

Bedeutung für Diagnose und Therapie

# Molekulare Marker

Über das letzte Jahrzehnt haben sich molekulare Marker für Diagnostik und Therapieentscheidung bei malignen Gliomen etabliert. In dieser kurzen praxisorientierten Zusammenstellung konzentrieren wir uns auf drei zwischenzeitlich validierte Marker, die im klinischen Alltag unentbehrlich geworden sind; den kombinierte Verlust der Chromosomenarme 1p und 19q, die aberrante Promotor-Methylierung des O6-Methylguanin-DNS-methyltransferase (MGMT)-Gens und Mutationen der Isocitratdehydrogenase (IDH)-1 oder IDH-2 Gene.



Au cours de la dernière décennie, des marqueurs moléculaires pour le diagnostic et la décision de traitement dans les gliomes malins ont été mis en place. Dans cette brève compilation pratique, nous nous concentrons sur trois marqueurs validés entre-temps dans la pratique clinique qui sont devenus indispensables; la perte combinée des bras des chromosomes 1p et 19q, la méthylation du promoteur aberrante du gène de la O6-méthylguanine ADN méthyltransférase (MGMT) et des mutations des gènes de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) -1 et IDH-2.

Trotz verbesserter Therapien mit chirurgischer Resektion, Bestrahlung gleichzeitig mit konkomitanter Chemotherapie, allenfalls auch wiederholter Chirurgie und Radiotherapie, sowie Verabreichung mehrerer Linien zytotoxischer und zielgerichteter Chemotherapie ist die durchschnittliche Prognose von Patienten mit malignen Gliomen insgesamt nur wenig verbessert worden. Einzelne Patienten sprechen jedoch ausserordentlich gut auf diese Therapien an, und auch Langzeit-Überleben mit guter Lebensqualität kann heute bei 10-15% der Glioblastom-Patienten erwartet werden. Allgemeine und gut belegte günstige prognostische Faktoren wie junges Alter, makroskopisch komplette Tumorsektion, guter Allgemeinzustand, u. a. helfen bei der individuellen Therapie-Entscheidung wenig. Nur wenige Faktoren sind prädiktiv für das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie. Drei molekulare Parameter haben im

Bereich der Gliome in den letzten Jahren bzw. Monaten erheblich an Bedeutung gewonnen.

## Klinische Situationen

An 3 Beispielen soll die klinische Wertigkeit der einzelnen Marker illustriert werden:

### 1. MGMT

Bei einem 70-jährigen Patienten in gutem Allgemeinzustand wurde mittels Tumor-Teilresektion ein Glioblastom nachgewiesen. Seit der Tumorsektion ist er neurologisch stabil und ohne evidente Defizite. Er steht dennoch weiteren therapeutischen Massnahmen eher kritisch gegenüber. Seine statistische mittlere Lebenserwartung mit Standard Chemoradiotherapie (TMZ/RT→TMZ) ist 12.8 Monate, die 2-Jahres Lebenserwartung 17.5%. Im Wissen um seinen methylierten MGMT-Status steigt die mittlere Lebenserwartung auf 16.4 Monate, die 2-J. Überlebenswahrscheinlichkeit liegt nun bei 48% (!). Neuere Studien haben gezeigt, dass bei älteren und fragilen Patienten eine alleinige TMZ-Chemotherapie zur Lebensverlängerung und Erhaltung der Lebensqualität führt, dies jedoch nur bei Patienten mit einem methylierten MGMT-Promotor. Bei Patienten mit nicht-methyliertem MGMT ist alleinige RT angezeigt.

Für jüngere Patienten wird die Bedeutung des MGMT Methylierungs-Status für die initiale Therapieentscheidung kontrovers diskutiert. Insbesondere das Fehlen einer besseren, alternativen Therapieempfehlung und die insgesamt gute Verträglichkeit der Kombinations-Chemoradiotherapie verleitet zum Beibehalten der TMZ-Chemotherapie. Im Anschluss an die Chemoradiotherapie (und bis zu 3–6 Monate



Prof. Dr. med. Roger Stupp  
Lausanne



Prof. Dr. sc. nat. Monika E. Hegi  
Lausanne



Prof. Dr. med. Michael Weller  
Zürich

TAB. 1 Molekuläre Marker				
Marker	Diagnose	prognostisch	prädiktiv	Bemerkungen
IDH1/2 Mutation	++	++	–	in der Praxis wird meist die häufigste IDH1 Mutation immunohistochemisch nachgewiesen.
Co-deletion 1p/19q	++	++	+	Der prädiktive Wert ist lediglich in anaplastischen Tumoren belegt
MGMT Methylierung				Die Bedeutung des MGMT Status ist unterschiedlich in den verschiedenen Tumor-entitäten. In LGG bisher nur bedingt untersucht.
GBM	–	+	++	
AA	–	+	–	
LGG	–	(+)	(?)	

