

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Neuropathologie

**Analyse von Gliomen bezüglich ihrer Olig2- und FoxG1-
Expressionsverhalten und deren Zusammenhang mit H3F3A-
Mutationen**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schäfer, Sarah Theresia

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Schittenhelm

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Noell

Tag der Disputation: 19.09.2019

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
1.1	Gliale Tumore	10
1.1.1	Astrozytome	13
1.1.1.1	Diffuses Astrozytom WHO-Grad II	13
1.1.1.2	Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III	14
1.1.1.3	Glioblastom WHO-Grad IV	15
1.1.2	Oligodendrogliome	18
1.1.2.1	Oligodendrogliom WHO-Grad II	19
1.1.2.2	Anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III	19
1.2	Molekulare Marker	20
1.2.1	IDH-Mutationen	20
1.2.2	ATRX-Verlust	21
1.2.3	1p/19q-Kodeletion	22
1.2.4	MGMT-Promotorhypermethylierung	22
1.2.5	Olig2	23
1.2.6	FoxG1	24
1.3	Fragestellung	24
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Auswahl und Definition der Gewebeproben	26
2.1.1	Verteilung der Tumorentitäten im Gesamtkollektiv	28
2.1.2	Geschlechterverteilung	30
2.1.3	Durchschnittliches Patientenalter	30
2.1.4	Lokalisationsverteilung	31
2.1.5	Verhältnis von Primär- und Rezidivtumoren	31
2.2	Herstellung der histologischen Präparate	32
2.3	Tissue Microarrays (TMA)	32
2.4	Immunhistochemie	34
2.4.1	Avidin-Biotin-Methode	34
2.4.2	Verwendete Antikörper	35

2.4.3	Automatisierte immunhistochemische Färbung – das OptiView-Verfahren.....	36
2.5	Lichtmikroskopische Auswertung	38
2.6	Statistische Auswertung	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	FoxG1.....	40
3.1.1	FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Tumorentität	42
3.1.2	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades	43
3.1.3	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts	44
3.1.4	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Alters	44
3.1.5	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Rezidiv-Status	45
3.1.6	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Sekundärstatus in Glioblastomen.....	45
3.1.7	FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation	46
3.1.8	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des IDH-Mutationsstatus	47
3.1.9	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des ATRX-Status.....	48
3.1.10	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des MGMT-Promotormethylierungsstatus	49
3.1.11	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des 1p/19q-Kodeletionsstatus	49
3.1.12	FoxG1-Expression Überblick.....	49
3.2	Olig2	50
3.2.1	Olig2-Expression im Vergleich der einzelnen Entitäten	51
3.2.2	Olig2-Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades	52
3.2.3	Olig2-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts	53
3.2.4	Olig2-Expression in Abhängigkeit des Alters	53
3.2.5	Olig2-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Rezidiv-Status	54
3.2.6	Olig2-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Sekundärstatus in Glioblastomen.....	54
3.2.7	Olig2-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation.....	55
3.2.8	Olig2-Expression in Abhängigkeit des IDH-Mutationsstatus.....	57
3.2.9	Olig2-Expression in Abhängigkeit des ATRX-Status	57

3.2.10	Olig2-Expression in Abhängigkeit des MGMT-Promotormethylierungsstatus	58
3.2.11	Olig2-Expression in Abhängigkeit des 1p/19q-Kodeletionsstatus...	58
3.2.12	Olig2-Expression Überblick	58
3.3	Korrelation von FoxG1 und Olig2	59
3.4	H3F3A-mutierte Tumore	59
3.4.1	FoxG1-Expression in Abhängigkeit des H3F3A- Mutationsstatus ..	59
3.4.2	Olig2-Expression in Abhängigkeit des H3F3A- Mutationsstatus.....	60
3.4.3	ROC-Analysen.....	61
3.4.4	FoxG1- Und Olig2-Expression in H3F3A-mutierten Tumoren im Überblick	63
3.5	Molekulare Subgruppen.....	64
3.5.1	FoxG1-Expression in Abhängigkeit von molekularen Untergruppen	64
3.5.2	Olig2-Expression in Abhängigkeit von molekularen Untergruppen.	65
3.6	Überlebensanalysen	67
3.6.1	Repräsentativität des Patientenkollektivs	67
3.6.2	Überlebensanalyse FoxG1	67
3.6.2.1	Parametrische Überlebensanalyse.....	67
3.6.2.2	Überlebensanalyse (Survival) nach Kaplan-Meier.....	68
3.6.3	Überlebensanalyse Olig2	69
3.6.3.1	Parametrische Überlebensanalyse.....	69
3.6.3.2	Überlebensanalyse (Survival) nach Kaplan-Meier.....	70
3.6.4	Multivariate Überlebensanalyse	71
4	DISKUSSION	72
4.1	FoxG1 und Olig2 als prognostische und diagnostische Marker.....	72
4.1.1	FoxG1.....	73
4.1.2	Olig2.....	76
4.1.3	Relevanz von FoxG1 und Olig2 zur Detektion von H3F3A-Mutationen.....	81
4.2	Limitationen der Studie	84

4.3	Schlussfolgerung	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	90
7	TABELLENVERZEICHNIS	92
8	LITERATURVERZEICHNIS	93
9	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	106
10	VERÖFFENTLICHUNG.....	107
11	ANHANG.....	108
11.1	Exemplarische FoxG1- und Olig2-Expression	108
11.2	Karnowsky-Index	109
11.3	Datentabellen	110
12	DANKSAGUNG	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ampl.	Amplifikation
ATRX	α -thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked
AUC	area under the curve
BTIC	brain tumor initiating cell
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
Chr.	Chromosom
CNV	copy number variation
del.	Deletion
DIPG	diffuses intrinsisches Ponsgliom
DNA	desoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
FISH	fluorescence in situ hybridization
F/M	female/male
FoxG1	forkhead box transcription factor G1
GBM	Glioblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin (Färbung)
H3F3A K27M	Mutation im H3F3A-Gen an Stelle K27
H3F3A G34R	Mutation im H3F3A-Gen an Stelle G34
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
KI	Konfidenzintervall
LOH	loss of heterozygosity
Max	Maximum
Min	Minimum
MGMT	O ⁶ -methylguanine-DNA-methyltransferase
MIB-1	molekular immunology borstel 1

M/U	methyliert/unmethyliert
mRNA	messenger ribonucleic acid
mut	mutiert
MW	Mittelwert
MYCN	n-myc (Proto-Onkogen-Protein)
n	Anzahl (Patienten/Proben)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF1	Neurofibromin 1
Non-WNT/Non-SHH	non-wingless-Int1-pathway/non-sonic hedgehog
NOS	not other specified
o.A.	ohne Angaben
PCR	polymerase chain reaction
PCV	Chemotherapie-Kombination aus Procarbazin, Lomustin und Vincristin
PDGRF	platelet-derived growth factor receptor
PNET	primitive neuroectodermal tumor
Prim./Sek.	primär/sekundär
RTK	Rezeptorthyrosinkinase
s.	siehe
SD	Standardabweichung
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF- β	transforming growth factor beta
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor Nodus Metastase (Tumor-Klassifikation)
TP53	Tumorsupressor p53
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Gliale Tumore

Gliome sind mit circa 80% die häufigsten malignen primären intrakraniellen ZNS-Tumore (Ostrom et al. 2017). Die Inzidenz ist stark von Tumorentität, Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Region und Rasse abhängig und beträgt weltweit geschätzt 3,4 pro 100.000 Personen pro Jahr, wobei die Inzidenz mit 5,1/100.000 in weit entwickelten Ländern höher ausfällt als in weniger entwickelten Ländern mit einer Inzidenz von circa 3,0/100.000. (Ferlay et al. 2015) Laut dem amerikanischen Hirntumorregister (CBTRUS) Report 2017 betrug die Inzidenz in den USA zwischen 2010 und 2014 7,15/100.000 (Ostrom et al. 2017). Gliome treten mit 55% bei Männern etwas häufiger auf als bei Frauen (Ostrom et al. 2015). Es besteht eine Korrelation zwischen Alter und Malignitäts-Grad, wobei mit zunehmendem Alter eher höhergradige Tumore zu erwarten sind (Louis et al. 2016). Einige genetische Erkrankungen sind mit einem vermehrten Vorkommen von Gliomen assoziiert, darunter unter anderem Neurofibromatose, Tuberöse Sklerose, Lynch-Syndrom und Li-Fraumeni-Syndrom (Goodenberger et al. 2012). Ein erhöhtes Risiko für Gliomentstehung besteht außerdem unter erhöhter Belastung mit ionisierender Strahlung, während eine Atopie oder Allergie mit einem verminderten Gliom-Risiko assoziiert sind (Sadetzki et al. 2005, Linos et al. 2007, Bondy et al. 2008).

Gliome metastasieren nur in extrem seltenen Fällen extrakraniell, weshalb sie nicht nach der sonst bei Tumoren üblichen TNM-Klassifikation eingeteilt werden, sondern nach WHO-Graduierung in die Malignitäts-Grade I-IV (Lun et al. 2011, Louis et al. 2016). Die Einteilung nach WHO-Grad wird anhand histologischer Kriterien wie Mitoserate, nukleäre Atypien, Zellzahl, Pleomorphie, Nekrosen und Endothelproliferation und somit nach dem zu erwartenden Malignitäts-Grad bestimmt (Louis et al. 2016). In dieser Arbeit werden ausschließlich die miteinander verwandten diffusen Gliome analysiert (s. Abbildung 2), welche von der WHO als Astrozytome WHO-Grad II, anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, Glioblastome WHO-Grad IV, Oligodendrogliome WHO-Grad II und anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III klassifiziert werden (Louis et al.

2016). Andere Entitäten wie zum Beispiel Ependymome oder pilozytische Astrozytome (s. Abbildung1), welche häufig zur Gruppe der Gliome gezählt werden, werden hier nicht berücksichtigt (Ostrom et al. 2017).

Diffuse Gliome werden als solche bezeichnet, da sie als nahezu einzige Tumore das Neuropil, vor allem subkortikal und im Marklager, diffus infiltrieren. Sie breiten sich zwischen neuronalen Netzwerken aus, was die Tumorgrenzen schlecht identifizierbar macht und zu ihrer schlechten Therapierbarkeit beiträgt. (Claes et al. 2007) Bei Erwachsenen treten diffuse Gliome hauptsächlich supratentoriell im Frontal- und Temporallappen auf, während die bei Kindern häufiger auftretenden Lokalisationen im Kleinhirn und Hirnstamm bei Erwachsenen seltener sind. (Larjavaara et al. 2007, Louis et al. 2007, Wu et al. 2012, Ostrom et al. 2017)

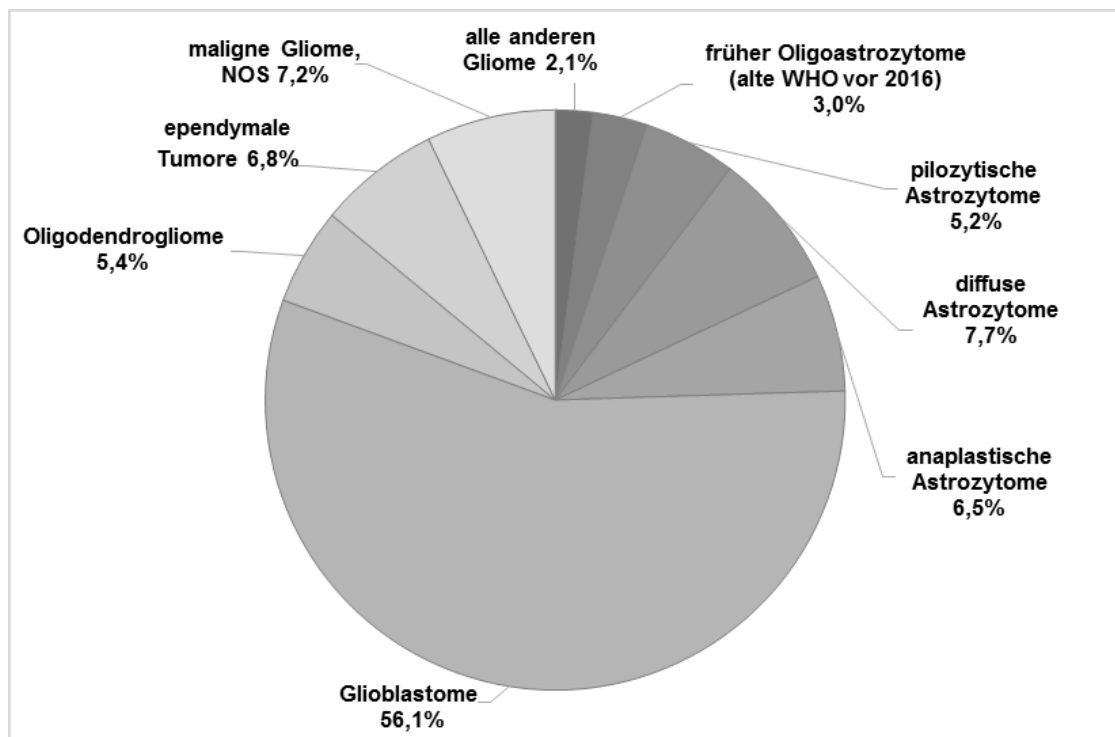
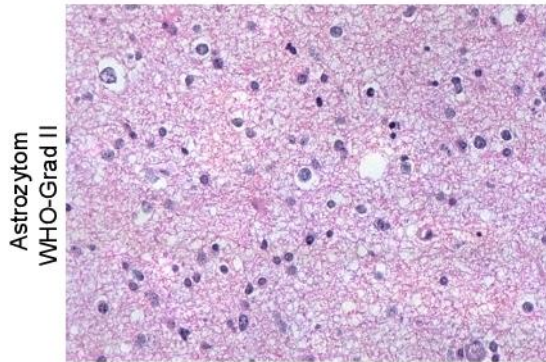
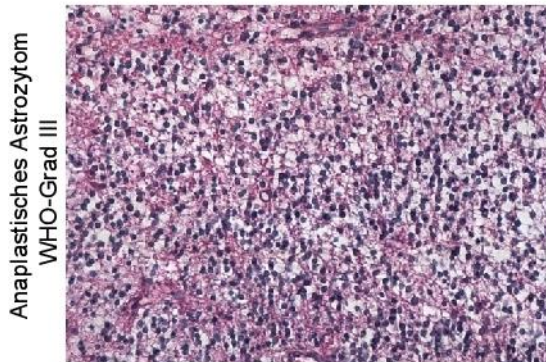


Abbildung 1: Verteilung der von primären Hirntumoren und anderen ZNS-Tumoren nach histologischem Subtyp. Abbildung modifiziert nach (Ostrom et al. 2017), Auswertung von 2010-2014 in der USA diagnostizierten primären Hirntumoren und anderen ZNS-Tumoren.

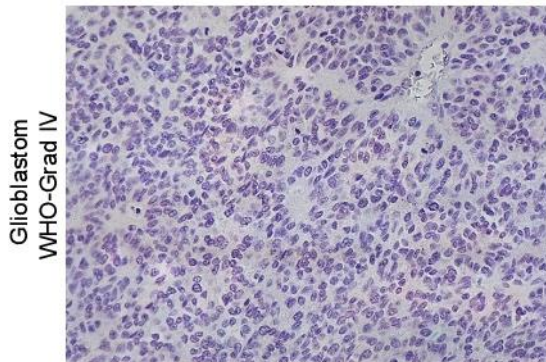
Astrozytome



Astrozytom
WHO-Grad II

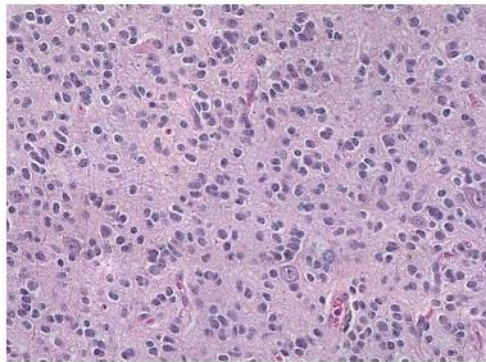


Anaplastisches Astrozytom
WHO-Grad III

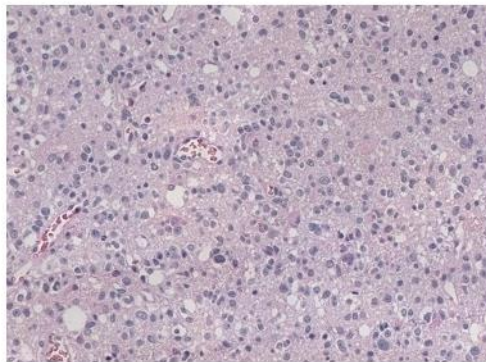


Glioblastom
WHO-Grad IV

Oligodendrogliome



Oligodendrogliom
WHO-Grad II



Anaplastisches Oligodendrogliom
WHO-Grad III

Abbildung 2: Diffuse Gliome in HE-Färbung (mit Zeiss Mirax Scanner digitalisiert).

1.1.1 Astrozytome

Astrozytome sind diffuse Gliome mit einem sehr heterogenen histologischen Erscheinungsbild. Sie weisen eine astrozytäre Zellcharakteristik und je nach WHO-Grad eine niedrige bis hohe Hyperzellularität auf. Zu den diffusen astrozytären Tumoren des ZNS zählen diffuse Astrozytome WHO-Grad II, anaplastische Astrozytome WHO-Grad III und Glioblastome WHO-Grad IV. Diese werden nach WHO-Klassifikation von 2016 jeweils in IDH-mutiert, IDH-Wildtyp und NOS (not other specified, kein IDH-Mutationsstatus erhebbar) eingeteilt (s. auch Kapitel 1.2.1). Weitere nicht diffus wachsende astrozytäre Tumore wie zum Beispiel pilozytische oder pilomyxoide Astrozytome, subependymale Riesenzellastrozytome oder Xanthoastrozytome werden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. (Burger et al. 1989, Louis et al. 2016) Auf Grund des fließenden Überganges zwischen den WHO-Graden reichen histologische Kriterien vor allem in Grenzfällen häufig nicht aus, um WHO-Grade exakt zu differenzieren. Hier können molekulare Marker wie der Proliferationsmarker MIB-1, IDH-Mutationsstatus oder ATRX-Status herangezogen werden. (Neder et al. 2004, Killela et al. 2014, Louis et al. 2016)

1.1.1.1 Diffuses Astrozytom WHO-Grad II

Diffuse Astrozytome WHO-Grad II zählen zu den niedermalignen Gliomen. Mit circa 7,7% bilden sie nach den Glioblastomen die zweitgrößte Gruppe der Gliome (s. Abbildung 1) und haben ein mittleres Manifestationsalter von etwa 40 Jahren. (Arora et al. 2009, Ostrom et al. 2017) Die Inzidenz liegt bei 0,26 bis 0,48/100.000 Personen pro Jahr, wobei die Inzidenz wie bei allen diffusen Gliomen mit dem Alter ansteigt (Okamoto et al. 2004, Ostrom et al. 2017). Männer sind mit 1,7:1 häufiger betroffen als Frauen (Okamoto et al. 2004).

Diffuse Astrozytome sind langsam wachsende Tumore, welche jedoch in höhergradige Astrozytome übergehen können (Louis et al. 2007, Wen et al. 2008). Sie weisen, im Gegensatz zu normalem Hirngewebe, Zellatypien und eine niedrige bis moderate Hyperzellularität auf. Häufig zeigen sich Mikrozysten und ein fibrillärer Hintergrund, welcher meist gut differenzierten astrozytischen

Charakter aufweist. Zu den häufigsten genetischen Alterationen in diffusen Astrozytomen zählen IDH1- und IDH2-Mutationen, welche mit einer deutlich besseren Prognose als IDH-Wildtyp-Tumore einhergehen. Zudem finden sich in bis zu 60% TP53-Mutationen, welche dagegen mit einem schlechteren Überleben assoziiert sind. (Ohgaki et al. 2011)

Die Therapie besteht in erster Linie aus der Tumorresektion. Bei nicht möglicher oder nicht vollständiger Resektion kommen zusätzlich Radiotherapie und Chemotherapie zum Einsatz. (McGirt et al. 2008, Wen et al. 2008) Das mittlere Überleben beträgt mehr als fünf Jahre, die 5-Jahre Überlebensrate circa 50% (Louis et al. 2007, Ostrom et al. 2017).

1.1.1.2 Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III

Anaplastische Astrozytome WHO-Grad III machen etwa 6,5% aller Gliome aus (s. Abbildung 1). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt etwa 50 Jahren. Die Inzidenz liegt zwischen 0,35 und 0,4/100.000 pro Jahr, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter von 0,09/100.000 bei Kindern bis zu 0,84/100.000 bei Senioren steigt. Bei Männern treten anaplastische Astrozytome mit einer Ratio von circa 1,2:1 häufiger auf als bei Frauen. (Smoll et al. 2014, Shin et al. 2016, Ostrom et al. 2017) Anaplastische Astrozytome WHO-Grad III sind aggressiver und schneller wachsend als diffuse Astrozytome WHO-Grad II und können ebenso in sekundäre Glioblastome übergehen (Louis et al. 2007, Wen et al. 2008). Zusätzlich zu einer moderaten bis hohen Hyperzellularität zeigen sie eine erhöhte mitotische Aktivität und den Übergang zu weniger differenzierten Zellen, allerdings keine Nekrosen oder Gefäßproliferationen. IDH-Mutationen, ATRX-Verlust und TP53-Mutationen sind die häufigsten genetischen Alterationen in anaplastischen Astrozytomen. Da IDH-Mutation und ATRX-Verlust in primären Glioblastomen nur äußerst selten vorkommen (s. Kapitel 1.1.1.3), können sie zur Unterscheidung von primären und sekundären, aus niedermalignen Astrozytomen entstandenen, Glioblastomen beitragen. (Killela et al. 2014)

Eine komplette operative Entfernung des Tumors ist häufig auf Grund des infiltrativen Wachstums nicht möglich. Die Therapie besteht deshalb zusätzlich aus Radiotherapie und eventuell kombinierter oder alleiniger adjuvanter

Chemotherapie mit Temozolomid. (Wen et al. 2008) Das mittlere Überleben bei Diagnosestellung eines anaplastischen Astrozytoms WHO-Grad III liegt bei zwei bis drei Jahren (Louis et al. 2007, Louis et al. 2016). Die 5-Jahre Überlebensrate beträgt circa 30% (Ostrom et al. 2017).

1.1.1.3 Glioblastom WHO-Grad IV

Glioblastome sind mit über 50% die häufigsten Gliome (s. Abbildung 1) und stellen eine sehr heterogene Gruppe mit besonders ungünstiger Prognose dar (Louis et al. 2016). Sie sind astrozytären Ursprungs und werden nach WHO-Klassifikation dem WHO-Grad IV zugeordnet (Louis et al. 2016). Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 64 Jahren sind sie ein Tumor des Erwachsenenalters und treten selten bei Kindern auf. Die Inzidenz liegt bei circa 3,19 pro 100.000 Personen und steigt mit dem Patientenalter an, bis sie ab circa 85 Jahren wieder abfällt. (Ostrom et al. 2013, Thakkar et al. 2014) Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Thakkar et al. 2014). Circa 90% der Glioblastome sind primäre, de novo entstandene Glioblastome, welche vermehrt in älteren Patienten auftreten. Sekundäre Glioblastome, welche aus niedermalignen astrozytären Tumoren entstehen, sind seltener, haben eine bessere Prognose und treten eher bei jüngeren Patienten auf. Zudem tragen sie im Gegenteil zu primären Glioblastomen häufig eine IDH-Mutation. (Ohgaki et al. 2013) Nach WHO-Klassifikation 2016 werden Glioblastome deshalb in Glioblastome IDH-Wildtyp (entsprechen meist primären GBM; darunter zusammengefasst sind großzelliges GBM, Gliosarkom und neu auch das epitheloide GBM), Glioblastome IDH-mutiert (circa 10% der GBM, mit sekundären GBM assoziiert) und Glioblastome NOS (kein IDH-Mutationsstatus erhebbar) eingeteilt (Louis et al. 2016).

Glioblastome sind am häufigsten supratentoriell (frontal, temporal, parietal und occipital) lokalisiert (Chakrabarti et al. 2005). Das aktuelle Therapie-Regime besteht aus operativer Entfernung des Tumors, was sich auf Grund des infiltrativen Wachstums häufig schwierig erweist, gefolgt von Bestrahlung kombiniert mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid und einer adjuvanten Erhaltungs-Chemotherapie mit Temozolomid (Stupp et al. 2005).

Trotz maximaler Therapie liegt das mittlere Überleben bei nur 14-15 Monaten und die 5-Jahres-Überlebensrate bei 5,5%. Das Überleben ist dabei vor allem von Resektionsvollständigkeit, Performance (Karnofsky-Index s. Anhang Kapitel 11.2), Patientenalter und MGMT-Status (s. Kapitel 1.2.4) abhängig. (Hegi et al. 2005, Stupp et al. 2009, Thakkar et al. 2014, Wilson et al. 2014, Ostrom et al. 2017)

Glioblastome können sich histologisch sehr heterogen darstellen. Im Allgemeinen sind sie als Zeichen ihrer Malignität schlecht differenziert und zellreich, zeigen pleomorphe Zellen und weisen eine hohe Mitoserate auf. Zudem sind Nekrosen und Gefäßproliferationen vorhanden. (Burger et al. 1989)

Primäre Glioblastome weisen häufige Mutationen in EGFR, TP53, PTEN, RB1, NF1 und Deletionen in CDKN2A auf. (Cancer Genome Atlas Research 2008, Parsons et al. 2008, Brennan et al. 2013)

Molekulare Subgruppen von Glioblastomen

Glioblastome sind sowohl in ihrem histologischen Erscheinungsbild, als auch auf molekularer Ebene eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren. Dies führt unter anderem zusammen mit der genetischen Evolution von Rezidivtumoren zu Resistenzen gegen konventionelle Therapien und wird als eine der Ursachen für Therapieversagen erachtet. Genetischen Analysen und molekulare Charakterisierung könnten bei der Vorhersage von Therapieansprechen behilflich sein. (Sottoriva et al. 2013, Ellis et al. 2015) So gibt es mittlerweile starke Hinweise, dass sich molekulare Subgruppen von Glioblastomen unterscheiden lassen, welche unter anderem anhand von Hotspot-Mutationen, Veränderung der Kopienzahl und dem DNA-Methylierungsmuster identifiziert werden können. Sturm et al. benennen sechs international anerkannte Subgruppen von Glioblastomen (s. Tabelle 1), welche innerhalb der Subgruppen zusätzlich zu ähnlichen molekularen Merkmalen auch ähnliche klinische Merkmale wie Lokalisation oder Alter aufweisen. (Sturm et al. 2012) Zuvor wurden bereits von dem „The Cancer Genome Atlas“ Netzwerk (TCGA) Transkriptionsprofile erstellt, welche die molekularen Subgruppen „proneural“, „neural“, „mesenchymal“ und „classic“ identifizieren konnten. (Verhaak et al.

2010) Einige Gruppen dieser Autoren überschneiden sich in ihrem genetischen Profil. So zeigt die Subgruppe „RTK I“ (Rezeptorthyrosinkinase I) von Sturm et al. ein der „proneuralen“ Gruppe entsprechendes Expressionsmuster und ist mit höherer PDGFR-Amplifizierung als in allen anderen Gruppen assoziiert. Die Gruppe „RTK II“ (Rezeptorthyrosinkinase II) zeigt dagegen ein der „Classic“-Gruppe entsprechendes Profil mit häufiger EGFR-Amplifikation, homozygoter CDKN2A-Deletion und zusätzlichem Chromosom 7 und Chromosom 10 Verlust. Diese Subgruppe beinhaltet ausschließlich adulte und keine pädiatrischen Glioblastome. Die Gruppe der „mesenchymalen“ Glioblastome weist ein Methylierungsmuster auf, welches normalem Hirngewebe am ähnlichsten ist und zeigt keine charakteristische Mutation. Sturm et al. identifizierten zusätzlich drei weitere Subgruppen, welche hauptsächlich in pädiatrischen Glioblastomen zu finden sind. Die Subgruppe „IDH“ enthält alle IDH-mutierten Glioblastome und zeigt eine globale Hypermethylierung (G-CIMP+). Sie überschneidet sich mit den häufig IDH-mutierten sekundären Glioblastomen und ist mit signifikant besserem Überleben als die beiden H3F3A-mutierten Gruppen „G34“ und „K27“ und anderen IDH-Wildtyp-Tumoren assoziiert. IDH-Mutation und H3F3A-Mutation schließen sich hierbei aus. Circa ein Drittel aller pädiatrischen Glioblastome weisen eine Mutation im H3F3A-Gen auf. Das Gen kodiert für das replikationsunabhängige Histon H3.3 und die Mutationen in kindlichen Glioblastomen führen zu einem Aminosäuren-Austausch an den Lokalisationen K27 oder G34. H3F3A-Mutationen sind mit bestimmten epigenetischen Veränderungen und Methylierungsmustern assoziiert. Die Subgruppe „K27“ der H3F3A-mutierten Tumore ist prognostisch ungünstig, enthält fast ausschließlich Mittellinien-Tumore und tritt vor allem bei Kindern auf, während die Gruppe „G34“ vor allem aus Adoleszenten und jungen Erwachsenen besteht und hauptsächlich in den beiden Gehirnhälften außerhalb der Mittellinie lokalisiert ist. (Schwartzentruber et al. 2012, Sturm et al. 2012)

Tabelle 1: Epigenetische und biologische Subgruppen von Glioblastomen. Modifiziert nach (Sturm et al. 2012).

GBM Subgruppe	IDH	K27	G34	RTK I	Mesenchymal	RTK II
<i>Mutationen/ Zytogenetik</i>	IDHmut	H3F3Amut K27	H3F3Amut G34	PDGFRA ampl.	CNV low keine charakteristische Mutation	EGFR ampl. Chr. 7+10 Verlust
	TP53mut	TP53mut	TP53mut	CDKN2A del.		CDKN2A del.
<i>IHC-Marker</i>	IDH1	Olig2+/FoxG1-	Olig2-/FoxG1+	Olig2+/FoxG1+	Olig2+/FoxG1+	Olig2+/FoxG1+
<i>Gen- Expression</i>	proneural	proneural	gemischt	proneural	mesenchymal	Klassisch
<i>Charakteristik</i>	prognos- tisch günstig	v.a. pädiatrische GBM	v.a. pädiatrische GBM			nur adulte GBM
	häufig sekundäre GBM	prognostisch ungünstige Mittellinien- tumore				

1.1.2 Oligodendrogliome

Oligodendrogliome sind diffus wachsende Tumore. Sie machen weniger als 10% aller Gliome aus und weisen im Gegensatz zu Astrozytomen ein eher monotones Zellbild auf. Zu ihnen zählen low-grade Oligodendrogliome WHO-Grad II und anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III. Histologisch zeigen sich isomorphe, runde Zellkerne mit kleinem Nucleolus und wenig Zytoplasma. Charakteristisch ist zudem ein perinukleärer Halo, ein Fixierungsartefakt, welches die typische „Honigwaben-“, oder „Spiegelei-Struktur“ hervorruft. Dieser kann in Gefrierschnitten oder schnell fixiertem Gewebe allerdings fehlen. Auch Mikroverkalkungen und kleine Kapillaren zeigen sich häufig in oligodendroglialen Tumoren. (Wesseling et al. 2015, Louis et al. 2016, Ostrom et al. 2017)

Nach WHO-Klassifikation von 2016 zählen zu den Diagnosekriterien eines oligodendroglialen Tumors eine Kombination aus IDH-Mutationsnachweis und 1p/19q-Kodeletion. Ist eine Bestimmung dieser Marker nicht möglich, werden die Oligodendrogliome oder anaplastischen Oligodendrogliome mit NOS (not other specified) bezeichnet. (Louis et al. 2016)

Oligodendrogliome treten vor allem in der vierten und fünften Lebensdekade auf. Männer sind dabei etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Tumore sind

hauptsächlich supratentoriell lokalisiert, wobei der Frontallappen die prädominante Lokalisation darstellt. Patienten präsentieren sich meist mit Krampfanfällen, welche sowohl tonisch-klonisch generalisiert als auch fokal auftreten können (Wiesmann et al. 2015). Weitere Symptome können Kopfschmerzen, verändertes Bewusstsein oder Übelkeit sein (Koeller et al. 2005). Das Therapieregime besteht je nach Ausbreitung und Resektionsstatus aus Operation, Radiotherapie und Chemotherapie (Wesseling et al. 2015). Eine 1p/19q-Kodeletion korreliert mit gutem Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Procarbazin, Lomustin und Vincristin (PCV). Somit zeigen oligodendrogliale Tumore häufig eine bessere Therapierbarkeit und eine günstigere Prognose als andere diffuse Gliome. (Cairncross et al. 1998, Ostrom et al. 2017)

1.1.2.1 Oligodendrogliom WHO-Grad II

Oligodendrogliome WHO-Grad II sind low-grade Oligodendrogliome mit einer Inzidenz von circa 0,24/100.000. Sie zeigen ein langsames Wachstum und eine günstigere Prognose als die meisten anderen diffusen Gliome mit einem mittleren Überleben von ungefähr 12 Jahren und einer 5-Jahre-Überlebensrate von über 80%. Allerdings gehen sie im Verlauf annähernd alle Tumore in höher maligne Gliome über. (Okamoto et al. 2004, Wesseling et al. 2015, Ostrom et al. 2017) Oligodendrogliome WHO-Grad II zeigen gut differenzierte histologische Kriterien eines oligodendroglialen Tumors und weisen kaum oder keine Mitosen, keine Nekrosen und keine Gefäßproliferationen auf (Koeller et al. 2005).

1.1.2.2 Anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III

Anaplastische Astrozytome WHO-Grad III entstehen de novo oder sekundär aus low-grade Oligodendrogliomen. Die Inzidenz beträgt 0,19/100.000. Das mittlere Überleben liegt bei ungefähr ein bis drei Jahren, die 5-Jahre-Überlebensrate beträgt circa 57%, wobei die Überlebensdauer mit steigendem Alter bei Diagnosestellung sinkt. (Olson et al. 2000, Ohgaki et al. 2005, Ostrom et al. 2017) Im Gegensatz zu niedergradigen Oligodendrogliomen zeigen sich hier vermehrt Zellatypien, Mitosen und eine erhöhte Zellzahl (Koeller et al. 2005).

