

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger)

Identifizierung und klinische Bedeutung von molekularen Markern für Patienten mit malignen Gliomen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Neuropathologie

der Hohen Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Dr. med. Jörg Felsberg

Identifizierung und klinische Bedeutung von molekularen Markern für Patienten mit malignen Gliomen

1	EINLEITUNG	3
2	EIGENE ARBEITEN UND DISKUSSION	7
2.1	Oligodendrogliale Tumoren: Verfeinerung der Kandidatenregionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, Untersuchungen des <i>MGMT</i> -Gens und Korrelation des 1p/19q Status mit dem klinischen Verlauf	8
2.2	Identifizierung und klinische Bedeutung von neuen Kandidatengenen und chromosomalen Veränderungen in oligodendroglialen Tumoren	15
2.3	Bedeutung des <i>MGMT</i> -Gens in Glioblastomen	27
2.4	Epigenetische Regulation des <i>DUSP4/MKP2</i> - Gens in Gliomen	47
2.5	<i>IDH1</i> -Mutationen als neuer diagnostischer und prognostischer Marker für Gliome	51
3.	ZUSAMMENFASSUNG	61
4.	DANKSAGUNG	66
5.	LITERATURVERZEICHNIS	67
6.	ANHANG	78

1 EINLEITUNG

Tumoren des zentralen Nervensystems machen insgesamt knapp drei Prozent aller Krebserkrankungen aus. Ihre jährliche Inzidenz liegt bei ungefähr 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern, die Prävalenz bei ca. 60 Patienten pro 100.000 Einwohnern. Bei Kindern ist der prozentuale Anteil von Tumoren des Nervensystems deutlich höher als bei Erwachsenen. Hier stellen sie nach den kindlichen Leukämieformen die zweithäufigste Gruppe der Krebserkrankungen dar (1, 2) Unter den primären Tumoren des zentralen Nervensystems bilden die Gliome die mit Abstand größte Gruppe. Die systematische histologische Einordnung der Gliome erfolgt heute weltweit einheitlich gemäß der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegebenen WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (3) Die WHO-Gradierung stellt eine prognostische Einschätzung der Tumoren dar und umfasst eine vierstufige Skalierung von WHO-Grad I (benigne) bis zu WHO-Grad IV (hochmaligne).

Die häufigste Untergruppe innerhalb der Gliome stellen die diffus infiltrativ wachsenden astrozytären Tumoren dar, die mehr als 60% aller Gliome ausmachen. Das diffuse Astrozytom (WHO-Grad II) ist der histologisch am besten differenzierte Vertreter dieser Gruppe, weist aber aufgrund seines diffus infiltrierenden Wachstumsverhaltens sowie seiner Neigung zu malignen Progression trotzdem langfristig eine ungünstige Prognose auf. So können sich aus diffusen Astrozytomen, die sich typischerweise im jungen bis mittleren Erwachsenenalter manifestieren, im Verlauf anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) und schließlich sekundäre Glioblastome (WHO-Grad IV, sGBIV) entwickeln. Die primären Glioblastome (WHO-Grad IV, pGBIV), d.h. Glioblastome, die *de novo* ohne niedriggradigere Vorläuferläsion entstehen, stellen die häufigsten und zugleich bösartigsten Hirntumoren des Menschen dar. Der klinische Verlauf der Glioblastome ist in der Regel rasch progredient und die Überlebenszeit der betroffenen Patienten beträgt nur 6 - 15 Monate nach Diagnosestellung. Während die durch maligne Progression entstandenen sekundären Glioblastome typischerweise im Laufe des 4.-5. Lebensjahrzehnts auftreten, zeigen die häufigeren primären Glioblastome einen deutlich späteren Altersgipfel im 6.-7. Lebensjahrzehnt.

Histologisch sind primäre und sekundäre Glioblastome nicht zu unterscheiden, allerdings weisen sie ein unterschiedliches Spektrum molekulargenetischer Veränderungen

auf, die auf eine verschiedenartige Pathogenese dieser beiden Tumorarten hindeuten (Abb.1)
 (4) So stellen Amplifikationen (ca. 40%) mit konsekutiver Überexpression (ca. 60%) des *EGFR*-Gens auf Chromosom 7p12 sowie Aberrationen in Genen des PTEN/PI3K/AKT-Signalweges Schlüsselveränderungen in primären Glioblastomen dar, wohingegen sekundäre Glioblastome typischerweise hohe Mutationsfrequenzen (ca. 70%) des *TP53*-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 17p13 und des *IDH1*-Gens auf 2q33 aufweisen (4-8).

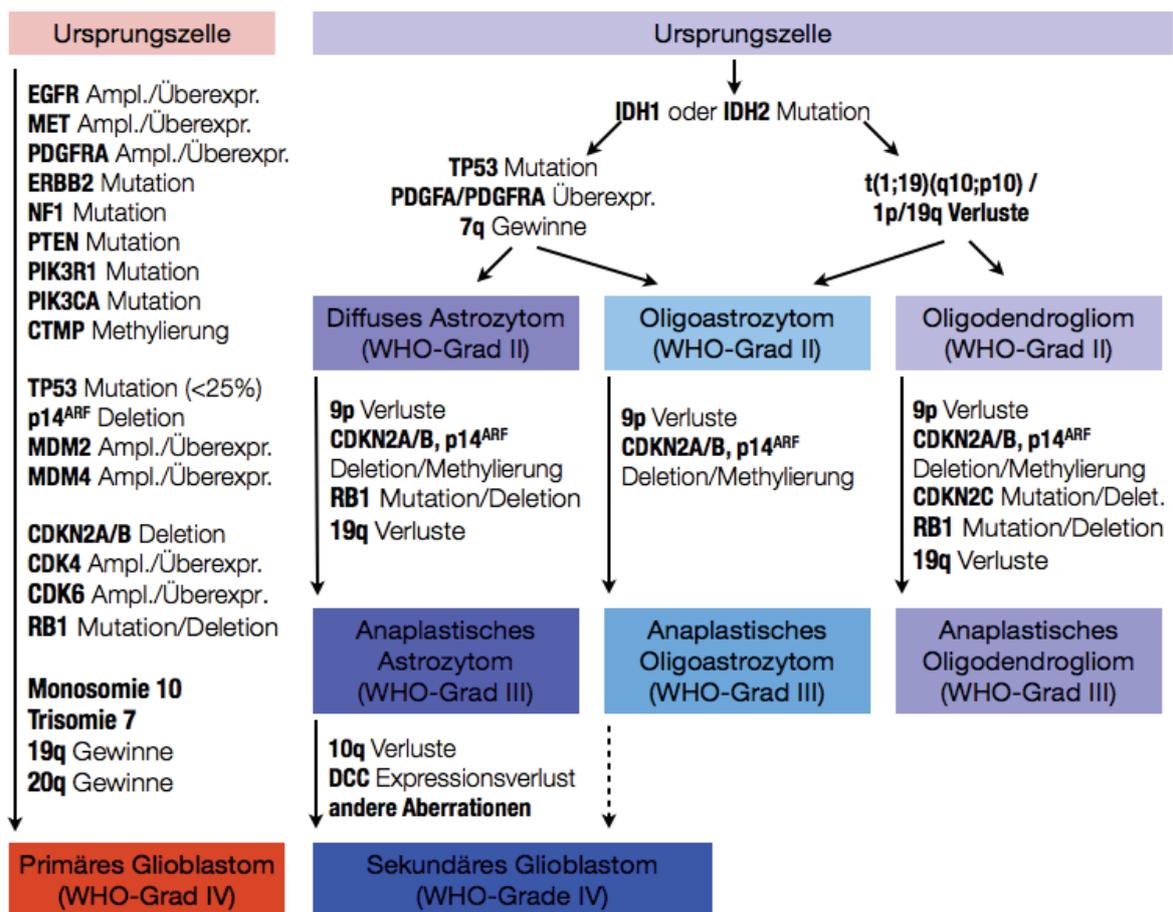


Abbildung 1. Schematische Darstellung der unterschiedlichen molekularen Pathogenese in Gliomen (Modifiziert nach Riemenschneider et al., Acta Neuropathol. 120:567-84, 2010).

Eine weitere Untergruppe der Gliome stellen die oligodendroglialen Tumoren dar, die ca. 5-6% aller Gliome ausmachen (9) Es werden zwei Malignitätsgrade, WHO-Grad II für gut differenzierte Tumoren und WHO-Grad III für die anaplastischen Varianten, unterschieden (10) Des Weiteren differenziert man zwischen Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen, die neben einer oligodendroglialen Tumorkomponente zusätzlich eine astrozytäre

Differenzierung aufweisen, wobei in anaplastischen Oligoastrozytomen - im Unterschied zu anaplastischen Oligodendrogliomen - das Vorliegen von Nekrosen mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert ist, so dass diese Tumoren neuerdings als sog. „Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente (WHO-Grad IV)“ eingestuft werden (11).

Die klinisch bedeutsamste genetische Veränderung in Oligodendrogliomen stellt der kombinierte Allelverlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 und dem langen Arm von Chromosom 19 dar, der sich in etwa 80% der niedriggradigen Oligodendrogliome (WHO-Grad II), 60% der anaplastischen Oligodendrogliome (WHO-Grad III) sowie etwa 50% der oligoastrozytären Tumoren (WHO-Grad II bzw. III) findet (9, 12) Patienten mit Tumoren, die einen kombinierten 1p/19q-Verlust aufweisen, zeigen in der Regel ein signifikant besseres Therapieansprechen auf eine Chemo- oder Radiotherapie und weisen eine günstigere Prognose auf (13-15) Die kombinierten Allelverluste sind Folge einer unbalancierten t(1;19) (q10;p10) Translokation in den Tumorzellen (16, 17), wobei die entsprechenden Zielgene der Allelverluste sowie der zugrunde liegende Mechanismus der Translokation (18) bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten.

Kürzlich wurde gezeigt, dass Mutationen im Isocitrat-Dehydrogenase 1 (*IDH1*) Gen und seltener im verwandten *IDH2* Gen in der Mehrheit der diffusen Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III sowie der sekundären Glioblastome (WHO-Grad IV) zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Tumorentstehung nachweisbar sind und somit eine entscheidende Bedeutung für die Initiierung der Tumorentstehung haben dürften (5, 8) Auf diesen Sachverhalt und die klinische Bedeutung dieser Mutationen wird aber zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen der eigenen Arbeiten noch ausführlich eingegangen.

Die aktuelle WHO-Klassifikation teilt die Tumoren ausschließlich nach histologischen Kriterien ein. In einigen Entität, wie z.B. den oligoastrozytären Mischtumoren, gelingt dies aber nicht immer reproduzierbar (19). Des Weiteren existieren zur Zeit auch keine immunhistochemischen oder molekulargenetischen Marker, die eine zuverlässige Unterscheidung dieser Tumorentitäten erlauben würden. Die molekulargenetische Charakterisierung der Gliome hat dazu beigetragen, die Mechanismen und Tumorgenese besser zu verstehen, das Patientenmanagement durch die Identifizierung neuer diagnostischer, prognostischer und prädiktiver Marker zu verbessern sowie Studienpatienten besser stratifizieren zu können (20). Untersuchungen mittels Microarray-basierten

Genexpressionsanalysen zeigten z.B. für Tumoren mit 1p/19q Verlusten eine sogenannte proneurale Genexpressionssignatur, die mit einer guten Prognose in anaplastischen Gliomen assoziiert ist (21, 22). Einige der in Abb.1 dargestellten Aberration in Gliomen haben eine diagnostische und z.T. auch prognostische Bedeutung. Letztlich muss aber festgestellt werden, dass die meisten Aberrationen nicht den Status eines Biomarkers im engeren Sinne erfüllen. Von einem Biomarker ist zu erwarten, dass er in besonderem Maße diagnostische, prognostische und prädiktive Informationen liefert, die über die rein histologische Tumorklassifikation hinausgehen. So werden z.B. Glioblastom-assoziierte genetische Alterationen wie *EGFR*-Amplifikation oder *TP53*-Mutationen bezüglich ihres prognostischen Effektes nach wie vor kontrovers diskutiert (23). Von einem diagnostischen Biomarker ist zu fordern, dass er bei histologisch mehrdeutigen Befunden eine eindeutige Klassifikation ermöglicht und eine nach klinischen Gesichtspunkten sinnvolle Differenzierung von unterschiedlichen Tumorentitäten erlaubt. Ein prognostischer Marker sollte mit dem Rezidivfreien Intervall bzw. dem Gesamtüberleben korrelieren, ein prädiktiver Marker sollte dagegen Informationen über das Ansprechen bestimmter Therapieformen liefern. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien reduzieren sich derzeit die für die klinische Neuroonkologie relevanten molekularen Parameter im Wesentlichen auf drei vielversprechende Marker. Dies sind der kombinierte Verlust von 1p und 19q in oligodendroglialen Tumoren, die *MGMT*-Promotorhypermethylierung in malignen Gliomen, insbesondere Glioblastomen, sowie Mutationen des *IDH1*- und *IDH2*-Gens in diffusen Gliomen. Derzeit laufende Studien stratifizieren ihre Patientenkollektive bereits nach 1p/19q-Deletion oder *MGMT*-Promotormethylierung. *IDH1*-Mutationen wurden kürzlich als wichtigster prognostischer Marker in anaplastischen Gliomen identifiziert (24, 25) und stellen einen hilfreichen Marker in der Differentialdiagnostik von diffusen Gliomen dar. Zudem sind sie von herausragender Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese von Gliomen und hinsichtlich der Entwicklung neuer, Pathogenese-basierter Therapieansätze für diese Tumoren.

2 EIGENE ARBEITEN UND DISKUSSION

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift befasst sich mit der klinischen Validierung bekannter Gliom-assoziiertes molekularer Veränderungen sowie der Identifizierung und klinischen, d.h. diagnostischen und prognostischen Charakterisierung neuartiger molekularer Veränderungen in Gliomen. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf den für die klinische Neuroonkologie derzeit wichtigsten molekularen Biomarkern, d.h. kombinierten Verlusten von 1p und 19q, *MGMT*-Promotormethylierung und Mutationen im *IDH1*- oder *IDH2*-Gen.

Die in **Kapitel 2.1** (Anhang 1 und 2) beschriebenen Arbeiten widmen sich der Feinkartierung der Kandidatenregion auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 sowie der Bedeutung des *MGMT*-Gens in oligodendroglialen Tumoren. Die in **Kapitel 2.2** (Anhänge 3 bis 7) beschriebenen Arbeiten beschäftigen sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von neuen Kandidatengen in oligodendroglialen Tumoren. Ein besonderer Schwerpunkt liegt hierbei auf einem translationalen Forschungsansatz mit Charakterisierung der gefundenen molekularen Aberrationen hinsichtlich ihrer prognostischen und diagnostischen Relevanz.

Der Schwerpunkt der in **Kapitel 2.3** (Anhang 8 bis 12) vorgestellten Arbeiten dieser Habilitationsschrift liegt auf molekularen Untersuchungen zur Rolle von Aberrationen des *MGMT* Gens in Glioblastomen. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf der vergleichenden Untersuchung unterschiedlicher Analyseverfahren sowie der Korrelation dieser Veränderungen mit anderen genetischen Aberrationen und klinischen Parametern.

Die in **Kapitel 2.4** (Anhang 13) vorgestellte Arbeiten dieser Habilitationsschrift befassen sich mit der Untersuchung eines neu gefundenen, epigenetisch regulierten Kandidatengens, dem „dual-specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-2“-Gen (*DUSP4/MKP-2*) in Gliomen.

Die in **Kapitel 2.5** (Anhang 14 und 16) vorgestellten Arbeiten fokussieren schließlich auf Untersuchungen der Gene *IDH1* und *IDH2* in Gliomen, insbesondere in Hinblick auf deren diagnostische und prognostische Bedeutung sowie der Etablierung eines sensitiven und rasch durchführbaren Assays zur Mutationsdetektion mit Hilfe der DNA-Pyrosequenzierung.

2.1 Oligodendrogliale Tumoren: Verfeinerung der Kandidatenregionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, Untersuchungen des *MGMT*-Gens und Korrelation des 1p/19q Status mit dem klinischen Verlauf

Lange Zeit war die histologische Unterscheidung zwischen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren klinisch von untergeordneter Bedeutung, da sich die Prognose und auch die Therapie nicht wesentlich unterschieden. Der erste entscheidende Schritt in eine differenziertere, klinisch relevante Betrachtungsweise kam mit einer Arbeit von Cairncross et al. (26), die erstmals beschrieb, dass Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren besser auf eine alkylierende Chemotherapie nach dem sog. PCV-Schema (Procarbazin, Lomustin und Vincristin) ansprechen als astrozytäre Tumoren und ein längeres Progressions-freies Intervall aufweisen. Einige Jahre später wurde gezeigt, dass kombinierte Verluste der Chromosomenarme 1p und 19q in bis zu 80% der oligodendroglialen Tumoren vorkommen und ein frühes Ereignis in der Tumorgenese darstellen (12). Einen weiteren Meilenstein stellte dann die Arbeit von Cairncross und Mitarbeitern dar (14), in der gezeigt wurde, dass Patienten mit oligodendroglialen Tumoren, in denen Verluste von 1p und 19q vorlagen, gut auf eine PCV-Chemotherapie ansprechen und eine signifikant bessere Prognose haben, wohingegen Patienten, deren Tumoren keine 1p/19q-Verluste, stattdessen aber Deletionen des *CDKN2A* Gens aufwiesen, eine deutlich schlechtere Prognose hatten. Auf Grundlage u.a. dieser 3 Arbeiten begann die intensive Suche nach Kandidatengenen auf den Chromosomenarmen 1p und 19q.

Zu diesem Zweck etablierten wir eine Serie von 89 Patienten mit oligodendroglialen Tumoren, von denen in ausreichender Menge hochmolekulare DNA aus Tumorgewebe und peripheren Blutleukozyten verfügbar war, um in einem ersten Schritt eine Feinkartierung der Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 vorzunehmen und mögliche Kandidatenregionen für Tumorsuppressorgene einzugrenzen (27). Hierzu untersuchen wir 30 polymorphe Marker auf 1p und zusätzlich 7 polymorphe Marker auf 19q. Ein Verlust von Allelen auf 1p und 19q fand sich in 20/24 (83%) Oligodendrogliomen (WHO-Grad II, OII), 15/24 (63%) anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO-Grad III, AOIII), 10/18 (56%) Oligoastrozytomen (WHO-Grad II, OAI) und 12/23 (52%) anaplastischen Oligoastrozytomen (WHO-Grad III, AOAI). Während die überwiegende Zahl der Tumoren

einen vollständigen Verlust von 1p zeigte, fanden wir fünf Tumoren, die lediglich partielle Deletionen auf 1p aufwiesen. Mit Hilfe dieser Tumoren konnten wir die folgenden umschriebenen Kandidatenregionen definieren: Region 1: 1p36.31-pter distal von *DIS2633*, Region 2: 1p36.22-p36.31 zwischen *DIS489* und *DIS2642* sowie Region 3: 1p34.2-p36.1 zwischen *DIS2743* und *DIS482* (Abb. 2).

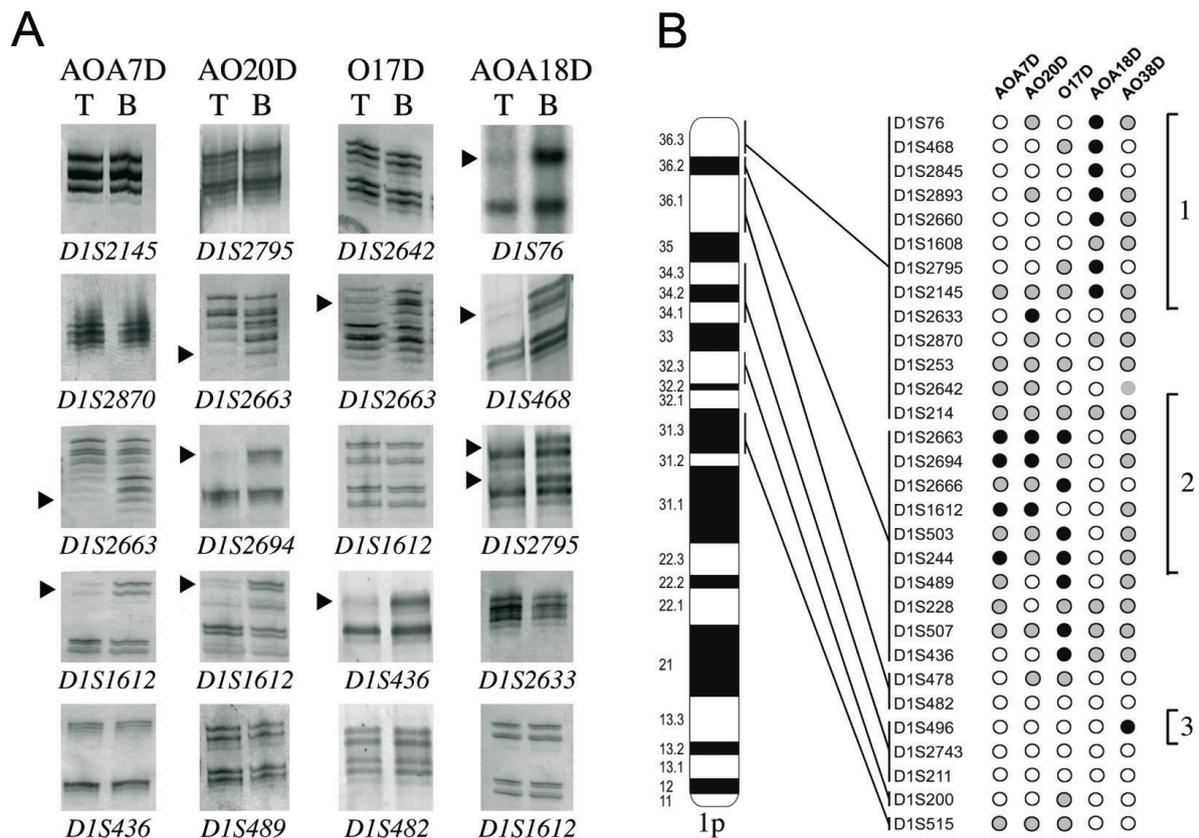


Abbildung 2. (A) zeigt Beispiele von Mikrosatelliten-Analysen in 4 oligodendroglialen Tumoren mit interstitiellen Verlusten auf 1p. Die obere Abszisse bezeichnet die Fall-Nummer (T, Tumor; B, Blut). Die Mikrosatellitenmarker sind entsprechend ihrer Lokalisation vom Telomer zum Centromer aufgelistet. Die Pfeilköpfe markieren Allelverluste in der Tumor-DNA. (B) zeigt eine graphische Zusammenfassung der LOH-Verteilung an den einzelnen Mikrosatellitenmarkern auf 1p in diesen Tumoren. Die linke Ordinate zeigt ein Schema des kurzen Arms von Chromosom 1, daneben stehen die untersuchten Mikrosatellitenmarker. Die überlappenden LOH-Muster der in der Abszisse bezeichneten Tumoren beschreiben somit 3 Kandidatenregionen, die in den Abschnitten 1p36.31-pter (Region 1), 1p26.2-1p36.3 (Region 2) und 1p34.2-p36.1 (Region 3) liegen. Zu beachten ist, dass die Mikrosatellitenverteilung nicht proportional dargestellt ist. Die Region 1 und 2 umfasst ca. 5,7 Megabasen, die Region 3 ca. 17 Megabasen. (schwarze Kreise, LOH; graue Kreise, nicht informativ; weiße Kreise, Retention beider Allele im Tumor).

In der von uns untersuchten Serie fand sich auf dem Chromosomenarm 19q keine partielle Deletion. Die Korrelation der LOH-Befunde mit den Überlebensdaten der Patienten zeigte,

dass der kombinierte Verlust auf 1p/19q mit einem längeren Rezidiv-freien Intervall und Gesamtüberleben signifikant assoziiert ist. Einzelheiten dazu sind in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgelistet, sowie den Kaplan-Meier-Kurven in Abb. 3 zu entnehmen.

Tabelle 1. Zusammenfassung der Überlebensdaten in Monaten in Bezug auf den 1p/19q LOH-Status und die Diagnose (TTP, Progressions-freie Zeit ; OS, Gesamtüberleben)

Histologie	LOH Status	Anzahl	TTP (Median)	OS (Median)	5-Jahres- Überlebensrate
OII	total	21	53	170	95 %
	LOH 1p+19q	20	53	170	100 %
	kein LOH 1p+19q	1	49	---	---
AOIII	total	19	34	58	46 %
	LOH 1p+19q	10	59	---	63 %
	kein LOH 1p+19q	9	13	33	19 %
OAI	total	17	61	105	72 %
	LOH 1p+19q	9	61	172	92 %
	kein LOH 1p+19q	8	45	105	70 %
AOAIII	total	18	77	91	75 %
	LOH 1p+19q	9	86	91	80 %
	kein LOH 1p+19q	9	77	46	36 %
OII / OAI	total	38	57	170	85 %
	LOH 1p+19q	29	57	172	92 %
	kein LOH 1p+19q	9	47	105	70 %
AOAIII / AOAIII	total	37	58	91	58 %
	LOH 1p+19q	19	86	91	80 %
	kein LOH 1p+19q	18	39	46	36 %

Diese Arbeit (27), die auf einem sowohl molekulargenetisch als auch klinisch gut charakterisierten Kollektiv von Patienten mit oligodendroglialen Tumoren (OII, AOIII, OAI, AOAIII) basiert und die drei darin identifizierten umschriebenen Kandidatenregionen stellen die Basis für die nachfolgend vorgestellten Arbeiten über oligodendrogliale Tumoren dar.

Neben der Bestätigung, dass der kombinierte Verlust auf 1p und 19q von prognostisch günstiger Bedeutung ist konnten wir die potentiellen Kandidatenregionen deutlich genauer definieren und wie kurz zuvor Iuchi et al. (28) zeigen, dass Patienten, deren Tumoren eine interstitielle Deletion auf 1p aufweisen, eine deutlich schlechtere Prognose haben als

Patienten, deren Tumoren kombinierte Verluste von 1p/19q oder keine Veränderungen dieser Chromosomenarme aufweisen (Abb.3i).

