



**ATF5-Expression und MGMT-Promotormethylierungsänderungen
in glialen Tumoren**

*ATF5-expression and alterations of the MGMT promoter methylation
status in glial tumors*

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Jonas Alexander Feldheim

aus

Schweinfurt

Würzburg, 2021



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. med. Ralf Christian Bargou

1. Betreuer: PD Dr. rer nat. Carsten Hagemann

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

4. Betreuer: Prof. Dr. med. Mario Löhr

5. Betreuerin: Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Für alle,
ohne deren Unterstützung diese Arbeit
nicht möglich gewesen wäre

Die Daten der vorliegenden Dissertation wurden bereits publiziert. Eine explizite Erlaubnis zur Wiederverwendung der Daten/Abbildungen in dieser Arbeit ist nicht erforderlich, da beide Publikationen unter der *Creative Commons Attribution* (CC-BY bzw. CC-BY-NC) erfolgten. Die Eigen- und Fremdanteile sind detailliert in den jeweiligen Publikationen dargelegt.

Publikationen:

Feldheim, J.; Kessler, A. F.; Schmitt, D.; Wilczek, L.; Linsenmann, T.; Dahlmann, M.; Monoranu, C. M.; Ernestus, R.-I.; Hagemann, C. and Löhr, M. (2018).

"Expression of activating transcription factor 5 (ATF5) is increased in astrocytomas of different WHO grades and correlates with survival of glioblastoma patients." Onco Targets Ther **11**: 8673-8684.

Feldheim, J.; Kessler, A. F.; Monoranu, C. M.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M. and Hagemann, C. (2019). "Changes of O(6)-Methylguanin DNA Methyltransferase (MGMT) promotor methylation in glioblastoma relapse - a meta-analysis type literature review." Cancers (Basel) **11**(12).

Kongressvorträge

Feldheim, J.; Kessler, A. F.; Hagemann, C.; Linsenmann, T.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M.:

Activating transcription factor 5 – a new therapeutic target for treatment of astrocytomas? 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). 12.-15.06.2016, Frankfurt am Main, Germany.

Feldheim, J.; Kessler, A.F; Linsenmann, T.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M.; Hagemann, C.:

Activating transcription factor 5 (ATF5) – ein neues Ziel für die Therapie astrozytärer Tumoren? 89. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN). 21.-24.09.2016, Mannheim, Germany.

Posterpräsentationen:

Feldheim, J.; Keßler, A. F; Linsenmann, T.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M.; Hagemann, C.:

Is activating transcription factor 5 (ATF5) a new therapeutic target in astrocytomas of different WHO grades and varying biological behavior? An expression analysis EANO 2016 Meeting, 12.10.-16.10.2016, Mannheim, Germany.

Feldheim, J.; Kessler, A. F.; Schmitt, D.; Wilczek, L.; Linsenmann, T.; Dahlmann, M.; Monoranu, C. M.; Ernestus, R.-I.; Hagemann, C.; Löhr, M.:

Activating transcription factor 5: a new therapeutic target in astrocytomas of different WHO-grades and varying biological behaviour? Brain Tumor Meeting 2017, 18.-19.05.2019, Berlin, Germany.

Feldheim, J.; Keßler, A. F.; Monoranu, C.; Linsenmann, T.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M.; Hagemann, C.:

Quantifikation of the MGMT Promotor methylation in glioblastoma relapse, Neurowoche 2018, 30.10. – 03.11.2018, Berlin, Germany.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung.....	1
1.1	Summary (Englischsprachige Zusammenfassung)	1
1.2	Deutschsprachige Zusammenfassung.....	2
2	Einleitung	3
2.1	Glioblastoma multiforme und andere astrozytäre Tumoren.....	3
2.2	Epigenetische Veränderungen.....	4
2.3	GBM und Genmethylierungen	4
2.4	Activating transcription factor 5 (ATF5)	6
2.5	Fragestellung / Ziele der Arbeit.....	6
3	Material und Methoden	8
3.1	Material	8
3.1.1	Geräte	8
3.1.2	Medien, Kits und Chemikalien.....	9
3.1.3	Primer und Sonden.....	9
3.1.4	Software	10
3.1.5	Reaktionsansätze und Puffer	10
3.1.6	Antikörper und Verdünnung	11
3.2	Methoden.....	12
3.2.1	Tumorproben und klinische Daten.....	12
3.2.2	RNA- und DNA-Extraktion	13
3.2.3	Quantitative Echtzeit PCR (qPCR).....	13