1.2 Molekulare Marker

Diffuse Gliome zeigen insgesamt eine ungünstige Prognose mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von maximal 35%. Ein Grund für die schlechte Prognose von diffusen Gliomen und deren schlechte Therapierbarkeit ist die intratumorale Heterogenität. Neueste Fortschritte in molekularer Diagnostik führen jedoch zur Identifikation von klinisch bedeutsamen genetischen Veränderungen und zu einem besseren Verständnis der Tumorphathogenese. So können einheitlichere molekulare Gruppen mit ähnlichen klinischen und prognostischen Charakteristika erstellt werden. (Lapointe et al. 2018) In der neuen WHO Klassifikation von 2016 wurden daher zusätzlich zu histologischen Kriterien molekulare Marker als Diagnosekriterien zur besseren Differenzierung der Entitäten und WHO-Grade und als Hilfe für prognostische Vorhersagen eingeführt (Louis et al. 2016). Einige dieser Marker wurden in dieser Arbeit zu Analyse Zwecken genutzt und sind im Folgenden erläutert.

1.2.1 IDH-Mutationen

Isocitrat-Dehydrogenasen (IDH) spielen im Zellmetabolismus eine wichtige Rolle und katalysieren die Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat durch Dekarboxylierung (Xu et al. 2004). Mutationen der NADP-abhängigen IDH1 und IDH2 treten häufig früh in der Entstehung von Gliomen auf und führen zur Akkumulation des Onkometaboliten D-2-Hydroxyglutarat (Dang et al. 2009, Watanabe et al. 2009). Es handelt sich um somatische Missens-Mutationen, im Falle von IDH1 in Codon 132 und im Falle von IDH2 in Codon 172. Die mit 90% häufigste Mutation an Position IDH1 R132H kann mit Hilfe eines mutationsspezifischen Antikörpers immunhistochemisch (IHC) detektiert werden. In IHC-negativen Fällen ist eine anschließende Sequenzierung sinnvoll, um andere Hotspot-IDH-Mutationen auszuschließen. IDH-Mutationen treten in circa 70-80% aller Grad II und Grad III Gliome und sekundären Glioblastome auf, wobei oligodendrogliale Tumore eine höhere Mutationsrate aufweisen als astrozytäre Tumore. Als wichtige Schlüsselmutationen in Gliomen wurden sie zu den Diagnosekriterien der WHO-Klassifikation von 2016 aufgenommen. Eine

IDH-Mutation in Kombination mit 1p/19q-Kodeletion gilt nun als Diagnosekriterium für oligodendrogliale Tumore während eine IDH-Mutation ohne 1p/19q-Kodeletion für einen astrozytären Tumor spricht. Astrozytome werden seither in IDH-mutiert und IDH-Wildtyp unterteilt. IDH1- und IDH2-mutierte Tumore sind dabei mit einer deutlich besseren Prognose als IDH-Wildtyp Tumore assoziiert. (Cohen et al. 2013, Louis et al. 2016, van den Bent et al. 2017) In diffusen Gliomen könnte der IDH-Mutationsstatus sogar prognostisch aussagekräftiger sein als der WHO-Grad (Reuss et al. 2015). IDH-mutierte Gliome weisen ein höheres Ansprechen auf Chemotherapie auf (Houillier et al. 2010, Cairncross et al. 2014). Zudem zeigte sich eine erhöhte Radiotherapie-Sensitivität in IDH-mutierten Tumoren mit geringerer Produktion von NADPH (Molenaar et al. 2015).

1.2.2 ATRX-Verlust

ATRX (α -thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked) ist ein am Chromatinumbau beteiligtes Protein, welches für die Anlagerung von Histon H3.3 an die DNA verantwortlich ist (Clynes et al. 2013). Mutationen im ATRX-Gen führen zu einem X-linked Syndrom mit mentaler Retardierung in Kombination mit α -Thalassämie (ATRX-Syndrom). Ein kompletter ATRX-Verlust, meist verursacht durch eine Stopgain-Mutation, spielt dagegen eine Rolle in der Entstehung verschiedener Tumorarten, unter anderem derer von Gliomen. Ein ATRX-Verlust spricht für einen astrozytären Tumortyp und ist vor allem in IDH-mutierten Astrozytomen stark mit TP53-Mutationen assoziiert, während er eine 1p/19q-Kodeletion und somit einen oligodendroglialen Tumortyp nahezu ausschließt. Da er häufig bereits in WHO-Grad II Gliomen auftritt, scheint der ATRX-Verlust ein Treiber in der initialen Entstehung von IDH-mutierten Tumoren zu sein. ATRX-Verluste kommen allerdings auch häufig in pädiatrischen H3F3A-mutierten Tumoren vor, welche keine IDH-Mutation aufweisen. Im Allgemeinen zeigen Gliome mit ATRX-Verlust eine bessere Prognose als Tumore mit ATRX-Retention, also vorhandener ATRX-Expression. (Liu et al. 2012, Wiestler et al. 2013)

1.2.3 1p/19q-Kodeletion

Eine 1p/19q-Kodeletion entspricht einem kompletten Heterozygotie-Verlust (Loss of Heterozygosity, LOH) der Chromosomenarme 1p und 19q, welcher durch eine unbalancierte Translokation $t(1;19)(q10;p10)$ entsteht (Jenkins et al. 2006, Hoffmann et al.). Sie ist mit einer oligodendroglialen Tumormorphologie assoziiert und nach WHO-Klassifikation von 2016 Voraussetzung für die Diagnose eines Oligodendroglioms. (Aldape et al. 2007, Louis et al. 2016)

1p/19q-Kodeletionen in Gliomen sind mit deutlich längerem Überleben und besserem Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert (Felsberg et al. 2004, McDonald et al. 2005). Ein partieller Verlust der Chromosomenarme 1p und 19q zeigt dagegen keine verbesserte Prognose und spricht für astrozytäre Tumore (Mizoguchi et al. 2012).

Zur Detektion des Loss of Heterozygosity (LOH) werden häufig FISH-Analysen (fluorescent in situ hybridisation) bevorzugt, da hier im Gegensatz zur weit verbreiteten LOH-Analyse mit Mikrosatelliten-Marker-PCR keine Blutproben der Patienten benötigt werden. Allerdings besteht hier die Gefahr von falsch-positiven Proben im Falle von partiellen Deletionen. Es wird deshalb eine zusätzliche PCR empfohlen, welche Veränderungen an mehreren Loci detektieren kann. (Riemenschneider et al. 2010)

1.2.4 MGMT-Promotorhypermethylierung

MGMT (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase) ist ein DNA-Reparaturenzym, welches die DNA-Alkylierung durch alkylierende Chemotherapeutika rückgängig machen kann und so zu einer Resistenz gegen Alkylanzien führt. Alkylanzien sind Chemotherapeutika, welche vor allem durch die Alkylierung der O⁶-Position von Guanin eine für die Zelle letale Vernetzung der DNA hervorrufen und so zur Apoptose führen. Zu ihnen zählen unter anderem Procarbazin, Nitrosoharnstoffe und Temozolomid. Tumore ohne MGMT-Expression sprechen besser auf alkylierende Chemotherapeutika an, da hier nach Alkylierung keine DNA-Reparatur stattfindet. Eine MGMT-Expression bleibt vor allem durch epigenetische Prozesse aus, wobei insbesondere die Promotor-

Methylierung des MGMT-Gens eine große Rolle in der Tumorgenese spielt. Die MGMT-Promotorhypermethylierung ist somit auch ein prädiktiver Marker für das Ansprechen von Glioblastomen auf Temozolomid. (Esteller et al. 2000, Hegi et al. 2005)

1.2.5 Olig2

Olig2 (Oligodendrocyte lineage transcription factor 2) ist ein Transkriptionsfaktor der Helix-loop-helix Familie und wird ausschließlich im zentralen Nervensystem exprimiert. Er ist an der Entwicklung von oligodendroglialen Vorläuferzellen (OPCs) und anderen multipotenten neuronalen Progenitorzellen beteiligt und spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung von Gliomen. (Tsigelny et al. 2016) In der embryonalen Entwicklung unterdrückt Olig2 die Differenzierung von Progenitorzellen (Lee et al. 2005). Olig2 spielt eine essentielle Rolle in der Entstehung von oligodendroglialen Zellen und erwies sich als Marker für Oligodendrozyten in Normalhirngewebe (Takebayashi et al. 2002, Yokoo et al. 2004). In Gliomen wird Olig2 hingegen universell sowohl in oligodendroglialen, als auch astrozytären Tumoren heterogen exprimiert. In oligodendroglialen Tumoren scheint Olig2 allerdings stärker exprimiert zu werden als in astrozytären Tumoren. (Suzuki et al. 2014, Lu et al. 2016). Olig2 erwies sich als spezifischer Marker für progenitor-ähnliche Zellen in Glioblastomen, welche die Gliomentstehung initiieren und bewirkt durch TGF- β 2-Induktion ein invasives Tumorwachstum (Trepant et al. 2015, Singh et al. 2016). In stammzell-ähnlichen Tumorzellen reguliert Olig2 die Expression von EGFR und PDGFR α . In einer aktuellen Studie konnte durch Ausschalten von Olig2 in Gliomen mit proneuralem Profil (PDGFR α) eine Umwandlung in Gliome mit klassischem Profil (EGFR) beobachtet werden. Olig2 wird besonders stark in PDGFR α -amplifizierten Gliomen mit IDH1-Mutation exprimiert, welche eine verbesserte Prognose aufweisen. (Leelatian et al. 2016, Lu et al. 2016)

1.2.6 FoxG1

FoxG1 gehört zur Familie der Forkhead Box Transkriptionsfaktoren und spielt als transkriptiver Repressor eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Telencephalons (Roth et al. 2010). FoxG1-Mutationen sind unter anderem für das FoxG1-Syndrom verantwortlich, ein heterogenes klinisches Syndrom, welches auch als kongenitale Variante des Rett-Syndroms klassifiziert wird (Caporali et al. 2018).

Es wird angenommen, dass FoxG1-Mutationen in der Tumorgenese verschiedenster Tumore beteiligt sind, so auch an der Entstehung von Gliomen (Chan et al. 2009, Zhang et al. 2015). Bisher sind die genauen Mechanismen allerdings noch wenig erforscht. FoxG1 wird vor allem in schlecht differenzierten astrozytären Tumorzellen exprimiert und zeigt sich fast universell in Glioblastomen. Hier trägt FoxG1 durch Regulierung der Expression von Zellzyklus-regulierenden Genen zu Tumorgenese bei. (Verginelli et al. 2013) FoxG1 scheint zudem die Apoptose in Gliomzellen zu inhibieren und wird mit Zellproliferation in Verbindung gebracht (Chen et al. 2018). Eine hohe FoxG1-Expression scheint mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein, wofür ein negatives Outcome in Glioblastomen mit hohen FoxG1 mRNA-Leveln spricht (Robertson et al. 2015). Im Gegensatz dazu zeigt die prognostisch ungünstige Gruppe der K27 H3F3A-mutierten Glioblastome allerdings eine geringe FoxG1-Expression (Sturm et al. 2012).

1.3 Fragestellung

Tumorheterogenität stellt ein bedeutendes Problem in Hinblick auf Prognosevorhersagen und Therapieansprechen in Gliomen dar. Mit Hilfe von molekularen Markern wird aktuell daran gearbeitet, Subgruppen innerhalb der Tumorentitäten zu bilden, welche ähnliche klinische und pathologische Charakteristika aufweisen und somit zu individuelleren Therapieschemata führen könnten. (Galanis et al. 2011, Ellis et al. 2015) Ein Beispiel sind die von Sturm et al. identifizierten sechs epigenetischen Subgruppen von Glioblastomen (s. Kapitel 1.1.1.3). Neben unterschiedlichen Schlüssel-Mutationen,

Methylierungsmustern und DNA-Copynumber-Veränderungen wurden hier unterschiedliche Olig2- und FoxG1-Expressionsmuster entdeckt. So zeigten H3F3A K27-mutierte Tumore ein Olig2⁺/FoxG1⁻-Profil, während H3F3A G34-mutierte Tumore ein Olig2⁻/FoxG1⁺-Profil aufwiesen. (Sturm et al. 2012)

In der vorliegenden Studie sollen die Tumormarker Olig2 und FoxG1 nun mit Hilfe von Immunhistochemie an einem großen Tumorkollektiv mit erweiterten Tumorentitäten (astrozytäre und oligodendrogliale Tumore) zum einen auf ihr prognostisches Potential hin, zum anderen auf ihre Eignung für die Erkennung von H3F3A-Mutationen analysiert werden. Zudem wurde der Zusammenhang zwischen Olig2- und FoxG1-Expression und anderen klinischen oder pathologischen Parametern wie Lokalisation, Alter, Geschlecht, Rezidivstatus, Überleben, Tumorentität, WHO-Grad oder molekularen Markern wie IDH-Mutationsstatus, MGMT-Promotormethylierung, ATRX-Status und 1p19q-Kodeletion untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl und Definition der Gewebeproben

Das Gesamtkollektiv dieser Arbeit bestand aus 808 in Paraffin eingebetteten Gewebeproben glialer Tumore von insgesamt 500 Patienten, welche hauptsächlich in der Abteilung für Neurochirurgie der Universitätsklinik Tübingen im Zeitraum von 2000 bis 2015 operiert wurden. Einige wenige Tumorgewebeproben stammen aus dem Patientenkollektiv anderer Kliniken, die ihre Proben zur Referenzbegutachtung an die Neuropathologie Tübingen gesandt hatten. Sie wurden für diese Arbeit aus dem Tumorbank-Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie, Abteilung Neuropathologie, des Universitätsklinikums Tübingen zusammengetragen. Für alle Tumorbank-Proben ist eine Dokumentation der Einwilligung für die wissenschaftliche Verwendung des Restgewebes erfolgt (Nr. 456/2009BO2). Ein Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen für die Durchführung dieser Arbeit und die damit verbundene Untersuchung der Patientenproben liegt unter der Nr. 681/2013BO2 vor.

Patienteninformationen wie beispielsweise der Rezidiv-Status oder die Tumorlokalisierung wurden dem pathologischen Beauskunftungssystem Nexus pas.net (Patientendatenbank) des Universitätsklinikums Tübingen entnommen. Die Proben wurden von den Neuropathologen der Universität Tübingen, wo möglich, nach den neuen WHO-Richtlinien (Louis et al. 2016) klassifiziert. Fälle, deren Profil nach den neuen WHO-Kriterien der ursprünglichen vor 2016 gestellten Diagnose widersprachen und keine nachträglichen Diagnose-Marker erhoben werden konnten, wurden von der Analyse ausgeschlossen (s. Abbildung 3). Einige Fälle wurden zusätzlich zur pathologischen Referenzbegutachtung nach Bonn an das Hirntumorreferenzzentrum geschickt.

Um eine mögliche Heterogenität der Proben erfassen zu können, wurden die Gewebeproben der Patienten von denen mehrere Proben vorhanden waren für die Analysen zusammengefasst. Somit beziehen sich die statistischen

Auswertungen auf das Patientenkollektiv (n=500) und nicht auf das Gewebeprobenkollektiv (n=808).

Von den ursprünglich in die Analyse aufgenommenen 808 Gewebeproben (500 Patientenfälle) konnten letztendlich in 533 Proben (355 Patientenfällen) die FoxG1-Expression und in 557 Proben (361 Patientenfällen) die Olig2-Expression ausgewertet werden. Die anderen Gewebeproben konnten auf Grund von ungenügendem Tumorgewebe (<5%) oder zu schwacher immunhistochemischer Färbung nicht ausgewertet werden (s. Abbildung 3)

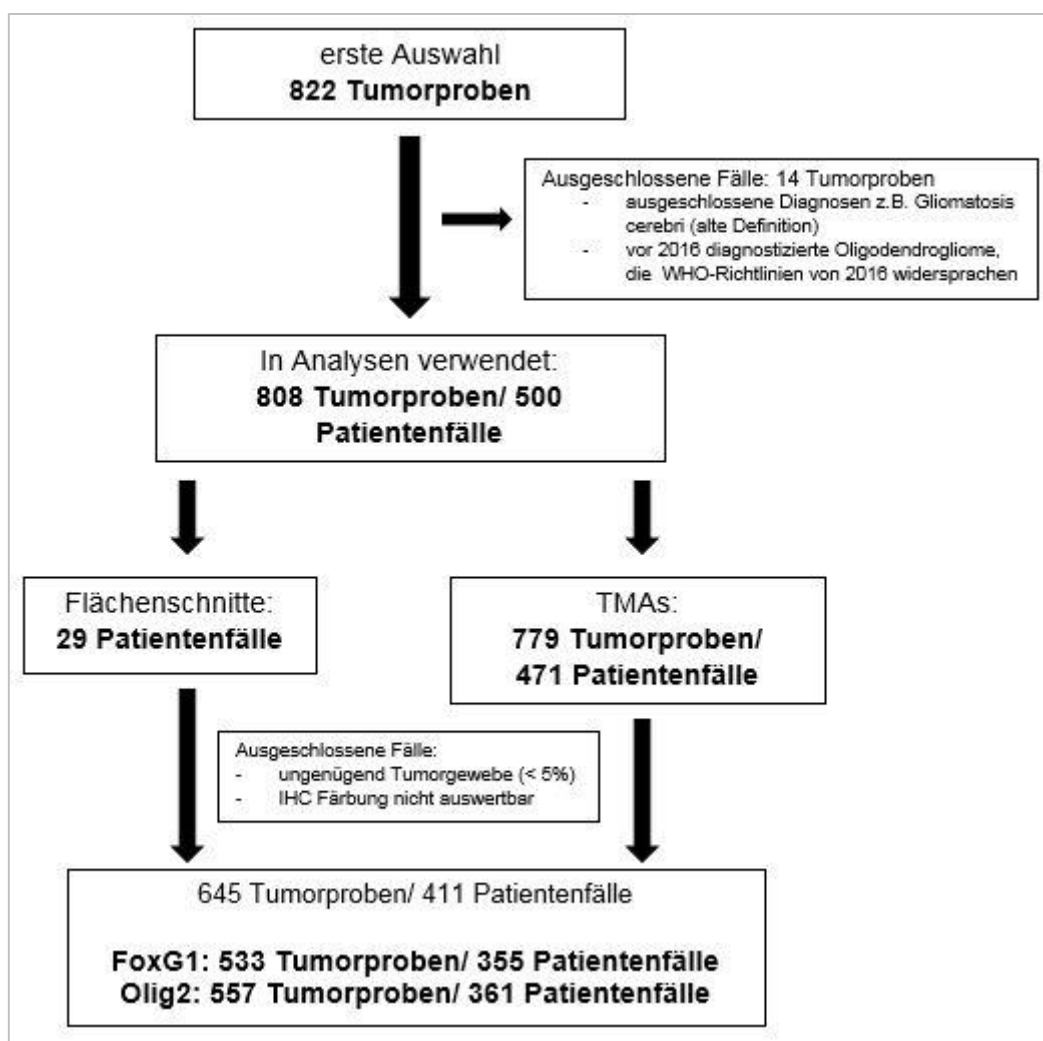


Abbildung 3: Anzahl der Tumorproben und Patientenfälle; modifiziert nach Schäfer et al. (Schäfer et al. 2018)

2.1.1 Verteilung der Tumorentitäten im Gesamtkollektiv

Unter den 808 für die Analyse verwendeten Gewebeproben des Gesamtkollektivs befanden sich 598 astrozytäre Tumore, darunter 96 Astrozytome WHO-Grad II, 116 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III und 386 Glioblastome WHO-Grad IV. Zudem enthielt das Gesamtkollektiv 76 Gewebeproben von Oligodendrogliomen WHO-Grad II und 134 von anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III. Andere Entitäten wie zum Beispiel pilozytische Astrozytome, ein Gangliogliom, ein primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) und eine Gewebeprobe einer Gliomatosis cerebri waren bereits nach der ersten Auswahl ausgeschlossen worden (s. Abbildung 3).

Im Patientenkollektiv (n=500) wiesen 408 Patienten einen astrozytären Tumor auf. Davon erhielten 82 Patienten die Diagnose Astrozytom WHO-Grad II, von denen 58% der auf IDH-Status analysierten Astrozytome WHO-Grad II (n=46 von 80 analysierten Astrozytomen) eine IDH-Mutation und 60% aller auf ATRX-Status untersuchten Astrozytome (n=39 von 65) einen ATRX-Verlust aufwiesen (MGMT methyliert/unmethyliert: 8/7). 91 der astrozytären Tumore waren anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, bei denen in 51% der auf IDH-Status analysierten anaplastischen Astrozytome (n=44 von 86) eine IDH-Mutation und in 57% der auf ATRX-Status analysierten anaplastischen Astrozytome (n=43 von 76) ein ATRX-Verlust vorlag (MGMT M/U: 5/15). 235 der Patienten hatten ein Glioblastom WHO-Grad IV (primäre GBM: n=218 (IDH-mutiert: 6%, n=11 von 178 analysierten primären GBM), sekundäre GBM: n=13 (IDH-mutiert: 54%, n=7 von 13 analysierten sekundären GBM), keine Angabe zu P/S-Status: n=4), von denen 13% (n=29 von 190) einen ATRX-Verlust zeigten (MGMT M/U: 61/88).

92 Patienten wiesen einen oligodendroglialen Tumor auf. 34 Tumorpatienten erhielten die Diagnose Oligodendrogliom WHO-Grad II, wobei 3% aller auf ATRX-Status untersuchten Oligodendrogliome WHO-Grad II (n=1 von 32) einen ATRX-Verlust aufwies (MGMT M/U: 5/1). 58 Patienten erhielten die Diagnose anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III, wobei 2% der auf ATRX-Status analysierten anaplastischen Oligodendrogliome (n=1 von 55) einen ATRX-Verlust aufwies (MGMT M/U: 17/2). Bei den oligodendroglialen Tumorentitäten

zeigten den aktuellen WHO-Richtlinien entsprechend 100% der Tumore eine IDH-Mutation. (Louis et al. 2016) Ebenso zeigten alle oligodendroglialen Tumore, bei denen eine Bestimmung des 1p/19q-Deletions-Status erfolgte, in 100% der analysierten Fällen eine 1p/19q-Kodeletion (Oligodendrogliom WHO-Grad II: n=14, anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III: n=16). (s. auch Anhang Tabelle 11 und 12)

Die IDH-Mutationstypen und ihre Verteilung im Gesamtkollektiv sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In 36 Patientenfällen war kein IDH-Status bekannt. Der ATRX-Status blieb in 82 Patientenfällen unbekannt. Beide Marker wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Immunhistochemie analysiert (s. auch Kapitel 2.4.2). Der MGMT-Promotormethylierungsstatus war in 291 Fällen nicht bekannt. Er wurde mit einer methylierungsspezifischen PCR (MSP PCR) ermittelt. In 62 oligodendroglialen Tumoren konnte kein 1p/19q-Kodeletionsstatus mehr erhoben werden, da keine Blutproben der Patienten für die Mikrosatelliten-Marker-PCR zur Verfügung standen, welche zur Detektion des Loss of Heterozygosity (LOH) durchgeführt wurde. 205 der 500 Gliome wurden auf ihren H3F3A-Status hin sequenziert (DNA-Sequenzierung), davon konnte in 24 astrozytären Tumoren eine H3F3A-Mutation detektiert werden (G34R n=9; K27M n=15). In 324 Tumoren wurde der K27M-Status zusätzlich mit Hilfe von Immunhistochemie (K27M-Antikörper) bestimmt. In 16 Fällen lag eine K27M-Mutation vor (ein Fall mehr als in den sequenzierten Tumoren).

Tabelle 2: Verteilung der IDH-Mutationstypen im Gesamtkollektiv.

IDH-Mutationstyp	Gewebeproben		Patientenfälle	
	<i>Anzahl</i>	<i>%</i>	<i>Anzahl</i>	<i>%</i>
R132C	7	1,0	6	1,3
R132G	2	0,3	1	0,2
R132H	333	49,4	183	39,4
R132S	1	0,2	1	0,2
R172K	7	1,0	5	1,1
R172M	4	0,6	2	0,4
R172S	3	0,5	2	0,4
WT (sequenziert)	27	4,0	23	5,0
IHC negativ	290	43,0	241	51,9
Gesamt	674	100	464	100

2.1.2 Geschlechterverteilung

Insgesamt wurden 201 Frauen und 299 Männer in die Studie eingeschlossen. Das Verhältnis von Frauen zu Männern betrug im gesamten Patientenkollektiv 1:1,49 (40,2% Frauen und 59,8% Männer). Der Frauenanteil bei Astrozytomen WHO-Grad II betrug 37,8%, der Männeranteil 62,2%. Die Gruppe der anaplastischen Astrozytome WHO-Grad III enthielt 38,5% Frauen und 61,5% Männer. Im Falle der Glioblastome WHO-Grad IV lag das Verhältnis von Frauen und Männern bei 40,0% Frauen zu 60,0% Männern und bei den Oligodendrogliomen WHO-Grad II bei 32,4% Frauen zu 68,6% Männern. Anaplastische Oligodendrogliome waren die einzige Gruppe in der das weibliche Kollektiv mit 51,7% die größere Gruppe im Vergleich zum männlichen Kollektiv mit 48,3% bildete. (s. auch Anhang Tabelle 11)

2.1.3 Durchschnittliches Patientenalter

Das gesamte Patientenkollektiv wies ein Durchschnittsalter von 50,8 Jahren (4-87 Jahre) auf. Das durchschnittliche Patientenalter der Astrozytome WHO-Grad II lag bei 44,5 Jahren (18-77 Jahre). Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Frauen lag bei 45,4 Jahren, bei Männern bei 44,0 Jahren. Bei anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III lag das Durchschnittsalter bei 45,2 Jahren (10-77 Jahre). Im weiblichen Kollektiv trat der Tumor durchschnittlich mit 46,3 Jahren auf, im männlichen mit 44,3 Jahren. Glioblastome WHO-Grad IV zeigten das höchste Durchschnittsalter der untersuchten Gruppen mit 57,2 Jahren (4-87 Jahre), wobei Frauen mit einem mittleren Alter von 61,3 Jahren ein etwas späteres Manifestationsalter aufwiesen als Männer mit einem mittleren Manifestationsalter von 54,5 Jahren.

Oligodendrogliome WHO-Grad II manifestierten sich im Durchschnitt mit 40,2 Jahren (16-67 Jahre), bei Frauen mit durchschnittlich 38,2 Jahren, bei Männern mit 41,2 Jahren. Das mittlere Alter bei anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III lag bei 48,4 Jahren (26-80 Jahre). Sie traten bei Frauen durchschnittlich mit 52,7 Jahren auf, Männer waren im Durchschnitt mit 43,9 Jahren früher betroffen. (s. auch Anhang Tabelle 11)

2.1.4 Lokalisationsverteilung

Die Lokalisationsverteilung der Tumore im Gesamtkollektiv ist in Abbildung 4 dargestellt. Am häufigsten traten Tumore mit jeweils etwa einem Drittel Anteil frontal und temporal auf. Tumore des Thalamus und der Stammganglien und infratentorielle Tumore waren nur wenige im Gesamtkollektiv enthalten.

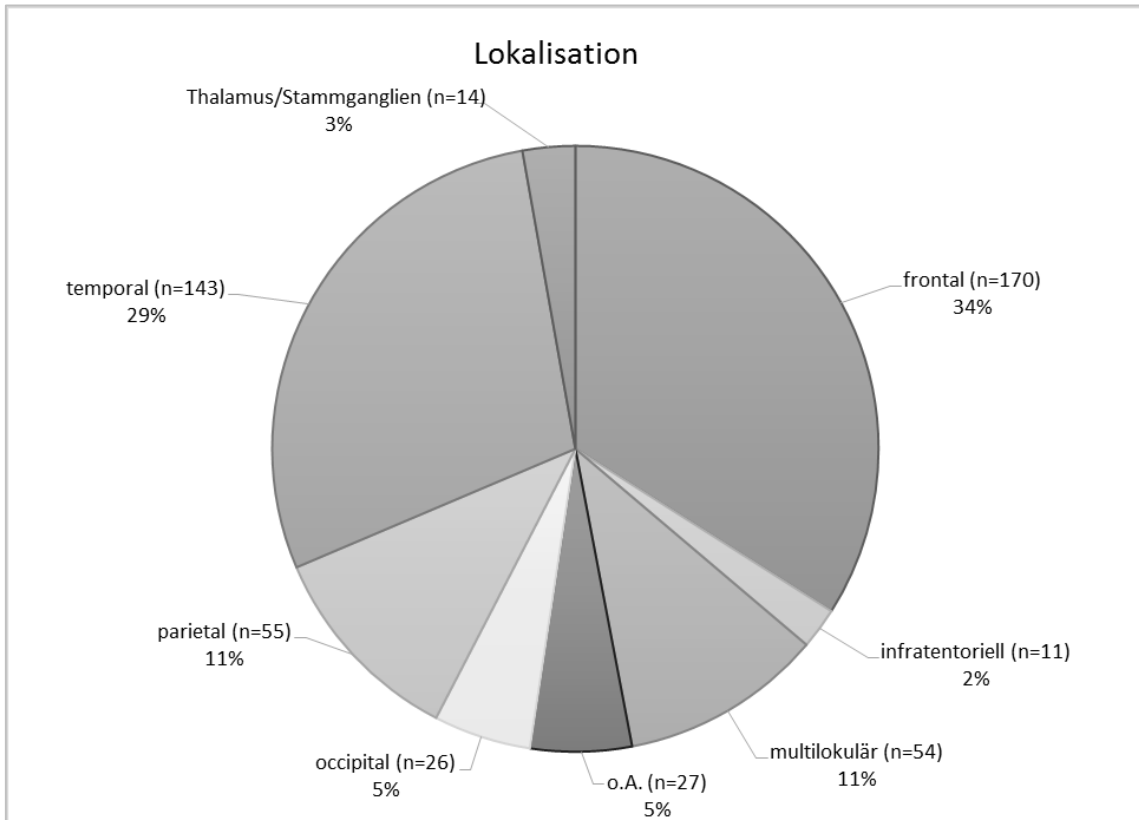


Abbildung 4: Verteilung der Tumorlokalisationen im Patientenkollektiv.

2.1.5 Verhältnis von Primär- und Rezidivtumoren

Das Verhältnis von Primär- und Rezidivtumoren im untersuchten Patientenkollektiv betrug 3,42:1. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 3. Mit Ausnahme der anaplastischen Oligodendrogliome handelte es sich überwiegend um Primärtumore. Im Falle eines Tumors lagen keine Informationen zu Primär-beziehungsweise Rezidiv-Status vor.

Tabelle 3: Verteilung der Tumore nach Primär- und Rezidivstatus im Patientenkollektiv.

Tumorentität	WHO-Grad	Anzahl	Primärtumor	Rezidivtumor
Astrozytome	II	82	70 (85%)	12 (15%)
Anaplastische Astrozytome	III	90	65 (72%)	25 (28%)
Glioblastome	IV	235	197 (84%)	38 (16%)
Oligodendrogliome	II	34	29 (85%)	5 (15%)
Anaplastische Oligodendrogliome	III	58	25 (43%)	33 (57%)
<i>Gesamt</i>	II-IV	499	386 (77%)	113 (23%)

2.2 Herstellung der histologischen Präparate

Das Tumorgewebe wurde zur Konservierung unverzüglich nach der operativen Entnahme in einer phosphatgepufferten Formalin-Lösung mit pH 7,4 fixiert. Im anschließenden Entwässerungsprozess wurden die Präparate mit Alkohol in steigender Konzentration gespült (steigende Alkoholreihe: 70%, 70%, 80%, 96%, 100%, 100%). Danach wurde ihnen in einem 1:1 Ethanol:Chloroform-Gemisch und darauffolgend in unverdünntem Chloroform Wasser entzogen. Die fixierten und entwässerten Gewebeprobe wurden anschließend in Paraffin eingebettet. Die daraus entstandenen Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) in circa 3 µm dünne Scheiben geschnitten, welche im Anschluss auf einen Superfrost Plus Objektträger der Firma R. Langenbrick (Labor- und Medizintechnik Emmendingen, Germany) aufgezogen wurden. (s. auch (Schwab 2013))

2.3 Tissue Microarrays (TMA)

Die Tissue Microarray Methode wurde 1998 entwickelt, um eine größere Anzahl an Tumorpräparaten in kürzerer Zeit mit gleichbleibender Qualität analysieren zu können. So können auf einem Paraffinblock bis zu 1000 Gewebezylinder von unterschiedlichen Tumoren untergebracht werden. Dies ermöglicht gleichbleibende Färbeverhältnisse auf allen Präparaten eines TMA-Blocks und vereinfacht die mikroskopische Begutachtung der Gewebeprobe, da eine große Menge an Gewebe mit weniger Materialaufwand (Tumorgewebe und

Färbesubstanzen) und ohne Wechseln des Objektträgers analysiert werden kann. (Kononen et al. 1998, Srinath et al. 2016)

Im Rahmen dieser Studie wurden drei Tissue Microarrays aus Gewebebiopsien von Oligodendrogliomen, anaplastischen Oligodendrogliomen, Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen neu konstruiert. Zusätzlich wurden 10 weitere Tissue Microarrays verwendet, die von anderen Doktoranden der Abteilung Neuropathologie der Universität Tübingen in den Jahren 2008 bis 2013 angefertigt wurden.

Die Paraffinblöcke der neu angefertigten Tissue Microarrays enthielten 70, 69 und 54 Gewebezyylinder (68, 67 und 52 Tumorgewebezyylinder und jeweils zwei Kontrollgewebezyylinder aus Muskelgewebe). Von einem Tumor wurden dabei meist zwei oder mehr Biopsiezyylinder verwendet, um eventuellen Probenverlusten vorzubeugen und repräsentative Ergebnisse zu gewinnen.

Zu Beginn der Herstellung der Tissue Microarrays wurden die gewünschten Gewebeareale, die als Proben für die neu angefertigten TMA-Blöcke dienen sollten, auf HE-gefärbten Schnitten markiert. Dies diente dazu, ausschließlich Tumorgewebe und keine Nekrosen, Verkalkungen oder Einblutungen als Gewebeproben zu nutzen. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde keine weitere Selektion mehr vorgenommen. Die markierten Areale wurden im Anschluss mit den zu den HE-Schnitten gehörigen Donor-Paraffinblöcken abgeglichen und das gewählte Areal gestanzt.