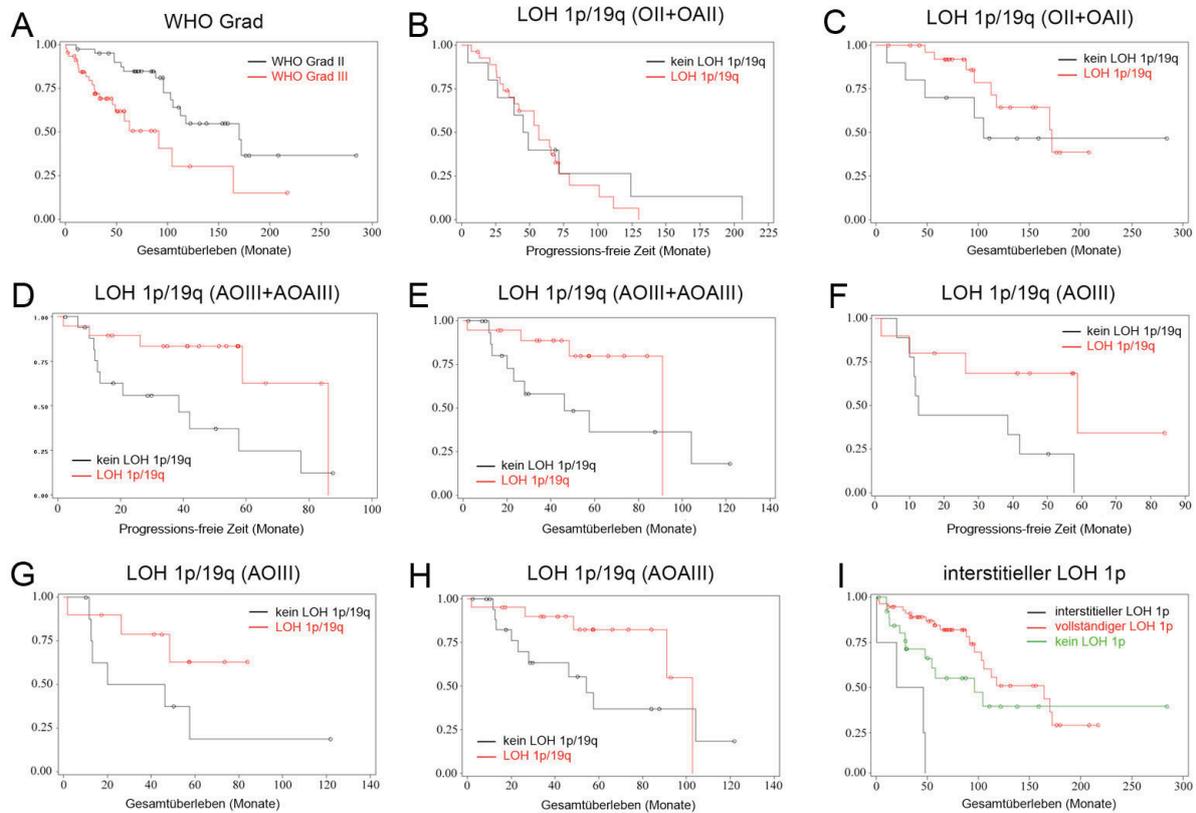


Abbildung 3. Ausgewählte Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (OS) sowie die Progressions-freie Zeit (TTP) von Patienten mit oligodendroglialen Tumoren. **A**, OS von Patienten mit WHO-Grad II vs. III Tumoren. **B-C**, TTP und OS von Patienten mit WHO-Grad II Tumoren mit und ohne kombiniertem 1p/19q Verlust. **D-E**, TTP und OS von Patienten mit WHO-Grad III Tumoren mit und ohne kombiniertem 1p/19q Verlust. **F-G**, TTP und OS von Patienten mit AOIII stratifiziert nach dem 1p/19q-Status. **H**, OS von AOIII Patienten stratifiziert nach dem 1p/19q-Status. **I**, OS von vier Patienten mit Tumoren mit interstitiellem LOH auf 1p im Vergleich zu Tumoren mit und ohne kompletten Verlust auf 1p.

Diese Tatsache ist insofern von großer klinischer Bedeutung, da nur die repräsentative Untersuchung des ganzen Chromosomenarms von 1p mit gleichzeitiger Analyse von 19q eine prognostisch zuverlässige Aussage erlaubt. Dies ist insbesondere hinsichtlich der gewählten Detektionsmethode zu beachten, da einige Techniken der molekularen Diagnostik einen partiellen Verlust u.U. nicht detektieren können, z.B. FISH, aber auch die Mikrosatelliten-Analyse muss durch die Verwendung mehrerer Marker, die über den gesamten Chromosomenarm verteilt sind sicherstellen, einen partiellen Verlust nicht zu übersehen. Die Array-CGH bietet hier eine, wenn auch zeit- und kostenintensivere Alternative (29).

In einer auf dem vorgestellten Tumorkollektiv basierenden Arbeit (30) untersuchten wir in Hinblick auf das gute Ansprechen von oligodendroglialen Tumoren auf alkylierende Chemotherapeutika eine Subpopulation von 52 Tumoren auf Promotormethylierung und mRNA- bzw. Protein-Expression der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*). Zusätzlich korrelierten wir diese Befunde mit dem 1p/19q-Status dieser Tumoren, da bereits einige Zeit vorher ein möglicher Zusammenhang von *MGMT*-Promotormethylierung und kombiniertem Allelverlust auf 1p/19q beschrieben wurde (31).

Der zytotoxische Effekt von alkylierenden Chemotherapeutika basiert hauptsächlich auf der Alkylierung der O6-Position von Guanin in der DNA (32, 33) O6-alkyliertes Guanin kann durch das Gen O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*) repariert werden. *MGMT* fungiert dabei als DNA-Reparaturenzym, das das mutagene Alkyladdukt von der O6-Position des Guanins wieder entfernt und somit zu einer Therapieresistenzentwicklung in Tumorzellen führen kann (33). Demzufolge konnte für eine reduzierte *MGMT*-Expression bzw. -Aktivität eine erhöhte Chemosensitivität in unterschiedlichen Tumoren, einschließlich Gliomen nachgewiesen werden (34). Als möglicher Mechanismus einer erniedrigten *MGMT*-Aktivität bzw. -Expression wurde in unterschiedlichen Tumoren eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors nachgewiesen (31, 35, 36).

Mittels direkter Sequenzierung von Natriumbisulfit-behandelter DNA konnten wir in 46 von 52 Tumoren (88%) eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors nachweisen. Die Mehrheit dieser Fälle zeigte ebenfalls eine reduzierte mRNA-Expression in der real-time RT-PCR und eine verminderte, immunhistochemisch bestimmte Protein-Expression (Abb. 4 und 5). Des Weiteren fanden wir, dass sowohl die Häufigkeit der Methylierung als auch die Rate der methylierten CpG-Positionen in Tumoren mit kombiniertem 1p/19q-Verlust signifikant höher war, eine Beobachtung, die das gute Ansprechen auf Chemotherapie dieser Tumoren zum Teil mit erklären könnte.

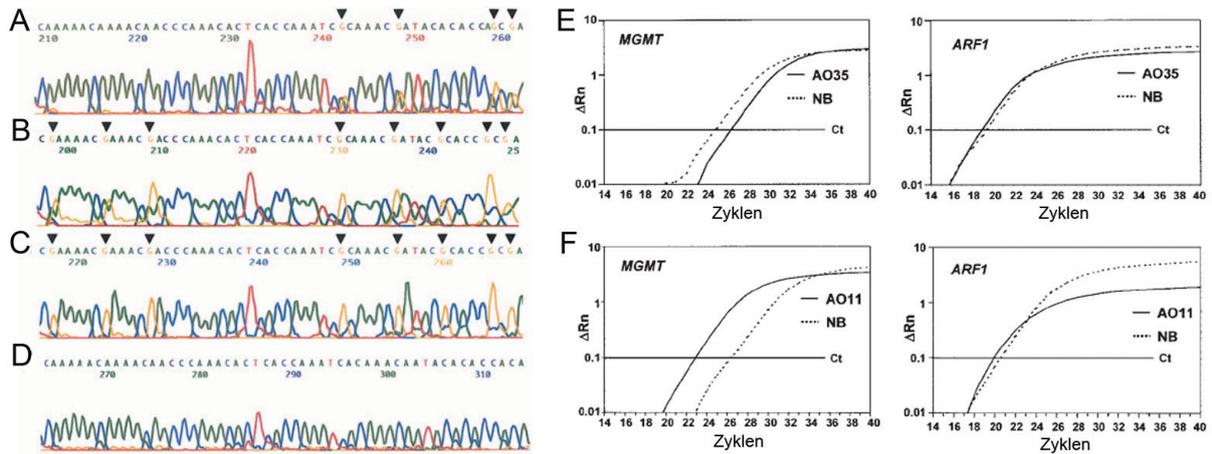


Abbildung 4. Sequenzierung des *MGMT*-Promoters nach Natriumbisulfit-Modifikation der DNA in ausgewählten Tumoren (**links, A-C**) und normalem Hirngewebe (**links, D**). Die Pfeilspitzen zeigen auf methylierte CpG-Dinukleotide in der untersuchten Promotorregion (CpG 6-13). Der Tumor OA3 (**A**) zeigt nur eine Methylierung in einem Teil der CpG-Dinukleotide wohingegen die Tumoren AO4 (**B**) und AOA1 (**C**) eine partielle oder vollständige Methylierung aller CpG-Dinukleotide dieses Promotorabschnittes aufweisen. (**E-F**) Beispiel einer real-time RT-PCR Analyse der *MGMT* mRNA-Expression in zwei AOIII (AO35, AO11) im Vergleich zu normalem Hirngewebe (NB). Die X-Achsen bezeichnet jeweils die Zykluszahl, die Y-Achsen die relative PCR-Produktmenge. (**E**) Man erkennt eine verminderte mRNA Expression von *MGMT* in AO35 im Vergleich zu NB. Während die Referenz mRNA (*ARF1*) eine annähernd gleiche Zykluszahl im Schwellenwert (Ct) aufweist., zeigt die *MGMT* Kurve von AO35 eine deutliche Verschiebung nach rechts im Vergleich zur NB-Kurve. Der relative mRNA Werte von *MGMT* im Vergleich zu NB betrug 0,2. (**F**) Hohe Expression von *MGMT* mRNA in Tumor AO11 mit deutlicher Verschiebung der *MGMT* Kurve nach links für AO11 im Vergleich zu NB. Die Kurven von AO11 und NB für die Referenz mRNA (*ARF1*) schneiden dagegen wieder annähernd in der gleichen Zykluszahl den Ct-Wert. Der relative mRNA Werte von *MGMT* im Vergleich zu NB betrug 12. Der Tumor AO35 zeigte sowohl eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung als auch einen kombinierten Allelverlust auf 1p und 19q, der Tumor AO11 dagegen nicht.

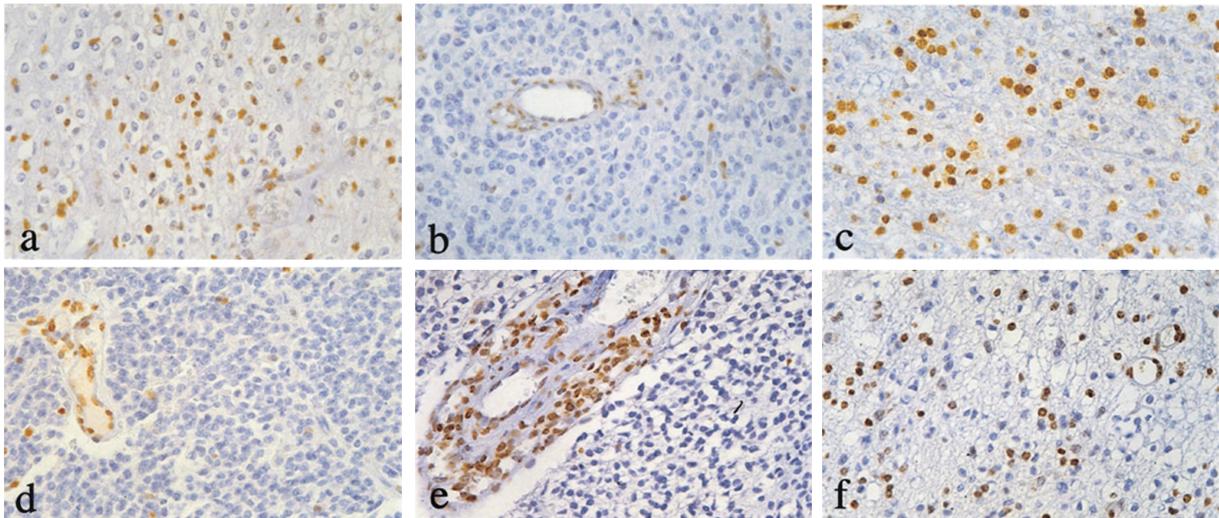


Abbildung 5. Immunhistochemische Färbungen des MGMT-Proteins (Klon: MT3.1, NeoMarkers, Fremont, CA) in oligodendroglialen Tumoren. **(a)** Das Oligodendrogliom O8 ohne LOH 1p/19q zeigt eine nukleäre Positivität für MGMT bei fehlender *MGMT*-Promotorhypermethylierung. **(b)** Im Tumor O14 fand sich dagegen keine nukleäre MGMT-Positivität in den Tumorzellen (lediglich die Gefäßendothelien reagieren positiv). Dieser Tumor wies einen kombinierten 1p/19q-Verlust und eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors auf. **(c-d)**, Der Tumor AO6 ist ein anaplastisches Oligodendrogliom mit fokaler Positivität für MGMT **(c)** während der Tumor AO19 keine MGMT-Positivität zeigt **(d)**. Beide Tumoren hatten molekularbiologisch eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung und einen kombinierten 1p/19q Verlust. **(e-f)** Der *MGMT*-Promotormethylierte Tumor AOA12 zeigt in zellreichen Arealen keine nukleäre MGMT-Positivität von Tumorzellen **(e)**, dagegen finden sich in zellärmeren Arealen mehrere positive Zellen **(f)**.

Über die Rolle der *MGMT*-Promotormethylierung und Expression in Glioblastomen wird noch ausführlich im Kapitel 2.3 berichtet.

2.2 Identifizierung und klinische Bedeutung von neuen Kandidatengenenen und chromosomalen Veränderungen in oligodendroglialen Tumoren

In dem folgenden Abschnitt liegt der Schwerpunkt auf Arbeiten, die sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von neuen Kandidatengenenen bzw. –regionen in oligodendroglialen Tumoren beschäftigen. Von besonderer Bedeutung ist hier zudem ein translationaler Forschungsansatz hinsichtlich der prognostischen und diagnostischen Bedeutung der gefundenen Veränderungen.

Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen haben über einen Verlust auf dem langen Arm von Chromosom 14 (14q) in verschiedenen Gliomen berichtet (37, 38). Mittels der „Differential Methylation Hybridization“ (DMH) Methode wurden in Vorarbeiten im Labor von Priv.-Doz. Dr. A. Waha am Institut für Neuropathologie in Bonn zwei Fragmente auf 14q (14q23.1, CGI-Klon #396 und 14q32.12, CGI-Klon #519) identifiziert, die differenziell in oligodendroglialen aber nicht in astrozytären Tumoren methyliert waren. In den Validierungsuntersuchungen an einer Serie von 43 astrozytären und oligodendroglialen Tumoren untersuchten wir diese Regionen hinsichtlich möglicher Allelverluste mittels Mikrosatellitenanalyse und Hypermethylierung mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP). Die Mikrosatellitenanalyse zeigte einen Verlust der Heterozygotie (LOH) in 7/28 (25%) der oligodendroglialen Tumoren und in 3/15 (20%) der astrozytären Tumoren. Sieben Tumoren zeigen einen vollständigen Verlust aller informativen Marker, wogegen drei Tumoren einen partiellen Verlust zeigen und die Kandidatenregion 14q22.3–q32.1 zwischen den Markern *D14S282* und *D14S995* definierten. Die MSP-Analyse des Fragments auf 14q32.12 erbrachte eine Hypermethylierung in 12/43 (28%) der untersuchten Gliome. Eine Hypermethylierung war ausschließlich in Tumoren mit oligodendroglialer Differenzierung nachweisbar (12/28, 43%). Keiner der hypermethylierten Tumoren zeigte dagegen Verluste auf 14q. Insgesamt zeigten somit 19/28 (68%) der oligodendroglialen Tumoren entweder einen Verlust auf 14q22.3–q32.2 oder eine Hypermethylierung auf 14q32 (Abb. 6).

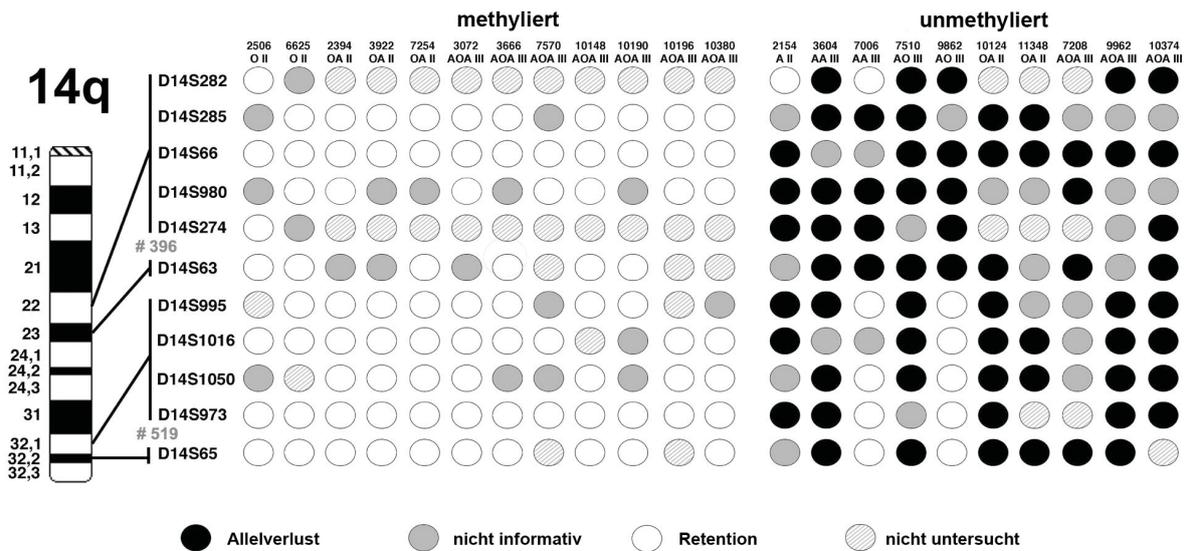


Abbildung 6. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse auf Chromosom 14q in oligodendroglialen und astrozytären Tumoren in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus des anonymen Locus CGI-Klon #519 auf 14q32.12.

Zusammenfassend können wir somit ebenfalls annehmen, dass auf 14q bislang nicht identifizierte, potentielle Gliom-assoziierte Tumorsuppressorgene liegen und die ausschließlich in oligodendroglialen Tumoren nachweisbare Hypermethylierung auf 14q32.12 vermutlich eine Rolle im Rahmen der epigenetischen DNA-Modifikation in dieser Tumorentität spielt. Diesbezüglich wäre auch ein Zusammenhang zwischen dem kürzlich in einem Teil der Gliome beschriebenen CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP), der insbesondere in *IDH1* mutanten und 1p/19q-deletierten Tumoren vorkommt, zu diskutieren (39).

Basierend auf der eigenen Feinkartierung des kurzen Arms von Chromosom 1 in oligodendroglialen Tumoren (27) und in Kooperation mit Priv.-Doz. Dr. Christian Hartmann, Institut für Neuropathologie in Heidelberg, der eine Feinkartierung des langen Arms von Chromosom 19 publizierte (40) wurde in einem gemeinsamen Projekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Lichter am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg cDNA-Microarray-basierte Expressionsprofile von 35 Gliomen (8 AII, 7 OII, 14 AOIII, 6 AOIII) erstellt, um neue potentielle Kandidatengene zu identifizieren, die in der Pathogenese dieser Tumoren von Bedeutung sind (41). Hierzu wurden cDNA-Mikroarrays mit 7.000 humanen, Tumor-relevanten, Gen-spezifischen Fragmenten benutzt (42, 43) die zusätzlich durch 215 selbst hergestellte cDNA Fragmente ergänzt wurden, die alle Gene in

den zuvor identifizierten chromosomalen Regionen auf 1p (1p36.31-pter, distal von *DIS2633*; 1p36.22-p36.31, zwischen *DIS489* und *DIS2642*; 1p34.2-p36.1, zwischen *DIS2743* und *DIS482*) (27) und 19q (19q13.3 zwischen *D19S219* und *D19S246*) (40) umfassten. Die Expressionsprofile von Gliomen mit und ohne kombinierten 1p/19q-Verlusten wurden mittels „significant analysis for microarrays (SAM)“ durchgeführt, die die Gene identifiziert, die differenziell in den genannten Tumorgruppen exprimiert werden. Anschließend wurde die sog. „Prediction analysis for microarrays (PAM)“ eingesetzt, um aus den zuvor identifizierten Genen sog. „Classifier“ zu definieren. Diese Untersuchungen identifizierten u.a. 8 Gene aus den Kandidatengenregionen auf 1p und 19q (*MGC4399*, *SRM* und *ICMT* auf 1p36.31-13 sowie *RPL18*, *FTL*, *ZIN*, *FLJ10781* und *DBP* auf 19q.132-33). In einem nachfolgenden Validierungsschritt mittels quantitativer real-time RT-PCR konnte für die Gene *MGC4399*, *ICMT* und *RPL18* eine differentielle Expression zwischen 1p/19q-deletierten und 1p/19q-intakten Gliomen bestätigt werden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass das zytosolische Phospholipase A2 Gen (*PLA2G4C*) auf 19q13.3 signifikant niedriger in anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO-Grad III) exprimiert wird, als in niedriggradigen Oligodendrogliomen (WHO-Grad II). Zusammenfassend wurden in diesem Projekt somit interessante neue Kandidatengene identifiziert, die offensichtlich eine Rolle in der Pathogenese oligodendroglialer Tumoren spielen.

Ein besonders aussichtsreicher Kandidat, der im Rahmen der o.g. Analysen (41) identifiziert wurde, war das „CBP/p300-interacting transactivator with glutamic acid/aspartic domain 4“ (*CITED4*) Gen auf 1p34.2, das in oligodendroglialen Tumoren mit kombiniertem Verlust auf 1p und 19q signifikant niedriger exprimiert wurde als in oligodendroglialen Tumoren ohne einen kombinierten 1p/19q-Verlust. Diese Daten konnten anhand des eigenen, zum größten Teil bereits publizierten Kollektivs (27) validiert werden. Insgesamt bestand die Patientenkohorte für diese Studie aus 78 Patienten mit oligodendroglialen Tumoren (21 OII, 3 OAI, 8 AII, 29 AOIII, 17 AOAI). Die nachfolgend durchgeführte Mutationsanalysen mittels SSCP und Direktsequenzierung erbrachten keine Hinweise auf eine somatische Mutation im *CITED4* Gen. Allerdings konnten wir erstmalig nachweisen, dass die niedrige Expression von *CITED4* signifikant mit einer Promotorhypermethylierung dieses Gens assoziiert ist (Abb. 7a und b). Der kausale Zusammenhang zwischen niedriger Expression und Promotorhypermethylierung wurde auch in Zelllinien-Experimenten bestätigt, die zeigten,

dass die mRNA Expression von *CITED4* nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A in mehreren Gliomzelllinie wieder anstieg, die einen hypermethylierten *CITED4* Promotor haben (Abb. 7c und d).

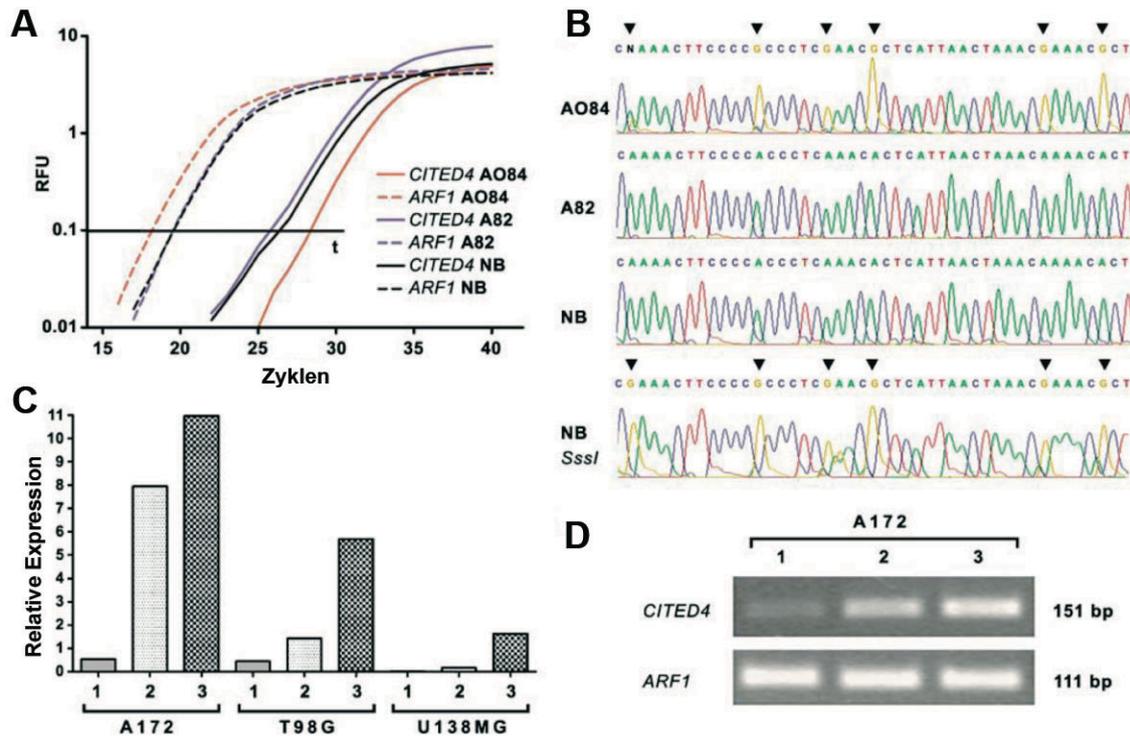


Abbildung 7. (A) Beispiel einer quantitativen real-time RT-PCR zur Bestimmung der *CITED4* mRNA Expression. Während das nicht-neoplastische Gehirngewebe (NB) und das Astrozytom (WHO-Grad II) A82 ohne kombinierten 1p/19q-Verlust annähernd identische Kurvenverläufe für *CITED4* und das Referenzgen *ARF1* zeigen, ist für das anaplastische Oligodendrogliom (WHO-Grad III) AO84 eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve für *CITED4* nachweisbar, die für eine verminderte Expression von *CITED4* in diesem Tumor spricht. Das Expressionsniveau lag für AO84 bei 20% im Vergleich zu NB und A82. (B) DNA-Sequenz der *CITED4* assoziierten CpG-Insel nach Natriumbisulfit-Behandlung der DNA aus dem Tumor AO84 mit methylierten CpG Dinukleotiden (Pfeilspitzen) in der oberen Abbildung, dagegen keine CpG Dinukleotidmethylierung in der darunter dargestellten Sequenzen des Tumors A82 bzw. der Normalhirnprobe (NB). Als Positivkontrolle ist zuunterst eine mit SssI-Methylase behandelte NB-Probe mit vollständiger Methylierung aller CpG Positionen dargestellt. (C) Bestimmung der Reexpression von *CITED4* mRNA mittels quantitativer real-time RT-PCR in 3 Gliomzelllinien (A172, T98G und U138MG) unter Standard-Bedingungen (1) und nach Behandlung der Zelllinien mit 500 nM bzw. 1mM 5-Aza-2'-Deoxycytidin und je 1 mM Trichostatin A (2 und 3) sowie (D) die auf ein 3%-iges Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte der Zelllinie A172. Im Vergleich zu dem Kontrollgen *ARF1* ist auch hier in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der real-time RT-PCR ein deutlicher Anstieg des PCR-Signals für *CITED4* nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A nachweisbar.

Des Weiteren ergaben korrelative Analysen, dass eine Promotorhypermethylierung von *CITED4* signifikant mit einem längeren Rezidiv-freien Intervall und Gesamtüberleben von Patienten mit oligodendroglialen Tumoren assoziiert ist. Zusammenfassend schließen wir aus diesen Ergebnissen, dass das in oligodendroglialen Tumoren mit kombiniertem 1p/19q-Verlust epigenetisch herunterregulierte *CITED4* als neuer prognostischer Marker in dieser Tumorentität anzusehen ist. Ob *CITED4* tumorsuppressive Eigenschaften hat, muss in weitergehenden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen funktionell analysiert werden. Ein Mausmodell mit konstitutivem *CITED4* Knock-out wurde hierfür kürzlich im Rahmen des NGFN^{plus} Hirntumornetzes generiert und wird derzeit am DKFZ in Heidelberg phänotypisch charakterisiert.

Ein weiteres aussichtsreiches Kandidatengen, welches das „Epitheliale Membran Protein 3“ (*EMP3*) kodiert, wurde ebenfalls im Rahmen der o.g. Analysen (41) identifiziert und liegt auf 19q13.3. Auch *EMP3* wird in oligodendroglialen Tumoren mit kombiniertem Verlust auf 1p und 19q vermindert exprimiert (44) und soll im Folgenden kurz vorgestellt werden. Die von uns erhobenen Befunde werden auch durch Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe (45) in Neuroblastomen und Astrozytomen unterstützt, die als Mechanismus einer verminderten *EMP3*-Expression eine epigenetische Inaktivierung dieses Gens beschrieben. An einem erweiterten Tumorkollektiv aus 162 Gliomen (22 OII, 36 AOIII, 5 OAI, 11 AOAI, 24 AII, 25 AAII, 30 pGBIV und 9 sGBIV) wurde die Promotormethylierung von *EMP3* mittels Natriumbisulfit-Sequenzierung bestimmt. Von 132 dieser Gliomen (28 OII, 33 AOIII, 5 OAI, 31 AOAI, 7 AII, 15 AAII und 13 pGBIV) wurde zusätzlich auch ein Mutationsscreening mittels SSCP-Analyse durchgeführt. Von 78 Gliomen (10 OII, 21 AOIII, 2 OAI, 8 AOAI, 9 AII, 10 AAII, 9 pGBIV und 9 sGBIV) stand weiterhin mRNA in ausreichender Menge und Qualität für mRNA-Expressionsanalysen zur Verfügung.