3.2.4	IHC-Färbungen	14
3.2.5	HRM Analysen.....	16
3.3	Statistische Analysen.....	16
3.4	Literaturzusammenfassung und Gesamtanalyse	17
4	Ergebnisse	20
4.1	Patientenkohorte.....	20
4.2	ATF5-Expression in Gliom-Proben	20
4.3	Überlebenszeitanalyse der GBM-Patienten, aufgeteilt nach Subgruppen hoher und niedriger ATF5-mRNA-Expression zum Zeitpunkt der Erst-Operation.	26
4.4	Die MGMT-Promotormethylierung kann sich vom Primärtumor zum Rezidiv ändern.....	31
4.5	Gesamtanalyse der eingeschlossenen Studien	33
5	Diskussion.....	35
5.1	ATF5 ist zwar mit der Prognose der Patienten assoziiert, jedoch kein unabhängiger Marker	35
5.2	ATF5 stellt ein vielversprechendes Therapieziel dar	36
5.3	Initiale und inzidentelle Beobachtungen zu Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung	37
5.4	Systematische klinische Studien zu Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung	38
5.5	Änderungen der MGMT-Promotormethylierung entstehen regelmäßig, es gibt zum aktuellen Zeitpunkt jedoch keine eindeutige Implikation für eine erneute Testung im Rezidivfall.....	44

5.6	Wechselwirkungen zwischen TMZ und der MGMT-Promotormethylierung ..	45
5.7	Den direkten und indirekten TMZ-Effekten kommt als mögliche Ursache der Veränderungen besondere Bedeutung zu ..	46
5.8	Zusammenfassung und Ausblick.....	48
	Quellenverzeichnis.....	50
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	61
	Abkürzungsverzeichnis.....	62
	Publikationsverzeichnis.....	64
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Eidesstattliche Erklärung	65
	Danksagung	67

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 SUMMARY (ENGLISCHSPRACHIGE ZUSAMMENFASSUNG)

The 2016 WHO classification for brain tumors signaled a major paradigm shift and paves the way for molecular markers and molecular targets. One such target could be the transcription factor ATF5. It suppresses differentiation of neuroprogenitor cells and is overexpressed in glioblastoma (GBM). Data on ATF5 expression in glioma of WHO grade II (LGG) are scarce and lacking on recurrent GBM. Therefore, we examined 79 GBM, 40 LGG and 10 normal brain (NB) specimens for their ATF5-mRNA and protein expression by quantitative real-time PCR and immunohistochemistry, respectively, and compared it to multiple retrospectively obtained clinical characteristics of the patients. ATF5-mRNA was overexpressed in LGG and GBM compared to NB on mRNA and protein level. Although ATF5-mRNA expression in GBM showed a considerable fluctuation range, GBM groups of varying biological behavior were not significantly different. ATF5-mRNA correlated with the patients' age and inversely with Ki67-staining. Kaplan-Meier analysis and Cox regression indicated that ATF5-mRNA expression was significantly associated with survival after 12 months and progression-free survival. Methylation of the O⁶-Methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter is a well-established strong prognostic factor in the therapy of GBM. It is associated with an improved response to chemotherapy with temozolomide and longer overall survival. We made the incidental finding of patients with changing MGMT promoter methylation during the clinical course, which prompted us to further investigate this topic. Indeed, a meta-analysis of the literature revealed changes in MGMT promoter methylation in 115 of 476 patients. To conclude, ATF5-mRNA expression could be identified as an additional, though not independent factor correlating with patients' survival. Since its inhibition might lead to the selective death of glioma cells, it might serve as a potential ubiquitous therapeutic target in astrocytic tumors. Clinical implications of the observed changes in MGMT promoter methylation are still ambiguous and do not yet support a change in clinical practice. However, retesting MGMT methylation might be useful for future treatment decisions and we encourage clinical studies to address this topic.