Die Tissue Microarrays wurden mit Hilfe eines eigens für diese Methode entworfenen TMA-Arrayers (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA; Model MTA – 1, Serial No: MTA1777) angefertigt. Hierfür wurden Zylinder im Abstand von circa 2mm aus einem frischen Akzeptor-Paraffinblock gestanzt. Die so entstandenen Löcher wurden im nächsten Schritt mit den Gewebezyindern aufgefüllt, die zuvor aus den markierten Tumorarealen der Donor-Blöcke ausgestanzt worden waren. Die genaue Stanzen-Positionierung der Proben im Donor-Block und die exakte Positionierung der Gewebeproben in den ausgestanzten Zylindern des Akzeptor-Blocks wurden mit Hilfe von Feststellschrauben erreicht. Die Anzahl der Tumorgewebezyylinder wurde auf 70

(7 Reihen und 10 Spalten) begrenzt, um Gewebeverlusten beispielsweise durch Schneiden des Paraffinblocks vorzubeugen. Abschließend wurden die Tissue Microarray Paraffinblöcke versiegelt, indem die Oberfläche nach kurzem Erwärmen mit einem Objektträger flachgedrückt wurde. (Vogel 2014)

2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde bereits Anfang der 1940er Jahre in einer Veröffentlichung von Coons et al. erwähnt und wird seither in der Diagnostik und Forschung verschiedenster Erkrankungen angewandt (Coons et al. 1942). Auch in der Tumorforschung und -diagnostik hat sie einen großen Stellenwert, nicht zuletzt in Hinblick auf neue Target-Therapien, bei denen unter anderem das Vorhandensein bestimmter molekularer Strukturen eine spezifische Tumortherapie ermöglicht. Mit Hilfe von Immunhistochemie können bestimmte Antigene mit spezifischen Antikörpern markiert und detektiert werden. Das Prinzip beruht auf der Bindung von Antikörpern an Antigene über Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kräfte. Die Immunhistochemie ermöglicht durch Antigen-Antikörper-Komplex-Bildung und darauffolgender biochemischer Farbreaktion den licht- oder fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer Vielzahl von Proteinen in Geweben. (Lang 2013)

2.4.1 Avidin-Biotin-Methode

Eine immunhistochemische Methode ist die Avidin-Biotin-Methode, welche in der vorliegenden Arbeit für immunhistochemische Färbungen verwendet wurde (s. Abbildung 5). Hierbei wird ein Primärantikörper, welcher an die zu detektierende Struktur bindet, mit einem Biotin-markierten Sekundärantikörper gekoppelt. Das Hühnereiweiß Avidin, welches mit Enzymen gekoppelt wird, zeigt wiederum eine starke Affinität zu Biotin. Die so an die Antikörper gekoppelten Enzyme können Chromogene umsetzen und so eine Farbreaktion auslösen, welche spezifische Strukturen detektierbar macht. In der vorliegenden Arbeit wurde als Enzym die Meerrettichperoxidase gewählt, welche das Chromogen Diaminobenzidintetra-

hydrochlorid in einen braunen Farbstoff umwandeln kann. Haben die Avidin-Biotin-Enzym-Antikörper-Komplexe an eine zu detektierende Struktur gebunden und wird nun das Chromogen hinzu gegeben, erscheint das entsprechende Zellkompartiment braun und es kann die Expression bestimmter Proteine und Strukturen nachgewiesen werden. Je mehr Enzyme an einen Antikörper gekoppelt sind, desto stärker ist die Farbreaktion und desto weniger Antikörper werden benötigt, um eine ausreichende Farbreaktion auszulösen. (Lang 2013)

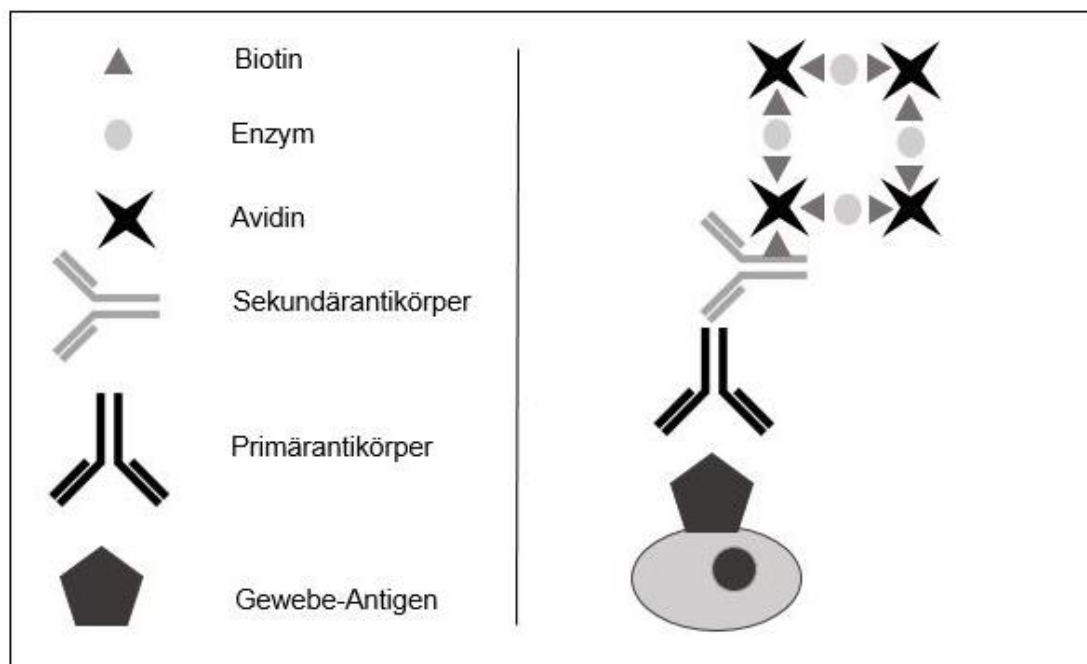


Abbildung 5: Avidin-Biotin-Methode (modifiziert nach (NovusBiologicals 2018)).

2.4.2 Verwendete Antikörper

- **Anti-Olig2:**

Polyklonaler Hasenantikörper gegen Olig2 der Firma Millipore (Burlington, Massachusetts), 32 Minuten Inkubationszeit bei 37°C, verwendete Verdünnungen: 1:500, 1:250 und 1:50 (Verdünnungen wurden anhand der nukleären Färbungsintensität ermittelt und angepasst, höhere Konzentrationen waren vor allem bei älteren Schnitten notwendig)

- **Anti-FoxG1:**
Polyklonaler Hasenantikörper gegen FoxG1 der Firma abcam (Cambridge, UK), 40 Minuten Inkubationszeit bei 37°C, verwendete Verdünnung: 1:50, bei zu hoher Hintergrundfärbung Zweitfärbung mit stärkerer Verdünnung bis zu 1:400

Folgende IHC-Färbungen wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit, sondern standardmäßig als Routine-Färbungen durchgeführt und für die Analyse ausgewertet:

- **Anti-IDH1 R123H:**
Maus IgG2a gegen IDH1 R123H (H09) der Firma Dianova, Vorbehandlung mit CC1 für 56 Minuten, Antikörper Inkubation für 32 Minuten bei 37°C, Verstärker für 8 Minuten; verwendete Verdünnung 1:400, IDH1 R123H negative Fälle unter 55 Jahren und Fälle mit ATRX-Verlust wurden sequenziert
- **Anti-ATRX:**
Hasenantikörper gegen humanes ATRX der Firma Sigma/Atlas, Vorbehandlung mit CC1 für 56 Minuten, Antikörper Inkubation für 20 Minuten bei 37°C, Verstärker für 8 Minuten; verwendete Verdünnung 1:600

2.4.3 Automatisierte immunhistochemische Färbung – das OptiView-Verfahren

Färbeprotokoll des Departments für Neuropathologie Tübingen für Anti-FoxG1 (s. auch Abbildung 6):

Zu Beginn wurde der Objektträger und die Flüssigkeiten auf 75°C erhitzt und anschließend dreimal mit EZ Prep Volumen (Puffer) der pH ausgeglichen, inkubiert und gewaschen. Danach wurde ein Coverslip aufgetragen und der Objektträger auf 76°C erhitzt, bevor er gewaschen und deparaffiniert wurde.

Nachdem nochmals ein Coverslip aufgetragen und nach kurzer Inkubation gewaschen wurde, wurde der Cell Conditioner Nr.1 für 36 Minuten aufgetragen. Im Anschluss wurde der Objektträger auf bis zu 100°C erhitzt und im Folgenden mehrmals abwechselnd Cell Conditioner Nr. 1 und ein Coverslip aufgetragen und für mehrere Minuten inkubiert. Am Ende des Ablaufs wurde der Objektträger auf 37°C erhitzt und gewaschen. Anschließend wurde ein Tropfen OptiView PEROX IHIBITOR (Peroxidase) aufgetragen, inkubiert und mehrmals ausgewaschen und ein Coverslip aufgetragen. Von Hand wurde nun der verdünnte Primärantikörper Anti-FoxG1 aufgetragen und 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde mehrfach gewaschen, 460µl Waschpuffer zum Volumenausgleich und ein Coverslip aufgetragen und 4 Minuten inkubiert. Nun wurde ein Tropfen OptiView HQ Universal Linker (Sekundärantikörper) und ein Coverslip aufgetragen und 8 Minuten inkubiert und anschließend das Procedere mit abwechselndem Waschpuffer und Coverslip auftragen und inkubieren mehrmals wiederholt. Nachdem der Objektträger gewaschen wurde, wurde ein Tropfen OptiView HPR Multimer (Tertiärantikörper) aufgetragen, 8 Minuten inkubiert und anschließend wieder mehrfach abwechselnd gewaschen, Waschpuffer und Coverslip aufgetragen und inkubiert. Zur Färbung wurde ein Tropfen OptiView H₂O₂ und ein Tropfen OptiView DAB (3,3'-Diaminobenzidin) und LCS aufgetragen und 8 Minuten lang inkubiert. Auf nochmaliges Waschen folgten das Auftragen von OptiView Copper und eine 4-minütige Inkubation mit nochmaligem Waschen im Anschluss. Am Ende wurde eine Gegenfärbung mit einem Tropfen Counterstain 1 und LCS durchgeführt und nach 4-minütiger Inkubation mehrmals gewaschen und ein Coverslip aufgetragen. (Abgespeichert unter Protokoll-Nr. 714 der Neuropathologie Tübingen)

Färbeprotokoll mit Anti-Olig2:

Das Protokoll für die immunhistochemische Färbung mit Anti-Olig2 ähnelt dem Färbeprotokoll für Anti-FoxG1. Hier wurde mit Cell Conditioner Nr. 2 16 Minuten vorbehandelt und anschließend der verdünnte Primärantikörper Anti-Olig2 aufgetragen und für 32 Minuten bei 37°C inkubiert (abgespeichert unter Protokoll-Nr. 205 der Neuropathologie Tübingen).

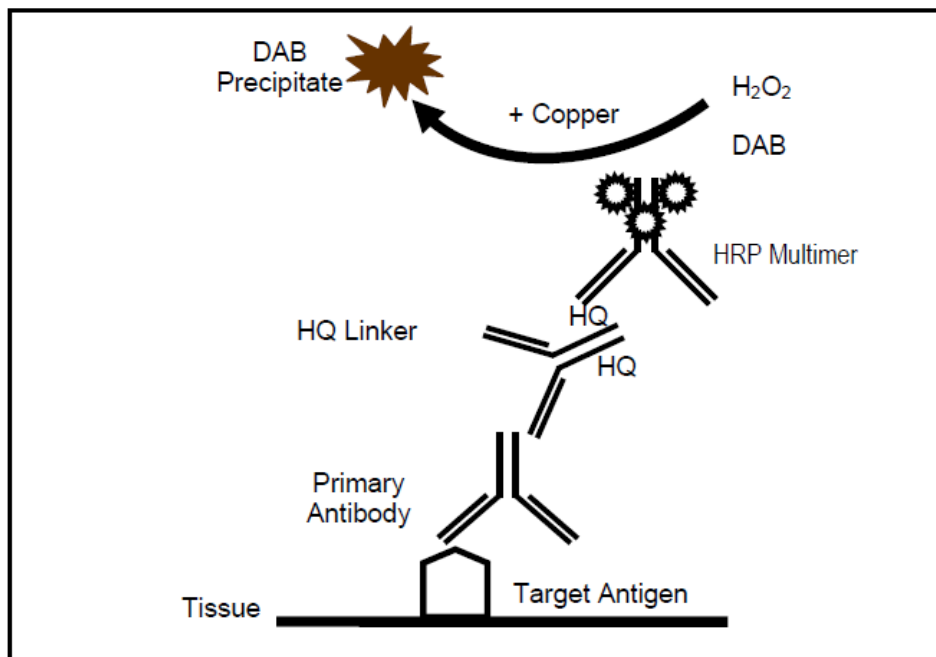


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung mit dem OptiView-Verfahren (Ventana OptiView DAB IHC detection kit); Abbildung aus: (Ventana).

2.5 Lichtmikroskopische Auswertung

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden die 779 Proben auf den TMA`s und die 29 Flächenschnitte (hauptsächlich H3F3A-mutierte Tumore) unter einem Olympus VANOX AHBT3 Lichtmikroskop begutachtet. Dabei wurden nur Proben miteinbezogen, welche mehr als 5% Tumorgewebe enthielten. Es wurden ausschließlich eindeutig mit FoxG1 oder Olig2 gefärbte Zellkerne quantitativ gewertet, wobei zunächst die 20x Vergrößerung zur groben Übersicht genutzt und anschließend in 40x Vergrößerung ein kleinerer, repräsentativer Ausschnitt ausgezählt wurde. Nekrosen, Blutgefäße und extranukleäre Anfärbungen wurden nicht gewertet. Lagen mehrere Proben eines Tumors vor, so wurde aus den Prozentwerten der jeweilig gefärbten Zellkerne aller Proben eines Patientenfalles ein Mittelwert gebildet und dieser für die statistischen Analysen verwendet.

Die in dieser Arbeit abgebildeten Tumore wurden mit dem Mirax Scanner (Zeiss, Göttingen) digitalisiert und repräsentative Fotoausschnitte als „jpeg“ exportiert. Diese wurden anschließend mit dem Programm image Access Enterprise (Glattbrug, Schweiz) zur Farbkalibrierung bearbeitet.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Statistik-Programms JMP 13 (SAS Institute Inc. Cary, New Jersey, USA) durchgeführt.

Zur Bestimmung von FoxG1- und Olig2-Mittelwerten und Standardabweichungen wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Der paarweise Vergleich der Mittelwerte wurde mit Hilfe eines student-t Tests durchgeführt. Nichtparametrische multiple Vergleiche wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für jedes Paar durchgeführt.

Mit Hilfe des Vorhersagemodells der rekursiven Partitionierung (CART) wurde ein Entscheidungsbaum erzeugt, um so die optimalen Cutoffs für Olig2 und FoxG1 in Hinblick auf den H3F3A-Mutationsstatus bestimmen zu können und diese mit Hilfe einer ROC-Kurve (receiver operating characteristics) auf Sensitivität und Spezifität überprüfen zu können. Anhand des CART-Cutoffs wurden die Tumore in FoxG1^{high} oder FoxG1^{low} und Olig2^{high} oder Olig2^{low} eingeteilt.

Für die Überlebensanalysen wurden FoxG1 und Olig2 anhand der Mittelwerte und mit Hilfe der rekursiven Partitionierung (CART) ebenfalls dichotomisiert. Anschließend wurden bei FoxG1^{high}/FoxG1^{low}-Tumoren, Olig2^{high}/Olig2^{low}-Tumoren, WHO-Grad, IDH-Mutationsstatus, ATRX-Verlust und MGMT-Methylierungsmuster die parametrische Lebensdaueranpassung und die Darstellung nach Kaplan-Meier angewandt. Es wurden Mittelwert, das 95%-Konfidenzintervall und der log-Rank Wert zur Ermittlung des Signifikanzniveaus bestimmt.

Für eine multivariate Überlebensanalyse von WHO-Grad, Alter, ATRX, FoxG1 und Olig2 (in den univariaten Überlebensanalysen in der parametrischen Lebensdaueranpassung oder in der Kaplan-Meier Darstellung signifikant) wurde das semiparametrische Cox-Regressions-Modell verwendet, um den Einfluss der verschiedenen Faktoren auf das Überleben zu bestimmen.

Es wurden in jeder Auswertung Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Alle Auswertungen mit p-Wert <0,05 wurden als signifikant und mit p-Wert <0,0001 als hochsignifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Die nachfolgenden Daten wurden in ähnlicher Weise im Artikel „Low FoxG1 and high Olig-2 labelling indices define a prognostically favourable subset in isocitrate dehydrogenase (IDH)-mutant gliomas“ publiziert (Schäfer et al. 2018). Hierfür wurde ein fast identisches Patientenkollektiv verwendet und identische Methoden zur retrospektiven Datenerhebung angewandt. Allerdings wurde die statistische Auswertung in der Publikation anhand von maschinell, mit Hilfe des Programms „ImmunoRatio plugin für ImageJ“, ausgewerteten Expressionsindices durchgeführt. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Expressionsindices wurden dagegen durch manuelle, lichtmikroskopische Auszählung der Proben erhoben. (Schäfer et al. 2018)

3.1 FoxG1

Ausgewertet wurde für FoxG1 lediglich eine nukleäre Färbung entsprechend der erwarteten Lokalisation des Proteins FoxG1 (Ariani et al. 2008). Gewertet wurde hierbei die Anzahl der positiv gefärbten Zellkerne, nicht deren Intensität. Häufig zeigte sich zusätzlich eine ausgeprägte zytoplasmatische Hintergrundfärbung mit FoxG1, welche in der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. Das Endothel zeigte keine Anfärbung durch FoxG1. (s. Abbildung 7)

Die FoxG1-Expression war in 533 Tumorproben auswertbar, was einem Kollektiv von 355 auswertbaren Patienten entsprach. Im Durchschnitt exprimierten 29,6% (SD: 27,0) der Tumorzellen nukleär FoxG1.

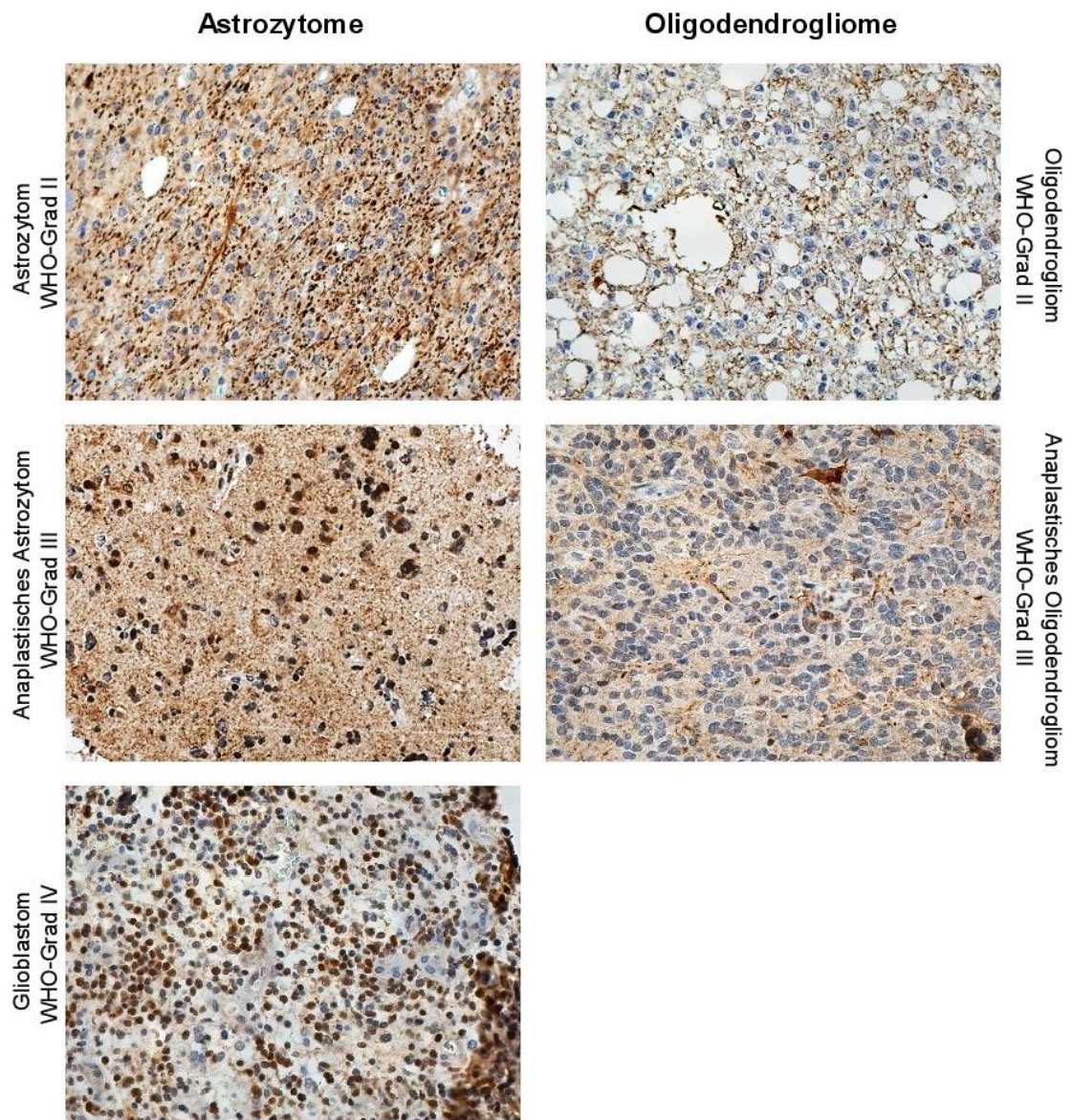


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung: repräsentative nukleäre FoxG1-Expression in den einzelnen Tumorentitäten (braun); Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun (blau).

3.1.1 FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Tumorentität

In allen oligodendroglialen Tumoren (n=67) kombiniert ergab sich mit durchschnittlich 20,6% (SD: 22,2) eine signifikant (p=0,0025) geringere nukleäre FoxG1-Expression, als in astrozytären Tumoren (n=288), welche einen mittleren Expressionsindex von 31,6% (SD: 27,6) aufwiesen.

Oligodendrogliale Tumore zeigten im Hinblick auf ihre FoxG1-Expression kaum einen Unterschied zwischen den Tumorgraden (Oligodendrogliome WHO-Grad II (n=23) MW: 20,7% (SD: 23,8); anaplastischen Oligodendrogliome WHO-Grad III (n=44) MW: 20,5% (SD: 21,5)). Astrozytäre Tumore hingegen zeigten einen signifikanten Anstieg des FoxG1-Expressionsindex von diffusen Astrozytomen WHO-Grad II (n=38) mit im Mittel 15,4% (SD: 22,5), gefolgt von anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III (n=61) mit einer durchschnittlichen FoxG1-Expression von 21,0% (SD: 23,9) und Glioblastomen WHO-Grad IV (n=189) mit dem höchsten Expressionsindex von im Durchschnitt 38,3% (SD: 27,4) positiven Tumorzellen. (s. Abbildung 7 und Abbildung 8)

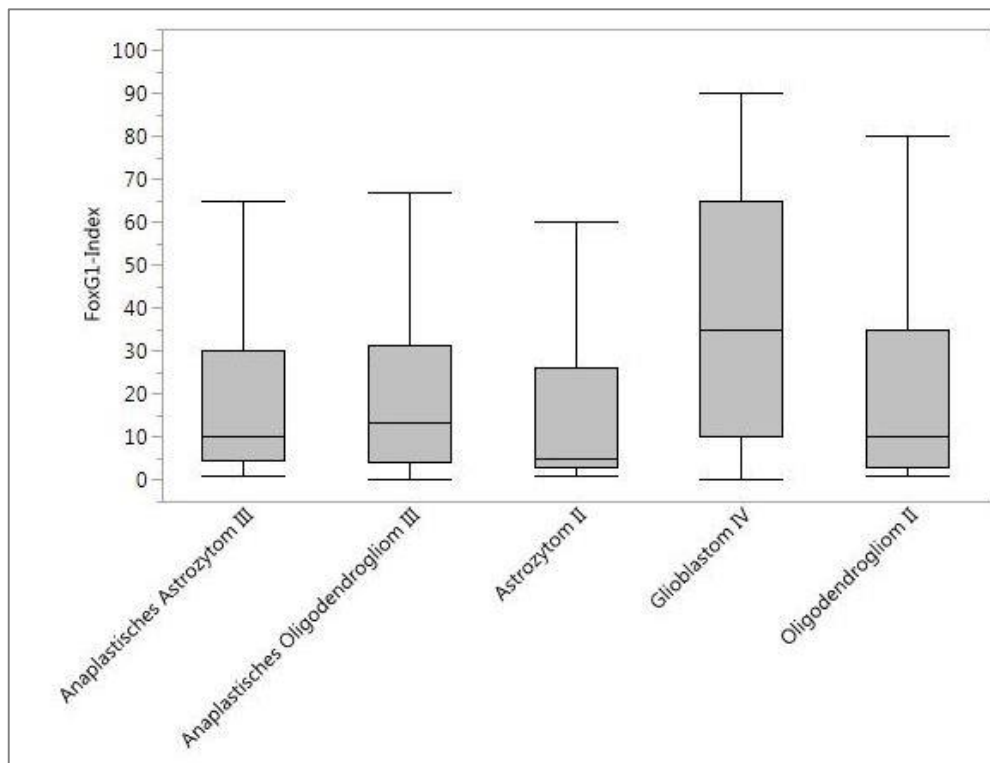


Abbildung 8: FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Tumorentität.

Im paarweisen Vergleich zwischen den FoxG1-Expressionsindices der einzelnen Tumorentitäten zeigte sich eine signifikant ($p=0,0033$ bis $0,0001$) bis hochsignifikant ($p<0,0001$) höhere FoxG1-Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV im Vergleich zu allen anderen Entitäten. Zusätzlich zeigten Astrozytome WHO-Grad II einen signifikant geringeren FoxG1-Expressionsindex als anaplastische Astrozytome ($p=0,0399$). (s. Tabelle 4)

Tabelle 4: Paarweiser Vergleich: signifikante Unterschiede in der FoxG1-Expression zwischen den Tumorentitäten (fett gedruckt: signifikant).

FoxG1 (p-Werte)	Astrozytom II	Anaplastisches Astrozytom III	Glioblastom IV	Oligodendrogliom II	Anaplastisches Oligodendrogliom III
Astrozytom II		0,0399	<0,0001	0,2703	0,0714
Anaplastisches Astrozytom III	0,0399		<0,0001	0,6544	0,9067
Glioblastom IV	<0,0001	<0,0001		0,0033	0,0001
Oligodendrogliom II	0,2703	0,6544	0,0033		0,6965
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0,0714	0,9067	0,0001	0,6965	

3.1.2 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades

Es zeigte sich eine gesteigerte FoxG1-Expression mit zunehmendem WHO-Grad. WHO-Grad II Tumore (Astrozytome und Oligodendrogliome kombiniert; $n=61$) zeigten dabei einen Expressionsmittelwert von 17,4% (SD: 22,9), während WHO-Grad III Tumore (anaplastische Astrozytome und anaplastische Oligodendrogliome kombiniert; $n=105$) in durchschnittlich 20,8% (SD: 22,9) der Tumorzellen und WHO-Grad IV Tumore (Glioblastome; $n=189$) in durchschnittlich 38,3% (SD: 27,4) der Zellen FoxG1 exprimierten. (s. Abbildung 9)

Im paarweisen Vergleich der einzelnen WHO-Grade ergab sich eine hochsignifikant ($p<0,0001$) höhere FoxG1-Expression in WHO-Grad IV Tumoren im Vergleich zu WHO-Grad II und III Tumoren. Die Unterschiede zwischen WHO-Grad II und III waren hingegen nicht signifikant ($p=0,0636$).

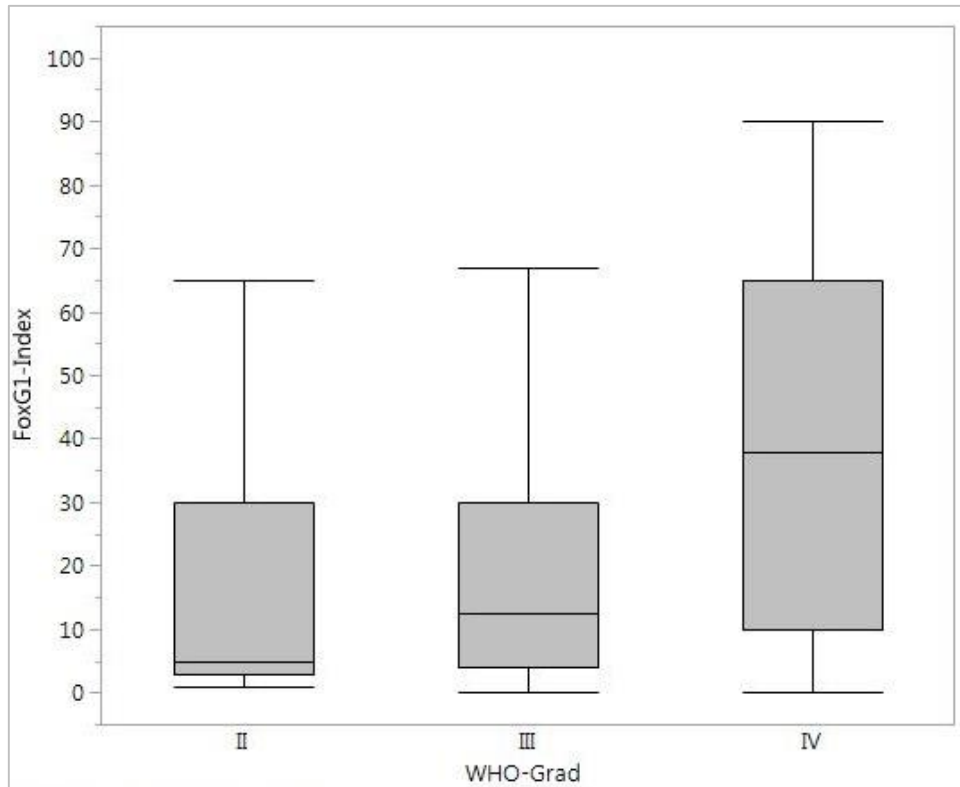


Abbildung 9: FoxG1-Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades.

3.1.3 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts

Die Expression von FoxG1 war im Frauenkollektiv (n=136) mit durchschnittlich 28,6% (SD: 26,6) ähnlich hoch wie im Männerkollektiv (n=219) mit 30,1% (SD: 27,3). Es zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied ($p=0,6134$) in den beiden Gruppen.

3.1.4 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Alters

Es ergab sich keine signifikante Korrelation ($p=0,0937$) zwischen FoxG1-Expression und Patientenalter. Eine Tendenz zu höheren FoxG1-Expressionen mit steigendem Patientenalter war allerdings erkennbar. (s. Abbildung 10)

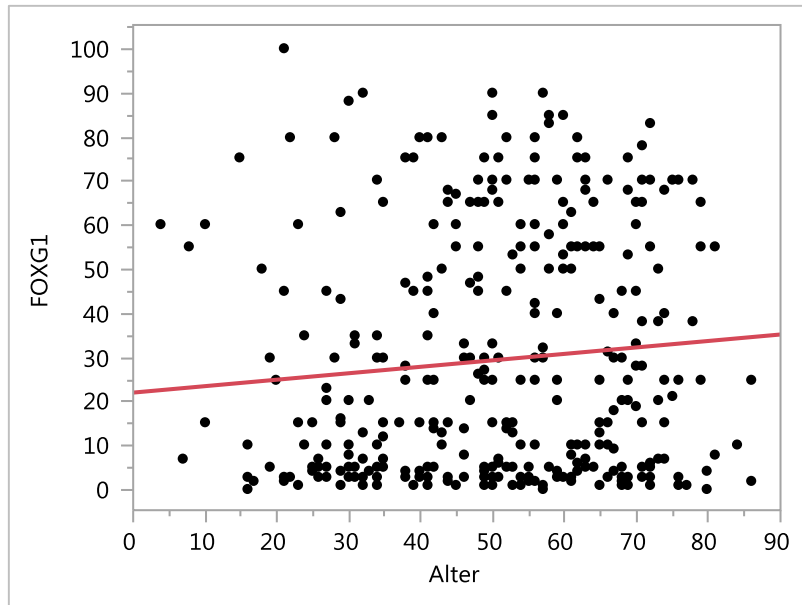


Abbildung 10: FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Patientenalters.

3.1.5 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Rezidiv-Status

In Primärtumoren (n=264) betrug der durchschnittliche FoxG1-Expressionsindex 30,6% (SD: 27,3), Rezidivtumore (n=90) zeigten einen Expressionsindex von durchschnittlich 26,9% (SD: 26,1). Die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,2638$).

3.1.6 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Sekundärstatus in Glioblastomen

Die FoxG1-Expression in primären Glioblastomen (n=175) betrug im Durchschnitt 38,7% (SD:27,2), in sekundären Glioblastomen (n=11) zeigte sich ein mittlerer Expressionsindex von 23,4% (SD: 25,7). Es ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede ($p=0,0692$) zwischen den Gruppen.

3.1.7 FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation

Tumore mit Lokalisation in den Stammganglien oder im Thalamus (n=8) zeigten mit durchschnittlich 17,1% (SD: 25,0) die geringste FoxG1-Expression im Vergleich zu allen anderen Tumorlokalisationen. Infratentoriell lokalisierte Tumore (n=7) zeigten einen mittleren FoxG1-Expressionsindex von 20,3% (SD: 25,4) gefolgt von frontal lokalisierten Tumoren (n=127) mit einem mittleren FoxG1-Expressionsindex von 25,8% (SD: 27,0). Tumore mit temporaler Lokalisation (n=110) exprimierten im Mittel in 32,2% (SD: 27,5) der Tumorzellen FoxG1, parietal lokalisierte Tumore (n=36) in 33,4% (SD: 26,5). Mit einem Mittelwert von 34,3% (SD: 30,2) wiesen occipital lokalisierte Tumore (n=15) den zweithöchsten Expressionsindex auf. Multilokuläre Tumore (n=41) zeigten mit durchschnittlich 35,9% (SD:25,2) die höchsten FoxG1-Expressionsindicese. (s. Abbildung 11)

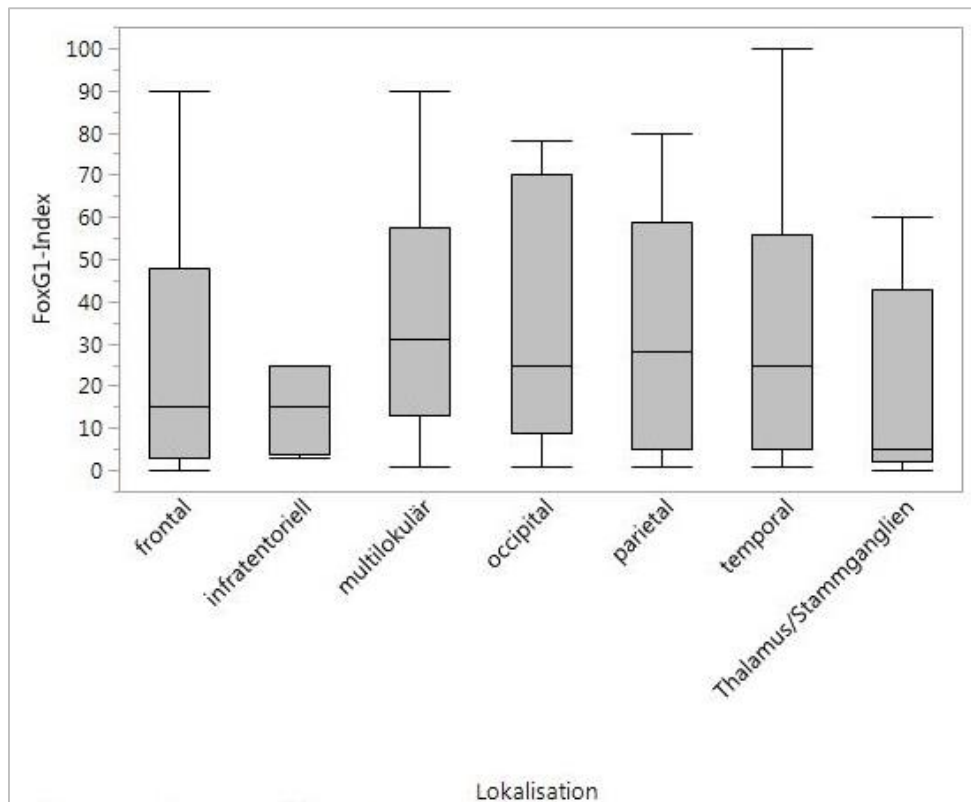


Abbildung 11: FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation.