TAB. 2 Abkürzungen	
Abkürzung	Erklärung
GBM	Glioblastom (das früher gebräuchliche multiforme ist nach neuester Klassifikation von 2007 nicht mehr in Verwendung), WHO Grad IV
AA	Anaplastisches Astrozytom; WHO Grad III
LGG	Low-grade (niedriggradige) Gliome; WHO Grad II
TMZ	Temozolomid (Temodal®, MSD Pharma)
RT	Radiotherapie: für GBM in der Regel fraktioniert, 30 x 2 Gy.
TMZ/RT→TMZ	Standardtherapie: Radiotherapie mit konkomitanter TMZ-Chemotherapie, gefolgt von bis zu 6 adjuvanten TMZ-Zyklen
IDH1 and 2	Isozitatdehydrogenase 1 and 2. Enzyme, die die Reaktion von Isozitat zu alpha-Ketoglutarat katalysieren. Varianten: <i>IDH1</i> im Zytosol, <i>IDH2</i> in den Mitochondrien. Die mutierten Formen von <i>IDH1</i> und 2, welche in Tumoren gefunden werden, katalysieren die Reaktion von alpha-Ketoglutarat zu 2-Deoxyglutarat, welches als „Onco-metabolit“ bezeichnet wird. Nachweis durch Gen-Sequenzierung oder für die häufigste Mutante, <i>IDH1R132H</i> , immunohistochemisch.
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase. DNS-Reparaturprotein. Als molekularer Marker hat sich die Methylierungs-Analyse des Gen-Promotors etabliert. Wird durch methylierungs-spezifische PCR nachgewiesen.
Deletion 1p/19q	Chromosomaler Verlust von 1p und 19q, wird durch PCR von polymorphen Microsateliten Markern oder FISH-Analyse nachgewiesen
PCR	polymerase chain reaction
FISH	Fluorescent in-situ hybridization

## Die wichtigsten molekularen Marker in Kürze:

### LOH 1p/19q

Die Co-Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 (1p) und des langen Armes von Chromosom 19 (19q) ist zwischenzeitlich als Ergebnis einer 1;19 Translokation identifiziert worden. Als Konsequenz wird eine Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen vermutet. Mittlerweile sind 2 Kandidatengene identifiziert worden, welche auf diesen Chromosomenarmen lokalisiert sind, und in Assoziation mit der Co-Deletion oft mutiert sind. Die funktionellen und klinischen Auswirkungen werden zur Zeit erforscht. Die 1p/19q Co-Deletion ist charakteristisch für eine Subgruppe von Oligodendrogliomen mit deutlich langsamerem klinischen Verlauf, besserer Prognose und exquisitem Ansprechen auf sowohl Chemo- wie auch Radiotherapie. Der Grund dieses besseren Verlaufs bleibt noch unklar und hat wahrscheinlich nichts mit dieser Translokation per se zu tun. Auffallend ist auch die hohe Korrelation zwischen der Co-Deletion von 1p/19q und Mutationen in den IDH-Genen.

### IDH-Mutationen

Mutationen in den Isozitatdehydrogenase (IDH) Genen 1 und 2 sind charakteristisch für Grad II & III-Gliome. Die Mutationen befinden sich in einem Codon und resultieren in einer neuen enzymatischen Funktion, die zu hohen Konzentrationen eines normalerweise nicht vorkommenden Metaboliten führen. Dieser „Onco-Metabolit“ inhibiert Enzyme involviert in der epigenetischen Genregulation, welches zu einem sogenannten „CpG-island methylator phenotype“ führt, kurz „CIMP“. Diese epigenetischen Veränderungen gelten als im höchsten Masse Tumor relevant. *IDH1/2*-Mutationen und der damit assoziierte CIMP sind typisch für sekundäre maligne Gliome, d. h. Glioblastome und anaplastische Astrozytome, die sich aus vorausgehenden niedriggradigen Gliomen entwickeln. Die häufigste *IDH1* Mutation (>90%) kann bereits immunhistochemisch dargestellt werden. Hochgradige Gliome mit mutiertem *IDH1* oder *IDH2*-Gen haben eine bessere Prognose.

### MGMT Gen Promoter Methylierung

Die Methyl-Guanin Methyltransferase ist ein ubiquitär exprimiertes DNS-Reparaturprotein, welches Alkylgruppen von der O<sup>6</sup>-Position des Guanins entfernt. Alkylierende Chemotherapeutika wie Nitrosoharnstoffe oder Temozolomid übertragen Alkyl-Gruppen an verschiedene Stellen der DNS, u. a. auch an die O<sup>6</sup>-Position des Guanins. Bei der DNS-Replikation führt dies zu Fehlern der Basenpaarung, welche indirekt zu letalen DNS Doppelstrang-Brüchen führen können. Das MGMT-Protein repariert jedoch diese O<sup>6</sup>-Alkylierung und wird hierbei konsumiert. Eine letale Zellschädigung erfolgt somit lediglich bei fehlender oder ungenügender MGMT-Aktivität.