1.2 DEUTSCHSPRACHIGE ZUSAMMENFASSUNG

Die WHO-Klassifikation der Hirntumoren von 2016 ebnete den Weg für molekulare Marker und Therapie-Angriffspunkte. Der Transkriptionsfaktor ATF5 könnte ein solcher sein. Er unterdrückt die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen und wird in Glioblastomen (GBM) überexprimiert. Daten zur ATF5-Expression in WHO Grad II Gliomen (LGG) und GBM-Rezidiven sind nur spärlich vorhanden. Daher untersuchten wir 49 GBM, 40 LGG und 10 Normalhirnproben auf ihre ATF5-mRNA- und Proteinexpression mit quantitativer Echtzeit-PCR bzw. Immunhistochemie und verglichen sie mit multiplen, retrospektiv erhobenen klinischen Charakteristika der Patienten. ATF5 war in LGG und GBM verglichen zum Normalhirn sowohl auf mRNA-, als auch Proteinebene überexprimiert. Obwohl die ATF5-mRNA-Expression im GBM eine erhebliche Fluktuationsrate zeigte, gab es keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen GBM-Gruppen unterschiedlicher biologischer Wachstumsmuster. ATF5-mRNA korrelierte mit dem Alter der Patienten und invers mit der Ki67-Färbung. Kaplan Meier- und Cox-Regressionsanalysen zeigten eine signifikante Korrelation der ATF5-mRNA-Expression mit dem Überleben nach 12 Monaten sowie dem progressionsfreien Überleben. Die Methylierung des Promotors der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein etablierter Marker in der Therapie des GBMs. Sie ist mit dem therapeutischen Ansprechen auf Temozolomid und dem Überleben assoziiert. Uns fielen inzidentell Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung auf, woraufhin wir den aktuellen Wissensstand mittels einer ausführlichen Literatur-Metaanalyse zusammenfassten. Dabei fanden wir Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung bei 115 der 476 Patienten. Wir schlussfolgern, dass die ATF5-mRNA-Expression als prognostischer Faktor für das Überleben der Patienten dienen könnte. Da seine *in vitro*-Inhibition zu einem selektiven Zelltod von Gliomzellen führte und wir eine Überexpression in glialen Tumoren nachweisen konnten, zeigt ATF5 Potential als ubiquitäres Therapieziel in Gliomen. Zum aktuellen Zeitpunkt ergibt sich keine klare Indikation, den klinischen Standard der MGMT-Teststrategie zu verändern. Trotzdem könnte eine erneute Testung der MGMT-Promotormethylierung für zukünftige Therapieentscheidungen sinnvoll sein und wir regen an, dass dieses Thema in klinischen Studien weiter untersucht wird.

2 EINLEITUNG

2.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME UND ANDERE ASTROZYTÄRE TUMOREN

Die „World Health Organization“ (WHO) teilt die diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren nach ihrem molekularen Profil in folgende Subgruppen ein: Diffuses Astrozytom, Anaplastisches Astrozytom, Glioblastom, Diffuses Mittelliniengliom, Oligodendrogliom, Anaplastisches Oligodendrogliom und Oligoastrozytom [1-3]. Unter diesen Subgruppen stellen niedriggradige astrozytäre Tumoren WHO Grad II mit Mutation der Isozitat-Dehydrogenase (IDH) (LGG) gut differenzierte Tumoren dar, die mit einer verhältnismäßig günstigen Prognose einhergehen [1,4,5].