Tumore, die im Thalamus oder den Stammganglien lokalisiert waren zeigten eine signifikant geringere FoxG1-Expression als multilokuläre ($p=0,0254$) Tumore. Ebenso zeigten frontale Tumore eine signifikant geringere FoxG1-Expression im Vergleich zu temporalen ($p=0,0352$) und multilokulären ($p=0,0069$) Tumoren. (s. Tabelle 5)

Tabelle 5: Paarweiser Vergleich der FoxG1-Expression von verschiedenen Tumorlokalisationen (fett gedruckt: signifikant).

FoxG1 Lokalisation (p-Werte)	frontal	infratentoriell	multilokulär	occipital	parietal	temporal	Thalamus/ Stammganglien
frontal		0,9281	0,0069	0,2612	0,0723	0,0352	0,2807
infratentoriell	0,9281		0,1076	0,3965	0,2284	0,3787	0,4154
multilokulär	0,0069	0,1076		0,7810	0,6163	0,2671	0,0254
occipital	0,2612	0,3965	0,7810		0,9258	0,7552	0,0811
parietal	0,0723	0,2284	0,6163	0,9258		0,7298	0,0739
temporal	0,0352	0,3787	0,2671	0,7552	0,7298		0,0645
Thalamus/ Stammganglien	0,2807	0,4154	0,0254	0,0811	0,0739	0,0645	

FoxG1-Expression in Abhängigkeit von supra- oder infratentorieller Lage

Infratentorielle Tumore ($n=7$) wiesen eine mittlere FoxG1-Expression von 20,3% (SD: 25,4) auf. Supratentorielle Tumore ($n=296$) zeigten im Durchschnitt einen Expressionsindex von 29,3% (SD: 27,3). Es ergab sich kein signifikanter Expressionsunterschied ($p=0,3883$) zwischen den beiden ZNS-Kompartimenten.

3.1.8 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des IDH-Mutationsstatus

Die Gruppe der IDH-mutierten Tumore ($n=137$) zeigte mit durchschnittlich 19,5% (SD: 20,7) eine hochsignifikant ($p<0,0001$) geringere FoxG1-Expression, als die Gruppe der nicht-IDH-mutierten Tumore ($n=197$) mit durchschnittlich 35,0% (SD: 29,0). (s. Abbildung 12)

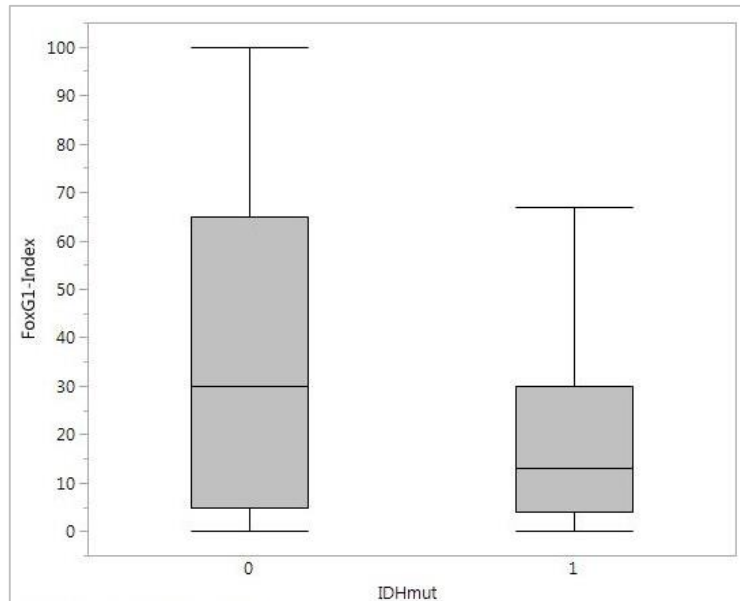


Abbildung 12: FoxG1-Expression in IDH-mutierten (1) und nicht-mutierten (0) Tumoren.

3.1.9 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des ATRX-Status

Tumore mit ATRX-Verlust (n=83) wiesen mit durchschnittlich 20,2% (SD: 23,1) eine hochsignifikant ($p < 0,0001$) geringere FoxG1-Expression auf, als Tumore ohne ATRX-Verlust (n=245), welche einen mittleren FoxG1-Expressionsindex von 33,4% (SD: 27,3) zeigten. (s. Abbildung 13)

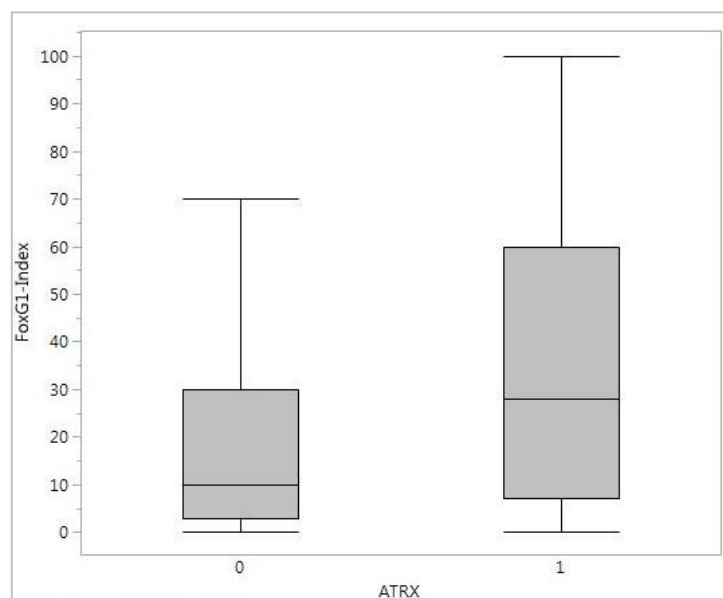


Abbildung 13: FoxG1-Expression in Abhängigkeit des ATRX-Verlustes (0) und erhaltener ATRX-Expression (1).

3.1.10 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des MGMT-Promotormethylierungsstatus

Im Mittel exprimierten Tumore mit hypermethyliertem MGMT-Promotor (n=75) in 33,0% (SD: 28,0) der Tumorzellen FoxG1. Tumore ohne MGMT-Promotorhypermethylierung (n=85) zeigten eine FoxG1-Expression in durchschnittlich 37,4% (SD: 30,0) der Tumorzellen. Es ergab sich somit keine Korrelation ($p=0,3447$) zwischen FoxG1-Expression und MGMT-Promotormethylierungsstatus.

3.1.11 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des 1p/19q-Kodeletionsstatus

In Tumoren mit 1p/19q-Kodeletion (n=26) zeigte sich eine mittlere FoxG1-Expression von 18,2% (SD: 22,3). In Tumoren ohne 1p/19q-Kodeletion (n=17) betrug der Expressionsindex durchschnittlich 17,2% (SD: 26,7). Die Expressionsunterschiede waren nicht signifikant ($p=0,8953$).

3.1.12 FoxG1-Expression Überblick

Zusammenfassend zeigten die Resultate eine steigende FoxG1-Expression mit dem WHO-Grad (Grad IV Tumore signifikant höhere Expressionsindices als WHO-Grad II und III) und es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen geringen FoxG1-Expressionsindices und den prognostisch günstigen IDH-mutierten Tumoren, sowie Tumoren mit ATRX-Verlust.

Keinen Einfluss auf die FoxG1-Expression zeigten Geschlecht, MGMT-Promotormethylierungsstatus und 1p/19q-Deletionsstatus. Keine Unterschiede in der FoxG1-Expression zeigten sich zudem zwischen Primärtumoren und Rezidiven und primären und sekundären Glioblastomen.

3.2 Olig2

Olig2 zeigte ebenfalls eine nukleäre Färbung in den Tumorzellen. Es wurde die Anzahl der positiv gefärbten Zellkerne gewertet. Endothel und Zytoplasma zeigten keine Olig2-Färbung. (s. Abbildung 14) In 361 Patientenfällen (557 Tumorproben) konnte die Olig2-Expression untersucht werden. Im gesamten Tumorkollektiv exprimierten durchschnittlich 25,1% (SD: 24,4) der Tumorzellen Olig2.

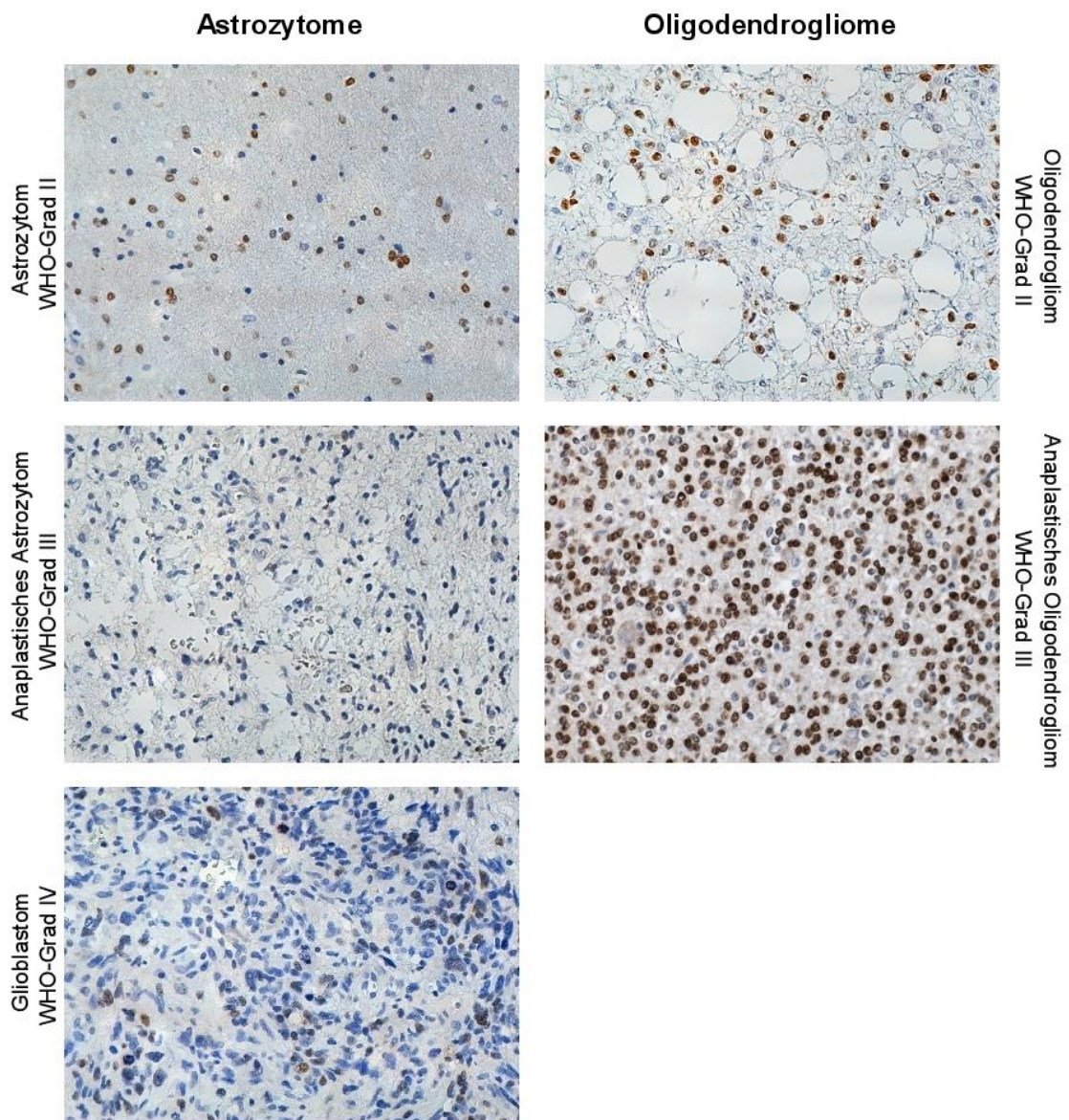


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung: repräsentative nukleäre FoxG1-Expression in den einzelnen Tumorentitäten (braun); Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun (blau).

3.2.1 Olig2-Expression im Vergleich der einzelnen Entitäten

Oligodendrogliale Tumore (n=72) zeigten mit 41,0% (SD: 27,8) eine hochsignifikant ($p < 0,0001$) höhere Olig2-Expression als astrozytäre Tumore (n=356) mit 20,7% (SD: 23,2).

Glioblastome WHO-Grad IV (n=179, MW: 19,0%, SD: 21,3) zeigten die geringste Anzahl an Olig2-exprimierenden Tumorzellen, gefolgt von anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III (n=53, MW: 20,0%, SD: 21,7). Astrozytomen WHO-Grad II (n=46) wiesen einen mittleren Olig2-Expressionsindex von 27,4% (SD: 24,6) auf. Mit durchschnittlich 39,2% (SD: 26,8) exprimierten in anaplastische Oligodendroglione WHO-Grad III (n=53) bereits deutlich mehr Tumorzellen Olig2. Den höchsten Expressionsindex zeigten Oligodendroglione WHO-Grad II (n=30) mit durchschnittlich 42,7% (SD: 24,1). (s. Abbildung 14 und Abbildung 15) Oligodendroglione WHO-Grad II und anaplastische Oligodendroglione WHO-Grad III zeigten damit eine signifikant bis hochsignifikant ($p = 0,0410$ bis $< 0,0001$) höhere Olig2-Expression als alle astrozytären Tumorentitäten. Zudem zeigten Glioblastome WHO-Grad IV einen signifikant ($p = 0,0136$) geringere Olig2-Expression als Astrozytome WHO-Grad II. (s. Tabelle 6)

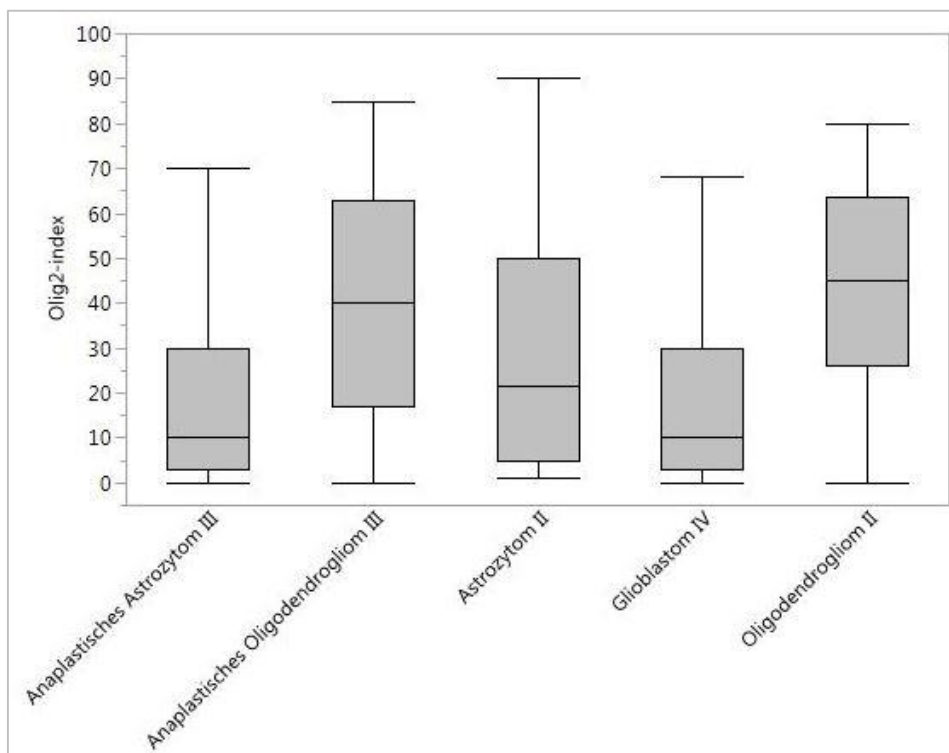


Abbildung 15: Olig2-Expression in Abhängigkeit der Tumorentität.

Tabelle 6: Paarweiser Vergleich: signifikante Unterschiede in der Olig2-Expression zwischen den Tumorentitäten (fett gedruckt: signifikant).

Olig2 (p-Werte)	Astrozytom II	Anaplastisches Astrozytom III	Glioblastom IV	Oligodendrogliom II	Anaplastisches Oligodendrogliom III
Astrozytom II		0,0941	0,0136	0,0089	0,0410
Anaplastisches Astrozytom III	0,0941		0,5714	0,0002	0,0005
Glioblastom IV	0,0136	0,5714		<0,0001	<0,0001
Oligodendrogliom II	0,0089	0,0002	<0,0001		0,5373
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0,0410	0,0005	<0,0001	0,5373	

3.2.2 Olig2-Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades

Im Vergleich der Olig2-Expression in Bezug auf die einzelnen WHO-Grade zeigte sich eine abfallende Olig2-Expression mit steigendem WHO-Grad.

WHO-Grad II Tumore (Astrozytome, Oligodendrogliome; n=76) wiesen mit einem mittleren Olig2-Expressionsindex von 33,4% (SD: 25,4) die höchsten Expressionswerte auf. WHO-Grad III Tumore (anaplastische Astrozytome, anaplastische Oligodendrogliome; n=106) zeigten eine geringere Olig2-Expression von im Mittel 29,6% (SD: 26,1) und WHO-Grad IV Tumore (Glioblastome; n=179) zeigten mit durchschnittlich 19,0% (SD: 21,3) die geringsten Expressionswerte. (s. Abbildung 16)

Im paarweisen Vergleich der einzelnen WHO-Grade zeigte sich bei WHO-Grad IV Tumoren eine hochsignifikant ($p < 0,0001$) geringere Expression von Olig2 gegenüber WHO-Grad II und eine signifikant ($p = 0,0009$) geringere Expression gegenüber WHO-Grad III Tumoren. Zwischen WHO-Grad II und III ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,2432$).

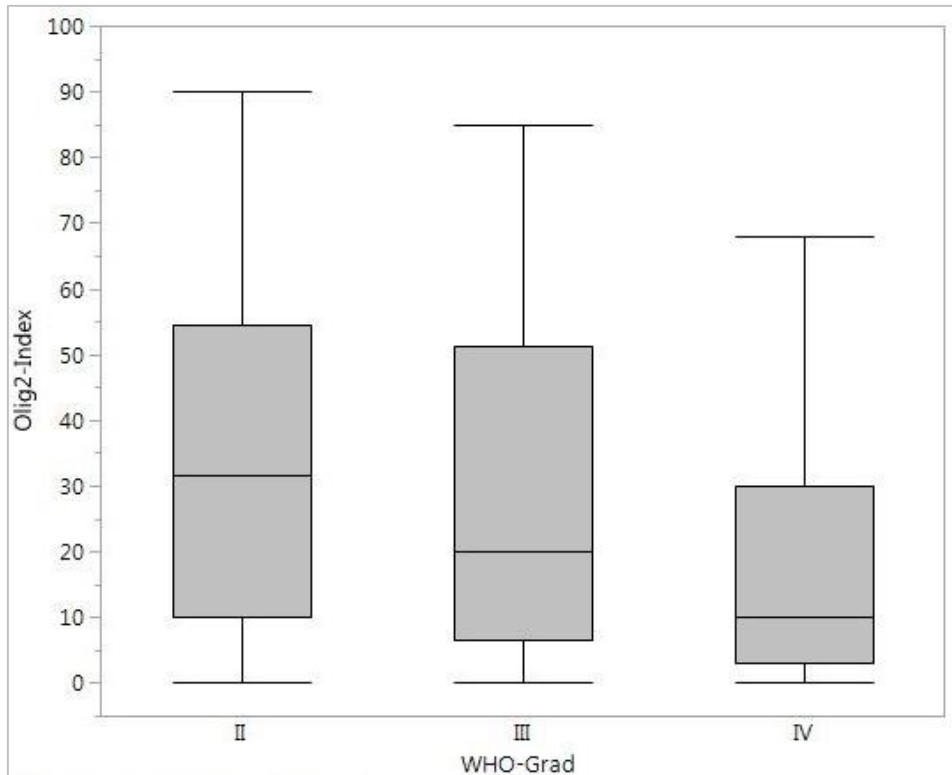


Abbildung 16: Olig2- Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades.

3.2.3 Olig2-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts

In beiden Geschlechtern zeigte sich eine ähnliche Olig2-Expression. Im Frauenkollektiv (n=139) betrug der Expressionsindex durchschnittlich 25,3% (SD: 22,8), im Männerkollektiv (n=222) betrug er im Mittel 25,1% (SD: 25,4). Die Unterschiede in der Olig2-Expression zwischen den beiden Gruppen waren nicht signifikant ($p=0,9445$).

3.2.4 Olig2-Expression in Abhängigkeit des Alters

Es zeigte sich kein signifikanter Olig2-Expressionsunterschied ($p=0,1310$) in den verschiedenen Altersgruppen. Eine Tendenz zu geringeren Expressionsindices mit steigendem Alter ließ sich allerdings ablesen. (s. Abbildung 17)

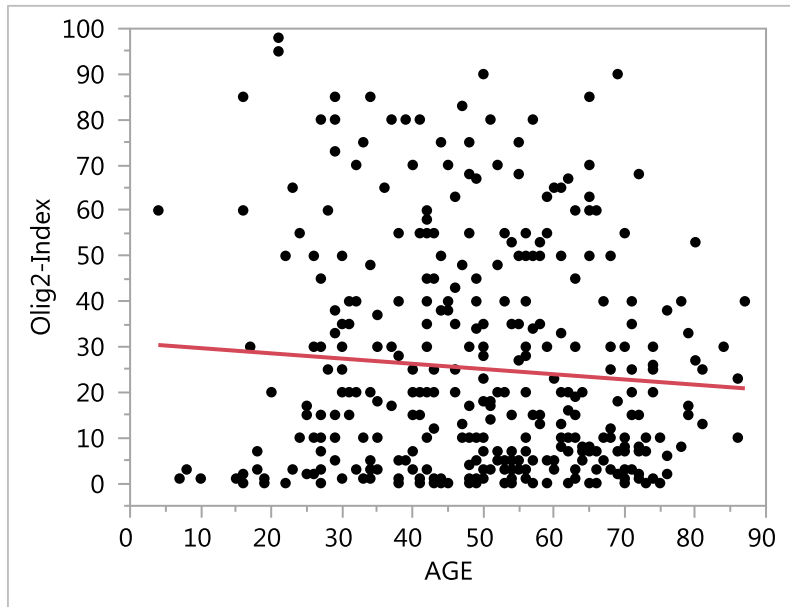


Abbildung 17: Olig2-Expression in Abhängigkeit des Patientenalters.

3.2.5 Olig2-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Rezidiv-Status

Primärtumore (n=266) zeigten eine Olig2-Expression von durchschnittlich 24,5% (SD: 24,1), Rezidivtumore (n=94) von 26,6% (SD: 25,5). Es ergab sich kein signifikanter Expressionsunterschied ($p=0,4733$) zwischen den beiden Gruppen.

3.2.6 Olig2-Expression in Abhängigkeit des Primär-/ Sekundärstatus in Glioblastomen

Die Gruppe der primären Glioblastome (n=164) zeigte eine mittlere Olig2-Expression von 18,7% (SD: 20,9), die der sekundären Glioblastome (n=12) eine Expression von durchschnittlich 21,5% (SD: 21,8). Die beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede ($p=0,6509$).

3.2.7 Olig2-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation

Occipital lokalisierte Tumore (n=18) zeigten die geringste Olig2-Expression mit durchschnittlich 15,8% (SD: 20,7). Parietale Tumore (n=31) zeigten mit durchschnittlich 16,6% (SD: 20,4) eine gering höhere Expression. Temporal lokalisierte Tumore (n=116) exprimierten im Mittel in 21,4% (SD: 22,9) der Tumorzellen Olig2. Die mittlere Olig2-Expression multilokulärer Tumore (n=29) betrug 26,9% (SD: 23,9), die der frontalen Tumore (n=136) 29,6% (SD: 23,6). Tumore im Thalamus oder den Stammganglien (n=9) zeigten einen Expressionsindex von durchschnittlich 32,2% (SD: 39,3). Die höchste Olig2-Expression wiesen infratentorielle Tumore (n=8) mit im Mittel 50,5% (SD: 39,5) auf. (s. Abbildung 18)

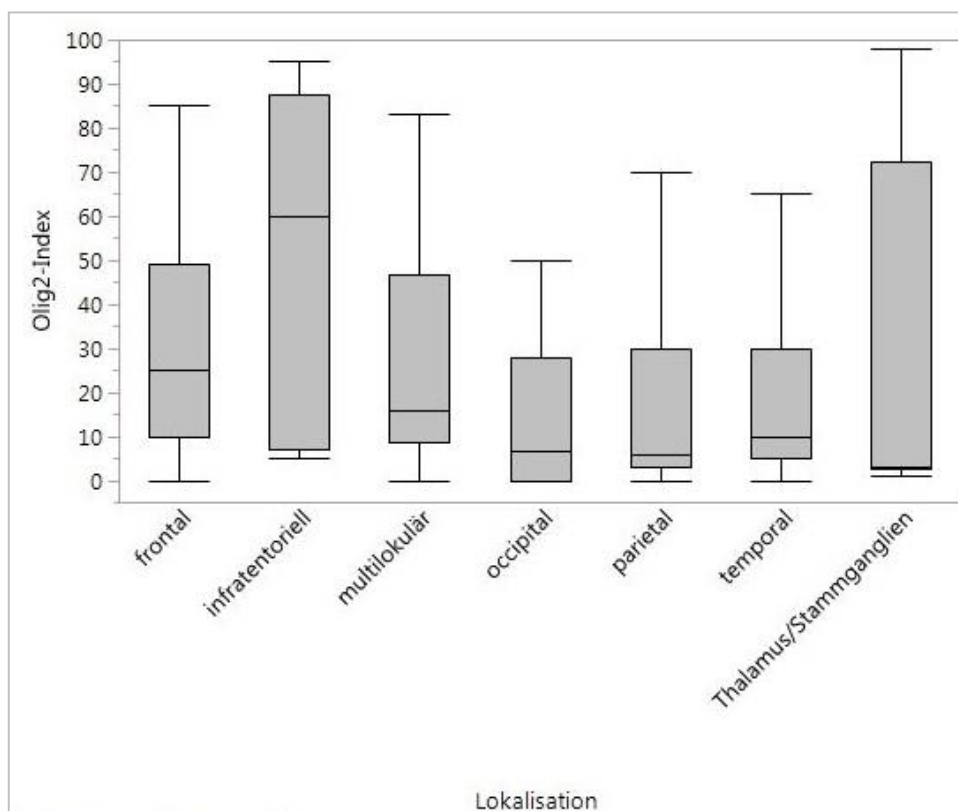


Abbildung 18: Olig2-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation.

Frontale Tumore zeigten eine signifikant höhere Olig2-Expression als occipitale ($p=0,0068$), parietale ($p=0,0044$) oder temporale ($p=0,0026$) Tumore. Auch infratentorielle Tumore exprimierten signifikant mehr Olig2 als occipitale

($p=0,0205$), parietale ($p=0,0115$) oder temporale ($p=0,0431$) Tumore. Multilokuläre Tumore exprimierten ebenfalls signifikant ($p=0,0373$) mehr Olig2 als parietale Tumore. (s. Tabelle 7)

Tabelle 7: Paarweiser Vergleich der Olig2-Expression von verschiedenen Tumorlokalisationen (fett gedruckt: signifikant).

Olig2 Lokalisation (p-Werte)	frontal	Infratentoriell	multilokulär	occipital	parietal	Temporal	Thalamus/ Stammganglien
frontal		0,1288	0,5414	0,0068	0,0044	0,0026	0,7428
infratentoriell	0,1288		0,1897	0,0205	0,0115	0,0431	0,1616
multilokulär	0,5414	0,1897		0,0522	0,0373	0,1765	0,6674
occipital	0,0068	0,0205	0,0522		0,1765	0,1319	0,2341
parietal	0,0044	0,0115	0,0373	0,4857		0,1570	0,6603
temporal	0,0026	0,0431	0,1765	0,1319	0,1570		0,9504
Thalamus/ Stammganglien	0,7428	0,1616	0,6674	0,2341	0,6603	0,9504	

Olig2-Expression in Abhängigkeit von supra- oder infratentorieller Lage

Infratentoriell lokalisierte Tumore ($n=8$) zeigten mit durchschnittlich 50,5% (SD: 39,5) eine signifikant ($p=0,0031$) höhere Olig2-Expression, als supratentorielle Tumore ($n=310$) mit einem Expressionsindex von im Mittel 24,5% (SD: 23,9). (s. Abbildung 19)

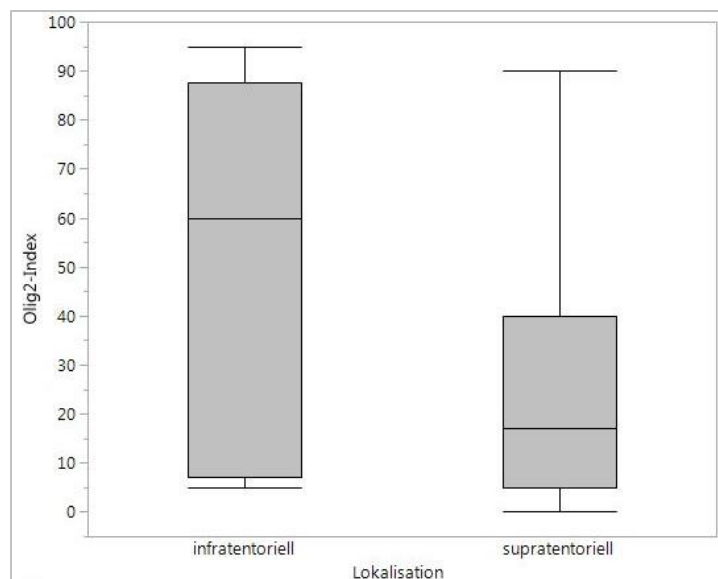


Abbildung 19: Olig2-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation (supra- oder infratentoriell).

3.2.8 Olig2-Expression in Abhängigkeit des IDH-Mutationsstatus

IDH-mutierte Tumore (n=160) zeigten mit einem Expressionsindex von durchschnittlich 33,8% (SD: 23,9) hochsignifikant ($p < 0,0001$) mehr Olig2 positive Zellkerne als nicht-IDH-mutierte Tumore (n=179) mit einem Expressionsindex von durchschnittlich 19,4% (SD: 23,5). (s. Abbildung 20)

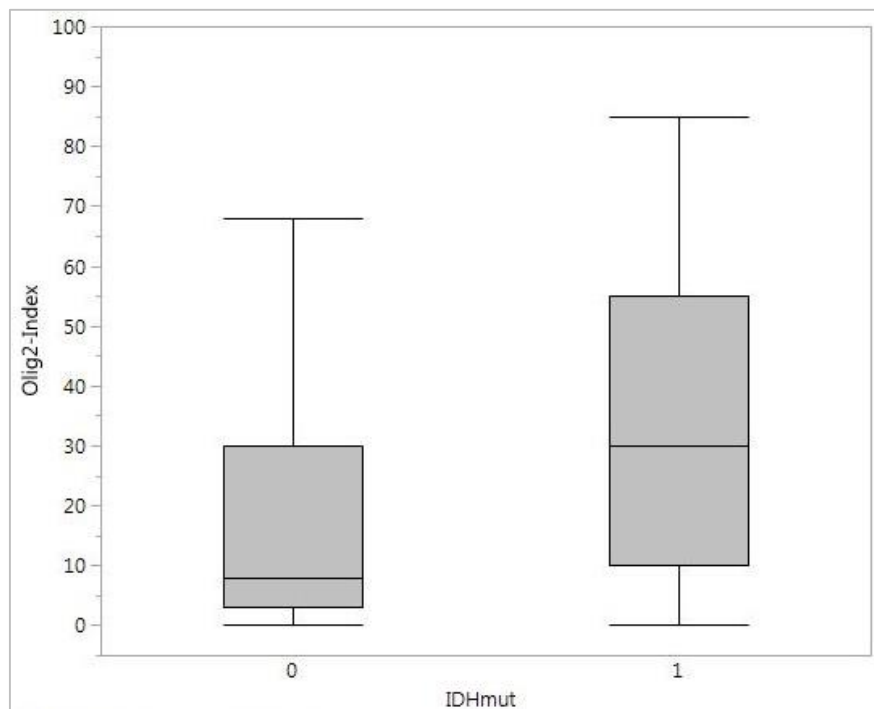


Abbildung 20: Olig2-Expression in IDH-mutierten (1) und nicht-mutierten (0) Tumoren.

3.2.9 Olig2-Expression in Abhängigkeit des ATRX-Status

Die Olig2-Expression betrug im Durchschnitt 22,4% (SD: 19,6) in Tumoren mit ATRX-Verlust (n=86). Tumore ohne ATRX-Verlust (n=253) zeigten einen Expressionsindex von durchschnittlich 26,8% (SD: 26,1). Es zeigte sich keine signifikante Korrelation ($p = 0,1520$) zwischen Olig2-Expression und ATRX-Status.

3.2.10 Olig2-Expression in Abhängigkeit des MGMT-Promotormethylierungsstatus

Tumore mit MGMT-Promotorhypermethylierung (n=72) exprimierten in durchschnittlich 27,1% (SD: 23,9) der Tumorzellen Olig2. Tumore ohne MGMT-Promotorhypermethylierung (n=85) zeigten eine mittlere Olig2-Expression von 22,2% (SD: 23,8). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,2016$) zwischen den beiden Gruppen.

3.2.11 Olig2-Expression in Abhängigkeit des 1p/19q-Kodeletionsstatus

Im Mittel exprimierten Tumore mit LOH 1p/19q (n=27) in durchschnittlich 43,3% (SD: 25,1) der Tumorzellen Olig2, Tumore ohne LOH (n=19) in 38,1% (SD: 26,2) der Zellen. Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,4995$) zwischen Olig2-Expression und dem 1p/19q-Kodeletionsstatus.