Bei rund 40-45% aller Glioblastome ist das MGMT-Gen epigenetisch verändert durch eine Methylierung der regulatorischen Genregion (Promotor), und somit ruhigestellt. Eine Methylierung des MGMT-Gens ist stark mit einem Ansprechen auf eine alkylierende Chemotherapie und verlängertem Überleben assoziiert.

nach Ende der Bestrahlung) wird nicht selten ein vermeintlicher radiologischer Progress im MRI diagnostiziert. Diese sog. Pseudoprogression wird möglicherweise häufiger bei Patienten mit MGMT methylierten Tumoren beobachtet, wahrscheinlich Ausdruck eines guten Therapie-Ansprechens. Das Wissen um den MGMT-Status kann hier helfen den vermeintlichen Tumorprogress als Pseudoprogression zu erkennen und die TMZ-Therapie fortzusetzen.

## 2. 1p/19q-Codeletion

Bei einer 40-jährigen Patientin wird im Rahmen einer Abklärung monatelanger unspezifischer neurologischer Symptome, depressiver Verstimmung und Müdigkeit ein 5.5 cm grosser, nicht Kontrastmittel anreichernder frontaler Hirntumor diagnostiziert, die Biopsie erlaubt eine Diagnose eines Oligoastrozytoms Grad II. Eine grosse EORTC-Studie hatte gezeigt, dass bei Grad II-Gliomen ohne besondere andere Risikofaktoren (Grösse > 6 cm, bi-hemisphärische Tumorausbreitung, Alter > 40 Jahre, nicht-oligodendrogliale Histologie, neurologische Defizite) eine aktive Überwachung genügt, und eine Radiotherapie erst im Rezidiv vorgesehen werden kann. Insbesondere Oligodendrogliome mit der 1p/19q-Codeletion haben eine gute Prognose, mit mittleren Überlebenszeiten von > 10–15 Jahren.

Bei unserer Patientin wird nach vollständiger Tumorresektion die histologische Diagnose revidiert zu einem anaplastischen

Oligoastrozytom Grad III. Zwei grosse randomisierte Studien haben (neo-)adjuvante Chemotherapie (Procarbazin, Lomustin [CCNU], Vincristin; PCV) vor oder nach Strahlentherapie mit alleiniger Strahlentherapie verglichen. Obwohl initial nach einer mittleren Beobachtungszeit von 6 Jahren kein Unterschied festgestellt werden konnte, hat die Analyse der Langzeitresultate nach 12 Jahren Beobachtung gezeigt, dass spezifisch die Patienten mit den prognostisch insgesamt günstigeren 1p/19q-Codeletionen von einer adjuvanten Chemotherapie (zusätzlich zur Radiotherapie) profitieren.

## 3. IDH1 oder IDH2 Mutationen

Bei einem 45-jährigen Patienten wird im Anschluss an einen epileptischen Anfall ein Glioblastom diagnostiziert. Im Rückblick sind erste klinische Symptome bereits 3–4 Monate vorher erkennbar.

Der immunhistologische Nachweis der häufigsten *IDH1*-Mutation (*IDH1R132H*) spricht für die Klassifizierung als sekundäres Glioblastom, d.h., eines Glioblastoms, das nach sekundärer Malignisierung einer weniger aggressiven Grad II/III-Vorläuferläsion entstanden ist. Sekundäre Glioblastome und *IDH1/2*-mutierte anaplastische Astrozytome haben unabhängig von der Therapie eine bessere Prognose. Zusätzlich besteht eine hohe Assoziation zwischen *IDH1/2*-Mutationen und einer *MGMT*-Methylierung, d.h. diese Patienten haben auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, von einer Alkylanzien-Therapie zu profitieren.

Der immunhistologische Nachweis der *IDH1R132H*-Mutation erlaubt auch die Differentialdiagnose von reaktiver Gliose (zu B. nach vorgängiger Therapie oder Trauma) und Tumor. Inwieweit *IDH1/2*-Mutationen zur individuellen Therapieentscheidung und v. a. auch als therapeutisches Target beitragen können, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

### Zusammenfassung und Ausblick

Molekulare Marker sind heute ein integraler Bestandteil moderner neuropathologischer Diagnostik, und für viele Therapieentscheidungen unerlässlich. Der Status der drei Marker, *MGMT* Methylierung, *1p/19q*-Co-Deletion und *IDH1/2* Mutation, sind sowohl von prognostischer und teilweise auch prädiktiver Bedeutung, und sind für viele individuelle Therapieentscheidungen hilfreich oder unerlässlich. Komplexere molekulare Signaturen (z. B. Mutationen und Expression mehrerer 1000 Gene simultan betrachtet) werden im Rahmen grosser internationaler Projekte und Kollaborationen entwickelt, mit dem Ziel die individuelle Therapie nach dem molekularen Profil zu richten und so einen besseren Therapieerfolg zu erreichen. Ebenso können solche Analysen neue molekulare Zielstrukturen identifizieren, die zukünftig therapeutisch angegangen werden können.