Die charakteristische Mutation der IDH1/IDH2 initiiert vermutlich eine pathologische Funktion des Enzyms, die zu Veränderungen der DNA-Methylierung des Genoms führen kann und mutmaßlich das initiale Ereignis in der Genese dieser Tumoren darstellt [6,7]. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim Glioblastoma multiforme (GBM) mit IDH-Wildtyp um die aggressivste, aber auch häufigste Form astrozytärer Tumoren [4]. Circa 50 % der bei Erwachsenen diagnostizierten Gliome entsprechen histologisch dem Bild eines GBM [8]. Nach der initialen Therapie, die zumeist aus Tumorresektion, Strahlentherapie, sowie konkomitanter und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) besteht, kommt es im Regelfall zum Tumorrezidiv, welches eine zunehmende Aggressivität und Therapieresistenz zeigt [9]. Obwohl Osswald et al. die molekularen Vorgänge bei der Entstehung eines Lokalrezidivs näher beleuchten konnten [10], ist noch wenig über die Veränderungen, die zum multifokalen Wachstum eines astrozytären Tumors führen, bekannt. Da bei unifokal wachsenden Tumoren einzelne multifokal vorliegende Tumorzellen nachgewiesen werden konnten [11], stellt sich die Frage, welche Mechanismen auf zellulärer Ebene die Entstehung eines Zweittumors aus solchen Einzelzellen begünstigen oder verhindern [5].

In letzter Zeit zeigte vor allem der klinische Einsatz von Tumor-Therapie-Feldern (TTFields) das Potential für eine Verbesserung des aktuellen GBM-Therapieschemas [12-14]. Trotzdem haben GBM-Patienten weiter eine ungünstige Prognose. Bei leitliniengerechter Therapie beträgt das mediane Gesamtüberleben (OS) nach Diagnosestellung nur ca. 14,6 Monate [15].

Bei einem multifokalen Tumorwachstum sind die therapeutischen Optionen und die Prognose noch weiter eingeschränkt [5,16]. Deswegen sind genetische prognostische Marker und molekulare Angriffsziele für die Therapie der astrozytären Tumoren von hoher Bedeutung. Daneben spielt jedoch auch die Epigenetik eine essentielle Rolle [5].

2.2 EPIGENETISCHE VERÄNDERUNGEN

Der Begriff „Epigenetik“ wurde erstmals vom britischen Wissenschaftler Conrad Hal Waddington in den frühen 1940er Jahren eingeführt [17]. Seit dieser Zeit wurde die entsprechende Terminologie noch weiterentwickelt und konkretisiert. Aktuell wird unter Epigenetik eine vererbare Veränderung der Genfunktion verstanden, welche ohne eine Veränderung der DNA-Sequenz auskommt [3,18,19].

Die DNA besteht aus den Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Nach der Replikation können DNA-Methyltransferasen Cytosine zu 5-Methylcytosinen methylieren [20]. Diese kommen im Genom häufig in Gruppen palindromischer CpG Dinukleotide, den sog. „CpG-Inseln“ (*CpG-Islands*) vor [3,21]. Kommt es zu einem verdichteten Auftreten dieser CpG-Inseln in einer Promotorregion, kann dies die entsprechenden Gene abschalten bzw. deren Expression herunterregulieren [22-25]. Obwohl man davon ausgeht, dass diese DNA-Methylierungsmuster sich relativ stabil verhalten, kann sich das Methylierungsprofil aufgrund externer oder interner Stimuli verändern [3,23,26].

Tatsächlich spielen sowohl Hyper- als auch Hypomethylierung nicht nur eine essentielle Rolle in der Langzeitregulation der Genexpression, sondern auch in der Karzinogenese, in dem sie Onkogene reaktivieren, Tumorsuppressorgene ausschalten, die mRNA-Expression deregulieren, das Entstehen von Mutationen fördern oder die funktionelle Stabilität der Chromosomen verändern [3,20,27].