3.2.12 Olig2-Expression Überblick

Es zeigte sich eine fallende Olig2-Expression mit steigendem WHO-Grad (WHO-Grad IV signifikant geringere Expression als WHO-Grade II und III), wobei oligodendrogliale Tumore eine signifikant höhere Olig2-Expression aufwiesen als astrozytäre Tumore. IDH-Mutationen waren mit hohen Olig2-Mittelwerten assoziiert, während ATRX-Verlust, MGMT-Promotormethylierungsstatus und 1p/19q-Deletion keinen Einfluss auf den Olig2-Expressionsindex zeigten. Infratentorielle Tumore exprimierten signifikant höher Olig2 als supratentorielle Tumore. Kein Zusammenhang bestand zwischen Olig2-Expression und Geschlecht, Alter, Primär- und Rezidivstatus und primären und sekundären Glioblastomen.

3.3 Korrelation von FoxG1 und Olig2

In 411 Patientenfällen (645 Tumorproben) lagen beide Resultate für FoxG1 und Olig2 vor. Es zeigte sich eine signifikante negative Korrelation ($p=0,0149$) zwischen Olig2- und FoxG1-Expression. Eine hohe Olig2-Expression ging mit niedriger FoxG1-Expression einher und umgekehrt. (s. Abbildung 21
Abbildung 21)

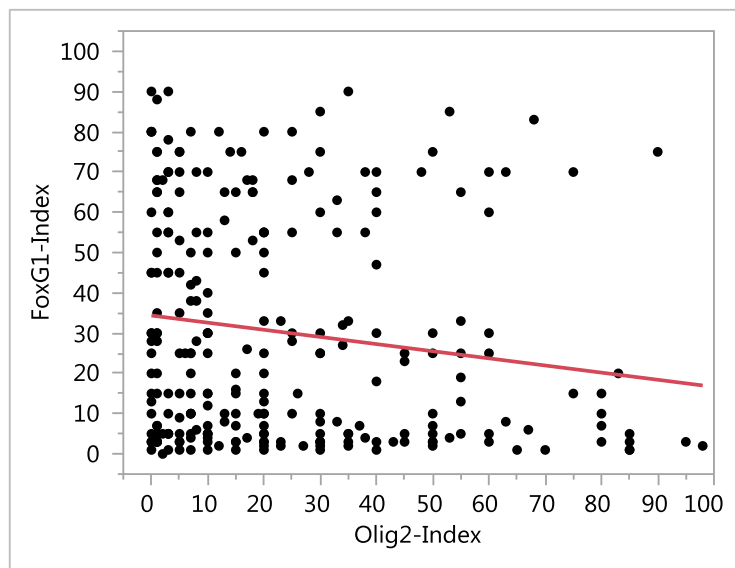


Abbildung 21: Korrelation von Olig2- und FoxG1-Mittelwerten.

3.4 H3F3A-mutierte Tumore

3.4.1 FoxG1-Expression in Abhängigkeit des H3F3A-Mutationsstatus

Tumore mit immunhistochemisch nachgewiesener K27M-Mutation (bei $n=13$ auswertbar) zeigten im Mittel eine FoxG1-Expression von 19,6% (SD: 25,7); Tumore ohne immunhistochemisch nachweisbare H3F3A-K27M Mutation ($n=272$) von 29,1% (SD: 26,9). Es ergaben sich keine signifikanten ($p=0,2164$) Expressionsunterschiede in der Gruppe der nicht K27M-mutierten (Wildtyp- und G34R-mutierten) Tumore im Vergleich zur Gruppe der K27M-mutierten Tumore.

Unter den für H3F3A sequenzierten Tumoren zeigte sich bei Wildtyp-Tumoren (n=164) eine FoxG1-Expression von durchschnittlich 30,7% (SD: 27,7), bei K27M-mutierten Tumoren (n=12) von 20,0% (SD: 26,8) und bei G34R-mutierten Tumoren (n=9) von 33,3% (SD: 36,9). Eine signifikante Korrelation zwischen H3F3A-Mutation und FoxG1-Expression konnten nicht nachgewiesen werden (Paarweise Korrelationen: WT/K27M: $p=0,1475$; WT/G34R: $p=0,8507$; K27M/G34R: $p=0,2387$).

3.4.2 Olig2-Expression in Abhängigkeit des H3F3A-Mutationsstatus

Immunhistochemisch positive K27M-mutierte Tumore (n=15) zeigten einen Olig2-Expressionsindex von im Mittel 39,3% (SD: 40,2). Tumore mit negativer K27M-Expression (n=270) wiesen eine Olig2-Expression von durchschnittlich 24,7% (SD: 23,7) auf. Es zeigte sich eine signifikant höhere Olig2-Expression in K27M-positiven Tumoren im Gegensatz zu K27M-negativen Tumoren ($p=0,0273$).

Im Kollektiv der H3F3A sequenzierten Tumore zeigten K27M-mutierte Tumore (n=14) eine durchschnittliche Olig2-Expression von 40,6% (SD: 41,3). G34R-mutierte Tumore (n=9) exprimierten in 1,1% (SD: 1,1) der Tumorzellen Olig2. K27M-mutierte Tumore zeigten eine Überschneidung der Mittelwerte mit Mittelwerten von Wildtyp-Tumoren (n=158), welche eine durchschnittliche Olig2-Expression von 29,2% (SD: 24,5) aufwiesen.

Es ergab sich eine signifikant geringere Olig2-Expression in G34R-mutierten Tumoren im Gegensatz zu K27M-mutierten und H3F3A Wildtyp-Tumoren (Paarweise Korrelationen: G34R/WT: $p<0,0001$; G34R/K27M: $p=0,0005$). K27M-mutierte Tumore und Wildtyp-Tumore zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Olig2-Expression ($p=0,5885$), es ließ sich allerdings eine Tendenz zu einer höheren Olig2-Expression bei K27M-mutierten Tumoren feststellen. (s. Abbildung 22)

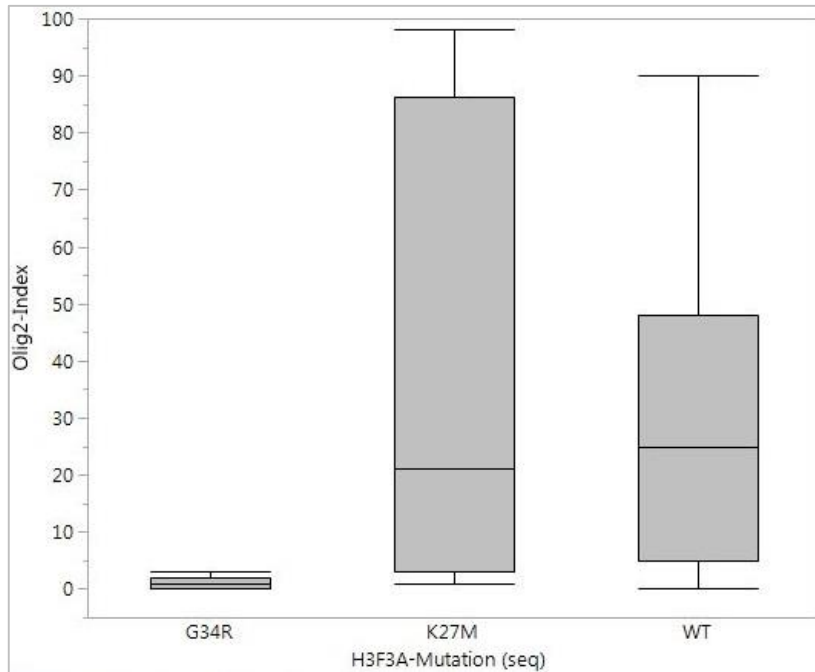


Abbildung 22: Olig2-Expression in Abhängigkeit des H3F3A-Mutations-Status (sequenziert).

3.4.3 ROC-Analysen

Mit Hilfe der rekursiven Partitionierungsanalyse errechnete sich aus dem vorhandenen Datensatz von 205 Patientenfällen ein Cutoff von 19% FoxG1-positiver Zellkerne, um zwischen H3F3A K27M-mutierten und Wildtyp-Tumoren zu differenzieren und ein Cutoff von 75% um zwischen H3F3A G34R-mutierten und Wildtyp-Tumoren zu differenzieren. Beide zeigten allerdings in der Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (Grenzwertoptimierungskurve) nur eine moderate Sensitivität und Spezifität (AUC K27M/WT: 0,6459, AUC G34R/WT: 0,6252) für die ermittelten Cutoff-Werte.

Für Olig2 ergab sich ein Cutoff von 80% Olig2-positiver Zellkerne zur Differenzierung zwischen H3F3A K27M-mutierten und Wildtyp-Tumoren (AUC K27M/WT: 0,6501). Für die Differenzierung zwischen H3F3A G34R-mutierten und Wildtyp-Tumoren wurde ein Cutoff von 5% ermittelt (AUC: 0,9199). Hier zeigte sich eine hohe Sensitivität und Spezifität zur Detektion von G34R-Mutationen (AUC 0,9133). (s. Abbildung 23)

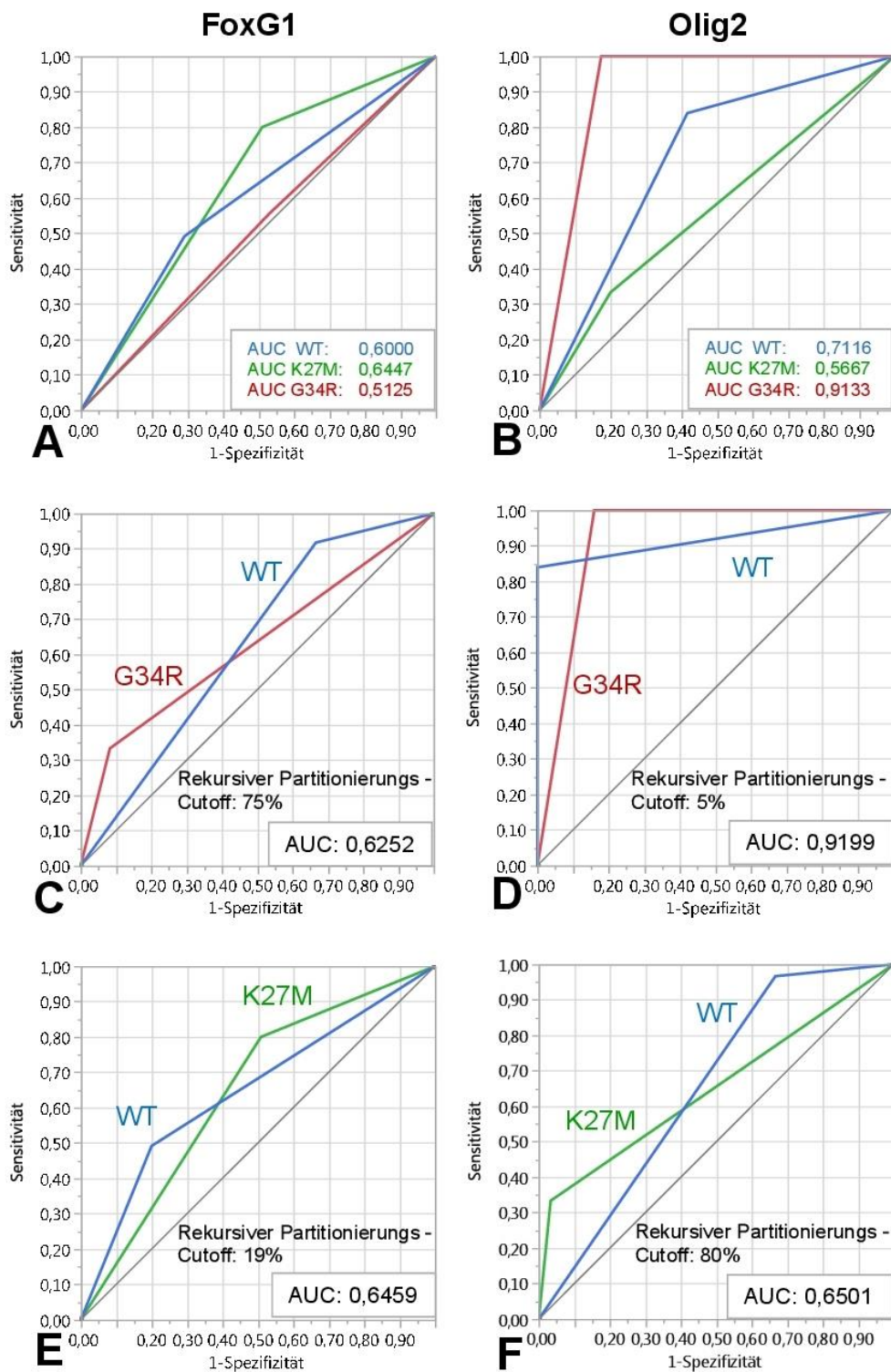


Abbildung 23: ROC-Kurven für FoxG1 (A) und Olig2 (B) nach H3F3A-Mutationsstatus. Spezifität und Sensitivität von FoxG1 und Olig2 zur Detektion von G34R-mutierten (C+D) und K27M-mutierten Tumoren (E+F). modifiziert nach (Schäfer et al. 2018)

3.4.4 FoxG1- Und Olig2-Expression in H3F3A-mutierten Tumoren im Überblick

Sequenzierte H3F3A K27M-mutierte Tumore exprimierten durchschnittlich in 20,0% der Tumorzellen FoxG1 und in 40,6% Olig2 und zeigten somit ein FoxG1^{low}/Olig2^{high}-Expressionsprofil, während G34R-mutierte Tumore mit einer durchschnittlichen FoxG1-Expression von 33,3% und einer Olig2-Expression von 1,1% ein FoxG1^{high}/Olig2^{low}-Profil aufwiesen. Lediglich G34R-mutierte Tumore zeigten einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen H3F3A-mutierten und Wildtyp-Tumoren. G34R-mutierte Tumore wiesen dabei eine signifikant geringere Olig2-Expression als K27M-mutierte und Wildtyp-Tumore auf (G34R/WT: $p < 0,0001$; G34R/K27M: $p = 0,0005$). Immunhistochemisch bestimmte K27M-mutierte Tumore zeigten zwar eine signifikant höhere Olig2-Expression als nicht-K27M-mutierte Tumore (WT+G34R), allerdings war der Unterschied in den sequenzierten Tumoren zwischen K27M-mutierten Tumoren und Wildtyp-Tumoren nicht mehr signifikant. Die FoxG1-Expression zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen. In den ROC-Analysen zeigten sich 19% FoxG1- und 80% Olig2-positive Zellkerne als die optimalsten Cutoffs zur Detektion von K27M-mutierten Tumoren und 75% FoxG1- und 5% Olig2-positive Zellkerne als Cutoffs zur Detektion von G34R-mutierten Tumoren. Eine hohe Sensitivität und Spezifität zeigte sich lediglich in den ROC-Kurven der Olig2-Expression in G34R-mutierten Tumoren.

3.5 Molekulare Subgruppen

Die Tumore wurden für die nachfolgenden Analysen in klinisch und pathologisch relevante Subgruppen unterteilt. Hierzu wurden folgende Gruppen gebildet:

- IDHmut+LOH: IDH-mutiert und 1p/19q-Kodeletion vorhanden, Tumore entsprechen den prognostisch günstigen Oligodendrogliomen
- IDHmut+ATRXloss: IDH-mutiert und ATRX-Verlust, Tumore entsprechen einem astrozytären Tumortyp
- IDHwt: IDH-Wildtyp mit insgesamt schlechterer Prognose als IDH-mutierte Tumore (Louis et al. 2016)
- H3F3A K27M: H3F3A K27M-mutierte Tumore
- H3F3A G34R: H3F3A G34R-mutierte Tumore

Diese molekularen Subgruppen wurden auf das Expressionsverhalten von FoxG1 und Olig2 analysiert.

3.5.1 FoxG1-Expression in Abhängigkeit von molekularen Untergruppen

Die Tumore aus den Gruppen IDHmut+ATRXloss (n=58, MW: 17,8%, SD: 20,1), IDHmut+LOH (n=26, MW: 18,2%, SD: 22,3) und H3F3A K27M (n=13, MW: 19,6%, SD: 25,7) zeigten ähnliche FoxG1-Expressionsindices. Die Tumore aus den Gruppen IDHwt (n=175, MW: 36,2%, SD: 28,6) und H3F3A G34R (n=9, MW: 33,3%, SD: 36,9) zeigten eine deutlich höhere FoxG1-Expression, welche sich nicht signifikant voneinander unterschied ($p=0,8800$). (s. Abbildung 24)

Signifikante Unterschiede zeigten sich lediglich in der Gruppe der IDHwt-Tumore im Vergleich zu den Gruppen IDHmut+ATRXloss ($p=0,0001$) und IDHmut+LOH ($p=0,0043$) (s. Tabelle 8).

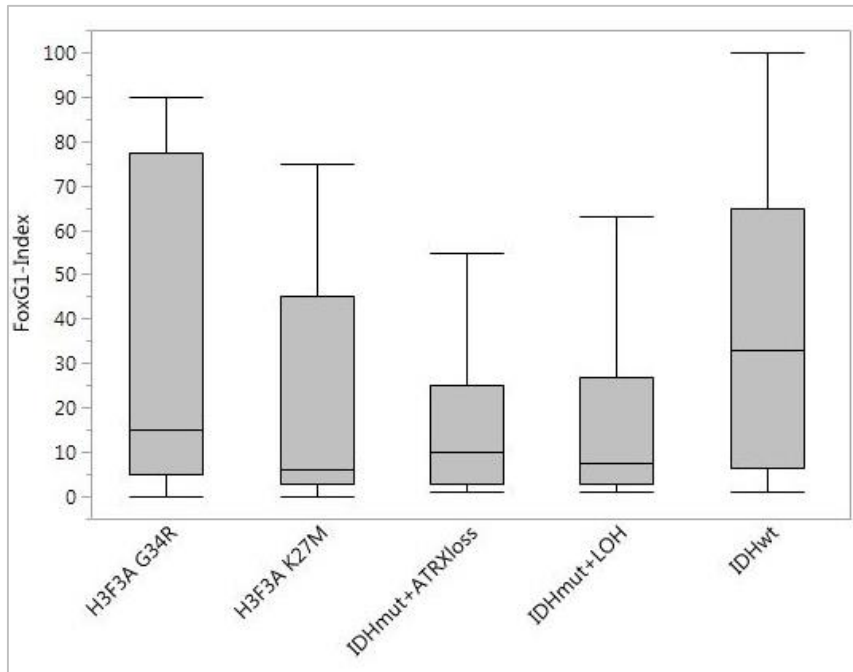


Abbildung 24: FoxG1-Expression in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe.

Tabelle 8: Paarweiser Vergleich der FoxG1-Expression in den molekularen Subgruppen (fett gedruckt: signifikant).

FoxG1 (p-Werte)	H3F3A G34R	H3F3A K27M	IDHmut+ATRXloss	IDHmut+LOH	IDHwt
H3F3A G34R		0,2681	0,2630	0,2896	0,8800
H3F3A K27M	0,2681		0,7875	0,9762	0,0535
IDHmut+ATRXloss	0,2630	0,7875		0,7967	0,0001
IDHmut+LOH	0,2896	0,9762	0,7967		0,0043
IDHwt	0,8800	0,0535	0,0001	0,0043	

3.5.2 Olig2-Expression in Abhängigkeit von molekularen Untergruppen

Die geringste Olig2-Expression zeigte sich in der Gruppe H3F3A G34R (n=9; MW: 1,1%; SD: 1,1). IDHwt (n=155; MW: 15,5%; SD: 20,8) und IDHmut+ATRXloss (n=63; MW: 27,2%; SD: 19,3) zeigten bereits eine deutlich höhere Olig2-Expression. H3F3A K27M (n=15; MW: 39,3%; SD: 40,2) und IDHmut+LOH (n=27; MW: 43,3%; SD: 25,1) wiesen nochmals erheblich höhere Olig2-Expressionsindices auf. (s. Abbildung 25)

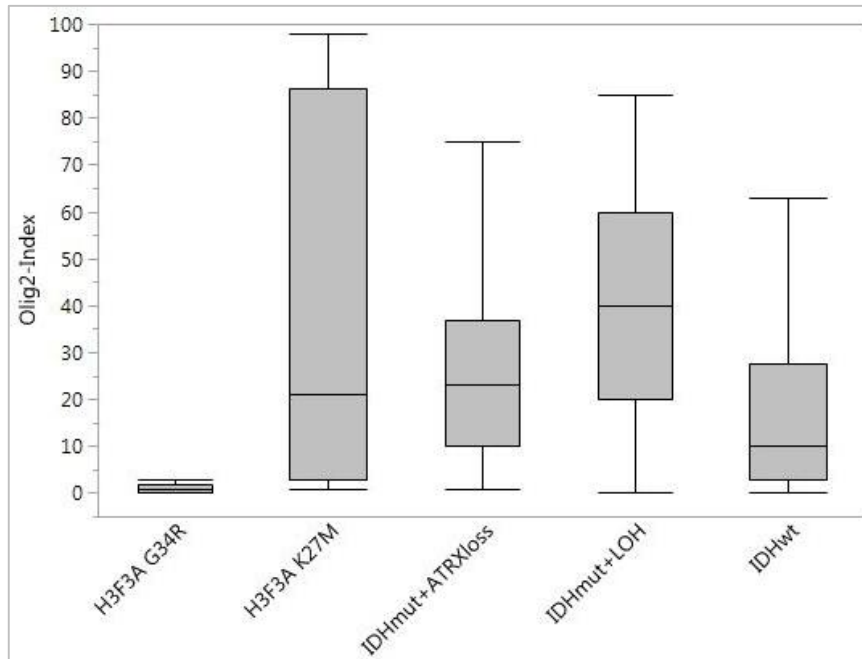


Abbildung 25: Olig2-Expression in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe.

In der Gruppe der H3F3A G34R-mutierten Tumore konnte eine signifikante bis hochsignifikante geringere Olig2-Expression als in allen anderen Gruppen (H3F3A K27M ($p=0,0004$), IDHmut+LOH ($p=0,0001$), IDHwt ($p=0,0002$) und IDHmut+ATRXloss ($p<0,0001$)) nachgewiesen werden. Die Gruppe der IDHwt Tumore zeigte zudem eine hochsignifikant ($p<0,0001$) geringere Olig2-Expression als die Gruppen IDHmut+LOH und IDHmut+ATRXloss. Die Gruppe IDHmut+ATRXloss wies einen signifikant ($p=0,0026$) niedrigeren Olig2-Expressionsindex als die Gruppe IDHmut+LOH auf. Die Gruppe der H3F3A K27M-mutierten Tumore überlappte mit den beiden IDH-mutierten Gruppen (IDHmut+LOH ($p=0,5899$), IDHmut+ATRXloss ($p=0,9696$)) und der IDHwt Gruppe ($p=0,1409$). (s. Tabelle 9)

Tabelle 9: Paarweiser Vergleich der Olig2-Expression in den molekularen Subgruppen (fett gedruckt: signifikant).

Olig2 (p-Werte)	H3F3A G34R	H3F3A K27M	IDHmut+ATRXloss	IDHmut+LOH	IDHwt
H3F3A G34R		0,0004	<0,0001	0,0001	0,0002
H3F3A K27M	0,0004		0,9696	0,5899	0,1409
IDHmut+ATRXloss	<0,0001	0,9696		0,0026	<0,0001
IDHmut+LOH	0,0001	0,5899	0,0026		<0,0001
IDHwt	0,0002	0,1409	<0,0001	<0,0001	

3.6 Überlebensanalysen

3.6.1 Repräsentativität des Patientenkollektivs

Zunächst wurden die Repräsentativität der in der Literatur bereits bekannten und etablierten prognostischen klinischen und molekularen Marker im verwendeten Patientenkollektiv überprüft. Insgesamt lagen für 296 Fälle mit erhobenem FoxG1-Status die Überlebensdaten und für 300 Fälle mit erhobenem Olig2-Status die Überlebensdaten vor.

In der parametrischen Überlebensanalyse zeigte sich ein hochsignifikant ($p < 0,0001$) schlechteres Überleben mit zunehmendem WHO-Grad. Mit höherem Alter sank die Überlebenszeit im Patientenkollektiv hochsignifikant ($p < 0,0001$) ab. Das Geschlecht hatte keine Auswirkung auf das Überleben ($p = 0,9612$). IDH-mutierte Tumore zeigten im Patientenkollektiv ein hochsignifikant ($p < 0,0001$) längeres Überleben im Vergleich zu Wildtyp-Tumoren, ebenso Tumore mit ATRX-Verlust im Gegensatz zu Tumoren ohne ATRX-Verlust ($p < 0,0001$). Im verwendeten Patientenkollektiv zeigte sich in Tumoren mit hypermethyliertem MGMT-Promotor kein signifikant verbessertes Überleben ($p = 0,8997$). Somit zeigte sich das Patientenkollektiv im Hinblick auf das Überleben mit Ausnahme des MGMT-Promotormethylierungsstatus als repräsentativ (Louis et al. 2016, Chaurasia et al. 2016, Stupp et al. 2009).

3.6.2 Überlebensanalyse FoxG1

3.6.2.1 Parametrische Überlebensanalyse

In der parametrischen Überlebensanalyse der FoxG1-Mittelwerte aller Tumore mit verfügbaren Überlebensdaten ($n = 296$) zeigte sich keine signifikante ($p = 0,0521$) Auswirkung der FoxG1-Expression auf das Überleben der Patienten. Es ließ sich allerdings eine Tendenz zu längerem Überleben mit fallender FoxG1-Expression erkennen. (s. Abbildung 26)

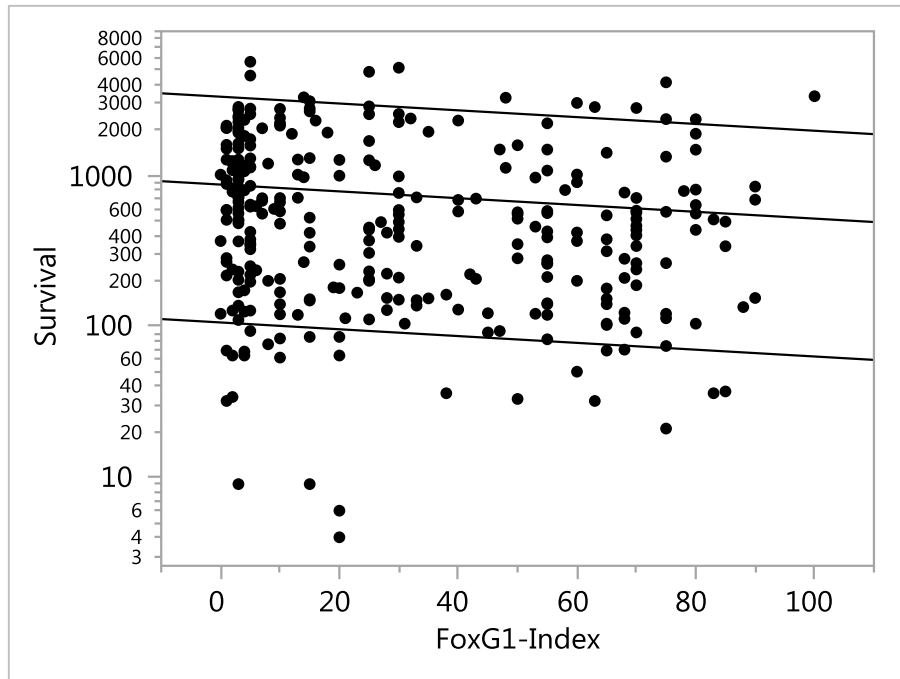


Abbildung 26: Parametrische Lebensdaueranpassung: Überleben in Abhängigkeit der FoxG1-Expression.

3.6.2.2 Überlebensanalyse (Survival) nach Kaplan-Meier

Für die Kaplan-Meier-Analysen wurden die FoxG1-Expressionsindices einmal anhand des Mittelwertes (MW: 29,6%, n=283) und einmal anhand eines mit Hilfe der Classification and Regression Tree (CART) Analyse ermittelten Cutoffs (CART: 33%, n=280) in FoxG1^{low} (unterhalb des Cutoffs) und FoxG1^{high} (oberhalb des Cutoffs) exprimierende Tumore gruppiert.

Wie in der parametrischen Überlebensanalyse bereits angedeutet, zeigte sich hier, dass FoxG1^{low}-Tumore (MW-Cutoff: medianes Überleben 1077 Tagen, 95%-Konfidenzintervall: 779-1123 Tage; CART-Cutoff: medianes Überleben 984 Tage, 95%-Konfidenzintervall: 718-1210 Tage) mit signifikant (MW: p=0,0031, CART: p=0,0022) besserem Überleben assoziiert als FoxG1^{high}-Tumore (MW-Cutoff: medianes Überleben 543 Tage, 95%-Konfidenzintervall: 400-636 Tage; CART-Cutoff: medianes Überleben 543, 95%-Konfidenzintervall: 388-687 Tage). (s. Abbildung 27)

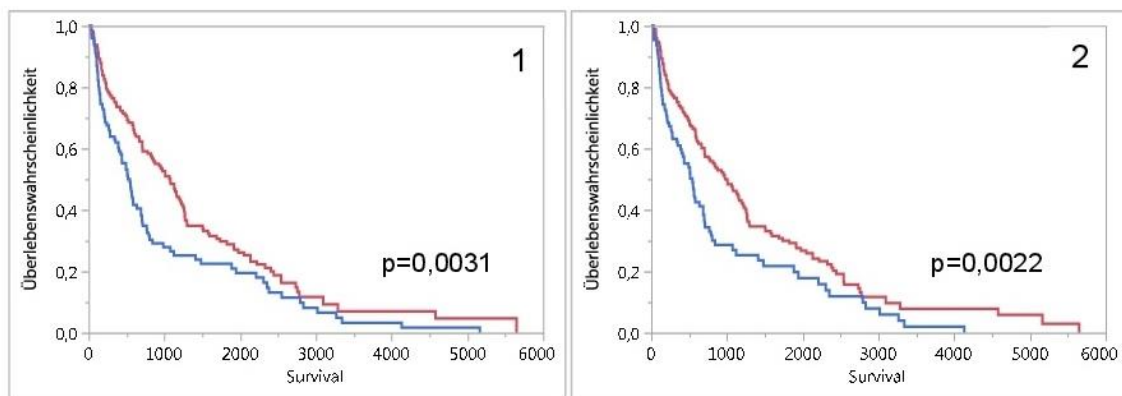


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve; 1: Überleben in Abhängigkeit der FoxG1-Expression über- oder unterhalb des FoxG1-Expressionsmittelwertes (29,5%). 2: Überleben in Abhängigkeit der FoxG1-Expression über- oder unterhalb des optimalen CART-Cutoffs (33%). Rot: Überlebenskurve FoxG1^{low}, Blau: Überlebenskurve FoxG1^{high}.

3.6.3 Überlebensanalyse Olig2

3.6.3.1 Parametrische Überlebensanalyse

In n=300 Patientenfällen mit erhebbarer Olig2-Status waren Überlebensdaten vorhanden. Es zeigte sich keine signifikante ($p=0,3296$) Korrelation zwischen den Olig2-Expressionsmittelwerten und dem Überleben des Patientenkollektivs. (s. Abbildung 28)

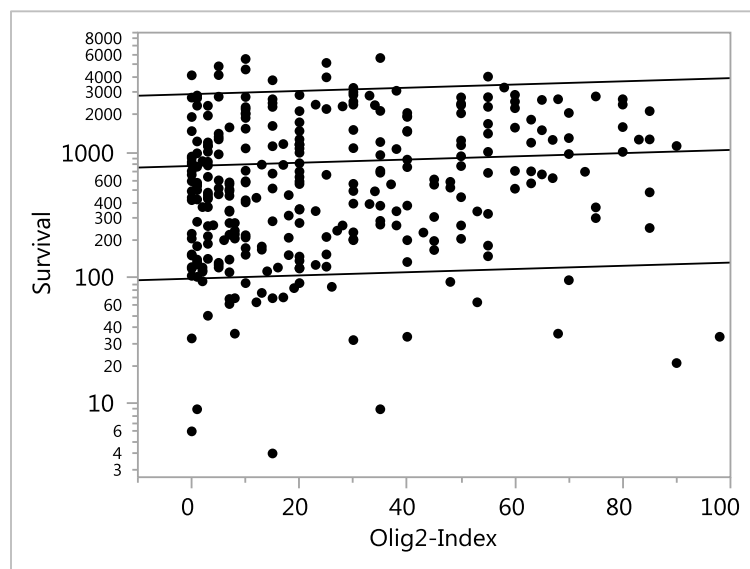


Abbildung 28: Parametrische Lebensdaueranpassung: Überleben in Abhängigkeit der Olig2-Expression.

3.6.3.2 Überlebensanalyse (Survival) nach Kaplan-Meier

Auch hier wurden die Olig2-Expressionsindices anhand des Mittelwertes (MW: 25,1%, n=279) und des CART-Cutoffs (CART: 10%, n=286) in Olig2^{low} und Olig2^{high} exprimierende Tumore gruppiert. In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier zeigten Olig2^{low}-Tumore getrennt nach Mittelwert (mittleres Überleben 636 Tage, 95%-Konfidenzintervall: 507-842 Tage) und getrennt nach CART-Cutoff (mittleres Überleben 549 Tage, 95%-Konfidenzintervall: 427-804 Tage) eine kürzere Lebenserwartung als Olig2^{high}-Tumore (MW-Cutoff: mittleres Überleben 1082 Tage (95%-Konfidenzintervall: 714-1411 Tage; CART-Cutoff: mittleres Überleben 1075 Tage, 95%-Konfidenzintervall: 714-1258 Tage).

Im Log-Rang Test ergaben sich bei der Trennung nach dem Mittelwert keine signifikanten ($p=0,3094$) Unterschiede zwischen dem Überleben der beiden Gruppen. Bei der Trennung von Olig2^{low} und Olig2^{high} nach dem mit Hilfe der rekursiven Partitionierung optimal ermittelten CART-Cutoff ergab sich allerdings eine signifikant ($p=0,0485$) längere Lebenserwartung für Olig2^{high}-Tumore. (s. Abbildung 29)

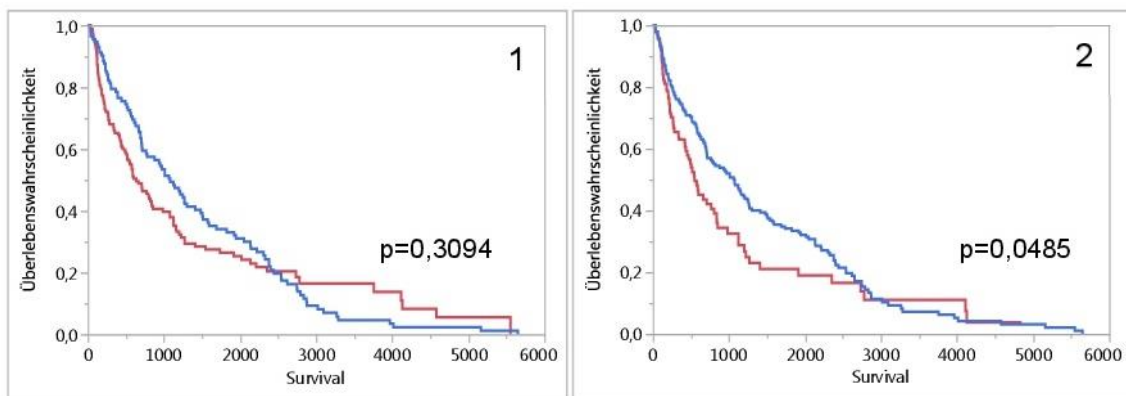


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve; 1: Überleben in Abhängigkeit der Olig2-Expression über- oder unterhalb des Olig2-Expressionsmittelwertes (25,1%). 2: Überleben in Abhängigkeit der Olig2-Expression über- oder unterhalb des optimalen CART-Cutoffs (10%). Rot: Überlebenskurve Olig2^{low}, Blau: Überlebenskurve Olig2^{high}.

