



Roger Stupp<sup>1</sup> und Monika E. Hegi<sup>2</sup>

# Sinnvolle Biomarker zur Diagnose und Therapiewahl von Gliomen

**Für die histopathologische Nosologie von Gliomen steht der Nachweis bzw. das Fehlen einer Mutation in den Isocitrat-Dehydrogenase-Genen 1 und 2 (IDH1/2) im Vordergrund. Gliome mit einer Mutation in einem der beiden IDH-Gene haben eine deutlich bessere Prognose als Tumore mit intaktem (Wildtyp) IDH1 und 2. Für die IDH1/2-mutierten niedriggradigeren Gliome (WHO II and III), mit morphologisch astrozytärer oder oligodendroglialer Differenzierung, müssen für die neue Klassifizierung zusätzliche Marker erfasst werden. Der Nachweis einer Co-Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q ist obligatorisch für die Diagnose von Oligodendrogliomen. Charakteristisch für den astrozytären Subtyp ist der Verlust der Expression des ATRX-Proteins. Die Methylierung des Promoters des Methyl-Guanin-Methyl-Transferase-(MGMT)-Gens ist insbesondere bei Glioblastomen ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine alkylierende Chemotherapie. Im Zusammenspiel erlauben diese Marker eine präzise Diagnose und Prognose, was hilft, individuelle Therapieentscheidungen zu treffen (Abb. 1).**

## IDH1/2-Mutationen

Morphologisch lassen sich primäre und sekundäre, d.h. aus einem niedriggradigeren Tumor hervorgegangene, Glioblastome nicht unterscheiden. Klinisch beruhte die Abgrenzung lediglich auf der Anamnese mit Vorhandensein von Symptomen während >6 Monaten, bzw. einer vorgängigen Diagnose eines niedriggradigeren Glioms. Entsprechend fehlt bei allen bisherigen Therapie-Studien eine präzise Abgrenzung. Obwohl bereits seit vielen Jahren primäre und sekundäre Gli-

werden. In Glioblastomen kommen fast ausschließlich IDH1-Mutationen vor, sie gelten heute als pathognomonisch für sekundäre Glioblastome. IDH-Mutationen erfolgen früh in der Pathogenese der Gliome. IDH katalysieren die Umwandlung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ KG) im Zytoplasma (IDH1) und in den Mitochondrien (IDH2, Krebszyklus). Mutiertes IDH1 und 2 haben eine sogenannte «neomorphe» Funktion und konvertieren  $\alpha$ KG zu 2-Hydroxyglutarat (2HG), welches akkumuliert wird. Die Folge ist Inhibition von  $\alpha$ KG-abhängigen Enzymen durch 2HG, was zu einer DNS-Hypermethylierung führt, bekannt als «Methylierungs-Phänotyp» (G-CIMP, *glioma-CpG-island methylator phenotype*). Der Nachweis der häufigsten IDH1-Mutation (R132H) lässt sich immunhistochemisch mit einem spezifischen und kommerziell erhältlichen Antikörper erbringen, was rund 85–90% der IDH-Mutationen abdeckt. Bei immun-histochemisch negativem Befund sollte bei klinischem Verdacht auf ein sekundäres Glioblastom und bei niedriggradigeren Gliomen eine Sequenzierung des IDH1- und IDH2-Gens erfolgen.

Die Prognose von Gliom-Patienten, deren Tumore eine IDH-Mutation aufweisen, ist deutlich besser als die von Tumoren ohne IDH-Mutation. Eine IDH-Mutation ist ein prognostisch bedeutenderer Marker als der Malignitätsgrad (Grad 4 [Glioblastome] versus Grad 3 [anaplastische Astrozytome]). Folglich werden Gliome

grundsätzlich als IDH-Wildtyp-Glioblastome und diffuse Astrozytome oder IDH-mutiert (v.a. sekundäre Glioblastome und Astrozytome, Oligodendrogliome) klassifiziert.

## 1p/19q-Co-Deletion

Die ausgesprochene Sensitivität für alkylierende Chemotherapien, aber letztlich auch die insgesamt bessere Prognose unabhängig von der Therapiewahl der Oligodendrogliome, wurde bereits vor über 20 Jahren erkannt. Charakteristisch für Oligodendrogliome ist das Vorhandensein einer Co-Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q (1p/19q), welche mit einer Translokation von Chromosom 1 zu Chromosom 19 [t(1;19)(q10;p10)] einhergeht, deren funktionale Konsequenzen noch nicht verstanden sind (vermutet werden Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen). In der aktualisierten Klassifikation 2016 ist die Identifizierung einer 1p/19q-Co-Deletion, zusätzlich zur IDH-Mutation, eine Bedingung zur Diagnosestellung eines Oligodendroglioms. Oligodendrogliome haben einen langsameren Verlauf, mit mittleren Überlebenszeiten von bis zu 15 und mehr Jahren. Für diagnostische Zwecke ist es oft sinnvoll, eine ATRX-Expressionsanalyse mittels eines kommerziellen Antikörpers vorzunehmen. Der Verlust von ATRX-Expression aufgrund einer Mutation ist charakteristisch für astrozytäre IDH mutierte, niedriggradigere Gliome (WHO II und III) und schliesst eine 1p/19q-Co-Deletion aus