2.3 GBM UND GENMETHYLIERUNGEN

Methylierungsmuster spielen eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie der Gliome. Sie sind nicht nur wesentlich für die Subklassifikation der Tumoren, sondern stellen auch vielversprechende Ziele neuer therapeutischer Konzepte dar [28-30]. Zudem sind sie relevant zur Einschätzung der Prognose und des therapeutischen Ansprechens der Patienten. In den

letzten Jahren hat sich die Methylierung der Promotorregion des DNA-Reparaturenzyms O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) als starker prognostischer Faktor bei neu diagnostiziertem GBM bestätigt [31-34]. MGMT entfernt Alkylgruppen von den Guaninen in der DNA und arbeitet damit potenziell dem therapeutischen Nutzen von alkylierenden Chemotherapeutika, sowie TMZ in Tumorzellen entgegen [35]. Epigenetisches *silencing* der Promotorregion von MGMT führt vermutlich zu einer verringerten Transkription und verminderten Expression des MGMT-Proteins [35]. Es ist außerdem mit einer verbesserten therapeutischen Antwort auf TMZ-Chemotherapie und einem längeren OS der GBM-Patienten assoziiert [3,34,36].

Ältere Patienten mit einer MGMT-Promotor-Hypermethylierung profitieren von einer TMZ-Chemotherapie verglichen mit einer alleinigen Strahlentherapie, wohingegen für Patienten mit einer niedrigen Methylierung kein sicherer Effekt festzustellen ist [37-40]. Jüngst wurde berichtet, dass die Kombination der Chemotherapeutika Lomustin und TMZ für Patienten mit hypermethyliertem MGMT einen signifikanten Zusatznutzen bringt, was zusätzlich die prognostische Relevanz der Bestimmung der MGMT-Promotormethylierung unterstreicht [41-43]. Heutzutage wird der MGMT-Methylierungsstatus der Patienten üblicherweise mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP), methylierungsspezifischer hochauflösender Schmelzpunktanalyse (HRM) oder Pyrosequenzierung bestimmt. Ein *cut-off*-Wert von 8 bis 10 % wird weitestgehend als Schwelle zwischen methyliertem und unmethyliertem MGMT-Promotor anerkannt [3,32,44,45].

Trotz intensiver Therapie kommt es bei nahezu allen GBM zu einem Tumorrezidiv, welches üblicherweise mit einer vermehrten Aggressivität und Therapieresistenz einhergeht [46]. Obwohl das Allgemeinbefinden der Patienten oder die Tumorlokalisierung/Ausdehnung regelmäßig die therapeutischen Optionen im Tumorrezidiv einschränken, ist häufig eine erneute Resektion des Tumors, gefolgt von einer TMZ-Therapie (ggf. kombiniert mit einer Strahlentherapie) eine valide Option [39,40,47]. Deswegen könnte die MGMT-Promotormethylierung nicht nur einen wertvollen Prädiktor für das Outcome nach initialer Diagnose und Operation, sondern auch im Rezidivfall darstellen. Dennoch ist seine Rolle nach Krankheitsprogression und als Prädiktor des klinischen Verlaufs nach Rezidiv-OP weiterhin nicht endgültig geklärt [3,36,48].

Einen weiteren vielversprechenden molekularen prognostischen Marker könnte der Transkriptionsfaktor *Activating transcription factor 5* (ATF5) darstellen.