3.6.4 Multivariate Überlebensanalyse

In die multivariate Überlebensanalyse wurden alle in der univariaten Analyse erhobenen signifikanten Parameter (parametrische Überlebensanalyse oder Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier) eingeschlossen. Hierbei zeigten WHO-Grad ($p=0,0001$), Alter ($p=0,0120$) und der ATRX-Status ($p<0,0001$) weiterhin einen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Der IDH-Mutationsstatus ($p=0,2192$) und der FoxG1- ($p=0,4328$) und Olig2-Expressionsstatus ($p=0,2936$) zeigten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben des Patientenkollektives mehr.

4 Diskussion

4.1 FoxG1 und Olig2 als prognostische und diagnostische Marker

Molekulargenetische Subgruppierungen von übergeordneten Tumorklassen rücken auf Grund ihrer prognostischen und therapeutischen Relevanz immer mehr ins Zentrum der Forschung, da die genetische Heterogenität von Gliomen Therapieversagen und Tumorrezidive begünstigt (Ellis et al. 2015). Vor allem Tumorguppen wie die prognostisch ungünstigen Glioblastome profitieren von einer Subklassifizierung und eventuell hieraus resultierenden individuellen Therapieansätzen (Galanis et al. 2011).

In der vorliegenden Studie wurden die molekularen Marker FoxG1 und Olig2 auf ihr prognostisches Potential und ihre prädiktive Bedeutung in Hinblick auf H3F3A K27M- und G34R-Mutationen untersucht, welche zwei von sechs international anerkannten Glioblastom-Subgruppen bilden (Sturm et al. 2012). Zudem wurde die Korrelation der beiden Marker mit wichtigen Parametern, wie zum Beispiel Alter, WHO-Grad, Lokalisation, Rezidiv-Status, IDH-Mutationsstatus, LOH, MGMT-Promotormethylierungsstatus und Überleben geprüft. Während Olig2 bereits relativ gut erforscht ist, sind die Daten zu FoxG1 in Gliomen bisher limitiert. In vergangenen Studien wurden die Olig2- und FoxG1-Analysen nach vorhandenem Kenntnisstand zudem nur an Tumor-Kollektiven mit Einteilung nach alter WHO-Klassifikation oder an Kollektiven, welche ausschließlich pädiatrische Gliome mit H3F3A-Mutationen enthielten, durchgeführt (Sturm et al. 2012). Es wurden bislang auch keine Olig2- und FoxG1-Färbung innerhalb einer Tumorentität direkt miteinander verglichen.

In der vorliegenden Studie wurde die neue WHO-Richtlinie von 2016 berücksichtigt und alle als Oligodendrogliome klassifizierten Tumore, welche negativ auf eine 1p/19q-Kodeletion oder IDH-Mutation getestet wurden, ausgeschlossen. In vielen Fällen konnte allerdings auf Grund fehlenden Patientenblutes keine rückwirkende LOH-Untersuchung durchgeführt werden. Daher wurden histologisch als Oligodendrogliome klassifizierte Tumore mit IDH-

Mutation, bei denen der LOH-Status nicht erhoben werden konnte, bei zusätzlichem Vorliegen einer ATRX-Retention als oligodendrogliale Tumore in das Studien-Kollektiv aufgenommen. Andernfalls wären die Fallzahlen für aussagekräftige statistische Analysen zu gering ausgefallen. Die Wahrscheinlichkeit, dass in dieser Konstellation kein LOH (1p/19q-Kodeletion) vorliegt, liegt bei unter 1,5% und beeinflusst somit die Aussagekraft der erhobenen Mittelwerte nur geringfügig. (Ebrahimi et al. 2016, Pekmezci et al. 2017) Bei den beiden eingeschlossenen oligodendroglialen Tumoren mit ATRX-Verlust (s. Kapitel 2.1.1) lag eine nachgewiesene IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion vor, wodurch es sich nach WHO 2016 um gesicherte Oligodendrogliome handelte (Louis et al. 2016).

4.1.1 FoxG1

In dieser Studie zeigte sich eine zunehmende FoxG1-Expression mit steigendem WHO-Grad (s. Kapitel 3.1.2). Glioblastome exprimierten dabei hochsignifikant mehr FoxG1 als alle anderen Entitäten, was auf eine Assoziation von FoxG1 mit erhöhter Tumormalignität hindeutet (s. Kapitel 3.1.1, Tabelle 4). Studien über FoxG1 wurden bisher vor allem an astrozytären Tumoren und dabei hauptsächlich an Glioblastomen durchgeführt (Verginelli et al. 2013, Dali et al. 2018). Dies ist eine der ersten Studien, welche zusätzlich die FoxG1-Expression in oligodendroglialen Tumoren untersucht. Oligodendrogliale Tumore zeigten dabei eine signifikant geringere FoxG1-Expression als astrozytäre Tumore (s. Kapitel 3.1.1). Da astrozytäre Tumore im Allgemeinen eine schlechtere Prognose als oligodendrogliale Tumore aufweisen, unterstützt dies die Annahme eines Zusammenhangs von steigender FoxG1-Expression mit höherer Malignität (Louis et al. 2016, Ostrom et al. 2017).

In vorherigen Studien konnte ebenfalls eine hohe FoxG1-Expression in Tumoren mit ungünstiger Prognose gezeigt werden. So wiesen in einer Studie von Verginelli et al. etwa 50% der Tumorzellen in einer Kohorte von 30 Glioblastomen eine FoxG1-Expression auf, was deutlich über der FoxG1-Expression in Normalhirn-Gewebe lag, welches nur in unter 10% der Zellen FoxG1 exprimierte. WHO-Grad II und III Gliome exprimierten ebenfalls mehr FoxG1 als normales

Hirngewebe, allerdings in geringerem Ausmaß als Glioblastome (WHO-Grad II circa 20%, WHO-Grad III circa 30%). Durch einen experimentell induzierten FoxG1-Knockdown in Hirntumor-initiierenden-Zellen (BTIC) in Mäusen konnte unter anderem eine Herunterregulation von Proliferations- und Stammzellmarkern und ein vermindertes von BTIC ausgehendes Wachstum erzielt werden. Somit erscheint eine Rolle von FoxG1 in der Tumorgenese von Glioblastomen wahrscheinlich. (Verginelli et al. 2013) Auch Medulloblastome, welche circa 20% der kindlichen neuroepithelialen Tumore ausmachen, zeigten vor allem in der prognostisch ungünstigen Non-SHH/Non-WNT-Gruppe eine FoxG1-Expression (Adesina et al. 2007, Manoranjan et al. 2013). Einige Studien weisen auf eine Rolle der FoxG1-Expression in der Malignität von Nicht-Hirntumoren hin. So berichten Chan et al. von einer Korrelation zwischen hoher FoxG1-Expression und high-grade Ovarialkarzinomen und weisen auf einen potentiellen onkogenen Charakter von FoxG1 hin, welcher in den antiproliferativen Signalweg von TGF-beta eingreift. (Chan et al. 2009) Auch in einer Studie über Harnblasenkarzinome wurde eine erhöhte FoxG1-Expression in Karzinomen im Gegensatz zu Normalgewebe nachgewiesen und FoxG1 mit der Entstehung von Harnblasenkarzinomen assoziiert. Vor allem Blasenkarzinome in fortgeschrittenem Stadium zeigten eine erhöhte FoxG1-Expression gegenüber weniger fortgeschrittenen und prognostisch günstigeren Tumoren. (Kim et al. 2009)

In der vorliegenden Studie konnte zudem in IDH-mutierten Tumoren eine hochsignifikant geringere FoxG1-Expression festgestellt werden als in Wildtyp-Tumoren (s. Kapitel 3.1.8 und 3.5.1). Die Assoziation von IDH-mutierten Tumoren mit einer besseren Prognose deutet darauf hin, dass eine geringe FoxG1-Expression möglicherweise als günstiger prognostischer Kofaktor fungiert (Yan et al. 2009, Hartmann et al. 2010). Unterstützt wird diese Beobachtung zudem durch frühere Studien, nach denen die prognostisch ungünstigen IDH-Wildtyp-Tumoren, wie zum Beispiel primäre Glioblastome, häufiger eine EGFR-Amplifikation oder EGFR-Mutation aufwiesen als IDH-mutierte Gliome (Crespo et al. 2015). EGFR induziert FoxG1-Transkription, was möglicherweise zu

Tumorgenese in der prognostisch ungünstigen Gruppe der IDH-Wildtyp Glioblastome führt (Liu et al. 2015).

Auch in Bezug auf ATRX (s. Kapitel 3.1.9), einem weiteren prognostischen Marker, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit bei prognostisch günstigen Tumoren mit nukleärem ATRX-Verlust eine geringere FoxG1-Expression im Vergleich zu Tumoren mit ATRX-Retention (Wiestler et al. 2013, Ebrahimi et al. 2016).

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der FoxG1-Expression zwischen primären und sekundären Glioblastomen (s. Kapitel 3.1.6). Auf Grund ihrer Abstammung von weniger malignen Astrozytomen tragen sekundäre Glioblastome in mehr als 70% der Fälle eine IDH1-Mutation (Cancer Genome Atlas Research 2008, Parsons et al. 2008). IDH-mutierte Tumore sind wie bereits beschrieben mit einer hochsignifikant geringeren FoxG1-Expression assoziiert als Wildtyp-Tumore. Somit wäre eine vergleichbar geringe FoxG1-Expression auch in der prognostisch günstigeren Gruppe der sekundären Glioblastome zu erwarten. Es ließ sich in der vorliegenden Studie zwar eine geringere FoxG1-Expression als in primären Glioblastomen zeigen, allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Dies ist am ehesten auf die geringe Fallzahl an sekundären Glioblastomen (n=13) zurückzuführen.

FoxG1^{low}-Tumore (Expression unterhalb des Expressions-Mittelwertes/ CART-Cutoffs) waren mit einem signifikant längeren Überleben assoziiert als FoxG1^{high}-Tumore (s. Kapitel 3.6.2.). Dies unterstreicht nicht zuletzt die Rolle von FoxG1 als prognostischer Faktor. Diese Beobachtung wird zusätzlich von einer früheren Analyse der prognostischen Relevanz von FoxG1-Genen unterstützt, in der mit Hilfe der Daten von über 500 Patientenproben aus dem „Cancer Genome Atlas“, einem Projekt zur Katalogisierung genetischer Mutationen in Tumoren, eine Assoziation von hohen FoxG1-RNA-Leveln in Glioblastomen mit einem geringeren Überleben gezeigt werden konnte (Robertson et al. 2015).

Die Lokalisationsverteilung FoxG1-exprimierender Tumore stimmte in dieser Studie mit Beobachtungen vorheriger Studien überein. Parietale und occipitale Tumore exprimierten signifikant mehr FoxG1 als Tumore des Thalamus oder der

Stammganglien. Temporale Tumore zeigten eine signifikant höhere FoxG1-Expression als frontale Tumore. Dies ist auf Grund der prädominant in frontalen Tumoren auftretenden IDH-Mutationen zu erwarten (Choi et al. 2017), da IDH-mutierte Tumore eine geringe FoxG1-Expression aufweisen (s. Kapitel 3.1.8). Dies lässt auf eine überwiegende Lokalisation von FoxG1-exprimierenden Tumoren im Parietallappen, Occipitallappen und Temporallappen schließen, was mit den Daten von Sturm et al. übereinstimmt, wonach Tumore mit einer H3F3A G34-Mutation und FoxG1⁺-Expressionsmuster (hohe FoxG1-Expression) ebenfalls überwiegend im Parietal-, Occipital- und Temporallappen zu finden waren (Sturm et al. 2012).

Geschlecht, Rezidiv-Status, MGMT-Promotormethylierung und LOH zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die FoxG1-Expression. Es zeigte sich zwar eine Tendenz zu höheren FoxG1-Werten mit steigendem Alter, eine signifikante Korrelation konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bereits in anderen Tumoren, so zum Beispiel in einer Analyse der FoxG1-Expression in Ovarialkarzinomen. Auch hier ergab sich eine Korrelation von FoxG1 und Malignitätsgrad mit hoher FoxG1-Expression in high-grade Ovarialkarzinomen. Allerdings konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen FoxG1-Expression und Rezidiv-Status oder Patientenalter festgestellt werden. (Chan et al. 2009) Dies lässt vermuten, dass diese Parameter keinen Einfluss auf die Höhe der FoxG1-Expression haben.

4.1.2 Olig2

Oligodendrogliale Tumore (Oligodendrogliome WHO-Grad II und anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III) zeigten in der vorliegenden Studie eine deutlich höhere Olig2-Expression als astrozytäre Tumore, wobei die Olig2-Expressionslevel in astrozytären Tumoren mit zunehmender Malignität und WHO-Grad sanken und Glioblastome die geringste Olig2-Expression aufwiesen (s. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) Die ermittelten Olig2-Expressionsmuster erwiesen sich somit im Einklang mit der bestehenden Literatur. Eine Studie von Ohnishi et al. konnte bereits signifikant mehr Olig2-exprimierende Zellen in

anaplastischen Oligodendrogliomen im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen nachweisen. In derselben Studie konnten zudem steigende Level von Olig2-mRNA mit sinkendem WHO-Grad in astrozytären Tumoren festgestellt werden. (Ohnishi et al. 2003) Diese Beobachtung konnte in einer weiteren Studie von Rhee et al. bestätigt werden. Hier zeigte sich eine sinkende Olig2-Expression mit steigendem WHO-Grad, wobei Glioblastome WHO-Grad IV mit 25% Olig2-exprimierender Zellen eine deutlich geringere Olig2-Expression aufwiesen als WHO-Grad II und III Tumore, welche zwischen 56% und 89% Olig2-exprimierender Tumorzellen aufwiesen. (Rhee et al. 2009) Diese Ergebnisse deuten auf ein positives prognostisches Potential von Olig2 bei vorhandener Expression hin. Auch die in den molekularen Subgruppen ermittelten Olig2-Expressionsindices konnten dies bestätigen. So zeigten die Gruppen IDHmut+ATRXloss und IDHmut+LOH eine signifikant höhere Olig2-Expression als die IDHwt-Gruppe (s. Kapitel 3.5.2). Eine Erklärung ist dabei vermutlich die signifikant bessere Prognose von Tumoren mit IDH-Mutation, 1p/19q-Kodeletion und ATRX-Verlust im Gegensatz zu IDH-Wildtyp Tumoren. Die Gruppe IDHmut+LOH zeigte dabei äquivalent zu den durch sie repräsentierten prognostisch günstigen Oligodendrogliomen signifikant höhere Olig2-Expressionsindices als die Gruppe IDHmut+ATRXloss, welche den IDH-mutierten Astrozytomen entsprach. (Suzuki et al. 2014, Louis et al. 2016) Hinweise, dass eine hohe Olig2-Expression für eine günstige Prognose sprechen, fanden sich bereits in Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML). Olig2 inhibiert dabei das Tumorwachstum in AML-Zellen und scheint eine Leukämie-unterdrückende Wirkung zu haben. (Yalcin et al. 2017)

Die generelle prognostische Aussagekraft von Olig2 in Gliomen wird allerdings durch Ausnahmen wie Glioblastome mit einer H3F3A K27M-Mutation limitiert, welche ähnlich hohe Olig2-Expressionsindices wie oligodendrogliale Tumore aufwiesen (s. Kapitel 3.4.2). Dies erscheint auf Grund der sehr unterschiedlichen Tumorbilogie überraschend, da Oligodendrogliome in der Regel eine gute Therapierbarkeit mit PCV-Polychemotherapie und eine relativ günstige Prognose aufweisen, während K27M-mutierte Glioblastome meist eine infauste Prognose zeigen (Cairncross et al. 1998, Khuong-Quang et al. 2012). In einer aktuellen

Studie von Anderson et al. erwies sich Olig2 jedoch als elementar für die Entstehung von diffusen intrinsischen Ponsgliomen (DIPG), hochmalignen kindlichen Hirnstammtumoren, zu denen K27M-mutierte Glioblastome zählen. Vermutlich führen verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen in Stammzell-Markern des Pons, so unter anderem in Olig2, zur Entstehung von DIPG durch ungehinderte Proliferation. In 70-80% der DIPG zeigte sich eine hohe Olig2-Expression und rund 80% wiesen entweder eine H3F3A-Mutation oder eine verwandte HIST1H3B-Mutation auf. Die Lokalisation der DIPG im Hirnstamm in Kombination mit einer H3F3A-Mutation sprechen für K27M-mutierte pädiatrische Glioblastome, in denen ebenso wie in der vorliegenden Arbeit eine hohe Olig2-Expression zu finden ist. (Sturm et al. 2012, Anderson et al. 2017) Auch Otero et al. beobachtete in einer Studie an ependymalen und astrozytären pädiatrischen Tumoren eine besonders hohe Olig2-Expression in pädiatrischen Glioblastomen, vor allem in hochproliferativen Tumoren (Otero et al. 2011). Während Glioblastome in adulten oder gemischten Kollektiven eine geringe Olig2-Expression aufweisen (Rhee et al. 2009, Kupp et al. 2016, Schäfer et al. 2018), scheinen pädiatrische Glioblastome somit eine besonders hohe Olig2-Expression aufzuweisen. Diese Beobachtungen unterstreichen die genetischen und biologischen Unterschiede zwischen adulten und pädiatrischen Glioblastomen und die Relevanz von klinisch und molekular einheitlichen Subgruppen (Paugh et al. 2010, Qu et al. 2010, Sturm et al. 2012). Eine weitere Unterteilung von pädiatrischen Glioblastomen wurde bei Otero et al. allerdings nicht vorgenommen. (Otero et al. 2011) Die einzelnen Subgruppen der pädiatrischen Glioblastome wiesen in anderen Studien jedoch unterschiedliche Olig2-Expressionsmuster auf. So konnten sowohl bei Sturm et al. als auch in der vorliegenden Studie eine hohe Olig2-Expression in H3F3A K27M-mutierten Tumoren gezeigt werden, während H3F3A G34R-mutierte pädiatrische Tumore eine negative bis sehr geringe Olig2-Expression aufwiesen (s. Kapitel 3.4.2 und (Sturm et al. 2012)). Bei Otero et al. zeigten Tumore im Hirnstamm und Rückenmark einen erhöhten Olig2-Score im Vergleich zu Tumoren in den Frontal-, Parietal-, Temporal- oder Occipitallappen. (Rhee et al. 2009, Otero et al. 2011) Dies könnte auch hier ein Hinweis auf erhöhte Olig2-Expression in

K27M-mutierten Tumoren sein, welche zu den Olig2⁺ exprimierenden, pädiatrischen Mittellinientumoren (häufig in Hirnstamm oder Rückenmark) zählen (Sturm et al. 2012). Eine nähere Aussage zu den Gründen der unterschiedlichen Olig2-Expression in den pädiatrischen Glioblastom-Subgruppen kann mit der vorliegenden Arbeit jedoch nicht getroffen werden. Die genaue Rolle von Olig2 in der Gliomentstehung und der Zusammenhang zwischen Olig2-Expression und verschiedenen intrazellulären Signalwegen sind nicht vollständig verstanden (Ligon et al. 2007). So spielt Olig2 eine Rolle in multipotenten Vorläuferzellen des ZNS und progenitor-ähnlichen Zellen in Gliomen und unterdrückt somit Zelldifferenzierung. Andererseits spielt Olig2 auch eine pro-neurale Rolle in der Entstehung und Differenzierung von Oligodendrozyten. (Sun et al. 2011, Trepant et al. 2015) Zudem scheint Olig2 auch in normalem, adultem Hirngewebe eine Rolle zu spielen. So konnte beispielsweise eine Hochregulation von Olig2 nach Hirnverletzungen gezeigt werden, welche die Neurogenese in den verletzten Hirnarealen unterdrückt und mitverantwortlich für das fehlende Ersetzen von Neuronen nach Hirnverletzung ist. (Buffo et al. 2005) Weitere Studien sind notwendig, um die genaue Rolle von Olig2 in der Entstehung von verschiedenen Gliomentitäten zu erforschen und insbesondere die Gründe für die signifikant unterschiedlichen Olig2-Expressionsmuster in H3F3A-mutierten Tumoren zu untersuchen.

In Hinblick auf das prognostische Potential von Olig2 zeigte sich in dieser Studie ein signifikanter Abfall der Olig2-Expression mit steigendem WHO-Grad (s. Kapitel 3.2.2). Zudem wiesen die gut therapierbaren oligodendroglialen Tumore (Cairncross et al. 1998) eine signifikant höhere Olig2-Expression als astrozytäre Tumore auf (s. Kapitel 3.2.1). In der Gruppe der prognostisch günstigen IDH-mutierten Tumore (Louis et al. 2016) exprimierten ebenfalls signifikant mehr Tumorzellen Olig2 als in IDH-Wildtyp Tumoren (s. Kapitel 3.2.8). In den Überlebensanalysen zeigte Olig2 außerdem bei der Verwendung des mit Hilfe der rekursiven Partitionierung optimal ermittelten CART-Cutoff eine signifikant höhere Lebenserwartung bei Patienten mit Olig2^{high}-Tumoren (s. Kapitel 3.6.3). Die multivariate Analyse zeigte jedoch keinen unabhängigen Einfluss von Olig2 auf das Überleben (s. Kapitel 3.6.4). Olig2 kann somit zwar als Hinweis für eine

positive Prognose bei Gliomen gewertet werden, allerdings schließen Ausnahmen wie die bereits erwähnte hohe Olig2-Expression in K27M-mutierten Glioblastomen Olig2 als prognostischen Marker aus.

Infratentorielle (n=8) Tumore zeigten in der vorliegenden Studie eine signifikant höhere Olig2-Expression als supratentorielle (n=310) Tumore (s. Kapitel 3.2.7). Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass unter den infratentoriellen Tumoren einige K27M-mutierte Mittellinientumore, beispielsweise des Hirnstamms, enthalten sind. Ein größeres Kollektiv an infratentoriellen Tumoren wäre notwendig, um dies zu verifizieren. In einer Studie von Andreiuolo et al. an pädiatrischen Ependymomen zeigten sich ebenfalls höhere Olig2-Expressionsindices in infratentoriellen Tumoren im Gegensatz zu supratentoriellen Tumoren, mit signifikant erhöhter Olig2-Expression in der hinteren Schädelgrube (Andriuolo et al. 2010). Es sind kaum Daten zur Verteilung der Olig2-Expression in adultem Normalhirngewebe vorhanden. Bekannt ist eine vermehrte Olig2-Expression in der zerebellären ventrikulären Zone während der embryonalen Entwicklung (Seto et al. 2014). Somit könnte die hohe Olig2-Expression in infratentoriellen Tumoren unter Umständen auch auf ein bereits vorhandenes heterogenes Olig2-Expressionsmuster in Normalhirngewebe zurückzuführen sein.

Bei Andreiuolo et al. zeigte sich in supratentoriellen Ependymomen zudem eine Hochregulierung an Markern wie FoxG1 im Gegensatz zu infratentoriellen Ependymomen (Andriuolo et al. 2010). FoxG1-Expressionsindices zeigten sich auch in der vorliegenden Studie in supratentoriellen Tumoren erhöht im Vergleich zu infratentoriellen Tumoren, wenngleich nicht signifikant (s. Kapitel 3.1.7). FoxG1 ist für die embryonale Entstehung des Telencephalon essentiell (Martynoga et al. 2005, Manuel et al. 2010). Somit könnten die hier ermittelten hohen FoxG1-Expressionsindices in supratentoriellen Tumoren ebenfalls auf ein bestehendes FoxG1-Verteilungsmuster in Normalhirngewebe zurückzuführen sein. Die hier ermittelten Olig2- und FoxG1-Expressionsmuster könnten andererseits auch einen Hinweis auf ein unterschiedliches klinisches und biologisches Verhalten von supra- und infratentoriellen Tumoren geben und

bedürfen somit weiterer Studien zur Untersuchung der Rolle von Olig2 und FoxG1 in unterschiedlichen Tumorlokalisationen mit direktem Vergleich entsprechender Normalhirnproben.

Analog zu FoxG1 wurde die Olig2-Expression durch Geschlecht, Alter, Rezidiv-Status und MGMT-Promotormethylierung nicht signifikant beeinflusst. Es zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen 1p/19q-Kodeletierten und 1p/19q-intakten Tumoren (s. Kapitel 3.2.11). Auf Grund der Assoziation von 1p/19q-Kodeletionen mit oligodendroglialen Tumoren (Mokhtari et al. 2005, Louis et al. 2016), wäre hier eigentlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohen Olig2-Expressionsindices und 1p/19q-Kodeletion zu erwarten (s. Kapitel 3.2.1: oligodendrogliale Tumore mit signifikant höherer Olig2-Expression als astrozytäre Tumore). Ein signifikanter Zusammenhang konnte in der vorliegenden Studie vor allem auf Grund der geringen Zahl der auf LOH (1p/19q-Kodeletion) getesteten astrozytären Tumoren (n=19) nicht gezeigt werden. Die generell gering Olig2-exprimierenden astrozytären Tumore fielen so weniger ins Gewicht. Andere Studien konnten hingegen einen signifikanten Zusammenhang zwischen 1p/19q-Kodeletion und hohen Olig2-Expressionsindices in Gliomen nachweisen (Durand et al. 2010).

Sekundäre Glioblastome zeigten ebenfalls keine signifikant höhere Olig2-Expression, obwohl dies auf Grund der häufigen IDH-Mutationen in diesen Tumoren zu erwarten wäre (Ohgaki et al. 2013). Dies ist vermutlich auf die geringe Fallzahl (n=12) der sekundären Glioblastome in dieser Studie zurückzuführen.

4.1.3 Relevanz von FoxG1 und Olig2 zur Detektion von H3F3A-Mutationen

Glioblastome wurden von Sturm et al. an Hand ihrer biologischen und molekularen Charakteristik in sechs Subgruppen unterteilt, welche unterschiedliche Schlüsselmutationen aufweisen (Sturm et al. 2012). Zwei Subgruppen zeigen eine Mutation im H3F3A-Gen (K27 und G34), welches für

eine replikations-unabhängige Form des Histons H3 (H3.3) kodiert und in einem Drittel der kindlichen Glioblastome vorhanden ist (Schwartzentruber et al. 2012). Sturm et al. berichten von einem Olig2⁺/FoxG1⁻-Profil in der Subgruppe der K27-mutierten Tumore und einem Olig2⁻/FoxG1⁺-Profil in der G34-mutierten Subgruppe der beiden H3F3A-mutierten Gruppen (Sturm et al. 2012). In der vorliegenden Studie konnte ein FoxG1^{low}/Olig2^{high}-Profil in K27M-mutierten Tumoren und ein FoxG1^{high}/Olig2^{low}-Profil in G34R-mutierten Tumoren nachgewiesen werden (high/low: Expression oberhalb/unterhalb des CART-Cutoffs; s. Kapitel 3.4), was die Beobachtungen von Sturm et al. bestätigt (Sturm et al. 2012). FoxG1 und Olig2 zeigten hierbei eine signifikant negative Korrelation (s. Kapitel 3.3).

Die Olig2-Expressionswerte waren in der Gruppe der sequenzierten Tumore bei G34R-mutierten Tumoren signifikant geringer als in K27M-mutierten oder Wildtyp-Tumoren (s. Kapitel 3.4.2). Die molekulare Subgruppe H3F3A G34R zeigte zudem eine signifikant geringere Olig2-Expression als alle anderen molekularen Subgruppen (H3F3A K27M, IDHmut+LOH, IDHwt und IDHmut+ATRXloss). Olig2 ist somit als immunhistochemischer Marker geeignet, G34R von den anderen Tumorgruppen zu unterscheiden (s. Kapitel 3.5.2). Es wird angenommen, dass die Olig2-Expression in G34-mutierten Tumoren auf Grund einer vermehrten Expression des Onkoproteins MYCN herunterreguliert wird. MYCN unterdrückt Signalwege der Zelldifferenzierung, was zu einer verminderten Expression von Zelldifferenzierungs-Proteinen wie Olig2 führt. (Huang et al. 2013) K27M-mutierte Tumore zeigten in der vorliegenden Arbeit eine Tendenz zu höheren Olig2-Expressionswerten als Wildtyp-Tumore, die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. In der Gruppe der mit Hilfe von IHC bestimmten K27M-mutierten Tumore zeigte sich die Olig2-Expression dagegen signifikant erhöht gegenüber den nicht-K27M-mutierten (Wildtyp- und G34R-mutierten) Tumoren. (s. Kapitel 3.4.2) Dies könnte ein Hinweis auf signifikante Unterschiede in der Olig2-Expression zwischen K27M-mutierten und Wildtyp-Tumoren sein, welche im nicht-K27M-mutierten, G34R/wt-Kollektiv klar überwiegen. Eine Studie mit einer größeren Anzahl an sequenzierten H3F3A-mutierten Tumoren könnte hier für weitere Klärung sorgen.

Es zeigten sich in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede in der FoxG1-Expression zwischen H3F3A K27M-mutierten, G34R-mutierten oder Wildtyp-Tumoren (s. Kapitel 3.4.1) und somit kein diagnostisches Potential von FoxG1, diese zu unterscheiden oder zu detektieren. Dies entsprach nicht den Beobachtungen von Schäfer et al., in deren fast identisch aufgebauten Studie K27M-mutierte Tumore eine signifikant geringere FoxG1-Expression als G34-mutierte und Wildtyp-Tumore zeigten. Der wesentliche Unterschied im Aufbau dieser Studie bestand aus einer maschinellen Auszählung der immunhistochemisch gefärbten Tumorzellen mit Hilfe des Programms „ImmunoRatio plugin für ImageJ“, anstatt der hier verwendeten manuellen, lichtmikroskopischen Auszählung. Diese Unterschiede sind vermutlich auf die geringe Fallzahl der sequenzierten H3F3A-mutierten Tumore (n=24) sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Schäfer et al. zurückzuführen, da die übrigen Ergebnisse der manuellen Auswertung der vorliegenden Studie und der maschinellen Auswertung von Schäfer et al. in fast allen Punkten übereinstimmen. (Schäfer et al. 2018)

Bei Schäfer et al. ergab sich allerdings ebenso wie in der vorliegenden Studie, trotz Ermittlung eines optimalen Cutoffs von FoxG1- und Olig2-positiven Tumorzellen mit Hilfe der rekursiven Partitionierungsanalyse eine zu geringe Sensitivität und Spezifität, um zwischen H3F3A-mutierten und Wildtyp-Tumoren unterscheiden zu können. Lediglich zwischen den Gruppen der H3F3A G34R-mutierten und Wildtyp-Tumoren konnte bei einem Cutoff von 5% (4% bei Schäfer et al.) Olig2-exprimierender Zellen eine verbesserte Diskrimination festgestellt werden. (s. Kapitel 3.4.3 und Schäfer et al. 2018)

Sowohl Olig2- als auch FoxG1-Expressionsmittelwerte in H3F3A-mutierten Tumoren zeigten allerdings teilweise gleiche Olig2- und FoxG1-Expressionsmittelwerte wie IDH-mutierte und Wildtyp-Tumoren (s. Kapitel 3.5). Eine ausschließliche Detektion von H3F3A-Mutationen mit Hilfe der von Olig2 und FoxG1 ist somit nicht möglich. Ausnahme ist eine sehr geringe bis negative Olig2-Expression, welche für eine G34R-Mutation spricht. Ausgesprochen geringe Olig2-Expressionsindices können so, insbesondere in Kombination mit molekularen Markern wie ATRX-Verlust oder TP53-Mutationen, welche bereits

mit H3F3A-Mutationen assoziiert werden, zur Diagnose von G34R-Mutationen beitragen (Khuong-Quang et al. 2012, Ebrahimi et al. 2016). Zudem wies ein FoxG1^{low}/Olig2^{high}-Profil auf K27M-mutierte Tumore und ein FoxG1^{high}/Olig2^{low}-Profil auf G34R-mutierte Tumore hin (s. auch Sturm et al. 2012). Tumore mit entsprechendem Profil sollten deshalb auf ihren H3F3A-Mutationsstatus hin untersucht werden. Bisher werden H3F3A-mutierte Tumore häufig sequenziert. K27M-mutierte Tumore können zudem mit einem Antikörper immunhistochemisch detektiert werden (Venneti et al. 2014). Ein erster G34R-Antikörper wurden zwar bereits entwickelt, muss sich allerdings in der Routine noch bewähren (Haque et al. 2017). Gliome, insbesondere Glioblastome, welche die Mehrzahl der H3F3A-mutierten Tumore bilden, könnten in Zukunft anhand ihres FoxG1- und Olig2-Expressionsmusters vorselektiert werden, um eventuelle Kosten durch Sequenzierung oder zusätzliche immunhistochemische Färbungen mit K27M- und G34R-Antikörpern zu vermeiden.

4.2 Limitationen der Studie

Ein limitierender Faktor dieser Studie ist das retrospektive Studiendesign. So können einige der vorhandenen Daten rückblickend erschwert beurteilt und zusätzliche Informationen zum Zeitpunkt der Studie nur schwer oder gar nicht erhoben werden. Ein Beispiel ist hier der 1p/19q-Kodeletionsstatus, welcher auf Grund fehlender Blutproben der Patienten in vielen Fällen nachträglich nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurde dies durch ergänzende Berücksichtigung des ATRX-Status kompensiert.