## Der MGMT-Methylierungsstatus in Glioblastomen ist der erste und wichtigste prädiktive Marker in der Neuro-Onkologie.

oblastome mit unterschiedlichen molekularen Profilen assoziiert worden sind, war die ungleiche Prognose nicht so klar. Im Jahre 2008 wurden durch Genom-weite Sequenzierung Mutationen im Codon 132 des IDH1-Genes in 5–10% der Glioblastome nachgewiesen, v.a. bei jüngeren Patienten. Am häufigsten finden sich IDH Mutationen allerdings in niedriggradigeren Gliomen mit bis zu über 80%, wobei über 90% in IDH1 und lediglich 10% in IDH2 (Codon 172) gefunden

1 Prof. Roger Stupp, Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago

2 Prof. Monika E. Hegi, Lausanne University Hospital (CHUV), Neuroscience Research Center, Epalinges

## Biomarqueurs pertinents pour le diagnostic des gliomes et le choix du traitement

Dans la classification OMS actualisée des tumeurs du système nerveux central, les caractéristiques moléculaires font pour la première fois partie intégrante du diagnostic. Outre la classification et la gradation morphologiques, de nouvelles connaissances relatives à la pathogenèse et au pronostic sont désormais intégrées. Ces facteurs moléculaires revêtent une pertinence clinique croissante, à la fois sur le plan diagnostique et pronostique, mais également en tant que facteurs prédictifs pour les décisions thérapeutiques individuelles. Ce bref article de revue a pour objectif d'expliquer la signification pratique des principaux marqueurs actuellement utilisés dans le quotidien clinique, à savoir les mutations IDH, les codélétions 1p/19q et la méthylation de MGMT.

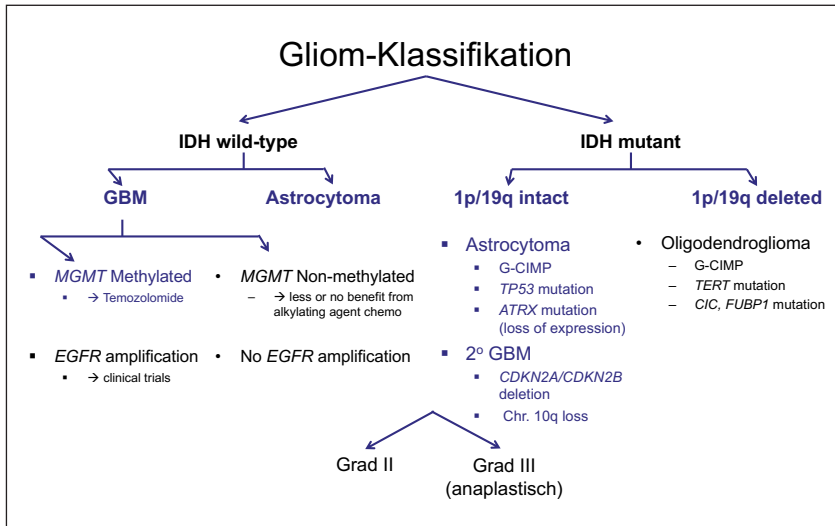


Abbildung 1: Gliom-Klassifikation

(exklusiv). D.h. nur für ATRX-exprimierende IDH-mutierte niedriggradigere Gliome muss eine 1p/19q-Co-Deletion nachgewiesen werden, was technisch, zeitlich und kostenmässig aufwändiger ist.

### MGMT-Gen-Promoter-Methylierung

Alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid (Temodal®) oder Nitrosoharnstoffe (Lomustin [CCNU, CiNU®] oder Carmustine [BCNU, BiCNU®]) induzieren DNS-Alkyladdukte. Die Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT), ein ubiquitäres DNA-Reparatur-Protein, repariert Adukte an der O6-Position des Guanins, einer der zytotoxischsten Läsionen von Alkylantien, indem die Alkylgruppe auf das Enzym transferiert wird, wobei das MGMT-Protein konsumiert wird. Bei fehlendem oder ungenügendem Vorhandensein von MGMT erfolgt keine Reparatur. Bei der nächsten DNS-Replikation kommt es zu einer fehlerhaften Basenpaarung, welches von der *mismatch*-Reparatur erkannt wird, es aber nicht reparieren kann. In der Folge, und abhängig von der *mismatch*-Reparatur-Maschinerie, kommt es zu DNA-Doppelstrang-Brüchen, welche zu einer letalen Zellschädigung führen.