2.4 ACTIVATING TRANSCRIPTION FACTOR 5 (ATF5)

ATF5 ist ein in vielen Zelltypen exprimiertes Protein, welches über einen "Leucin-Reißverschluss" mit der DNA interagieren kann und der Familie der "activating transcription factors/cAMP response element binding proteins" angehört [49,50]. Nach aktuellem Wissensstand besteht die physiologische Funktion von ATF5 darin, in neuronalen Vorläuferzellen die Differenzierung in Gliazellen oder Neurone zu unterdrücken [5,51-53]. Da ATF5 in diversen Tumorentitäten, u.a. GBM, überexprimiert wird [50,54] stellte es ein vielversprechendes Ziel neuer hochselektiver Therapieverfahren dar [55,56]. In GBM-Zelllinien und einem Xenograft-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines dominant negativen Peptides über Reduktion der ATF5-Aktivität zu einem p53-unabhängigen Zelltod führt. Interessanterweise konnten nach derartiger Intervention keine sichtbaren Veränderungen im Normalhirngewebe (NB) oder kultivierten Astrozyten festgestellt werden [54,55,57]. Die ATF5-Expression im GBM wurde bereits in einigen Publikationen näher beleuchtet, über die Expression bei LGG ist jedoch wenig bekannt [58]. Nach unserem Wissen wurde außerdem bisher noch nicht näher untersucht, ob und in wie weit ATF5 die Entwicklung, den Zeitpunkt oder die Lokalisation von lokalen und multifokalen Rezidiven beeinflusst [5].

2.5 FRAGESTELLUNG / ZIELE DER ARBEIT

Im Rahmen unserer Studie untersuchten wir die ATF5-Expression von LGG, GBM und NB Proben auf dem *messenger* RNA (mRNA) und Protein Level. Zusätzlich erhoben wir retrospektiv die klinischen Daten der Patienten, um mögliche Zusammenhänge der Expression von ATF5 auf das Wachstumsverhalten des Tumors und den klinischen Verlauf der Patienten darzustellen [5].

Den inzidentellen Fund von Veränderungen der MGMT-Methylierungsstatus im Rezidivfall im Rahmen dieser Studie, der im Kontrast zu aktuellen Leitlinien zu stehen scheint, nutzten wir als Ansatzpunkt, um unsere Ergebnisse zur Bestimmung der MGMT-

Promotormethylierung mit Literaturdaten zu vergleichen.

Die frühen Publikationen wurden im Jahr 2015 bereits zusammengefasst [59]. Die zwischenzeitlich erfolgte Publikation einer Vielzahl neuer Daten zu diesem Thema veranlasste uns dazu, eine neue Zusammenfassung dieser Beobachtungen zu erstellen [3]. Viele der Autoren kamen zu kontrastierenden Schlussfolgerungen und diskutierten die zugrunde liegenden Mechanismen und klinische Signifikanz kontrovers, was uns veranlasste, diese in unserer Arbeit gegenüberzustellen, kritisch zu bewerten und in einer Gesamtanalyse zusammenzufügen [3].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Accurpette	VWR International, LLC
Autoklave Systec VX-150	Systec GmbH
Countess II Automatisiertes Zellzählgerät	Thermo Fisher Scientific Inc.
Eismaschine ZBE 70-35	ZIEGRA Eismaschinen GmbH
Elektronische Waage ABT 120-SDNM	KERN & SOHN GmbH
Inkubator Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kühl- und Gefrierschränke	
4 °C	Liebherr International Deutschland GmbH
-20 °C	Liebherr International Deutschland GmbH
-80 °C	FRYKA Kältetechnik GmbH
Kühlcontainer Chronos 10000397	Messner Industriegase GmbH
MAGNETOM Trio	Siemens AG
Mikroskop DMI3000 B (mit DFC450 Kamera)	Leica Microsystems GmbH
Multipette E3	Eppendorf AG
Pipetten	
Discovery (1.000µl)	HTL Lab Solutions (PZ HTL) S.A.
Eppendorf Reference (2.500µl, 100µl, 10µl, 2,5µl; gestopfte und ungestopfte Spitzen)	Eppendorf AG
Eppendorf Research (5.000µl)	Eppendorf AG
StepOnePlus Real-time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc.
Sterilbank Herasafe type HS12	Heraeus GmbH
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.
Zentrifuge MEGA STAR 3.0R	VWR International, LLC

Tabelle 1: Geräte.