Bereits die heute zu Verfügung stehenden Marker erlauben die Therapieentscheidungen rational zu unterlegen und beeinflussen. Dies führt bereits zu besseren Therapieerfolgen und erlaubt in Grenzfällen den Ausschlag zugunsten einer aktiven Therapie, bzw. dagegen bei Absenz der entsprechenden Marker. Um solche Marker adäquat im Alltag zu interpretieren ist genaue Kenntnis ihrer Bedeutung, der zugrunde liegenden Analyse und ihrer technischen Limitationen notwendig. Ebenso müssen sowohl Technologie wie auch Marker in Studien auf Reproduzierbarkeit und Aussagekraft validiert werden.

#### Prof. Dr. med. Roger Stupp

Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) et Université de Lausanne  
Rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne  
roger.stupp@chuv.ch

#### Prof. Dr. sc. nat. Monika E. Hegi

Service de Neurochirurgie,  
Département des Neurosciences Cliniques  
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) et Université de Lausanne  
Rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne  
monika.hegi@chuv.ch

#### Prof. Dr. med. Michael Weller

Klinik für Neurologie, UniversitätsSpital Zürich,  
Rämistrasse 100, 8091 Zürich  
michael.weller@usz.ch

#### ✚ Literatur

am Online-Beitrag unter: [www.medinfo-verlag.ch](http://www.medinfo-verlag.ch)

#### Take-Home Message

- ◆ Molekulare Marker sind ein integraler Bestandteil moderner neuropathologischer Diagnostik, insbesondere der Status von *MGMT*, *1p/19q* und *IDH1/2*
- ◆ Molekulare Marker beeinflussen Diagnose und Therapieentscheidungen, wobei ihre Interpretation je nach klinischer Situation und Tumortyp unterschiedlich sein kann
- ◆ Prognostische Aussagen müssen von prädiktiven Aussagen zum Therapieansprechen unterschieden werden
- ◆ Molekulare Techniken erfordern spezialisierte und erfahrene Labors und regelmässige Qualitätskontrollen und Validierung der Tests und Techniken
- ◆ Nebst technischer Validierung muss ein Test auch bezüglich Aussagekraft in grossen Studien evaluiert und etabliert werden

#### Message à retenir

- ◆ Les marqueurs moléculaires sont une partie intégrante du diagnostic neuropathologique moderne, en particulier le statut de *MGMT* et *1p/19q IDH1 / 2*
- ◆ Les marqueurs moléculaires influencent le diagnostic et les décisions de traitement, leur interprétation peut varier en fonction de la situation clinique et du type de tumeur
- ◆ Les déclarations pronostiques doivent être distinguées des déclarations prédictives de la réponse au traitement
- ◆ Les techniques moléculaires nécessitent des laboratoires spécialisés et expérimentés et des contrôles de qualité réguliers et la validation des tests et techniques
- ◆ Outre la validation technique, un test doit aussi être évalué et établi par rapport à la signification dans de grandes études

## Weiterführende Literatur:

- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352(10): 987-96.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352(10): 997-1003.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 2008; 26(25): 4189-99.
- Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol.* 2008; 9(1): 29-38.
- Preusser M, Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Stupp R, Gorlia T, et al. Anti-MGMT immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. A translational research project of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour Group. *Brain Pathol.* 2008; 18(4): 520-32.
- Stupp R, Hegi ME. Neuro-oncology: oligodendroglioma and molecular markers. *Lancet Neurol.* 2007; 6(1): 10-2.
- Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, Schackert G, Simon M, Schnell O, et al. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer.* 2012; 131(6): 1342-50.
- Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13(7): 707-15.
- Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13(9): 916-26.
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. 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; 66(20): 9852-61.
- van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, Kros JM, Kouwenhoven MC, Deltre JY, 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.* 2012, in press (epub 15. Oct; PMID3071237)
- Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. 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; 27(34): 5743-50.
- Weller M, Stupp R, Hegi M, Wick W. Individualized targeted therapy for glioblastoma: fact or fiction? *Cancer J.* 2012; 18(1): 40-4.
- Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, et al. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol.* 2012; 14 Suppl 4: iv100-iv8.
- Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010; 6(1): 39-51.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009; 360(8): 765-73.
- Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. 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; 120(6): 707-18.