Des Weiteren könnten von der Literatur abweichende Ergebnisse auf zusätzliche, in dieser Studie nicht berücksichtigte Faktoren zurückzuführen sein, wie beispielsweise die unterschiedlichen Therapieansätze der Patienten. Verschiedene Therapieansätze und die breite Altersspanne der Patienten führen zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit der prognostischen Relevanz von FoxG1 und Olig2. Es wurde daher versucht, mögliche Störfaktoren mit Hilfe hoher Fallzahlen zu minimieren. Das Kollektiv der H3F3A-mutierten Tumore wies jedoch auf Grund der Notwendigkeit der Sequenzierung von G34R-mutierten

Tumoren zum Zeitpunkt der Datenerhebung und der klinischen Seltenheit eine geringe Fallzahl auf. Die in dieser Studie an H3F3A-mutierten Tumoren erhobenen Daten entsprachen dennoch weitestgehend Beobachtungen aus früheren Studien (Sturm et al. 2012). Allerdings wären weitere Studien mit höheren Fallzahlen an H3F3A-mutierten Tumoren notwendig, um die hier erhobenen Daten zu verifizieren und zusätzliche institutsübergreifende Überlebensanalysen in den H3F3A-mutierten Gruppen durchführen zu können. Eine Limitation der hier verwendeten Tissue Microarray Methode sind die kleinen Stichproben, welche nur Ausschnitte der jeweiligen Tumore darstellen. Dies könnte eine mögliche Heterogenität der FoxG1- oder Olig2-Expression innerhalb eines Tumors übersehen und so beispielsweise zur Fehlbeurteilung von Hotspots als durchschnittliches Tumorgewebe führen. Die TMA-Methode erwies sich jedoch unter Verwendung von doppelten Tumorproben eines Tumors als gleichwertig zu Flächenschnitten (Camp et al. 2000, Parker et al. 2002). Um die Fehlerquote zu minimieren wurden deshalb auch in dieser Studie wenn möglich mehrere Tumorproben von einem Tumor erstellt und gewertet. Zudem wurden zur Kontrolle einige Flächenschnitte, vor allem der H3F3A-mutierten Tumoren, in die Studie miteinbezogen. Die TMA-Methode wurde in dieser Studie auf Grund ihrer zeit- und materialsparenden Eigenschaften (Tumorgewebe und Antikörper) und der gleichmäßigen Färbung von mehreren Tumorproben auf einem Objektträger eingesetzt.

4.3 Schlussfolgerung

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Analyse des prognostischen und diagnostischen Potentials von FoxG1- und Olig2-Expression in Gliomen. Hierbei wurde insbesondere die Relevanz von FoxG1 und Olig2 zur Detektion von H3F3A-mutierten Tumoren untersucht.

Im Hinblick auf das prognostische Potential erwies sich FoxG1 als potentieller negativer prognostischer Marker. Eine hohe FoxG1-Expression deutete auf eine höhere Malignität hin, wobei die FoxG1-Expression mit steigendem WHO-Grad anstieg und die prognostisch ungünstigen Tumore ohne IDH-Mutation und ohne

ATRX-Verlust mit hohen FoxG1-Expressionsindices einhergingen. Zudem zeigte sich in FoxG1^{low}-Tumoren ein signifikant längeres Überleben als in FoxG1^{high}-Tumoren.

Im Gegensatz dazu zeigte Olig2 ein positives prognostisches Potential. So exprimierten oligodendrogliale Tumore signifikant mehr Olig2 als astrozytäre Tumore und die Olig2-Expression stieg mit fallender Malignität und sinkendem WHO-Grad. Auch die prognostisch günstigen IDH-mutierten Tumore zeigten hohe Olig2-Expressionsindices und Olig2^{high}-Tumore zeigten passend dazu ein signifikant längeres Überleben als Olig2^{low}-Tumore. Das prognostische Potential von Olig2 wird allerdings durch die hohe Olig2-Expression in H3F3A K27M-mutierten Glioblastomen limitiert. Dies verdeutlicht die Heterogenität innerhalb von Entitäten und somit die Relevanz der Bildung von molekular definierten Subgruppen. Ein Beispiel für die intratumorale Heterogenität sind hier die beiden H3F3A-mutierten Subgruppen. Während G34R-mutierten Tumore, vermutlich auf Grund einer erhöhten Expression des Onkoproteins MYCN, eine extrem niedrige bis negative Olig2-Expression aufwiesen, exprimierten K27M-mutierte Tumore ähnlich viel Olig2 wie oligodendrogliale Tumore (Huang et al. 2013).

In Hinblick auf das diagnostische Potential wiesen K27M-mutierte Tumore ein FoxG1^{low}/Olig2^{high}-Profil und G34R-mutierte Tumore ein FoxG1^{high}/Olig2^{low}-Profil auf. Diese Ergebnisse zeigten sich in Einklang mit initialen Beobachtungen von Sturm et al. (Sturm et al. 2012). Liegt eines der beiden Expressionsprofile vor, gibt dies einen Hinweis auf die jeweilige H3F3A-Mutation. Tumore mit entsprechendem Profil sollten deshalb auf ihren H3F3A-Mutationsstatus hin untersucht werden. FoxG1 und Olig2 alleine zeigten jedoch auf Grund der gemeinsamen Schnittmenge von Expressionsindices in H3F3A-mutierten, IDH-mutierten und Wildtyp-Tumoren kein ausreichendes Potential zur alleinigen Detektion von H3F3A-Mutationen. Lediglich eine sehr geringe bis negative Olig2-Expression wies auf G34R-mutierte Tumore hin ($p=0,0005- < 0,0001$). In Kombination mit einem ATRX-Verlust oder einer TP53-Mutation, welche stark mit H3F3A-Mutationen assoziiert sind, kann eine sehr geringe bis negative Olig2-Expression zur Detektion von G34R-mutierten Tumore genutzt werden (Khuong-Quang et al. 2012). Insbesondere Glioblastome könnten somit vor allem bei

Vorliegen der genannten Konstellation auf G34R-Mutationen, aber auch bei entsprechendem FoxG1^{low}/Olig2^{high}- oder FoxG1^{high}/Olig2^{low}-Expressionsprofil auf die jeweilige H3F3A-Mutation überprüft werden, um auf diese Weise weitere Kosten durch zusätzliche immunhistochemische Färbungen oder Sequenzierung zu vermeiden. Weitere Studien würden benötigt werden, um die Gründe für die Überschneidung von Olig2- und FoxG1-Expressionsindices in H3F3A-mutierten Tumoren mit Expressionsindices in IDH-mutierten und Wildtyp-Tumoren zu erforschen und eine mögliche Rolle der beiden Marker in diesen Tumoren näher zu betrachten.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die vorliegende Arbeit zum Verständnis des prognostischen und diagnostischen Potentials von FoxG1 und Olig2 beiträgt und durch Analysen an einem großen Tumorkollektiv aus astrozytären und oligodendroglialen Gliomen eine Übersicht über die Eigenschaften der beiden Marker gibt.

5 Zusammenfassung

Diffuse Gliome sind die häufigsten malignen primären Hirntumore. Zu ihnen zählen Astrozytome WHO-Grad II, anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, Glioblastome WHO-Grad IV, Oligodendrogliome WHO-Grad II und anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III. (Louis et al. 2016) Sie zeigen insgesamt eine eher schlechte Prognose, was unter anderem auf intratumorale Heterogenität zurückzuführen ist. Molekulare Marker helfen dabei, Subgruppen mit ähnlichen klinischen und pathologischen Charakteristika zu erstellen und ermöglichen somit durch Homogenisierung der Gruppen individuellere Therapieschemata und genauere Prognosevorhersagen. (Ellis et al. 2015, Lapointe et al. 2018) Ein Beispiel hierfür sind die sechs von Sturm et al. identifizierten international anerkannten Subgruppen der besonders heterogenen Glioblastome. Hier wurde unter anderem auf ein mögliches Potential von FoxG1 und Olig2 zur Detektion der H3F3A-mutierten Glioblastomsubgruppen K27 und G34 hingewiesen. (Sturm et al. 2012)

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das diagnostische Potential von FoxG1 und Olig2 im Hinblick auf die Detektion von H3F3A-Mutationen in einem großen Tumorkollektiv (n=500) von astrozytären und oligodendroglialen Tumoren analysiert. Zusätzlich wurden die beiden Marker auf ihr prognostisches Potential und ihr Expressionsverhalten in Korrelation mit diversen klinischen und pathologischen Parameter wie Lokalisation, Alter, Geschlecht, Rezidivstatus, Überleben, Tumorentität, WHO-Grad und molekularen Markern wie IDH-Mutationsstatus, MGMT-Promotormethylierung, ATRX-Status und 1p19q-Kodeletion analysiert. Anhand von drei eigens für diese Arbeit konstruierten TMAs, 10 weiteren TMAs und 29 Flächenschnitten wurde eine quantitative, lichtmikroskopische Auszählung von immunhistochemisch gefärbten FoxG1- und Olig2-positiven Tumorzellen vorgenommen (s. Anhang Abbildung 32).

Es zeigte sich eine signifikant ($p=0,0025$) häufigere nukleäre FoxG1-Expression in astrozytären Tumoren im Vergleich zu oligodendrogliale Tumoren, während Olig2 in oligodendroglialen Tumoren signifikant ($p<0,0001$) häufiger nukleär exprimiert wurde als in astrozytären Tumoren. Die FoxG1-Expression stieg mit dem WHO-Grad von 17,4% in WHO-Grad II, über 20,8% in WHO-Grad II bis

38,3% in WHO-Grad IV Tumoren. Die Olig2-Expression sank dagegen von 33,4% in WHO-Grad II zu 29,6% in WHO-Grad III bis auf 19,0% in WHO-Grad IV Tumoren. In IDH-mutierten Tumoren ($p < 0,0001$) und Tumoren mit ATRX-Verlust ($p < 0,0001$) war die FoxG1-Expression signifikant reduziert, während Olig2-positive Zellkerne in IDH-Wildtyp ($p < 0,0001$) und G34R-mutierten Tumoren ($p = 0,0005$ G34R/K27Mmut; $p < 0,0001$ G34R/H3F3Awt) signifikant reduziert waren. In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier zeigte sich ein signifikant längeres Überleben in FoxG1^{low}- (n=280, Log-Rank $p = 0,0022$) und Olig2^{high}-Tumoren (n=286, Log-Rank $p = 0,0485$). Beide Marker zeigten in der multivariaten Analyse allerdings keinen Einfluss mehr auf das Überleben der Patienten. (s. Anhang Tabelle 13 und 14)

Damit spricht eine hohe FoxG1-Expression für eine eher ungünstige Prognose, während Olig2-hochexprimierende Tumore in der Regel eine günstige Prognose aufweisen. Ausnahme sind K27M-mutierte Tumore mit besonders ungünstiger Prognose und einer hohen Olig2-Expression. Das diagnostische Potential von FoxG1 und Olig2 ist limitiert, da eine ausschließliche Detektion von H3F3A-Mutationen mit Hilfe der beiden Marker auf Grund ähnlicher Expressionsindices in IDH-mutierten und Wildtyp-Tumoren nicht möglich ist. Ein FoxG1^{low}/Olig2^{high}-Profil weist jedoch auf K27M-mutierte Tumore und ein FoxG1^{high}/Olig2^{low}-Profil auf G34R-mutierte Tumore hin (s. auch Sturm et al. 2012). Tumore mit entsprechendem Profil sollten deshalb auf ihren H3F3A-Mutationsstatus hin untersucht werden. Tumore mit sehr geringer bis negativer Olig2-Expression, insbesondere bei zusätzlichem Vorliegen anderer mit H3F3A-Mutationen assoziierter Konstellationen wie ATRX-Verlust oder TP53-Mutationen entsprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit G34R-mutierten Tumoren (Khuong-Quang et al. 2012, Ebrahimi et al. 2016).

Die vorliegende Arbeit trägt zum besseren Verständnis des Expressionsverhaltens von Olig2 und FoxG1 bei. Hier ermittelte Expressionsmuster können in Zukunft zur Vorselektion insbesondere von Glioblastomen dienen, um eventuelle Kosten und Aufwand durch Sequenzierung oder zusätzliche immunhistochemische Färbungen H3F3A-mutierter Tumore zu reduzieren.

6 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Verteilung der von primären Hirntumoren und anderen ZNS-Tumoren nach histologischem Subtyp. Abbildung modifiziert nach (Ostrom et al. 2017), Auswertung von 2010-2014 in der USA diagnostizierten primären Hirntumoren und anderen ZNS-Tumoren.....	11
Abbildung 2: Diffuse Gliome in HE-Färbung (mit Zeiss Mirax Scanner digitalisiert).....	12
Abbildung 3: Anzahl der Tumorproben und Patientenfälle; modifiziert nach Schäfer et al. (Schäfer et al. 2018).....	27
Abbildung 4: Verteilung der Tumorlokalisationen im Patientenkollektiv.....	31
Abbildung 5: Avidin-Biotin-Methode (modifiziert nach (NovusBiologicals 2018)).	35
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung mit dem OptiView-Verfahren.....	38
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung: repräsentative nukleäre FoxG1-Expression in den einzelnen Tumorentitäten (braun); Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun (blau).....	41
Abbildung 8: FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Tumorentität.	42
Abbildung 9: FoxG1-Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades.	44
Abbildung 10: FoxG1-Expression in Abhängigkeit des Patientenalters.....	45
Abbildung 11: FoxG1-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation.	46
Abbildung 12: FoxG1-Expression in IDH-mutierten (1) und nicht-.....	48
Abbildung 13: FoxG1-Expression in Abhängigkeit des ATRX-.....	48
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung: repräsentative nukleäre FoxG1-Expression in den einzelnen Tumorentitäten (braun); Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun (blau).....	50
Abbildung 15: Olig2-Expression in Abhängigkeit der Tumorentität.....	51
Abbildung 16: Olig2- Expression in Abhängigkeit des WHO-Grades.	53
Abbildung 17: Olig2-Expression in Abhängigkeit des Patientenalters.	54
Abbildung 18: Olig2-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation.....	55
Abbildung 19: Olig2-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation.....	56
Abbildung 20: Olig2-Expression in IDH-mutierten (1) und nicht-mutierten (0)..	57
Abbildung 21: Korrelation von Olig2- und FoxG1-Mittelwerten.....	59

Abbildung 22: Olig2-Expression in Abhängigkeit des H3F3A-Mutations-.....	61
Abbildung 23: ROC-Kurven für FoxG1 (A) und Olig2 (B) nach H3F3A-Mutationsstatus. Spezifität und Sensitivität von FoxG1 und Olig2 zur Detektion von G34R-mutierten (C+D) und K27M-mutierten Tumoren (E+F). modifiziert nach (Schäfer et al. 2018).....	62
Abbildung 24: FoxG1-Expression in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe.....	65
Abbildung 25: Olig2-Expression in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe.	66
Abbildung 26: Parametrische Lebensdaueranpassung: Überleben in.....	68
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve; 1: Überleben in Abhängigkeit der FoxG1-Expression über- oder unterhalb des FoxG1-Expressionsmittelwertes (29,5%). 2: Überleben in Abhängigkeit der FoxG1-Expression über- oder unterhalb des optimalen CART-Cutoffs (33%). Rot: Überlebenskurve FoxG1 ^{low} , Blau: Überlebenskurve FoxG1 ^{high}	69
Abbildung 28: Parametrische Lebensdaueranpassung: Überleben.....	69
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve; 1: Überleben in Abhängigkeit der Olig2-Expression über- oder unterhalb des Olig2-Expressionsmittelwertes (25,1%). 2: Überleben in Abhängigkeit der Olig2-Expression über- oder unterhalb des optimalen CART-Cutoffs (10%). Rot: Überlebenskurve Olig2 ^{low} , Blau: Überlebenskurve Olig2 ^{high}	70
Abbildung 30: Exemplarische FoxG1- und Olig2-Expression (IHC) in den verschiedenen Tumorentitäten inklusive K27M- und G34R-mutierte und H3F3A-Wildtyp GBM.....	108

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Epigenetische und biologische Subgruppen von Glioblastomen. Modifiziert nach (Sturm et al. 2012).	18
Tabelle 2: Verteilung der IDH-Mutationstypen im Gesamtkollektiv.....	29
Tabelle 3: Verteilung der Tumore nach Primär- und Rezidivstatus im Patientenkollektiv.	32
Tabelle 4: Paarweiser Vergleich: signifikante Unterschiede in der FoxG1- Expression zwischen den Tumorentitäten (fett gedruckt: signifikant).....	43
Tabelle 5: Paarweiser Vergleich der FoxG1-Expression von verschiedenen Tumorlokalisationen (fett gedruckt: signifikant).	47
Tabelle 6: Paarweiser Vergleich: signifikante Unterschiede in der Olig2- Expression zwischen den Tumorentitäten (fett gedruckt: signifikant).....	52
Tabelle 7: Paarweiser Vergleich der Olig2-Expression von verschiedenen Tumorlokalisationen (fett gedruckt: signifikant).	56
Tabelle 8: Paarweiser Vergleich der FoxG1-Expression in den molekularen Subgruppen (fett gedruckt: signifikant).....	65
Tabelle 9: Paarweiser Vergleich der Olig2-Expression in den molekularen Subgruppen (fett gedruckt: signifikant).....	66
Tabelle 10: Karnowsky-Index modifiziert nach (Mor et al. 1984)	109
Tabelle 11: Übersicht Gesamtkollektiv	110
Tabelle 12: Übersicht molekulares Profil Gesamtkollektiv (% bezieht sich auf alle analysierten Fälle der entsprechenden Entität)	110
Tabelle 13: FoxG1- und Olig2-Expression im Überblick (fett gedruckt: signifikant).....	111
Tabelle 14: Überleben oberhalb/unterhalb des MW/CART-Cutoff (fett gedruckt: signifikant).....	112

8 Literaturverzeichnis

- 1) Immunhistochemie Olig2 optiView - Rezepturhandbuch, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Abteilung Neuropathologie, Universität Tübingen.
- 2) Abcam Anti-FOXG1 antibody - ChIP Grade (ab18259), Abcam Cambridge UK.
- 3) Adesina, A. M., Y. Nguyen, V. Mehta, H. Takei, P. Stangeby, S. Crabtree, M. Chintagumpala and M. K. Gumerlock (2007). "FOXG1 dysregulation is a frequent event in medulloblastoma." J Neurooncol **85**(2): 111-122.
- 4) Aldape, K., P. C. Burger and A. Perry (2007). "Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma." Arch Pathol Lab Med **131**(2): 242-251.
- 5) Anderson, J. L., R. Muraleedharan, N. Oatman, A. Klotter, S. Sengupta, R. R. Waclaw, J. Wu, R. Drissi, L. Miles, E. H. Raabe, M. L. Weirauch, M. Fouladi, L. M. Chow, L. Hoffman, M. DeWire and B. Dasgupta (2017). "The transcription factor Olig2 is important for the biology of diffuse intrinsic pontine gliomas." Neuro Oncol **19**(8): 1068-1078.
- 6) Andreiuolo, F., S. Puget, M. Peyre, C. Dantas-Barbosa, N. Boddaert, C. Philippe, A. Mauguen, J. Grill and P. Varlet (2010). "Neuronal differentiation distinguishes supratentorial and infratentorial childhood ependymomas." Neuro Oncol **12**(11): 1126-1134.
- 7) Ariani, F., G. Hayek, D. Rondinella, R. Artuso, M. A. Mencarelli, A. Spanhol-Rosseto, M. Pollazzon, S. Buoni, O. Spiga, S. Ricciardi, I. Meloni, I. Longo, F. Mari, V. Broccoli, M. Zappella and A. Renieri (2008). "FOXG1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome." Am J Hum Genet **83**(1): 89-93.
- 8) Arora, R. S., R. D. Alston, T. O. Eden, E. J. Estlin, A. Moran and J. M. Birch (2009). "Age-incidence patterns of primary CNS tumors in children, adolescents, and adults in England." Neuro Oncol **11**(4): 403-413.
- 9) Bondy, M. L., M. E. Scheurer, B. Malmer, J. S. Barnholtz-Sloan, F. G. Davis, D. Il'yasova, C. Kruchko, B. J. McCarthy, P. Rajaraman, J. A. Schwartzbaum, S. Sadetzki, B. Schlehofer, T. Tihan, J. L. Wiemels, M. Wrensch, P. A. Buffler and C. Brain Tumor Epidemiology (2008). "Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium." Cancer **113**(7 Suppl): 1953-1968.
- 10) Brennan, C. W., R. G. Verhaak, A. McKenna, B. Campos, H. Nounshmehr, S. R. Salama, S. Zheng, D. Chakravarty, J. Z. Sanborn, S. H. Berman, R. Beroukhi, B. Bernard, C. J. Wu, G. Genovese, I. Shmulevich, J. Barnholtz-Sloan, L. Zou, R. Vegesna, S. A. Shukla, G. Ciriello, W. K. Yung, W. Zhang, C. Sougnez, T. Mikkelsen, K. Aldape, D. D. Bigner, E. G. Van Meir, M. Prados, A. Sloan, K. L. Black, J. Eschbacher, G. Finocchiaro, W. Friedman, D. W. Andrews, A. Guha, M. Iacocca, B. P. O'Neill, G. Foltz, J. Myers, D. J. Weisenberger, R. Penny, R. Kucherlapati, C. M. Perou, D. N. Hayes, R. Gibbs, M. Marra, G. B. Mills, E. Lander, P. Spellman, R. Wilson, C. Sander, J. Weinstein, M. Meyerson, S. Gabriel, P. W. Laird, D. Haussler, G. Getz, L. Chin and T.

- R. Network (2013). "The somatic genomic landscape of glioblastoma." Cell **155**(2): 462-477.
- 11) Buffo, A., M. R. Vosko, D. Erturk, G. F. Hamann, M. Jucker, D. Rowitch and M. Gotz (2005). "Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18183-18188.
 - 12) Burger, P. C. and P. Kleihues (1989). "Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies." Cancer **63**(10): 2014-2023.
 - 13) Cairncross, J. G., K. Ueki, M. C. Zlatescu, D. K. Lisle, D. M. Finkelstein, R. R. Hammond, J. S. Silver, P. C. Stark, D. R. Macdonald, Y. Ino, D. A. Ramsay and D. N. Louis (1998). "Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas." J Natl Cancer Inst **90**(19): 1473-1479.
 - 14) Cairncross, J. G., M. H. Wang, R. B. Jenkins, E. G. Shaw, C. Giannini, D. G. Brachman, J. C. Buckner, K. L. Fink, L. Souhami, N. J. Laperriere, J. T. Huse, M. P. Mehta and W. J. Curran (2014). "Benefit From Procarbazine, Lomustine, and Vincristine in Oligodendroglial Tumors Is Associated With Mutation of IDH." Journal of Clinical Oncology **32**(8): 783-+.
 - 15) Camp, R. L., L. A. Charette and D. L. Rimm (2000). "Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma." Lab Invest **80**(12): 1943-1949.
 - 16) Cancer Genome Atlas Research, N. (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." Nature **455**(7216): 1061-1068.
 - 17) Caporali, C., S. Signorini, V. De Giorgis, A. Pichiecchio, O. Zuffardi and S. Orcesi (2018). "Early-onset movement disorder as diagnostic marker in genetic syndromes: Three cases of FOXP1-related syndrome." Eur J Paediatr Neurol **22**(2): 336-339.
 - 18) Chakrabarti, I., M. Cockburn, W. Cozen, Y. P. Wang and S. Preston-Martin (2005). "A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999." Cancer **104**(12): 2798-2806.
 - 19) Chan, D. W., V. W. Liu, R. M. To, P. M. Chiu, W. Y. Lee, K. M. Yao, A. N. Cheung and H. Y. Ngan (2009). "Overexpression of FOXP1 contributes to TGF-beta resistance through inhibition of p21WAF1/CIP1 expression in ovarian cancer." Br J Cancer **101**(8): 1433-1443.
 - 20) Chaurasia, A., S. H. Park, J. W. Seo and C. K. Park (2016). "Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival." J Korean Med Sci **31**(8): 1208-1214.
 - 21) Chen, J., X. Wu, Z. Xing, C. Ma, W. Xiong, X. Zhu and X. He (2018). "FOXP1 Expression Is Elevated in Glioma and Inhibits Glioma Cell Apoptosis." J Cancer **9**(5): 778-783.
 - 22) Choi, B. D. and W. T. Curry (2017). "IDH mutational status and the immune system in gliomas: a tale of two tumors?" Transl Cancer Res **6**(Suppl 7): S1253-S1256.

- 23) Claes, A., A. J. Idema and P. Wesseling (2007). "Diffuse glioma growth: a guerilla war." Acta Neuropathol **114**(5): 443-458.
- 24) Clynes, D., D. R. Higgs and R. J. Gibbons (2013). "The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease." Trends Biochem Sci **38**(9): 461-466.
- 25) Cohen, A. L., S. L. Holmen and H. Colman (2013). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas." Curr Neurol Neurosci Rep **13**(5): 345.
- 26) Coons, A. H., H. J. Creech., R. N. Jones and G. Berliner (1942). "The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody." J. Immunology **45**:159-70.
- 27) Crespo, I., A. L. Vital, M. Gonzalez-Tablas, C. Patino Mdel, A. Otero, M. C. Lopes, C. de Oliveira, P. Domingues, A. Orfao and M. D. Tabernero (2015). "Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme." Am J Pathol **185**(7): 1820-1833.
- 28) Dali, R., F. Verginelli, A. Pramatarova, R. Sladek and S. Stifani (2018). "Characterization of a FOXP1:TLE1 transcriptional network in glioblastoma-initiating cells." Mol Oncol **12**(6): 775-787.
- 29) Dang, L., D. W. White, S. Gross, B. D. Bennett, M. A. Bittinger, E. M. Driggers, V. R. Fantin, H. G. Jang, S. Jin, M. C. Keenan, K. M. Marks, R. M. Prins, P. S. Ward, K. E. Yen, L. M. Liau, J. D. Rabinowitz, L. C. Cantley, C. B. Thompson, M. G. Vander Heiden and S. M. Su (2009). "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate." Nature **462**(7274): 739-744.
- 30) Durand, K. S., A. Guillaudeau, N. Weinbreck, R. DeArmas, S. Robert, A. Chaunavel, I. Pommepuy, S. Bourthoumieu, F. Caire, F. G. Sturtz and F. J. Labrousse (2010). "1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis." Mod Pathol **23**(4): 619-628.
- 31) Ebrahimi, A., M. Skardelly, I. Bonzheim, I. Ott, H. Muhleisen, F. Eckert, G. Tabatabai and J. Schittenhelm (2016). "ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas." Acta Neuropathol Commun **4**(1): 60.
- 32) Ellis, H. P., M. Greenslade, B. Powell, I. Spiteri, A. Sottoriva and K. M. Kurian (2015). "Current Challenges in Glioblastoma: Intratumour Heterogeneity, Residual Disease, and Models to Predict Disease Recurrence." Front Oncol **5**: 251.
- 33) Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S. N. Goodman, O. F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S. B. Baylin and J. G. Herman (2000). "Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents." N Engl J Med **343**(19): 1350-1354.
- 34) Felsberg, J., A. Erkwow, M. C. Sabel, L. Kirsch, R. Fimmers, B. Blaschke, U. Schlegel, J. Schramm, O. D. Wiestler and G. Reifenberger (2004). "Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival." Brain Pathol **14**(2): 121-130.
- 35) Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). "Cancer incidence and

- mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.
- 36) Galanis, E., W. Wu, J. Sarkaria, S. M. Chang, H. Colman, D. Sargent and D. A. Reardon (2011). "Incorporation of biomarker assessment in novel clinical trial designs: personalizing brain tumor treatments." Curr Oncol Rep **13**(1): 42-49.
 - 37) Goodenberger, M. L. and R. B. Jenkins (2012). "Genetics of adult glioma." Cancer Genet **205**(12): 613-621.
 - 38) Haque, F., P. Varlet, J. Puntinet, L. Storer, A. Bountali, R. Rahman, J. Grill, A. M. Carcaboso, C. Jones, R. Layfield and R. G. Grundy (2017). "Evaluation of a novel antibody to define histone 3.3 G34R mutant brain tumours." Acta Neuropathol Commun **5**(1): 45.
 - 39) Hartmann, C., B. Hentschel, W. Wick, D. Capper, J. Felsberg, M. Simon, M. Westphal, G. Schackert, R. Meyermann, T. Pietsch, G. Reifenberger, M. Weller, M. Loeffler and A. von Deimling (2010). "Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas." Acta Neuropathol **120**(6): 707-718.
 - 40) Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer and R. Stupp (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.
 - 41) Hoffmann, M., C. Koelsche, M. Seiz-Rosenhagen, S. Mai, F. Lohr, D. Reuss, F. Wenz, C. Gebhardt and F. A. Giordano (2016). "The GNAQ in the haystack: intramedullary meningeal melanocytoma of intermediate grade at T9-10 in a 58-year-old woman." J Neurosurg **125**(1): 53-56.
 - 42) Houillier, C., X. Wang, G. Kaloshi, K. Mokhtari, R. Guillevin, J. Laffaire, S. Paris, B. Boisselier, A. Idbah, F. Laigle-Donadey, K. Hoang-Xuan, M. Sanson and J. Y. Delattre (2010). "IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas." Neurology **75**(17): 1560-1566.
 - 43) Huang, M. and W. A. Weiss (2013). "G34, another connection between MYCN and a pediatric tumor." Cancer Discov **3**(5): 484-486.
 - 44) Jenkins, R. B., H. Blair, K. V. Ballman, C. Giannini, R. M. Arusell, M. Law, H. Flynn, S. Passe, S. Felten, P. D. Brown, E. G. Shaw and J. C. Buckner (2006). "A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma." Cancer Res **66**(20): 9852-9861.
 - 45) Khuong-Quang, D. A., P. Buczkowicz, P. Rakopoulos, X. Y. Liu, A. M. Fontebasso, E. Bouffet, U. Bartels, S. Albrecht, J. Schwartzentruber, L. Letourneau, M. Bourgey, G. Bourque, A. Montpetit, G. Bourret, P. Lepage, A. Fleming, P. Lichter, M. Kool, A. von Deimling, D. Sturm, A. Korshunov, D. Faury, D. T. Jones, J. Majewski, S. M. Pfister, N. Jabado and C. Hawkins (2012). "K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas." Acta Neuropathol **124**(3): 439-447.

- 46) Killela, P. J., C. J. Pirozzi, Z. J. Reitman, S. Jones, B. A. Rasheed, E. Lipp, H. Friedman, A. H. Friedman, Y. He, R. E. McLendon, D. D. Bigner and H. Yan (2014). "The genetic landscape of anaplastic astrocytoma." Oncotarget **5**(6): 1452-1457.
- 47) Kim, T. H., S. W. Jo, Y. S. Lee, Y. J. Kim, S. C. Lee, W. J. Kim and S. J. Yun (2009). "Forkhead box O-class 1 and forkhead box G1 as prognostic markers for bladder cancer." J Korean Med Sci **24**(3): 468-473.
- 48) Koeller, K. K. and E. J. Rushing (2005). "From the archives of the AFIP: Oligodendroglioma and its variants: radiologic-pathologic correlation." Radiographics **25**(6): 1669-1688.
- 49) Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O. P. Kallioniemi (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med **4**(7): 844-847.
- 50) Kupp, R., L. Shtayer, A. C. Tien, E. Szeto, N. Sanai, D. H. Rowitch and S. Mehta (2016). "Lineage-Restricted OLIG2-RTK Signaling Governs the Molecular Subtype of Glioma Stem-like Cells." Cell Rep **16**(11): 2838-2845.
- 51) Lang, G. (2013). *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*, Springer.
- 52) Lapointe, S., A. Perry and N. A. Butowski (2018). "Primary brain tumours in adults." Lancet.
- 53) Larjavaara, S., R. Mantyla, T. Salminen, H. Haapasalo, J. Raitanen, J. Jaaskelainen and A. Auvinen (2007). "Incidence of gliomas by anatomic location." Neuro Oncol **9**(3): 319-325.
- 54) Lee, S. K., B. Lee, E. C. Ruiz and S. L. Pfaff (2005). "Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells." Genes Dev **19**(2): 282-294.
- 55) Leelatian, N. and R. A. Ithrie (2016). "Head of the Class: OLIG2 and Glioblastoma Phenotype." Cancer Cell **29**(5): 613-615.
- 56) Ligon, K. L., E. Huillard, S. Mehta, S. Kesari, H. Liu, J. A. Alberta, R. M. Bachoo, M. Kane, D. N. Louis, R. A. Depinho, D. J. Anderson, C. D. Stiles and D. H. Rowitch (2007). "Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma." Neuron **53**(4): 503-517.
- 57) Linos, E., T. Raine, A. Alonso and D. Michaud (2007). "Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis." J Natl Cancer Inst **99**(20): 1544-1550.
- 58) Liu, F., G. C. Hon, G. R. Villa, K. M. Turner, S. Ikegami, H. Yang, Z. Ye, B. Li, S. Kuan, A. Y. Lee, C. Zanca, B. Wei, G. Lucey, D. Jenkins, W. Zhang, C. L. Barr, F. B. Furnari, T. F. Cloughesy, W. H. Yong, T. C. Gahman, A. K. Shiau, W. K. Cavenee, B. Ren and P. S. Mischel (2015). "EGFR Mutation Promotes Glioblastoma through Epigenome and Transcription Factor Network Remodeling." Mol Cell **60**(2): 307-318.
- 59) Liu, X. Y., N. Gerges, A. Korshunov, N. Sabha, D. A. Khuong-Quang, A. M. Fontebasso, A. Fleming, D. Hadjadj, J. Schwartzentruber, J. Majewski, Z. Dong, P. Siegel, S. Albrecht, S. Croul, D. T. Jones, M. Kool, M. Tonjes, G. Reifenberger, D. Faury, G. Zadeh, S. Pfister and N. Jabado (2012). "Frequent ATRX mutations and loss of expression in

- adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations." Acta Neuropathol **124**(5): 615-625.
- 60) Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvret, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- 61) Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues and D. W. Ellison (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol **131**(6): 803-820.
- 62) Lu, F., Y. Chen, C. Zhao, H. Wang, D. He, L. Xu, J. Wang, X. He, Y. Deng, E. E. Lu, X. Liu, R. Verma, H. Bu, R. Drissi, M. Fouladi, A. O. Stemmer-Rachamimov, D. Burns, M. Xin, J. B. Rubin, E. M. Bahassi, P. Canoll, E. C. Holland and Q. R. Lu (2016). "Olig2-Dependent Reciprocal Shift in PDGF and EGF Receptor Signaling Regulates Tumor Phenotype and Mitotic Growth in Malignant Glioma." Cancer Cell **29**(5): 669-683.
- 63) Lun, M., E. Lok, S. Gautam, E. Wu and E. T. Wong (2011). "The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme." J Neurooncol **105**(2): 261-273.
- 64) Manoranjan, B., X. Wang, R. M. Hallett, C. Venugopal, S. C. Mack, N. McFarlane, S. M. Nolte, K. Scheinemann, T. Gunnarsson, J. A. Hassell, M. D. Taylor, C. Lee, J. Triscott, C. M. Foster, C. Dunham, C. Hawkins, S. E. Dunn and S. K. Singh (2013). "FoxG1 interacts with Bmi1 to regulate self-renewal and tumorigenicity of medulloblastoma stem cells." Stem Cells **31**(7): 1266-1277.
- 65) Manuel, M., B. Martynoga, T. Yu, J. D. West, J. O. Mason and D. J. Price (2010). "The transcription factor Foxg1 regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice." Development **137**(3): 487-497.
- 66) Martynoga, B., H. Morrison, D. J. Price and J. O. Mason (2005). "Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis." Dev Biol **283**(1): 113-127.
- 67) McDonald, J. M., S. J. See, I. W. Tremont, H. Colman, M. R. Gilbert, M. Groves, P. C. Burger, D. N. Louis, C. Giannini, G. Fuller, S. Passe, H. Blair, R. B. Jenkins, H. Yang, A. Ledoux, J. Aaron, U. Tipnis, W. Zhang, K. Hess and K. Aldape (2005). "The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors." Cancer **104**(7): 1468-1477.
- 68) McGirt, M. J., I. M. Goldstein, K. L. Chaichana, M. E. Tobias, K. F. Kothbauer and G. I. Jallo (2008). "Extent of surgical resection of malignant astrocytomas of the spinal cord: outcome analysis of 35 patients." Neurosurgery **63**(1): 55-60; discussion 60-51.
- 69) Mizoguchi, M., K. Yoshimoto, X. Ma, Y. Guan, N. Hata, T. Amano, A. Nakamizo, S. O. Suzuki, T. Iwaki and T. Sasaki (2012). "Molecular characteristics of glioblastoma with 1p/19q co-deletion." Brain Tumor Pathol **29**(3): 148-153.