3.1.2 Medien, Kits und Chemikalien

Name	Hersteller
Antibody Diluent (Verdünnungspuffer)	Zytomed Systems GmbH
Bisulfite Conversion Kit	Thermo Fisher Scientific Inc
Cell-to-CpG™ Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit	Thermo Fisher Scientific Inc
Citronensäure Monohydrat (C₆H₈O₇)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Destilliertes Wasser (Aqua dest)	Universitätsklinikum Würzburg
Eindeckmedium	ORSAtec GmbH
Envision System HRP DAB	Dako Denmark A/S
Ethanol (C₂H₅OH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Melt Doctor™ HRM Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.
Natriumchlorid (NaCl)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Salzsäure (HCl, 25 %)	Merck KGaA
Saure Hämalalaun-Lösung (nach Mayer)	Carl Roth GmbH + Co. KG
TaqMan Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.
TRIzol® Reagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultra pure water (steril/RNase frei)	Biochrom GmbH
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Xylol (C₈H₁₀)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ziegenserum (normal goat serum)	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 2: Medien, Kits und Chemikalien.

3.1.3 Primer und Sonden

Primer und Sonden	Hersteller
ATF5 qPCR Sonde	
ATF5_FAM (Hs01119208_m1)	Thermo Fisher Scientific Inc.
GAPDH qPCR Sonde	
GAPDH_VIC_PL (Hs99999905_m1)	Thermo Fisher Scientific Inc.
MGMT HRM Primer vorwärts	
5'-GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT-3'	Thermo Fisher Scientific Inc.
MGMT HRM Primer rückwärts	
5'-CCTACAAAACCACTCGAACTACCA-3'	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 3: HRM Primer.

3.1.4 Software

Software	Hersteller
Biorender	Shiz Aoki / Biorender.com
CorelDRAW X8	Corel Corporation
DispImage	Plummer et al. [60]
ExpressionSuite Software v1.0.3	Thermo Fisher Scientific Inc.
ImageJ 1.51g (Fiji)	National Institutes of Health
High-Resolution Melting Software	Thermo Fisher Scientific Inc.
Leica Application Suite V4.5	Leica Microsystems GmbH
Methyl Primer Express®	Thermo Fisher Scientific Inc.
SPSS Statistics 25	IBM Corporation

Tabelle 4: Software.

3.1.5 Reaktionsansätze und Puffer

Ansatz	Zusammensetzung
Citrat-Puffer	4,2 g Citronensäure Monohydrat 2,1 g Natriumhydroxid Mittels destilliertem Wasser auf 2 l aufgefüllt und mit Salzsäure auf einen pH von 6,0 eingestellt.
HRM-Ansatz	10 µl Melt Doctor™ HRM Master Mix 20 ng DNA der jeweiligen Probe 5 pM jedes HRM-Primers Mittels RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt.
qPCR-Ansatz	10 µl TaqMan Gene Expression Master Mix 20 ng DNA der jeweiligen Probe 1 µl der jeweiligen TaqMan Sonden (1 µl der Kontroll-Sonde + 1 µl der zu testenden Sonde) Mittels RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Tabelle 5: Reaktionsansätze und Puffer.

3.1.6 Antikörper und Verdünnung

Name	Verdünnung	Hersteller
Anti-IDH1 R132H/DIA-H09	1:20	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ki67 Antibody M7240	1:800	Dako Denmark A/S
Mouse anti-ATF5 antibody 101-0380	1:200	Zytomed Systems GmbH

Alle Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung in Antibody Diluent verdünnt.

Tabelle 6: Antikörper und Verdünnung.

3.2 METHODEN

3.2.1 Tumorproben und klinische Daten

Die untersuchten Tumorproben stammten von Patienten, die in der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg, Deutschland, behandelt wurden. Die Patienten willigten nach vorheriger Aufklärung in die postoperative Aufbewahrung und Untersuchung von Gewebeproben ein. Die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission der Universität Würzburg wurde eingeholt (#103/14). Als Kontrollgruppe konnten wir Gewebeproben von nicht-pathologisch verändertem Hirngewebe (NB) (n=10) aus epilepsiechirurgischen Eingriffen (n=4) und von Kontrollautopsien bei verstorbenen Patienten (n=6), bei denen sich keine Erkrankungen des zentralen Nervensystems manifestierten, gewinnen. Zudem beinhaltete unsere Studie Gewebeproben von 40 IDH mutierten niedriggradigen Gliomen WHO Grad II (LGG) und 79 GBM mit teilweise unterschiedlichen Wachstumsmustern zwischen Primärtumor und Rezidiv [5].