Die Mutationsanalysen mittels SSCP erbrachte keinen Hinweis auf *EMP3*-Mutationen in Gliomen. In der Mehrheit der oligodendroglialen Tumoren fanden wir jedoch eine Hypermethylierung in der 5'-Region des *EMP3*-Gens, die signifikant mit einer erniedrigten mRNA-Expression und Verlusten auf 19q korrelierte. Astrozytome wiesen ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen reduzierter *EMP3* mRNA-Expression und Promotorhypermethylierung auf, jedoch waren diese Beobachtungen unabhängig vom 19q-Status. Eine *EMP3* Promotorhypermethylierung konnte in über 80% der diffusen oder

anaplastischen Astrozytome und sekundären Glioblastome gefunden werden. Primäre Glioblastome zeigten dagegen mehrheitlich keine *EMP3*-Hypermethylierung dafür aber eine häufige *EMP3*-Überexpression. Insgesamt scheint *EMP3* somit ein epigenetisch regulierter Tumorsuppressorgen-Kandidat auf 19q13 in Gliomen zu sein. Dies wird auch durch die Arbeiten anderer Autoren unterstützt, die über eine wachstumshemmende Wirkung von *EMP3* auf Neuroblastomzellen *in vitro* berichteten (45).

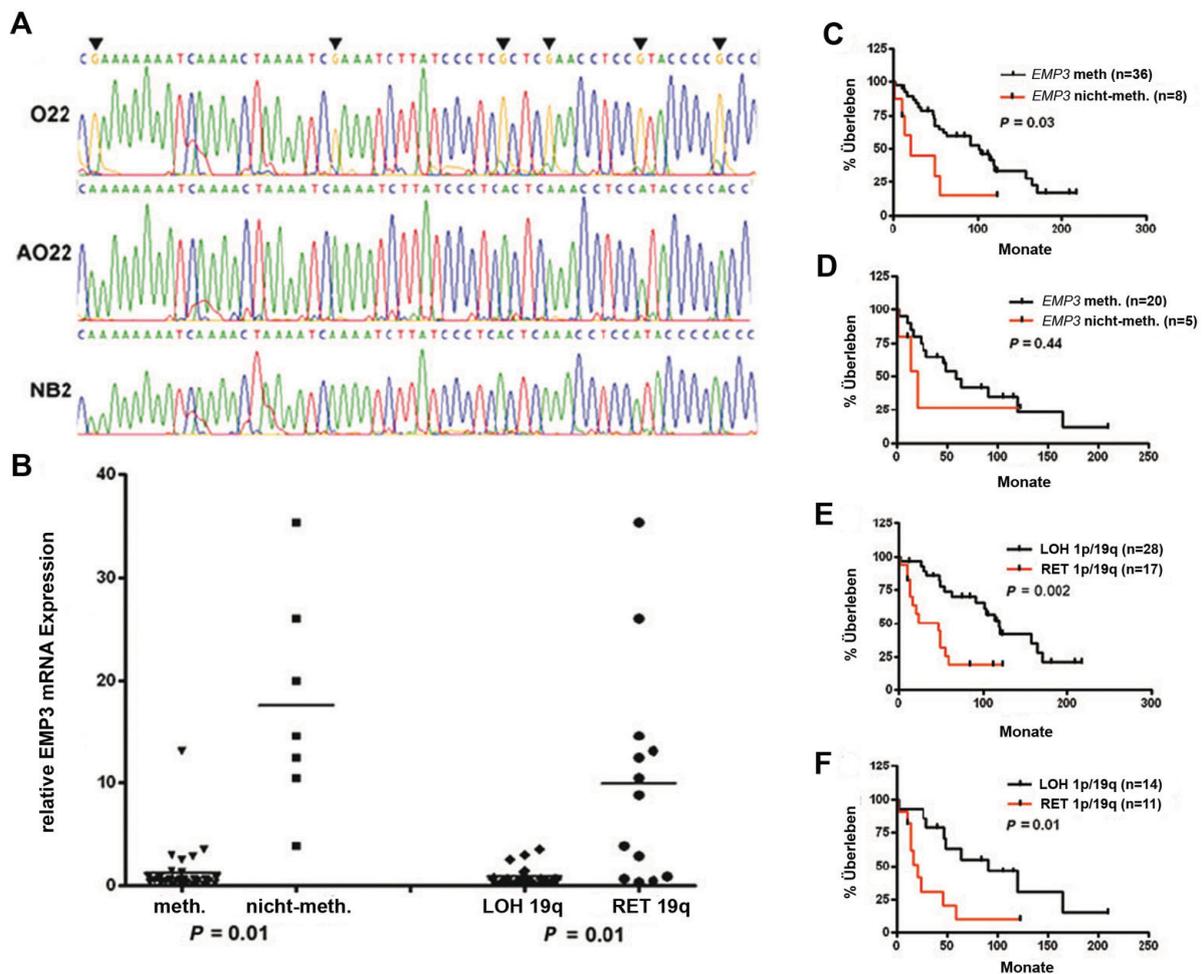


Abbildung 8. (A-B) *EMP3*-Promotorhypermethylierung und mRNA-Expressionsanalyse in oligodendroglialen Tumoren WHO-Grad II und III. (A) Sequenzbeispiele aus einem Bereich der 5'-CpG reichen Region von *EMP3* nach Natriumbisulfit-Behandlung der DNA. Die obere Sequenz zeigt den Tumor O22 mit methylierten CpG Positionen (Pfeilspitzen) und darunter den Tumor AO22 und eine nicht-neoplastische Gehirngewebskontrolle (NB2) ohne Methylierung (Dargestellt ist jeweils die reverse Sequenz von Chromosom 19, Nukleotide 53520611 bis 53520671, UCSC genome browser, Mar 2006 (hg18) assembly). (B) Dot-Plot-Diagramm der *EMP3* mRNA-Expression in oligodendroglialen Tumoren stratifiziert nach dem *EMP3* Promotermethylierungsstatus (34 Tumoren mit und 7 Tumoren ohne *EMP3* Hypermethylierung; meth., *EMP3* hypermethyliert; non-meth., *EMP3* nicht hypermethyliert) sowie nach dem Allelstatus auf 19q (27 Tumoren mit und 13 ohne Allelverluste auf 19q; LOH = Verlust der Heterozygotie; RET = Retention der Heterozygotie). Die mittlere Expression (horizontale Linien) in Tumoren mit *EMP3* Hypermethylierung bzw. Tumoren mit 19q-Verlust ist jeweils signifikant niedriger ($p = 0,01$, Student t-Test). (C-F) Kaplan-Meier Analysen

hinsichtlich *EMP3*-Hypermethylierung (**C,D**) bzw. LOH auf 1p/19q (**E,F**) und Gesamtüberleben (OS) in 21 Patienten mit WHO Grad II bzw. 25 Patient mit WHO Grad III Tumoren (**C,E**) und einer Untergruppe von 25 Tumoren mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren (**D,F**). Es zeigt sich eine signifikante Assoziation zwischen *EMP3*-Hypermethylierung bzw. LOH 1p/19q mit dem Gesamtüberleben (OS) in der Gesamtpopulation (**C,E**), sowie zwischen LOH 1p/19q und OS in der Subpopulation aus Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren (**F**), hingegen nicht in dieser Subgruppe bezüglich *EMP3*-Hypermethylierung (**D**).

Schließlich führten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ruthild Weber am Institut für Genetik der Universität Bonn an einer Subpopulation des eigenen Patientenkollektivs mit oligodendroglialen Tumoren (27) eine vergleichende Genom-weite komparative Hybridisierung (CGH) durch, um prognostisch bedeutsame genomische Aberrationen zu identifizieren (46). Für diese Untersuchung standen uns 70 Gliompatienten mit den folgenden Diagnosen zur Verfügung: 16 OII, 5 OAI, 22 AOIII und 27 AOAI. Abbildung 9 gibt einen Übersicht über die gefundenen Gewinne und Verluste in dem untersuchten Patientenkollektiv.

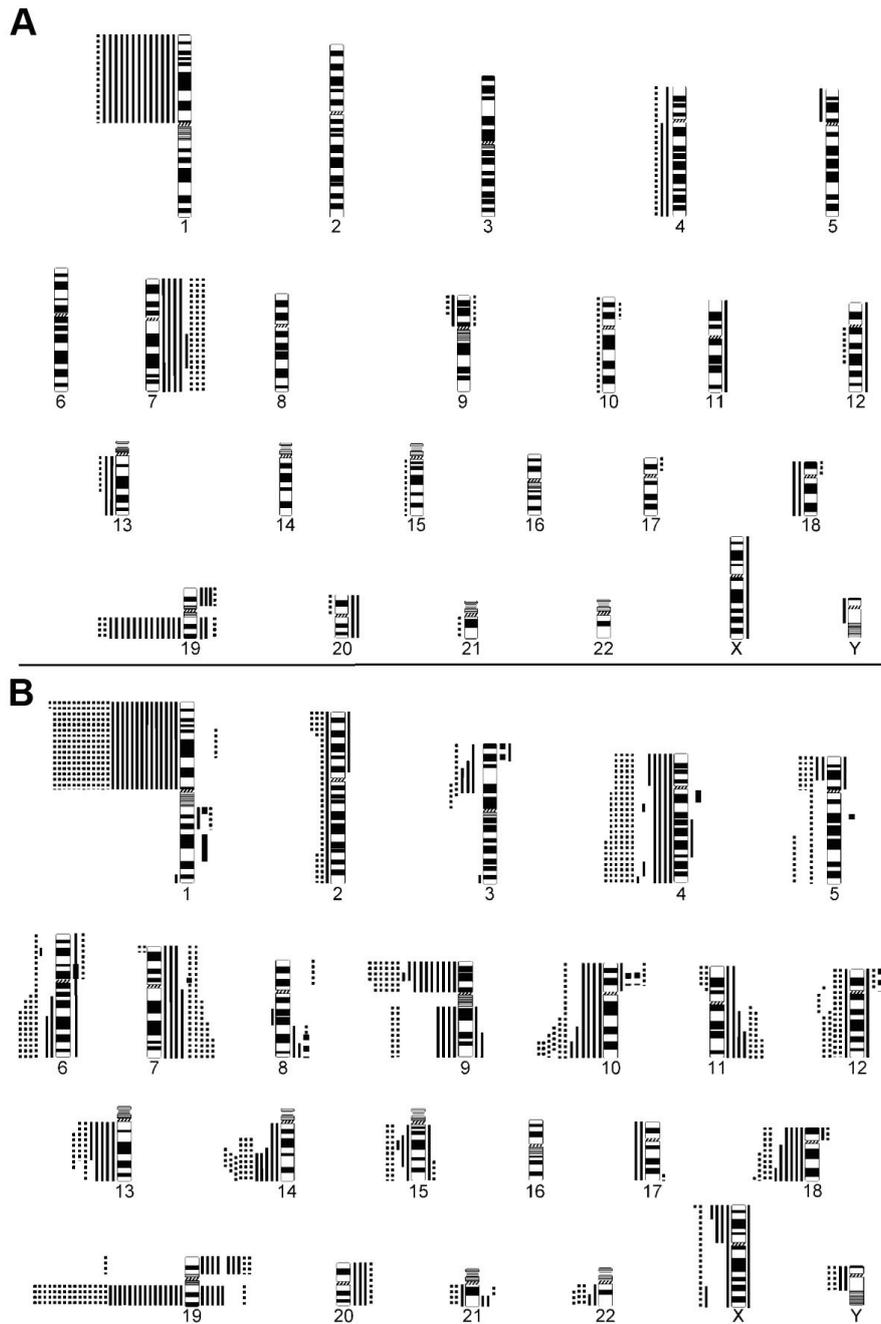


Abbildung 9. Übersicht über die mittels CGH-Analyse in 70 oligodendroglialen Tumoren gefundenen chromosomalen Gewinne und Verluste. **(A)** Ergebnisse in 21 niedriggradigen oligodendroglialen Tumoren (WHO-Grad II). Durchgezogene Linien: Oligodendrogliome (n=16); gestrichelte Linien: Oligoastrozytome (n=5). **(B)** Ergebnisse in 49 anaplastischen oligodendroglialen Tumoren (WHO-Grad III). Durchgezogene Linien, anaplastische Oligodendrogliome (n=24); gestrichelte Linien, anaplastische Oligoastrozytome (n=25). Verluste sind auf der linken, Gewinne auf der rechten Seite der chromosomalen Ideogramme aufgetragen. Hochgradige Amplifikationen sind durch fette Linien auf der rechten Seite der Ideogramme gekennzeichnet.

Als häufigste Aberrationen fanden sich Verluste auf 19q (64%), 1p (59%), 9p (26%), 4q (21%), 10q (19%), 18q (17%) und Gewinne auf 7q (24%), 19p (19%), 7p (17%). In der

univariaten Analyse erwiesen sich der kombinierte Verlust auf 1p und 19q sowie der Verlust auf 19q hinsichtlich längerem Gesamtüberleben als prognostisch signifikant. Gewinne auf 7, 8q, 19q, 20, sowie Verluste auf 9p, 10, 18q, Xp waren mit einem kürzeren Überleben assoziiert (Abb.10).

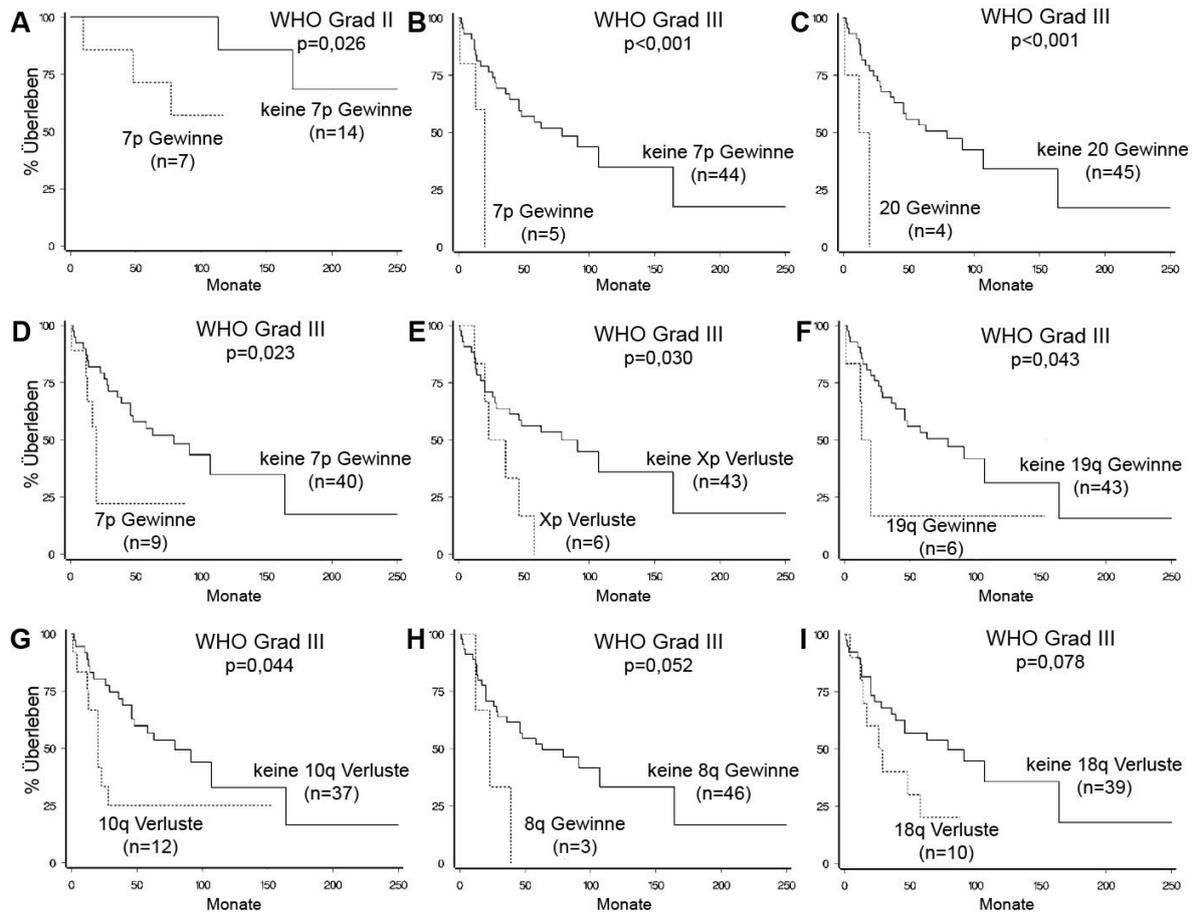


Abbildung 10. Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Monaten für ausgewählte unbalancierte genomische Aberrationen mit signifikant schlechterer Prognose in (A) 21 Patienten mit niedriggradigen oligodendroglialen Tumoren (WHO-Grad II) und (B-I) in 49 Patienten mit hochgradigen anaplastischen oligodendroglialen Tumoren (WHO-Grad III). Die in den einzelnen Abbildungen angegebenen p-Werte beziehen sich auf Ergebnisse von Logrank-Testungen.

Die im Anschluss durchgeführte multivariate Analyse identifizierte die nachfolgend aufgeführten Aberrationen als prognostisch ungünstig:

Tabelle 2. Ergebnisse der multivariaten Analysen. Aufgeführt sind die prognostisch ungünstigen Faktoren für das Gesamtkollektiv (WHO-Grad II und III) sowie für die Patienten mit WHO-Grad III Gliomen.

Tumoren	Parameter	Schätzwert	Standardabweichung	Odds Ratio	95% CI
WHO-Grad II + III (n=70 Patienten)	WHO-Grad	2,074	0,569	7,96	2,61-24,28
	Gewinne auf 7p	1,813	0,483	6,13	2,38-15,80
	Verluste auf 9p	0,955	0,391	2,60	1,21-5,59
WHO-Grad III (n=49 Patienten)	Gewinne auf 7p	2,328	0,622	10,26	3,03-34,75
	Gewinne auf 8q	1,619	0,622	5,05	1,38-18,48
	Verluste auf 18q	1,118	0,458	3,06	1,25-7,50

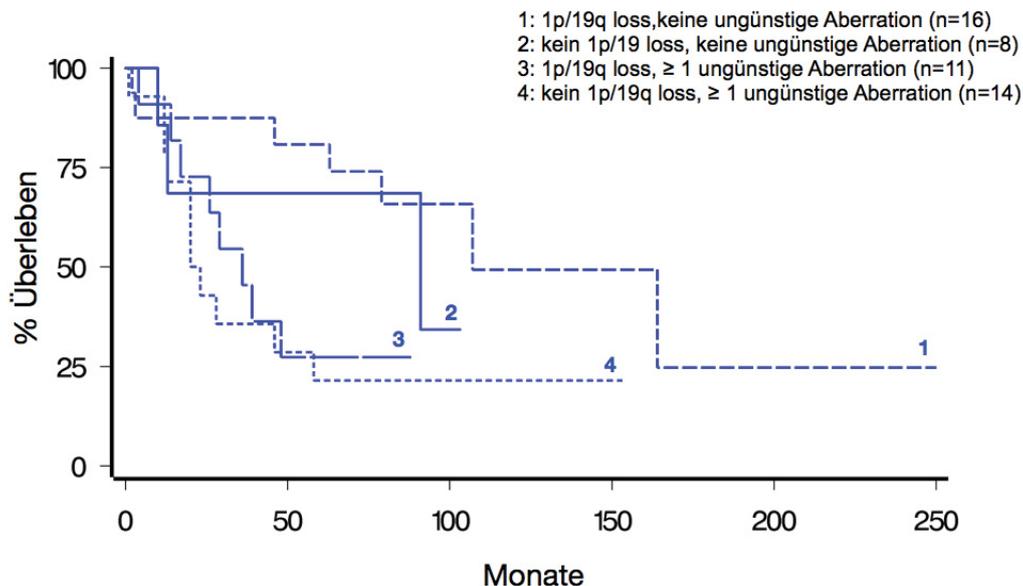


Abbildung 11. Kaplan-Meier-Kurven für 49 Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren (WHO-Grad III) stratifiziert nach den in der Abbildung genannten vier molekularen Subgruppen. Den günstigsten Verlauf zeigen Patienten, deren Tumoren 1p/19q-Deletionen aber keine der univariat prognostisch ungünstigen Alterationen aufweisen (Gruppe 1), während Patienten, deren Tumoren mindestens eine der prognostisch ungünstigen Alterationen zeigen (Gruppe 3 und 4), eine deutlich schlechtere Prognose haben, selbst wenn die Tumoren eine 1p/19q-Deletion aufweisen (Gruppe 3).

Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren und einem oder mehreren prognostisch ungünstigen genomischen Aberrationen wiesen unabhängig vom 1p/19q-Status einen signifikant ($p=0,037$) ungünstigeren Verlauf auf (Abb.11). Das Gesamtüberleben der einzelnen molekular definierten Gruppen betrug: 107 Monate (Gruppe 1: 1p/19q LOH, keine prognostisch ungünstige Aberration), 91 Monate (Gruppe 2: kein 1p/19 LOH, keine prognostisch ungünstige Aberration), 36 Monate (Gruppe 3: 1p/19q LOH, ≥ 1 prognostisch ungünstige Aberration) und 21,5 Monate (Gruppe 4: kein 1p/19q LOH, ≥ 1 ungünstige prognostisch Aberration) (vgl. Abb. 11).

Zusammenfassend konnten wir eine Anzahl von unabhängigen genomischen Aberrationen identifizieren, die mit einem verkürzten Gesamtüberleben in oligodendroglialen Tumoren assoziiert sind. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, dass unabhängig von 1p/19q-Status auch weitere in dieser Arbeit identifizierte molekulare Marker mit prognostisch ungünstiger Assoziation untersucht werden sollten, um eine umfassendere prognostische Aussage für Patienten mit oligodendroglialen Tumoren machen zu können.

Während Cairncross et al. initial noch davon ausgingen, dass oligodendrogliale Tumoren mit 1p/19q-Verlusten selektiv besser auf PCV-Chemotherapie ansprechen (14) konnte bald gezeigt werden, dass auch Patienten, die nur mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, ein längeres Überleben aufwiesen, wenn sie Tumoren mit diesem molekularen Marker hatten (47). Dies wurde in drei unabhängigen, prospektiven Studien (13, 15, 24) bestätigt. In der RTOG Studie (13) mit 289 Patienten wurden 4 Zyklen PCV als neoadjuvantes Dosis-intensiviertes Schemata gegeben, wohingegen in der EORTC Studie (15) mit 368 Patienten 6 Zyklen PCV-Chemotherapie nach der Bestrahlung gegeben wurde. Der Kontrollarm erhielt in beiden Studien lediglich Strahlentherapie. Unabhängig davon, ob die Patienten primär kombiniert behandelt oder nur radiotherapiert wurden, erwies sich der Verlust von 1p und 19q in beiden Studien als hochsignifikanter prognostischer Marker. Zu einem ähnlichen Ergebnisse kam auch die NOA-04 Studie der Neuroonkologischen Arbeitsgemeinschaft (NOA) an 318 Patienten mit anaplastischen Gliomen (WHO-Grad III). In dieser Studie erhielten die Patienten primär entweder eine alleinige Radiotherapie oder eine alleinige Chemotherapie (Temozolomid oder PCV). Im Rezidiv wurden die primär radiotherapierten Patienten dann mit einer Chemotherapie behandelt und *vice versa*. Auch in der NOA-04 Studie erwies sich der Verlust von 1p und 19q als Therapie-unabhängiger

prognostischer Marker. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der initialen Behandlung Patienten, deren Tumoren einen methylierten *MGMT*-Promotor oder eine *IDH1* Mutation aufwiesen, signifikant länger überlebten (24).

Die genannten Ergebnisse können allerdings die Frage nicht klären, ob 1p/19q-Verluste einen prognostischen Marker darstellen, der unabhängig von der Art der Therapie ist, oder ob es sich um einen prädiktiven Marker handelt, der nur dann mit einem längeren Überleben assoziiert ist, wenn die Patienten mit einer zytotoxischen Therapie, d.h. Radio- und/oder Chemotherapie, behandelt werden. Zur Beantwortung dieser Frage wäre der Zeitraum von der 1. Operation bis zum 1. Rezidiv bei Patienten mit und ohne adjuvante Therapie zu analysieren. Dieser Ansatz birgt allerdings ethische Probleme in sich, da zumindest bei anaplastischen Gliomen eine adjuvante Radio- oder Chemotherapie als Standardtherapie gilt, auf die im Regelfall nicht verzichtet werden kann. Auf der anderen Seite erhalten Patienten mit WHO-Grad II Gliomen in der Regel nach der ersten Resektion keine adjuvante Therapie, so dass eine prospektive Untersuchung zu dieser Fragestellung schwierig ist. In einer retrospektiven Untersuchung von Patienten des deutschen Gliomnetzwerkes (48) zeigten sich keine Unterschiede im Progressions-freien Intervall bei Patienten mit oligodendroglialen Tumoren mit bzw. ohne kombinierten 1p/19q-Verlust, wenn keine adjuvante Therapie gegeben wurde. Dies würde dafür sprechen, dass 1p/19q-Verluste nur dann von prognostischer Bedeutung sind, wenn die Patienten zusätzlich zur Operation noch eine adjuvante zytotoxische Therapie erhalten, was, wie gesagt, die Standardtherapie bei Patienten mit anaplastischen Gliomen ist.

2.3 Bedeutung des *MGMT*-Gens in Glioblastomen

Der folgende Abschnitt berichtet über die Ergebnisse der eigenen Arbeiten, die sich mit der Bedeutung des *MGMT*-Gens in Glioblastomen beschäftigen. Insbesondere wird die *MGMT*-Promotormethylierung mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP), die nach wie vor als Goldstandard gilt, mit alternativen Analyseverfahren verglichen und die Ergebnisse mit anderen genetischen Aberrationen und klinischen Parametern im Sinne eines translationalen Forschungsansatzes korreliert.

Die Resistenz gegenüber Chemotherapie stellt ein Hauptproblem bei der Behandlung von Glioblastompatienten dar (vgl. Übersicht in Kaina et al. (49)). Die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*) ist ein DNA-Reparaturenzym, das Alkyl-Gruppen von der O6-Position des Guanins entfernen kann. Diese O6-Position des Guanins stellt die am häufigsten betroffene Position der DNA-Alkylierung durch alkylierende Chemotherapeutika dar. Die Expression von *MGMT* schützt gesunde Zellen vor karzinogener Alkylierung, aber sie schützt auch Tumorzellen vor alkylierenden Chemotherapeutika. Die Methylierung des *MGMT*-Promotors begünstigt die Bindung von Methyl-CpG-binding-Proteinen wie Methyl-CpG-binding protein2 (MeCP2) und Methyl-CpG-binding domain protein (MBD2). Dies führt über Alterationen der Chromatinstruktur zur Behinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren und damit zum sogenannten Gensilencing. Die klinische Bedeutung des epigenetischen *MGMT*-Silencings wurde erstmals bei Patienten mit anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) und Glioblastomen (WHO-Grad IV) unter Nitrosourea-Chemotherapie beschrieben, die ein längeres Überleben zeigten, wenn sie Tumoren mit einer *MGMT*-Promotormethylierung hatten (50).