Durch epigenetische Methylierung des Gen-Promoters ist bei 35–45% der Glioblastome das MGMT-Gen inaktiviert (*silenced*) und der Tumor somit nicht genügend in der Lage, den durch die alkylierende Chemotherapie induzierten Schaden rechtzeitig zu reparieren. Wir und andere konnten zei-

gen, dass diese Tumore besonders gut auf Temozolomid und andere Alkylantien ansprechen und die Überlebenszeit dieser Patienten durch die Chemotherapie deutlich verlängert wird. In der Praxis wird die MGMT-(Gen-Promoter-)Methylierung durch eine Methylierungs-spezifische PCR (polymerase chain reaction) bestimmt. Ein immunhistochemischer Nachweis von MGMT-Protein-Expression oder fehlender Expression kann eine Methylierungs-Analyse nicht ersetzen. Der MGMT-Methylierungsstatus in Glioblastomen ist der erste und wichtigste prädiktive Marker in der Neuro-Onkologie.

### Klinische Relevanz

Im klinischen Alltag müssen wir diagnostische, prognostische und prädiktive Marker unterscheiden, wobei die Übergänge fließend und überlappend sind. Insbesondere in der Onkologie mit zunehmend spezifischen Therapien sind die prädiktiven Marker von grossem Interesse. Naturgemäss ist kein Marker absolut, es gibt alternative molekulare Resistenzmechanismen, die zusammen mit klinischen Faktoren das Ansprechen auf Therapie bzw. das Überleben mit beeinflussen. Der Einsatz der Marker im Alltag setzt Erfahrung, Verständnis für die zugrunde liegende Biologie und Kenntnis der Methodologie und ihrer Grenzen voraus. Die Nachweisgrenze, Definition des klinisch relevanten Schwellenwerts (und dessen Konfidenzintervall oder Grauzone) und Reproduzierbarkeit eines

Tests, zusammen mit unterschiedlicher Qualität, Konservierung des biologischen Materials und intratumoraler Heterogenität, sind immer wieder eine Herausforderung.

Pathologisch und diagnostisch steht die Unterscheidung in IDH-mutierte und nicht-mutierte Gliome im Vordergrund, und bei IDH-mutierten tiefergradigen Tumoren das Vorliegen einer 1p/19q-Co-Deletion. Letzteres ist pathognomonisch für eine prognostisch besonders günstige Untergruppe der Gliome, die lediglich ein langsames Wachstum über viele Jahre zeigen und besonders gut auf Therapien (sei es Bestrahlung oder alkylierende Chemotherapie) ansprechen. Erst danach wird auch die herkömmliche histologisch-morphologische WHO-Gradierung von I–IV (Grad 1: pilozytische Gliome; Grad II: diffuse Gliome; Grad III: anaplastische Gliome; Grad IV: Glioblastome) berücksichtigt. Allerdings basieren sämtliche relevanten bisherigen grossen klinischen Studien auf der klassischen morphologischen Diagnostik, die neuen Marker wurden erst anschliessend – retrospektiv – etabliert.

Der häufigste hirneigene maligne Tumor des Erwachsenen bleibt das Glioblastom IDH Wildtyp (WHO-Grad IV). Es steht für 90% aller Glioblastome, und entwickelt sich *de novo* und ohne IDH-Mutation. Primäre Temozolomid-Chemo- und konkomitante Radiotherapie gefolgt von adjuvanter Chemotherapie verlängern das Überleben. Die MGMT-Gen-Promoter-Methylierung ist der stärkste prognosti-

sche Faktor und v.a. auch prädiktiv für das Ansprechen auf Temozolomid (TMZ). Patienten mit Tumoren ohne MGMT-Methylierung scheinen kaum von TMZ zu profitieren. Trotz *evidence based medicine* wird im klinischen Alltag TMZ dennoch meist bei allen Patienten eingesetzt. Grund dafür ist die z.Zt. noch fehlende bessere therapeutische Alternative. Im Rahmen klinischer Studien wird bei nicht-methylierten Tumoren TMZ durch andere, erfolgversprechende Test-Substanzen ersetzt. Verschiedentlich wird versucht, die qualitative und semiquantitative Methodik zur MGMT-Bestimmung mittels Methylierungs-spezifischer PCR durch andere quantitative Methoden wie Pyrosequenzierung zu ersetzen. Ob dies im Alltag einen echten Vorteil darstellt, gegenüber der im Rahmen grosser klinischer Studien validierten Methode, bleibt zu zeigen.