- 70) Mokhtari, K., S. Paris, L. Aguirre-Cruz, N. Privat, E. Criniere, Y. Marie, J. J. Hauw, M. Kujas, D. Rowitch, K. Hoang-Xuan, J. Y. Delattre and M. Sanson (2005). "Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(1): 62-69.
- 71) Molenaar, R. J., D. Botman, M. A. Smits, V. V. Hira, S. A. van Lith, J. Stap, P. Henneman, M. Khurshed, K. Lenting, A. N. Mul, D. Dimitrakopoulou, C. M. van Drunen, R. A. Hoebe, T. Radivoyevitch, J. W. Wilmink, J. P. Maciejewski, W. P. Vandertop, W. P. Leenders, F. E. Bleeker and C. J. van Noorden (2015). "Radioprotection of IDH1-Mutated Cancer Cells by the IDH1-Mutant Inhibitor AGI-5198." Cancer Res **75**(22): 4790-4802.
- 72) Mor, V., L. Laliberte, J. N. Morris and M. Wiemann (1984). "The Karnofsky Performance Status Scale. An examination of its reliability and validity in a research setting." Cancer **53**(9): 2002-2007.
- 73) Neder, L., B. O. Colli, H. R. Machado, C. G. Carlotti, Jr., A. C. Santos and L. Chimelli (2004). "MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study." Clin Neuropathol **23**(6): 262-270.
- 74) NovusBiologicals. (2018). "IHC Detection." Retrieved 25. Juni, 2018, from <https://www.novusbio.com/ihc-detection>.
- 75) Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." Acta Neuropathol **109**(1): 93-108.
- 76) Ohgaki, H. and P. Kleihues (2011). "Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas." Brain Tumor Pathol **28**(3): 177-183.
- 77) Ohgaki, H. and P. Kleihues (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." Clin Cancer Res **19**(4): 764-772.
- 78) Ohnishi, A., H. Sawa, M. Tsuda, Y. Sawamura, T. Itoh, Y. Iwasaki and K. Nagashima (2003). "Expression of the oligodendroglial lineage-associated markers Olig1 and Olig2 in different types of human gliomas." J Neuropathol Exp Neurol **62**(10): 1052-1059.
- 79) Okamoto, Y., P. L. Di Patre, C. Burkhard, S. Horstmann, B. Jourde, M. Fahey, D. Schuler, N. M. Probst-Hensch, M. G. Yasargil, Y. Yonekawa, U. M. Lutolf, P. Kleihues and H. Ohgaki (2004). "Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas." Acta Neuropathol **108**(1): 49-56.
- 80) Olson, J. D., E. Riedel and L. M. DeAngelis (2000). "Long-term outcome of low-grade oligodendroglioma and mixed glioma." Neurology **54**(7): 1442-1448.
- 81) Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Farah, A. Ondracek, Y. Chen, Y. Wolinsky, N. E. Stroup, C. Kruchko and J. S. Barnholtz-Sloan (2013). "CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010." Neuro Oncol **15 Suppl 2**: ii1-56.
- 82) Ostrom, Q. T., H. Gittleman, J. Fulop, M. Liu, R. Blanda, C. Kromer, Y. Wolinsky, C. Kruchko and J. S. Barnholtz-Sloan (2015). "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012." Neuro Oncol **17 Suppl 4**: iv1-iv62.

- 83) Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Liao, T. Vecchione-Koval, Y. Wolinsky, C. Kruchko and J. S. Barnholtz-Sloan (2017). "CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014." Neuro Oncol **19**(suppl_5): v1-v88.
- 84) Otero, J. J., D. Rowitch and S. Vandenberg (2011). "OLIG2 is differentially expressed in pediatric astrocytic and in ependymal neoplasms." J Neurooncol **104**(2): 423-438.
- 85) Parker, R. L., D. G. Huntsman, D. W. Lesack, J. B. Cupples, D. R. Grant, M. Akbari and C. B. Gilks (2002). "Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray." Am J Clin Pathol **117**(5): 723-728.
- 86) Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." Science **321**(5897): 1807-1812.
- 87) Paugh, B. S., C. Qu, C. Jones, Z. Liu, M. Adamowicz-Brice, J. Zhang, D. A. Bax, B. Coyle, J. Barrow, D. Hargrave, J. Lowe, A. Gajjar, W. Zhao, A. Broniscer, D. W. Ellison, R. G. Grundy and S. J. Baker (2010). "Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease." J Clin Oncol **28**(18): 3061-3068.
- 88) Pekmezci, M., T. Rice, A. M. Molinaro, K. M. Walsh, P. A. Decker, H. Hansen, H. Sicotte, T. M. Kollmeyer, L. S. McCoy, G. Sarkar, A. Perry, C. Giannini, T. Tihan, M. S. Berger, J. L. Wiemels, P. M. Bracci, J. E. Eckel-Passow, D. H. Lachance, J. Clarke, J. W. Taylor, T. Luks, J. K. Wiencke, R. B. Jenkins and M. R. Wrensch (2017). "Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT." Acta Neuropathol **133**(6): 1001-1016.
- 89) Peus, D., N. Newcomb and S. Hofer (2013). "Appraisal of the Karnofsky Performance Status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation." BMC Med Inform Decis Mak **13**: 72.
- 90) Qian, S., Q. Zhang, Y. Wang, B. Lee, G. V. Betageri, M. S. Chow, M. Huang and Z. Zuo (2013). "Bioavailability enhancement of glucosamine hydrochloride by chitosan." Int J Pharm **455**(1-2): 365-373.
- 91) Qu, H. Q., K. Jacob, S. Fatet, B. Ge, D. Barnett, O. Delattre, D. Faury, A. Montpetit, L. Solomon, P. Hauser, M. Garami, L. Bognar, Z. Hansely, R. Mio, J. P. Farmer, S. Albrecht, C. Polychronakos, C. Hawkins and N. Jabado (2010). "Genome-wide profiling using single-nucleotide polymorphism arrays identifies novel chromosomal imbalances in pediatric glioblastomas." Neuro Oncol **12**(2): 153-163.
- 92) Reuss, D. E., Y. Mamatjan, D. Schrimpf, D. Capper, V. Hovestadt, A. Kratz, F. Sahm, C. Koelsche, A. Korshunov, A. Olar, C. Hartmann, J. C. Reijneveld, P. Wesseling, A. Unterberg, M. Platten, W. Wick, C. Herold-

- Mende, K. Aldape and A. von Deimling (2015). "IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO." Acta Neuropathol **129**(6): 867-873.
- 93) Rhee, W., S. Ray, H. Yokoo, M. E. Hoane, C. C. Lee, A. M. Mikheev, P. J. Horner and R. C. Rostomily (2009). "Quantitative analysis of mitotic Olig2 cells in adult human brain and gliomas: implications for glioma histogenesis and biology." Glia **57**(5): 510-523.
- 94) Riemenschneider, M. J., J. W. Jeuken, P. Wesseling and G. Reifenberger (2010). "Molecular diagnostics of gliomas: state of the art." Acta Neuropathol **120**(5): 567-584.
- 95) Robertson, E., C. Perry, R. Doherty and S. Madhusudan (2015). "Transcriptomic profiling of Forkhead box transcription factors in adult glioblastoma multiforme." Cancer Genomics Proteomics **12**(3): 103-112.
- 96) Roth, M., B. Bonev, J. Lindsay, R. Lea, N. Panagiotaki, C. Houart and N. Papalopulu (2010). "FoxG1 and TLE2 act cooperatively to regulate ventral telencephalon formation." Development **137**(9): 1553-1562.
- 97) Sadetzki, S., A. Chetrit, L. Freedman, M. Stovall, B. Modan and I. Novikov (2005). "Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis." Radiat Res **163**(4): 424-432.
- 98) Schäfer, S., F. Behling, M. Skardelly, M. Koch, I. Ott, F. Paulsen, G. Tabatabai and J. Schittenhelm (2018). "Low FoxG1 and high Olig-2 labelling indices define a prognostically favourable subset in isocitrate dehydrogenase (IDH)-mutant gliomas." Neuropathol Appl Neurobiol **44**(2): 207-223.
- 99) Schwab, D. E. (2013). Immunhistochemische Studie von Hirntumorgewebe mit spezifischen Antikörpern gegen GFAP, MAP – 2, NOGO – A, OLIG – 2 und WT – 1, University of Tuebingen.
- 100) Schwartzentruber, J., A. Korshunov, X. Y. Liu, D. T. Jones, E. Pfaff, K. Jacob, D. Sturm, A. M. Fontebasso, D. A. Quang, M. Tonjes, V. Hovestadt, S. Albrecht, M. Kool, A. Nantel, C. Konermann, A. Lindroth, N. Jager, T. Rausch, M. Ryzhova, J. O. Korbel, T. Hielscher, P. Hauser, M. Garami, A. Klekner, L. Bogner, M. Ebinger, M. U. Schuhmann, W. Scheurlen, A. Pekrun, M. C. Fruhwald, W. Roggendorf, C. Kramm, M. Durken, J. Atkinson, P. Lepage, A. Montpetit, M. Zakrzewska, K. Zakrzewski, P. P. Liberski, Z. Dong, P. Siegel, A. E. Kulozik, M. Zapatka, A. Guha, D. Malkin, J. Felsberg, G. Reifenberger, A. von Deimling, K. Ichimura, V. P. Collins, H. Witt, T. Milde, O. Witt, C. Zhang, P. Castelo-Branco, P. Lichter, D. Faury, U. Tabori, C. Plass, J. Majewski, S. M. Pfister and N. Jabado (2012). "Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma." Nature **482**(7384): 226-231.
- 101) Seto, Y., S. Ishiwata and M. Hoshino (2014). "Characterization of Olig2 expression during cerebellar development." Gene Expr Patterns **15**(1): 1-7.

- 102) Shin, J. Y. and A. Z. Diaz (2016). "Anaplastic astrocytoma: prognostic factors and survival in 4807 patients with emphasis on receipt and impact of adjuvant therapy." J Neurooncol **129**(3): 557-565.
- 103) Singh, S. K., R. Fiorelli, R. Kupp, S. Rajan, E. Szeto, C. Lo Cascio, C. L. Maire, Y. Sun, J. A. Alberta, J. M. Eschbacher, K. L. Ligon, M. E. Berens, N. Sanai and S. Mehta (2016). "Post-translational Modifications of OLIG2 Regulate Glioma Invasion through the TGF-beta Pathway." Cell Rep **16**(4): 950-966.
- 104) Smoll, N. R. and B. Hamilton (2014). "Incidence and relative survival of anaplastic astrocytomas." Neuro Oncol **16**(10): 1400-1407.
- 105) Sottoriva, A., I. Spiteri, S. G. Piccirillo, A. Touloumis, V. P. Collins, J. C. Marioni, C. Curtis, C. Watts and S. Tavare (2013). "Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(10): 4009-4014.
- 106) Srinath, S., R. K. Kendole, P. Gopinath, S. Krishnappa and S. K. Vishwanath (2016). "Economic methods used in fabrication of tissue microarray: A pilot study." J Oral Maxillofac Pathol **20**(1): 86-90.
- 107) Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, R. O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiation Oncology and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-466.
- 108) Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiotherapy and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.
- 109) Sturm, D., H. Witt, V. Hovestadt, D. A. Khuong-Quang, D. T. Jones, C. Konermann, E. Pfaff, M. Tonjes, M. Sill, S. Bender, M. Kool, M. Zapatka, N. Becker, M. Zucknick, T. Hielscher, X. Y. Liu, A. M. Fontebasso, M. Ryzhova, S. Albrecht, K. Jacob, M. Wolter, M. Ebinger, M. U. Schuhmann, T. van Meter, M. C. Fruhwald, H. Hauch, A. Pekrun, B. Radlwimmer, T. Niehues, G. von Komorowski, M. Durken, A. E. Kulozik, J. Madden, A. Donson, N. K. Foreman, R. Drissi, M. Fouladi, W. Scheurlen, A. von Deimling, C. Monoranu, W. Roggendorf, C. Herold-Mende, A. Unterberg, C. M. Kramm, J. Felsberg, C. Hartmann, B. Wiestler, W. Wick, T. Milde, O. Witt, A. M. Lindroth, J. Schwartzentruber, D. Faury, A. Fleming, M. Zakrzewska, P. P. Liberski, K. Zakrzewski, P. Hauser, M. Garami, A. Klekner, L. Bogner, S. Morrissy, F. Cavalli, M. D. Taylor, P. van Sluis, J. Koster, R. Versteeg, R. Volckmann, T. Mikkelsen,

- K. Aldape, G. Reifenberger, V. P. Collins, J. Majewski, A. Korshunov, P. Lichter, C. Plass, N. Jabado and S. M. Pfister (2012). "Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma." Cancer Cell **22**(4): 425-437.
- 110) Sun, Y., D. H. Meijer, J. A. Alberta, S. Mehta, M. F. Kane, A. C. Tien, H. Fu, M. A. Petryniak, G. B. Potter, Z. Liu, J. F. Powers, I. S. Runquist, D. H. Rowitch and C. D. Stiles (2011). "Phosphorylation state of Olig2 regulates proliferation of neural progenitors." Neuron **69**(5): 906-917.
- 111) Suzuki, A., S. Nobusawa, A. Natsume, H. Suzuki, Y. H. Kim, H. Yokoo, M. Nagaishi, H. Ikota, T. Nakazawa, T. Wakabayashi, H. Ohgaki and Y. Nakazato (2014). "Olig2 labeling index is correlated with histological and molecular classifications in low-grade diffuse gliomas." J Neurooncol **120**(2): 283-291.
- 112) Takebayashi, H., Y. Nabeshima, S. Yoshida, O. Chisaka, K. Ikenaka and Y. Nabeshima (2002). "The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages." Curr Biol **12**(13): 1157-1163.
- 113) Thakkar, J. P., T. A. Dolecek, C. Horbinski, Q. T. Ostrom, D. D. Lightner, J. S. Barnholtz-Sloan and J. L. Villano (2014). "Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **23**(10): 1985-1996.
- 114) Trepant, A. L., C. Bouchart, S. Rorive, S. Sauvage, C. Decaestecker, P. Demetter and I. Salmon (2015). "Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms." Tumour Biol **36**(3): 1943-1953.
- 115) Tsigelny, I. F., V. L. Kouznetsova, N. Lian and S. Kesari (2016). "Molecular mechanisms of OLIG2 transcription factor in brain cancer." Oncotarget **7**(33): 53074-53101.
- 116) van den Bent, M. J., M. Smits, J. M. Kros and S. M. Chang (2017). "Diffuse Infiltrating Oligodendroglioma and Astrocytoma." J Clin Oncol **35**(21): 2394-2401.
- 117) Venneti, S., M. Santi, M. M. Felicella, D. Yarin, J. J. Phillips, L. M. Sullivan, D. Martinez, A. Perry, P. W. Lewis, C. B. Thompson and A. R. Judkins (2014). "A sensitive and specific histopathologic prognostic marker for H3F3A K27M mutant pediatric glioblastomas." Acta Neuropathol **128**(5): 743-753.
- 118) Ventana. "Ventana OptiVlew DAB ICH detection kit package inserts." Retrieved 25. Juni, 2018, from www.inseonmedics.co.kr/bbs/download.php?bo_table=bbs2_1&wr_id=14&no=2.
- 119) Verginelli, F., A. Perin, R. Dali, K. H. Fung, R. Lo, P. Longatti, M. C. Guiot, R. F. Del Maestro, S. Rossi, U. di Porzio, O. Stechishin, S. Weiss and S. Stifani (2013). "Transcription factors FOXG1 and Groucho/TLE promote glioblastoma growth." Nat Commun **4**: 2956.
- 120) Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S.

- Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes and N. Cancer Genome Atlas Research (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.
- 121) Vogel, U. (2014). "Overview on Techniques to Construct Tissue Arrays with Special Emphasis on Tissue Microarrays." Microarrays (Basel) **3**(2): 103-136.
- 122) Watanabe, T., S. Nobusawa, P. Kleihues and H. Ohgaki (2009). "IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas." Am J Pathol **174**(4): 1149-1153.
- 123) Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." N Engl J Med **359**(5): 492-507.
- 124) Wesseling, P., M. van den Bent and A. Perry (2015). "Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers." Acta Neuropathol **129**(6): 809-827.
- 125) Wiesmann, U. C., K. Milinis, J. Paniker, K. Das, M. D. Jenkinson, A. Brodbelt, D. Crooks and S. S. Keller (2015). "The role of the corpus callosum in seizure spread: MRI lesion mapping in oligodendrogliomas." Epilepsy Res **109**: 126-133.
- 126) Wiestler, B., D. Capper, T. Holland-Letz, A. Korshunov, A. von Deimling, S. M. Pfister, M. Platten, M. Weller and W. Wick (2013). "ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis." Acta Neuropathol **126**(3): 443-451.
- 127) Wilson, T. A., M. A. Karajannis and D. H. Harter (2014). "Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics." Surg Neurol Int **5**: 64.
- 128) Wu, G., A. Broniscer, T. A. McEachron, C. Lu, B. S. Paugh, J. Beckfort, C. Qu, L. Ding, R. Huether, M. Parker, J. Zhang, A. Gajjar, M. A. Dyer, C. G. Mullighan, R. J. Gilbertson, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing, D. W. Ellison, J. Zhang, S. J. Baker and P. St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome (2012). "Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas." Nat Genet **44**(3): 251-253.
- 129) Xu, X., J. Zhao, Z. Xu, B. Peng, Q. Huang, E. Arnold and J. Ding (2004). "Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity." J Biol Chem **279**(32): 33946-33957.
- 130) Yalcin, A., M. Kovarbasic, J. Wehrle, R. Claus, H. Becker, M. Abdelkarim, V. I. Gaidzik, A. Schmidts, R. Wasch, H. L. Pahl, K. Dohner, L. Bullinger, J. Duyster, M. Lubbert and B. Hackanson (2017). "The oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2) is epigenetically regulated in acute myeloid leukemia." Exp Hematol **55**: 76-85 e73.
- 131) Yan, H., D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A.

- Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein and D. D. Bigner (2009). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas." N Engl J Med **360**(8): 765-773.
- 132) Yokoo, H., S. Nobusawa, H. Takebayashi, K. Ikenaka, K. Isoda, M. Kamiya, A. Sasaki, J. Hirato and Y. Nakazato (2004). "Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas." Am J Pathol **164**(5): 1717-1725.
- 133) Zhang, J., Y. Yang, T. Yang, S. Yuan, R. Wang, Z. Pan, Y. Yang, G. Huang, F. Gu, B. Jiang, C. Lin and W. Zhou (2015). "Double-negative feedback loop between microRNA-422a and forkhead box (FOX)G1/Q1/E1 regulates hepatocellular carcinoma tumor growth and metastasis." Hepatology **61**(2): 561-573.

9 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Analyse von Gliomen bezüglich ihrer Olig2- und FoxG1-Expressionsverhalten und deren Zusammenhang mit H3F3A-Mutationen“ wurde am Institut für Pathologie und Neuropathologie, Abteilung Neuropathologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Jens Schittenhelm durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter erstellt wurde. Die Erstellung von drei TMAs und die Auszählung der immunhistochemisch gefärbten Tumorproben erfolgten ausschließlich durch mich selbst. Die statistische Auswertung wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Schittenhelm von mir persönlich vorgenommen. Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbständig verfasst zu haben. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet und keine weiteren als die hier angegebenen Quellen verwendet.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits mit fast identischem Studienkonzept und Patientenkollektiv unter dem Titel „Low FoxG1 and high Olig-2 labelling indices define a prognostically favourable subset in isocitrate dehydrogenase (IDH)-mutant gliomas“ im Journal „Neuropathology and Applied Neurobiology“ von mir als Erstautorin veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit beruht auf den Daten, die von mir auch für die Publikation bereitgestellt wurden. Die Daten der Publikation weichen auf Grund der dort verwendeten maschinellen Auswertung mit Hilfe des Programmes „ImmunoRatio plugin für ImageJ“ anstatt der in dieser Arbeit verwendeten manuellen lichtmikroskopischen Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorzellen leicht von den Daten der vorliegenden Arbeit ab. Es wurden keine fremden Daten verwendet und Bezüge auf die Publikation als solche kenntlich gemacht.

Tübingen, den 3. März 2019

10 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Schäfer, S., F. Behling, M. Skardelly, M. Koch, I. Ott, F. Paulsen, G. Tabatabai and J. Schittenhelm (2018). "Low FoxG1 and high Olig-2 labelling indices define a prognostically favourable subset in isocitrate dehydrogenase (IDH)-mutant gliomas." Neuropathol Appl Neurobiol **44**(2): 207-223.

11 Anhang

11.1 Exemplarische FoxG1- und Olig2-Expression

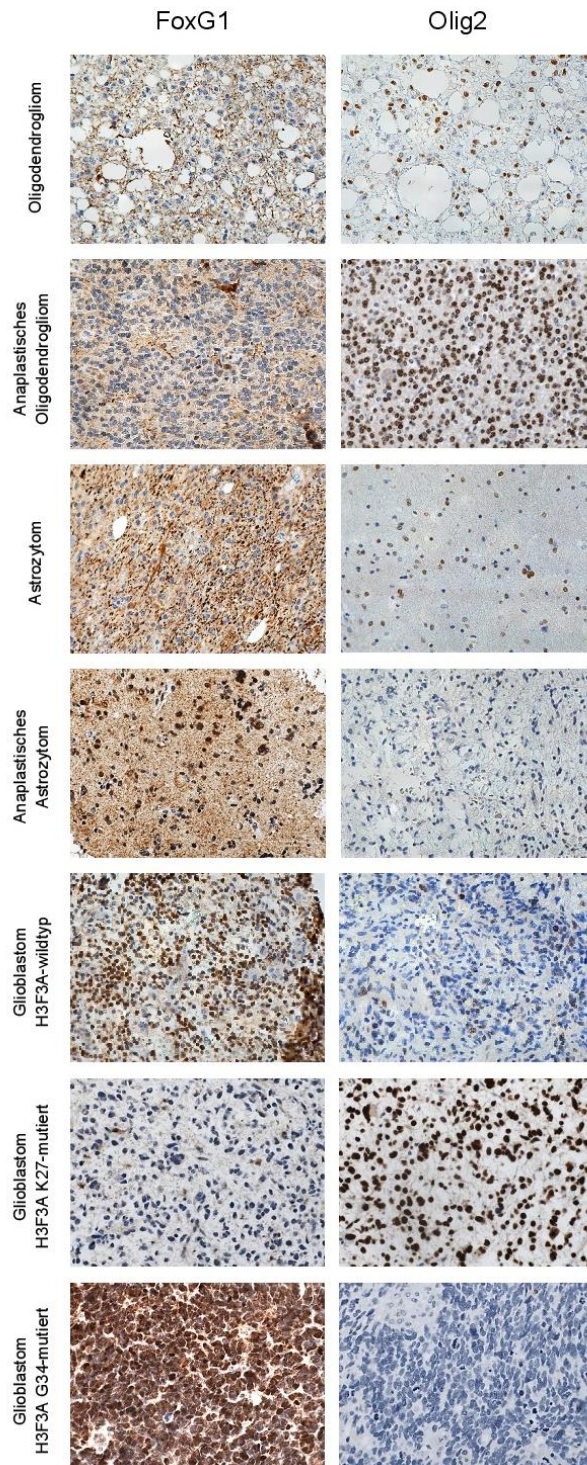


Abbildung 30: Exemplarische FoxG1- und Olig2-Expression (IHC) in den verschiedenen Tumorentitäten inklusive K27M- und G34R-mutierte und H3F3A-Wildtyp GBM.

11.2 Karnowsky-Index

Der Karnowsky-Index oder Karnowsky Performance Status (KPS) ist die am weitesten verbreitete Methode zur Erfassung des Allgemeinzustandes von Tumorpatienten (s. Tabelle 10). Die Skala wurde erstmals 1949 von D.A. Karnowsky und J.H. Burchenal eingeführt und reicht von 100% (normale Aktivität) bis 0% (Tod). (Mor et al. 1984, Peus et al. 2013)

Tabelle 10: Karnowsky-Index modifiziert nach (Mor et al. 1984)

Index	Kriterien
100%	Keine Krankheitszeichen, keine Beschwerden, normale Aktivität
90%	Geringe Krankheitszeichen oder -symptome, normale Aktivitäten ausführbar
80%	Einige Krankheitszeichen, normale Aktivität nur unter Anstrengung möglich
70%	Versorgt sich selbst, Arbeit und normale Aktivität nicht möglich
60%	Benötigt gelegentlich Unterstützung, aber überwiegend Selbstversorgung
50%	Benötigt erhebliche Unterstützung und häufige medizinische Versorgung
40%	Behinderung, benötigt spezielle Unterstützung und Hilfe
30%	Schwerbehinderung, Hospitalisierung indiziert
20%	Schwerstkrank, Hospitalisierung und supportive/ intensive Therapie notwendig
10%	Im Sterben liegend
0%	Tod
>70%	Keine spezielle Hilfe notwendig
>40%	Zu Hause in der Lage persönliche Bedürfnisse zu bewältigen, Unterstützung in unterschiedlichem Maß notwendig, keine Arbeit möglich
ab 40%	Keine Selbstversorgung möglich, Hospitalisierung oder institutionelle bzw. professionelle Pflege notwendig, rascher Krankheitsprogress

11.3 Datentabellen

Tabelle 11: Übersicht Gesamtkollektiv

Diagnose	WHO-Grad	Patienten (Tumorproben)	Geschlecht (F/M)	Alter (range)	Primär/Rezidiv (% R)	Prim./Sek. GBM
Astrozytom	II	82 (96)	31/51	44.5 (18-77)	70/12 (15%)	
Anaplastisches Astrozytom	III	91 (116)	35/56	45.2 (10-77)	65/25 (28%)	
Oligodendrogliom	II	34 (76)	11/23	40.2 (16-67)	29 / 5(15%)	
Anaplastisches Oligodendrogliom	III	58 (134)	30/28	48.4 (26-80)	25 / 33(57%)	
Glioblastom	IV	235 (384)	94/141	57.2 (4-87)	197/38(16%)	218/13(6%)
Alle Tumore		500 (808)	201/99	50.8 (4-87)	386/113(23%)	

Tabelle 12: Übersicht molekulares Profil Gesamtkollektiv (% bezieht sich auf alle analysierten Fälle der entsprechenden Entität)

Diagnose	IDHmut (nicht-mut/ mut)	ATRX-Verlust (Retention/Verlust)	1p/19q-Kodeletion (intakt/LOH)	MGMT (M/U)
Astrozytom	34/46 (58%)	26/39 (60%)	18/0	8/7
Anaplastisches Astrozytom	42/44 (51%)	33/43 (57%)	15/0	5/15
Oligodendrogliom	0/34 (100%)	31/1 (3%)	0/14 (100%)	5/1
Anaplastisches Oligodendrogliom	0/58 (100%)	54/1 (2%)	0/16 (100%)	17/2
Glioblastom	188/18 (9%)	161/29 (13%)	5/0	61/88
Alle Tumore	264/200(43%)	305/113 (24%)	38/30	96/113

Tabelle 13: FoxG1- und Olig2-Expression im Überblick (fett gedruckt: signifikant)

		FoxG1 (n)	MW (SD)	Olig2 (n)	MW (SD)
Entitäten	Astrozytom	38	15.4% (22.5)	46	27.4% (24.6)
	Anaplastisches Astrozytom	61	21.0% (23.9)	51	20.0% (21.7)
	Oligodendrogliom	23	20.7% (23.8)	30	42.7% (24.1)
	Anaplastisches Oligodendrogliom	44	20.5% (21.5)	53	39.2% (26.8)
	Glioblastom	189	38.3% (27.4)	179	19.0% (21.3)
	Alle Tumore	355	29.6% (27.0)	361	25.1% (24.4)
Tumorgruppe	Astro	288	31.6% (27.6)	356	20.7% (23.2)
	Oligo	67	20.6% (22.2) p=0,0025	72	41.0% (27.8) p < 0,0001
WHO-Grad	II	61	17.4% (22.9)	76	33.4% (25.4)
	III	105	20.8% (22.9)	106	29.6% (26.1)
	IV	189	38.3% (27.4) p <0.0001 (IV/ II&III)	179	19.0% (21.3) p <0.0001 (IV/ II) p=0,0009 (IV/ III)
Geschlecht	weiblich (f)	136	28.6% (26.6)	139	25.3% (22.8)
	männlich (m)	219	30.1% (27.3) p=0,6134	222	25.1% (25.4) p=0,9445
Alter		355	p=0,0937	361	p=0,1310
Rezidivstatus	Primär	264	30.6% (27.3)	266	24.5% (24.1)
	Rezidiv	90	26.9% (26.1) p=0.2638	94	26.6% (25.5) p=0.4733
GBM Status	primär	175	38.7% (27.2)	164	18.7% (20.9)
	sekundär	11	23.4% (25.7) p=0.0692	12	21.5% (21.8) p=0.0692
IDH-Mutation	mutiert	137	19.5% (20.7)	160	33.8% (23.9)
	nicht-mutiert	197	35.0% (29.0) p<0.0001	179	19.4% (23.5) p<0.0001
ATRX-Status	Verlust	83	20.2% (23.1)	86	22.4% (19.6)
	Retention	245	33.4% (27.3) p<0.0001	253	26.8% (26.1) p=0.1520
MGMT-Promotor	methyliert	75	33.0% (28.0)	72	27.1% (23.9)
	unmethyliert	85	37.4% (30.0) p=0.3447	85	22.2% (23.8) p=0.2016
1p/19q-Kodeletionsstatus	LOH	26	18.2% (22.3)	27	43.3% (25.1)
	kein LOH	17	17.2% (26.7) p=0.8953	19	38.1% (26.2) p=0.4995

		FoxG1 (n)	MW (SD)	Olig2 (n)	MW (SD)
Lokalisation	Frontal	127	25.8% (27.0)	136	29.6% (23.6)
	infratentoriell	7	20.3% (25.4)	8	50.5% (39.5)
	multilokulär	41	35.9% (25.2)	29	26.9% (23.9)
	o.A.	11	18.6% (22.0)	14	21.4% (2.0)
	occipital	15	34.3% (30.2)	18	15.8% (20.7)
	parietal	36	33.4% (26.5)	31	16.6% (20.4)
	temporal	110	32.1% (27.5)	116	21.4% (22.9)
	Thalamus/ Stammganglien	8	17.1% (25.0)	9	32.2% (39.3)
	infratentoriell	7	20.3% (25.4)	8	50.5% (39.5)
	supratentoriell	296	29.3% (27.3)	310	24.5% (23.9)
			p=0.3883	p=0.0031	
H3F3A-Mutation (sequenziert)	G34R	9	33.3% (36.9)	9	1.1% (1.1)
	K27M	12	20.0% (26.8)	14	40.6% (41.3)
	WT	164	30.7% (27.7)	158	29.2% (24.5)
				p=0.0005 (G34/K27) <0,0001 (WT/G34)	
K27M IHC:	WT+G34R	272	29.1% (26.9)	270	24.7% (23.7)
	K27M	13	19.6% (25.7)	15	39.3% (40.2)
				p=0.0273	
Molekulare Gruppe	IDHmut+LOH	26	18.2% (22.3)	27	43.3% (25.1)
	IDHmut+ATRXloss	58	17.8% (20.1)	63	27.2% (19.3)
	IDHwt	175	36.2% (28.6)	155	18.5% (20.8)
	G34R	9	33.3% (36.9)	9	1.1% (1.1)
	K27M	13	19.6% (25.7)	15	39.3% (40.2)

Tabelle 14: Überleben oberhalb/unterhalb des MW/CART-Cutoff (fett gedruckt: signifikant)

	n	p-Wert (log- Rang)	Durchschnittliches Überleben (Qian et al.) <MW/CART	95%-KI	Durchschnittliches Überleben (Qian et al.) >MW/CART	95%-KI
FoxG1 (MW)	283	0,0031	1077	779-1223	543	400-636
Olig2 (MW)	279	0,3094	636	507-842	1082	714-1411
FoxG1 (CART)	280	0,0022	984	718-1210	543	388-687
Olig2 (CART)	286	0,0485	549	427-804	1075	714-1258

12 Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Professor Dr. Jens Schittenhelm für die hervorragende, zuverlässige und engagierte Betreuung meiner Arbeit. Er stand mir mit viel Geduld zur Seite, beantwortete Fragen stets umgehend und machte mir durch seine Motivation und Hilfe immer wieder Freude an der neuropathologischen Forschung und meiner Arbeit. Eine so ausgezeichnete Betreuung ist nicht selbstverständlich und ich bin außerordentlich dankbar meine Promotion bei Professor Schittenhelm gemacht haben zu dürfen!

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Neuropathologie Tübingen für die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft mit der mir begegnet wurde bedanken. Besonders danke ich an dieser Stelle dem gesamten Labor-Team für die große Unterstützung mit der Laborarbeit insbesondere dem Schneiden und Färben der Präparate.

Von Herzen danke ich meinen Freunden für ihre langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen und ihr Interesse an meiner Arbeit. Danke für eure Motivation und euer offenes Ohr! Besonderer Dank gilt Lena für das sorgfältige Korrekturlesen und die unermüdliche Beantwortung von Fragen rund um diese Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken, die mich auf jede erdenkliche Art und Weise unterstützen. Danke insbesondere für die jahrelange liebevolle Unterstützung meines Studiums, ohne die diese Arbeit nicht möglich geworden wäre. Auch meiner gesamten Familie danke ich von Herzen für ihre Unterstützung und ihr Interesse während meines gesamten Studiums und darüber hinaus.