Für Jahrzehnte waren die neurochirurgische Tumorresektion und die postoperative Strahlentherapie die Eckpunkte der Glioblastomtherapie. Alter, Karnofsky-Performance-Scale (KPS) und das Resektionsausmaß waren anerkannte prognostische Parameter für alle häufigen Gliomentitäten einschließlich der Glioblastome. Chemotherapie erwies sich mehrheitlich als wenig effektiv, bis zur Einführung von Temozolamid. In der EORTC 26981-22981 NCIC CE.3 Studie (51) wurde erstmals im Rahmen einer prospektiven, randomisierten Phase III-Studie der positive Effekt von Temozolamid in der Primärbehandlung von Glioblastompatienten nachgewiesen, d.h. es zeigte sich eine

Verlängerung des medianen Überlebens unter kombinierter Radiochemotherapie mit Temozolamid im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie von 12,1 Monate auf 14,6 Monate. Die 2-Jahre Überlebenszeit stieg unter kombinierter Therapie von 10% auf 26%. In einer nachfolgenden Arbeit an einem Teilkollektiv dieser Studie wurde dann nachgewiesen, dass Patienten, deren Tumoren einen methylierten *MGMT*-Promotor zeigten, einen wesentliche stärkeren Nutzen von der Temozolamid-Therapie hatten als die Patienten, deren Tumoren keine *MGMT*-Promotormethylierung hatten (36). In 45% der untersuchten Glioblastome ließ sich eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung nachweisen und die entsprechenden Patienten zeigten ein medianes Überleben von 21,7 Monaten im Vergleich zu 15,3 Monaten für Patienten mit Tumoren ohne *MGMT*-Promotormethylierung. Die 2-Jahre Überlebensrate stieg von 23% auf 46%. Durch die EORTC 26981-22981 NCIC CE.3 Studie wurde die derzeit gültige Standardtherapie des Glioblastoms, bestehend aus Tumorresektion gefolgt von Radiotherapie mit konkomitanter und adjuvanter Temodal-Behandlung, definiert (51). Der positive Effekt dieser Therapie insbesondere bei Patienten mit *MGMT*-methylierten Tumoren wurde kürzlich auch im Langzeitverlauf mit Auswertung der 5-Jahre-Überlebensraten der Patienten der EORTC 26981-22981 NCIC CE.3 Studie bestätigt (52).

Die Bedeutung des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus in anderen Gliomentitäten sei hier nur kurz aufgeführt. In niedriggradigen Gliomen (WHO-Grad II) ist eine prognostische Bedeutung nicht hinreichend belegt. Hier gibt es widersprüchliche Ergebnisse an zumeist sehr kleinen, retrospektiven Patientenkohorten, die teilweise eine prognostisch günstige (53), teilweise aber auch eine ungünstige Rolle nahelegt (vgl. die Übersichtsarbeit von Weller et al. (54)). In Patienten mit anaplastischen Gliomen ist die *MGMT*-Promotormethylierung ein prognostisch günstiger Parameter und zwar unabhängig von der Art der Behandlung, d.h. Radiotherapie, Chemotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie (24, 55).

Einen kritischen und nach wie vor kontrovers diskutierten Sachverhalt stellt die Technik bzw. Methode dar, mit der im klinischen Alltag der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors bestimmt wird. Als Standard gilt nach wie vor die methylierungsspezifische-PCR-Analyse (MSP) unter Verwendung eines Primer-Sets, das auf den Arbeiten von Esteller et al. (1999) bzw. Hegi et al. (2005) basiert (36, 56). Aber auch andere methodische Ansätze wie die DNA-Pyrosequenzierung, real-time RT-PCR-basierte Expressionsanalysen, Nachweis der

Proteinexpression mittels Immunhistochemie oder Western-Blot sowie enzymatische Aktivitätsassays stellen prinzipiell alternative Methoden dar (vgl. die Übersichtsarbeit von Weller et al. (54)).

Ziel der nachfolgend vorgestellten eigenen Untersuchungen (57) war es, die MSP als etabliertes und international akzeptiertes Analyseverfahren mit anderen Methoden auf ihre Zuverlässigkeit hin zu vergleichen. Neben der MSP wurden die sog. „combined bisulfite restriction analysis“, COBRA, eine „primer extension- and denaturing high-performance liquid chromatography-basierte Methode SIRPH (SNuPE ion pair-reverse phase high-performance liquid chromatography) und die DNA-Pyrosequenzierung untersucht. Zunächst wurde mittels Natriumbisulfit-Direktsequenzierung das Methylierungsprofil des *MGMT*-Promotors in 22 Glioblastomen und 3 nicht-neoplastischen Gehirngewebsproben bestimmt. Daran anschließend wurden die Regionen identifiziert, die am besten zwischen methyliertem und unmethyliertem *MGMT*-Promotor diskriminieren konnten. Diese Daten wurden verwendet um optimale Primer für die zu untersuchenden Methoden COBRA, SIRPH und Pyrosequenzierung herzustellen. Im Anschluss wurden alle 3 Verfahren hinsichtlich Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit an den bereits gut charakterisierten Tumorproben validiert. Dabei zeigte sich die Pyrosequenzierung als beste und sensitivste Methode, die zusätzlich robust und einfach anzuwenden ist und darüber hinaus noch quantitative Ergebnisse im Vergleich zu der nicht-quantitativen MSP-Methode liefert (57).

In einer neueren Arbeit (58), deren Ergebnisse weiter unten noch ausführlicher besprochen werden, konnten wir zeigen, dass die MSP und Pyrosequenzierung konkordante Ergebnisse liefern. Dunn et al. (59) berichtete, dass abhängig vom Ausmaß der *MGMT*-Promotormethylierung eine Assoziation zur Prognose besteht, wenn mehr als 29% methylierte Allele vorliegen. Als cut-off für den Nachweis einer *MGMT*-Promoter-Methylierung wurde in dieser Arbeit ein Wert von 9% methylierter Allele vorgeschlagen, was gut zu dem in den eigenen Untersuchungen verwendeten Schwellenwert von 8% passt (58). Neben der Frage des besten Schwellenwertes muss nach wie vor auch die Frage, welche Region des *MGMT*-Promotors den tatsächlich höchsten prädiktiven bzw. prognostischen Stellenwert hat, in weiterführenden Studien genauer untersucht werden.

Eine weitere wichtige Fragestellung betrifft die Möglichkeit der Durchführung von *MGMT*-Promotormethylierungsanalysen an sehr kleinen Gewebeproben sowie das Problem

der potentiellen regionalen Heterogenität der *MGMT*-Promotormethylierung in malignen Gliomen. In der Neuroonkologie werden vermehrt mittels stereotaktisch geführter Navigation kleine Gewebeproben von maximal 1 mm³ zur Diagnosesicherung und weiteren Therapieplanung entnommen, die unter der Voraussetzung von repräsentativ entnommenen Gewebeproben in der Regel eine zuverlässige histologische Diagnose ermöglichen. Inwieweit die *MGMT*-Promotormethylierung und die Protein-Expression in solchen kleinen seriell entnommen Gewebeproben variiert und ob beide Analyseverfahren miteinander korrelieren, wurde in einer gemeinsamen Arbeit mit Kollegen der Neurochirurgischen Klinik und des Instituts für Neuropathologie der Ludwig Maximilians-Universität München im Rahmen des Deutschen Gliomnetzwerkes untersucht (60). Hierzu wurden von 25 Patienten mit malignen Gliomen (16 pGBIV, 4 primäre AAIII, 2 sGBIV, 3 sekundäre AAIII) zwischen 2 und 4 Biopsieproben von unterschiedlichen Tumorregionen untersucht. Der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus wurde an insgesamt 69 Gewebeproben mittels MSP (56) und Natriumbisulfit-Sequenzierung (30) bestimmt. Beide Analyseverfahren zeigten eine 100%ige Konkordanz. Die *MGMT*-Promotormethylierungsrate betrug in den primären Gliomen 30% und in den sekundären Gliomen 80%. Innerhalb der untersuchten Tumorproben eines Patienten waren bei 24 Patienten übereinstimmende Ergebnisse zu detektieren. Nur in einem Patienten ergaben sich diskordante Befunde zwischen unterschiedlichen Proben, die auf ein durch Gewebnekrosen verursachtes falsch negatives Ergebnis in einer Probe erklärt werden konnten. Zur Bestimmung der *MGMT*-Proteinexpression mittels Immunhistochemie (30) standen von 13 Tumoren geeignete stereotaktischen Gewebeproben zur Verfügung. Die einzelnen Proben eines Patienten zeigten jeweils gleiche bzw. annähernd gleiche Expressionlevels, wobei eine Korrelation mit dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus nicht nachgewiesen werden konnte.

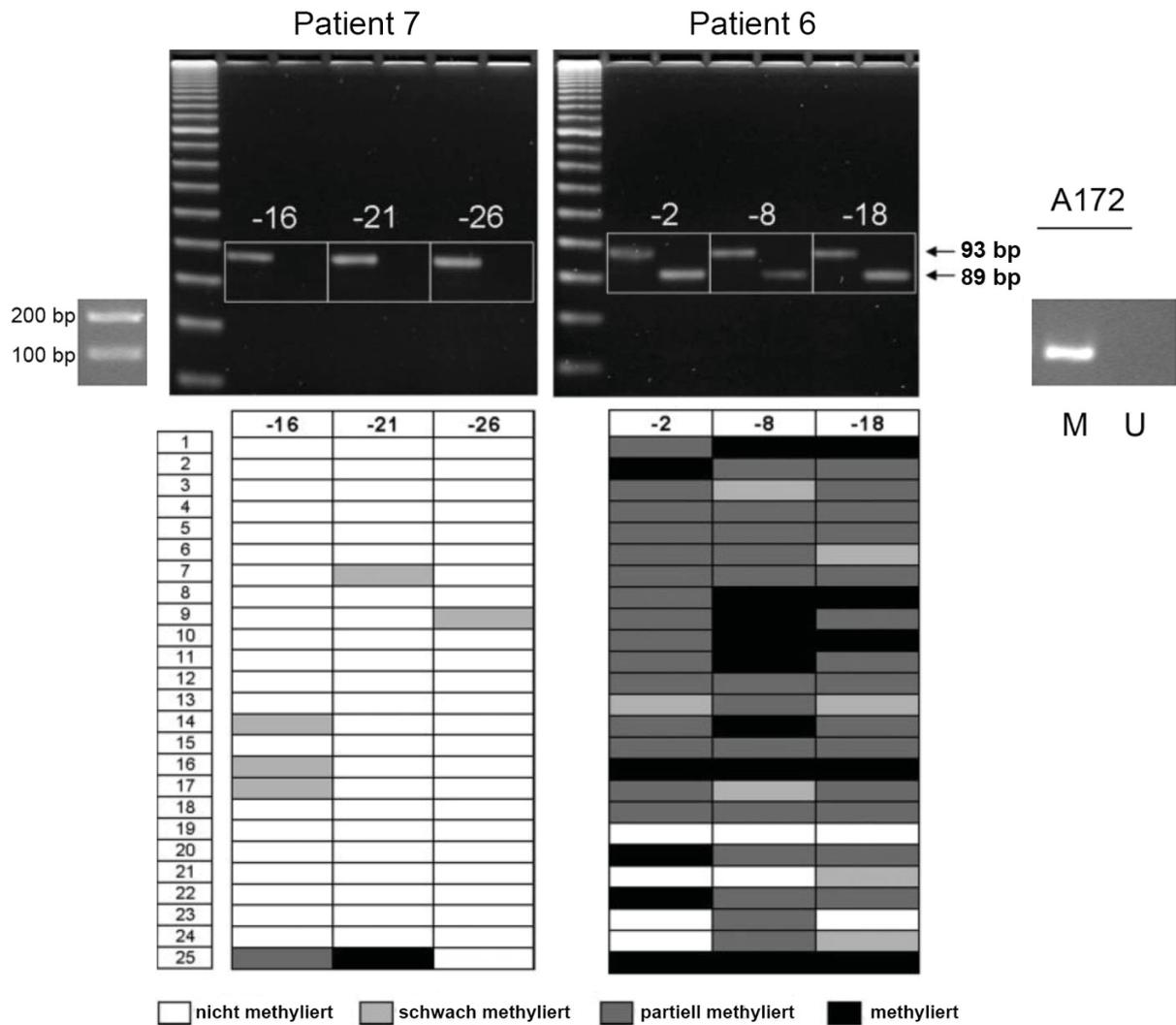


Abbildung 12. Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse von jeweils 3 Proben von 2 Glioblastompatienten (**Links:** Pat-ID: 7 ohne *MGMT*-Promotorhypermethylierung und **rechts** Pat.-ID: 6 mit *MGMT*-Promotorhypermethylierung). Die **oberen** Abbildungen zeigen die Ergebnisse der MSP, wobei das 93 bp-Fragment das unmethylierte und das 89bp-Fragment die methylierten PCR-Produkte darstellen. Die Zahlenangaben oberhalb der Banden geben die Lokalisation der Stereotaxieproben relativ zum Zielpunkt in mm an. In allen 3 Proben von Patient 7 ist ein unmethyliertes PCR-Produkt nachweisbar, wohingegen das methylierte PCR-Produkt nur rechts in Proben von Patient 6 nachweisbar ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der MSP sind im unteren Bereich der Abbildung die Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung dargestellt. Die Nummern links kennzeichnen die einzelnen sequenzierten CpG-Dinukleotide.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Untersuchungen somit dafür, dass die Verteilung der *MGMT*-Promotormethylierung innerhalb eines Tumors homogen ist und somit die Bestimmung des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus in kleinen stereotaktisch gewonnenen Gewebeproben als repräsentativ angesehen werden kann. Die immunhistochemische Bestimmung der *MGMT*-Proteinexpression erscheint dagegen als Biomarker für die Routinediagnostik weniger geeignet (60). Dieser Befund bestätigte sich

auch in einer anderen Arbeit (61), deren dezidiertes Ziel es war, die Aussagekraft der immunhistochemischen MGMT-Bestimmung im Detail zu überprüfen. Hierzu wurde an einem Subkollektiv von 164 Glioblastompatienten der EORTC 26981-22981/NCIC CE.3-Studie (36) ein Gewebemikroarray (TMA) angefertigt, um die Zuverlässigkeit der immunhistochemischen MGMT-Bestimmung zu untersuchen. Dazu wurden in unserem Institut diese TMAs mit zwei kommerziell erhältlichen Antikörpern (Klon MT3.1 und MT23.2) gefärbt. Die immunhistochemischen Befunde wurden semiquantitativ durch 4 Neuropathologen aus 3 Instituten nach standardisierten Kriterien jeweils in einem Abstand von 3 bis 6 Wochen zweimal ausgewertet.

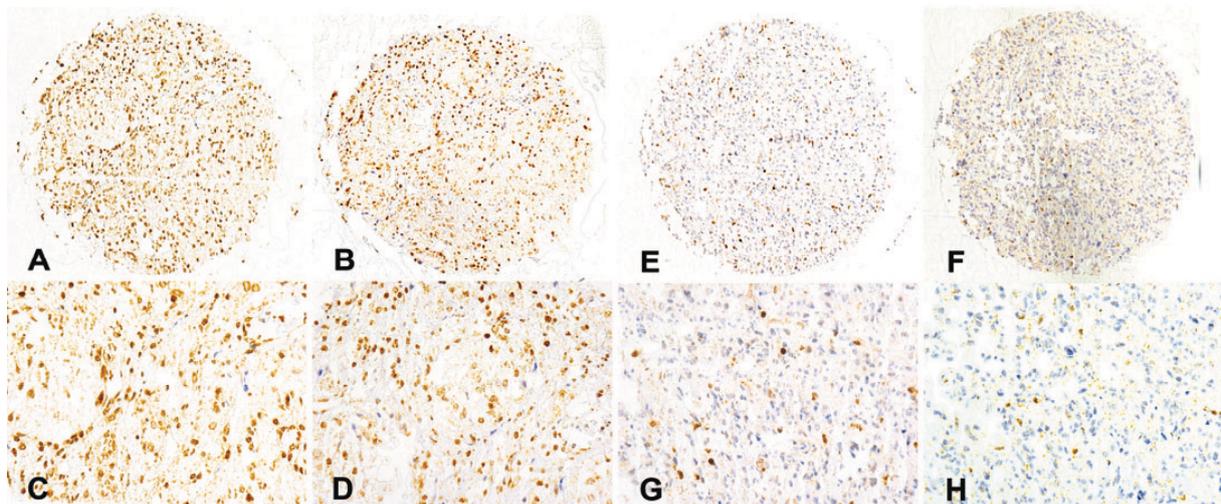


Abbildung 13. Immunhistochemische Ergebnisse mit 2 unterschiedlichen Antikörpern gegen MGMT. (A-D) Abbildung einer Probe des TMA. Klon MT3.1 (A,C) und Klon MT23.2 (B,D); Beide Antikörper zeigen in der Mehrheit eine nukleäre Positivität der Tumorzellkerne. (E-H) Abbildung einer anderen Probe des TMA. Klon MT3.1 (E,G) und Klon MT23.2 (F,H); Beide Antikörper zeigen eine nukleäre Positivität in einer Minderheit der Tumorzellkerne. Vergrößerung: x10 (A,B,E,F) und x40 Vergrößerung (C,D,G,H).

Die individuelle Übereinstimmung aus den einzelnen Auswertung der jeweiligen Untersucher zeigte eine sehr hohe Reproduzierbarkeit. Allerdings fand sich eine deutliche Variation zwischen den einzelnen Untersuchern. Die immunhistochemisch bestimmte MGMT-Expression unabhängig von dem verwendeten Antikörper zeigte keine signifikante Korrelation mit dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und auch keine Assoziation mit dem Überleben, so dass aus unserer Untersuchung der Schluss gezogen werden muss, dass die immunhistochemische Bestimmung von MGMT nicht als klinischer Biomarker in die

Routinediagnostik von Gliomen zu verwenden ist, wie sich dies auch schon in der zuvor dargestellten Arbeit (60) abgezeichnet hatte.

Wie bereits vorher ausgeführt, hat sich der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus als bedeutender molekulare Marker hinsichtlich Prognose und Ansprechen auf alkylierende Chemotherapie bei Patienten mit einem Glioblastom etabliert. Der mögliche Zusammenhang dieses Markers zu anderen bekannten molekularen Markern und deren klinische Signifikanz war dagegen noch weitgehend unbekannt, und wurde daher eingehend von uns untersucht (62). In einer Kohorte von 67 Patienten mit neu diagnostizierten primären Glioblastomen (WHO-Grad IV), die alle standardisiert nach der Tumorresektion eine Strahlentherapie und adjuvante Chemotherapie mit Temozolamid erhielten, wurden hierfür folgende molekulare Parameter bestimmt:

MGMT-Promotormethylierung mittels MSP, *MGMT* mRNA-Expression mittels real-time-RT-PCR und *MGMT* Protein-Expression mittels Immunhistochemie. Des Weiteren wurden 7 bekannte *MGMT*-Polymorphismen untersucht, da es in der Literatur Hinweise gab, dass einige Polymorphismen mit einem erhöhten Tumorrisiko, u.a. in Gliomen (63) sowie mit der *MGMT*-Promotormethylierung in kolorektalen Karzinomen (64) assoziiert sind. Inwieweit diese Beobachtungen auch für das Therapieansprechen und die Prognose von Glioblastomen von Relevanz sind, wurde bislang nicht untersucht und stellt in der hier vorgestellten Arbeit ein wesentliches Novum dar. Zusätzlich wurden weitere bekannte genetische Alteration, darunter Amplifikationen der Gene *EGFR*, *PDGFRA*, *CDK4* und *MDM2*, *TP53*-Mutationen sowie Allelverluste auf den Chromosomen-Armen 1p, 10q und 19q bestimmt.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die Gewebeaufbereitung für die Ergebnisse der *MGMT* MSP-Analyse von Bedeutung ist. Hierfür wurde von mehreren Patienten, von denen sowohl bei -80°C tiefgefrorenes Tumorgewebe als auch Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Tumorgewebe der gleichen Operation verfügbar war, eine MSP mit der jeweils aus den beiden unterschiedlichen Proben extrahierten DNA durchgeführt. Wie in Abb. 14 dargestellt, ist es mit der MSP möglich, vergleichbare Ergebnisse sowohl mit aus Paraffin-Material als auch aus Frischgewebe isolierter DNA zu erzielen, so dass der routinemässigen Verwendung von DNA aus Paraffinmaterial nichts entgegen spricht.

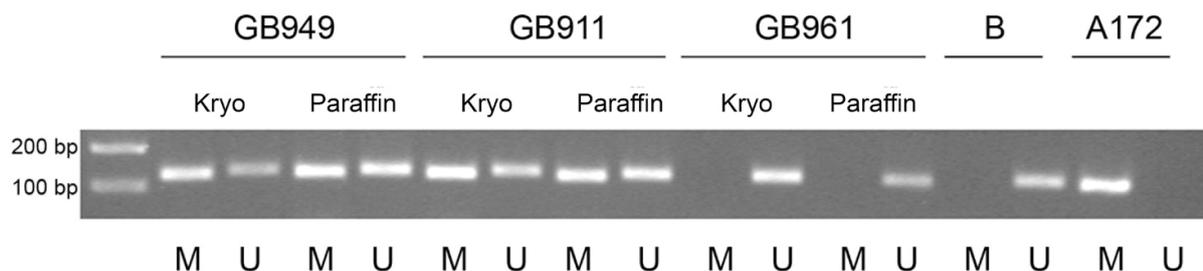


Abbildung 14. MSP-Ergebnisse von 3 unterschiedlichen Glioblastomen (GB949, GB911 und GB961) jeweils durchgeführt mit extrahierter DNA aus Frischgewebe (Kryo) und Paraffin-eingebettetem Gewebe (Paraffin). Unabhängig von der verwendeten DNA zeigen alle Proben identische Ergebnisse. M, PCR mit Primern für die methylierte *MGMT*-Promotorsequenz; U, PCR mit Primern für die nicht-methylierte *MGMT*-Promotorsequenz. B, Negativ-Kontrolle mit DNA aus Blutleukozyten; A172, DNA der Gliomzelllinie A172 als Positivkontrolle für die *MGMT* Promotmethylierung.

Wie weiter oben bereits ausgeführt wurde, ergaben eigene Untersuchungen, dass die immunhistochemische Bestimmung der *MGMT*-Expression nicht mit dem *MGMT* Promotormethylierungsstatus korreliert und keine zuverlässige bzw. prognostisch bedeutsame Aussagen in Gliomen erlaubt (60, 61). Eine mögliche Ursache für die fehlende Korrelation von Immunhistochemie und MSP stellt dabei die Kontamination des Tumorgewebes u.a. durch Mikrogliazellen dar. Wir haben daher erstmals systematisch diese Kontamination mittels ergänzend durchgeführter immunhistochemischer Färbung gegen CD68, einem Marker für Mikroglia und Makrophagen, berücksichtigt und die Fraktion CD68-gefärbter Zellen mit dem Anteil der *MGMT*-positiven Zellen verglichen und so versucht, die Wahrscheinlichkeit von durch Mikroglia-kontamination bedingten, falsch positiven immunhistochemischen Ergebnissen zu reduzieren.

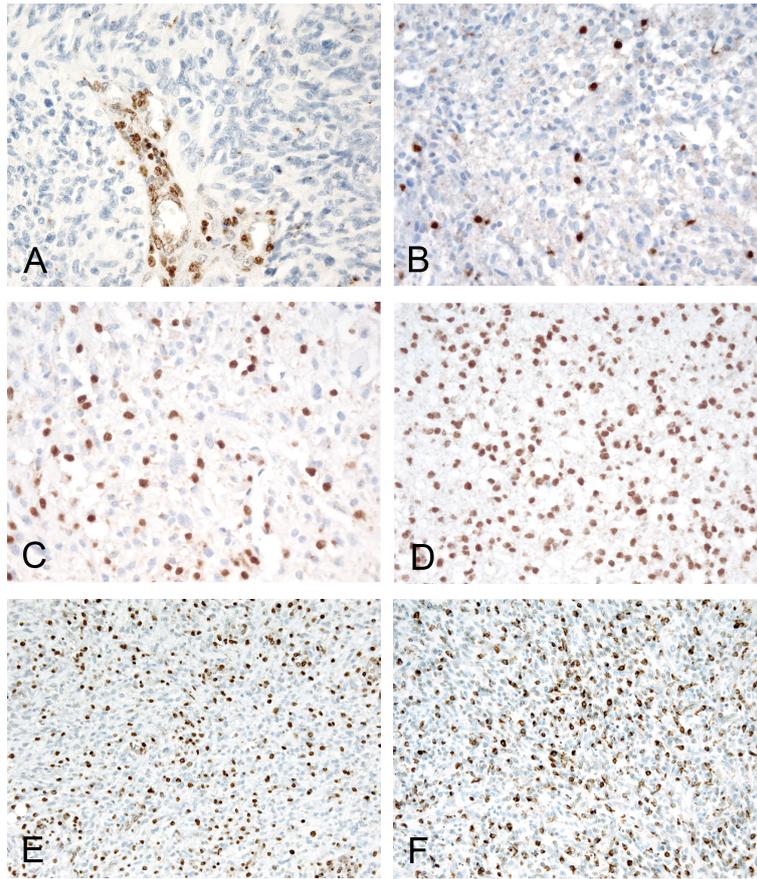


Abbildung 15. (A-D) Repräsentative Aufnahmen zur Illustration der semiquantitativen Auswertung der immunohistochemischen Untersuchungen zur Expression des MGMT-Proteins in Glioblastomen. **A**, Glioblastom ohne positive Tumorzellen (GB973). Lediglich die Gefäßendothelien, als interne positiv-Kontrolle sind markiert. **B**, Glioblastom mit weniger als 10% positiven Tumorzellen (GB958). **C**, Glioblastom mit 10–50% positiven Tumorzellen (GB10E). **D**, Glioblastom mit mehr als 50% positiven Tumorzellen (GB875). Es wurden nur Zellen mit Kernanfärbung als positiv gewertet. (E-F) Immunhistochemische Färbungen für MGMT und CD68 auf entsprechenden Schnittstufen eines Glioblastoms (GB946) mit nachgewiesener MGMT-Promotormethylierung in der MSP. Die meisten MGMT-positiven Zellen (E) entsprechen einer dichten Infiltration aus CD68-positiven Mikrogliazellen (F). Alle Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt. (ursprüngliche mikroskopische Vergrößerungen: A-D, 400x, E-F, 200x)

Auch nach Korrektur der CD68-positiven Mikrogliazellen erbrachte die immunohistochemische MGMT-Bestimmung allerdings keine signifikante Assoziationen mit den Ergebnissen der MSP-Analysen (s. Abb.15 E und F) und dem Gesamtüberleben der Patienten. Allerdings konnte in *MGMT* Promotormethylierten Glioblastomen eine signifikant niedrigere *MGMT* mRNA-Expression nachgewiesen werden als in unmethylierten Glioblastomen, wobei in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in der Arbeit von Preusser et al. (65) weder die immunohistochemische MGMT-Bestimmung, noch die *MGMT* mRNA-Bestimmung geeignet erscheint, die MSP als Methode der Wahl in der molekularen Diagnostik von Gliomen zu ersetzen. Die nachfolgende Tabelle 3 gibt einen Überblick über

die Ergebnisse der an der eigenen Kohorte von 66 Glioblastompatienten erzielten molekularen Ergebnisse.

Tabelle 3. Zusammenfassung der molekularen und immunhistochemischen Ergebnisse und deren Bedeutung für das Progressions-freie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) von Glioblastompatienten. n.d., nicht durchgeführt; *, p-Wert bestimmt mittels log-rank Test, Signifikanzniveau: $p < 0,05$; **, MGMT- Proteinexpression ohne Korrektur der Mikrogliakontamination; ***, MGMT-Proteinexpression mit Korrektur der CD68-positiven Mikrogliakontamination; fett, signifikante Werte.