Eine Zwischenanalyse einer grossen internationalen Studie unter der Leitung der EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) hat kürzlich gezeigt, dass der frühzeitige adjuvante Einsatz von TMZ auch bei Patienten mit Grad-III (anaplastischen) Gliomen die Überlebenszeit verlängert. Die gleiche Gruppe ebenso wie die Kollegen der RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) in den USA hatten bereits früher zeigen können, dass adjuvante alkylierende Chemotherapie mit der Kombination von PCV (Procarbazine, CCNU und Vincristin) das Überleben sowohl bei Grad-III- wie auch Grad-II-Tumoren verlängert, allerdings wird dieser Effekt erst nach einer Nachbeobachtungszeit von über 10 Jahren evident. Es scheinen v.a. Patienten mit einer IDH-Mutation und einer 1p/19q-Co-Deletion zu profitieren.

Die Verteilung dieser einzelnen Marker ist nicht zufällig, sondern voneinander abhängig. In den IDH-mutierten Tumoren ist MGMT in über 90% methyliert. Das wird auf den Methylierungs-Phänotyp (G-CIMP) zurückgeführt, der wie oben diskutiert durch die IDH-Mutation induziert wird. D.h. im Alltag kann in den IDH-mutierten Gliomen auf eine MGMT-Analyse verzichtet werden. Ebenso sind die 1p/19q-co-deletierten Gliome eine Untergruppe der IDH-mutierten Tumore. Die Abbildung 2 zeigt die Verteilung und Abhängigkeit der Marker, analysiert im Rahmen einer Studie mit Patienten mit konventionell-histologischer Diagnose eines niedriggradigen (Grad-II)Glioms.

### Konklusionen 2017

Sämtliche grossen klinischen Studien der letzten 20 Jahre haben gezeigt, dass der frühzeitige Einsatz von Chemotherapie (sei es Temozolomid oder PCV) konkomitant und/oder adjuvant zur Strahlentherapie zu einer Überlebenszeit-Verlängerung führt. Retrospektive molekulare Analysen zeigen, dass dieser Effekt in erster Linie bei «chemosensitiven» Tumoren nachweisbar ist, d.h. bei MGMT-Methylierung im Glioblastom, bei IDH-mutierten Grad-II und Grad-III-Gliomen und vor allem bei Oligodendrogliomen, einem IDH-mutierten Subtyp mit besonders langsamem Verlauf, der sich definiert durch das Vorhandensein einer 1p/19q-Co-Deletion. Für Patienten mit den prognostisch ungünstigsten Tumoren – Glioblastome ohne MGMT-Methylierung – sind neuartige experimentelle Therapieansätze, auch unter Verzicht der gegenwärtigen Standard-Therapie, im Rahmen von klinischen Protokollen indiziert. Umgekehrt sind Fragen der Therapie-De-Eskalation, bzw. ein optimaler sequentieller Einsatz verschiedenster Therapiemodalitäten bei Patienten mit

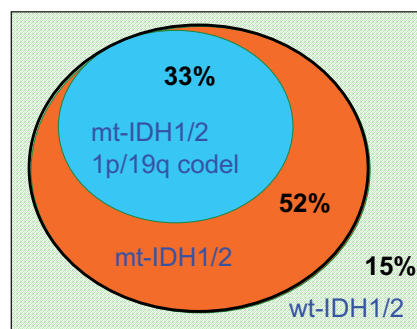


Abbildung 2: Verteilung der molekularen Marker bei niedriggradigen Gliomen. Ref. Baumert, Hegi, van den Bent et al. Lancet Oncol 2016.

besonders guter Prognose-Oligodendrogliome mit 1p/19q-Co-Deletion, im Rahmen von Studien zu prüfen (der formale Standard ist Bestrahlung gefolgt von Chemotherapie). Für Patienten mit diffusen Grad-II (*low-grade*) oder Grad-III (anaplastischen) Gliomen ohne IDH-Mutation ist aufgrund der heutigen Erkenntnisse ein intensiver Therapie-Ansatz ähnlich zu den Glioblastomen zu favorisieren.

Korrespondenz:  
Monika.Hegi@chuv.ch

### Literatur

- Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 29(10):204.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352(10):997–1003.
- Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *Lancet Oncol*. 2016; 17(11):1521–1532.
- Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol*. 2013; 31(3):344–350.
- Waitkus MS, Diplis BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol*. 2016; 18(1):16–26