Molekulare Parameter	Anzahl Patienten	Prozent	p-Wert*	
			PFS	OS
<i>MGMT</i> Promotormethylierung (MSP)	26/66	39 %	0,0001	4
Verminderte <i>MGMT</i> mRNA Expression	9/23	39 %	0,023	0,093
<i>MGMT</i> Protein Expression**	> 50%	11/61	17 %	0,975
	10-50%	20/61	36 %	
	< 10%	16/61	24 %	
	negativ	14/61	22 %	
<i>MGMT</i> Protein Expression***	> 50%	7/58	12 %	0,517
	10-50%	11/58	19 %	
	< 10%	20/58	34 %	
	negativ	20/58	34 %	
<i>MGMT</i> c.-56C>T Polymorphismus	6/61	10 %	0,332	0,866
<i>MGMT</i> c.159C>T Polymorphismus	14/65	22 %	0,524	0,828
<i>MGMT</i> c.195G>C Polymorphismus	0/65	0 %	n.d.	n.d.
<i>MGMT</i> c.250C>T Polymorphismus	14/65	22 %	0,524	0,828
<i>MGMT</i> c.427A>G Polymorphismus	3/62	5 %	0,684	0,045
<i>MGMT</i> c.478G>A Polymorphismus	0/62	0 %	n.d.	n.d.
<i>MGMT</i> c.533A>G Polymorphismus	3/62	5 %	0,684	0,045
<i>CDK4</i> Amplifikation	7/64	11 %	0,349	0,746
<i>MDM2</i> Amplifikation	5/65	8 %	0,172	0,493
<i>PDGFRA</i> Amplifikation	1/65	2 %	n.d.	n.d.
<i>EGFR</i> Amplifikation	26/66	39 %	0,522	0,90
<i>TP53</i> Mutation	13/65	20 %	0,061	0,397
LOH auf 1p	4/45	9 %	0,697	0,032
LOH auf 19q	8/45	18 %	0,187	0,918
LOH auf 1p und 19q	1/45	2 %	0,902	0,211
LOH auf 10q	31/44	70 %	0,434	0,513

Mit einer Methylierungsrate des *MGMT*-Promotors von 39% liegen unsere Ergebnisse in dem zu erwartenden Rahmen, der je nach Studie zwischen 30 und 60% angegeben wird (54). Das *MGMT*-Gen enthält mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), z.B. die

c.-56C>T Variante in Exon 1, die c.159C>T, c.195G>T und c.250C>T Varianten in Exon 3 sowie die c.427A>G, c.478G>A und c.533A>G Varianten in Exon 5. Von einigen dieser SNPs sind Effekte auf die MGMT-Aktivität beschrieben (66). Einige Autoren (67, 68) fanden für die c.427A>G and c.533A>G Polymorphismen eine Assoziation mit einem erhöhte Tumorrisiko, während andere Autoren (69, 70) eine solche Assoziation nicht nachweisen konnten. In unserer Serie waren die c.427A>G und c.533A>G SNPs in 5% der Patienten nachweisbar. Diese Frequenz liegt unter der von anderen Autoren beobachteten Frequenz von 11% bis 28% in einer kaukasischen Population (68). Obwohl wir Hinweise für ein kürzeres Gesamtüberleben (OS) in Glioblastompatienten mit der c.533A>G Variante fanden, sind diese Daten aufgrund der geringen Fallzahl zurückhaltend zu interpretieren.

Die Publikation von Ogino et al. (64) berichtete, dass in kolorektalen Karzinomen der c.-56C>T SNP mit einer *MGMT*-Promotormethylierung und einem Verlust der MGMT-Proteinexpression assoziiert ist. Diese Beobachtung konnten wir in unserer Gruppe von Glioblastompatienten nicht bestätigen. Interessanter Weise ist die c.478G>A Variante mit einer Resistenz gegenüber O6-Benzylguanin, einem pharmakologischen Inhibitor von MGMT assoziiert (67). Diese Beobachtung ist von klinischem Interesse, da die additive Behandlung mit O6-Benzylguanin bereits klinisch erprobt wird, um die Sensitivität von Glioblastomen gegenüber Temozolamid zu erhöhen (71). In unserer Serie konnten wir diesen SNP allerdings nicht nachweisen, so dass insgesamt die Häufigkeit dieser Variante in Glioblastompatienten sehr niedrig ist und damit deren klinische Relevanz eher gering sein dürfte.

Die übrigen in der eigenen Arbeit untersuchten molekularen Parameter (Amplifikation von *EGFR*, *PDGFR*, *CDK4* und *MDM2*, Mutation von *TP53*, LOH auf 1p, 10q und 19q) erbrachten abgesehen von einem prognostisch ungünstigen Verlauf von Tumoren mit Allelverlusten auf 1p, wie auch von Boulay et al. (72) berichtet, keine signifikante Assoziation zum TTP bzw. OS (Tabelle 3), wie dies auch in der größeren prospektiven Studie an Patienten des Deutschen Gliomentzwerkes beobachtet wurde (23).

In Übereinstimmung mit der Literatur zeigten die in der eigenen Arbeit untersuchten Glioblastompatienten ein signifikant längeres Gesamtüberleben, wenn eine Methylierung des *MGMT*-Promotors nachweisbar war. In einer multivariaten Analyse erwiesen sich die *MGMT*-

Promotormethylierung und die nahezu-vollständige Tumorresektion (NCR) als die bedeutsamsten unabhängigen prognostischen Faktoren (Abb.16).

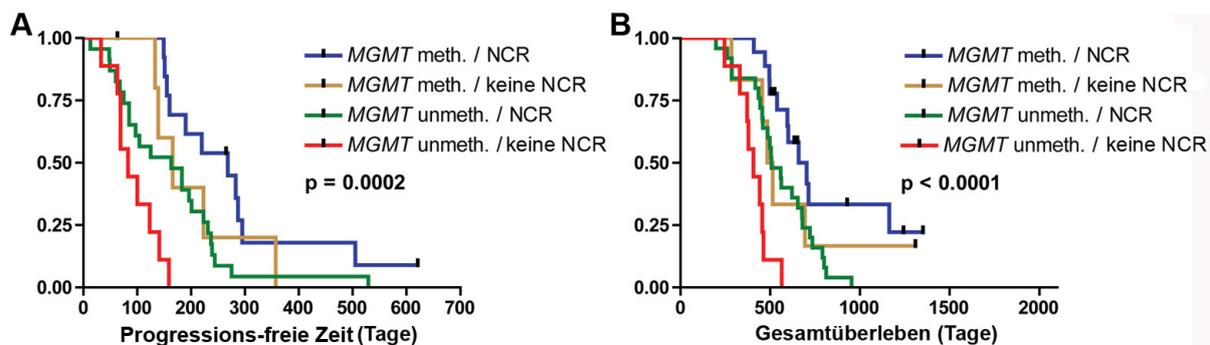


Abbildung 16. Überlebensanalyse der untersuchten Glioblastompatienten stratifiziert nach dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und dem Resektionsausmaß für das Progressions-freie Überleben (A) und das Gesamtüberleben (B). Die vier Patientengruppen setzen sich wie folgt zusammen: 1, *MGMT*-Promotor methyliert und fast-vollständige Tumorresektion (*MGMT* meth. / NCR); 2, *MGMT*-Promotor methyliert und unvollständige Tumorresektion (*MGMT* meth. / no NCR); 3, *MGMT*-Promotor unmethyliert und fast-vollständige Resektion (*MGMT* unmeth. / NCR); 4, *MGMT*-Promotor unmethyliert und unvollständige Resektion (*MGMT* unmeth. / no NCR). Patienten der Gruppe 1 haben im Vergleich zu den anderen Gruppen die beste Prognose, Patienten der Gruppe 4 die ungünstigste Prognose, während die Gruppen 2 und 3 annähernd gleiche Verläufe der Kaplan-Meier-Kurven aufweisen.

In dem nachfolgend vorgestellten Projekt (58) wurde untersucht, ob sich in Glioblastomrezidiven der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und die Proteinexpression von *MGMT* verändert, da bekanntermaßen Glioblastome mit *MGMT*-Promotormethylierung gut auf eine Chemotherapie mit Temozolamid ansprechen, im Regelfall aber dennoch rezidivieren. Bislang gab es zu dieser Fragestellung nur kleinere, widersprüchliche Serien (Übersicht in Weller et al. (54)). Zu diesem Zweck wurde in der eigenen Arbeit eine retrospektive Kohorte aus 80 Glioblastompatienten untersucht, von denen sowohl Gewebeproben des jeweiligen Primärtumors als auch eines zugehörigen Rezidivtumors nach Radio- oder Radiochemotherapie zur Verfügung standen. Neben der MSP-Analyse zur Bestimmung des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus wurde an Tumorproben von 48 Patienten der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors mittels Pyrosequenzierung sowie in Tumorproben von 43 Patienten die *MGMT*-Proteinexpression bestimmt.

Die nachfolgende Abbildung 17 gibt einen Überblick über die in den eigenen Analysen verwendeten Primerkombinationen im Vergleich zu den von Hegi et al. (36) verwendeten Primern.

```

tCGttttCGCGttttCGgatatggttgggatagttCGCGtttt
tagaaCGttttgCGtttCGaCGttCGtaggttttCGCGgtg
CGtatCGtttgCGatttgggtgagtgtttgggtCGtttCGtt
ttCGgaagagtgCGgagttttttttCGggaCGgtgtagtt
tCGagtggttttgtaggCGtttttatttCGtCGtCGgggtg
ggggtCGttttgatttttatttatttCGggCGagttttagg
tgCGttttaagtgttttttaggtgtttagtttttttC
GggtttggggtttttgatttaggttgCGttgtagtgattgt

```

Abbildung 17. Schematische Darstellung eines Teils der *MGMT*-Promotorsequenz. Dargestellt ist die modifizierte methylierte Sequenz nach Natriumbisulfit-Behandlung der DNA. Farblich hervorgehoben sind die unterschiedlichen Primersets aus der EORTC/NCIC 26981-22981/CE.3 Studie bzw. der aktuellen Arbeit. Hegi et al. (36) verwendeten einen zweistufigen (nested) PCR-Ansatz mit Primern, die initial von Palmisano et al. (73) beschrieben wurde (rot, erster Amplifikationsschritt; gelb, Primer für die nested-PCR-Amplifikation, die spezifisch die methylierte Sequenz detektiert). Die Position der in den eigenen Untersuchungen eingesetzten MSP-Primer sind mit Blau hinterlegt (überlappende Sequenzabschnitte der blauen und gelben Primer sind mit Grün hinterlegt). Die von uns mittels DNA-Pyrosequenzierung analysierte Sequenz ist mit einem schwarzen Rahmen gekennzeichnet.

Mittels MSP-Analyse war eine *MGMT*-Promotormethylierung in den Primärtumoren von 28 Patienten nachweisbar, 3 Patienten zeigten eine grenzwertige bzw. schwache Methylierung und bei 49 Patienten hatten die Tumoren keine *MGMT*-Promotormethylierung. In 71 Patienten (89%) war im Rezidiv keine Änderung des *MGMT*-Promotorstatus nachweisbar. MSP-Analyse und DNA-Pyrosequenzierung zeigten konkordante Resultate (Abb.18 und Tabelle 4).

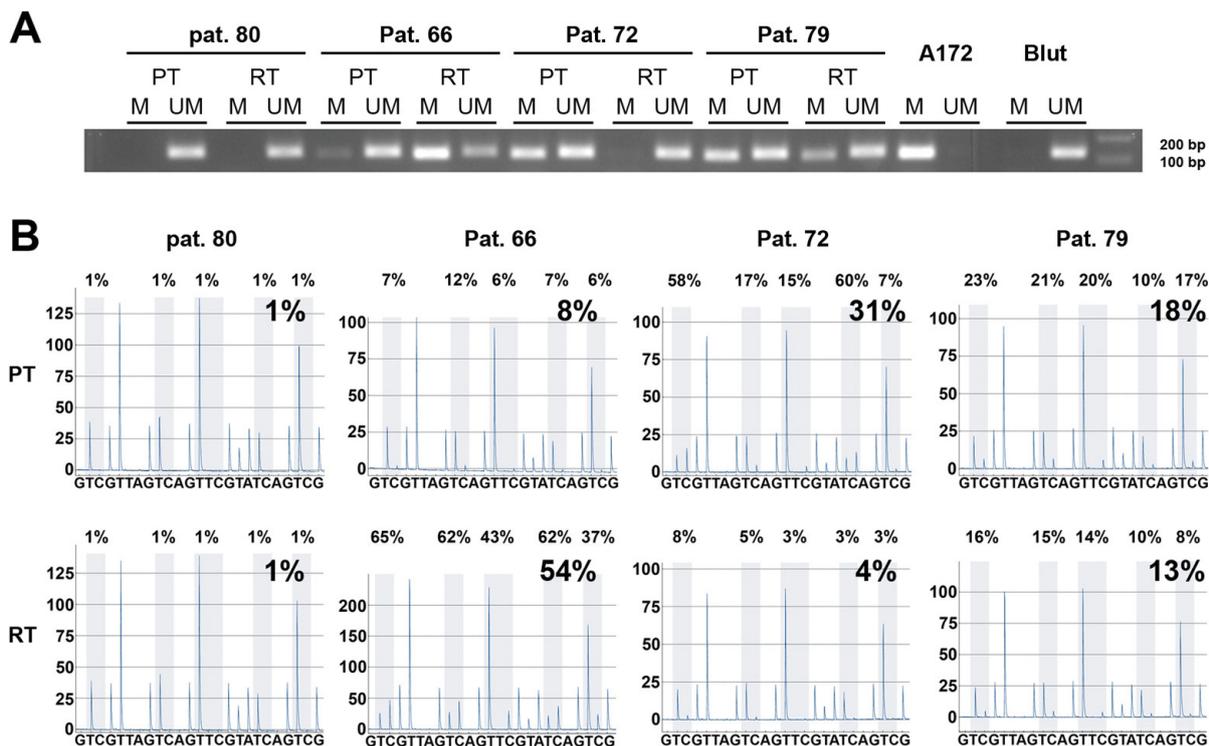


Abbildung 18. Beispiele der *MGMT*-Promotormethylierungsanalysen mittels MSP (**A**) und DNA-Pyrosequenzierung (**B**) an DNA-Proben aus den Primärtumoren (PT) und korrespondierenden Rezidivtumoren (RT) von vier ausgewählten Patienten (Pat. 66, 72, 79 und 80). DNA aus peripheren Blut-Leukozyten (Blut) und der Gliomzelllinie A172 dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Patient 80 weist sowohl im PT als auch im RT keine *MGMT*-Promotormethylierung (UM) auf. Patient 66 zeigt eine schwache *MGMT*-Promotormethylierung im PT aber eine deutliche Methylierung (M) im RT. Im Gegensatz dazu zeigt Patient 72 eine *MGMT*-Promotormethylierung im PT, dagegen aber keine *MGMT*-Promotormethylierung im RT. Patient 79 zeigt sowohl im PT als auch im RT eine *MGMT*-Promotormethylierung (M). Die gemittelte methylierte Allelfrequenz in der Pyrosequenzierung ist in der rechten Ecke eines jeden Pyrogramms aufgetragen. Bei einer methylierten Allelfrequenz von < 8% für unmethylierte Tumoren und > 12% für methylierte Tumoren zeigt sich für beide Methoden eine 100%-ige Übereinstimmung.

In Übereinstimmung mit den bereits vorgestellten Arbeiten (18, 60, 65) war auch in der Primär- versus Rezidivglioblastomstudie keine Assoziation zwischen *MGMT*-Promotormethylierung und immunhistochemischer Proteinexpression nachweisbar. Dagegen bestätigt sich die positive Assoziation der *MGMT*-Promotormethylierung mit einem längeren Progressions-freien Intervall und dem Gesamtüberleben (Abb. 19). Erstmals konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Patienten, deren Tumor einen methylierten *MGMT*-Promotor aufweist, auch nach dem Rezidiv noch von einer alkylierenden Chemotherapie profitieren (Abb. 19E).

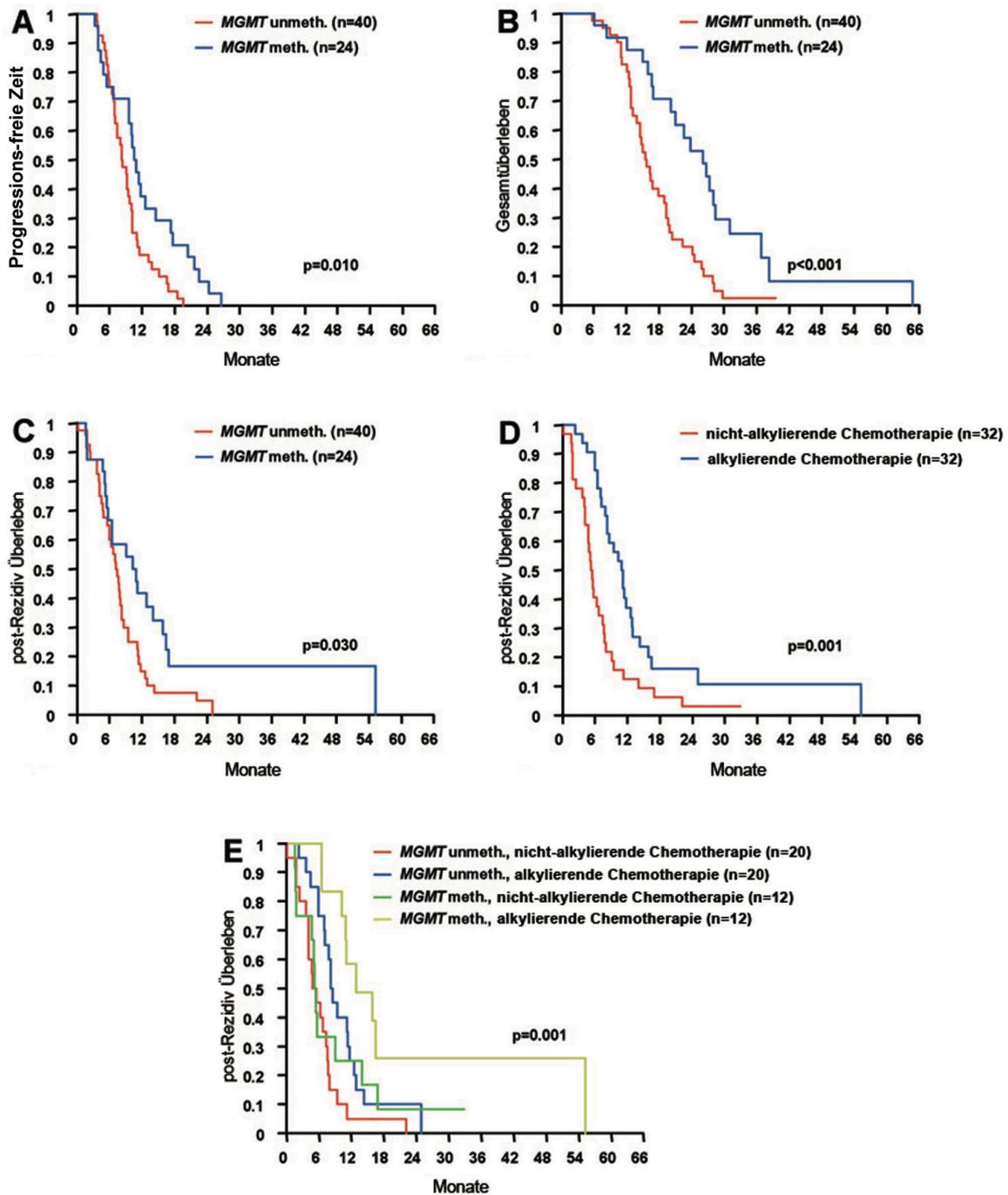


Abbildung 19. Kaplan-Meier-Kurven von 64 Glioblastompatienten, die mit Bestrahlung und Temozolamid-Therapie nach der 1. Operation behandelt wurden. Gezeigt sind die Kurven für das (A) Progressions-freie Intervall (PFS), (B) Gesamtüberleben (OS) und (C) Überleben nach dem Rezidiv (PRS), jeweils stratifiziert nach dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus bestimmt am jeweiligen Primärtumor. (D) PRS stratifiziert nach Rezidivtherapie (mit oder ohne alkylierende Chemotherapie). (E) Stratifizierung nach *MGMT*-Promotorstatus und Rezidivtherapie.

Tabelle 4. Zusammenfassung der Ergebnisse der *MGMT*-Promotormethylierungsanalysen mittels methylierungsspezifischer-PCR (MSP) und DNA-Pyrosequenzierung (PSQ) sowie der immunhistochemischen Ergebnisse (IRS, immunoreactivity score) in Primär- und Rezidivglioblastomen.

			<i>MGMT</i> -Promotorstatus im Rezidivtumor				
			MSP				
			nicht methyliert	schwach methyliert	methyliert	total	
<i>MGMT</i> -Promotorstatus im Primärtumor	MSP	nicht methyliert	48	1	0	49	
		schwach methyliert	1	1	1	3	
		methyliert	5	1	22	28	
		total	54	3	23	80	
	PSQ	PSQ					
		< 8% methylierte Allele	< 8% methylierte Allele	28		0	28
			≥ 8% methylierte Allele	5		15	20
		total	33		15	48	
	IRS	IRS					
		0	0	1	2	3	total
			1	0	0	0	1
			1	2	13	6	4
2			1	8	2	3	14
total	4	21	8	7	40		

In einer Reihe von Studien haben sich Hinweise ergeben, dass Veränderungen in den DNA Mismatch-Repair (MMR)-Genen in der Resistenzentwicklung von Temozolamid und der Progression von Glioblastomen involviert sind (74-78) Die Entwicklung des sog. Hypermethylations-Phänotyps mit Ausbildung einer Defizienz für die MMR-Funktion wird auch in Zusammenhang mit der Temozolamid-Therapie bei Patienten mit *MGMT*-Promotormethylierung diskutiert (79). Zusätzlich zeigen *in vivo* und *in vitro* Studien, dass *MSH6*-Mutationen im Rahmen einer Temozolamid-Therapie für die Resistenzentwicklung gegenüber diesem Chemotherapeutikum mitverantwortlich sein könnten (78). Andererseits scheint es dadurch nicht zu einer Mikrosatelliten-Instabilität zu kommen (80).

Außer durch Punktmutationen können MMR-Gene auch epigenetisch durch eine aberrante Promotormethylierung inaktiviert werden. Einige Hinweise darauf liefern Arbeiten, die über eine *MLH1*-Promotormethylierung in Gliomen berichteten (81-83).

Um der Frage nach einer möglichen Promotormethylierung und/oder einem Verlust der Proteinexpression von MMR-Genen unter Temozolamidtherapie von Gliomen nachzugehen, haben wir Primär- und Rezidivtumoren von 48 Glioblastompatienten auf Promotormethylierung der Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, und *PMS2* hin mittels Pyrosequenzierung untersucht. Für die Gene *MLH1* und *MSH2* wurden zusätzlich Promotormethylierungsanalysen mittels MSP durchgeführt. Die Expression aller vier MMR-Proteinen wurde zudem immunhistochemisch an Paraffinschnitten von Primär- und Rezidivglioblastomen von insgesamt 43 Patienten bestimmt.

Weder in der Pyrosequenzierung noch in der MSP-Analyse fand sich eine Promotormethylierung in einem der vier MMR-Gene in den von uns untersuchten Primär- und Rezidivglioblastomen. Dies spricht dafür, dass eine epigenetische Regulation dieser Gene über eine veränderte Promotormethylierung keine wesentliche Rolle in Glioblastomen spielt. Bei den immunhistochemischen Analysen fand sich hingegen oftmals eine Abnahme der Expression eines oder mehrerer der untersuchten MMR-Proteine vom Primär- zum Rezidivtumor. Abbildung 20 zeigt exemplarisch einige Tumoren mit reduzierter MMR-Proteinexpression im Rezidivtumor im Vergleich zum jeweiligen Primärtumor. Die molekularen Mechanismen, die der Reduktion der MMR-Proteinexpression in Rezidivglioblastomen zu Grunde liegen, sind bislang noch unbekannt. Die eigenen Ergebnisse sprechen dagegen, dass eine aberrante Promotormethylierung ursächlich für die verminderte Proteinexpression im Rezidiv ist. In diesem Zusammenhang zeigt eine von Papait et al. (83) veröffentlichte Untersuchung einen potentiellen Alternativmechanismus auf. Die Autoren fanden Hinweise dafür, dass unter Therapie mit Temozolamid und Carmustin eine ausgeprägte Heterochromatinreorganisation stattfindet, wobei der Gehalt an acetyliertem Histone H3 abnimmt und trimethyliertes Lysin auf Position 9 von Histon H3 zunimmt. Des Weiteren fanden sich höhere gebundene Mengen von MeCP2 und HP1alpha am Chromatin. Diese Befunde sprechen somit für eine Beeinflussung des Histoncodes durch Temozolamid, die möglicherweise zu einer verminderten Transkription und Expression verschiedener Gene führen könnte. Die Bestätigung dieser Hypothese bedarf aber noch weiterführender experimenteller Untersuchungen.

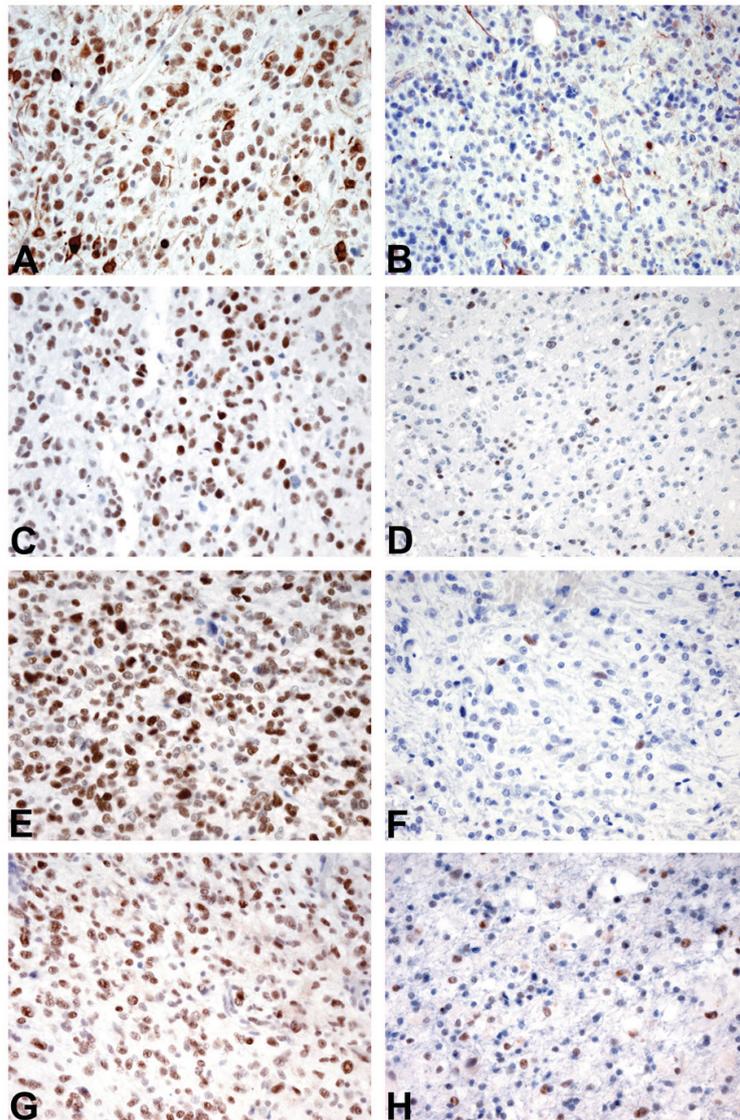


Abbildung 20. Beispiele der immunhistochemischen Färberegebnisse für einzelne MMR-Gene in Primär- und zugehörigen Rezidivtumoren von Glioblastompatienten. **A-B**) *MLH1* (Patient 53); **C-D**) *MSH2* (Patient 53); **E-F**) *MSH6* (Patient 47); **G-H**) *PMS2* (Patient 30). Dargestellt sind Beispiele von Patienten mit reduzierter Proteinexpression im Rezidivtumor (**B,D,F,H**) im Vergleich zum zugehörigen Primärtumor (**A,C,E,G**). Die positive nukleäre Immunreaktivität ist durch die braune Farbe des Chromogens 3'3-Diaminobenzidin gegeben. Alle Schnitte sind mit Hämalaun gegengefärbt (ursprüngliche mikroskopische Vergrößerung: 400x).

Hinsichtlich der klinischen Bedeutung der eigenen Ergebnisse an Primär- und Rezidivglioblastomen (58) lässt sich festhalten, dass der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promoters unter adjuvanter Therapie in Glioblastomen i.d.R. unverändert bleibt, so dass Mehrfachbestimmungen in Rezidivtumoren nicht unbedingt notwendig sind. Des Weiteren ist der Befund von Bedeutung, dass der Nachweis einer *MGMT*-Promotormethylierung im

Primärtumor auch noch von Bedeutung hinsichtlich der Prognose nach alkylierender Chemotherapie in der Rezidivbehandlung ist (Abb.19E).

Hinsichtlich des klinischen Stellenwerts des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus kann festgehalten werden, dass die *MGMT*-Promotormethylierung bislang der einzige prädiktive Marker für das Ansprechen von Glioblastomen auf eine Chemotherapie mit alkylierenden Medikamenten ist (84). In anaplastischen Gliomen kommt der *MGMT*-Promotormethylierung eine prognostische Relevanz zu, die unabhängig von der Art der adjuvanten Therapie ist, was in mehreren unabhängigen Studien nachgewiesen wurde (54). Die Frage warum Patienten mit anaplastischen Gliomen und *MGMT*-Promotormethylierung einen günstigeren Verlauf auch bei alleiniger Strahlentherapie zeigen, ist bislang noch nicht geklärt. Bislang gibt es zumindest keine Hinweise dafür, dass *MGMT* auch Strahleninduzierte DNA-Schäden reparieren kann. Es ist somit zu diskutieren, ob die *MGMT*-Promotormethylierung u.U. nur ein Marker für andere genetische oder epigenetische Veränderungen darstellt, welche das Ansprechen auf Strahlentherapie modulieren können. Hier sei kurz die Assoziation zwischen *MGMT*-Promotormethylierung, 1p/19q-Deletion und *IDH1*-Mutation genannt. Nach neueren Untersuchungen zeigen z.B. Gliome mit *IDH1*-Mutation häufig einen sogenannten „Glioma-CpG island methylator phenotype“ (G-CIMP) (39), so dass möglicherweise in diesen Tumoren Radiotherapieresistenzgene epigenetisch inaktiviert sind. Die Überprüfung dieser Hypothese bedarf allerdings noch weitergehender experimenteller Arbeiten.

Wenn auch von der prädiktiven und prognostischen Information des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus häufig keine individuellen Therapieentscheidungen abhängen, wird dieser molekulare Marker derzeit bereits zur Stratifizierung von Glioblastompatienten in unterschiedliche klinische Studien herangezogen. Eine Auswertung von Ergebnissen klinischer Studien an Patienten mit höhergradigen Gliomen ist ohne Berücksichtigung des *MGMT*-Promotorstatus heutzutage nicht mehr sinnvoll. Ob sich die MSP-Methode als Standard in der Routinediagnostik weiter behaupten wird oder ob quantitative Analyseverfahren, wie z.B. die DNA-Pyrosequenzierung aussagekräftigere und verlässlichere Verfahren sind, muss sich in zukünftigen Studien zeigen (Übersicht in Weller et al. (54)). In jedem Fall ist zu berücksichtigen, dass auch der Probenauf- und -verarbeitung mit Parametern wie der Art und Dauer der Fixierung, DNA-Extraktionsverfahren, adäquater Natriumbisulfit-Konvertierung, ausreichender Tumorzellgehalt der Probe und Lagerung der DNA eine hohe

Bedeutung zukommt. Insofern ist auch die Etablierung von geeigneten Maßnahmen zur Überprüfung und Sicherstellung der Qualität in der molekularen Diagnostik von Gliomen sehr wichtig.

2.4 Epigenetische Regulation des *DUSP4/MKP2*- Gens in Gliomen

Die in diesem Kapitel vorgestellte Arbeit (85) befasst sich mit der Analyse eines neuen putativen Tumorsuppressorgens, das in Gliomen epigenetisch reguliert ist und im Rahmen einer Kooperation mit Herr Priv.-Doz. Dr. Waha vom Institut für Neuropathologie der Universität Bonn entstand. Für die genomweite Analyse von Tumorgewebe auf *de novo* Methylierung wurde ein Mikroarray-basiertes Verfahren, die sog. Differentielle Methylierungs-Hybridisierung (DMH) eingesetzt (86). Mit diesem Ansatz wurde die Promotorregion des „dual-specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-2“-Gens (*DUSP4/MKP-2*), das spezifisch MAP-Kinasen dephosphoryliert und inaktiviert, als hypermethyliert in Gliomen identifiziert. Die MAPK-Phosphatasen (MKP) dephosphorylieren Phosphothreonin und Phosphotyrosin in MAPKs, einschließlich c-Jun NH₂-terminale Proteinkinase (JNK)/Stress-aktivierte Proteinkinase, p38 MAPK, und extrazelluläre Signal-abhängige Kinase (ERK). MKPs können auf diesem Wege die MAPK-Signalwege inaktivieren und damit die Proliferation hemmen. Bislang kennt man 10 MKPs, die eine spezifische Substratspezifität aufweisen. *DUSP4/MKP-2* inaktiviert ERK1, ERK2 und JNK, wird in einer Reihe von Geweben exprimiert und ist im Zellkern lokalisiert.

In insgesamt 83 astrozytären Gliomen (8 AII, 9 AIII, 53 pGBIV und 13 sGBIV) und 5 Gliomzelllinien haben wir den Methylierungsstatus und die mRNA-Expression des *DUSP4*-Gens bestimmt und die Ergebnisse mit anderen molekularen Veränderungen in den untersuchten Tumoren sowie dem klinischen Verlauf der Patienten verglichen.

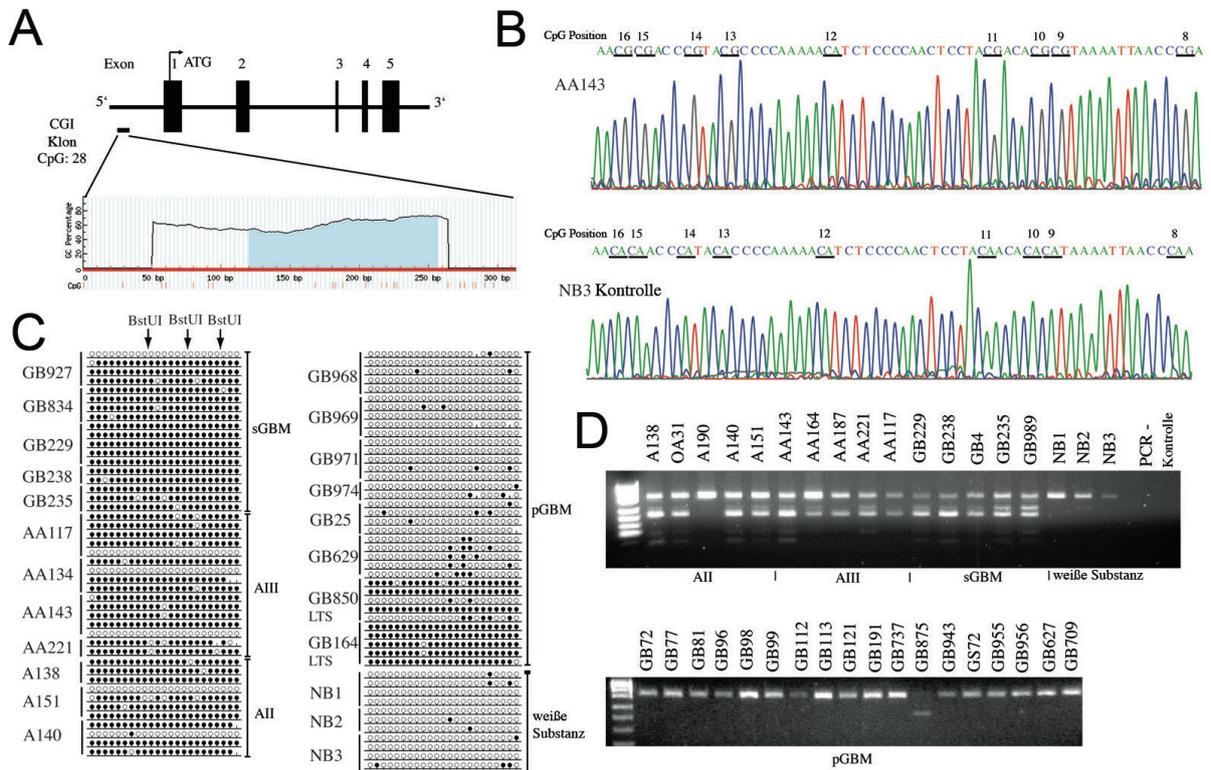


Abbildung 21. *De novo* Methylierung der Promotoreregion von *DUSP4/MKP-2* in Gliomen. **(A)** Schema des *DUSP4/MKP-2* Gens (NM_057158) mit Lokalisation des DMH-Klons und der CpG-Insel 28 (CpG:28 chr8:29266203–29266920) sowie Darstellung der mittels Natriumbisulfit-Sequenzierung untersuchten CpG Positionen 1–23. **(B)** Reverse Natriumbisulfit-Sequenzierung eines anaplastischen Astrozytoms (AA143) und einer Normalgewebekontrolle (NB3). Methylierte CpG- und methylierte CpA-Positionen 8-16 sind unterstrichen. **(C)** Repräsentative Natriumbisulfit-Sequenzierung der CpG Positionen 1-23 einzelner Klone von pGBM, sGBM, AAI, AII und Kontrollgewebe (NB1-3) **(D)** COBRA von *DUSP4/MKP-2*. BstUI-Restriktionsfragmente kommen mehrheitlich in AII, AAI und sGBM, dagegen nur ganz vereinzelt in pGBM (GB875) zur Darstellung.

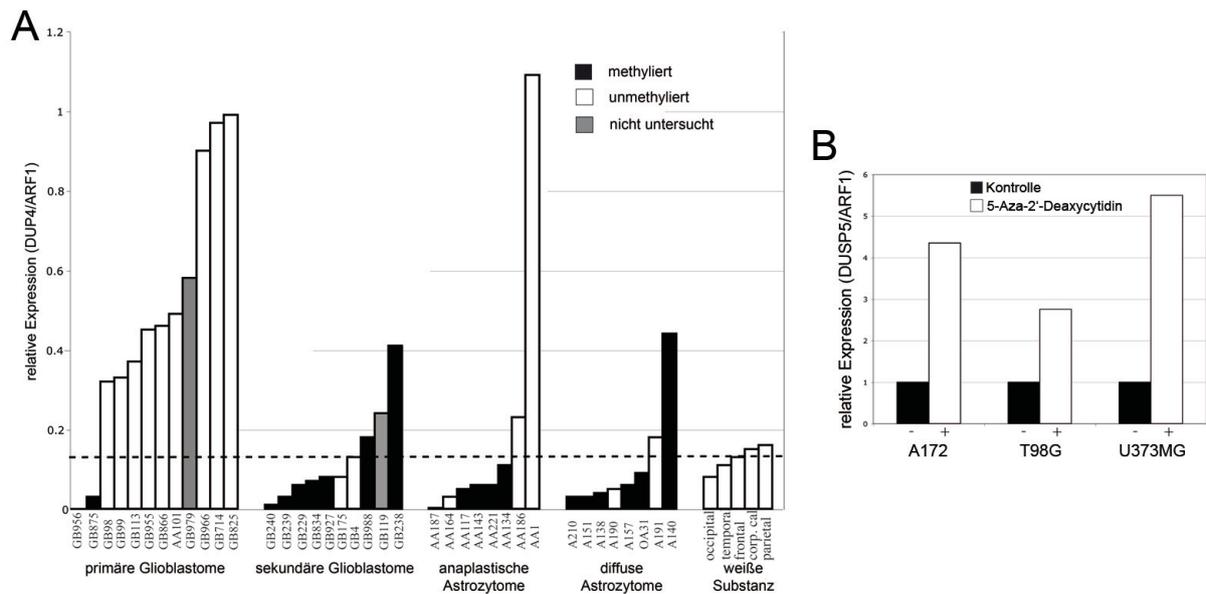


Abbildung 22. Transkriptionelle Herunterregulierung von *DUSP4/MKP-2* in Gliomen und Gliomzelllinien durch Promotorhypermethylierung. **(A)** Relative Transkriptlevels von *DUSP4/MKP-2* zu *ARF1* bestimmt durch real-time RT-PCR in unterschiedlichen Gliomen und Normalhirnkontrollen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den mittleren Expressionswert der Normalhirnkontrollen. Die schwarzen Balken zeigten zusätzlich eine Hypermethylierung des *DUSP4*-Promotors an, bei den grauen Balken konnte keine Methylierungsanalyse durchgeführt werden. **(B)** Relative Transkriptlevels von *DUSP4/MKP-2* zu *ARF1* in Glioblastomzelllinien ohne und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung.

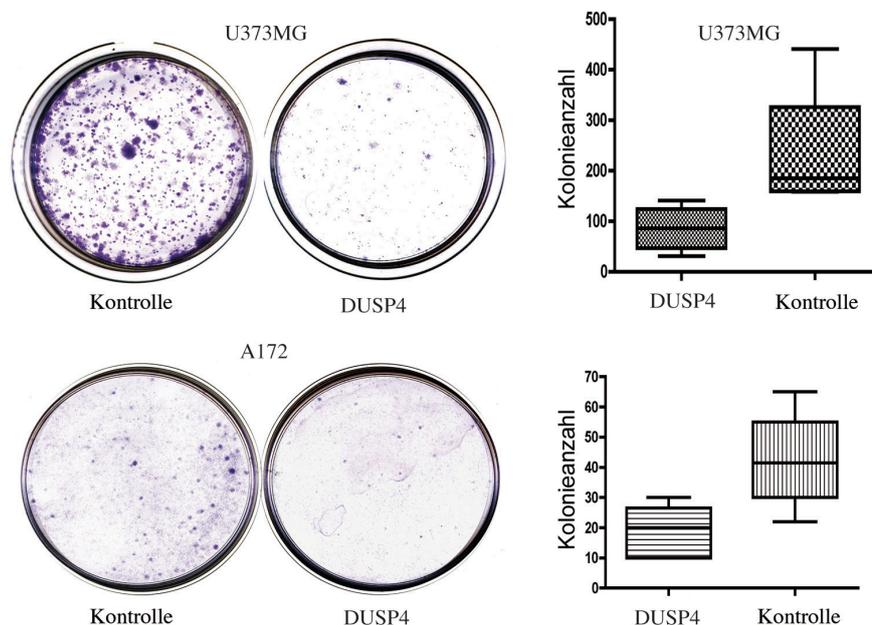


Abbildung 23. Überexpression von *DUSP4/MKP-2* hemmt die Koloniebildung der U373MG und A172 Zelllinien (Boxplots rechts). **(links)** Repräsentative Bilder des colony-formation-Assays **Oben**, Kontrolle: U373MG Zellen transfiziert mit dem pcDNA4/myc-His empty Vector; DUSP4: U373MG Zellen transfiziert mit dem DUSP4-pcDNA4/myc-His Plasmid. **Unten**, Kontrolle: A172-Zellen transfiziert mit dem pcDNA4/myc-His empty Vector; DUSP4: A172 Zellen transfiziert mit dem DUSP4-pcDNA4/myc-His Plasmid. Die Zellen wurden mit Crystalviolett gefärbt.

In den eigenen Untersuchungen wurde erstmals eine aberrante Methylierung des Promotors von *DUSP4/MKP-2* in humanen Gliomen berichtet. Anderer Mitglieder der MPK-Familie wurden bereits in anderen Tumorentitäten als epigenetisch reguliert beschrieben, so z.B. *DUSP6/MKP-3*, das in primären Pankreastumoren und Pankreaszelllinien hypomethyliert ist (87). Unsere Resultate zeigen, dass in diffusen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und sekundären Glioblastomen häufiger eine *DUSP4/MKP-2* Promotormethylierung nachweisbar ist als in primären Glioblastomen. Es bestand eine Assoziation mit reduzierter mRNA-Expression sowie mit *TP53*- und *IDH1*-Mutationen. Dagegen fand sich keine *DUSP4/MKP-2*-Promotormethylierung in Tumoren mit *EGFR*-Amplifikation. Die Inaktivierung von *DUSP4/MKP-2* in sGBIV und die gut untersuchte Amplifikation von *EGFR* in pGBIV liefert Evidenz dafür, dass der MAPK-Signalweg eine große Bedeutung in der molekulare Pathogenese von astrozytären Gliomen besitzt. Innerhalb der Gruppe von Patienten mit pGBIV fand sich ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit *DUSP4/MKP2*-hypermethylierten Tumoren. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bei Lungenkarzinomen gemacht werden, die eine Inaktivierung von *DUSP4/MKP2* aufwiesen (88). Unsere funktionellen Untersuchungen zeigen, dass eine Überexpression von *DUSP4/MKP2* zur einer Wachstumshemmung von Gliomzellen *in vitro* führt und somit *DUSP4/MKP2* einen interessanten neuen Tumorsuppressorgen-Kandidaten darstellt.

2.5 *IDH1* Mutationen als neuer diagnostischer und prognostischer Marker für Gliome

Die in diesem Kapitel vorgestellten drei eigenen Originalarbeiten befassen sich mit dem hochaktuellen Thema der Rolle von Mutationen im *IDH1*- und *IDH2*-Gen in der Pathogenese und molekularen Diagnostik von Gliomen. Zum einen werden die an einer großen Serie glialer Tumoren erzielten Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit und Verteilung der einzelnen Mutationen in unterschiedlichen glialen Tumorentitäten präsentiert (89), anschließend wird ein von uns etablierter Assay mit Hilfe der Pyrosequenztechnik zur sensitiven und raschen Mutationsdetektion für die Routinediagnostik vorgestellt (90) und abschließend werden anerkannte prognostische Parameter wie WHO-Grad, Alter, *IDH1*-Mutations- und *MGMT*-Promotormethylierungs-Status hinsichtlich ihrer jeweiligen prognostischen Relevanz in Astrozytomen unterschiedlichen WHO-Grades verglichen und deren Bedeutung für die zukünftige Tumorklassifikationen diskutiert (91).

Isocitratdehydrogenasen (IDH) sind Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatase (NADP⁺; IDH1 und IDH2) oder Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺, IDH3) abhängig und katalysieren die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat (ICT) in alpha-Ketoglutarat (α -KG), wobei von den 5 bekannten Isocitratdehydrogenasen (IDH) Genen lediglich das NADPH-abhängigen IDH1 (lokalisiert im Zytoplasma, Peroxisomen und endoplasmatischem Retikulum) und IDH2 (Lokalisation in den Mitochondrien) eine Bedeutung für die Tumorgenese der Gliome haben. Die 3 NAD-abhängigen Isocitratdehydrogenasen sind ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert und Bestandteil des Krebs-Zyklus (vgl. die Übersichtsarbeit von Fu et al. (2010), (92)).

In einem Genom-weiten Sequenzierungsansatz von Tumoren fanden Parson et al. (6) erstmalig Mutationen im *IDH1*-Gen in einem Teil der Glioblastome, darunter insbesondere Tumoren von jüngeren Patienten und sekundäre Glioblastome. Nachfolgende Studien bestätigten diesen Befund und zeigten, dass *IDH1*-Mutationen in primären Glioblastomen eher selten sind, d.h. auf ca. 5-10% der Tumoren beschränkt sind, dagegen in diffusen und anaplastischen Gliomen sowie sekundären Glioblastomen in bis zu 80% der Tumoren nachweisbar sind (5, 8). Klinisch sind Mutationen im *IDH1*-Gen sowohl in Glioblastompatienten als auch in Patienten mit anaplastischen Gliomen mit einer deutlich günstigeren Prognose assoziiert (8, 23, 24). Multivariate Analysen haben ergeben, dass *IDH1*-

Mutationen den zur Zeit stärksten unabhängigen prognostischen Faktor für Patienten mit diesen Gliomen darstellen (24, 25). Im Gegensatz dazu ist die Datenlage für Patienten mit niedriggradigen diffusen Gliomen (WHO-Grad II) noch kontrovers. Einige Autoren fanden auch für diese Patienten einen prognostisch günstigen Effekt (25, 93), wobei der *IDH1*-Status jedoch keinen Einfluß auf das Ansprechen auf Temozolamid hatte (93). In einer Arbeit von Kim et al. (94) konnte dieser prognostisch günstige Effekt nicht bestätigt werden. Die Verteilung der genetischen Aberrationen in dieser Untersuchung an 360 niedriggradigen diffusen Gliomen betrug 70-80% für *IDH1*-Mutationen, 60% für *TP53*-Mutationen in diffusen Astrozytomen, 70% für LOH auf 1p/19q in Oligodendrogliomen und jeweils 40-45% LOH 1p/19q oder *TP53*-Mutationen in Oligoastrozytomen. Insgesamt 93% aller WHO-Grad II Gliome trug mindestens eine dieser genetischen Aberrationen. Multivariate Analysen unter Berücksichtigung von Alter und Therapie weisen *TP53* als signifikant prognostisch ungünstig und LOH 1p/19q als signifikant prognostisch günstig aus, während sich für *IDH1*-Mutationen keine signifikante prognostische Bedeutung zeigte (94).

Während sich *IDH1*-Mutationen als prognostisch günstiger Marker für Patienten mit höhergradigen astrozytären und oligodendroglialen Gliomen erwiesen, konnte bislang nicht gezeigt werden, dass *IDH1*-Mutationen in Gliomen prädiktiv für das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie sind (93). In einer neueren Arbeit (95) konnte durch Hemmung von Glutaminase mittels siRNA oder des „kleinen Molekül“ DPTES die Konvertierung von Glutamat in alpha-Ketoglutarat gehemmt werden. Da alpha-Ketoglutarat das Substrat für das mutante IDH1-Protein ist, um daraus 2-Hydroxyglutarat zu bilden, kommt es bei *IDH1*-mutanten Gliomen durch diese Behandlung zu einem verlangsamten Wachstum, ein Effekt der durch Gabe von alpha-Ketoglutarat wieder umgekehrt werden kann. Damit zeichnet sich ein potentiell vielversprechender Ansatz zur gezielten Behandlung von *IDH1*-mutanten Glioblastomen ab.

In einer Kooperation mit Herrn Priv.-Doz. Dr. Christian Hartmann, Institut für Neuropathologie der Universität Heidelberg und anderen Kollegen wurde die Häufigkeit und Verteilung von *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen in 1.010 diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren untersucht (89). Eine Übersicht über die gefundenen Ergebnisse gibt Tabelle 5. Neben den eigenen Resultaten (grau hinterlegte Zeilen) sind vergleichend die Ergebnisse anderer großer Serien gegenübergestellt. Unsere Daten zeigen, dass die R1323C *IDH1*-Mutante stark mit astrozytären Tumoren assoziiert ist, während *IDH2*-Mutation

vorzugsweise in oligodendroglialen Tumoren auftreten. Des Weiteren fanden wir in dem untersuchten Kollektiv, dass das Manifestationsalter von anaplastischen Gliomen mit *IDH1*-Mutation 6 Jahre vor dem der anaplastischen Gliome ohne *IDH1*-Mutation liegt.

Tabelle 5. Häufigkeit und Verteilung von *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen in 1.010 diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren (grau hinterlegte Reihen). Im Vergleich dazu Mutationshäufigkeiten in anderen publizierten Serien.

Studie	Aminosäure Austausch	Nucleotid Austausch	alle n = 1010	AII n = 227	AAIII n = 228	OII n = 128	AOIII n = 174	OAI n = 76	AOAI n = 177
<i>IDH1</i>									
Hartmann 2009	R132H	G395A	664 (61,7%)	143 (63,0%)	132 (57,9%)	103 (80,5%)	111 (63,8%)	60 (78,9%)	115 (65,0%)
	R132C	C394T	29 (2,9%)	17 (7,5%)	7 (3,1%)	0 (0%)	2 (1,1%)	1 (1,3%)	1 (0,6%)
	R132S	C394A	11 (1,1%)	3 (1,3%)	3 (1,3%)	2 (1,5%)	4 (2,3%)	0	0
	R132G	C394G	10 (1,0%)	2 (0,9%)	3 (1,3%)	0	3 (1,7%)	1 (1,3%)	1 (0,6%)
	R132L	G395T	2 (0,2%)	0	1 (0,4%)	0	1 (0,6%)	0	0
				716 (70,9%)	165 (72,7%)	146 (64,0%)	105 (82,0%)	121 (69,5%)	62 (81,6%)
Balss 2008			281 (71,2%)	34/46 (73,9%)	29/47 (61,7%)	36/51 (70,6%)	36/54 (66,7%)	36/46 (78,3%)	29/37 (78,4%)
Watanabe 2009			173 (83,2%)	60/68 (88,2%)	21/27 (77,8%)	31/39 (79,5%)	6/8 (75,0%)	16/17 (94,1%)	10/14 (71,4%)
Korshunov 2009			50 (82,0%)	41/50 (82,0%)					
Yan 2009			179 (79,9%)	25/30 (83,3%)	36/52 (69,2%)	41/51 (80,4%)	31/36 (86,1%)	3/3 (100%)	7/7 (100%)
<i>IDH2</i>									
Hartmann 2009	R172K	G515A	20 (2,0%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	3 (2,3%)	6 (3,4%)	1 (1,3%)	6 (3,4%)
	R172M	G515T	6 (0,6%)	0	0	1 (0,8%)	2 (1,1%)	0	3 (1,7%)
	R172W	A514T	5 (0,5%)	0	0	2 (1,6%)	1 (0,6%)	0	2 (1,1%)
				31 (3,1%)	2 (0,9%)	2 (0,9%)	6 (4,7%)	9 (5,3%)	1 (1,3%)
Yan 2009			179 (5,0%)	2/30 (6,7%)	2/52 (3,8%)	2/51 (3,9%)	3/36 (8,3%)	0/3 (0%)	0/7 (0%)

Aufgrund der klinischen und prognostischen Bedeutung dieser Mutationen etablierten wir einen auf dem Prinzip der DNA-Pyrosequenzierung basierenden Assay, der nicht nur kostengünstig sondern auch innerhalb eines Arbeitstages durchführbar ist, und quantitative Ergebnisse hinsichtlich des prozentualen Anteils von *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen in einer DNA-Probe liefert (90). Ziel dieser Arbeit war zum Einen die Validierung der Pyrosequenzieretechnik gegenüber der konventionellen Sanger-Sequenzieretechnik, zum Anderen die Überprüfung, ob diese Methode auch geeignet ist, Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe zu untersuchen, und in wie weit die Sensitivität dieser Methode ausreicht, um eine Mutation z.B. auch noch in der Tumordinfiltrationszone mit nur geringem Tumorzellanteil zu detektieren. Insgesamt wurde hierfür eine Serie von 262 Gliomen unterschiedlicher Entitäten mittels Pyrosequenzierung (n = 228) und/oder konventioneller Sequenzierung (n = 220) untersucht. Beide Methoden erbrachten ohne Ausnahme kongruente Ergebnisse (Tabelle 6 und Abb. 24). Der Vergleich von DNA aus Paraffin-eingebettetem Gewebe und Frischgewebe der gleichen Patienten (n = 10) erbrachte ebenfalls kongruente Ergebnisse, mit kleineren Schwankungen in der mutanten Allelfrequenz bei der Pyrosequenzierung. Die mediane mutante Allelfrequenz in den Frischgewebeproben lag bei 38,5% (Spannweite: 30% – 46%) und in den Paraffin-eingebetteten Gewebeproben bei 39,5% (Spannweite: 18% – 43%). Der histologisch geschätzte Tumorzellgehalt betrug für alle Gewebeproben mindestens 80%. Die Verteilung der in dieser Arbeit gefundenen *IDH1*- und *IDH2*-Mutation (Tabelle 6) entspricht den bereits oben erwähnten Verteilungsmustern aus anderen großen Serien (s. auch Tabelle 5).

Tabelle 6. Ergebnisse der *IDH1*- und *IDH2*-Mutationsuntersuchung. PXA, pleomorphes Xanthoastrozytom; *Nur die Tumoren ohne *IDH1*-Mutation wurden auf *IDH2*-Mutationen hin untersucht.

Histologie	AII	OII	AAIII	AOIII	sGBIV	pGBIV	PXA
<i>IDH1</i>							
untersuchte Tumoren	15	8	19	10	16	152	42
Wild-type	5	3	3	2	3	141	42
R132H	8	5	14	7	13	10	0
R132G	0	0	1	1	0	0	0
R132S	1	0	1	0	0	1	0
R132C	1	0	0	0	0	0	0
Mutationen, gesamt	10	5	16	8	13	11	0
<i>IDH2</i>							
untersuchte Tumoren	5*	3*	3*	2*	3*	152	42
Wild-Typ	4	1	3	0	2	152	42
R172K	1	1	0	1	1	0	0
R172M	0	0	0	1	0	0	0
R172W	0	1	0	0	0	0	0
Mutationen, gesamt	1	2	0	2	1	0	0

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit an der bislang größten Serie der seltenen pleomorphen Xanthoastrozytome (n = 42) gezeigt werden, dass diese Tumorentität keine *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen aufweist. Eine aktuelle Arbeit spricht dafür, dass diese spezielle astrozytäre Tumorentität in mehr als 60% der Fälle aktivierende Punktmutationen im *BRAF*-Onkogen aufweist (96).

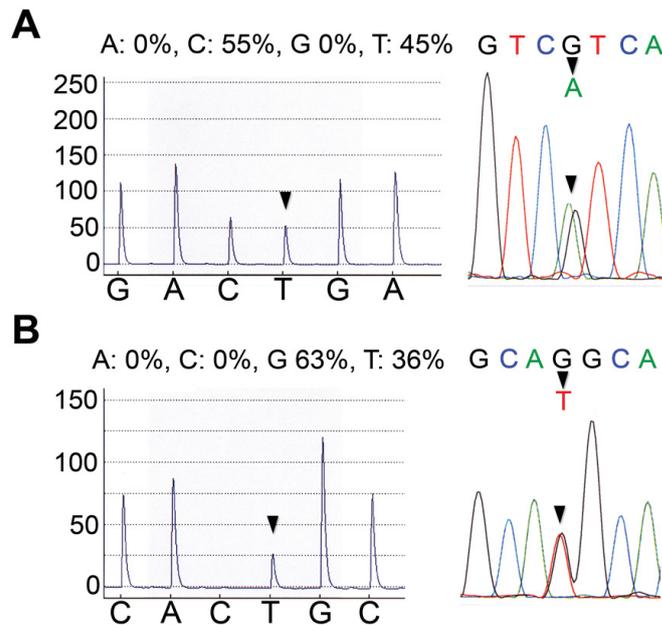


Abbildung 24. Beispiel einer *IDH1*- und *IDH2*-Mutation in zwei ausgewählten Gliomen, detektiert mit Pyrosequenzierung und konventioneller Sequenzierung. **(A)** Pyrogramm mit reverser Sequenz (**links**) und die korrespondierende Vorwärtssequenz bestimmt mittels konventioneller Sequenzierung (**rechts**): Dargestellt ist eine heterozygote G>A Punktmutation des Nukleotids 395 des *IDH1*-Gens, die zu einer Missense-Mutation im Codon 132 (c.395G>A, R132H) führt (Tumor: GB875). **(B)**, Pyrogramm mit Vorwärtssequenz (**links**) und die korrespondierende Vorwärtssequenz bestimmt mittels konventioneller Sequenzierung (**rechts**): Dargestellt ist eine heterozygote Punktmutation G>T des Nukleotids 515 des *IDH2*-Gens, die zu einer Missense-Mutation in Codon 172 (c.515G>T, R172M) führt (Tumor: AO18).

Die nachfolgende Abb. 25 zeigt, dass die Pyrosequenzierung auch in Gewebeproben mit geringem Tumorzellgehalt zuverlässige Ergebnisse erbringt, was insbesondere für die oft schwierige Differentialdiagnose zwischen reaktiv verändertem Hirngewebe und der Infiltrationszone eines diffusen Glioms von hohem diagnostischen Stellenwert ist. Mittlerweile ist zwar auch ein kommerzieller Antikörper gegen die häufigste *IDH1*-Mutante R132H verfügbar, zum Ausschluss bzw. Nachweis der übrigen, selteneren Mutationen ist aber weiterhin eine Diagnose nur mittels Sequenzierung möglich. Um die Sensitivität der Pyrosequenzierung weiter zu untersuchen, führten wir eine Analyse einer Verdünnungsreihe durch (Abb. 26).

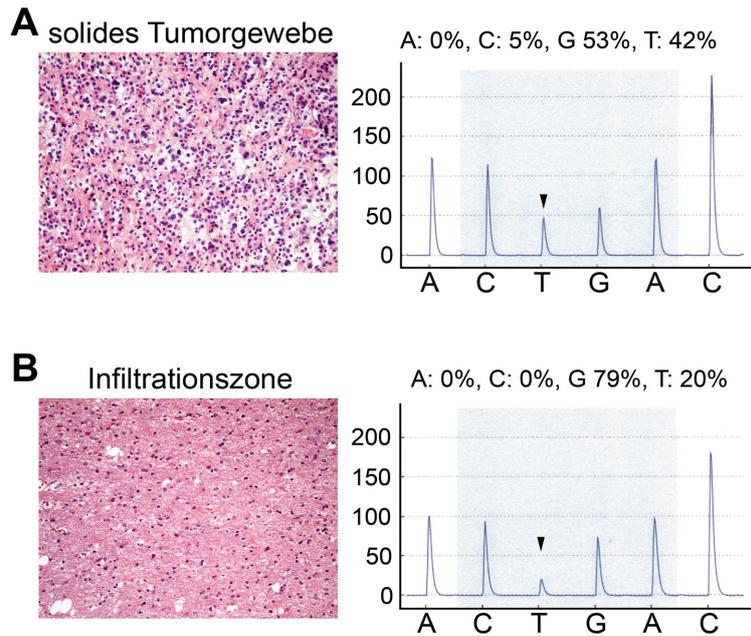


Abbildung 25. Pyrosequenzierung von DNA-Extrakten aus soliden Tumorteilen (oben, geschätzter Tumorzellgehalt über 80%) und der Infiltrationszone (unten, geschätzter Tumorzellgehalt unter 20%) in einem anaplastischen Astrozytom (AA187) mit *IDHI*-Mutation. Links ist jeweils die repräsentative Histologie abgebildet, rechts die Pyrogramme der entsprechenden Sequenzierungen. In beiden Analysen zeigt sich eine C>A Punktmutation (Pfeilspitze) des Nukleotids 394, entsprechend einer Missense-Mutation in Codon 132 (c.394C>A, R132S).

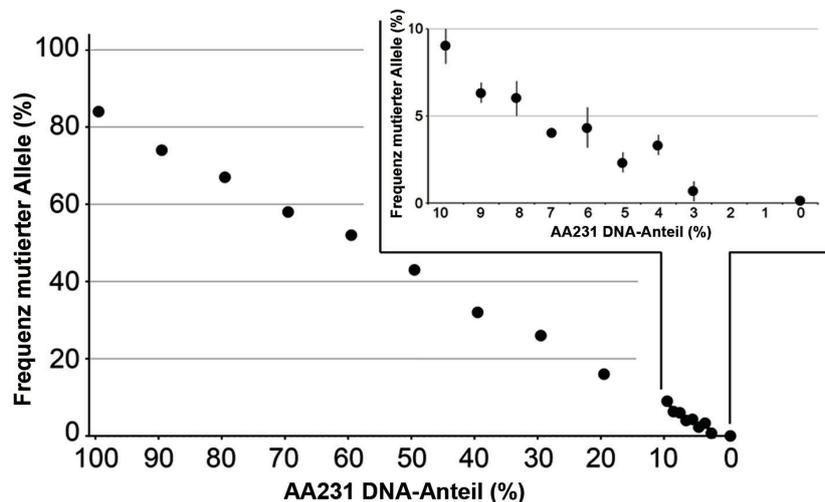


Abbildung 26. Sensitivität der *IDHI*-Mutationsdetektion mittels Pyrosequenzierung. Abgebildet sind die Ergebnisse der Verdünnungsreihe aus Wild-Typ *IDHI* DNA und DNA des Tumors AA231 mit einer homozygoten R132H-*IDHI*-Mutation. Die Ordinate gibt die mutante Allelfrequenz an, die Abszisse die unterschiedlichen Konzentrationen von AA231 DNA, die als PCR-Template eingesetzt wurde. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der Verdünnungsschritte 0-10% AA231-DNA. Mittels Pyrosequenzierung ist es möglich, eine Mutation zu detektieren, wenn der die mutante Allelfrequenz bei 4% liegt. Um Mutationen von Hintergrundrauschen zu unterscheiden, wird ein Schwellenwert ab 5% Allelfrequenz vom Hersteller (Qiagen) empfohlen.

In der Gruppe der Glioblastome konnten wir in der eigenen Serie Assoziationen von *IDHI*-Mutationen mit jüngerem Alter der Patienten (*IDHI*-Mutation: Median 42 Jahre, Spannweite: 25 - 54 Jahre; *IDHI*-Wildtyp: Median 60 Jahre, Spannweite: 11 – 83 Jahre) und dem Gesamtüberleben der Patienten bestätigen, dagegen fand sich keine Assoziation mit dem *MGMT*-Methylierungsstatus. Sanson et al. (25) berichtete über eine signifikante Assoziation zwischen *IDHI*-Mutation und *MGMT*-Promotormethylierung in einer Serie von 194 Gliomen der WHO-Grade II-IV. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise damit erklären, dass sowohl *IDHI*-Mutationen als auch *MGMT*-Promotormethylierung in etwa gleich hoher Frequenz und oftmals gemeinsam in niedriggradigen und anaplastischen Gliomen sowie sekundären Glioblastomen auftreten, dagegen sind *IDHI*-Mutationen in primären Glioblastomen wesentlich seltener als eine *MGMT*-Promotormethylierung. Die multivariate Analyse der eigenen Daten identifizierte *IDHI*-Mutation (OR = 0.352 [0.148 - 0.839]), Resektionsausmaß (OR = 0.484 [0.322 - 0.728]) und *MGMT*-Promotormethylierung (OR = 0.578 [0.393 - 0.850]) als signifikante unabhängige prognostische Faktoren für Patienten mit primären Glioblastomen.

In der letzten in diese Habilitationsschrift eingeschlossenen Originalarbeit haben wir uns in Kooperation mit Kollegen aus Heidelberg, Zürich und Leipzig mit der Frage beschäftigt, inwieweit der molekulare Marker „*IDHI*-Mutation“ möglicherweise eine stärkere prognostische Aussagekraft als die gegenwärtigen histologischen Kriterien der WHO-Klassifikation für die Einteilung von anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen haben (91). Die aktuelle Klassifikation der Hirntumoren basiert nach wie vor auf rein histologischen und immunhistochemischen Befunden, wohingegen molekulare Daten bislang keinen Einfluss auf die Tumorklassifikation und - gradierung haben. Die von uns durchgeführte Studie umfasste zwei große Patientenkollektive aus der NOA-04 Studie (24) und der prospektiven Kohorte des Deutschen Gliomnetzwerks (23). Insgesamt wurden Tumoren von 382 Patienten mit malignen astrozytären Gliomen (145 AAIII und 237 pGBIV) untersucht. In der Gruppe der anaplastischen Astrozytome fanden sich *IDHI*-Mutationen in 60% der Tumoren, dagegen in der Gruppe der Glioblastome lediglich in 7,2% der Tumoren, was sehr gut mit den Angaben in der Literatur übereinstimmt (5, 8, 23-25). Die anschließend durchgeführten Überlebensanalysen zeigten erwartungsgemäß eine signifikant günstigere Prognose für Patienten mit anaplastischen Astrozytomen des WHO-Grades III gegenüber Patienten mit

Glioblastomen des WHO-Grades IV. Allerdings ergab die Stratifizierung nach dem *IDHI*-Status eine noch deutlichere Unterscheidung in zwei prognostische unterschiedliche Patientengruppen. Daneben waren auch der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und das Lebensalter prognostisch relevante Parameter in univariaten Analysen. Bei Kombination der verschiedenen Parameter zeigte sich, dass Patienten, deren Tumoren eine *IDHI*-Mutation und eine *MGMT*-Promotormethylierung haben, den günstigsten Verlauf zeigten, wohingegen Patienten, deren Tumoren keine dieser Veränderungen zeigten, die ungünstigste Prognose hatten (Abb. 27A).

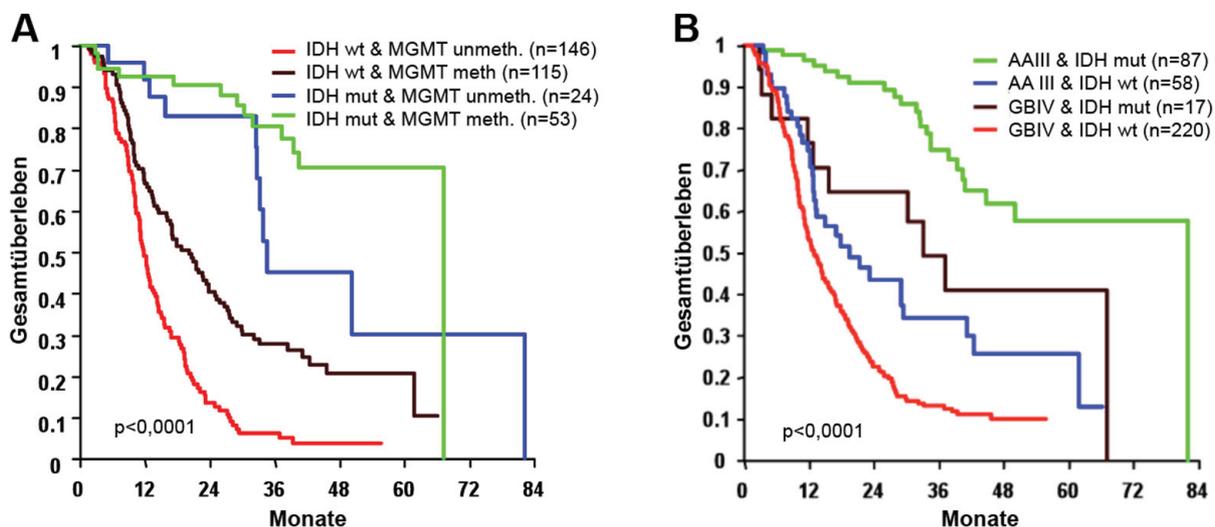


Abbildung 27. Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben von 382 Patienten mit malignen astrozytären Gliomen stratifiziert nach den molekularen Markern *IDHI*-Mutation und *MGMT*-Promotormethylierung (A) bzw. nach *IDHI*-Mutationsstatus und histologischer Diagnose (B).

Wie aus Abbildung 27B ersichtlich wird, ändert sich die Prognosesequenz für Patienten mit malignen astrozytären Gliomen zu Gunsten der Glioblastompatienten mit *IDHI*-Mutation, die eine signifikant bessere Prognose aufweisen als Patienten mit anaplastischen Astrozytomen ohne *IDHI*-Mutation. Das bedeutet, dass dem *IDHI*-Status eine größere prognostische Relevanz zukommt, als die gegenwärtige Gradierung gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation der Hirntumoren. Auch in der multivariaten Analyse bestätigte sich die *IDHI*-Mutation als prognostisch bedeutsamster Faktor, gefolgt von Histologie und *MGMT*-Promotormethylierung (91).

Hinsichtlich der funktionellen Auswirkungen von *IDH1*-Mutationen auf das Wachstum von Gliomen gibt es erste sehr interessante Befunde. In der Arbeit von Zhao et al. (97) konnte gezeigt werden, dass Zellen mit *IDH1*-Mutation ihre katalytische Aktivität Isocitrat unter Bildung von NADPH zu α -KG zu konvertieren verlieren. α -KG wiederum bewirkt die Degradierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (*HIF-1 α*), der eine zentrale Rolle in der zellulären Adaption auf Hypoxie einnimmt und die Expression vielfältiger Gene, u.a. des Glukosestoffwechsels, der Angiogenese, der Zellmotilität induziert (98). Neben diesem Funktionsverlust beobachtet man bei *IDH1*-mutanten Zellen auch einen Funktionsgewinn bei dem α -KG unter Verbrauch von NADPH in R(-)-2HG konvergiert wird. Entsprechend kann R(-)-2HG in Gliomproben erhöht nachgewiesen werden (99). *IDH1* mutante Tumore verbrauchen somit NADPH, anstelle dieses zu produzieren, was Glioblastome für Strahlen- und Chemotherapie sensibilisieren, und u.a. die günstigere Prognose dieser Patienten erklären könnte (100).

In einer aktuellen Arbeit von Figueroa et al. (101) über *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), der einzigen Tumorentität neben den Gliomen, in der vermehrt Mutationen von *IDH1* und *IDH2* beschrieben wurden, wurde nachgewiesen, das *IDH1*-mutante AML einen Hypermethylierungsphänotyp, ähnlich der Beobachtung von Nounmehr et al. (39) in Gliomen, aufweisen. Dieser Phänotyp wird durch die verminderte Aktivität des alpha-Ketoglutarat-abhängigen Enzyms TET2 bedingt, was letztlich in einer reduzierten Hydroxylierung methylierter CpG-Dinukleotide und damit vermutlich verminderten DNA-Demethylierung resultiert. Dabei sind *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen exklusiv mit Mutationen im *TET2*-Gen assoziiert. Andere Autoren bestätigten diese Befunde und berichteten, dass die verstärkte Produktion von 2-Hydroxyglutarat als Folge einer *IDH1*- oder *IDH2*-Mutation zu einer kompetitiven Hemmung von alpha-Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, darunter u.a. Histondemethylasen und die TET-Proteine, führt, was letztlich in einer globalen Veränderung der DNA-Methylierung und des Histonkodes resultiert (102).

Diese Genom-weiten Alterationen der Histon- und DNA-Methylierung könnten auch Ursache für den von Nounmehr et al. (2010) beschriebenen „Glioma- CpG island methylator phenotyp (G-CIMP)“ darstellen, der mit vor allem in Gliomen mit *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen zu beobachten und mit einer proneuralen Expressionssignatur sowie klinisch günstigeren Prognose assoziiert ist (39).

3 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift befasst sich mit Identifizierung und klinischen Validierung diagnostischer, prognostischer und prädiktiver molekularer Marker für Patienten mit oligodendroglialen und astrozytären Gliomen. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf Untersuchungen zur klinischen Bedeutung der drei derzeit wichtigsten molekularen Biomarker in Gliomen, d.h. (1) dem kombinierten Verlust der Chromosomenarme 1p und 19q in oligodendroglialen Tumoren, (2) der *MGMT*-Promotormethylierung in anaplastischen Gliomen und Glioblastomen und (3) dem Nachweis von Mutationen der Gene *IDH1* und *IDH2* in diffusen niedriggradigen und malignen Gliomen.

Durch molekulare Analysen einer großen Zahl von hochpolymorphen Mikrosatellitenmarkern auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 und dem langen Arm von Chromosom 19 konnten wir die prognostisch günstige Bedeutung eines kombinierten Verlustes von Allelen auf 1p und 19q für Patienten mit oligodendroglialen Tumoren bestätigen und zeigen, dass partielle Deletionen auf 1p, im Unterschied zu vollständigen Verlusten von 1p und 19q, mit einer deutlich schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten assoziiert sind (Felsberg et al. 2004, **Anlage 1**). Des Weiteren gelang es über eine Feinkartierung der Deletionen auf 1p die Kandidatengenregion auf diesem Chromosomenarm weiter eingrenzen. In einer weiteren Untersuchung fanden wir, dass in bis zu 88% der oligodendroglialen Tumoren eine *MGMT*-Promotormethylierung nachweisbar ist, die zu einer verminderten Expression dieses DNA-Reparatur- und Chemotherapieresistenz-Gens auf mRNA- und Proteinebene führt. Insgesamt bestand eine signifikante Assoziation zwischen *MGMT*-Promotormethylierung und kombinierten 1p/19q-Verlusten in oligodendroglialen Tumoren (Möllemann et al. 2004, **Anlage 2**). Beide Veränderungen tragen somit sehr wahrscheinlich zu dem besseren klinischen Ansprechen auf eine adjuvante cytotoxische Therapie, wie z.B. eine alkylierende Chemotherapie, dieser Tumoren bei.

Ein weiterer Schwerpunkt der in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten lag auf der Identifizierung und molekularen Charakterisierung von neuen, epigenetisch regulierten Kandidatengenen mit potentiell tumorsuppressiven Eigenschaften in Gliomen. Mittels eines Mikroarray-basierten Screening-Ansatzes, der sogenannten „Differential Methylation Hybridization (DMH)“, gelang es, ein neues CpG-reiches DNA-

Fragment auf 14q32.12 zu identifizieren, das ausschließlich in oligodendroglialen Tumoren hypermethyliert vorlag (Felsberg et al. 2005, **Anlage 3**). Keine der hypermethylierten Tumoren zeigte dagegen Allelverluste auf 14q. Insgesamt zeigten 68% der oligodendroglialen Tumoren entweder einen Verlust auf 14q22.3–q32.2 oder eine Hypermethylierung auf 14q32, so dass vermutet werden kann, dass in dieser Region ein oder mehrere Oligodendrogliom-assoziierte potentielle Tumorsuppressorgene liegen könnten. Basierend auf der eigenen Feinkartierung von 1p- und 19q-Deletionen in oligodendroglialen Tumoren (Felsberg et al. 2004) wurde ein cDNA-Mikroarray konstruiert, der neben 7.000 Tumor-relevanten, Gen-spezifischen Sonden zusätzlich 215 cDNA-Fragmente umfasste, die alle Gene in den zuvor identifizierten Kandidatenregionen auf 1p und 19q repräsentierten. Eine Expressionsanalyse von oligodendroglialen Tumoren mit Hilfe dieser cDNA-Mikroarrays erbrachte eine Reihe von differentiell exprimierten neuen Kandidatengenen, die spezifisch in Tumoren mit 1p/19q-Deletionen vermindert exprimiert wurden (Tews et al. 2006, **Anlage 4**). Hierzu zählte u.a. das *CITED4*-Gen auf 1p34.2. Es zeigten sich zwar keine somatische Mutationen in diesem Gen, wir konnten aber nachweisen, dass die niedrige Expression von *CITED4* in 1p/19q-deletierten Gliomen signifikant mit einer Promotorhypermethylierung dieses Gens assoziiert war. Diese wiederum war ähnlich wie die 1p/19q-Deletion mit einem längeren Rezidiv-freien Intervall und einem längeren Gesamtüberleben der betroffenen Patienten verbunden (Tews et al. 2007, **Anlage 5**).

Ein weiteres Kandidatengen, das *EMP3*-Gen auf 19q13.3, zeigte ebenfalls eine verminderte Expression in oligodendroglialen Tumoren mit kombiniertem 1p und 19q Verlust. Auch für *EMP3* fand sich als Ursache des Expressionsverlustes in der Mehrheit der oligodendroglialen Tumoren eine Hypermethylierung des *EMP3*-Promotors, die wiederum signifikant mit Verlusten auf 19q korrelierte. Eine *EMP3* Hypermethylierung fand sich aber auch in der Mehrheit der diffusen und anaplastischen Astrozytome sowie der sich daraus entwickelnden sekundären Glioblastome, während primäre Glioblastome mehrheitlich keine *EMP3*-Promotormethylierung aufwiesen und sogar eine Überexpression auf mRNA-Ebene zeigten (Kunitz et al. 2007, **Anlage 6**). Mit Hilfe der DMH-Methode haben wir zusätzlich das *DUSP4/MKP-2*-Gen gefunden, dass ebenfalls in diffusen und anaplastischen Astrozytomen sowie sekundären Glioblastomen, aber nicht in primären Glioblastomen, häufig durch eine aberrante Promotormethylierung transkriptionell herunterreguliert. *DUSP4/MKP-2* Promotormethylierung und verminderte Expression waren dabei mit *TP53*- und *IDH1*-

Mutationen, dagegen nicht mit *EGFR*-Amplifikation assoziiert (Waha, Felsberg et al. 2009, **Anlage 13**).

Aufbauend auf genomweiten Analysen chromosomaler Imbalancen mit Hilfe der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) haben wir neue genomische Gewinne und Verluste identifiziert, die mit kürzerem Überleben von Patienten mit oligodendroglialen Tumoren assoziiert sind (Trost et al. 2007, **Anlage 7**). Die multivariate Analyse identifizierte für das Gesamtkollektiv der untersuchten Patienten den WHO-Grad, Gewinne auf 7p und Verluste auf 9p als signifikant prognostisch ungünstige Faktoren. Innerhalb der Patientengruppe mit WHO-Grad III Tumoren erwiesen sich Gewinne auf 7p und 8q sowie Verluste auf 18q als signifikante prognostisch ungünstige Parameter. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, dass zusätzlich vom 1p/19q-Status auch die in dieser Arbeit identifizierten, prognostisch ungünstigen molekularen Marker bestimmt werden müssten, um verlässlichere prognostische Aussage über den Verlauf der Erkrankung bei Patienten mit oligodendroglialen Gliomen machen zu können.

Ein weiterer Schwerpunkt der eigenen Arbeiten lag auf der Untersuchung der Rolle von Veränderungen des *MGMT*-Gens, d.h. insbesondere der *MGMT*-Promotormethylierung, in Glioblastomen. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der vergleichenden Untersuchung unterschiedlicher Analyseverfahren zur Bestimmung dieses molekularen Markers sowie der Korrelation dieser Veränderungen mit anderen genetischen Aberrationen und klinischen Daten. In einer methodischen Arbeit konnten wir zeigen, dass die Pyrosequenzierung eine sensitive Methode, die zusätzlich robust und einfach anzuwenden ist und darüber hinaus quantitative Ergebnisse im Vergleich zu der semiquantitativen MSP liefert (Mikeska et al. 2007, **Anlage 8**). In mehreren Arbeiten über die immunhistochemische Bestimmung der *MGMT*-Proteinexpression an unterschiedlichen Tumorserien und mit verschiedenen Antikörpern (Grasbon-Frodl et al. 2007, Pruesser et al. 2008, Felsberg et al. 2009, 2011, **Anlagen 9-12**) konnten wir belegen, dass die *MGMT*-Proteinexpression als Biomarker für die Routinediagnostik weniger geeignet ist als die molekulare Bestimmung der *MGMT*-Promotormethylierung, selbst wenn man „Kontaminationen“ des Tumorgewebes durch Leukozyten, Mikrogliazellen u.ä. separat bestimmt und entsprechende Korrekturen in der Auswertung vornimmt. Zudem bestätigten die eigenen Ergebnisse, dass die DNA-Pyrosequenzierung konkordante Ergebnisse zur Methylierungsspezifischen PCR (MSP) in der Bestimmung der *MGMT*-Promotormethylierung bringt, dass der *MGMT*-

Promotormethylierungsstatus sich zwischen Primär- und Rezidivtumor in der Regel nicht verändert (Felsberg et al. 2011, **Anlage 12**) und dass der Methylierungsstatus in Tumoren regional homogen verteilt ist (Grasbon-Frodl et al. 2007, **Anlage 9**). Letzteres bedeutet, dass auch kleine, z.B. stereotaktisch gewonnene Gewebeproben ausreichen, um zuverlässig den *MGMT*-Promotormethylierungsstatus zu bestimmen. Eine erneute Bestimmung im Rezidiv ist im Regelfall nicht notwendig. Für die Durchführung der molekularen Analytik ist die Art der Gewebeasservierung und -prozessierung von untergeordneter Bedeutung, da sowohl aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe als auch aus tiefgefrorenem Frischgewebe qualitativ gleichwertige Ergebnisse mit der MSP-Methode erzielt werden können (Felsberg et al. 2009, **Anlage 11**).

Des Weiteren untersuchten wir den potentiellen Zusammenhang zwischen *MGMT*-Promotormethylierung und anderen bekannten molekularen Veränderungen in Gliomen, wie z.B. Amplifikationen von *EGFR*, *PDGFRA*, *CDK4* und *MDM2*, *TP53*-Mutationen sowie Allelverluste auf den Chromosomen-Armen 1p, 10q und 19q. Es ergab sich jedoch keine signifikante Assoziation zu einer dieser Alterationen. Sieben bekannte *MGMT*-Polymorphismen, die z.T. mit der *MGMT*-Aktivität assoziiert sein sollen, wurden ebenfalls untersucht. Obwohl wir Hinweise für ein kürzeres Gesamtüberleben in Glioblastom-Patienten mit der c.533A>G *MGMT*-Variante fanden, sind diese Daten zurückhaltend zu interpretieren, da insgesamt nur eine kleine Fallzahl zur Verfügung stand und in unserer Serie nur vereinzelt Polymorphismen nachweisbar waren. Wie bereits in mehreren Arbeiten belegt, konnten wir in einer multivariaten Analyse die *MGMT*-Promotormethylierung und die Tumorresektion als die bedeutsamsten unabhängigen prognostischen Faktoren für Glioblastompatienten identifizieren, die postoperativ eine Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid erhalten (Felsberg et al. 2009, **Anlage 11**). Auch in einer unabhängigen Arbeit über Glioblastomrezidive (Felsberg et al. 2011, **Anlage 12**) bestätigte sich die positive Assoziation zwischen *MGMT*-Promotormethylierung und längerem Progressions-freiem Intervall bzw. Gesamtüberleben. Des Weiteren zeigte sich, dass Patienten mit *MGMT*-methylierten Glioblastomen auch nach dem Rezidiv noch eine längere Überlebenszeit aufweisen, wenn sie erneut chemotherapeutisch behandelt werden.

Der letzte Teil dieser Habilitationsschrift beschäftigte sich mit der diagnostischen und prognostischen Rolle von Mutationen im *IDH1*- oder seltener *IDH2*-Gen in Gliomen. Zum einen konnten wir an einer großen Serie glialer Tumoren Häufigkeit und Verteilung der

einzelnen Mutationen bestimmen und zeigen, dass die R1323C *IDH1*-Mutante eng mit astrozytären Tumoren assoziiert ist, während *IDH2*-Mutationen vorzugsweise in oligodendroglialen Tumoren auftreten. Ferner stellten wir fest, dass sich anaplastische Gliome mit *IDH1*-Mutation im Schnitt sechs Jahre früher manifestieren als histologisch gleichartige Gliome ohne *IDH1*-Mutation (Hartmann et al. 2009, **Anlage 14**). Zur routinemäßigen Bestimmung dieser Mutationen etablierten wir einen Pyrosequenzierungs-basierten quantitativen Assay, mit dem *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen zuverlässig an routinemäßig fixierten und eingebetteten Gewebeproben mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden können. Mit dieser Methode konnten die prognostische Bedeutung von *IDH1*-Mutationen für Patienten mit Glioblastomen bestätigen und nachweisen, dass pleomorphe Xanthoastrozytome im Unterschied zu diffusen Astrozytomen keine *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen aufweisen (Felsberg et al. 2009, **Anlage 15**). Schließlich konnten wir an einer großen, klinisch gut charakterisierten Patientkohorte zeigen, dass dem *IDH1*-Status sogar größere prognostische Relevanz für Patienten mit malignen astrozytären Tumoren zukommt, als die konventionelle histologische Gradierung nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (Hartmann et al. 2010, **Anlage 16**).

Zusammenfassend wurden mit den in dieser Habilitationsschrift grundlagenwissenschaftlichen und translationalen Studien neue molekulare Marker für Gliome identifiziert, molekular charakterisiert und klinisch validiert. Mit den Markern *MGMT*-Promotormethylierung, 1p/19q-Deletion und *IDH1*-/*IDH2*-Mutation stehen seit kurzer Zeit drei prognostische und z.T. auch prädiktive molekulare Marker zur Verfügung, die nun Eingang in die molekulare Diagnostik von Gliomen gefunden haben. Im Rahmen von aktuellen klinischen Therapiestudien werden diese Marker obligat bestimmt und zum Teil als Aufnahmekriterium für bestimmte Studien eingesetzt. Es ist zu erwarten, dass diese und neue molekulare Biomarker in absehbarer Zukunft auch in der Routinediagnostik zur Anwendung kommen und in der nächsten Revision der WHO-Klassifikation von Tumoren des Nervensystems berücksichtigt werden.

4 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Guido Reifenberger bedanken, der meinen wissenschaftlichen Werdegang bis hin zur Habilitation kontinuierlich mit großer Unterstützung begleitet hat. Prof. Reifenberger war und ist mir ein exzellenter klinischer und wissenschaftlicher Mentor, der meinen bisherigen beruflichen Weg in jeder Hinsicht positiv geprägt hat.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Otmar D. Wiestler, Herrn Prof. Torsten Pietsch und besonders auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Waha vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn danken, die mir die Gelegenheit gaben, während meines zweijährigen Aufenthaltes in Bonn sowohl klinisch als auch wissenschaftlich in einem sehr inspirierendem Umfeld zu arbeiten.

Ein großer Dank gebührt den zahlreichen Mitarbeitern unserer eigenen Arbeitsgruppe und den externen Kooperationspartnern, mit denen mich, nicht zuletzt über Prof. Reifenberger, eine Jahre lange enge wissenschaftliche Zusammenarbeit verbinden. Zu nennen sind hier insbesondere Dr. Marietta Wolter und Priv.-Doz. Dr. Christian Hartmann mit denen ich bei der Erstellung mehrerer der in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen intensiv zusammenarbeiten durfte. Ein besonderer Dank richtet sich zudem an die Deutsche Krebshilfe, durch die die erfolgreiche Zusammenarbeit von Grundlagenforschern und Klinikern im Rahmen des Deutschen Gliomnetzwerkes unterstützt wurde, und an das Bundesministerium für Bildung und Forschung, durch welches das Hirntumornetzwerk innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzwerk (NGFN^{plus}) gefördert wird. Die Kooperation innerhalb dieser Verbundprojekte war für mehrere der in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen essentiell wichtig.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Michael Sabel, Neurochirurgische Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf, für die exzellente Zusammenarbeit hinsichtlich der klinischen Daten der in die eigenen Studien eingeschlossenen Düsseldorfer Patienten. Frau Britta Friedensdorf gilt mein ganz besonderer Dank für ihre hervorragende und unermüdliche Unterstützung im Labor.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, meinem Bruder Marc und insbesondere meiner Frau Rita und unseren Töchtern Miriam und Sara bedanken, ohne deren Liebe, uneingeschränkte Unterstützung und Verständnis über viele Jahre hinweg diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005 Jun 1;64(6):479-89.
2. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005 Jan 1;109(1):93-108.
3. Louis DN, Ohgaki H, Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO Classification of tumours of the central nervous system. 2007.
4. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007 May 1;170(5):1445-53.
5. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2008 Dec 1;116(6):597-602.
6. Parsons D, Jones S, Zhang X, Lin J, Leary R, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I, Gallia G, Olivi A, McLendon R, Rasheed B, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam D, Tekleab H, Diaz L, Hartigan J, Smith D, Strausberg R, Marie S, Shinjo S, Yan H, Riggins G, Bigner D, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu V, Kinzler K. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.
7. Reifenberger G, Collins V. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 2004 Oct 1;82(10):656-70.
8. Yan H, Parsons D, Jin G, McLendon R, Rasheed B, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins G, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler K, Velculescu V, Vogelstein B, Bigner D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009 Feb 19;360(8):765-73.
9. Reifenberger G, Louis D. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003 Feb 1;62(2):111-26.
10. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007 Aug 1;114(2):97-109.
11. Miller C, Dunham C, Scheithauer B, Perry A. Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: a clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas. *J Clin Oncol* 2006 Dec 1;24(34):5419-26.
12. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James C, Wechsler W, Collins V. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994 Nov 1;145(5):1175-90.

13. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* 2006 Jun 20;24(18):2707-14.
14. Cairncross J, Ueki K, Zlatescu M, Lisle D, Finkelstein D, Hammond R, Silver J, Stark P, Macdonald D, Ino Y, Ramsay D, Louis D. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998 Oct 7;90(19):1473-9.
15. van den Bent M, Carpentier A, Brandes A, Sanson M, Taphoorn M, Bernsen H, Frenay M, Tijssen C, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros J, van Kouwenhoven M, Vecht C, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006 Jun 20;24(18):2715-22.
16. Griffin C, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart J, Murphy K. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006 Oct 1;65(10):988-94.
17. Jenkins R, Blair H, Ballman K, Giannini C, Arusell R, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown P, Shaw E, Buckner J. 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* 2006 Oct 15;66(20):9852-61.
18. Benetkiewicz M, Idbaih A, Cousin P, Boisselier B, Marie Y, Criniere E, Hoang-Xuan K, Delattre J, Sanson M, Delattre O. NOTCH2 is neither rearranged nor mutated in t(1;19) positive oligodendrogliomas. *PLoS ONE* 2009;4(1):e4107.
19. Burger P. What is an oligodendroglioma? *Brain Pathol* 2002 Apr 1;12(2):257-9.
20. Purow B, Schiff D. Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? *Nat Rev Neurol* 2009 Aug 1;5(8):419-26.
21. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006 Mar 1;9(3):157-73.
22. Ducray F, Idbaih A, de Reyniès A, Bièche I, Thillet J, Mokhtari K, Lair S, Marie Y, Paris S, Vidaud M, Hoang-Xuan K, Delattre O, Delattre J-Y, Sanson M. Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer* 2008 Jan 1;7:41.

23. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach J, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn J, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M. Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009 Oct 5;27(34):5743-50.
24. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppe S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009 Dec 10;27(35):5874-80.
25. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre J. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009 Sep 1;27(25):4150-4.
26. Cairncross J, Macdonald D. Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol* 1988 Apr 1;23(4):360-4.
27. Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 2004 Apr 1;14(2):121-30.
28. Iuchi T, Namba H, Iwadate Y, Shishikura T, Kageyama H, Nakamura Y, Ohira M, Yamaura A, Osato K, Sakiyama S, Nakagawara A. Identification of the small interstitial deletion at chromosome band 1p34-p35 and its association with poor outcome in oligodendroglial tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2002 Oct 1;35(2):170-5.
29. Vogazianou AP, Chan R, Bäcklund LM, Pearson DM, Liu L, Langford CF, Gregory SG, Collins VP, Ichimura K. Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. *Neuro-oncology* 2010 Feb 17;12(7):664-78.
30. Möllemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2005 Jan 20;113(3):379-85.
31. Dong S, Pang J, Poon W, Hu J, To K, Chang A, Ng H. Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001 Aug 1;60(8):808-16.
32. Friedman H, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2000 Jul 1;6(7):2585-97.

33. Kaina B, Christmann M. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002 Aug 1;40(8):354-67.
34. Gerson S. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004 Apr 1;4(4):296-307.
35. Alonso M, Bello M, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, Lomas J, de Campos J, Isla A, Sarasa J, Rey J. Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003 Jul 15;144(2):134-42.
36. Hegi M, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, de Tribolet N, Weller M, Kros J, Hainfellner J, Mason W, Mariani L, Bromberg J, Hau P, Mirimanoff R, Cairncross J, Janzer R, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
37. Dichamp C, Taillibert S, Aguirre-Cruz L, Lejeune J, Marie Y, Kujas M, Delattre J, Hoang-Xuan K, Sanson M. Loss of 14q chromosome in oligodendroglial and astrocytic tumors. *J Neurooncol* 2004 May 1;67(3):281-5.
38. Hu J, Pang J, Tong C, Lau B, Yin X, Poon W, Jiang C, Zhou L, Ng H. High-resolution genome-wide allelotyping identifies loss of chromosome 14q as a recurrent genetic alteration in astrocytic tumours. *Br J Cancer* 2002 Jul 15;87(2):218-24.
39. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RGW, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K, Network CGAR. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010 May 18;17(5):510-22.
40. Hartmann C, Johnk L, Kitange G, Wu Y, Ashworth L, Jenkins R, Louis D. Transcript map of the 3.7-Mb D19S112-D19S246 candidate tumor suppressor region on the long arm of chromosome 19. *Cancer Res* 2002 Jul 15;62(14):4100-8.
41. Tews B, Felsberg J, Hartmann C, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer* 2006 Aug 15;119(4):792-800.
42. Neben K, Tews B, Wrobel G, Hahn M, Kokocinski F, Giesecke C, Krause U, Ho AD, Krämer A, Lichter P. Gene expression patterns in acute myeloid leukemia correlate with centrosome aberrations and numerical chromosome changes. *Oncogene* 2004 Mar 25;23(13):2379-84.
43. Wrobel G, Schlingemann J, Hummerich L, Kramer H, Lichter P, Hahn M. Optimization of high-density cDNA-microarray protocols by 'design of experiments'. *Nucleic Acids Res* 2003 Jun 15;31(12):e67.

44. Kunitz A, Wolter M, van den Boom J, Felsberg J, Tews B, Hahn M, Benner A, Sabel MC, Lichter P, Reifenberger G, von Deimling A, Hartmann C. DNA hypermethylation and aberrant expression of the EMP3 gene at 19q13.3 in Human Gliomas. *Brain Pathol* 2007 Oct 1;17(4):363-70.
45. Alaminos M, Dávalos V, Ropero S, Setién F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung N-KV, Gerald WL, Esteller M. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Research* 2005 Apr 1;65(7):2565-71.
46. Trost D, Ehrler M, Fimmers R, Felsberg J, Sabel MC, Kirsch L, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G, Weber RG. Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2007 Jun 1;120(11):2368-76.
47. Bauman G, Ino Y, Ueki K, Zlatescu M, Fisher B, Macdonald D, Stitt L, Louis D, Cairncross J. Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000 Oct 1;48(3):825-30.
48. Weller M, Berger H, Hartmann C, Schramm J, Westphal M, Simon M, Goldbrunner R, Krex D, Steinbach J, Ostertag C, Loeffler M, Pietsch T, von Deimling A. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? *Clin Cancer Res* 2007 Dec 1;13(23):6933-7.
49. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos W. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 2007 Aug 1;6(8):1079-99.
50. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman S, Hidalgo O, Vanaclocha V, Baylin S, Herman J. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000 Nov 9;343(19):1350-4.
51. Stupp R, Mason W, van den Bent M, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Belanger K, Brandes A, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R, Ludwin S, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross J, Eisenhauer E, Mirimanoff R. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
52. Stupp R, Hegi M, Mason W, van den Bent M, Taphoorn M, Janzer R, Ludwin S, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes A, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht C, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross J, Mirimanoff R. 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* 2009 May 1;10(5):459-66.

53. Everhard S, Kaloshi G, Criniere E, Benouaich-Amiel A, Lejeune J, Marie Y, Sanson M, Kujas M, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre J, Thillet J. MGMT methylation: A marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol* 2006 Dec 1;60(6):740-3.
54. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes A, van den Bent M, Wick W, Hegi M. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010 Jan 1;6(1):39-51.
55. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JWM, Ibdaih A, Brandes AA, Taphoorn MJB, Frenay M, Lacombe D, Gorlia T, Dinjens WNM, Kros JM. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* 2009 Dec 10;27(35):5881-6.
56. Esteller M, Hamilton S, Burger P, Baylin S, Herman J. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999 Feb 15;59(4):793-7.
57. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hübner A, Ehrentraut D, Schramm J, Felsberg J, Kahl P, Büttner R, Pietsch T, Waha A. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 2007 Jul 1;9(3):368-81.
58. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, Schackert G, Kreth FW, Pietsch T, Loeffler M, Weller M, Reifenberger G, Tonn J-C. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer* 2011:in press.
59. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer* 2009 Jul 7;101(1):124-31.
60. Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruitter M, Schnell O, Bise K, Felsberg J, Reifenberger G, Tonn J-C, Kretschmar HA. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer* 2007 Dec 1;121(11):2458-64.
61. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou M-F, Diserens A-C, Stupp R, Gorlia T, Marosi C, Heinzl H, Hainfellner JA, Hegi M. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol* 2008 Oct 1;18(4):520-32.
62. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, Steiger H-J, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC. Prognostic significance of molecular

- markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2009 Nov 1;15(21):6683-93.
63. Felini M, Olshan A, Schroeder J, North K, Carozza S, Kelsey K, Liu M, Rice T, Wiencke J, Wrensch M. DNA repair polymorphisms XRCC1 and MGMT and risk of adult gliomas. *Neuroepidemiology* 2007;29(1-2):55-8.
 64. Ogino S, Hazra A, Tranah G, Kirkner G, Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Meyerhardt J, Hunter D, Fuchs C. MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007 Sep 1;28(9):1985-90.
 65. Preusser M. MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. *Histol Histopathol* 2009 Apr 1;24(4):511-8.
 66. Bugni J, Han J, Tsai M, Hunter D, Samson L. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA Repair (Amst)* 2007 Aug 1;6(8):1116-26.
 67. Pegg A, Fang Q, Loktionova N. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair (Amst)* 2007 Aug 1;6(8):1071-8.
 68. Shen M, Purdue M, Krickler A, Lan Q, Grulich A, Vajdic C, Turner J, Whitby D, Chanock S, Rothman N, Armstrong B. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. *Haematologica* 2007 Sep 1;92(9):1180-5.
 69. Yang M, Coles B, Caporaso N, Choi Y, Lang N, Kadlubar F. Lack of association between Caucasian lung cancer risk and O6-methylguanine-DNA methyltransferase-codon 178 genetic polymorphism. *Lung Cancer* 2004 Jun 1;44(3):281-6.
 70. Crosbie P, McGown G, Thorncroft M, O'Donnell P, Barber P, Lewis S, Harrison K, Agius R, Santibanez-Koref M, Margison G, Povey A. Association between lung cancer risk and single nucleotide polymorphisms in the first intron and codon 178 of the DNA repair gene, O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Int J Cancer* 2008 Feb 15;122(4):791-5.
 71. Quinn J, Desjardins A, Weingart J, Brem H, Dolan M, Delaney S, Vredenburgh J, Rich J, Friedman A, Reardon D, Sampson J, Pegg A, Moschel R, Birch R, McLendon R, Provenzale J, Gururangan S, Dancey J, Maxwell J, Tourt-Uhlig S, Herndon J, Bigner D, Friedman H. Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 2005 Oct 1;23(28):7178-87.
 72. Boulay J, Miserez A, Zweifel C, Sivasankaran B, Kana V, Ghaffari A, Luyken C, Sabel M, Zerrouqi A, Wasner M, Van Meir E, Tolnay M, Reifenberger G, Merlo A. Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS ONE* 2007;2(6):e576.

73. Palmisano W, Divine K, Saccomanno G, Gilliland F, Baylin S, Herman J, Belinsky S. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000 Nov 1;60(21):5954-8.
74. Cahill D, Levine K, Betensky R, Codd P, Romany C, Reavie L, Batchelor T, Futreal P, Stratton M, Curry W, Iafrate A, Louis D. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res* 2007 Apr 1;13(7):2038-45.
75. Friedman H, Johnson S, Dong Q, Schold S, Rasheed B, Bigner S, Ali-Osman F, Dolan E, Colvin O, Houghton P, Germain G, Drummond J, Keir S, Marcelli S, Bigner D, Modrich P. Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Res* 1997 Jul 15;57(14):2933-6.
76. Friedman H, McLendon R, Kerby T, Dugan M, Bigner S, Henry A, Ashley D, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, Marchev F, Seman A, Cokgor I, Rich J, Stewart E, Colvin O, Provenzale J, Bigner D, Haglund M, Friedman A, Modrich P. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol* 1998 Dec 1;16(12):3851-7.
77. Hunter C, Smith R, Cahill D, Stephens P, Stevens C, Teague J, Greenman C, Edkins S, Bignell G, Davies H, O'Meara S, Parker A, Avis T, Barthorpe S, Brackenbury L, Buck G, Butler A, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gorton M, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Kosmidou V, Laman R, Lugg R, Menzies A, Perry J, Petty R, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Solomon H, Tofts C, Varian J, West S, Widaa S, Yates A, Easton D, Riggins G, Roy J, Levine K, Mueller W, Batchelor T, Louis D, Stratton M, Futreal P, Wooster R. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer Res* 2006 Apr 15;66(8):3987-91.
78. Yip S, Miao J, Cahill D, Iafrate A, Aldape K, Nutt C, Louis D. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res* 2009 Jul 15;15(14):4622-9.
79. Network C. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.
80. Maxwell J, Johnson S, McLendon R, Lister D, Horne K, Rasheed A, Quinn J, Ali-Osman F, Friedman A, Modrich P, Bigner D, Friedman H. Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2008 Aug 1;14(15):4859-68.
81. Gomori E, Pal J, Meszaros I, Doczi T, Matolcsy A. Epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in progression of gliomas. *Diagn Mol Pathol* 2007 Jun 1;16(2):104-7.
82. Kanamori M, Kumabe T, Sonoda Y, Nishino Y, Watanabe M, Tominaga T. Predictive factors for overall and progression-free survival, and dissemination in oligodendroglial tumors. *J Neurooncol* 2009 Jun 1;93(2):219-28.

83. Papait R, Magrassi L, Rigamonti D, Cattaneo E. Temozolomide and carmustine cause large-scale heterochromatin reorganization in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Feb 6;379(2):434-9.
84. Weller M, Wick W, Hegi ME, Stupp R, Tabatabai G. Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? *Future Oncol* 2010 Sep 1;6(9):1407-14.
85. Waha A, Felsberg J, Hartmann W, von dem Knesebeck A, Mikeska T, Joos S, Wolter M, Koch A, Yan PS, Endl E, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, Waha A. Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer Research* 2010 Feb 15;70(4):1689-99.
86. Waha A, Rodrigues FJ, Waha A, Meyer Puttlitz B, Cavenee W, Wiestler O, Huang T, Yan P. Methylation profiling identifies epigenetic markers for high-grade gliomas. *Cancer Genomics and Proteomics* 2004;1:209-14.
87. Xu S, Furukawa T, Kanai N, Sunamura M, Horii A. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *J Hum Genet* 2005 Jan 1;50(4):159-67.
88. Chitale D, Gong Y, Taylor BS, Broderick S, Brennan C, Somwar R, Golas B, Wang L, Motoi N, Szoke J, Reinersman JM, Major J, Sander C, Seshan VE, Zakowski MF, Rusch V, Pao W, Gerald W, Ladanyi M. An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors. *Oncogene* 2009 Aug 6;28(31):2773-83.
89. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 2009 Oct 1;118(4):469-74.
90. Felsberg J, Wolter M, Seul H, Friedensdorf B, Göppert M, Sabel MC, Reifenberger G. Rapid and sensitive assessment of the IDH1 and IDH2 mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. *Acta Neuropathol* 2010 Apr 1;119(4):501-7.
91. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A. 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* 2010 Nov 19;120(6):707-18.
92. Fu Y, Huang R, Du J, Yang R, An N, Liang A. Glioma-derived mutations in IDH: from mechanism to potential therapy. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 2010 May 26.

93. Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, Kros JM, van Heuvel I, Bromberg JE, Zonnenberg BA, Zonnenberg CBL, Postma TJ, Gijtenbeek JMM, Boogerd W, Groenendijk FH, Smitt PAES, Dinjens WNM, van den Bent MJ. IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide. *Neurology* 2009 Nov 24;73(21):1792-5.
94. Kim Y-H, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nakazato Y, Tanaka Y, Vital A, Mariani L, Stawski R, Watanabe T, De Girolami U, Kleihues P, Ohgaki H. Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol* 2010 Dec 1;177(6):2708-14.
95. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Rabinowitz JD, Dang CV, Riggins GJ. Inhibition of Glutaminase Preferentially Slows Growth of Glioma Cells with Mutant IDH1. *Cancer Research* 2010 Nov 2;70(22):8981-7.
96. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, Schmieder K, Wesseling P, Mawrin C, Hasselblatt M, Louis DN, Korshunov A, Pfister S, Hartmann C, Paulus W, Reifenberger G, von Deimling A. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011 Mar;121(3):397-405.
97. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan K, Xiong Y. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* 2009 Apr 10;324(5924):261-5.
98. Hughes JM, Groot AJ, van der Groep P, Sersansie R, Vooijs M, van Diest PJ, Van Noorden CJF, Schlingemann RO, Klaassen I. Active HIF-1 in the normal human retina. *J Histochem Cytochem* 2010 Mar 1;58(3):247-54.
99. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2010 Jun 17;462:739-46.
100. Bleeker F, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop W, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A, Bardelli A. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1 (R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat* 2009 Jan 1;30(1):7-11.
101. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJM, Thompson CB, Levine RL, Melnick A. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010 Dec 14;18(6):553-67.

102. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao M-T, Liu L-X, Jiang W-Q, Liu J, Zhang J-Y, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu Y-H, Lei Q-Y, Guan K-L, Zhao S-M, Xiong Y. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* 2011 Jan 18;19(1): 17-30.

6 ANHANG

Übersicht der Originalarbeiten, die dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrunde liegen:

- Anlage 1: **Felsberg J**, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G (2004) Oligodendroglial tumors: Refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 14:121-130.
- Anlage 2: Möllemann M, Wolter M, **Felsberg J**, Collins VP, Reifenberger G (2004) Frequent promoter hypermethylation and low expression of the *MGMT* Gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 113:379-385.
- Anlage 3: **Felsberg J**, Yan PS, Huang TH, Milde U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, Waha A (2006) DNA methylation and allelic losses on chromosome arm 14 q oligodendroglial tumors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32: 517-524.
- Anlage 4: Tews B, **Felsberg J**, Hartmann C, Kunitz A, Hahn M, Topedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P (2006) Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer* 119:792-800.
- Anlage 5: Tews B, Roerig P, Hartmann C, Hahn M, **Felsberg J**, Blaschke B, Sabel M, Kunitz A, Toedt G, Neben K, Benner A, Deimling AV, Reifenberger G, Lichter P (2007) Hypermethylation and transcriptional downregulation of the *CITED4* gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q. *Oncogene* 26:5010-6.
- Anlage 6: Kunitz A, Wolter M, van den Boom J, **Felsberg J**, Tews B, Hahn M, Benner A, Sabel M, Lichter P, Reifenberger G, von Deimling A, Hartmann C (2007) DNA hypermethylation and aberrant expression of the *EMP3* gene at 19q13.3 in human gliomas. *Brain Pathol* 17:363-70.
- Anlage 7: Trost D, Ehrler M, Fimmers R, **Felsberg J**, Sabel M, Kirsch L, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G, Weber RG (2007) Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 120:2368-76.
- Anlage 8: Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J, **Felsberg J**, Kahl P, Buttner R, Pietsch T, Waha A (2007) Optimization of quantitative *MGMT* promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 9:368-81.
- Anlage 9: Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruitter M, Schnell O, Bise K, **Felsberg J**, Reifenberger G, Tonn JC, Kretschmar H (2007) Intratumoral homogeneity of

MGMT promotor hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer* 121:2458-64.

- Anlage 10: Preusser M, Janzer RC, **Felsberg J**, Reifenberger G, Hamou MF, Diserens AC, Stupp R, Gorlia T, Marosi C, Heinzl H, Hainfellner JA, Hegi M (2008) Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: Observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol* 18:520-532.
- Anlage 11: **Felsberg J**, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goeppert M, Steiger HJ, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC (2009) Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 15:6683-93.
- Anlage 12: **Felsberg J**, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, Schackert G, Kreth FW, Pietsch T, Loeffler M, Weller, Reifenberger G, Tonn JC, for the German Glioma Network (2011) Promoter methylation and expression of *MGMT* and the DNA mismatch repair genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2* in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer* (in press).
- Anlage 13: Waha A*, **Felsberg J***, Hartmann w, von dem Knesebeck A, Mikeska T, Joos S, Wolter M, Koch A, Yan PS, Endl E, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, Waha A (2009) Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer Res* 70:1689-99. (*gleichberechtigte Erstautoren)
- Anlage 14: Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, **Felsberg J**, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A (2009) Type and frequency of *IDH1* and *IDH2* mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 118:469-74.
- Anlage 15: **Felsberg J**, Wolter M, Seul H, Friedensdorf B, Göppert M, Sabel MC, Reifenberger G. (2009) Rapid and sensitive diagnostic assessment of the *IDH1* and *IDH2* mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. *Acta Neuropathol* 119:501-507.
- Anlage 16: Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, **Felsberg J**, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller, M, Loeffler M, von Deimling A. (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* 120:707-18.