Wir konnten die klinischen Daten von 51 Patienten, die zwischen Januar 2011 und Dezember 2013 behandelt wurden, retrospektiv erheben. Die Klassifikation der Hirntumoren erfolgte anhand der WHO-Kriterien [1]. Für die weiterführenden Untersuchungen wurde das gewonnene Gewebe direkt nach Erhalt geteilt. Die eine Hälfte des Gewebes wurde zur Isolation von RNA und DNA bei -80 °C kryokonserviert (FF), während das für die Immunhistochemischen (IHC) Färbungen bestimmte Gewebe mittels Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingelegt wurde (PE). Alle Gewebeproben wurden von Frau PD Dr. Monoranu (Universität Würzburg, Institut für Pathologie, Neuropathologie) sowie im Bedarfsfall weiteren erfahrenen Neuropathologen, auf ihre Repräsentativität untersucht. GBM Gewebeproben mit einem Tumorzellanteil von unter 80 % wurden aus der Studie ausgeschlossen [5].

42 Patienten, deren klinischen Verlauf wir komplett erheben konnten, wurden in die Überlebenszeitanalysen eingeschlossen. Bei der Vergleichsanalyse des progressionsfreien Überlebens (PFS) mussten wir 6 Patienten mit primär multifokalen Tumoren ausschließen, da diese die RANO-Kriterien [61] für einen Progress nicht erfüllten. Zur Bestimmung des

Resektionsausmaßes wurden die prä- und postoperativen (max. 72 h nach OP) MRT-Bilder von einem erfahrenen Neuroradiologen (Universität Würzburg, Institut für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie) befundet. Bei komplett fehlender Kontrastmittelaufnahme im Tumorbereich in den postoperativen MRT-Bildern wurde die Resektion als komplett klassifiziert, bei residueller Kontrastmittelaufnahme ab einer Größe von einem Voxel auf der T1-gewichteten Sequenz als inkomplett. Das Tumolvolumen wurde mittels eines semiautomatischen Verfahrens des Programmes DISPIImage [60] anhand präoperativer T1-gewichteter MPRage-Sequenzen nach Kontrastmittelgabe, die auf einem MAGNETOM Trio erstellt worden waren, erhoben. Hierfür wurden die Regionen von Interesse (ROIs) manuell auf jeder Schicht der *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM) Aufnahmen eingezeichnet, um unter Zuhilfenahme der Schichtdicke, das Volumen des Tumors abschätzen zu können [5].

3.2.2 RNA- und DNA-Extraktion

Die *messenger* RNA (mRNA) und genomische DNA der kryokonservierten Gewebeproben wurden mittels des TRIzol® Reagenz nach Angaben des Herstellers extrahiert. Anschließend wurde die genomische DNA bei -80 °C gelagert und die mRNA direkt mittels des High Capacity RNA-to-cDNA Kit in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert. Die cDNA wurde mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und anschließend vor ihrer weiteren Verwendung ebenfalls bei -80 °C gelagert [5].

3.2.3 Quantitative Echtzeit PCR (qPCR)

Vier µl cDNA jeder Probe wurden mittels qPCR auf ihre ATF5-mRNA Expression untersucht. Wir verwendeten ein Duplex Setting, bei der die cDNA mitsamt der Sonde ATF5_FAM und der internen Kontroll-Sonde GAPDH_VIC_PL sowie dem TaqMan Universal PCR Master Mix in einer einzigen Probe amplifiziert wurde. Alle Proben wurden in Triplikaten getestet. Nach einer Enzymaktivierung von 2 min bei 50 °C und 10 min bei 95 °C wurde die cDNA in 50 Zyklen aus 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C amplifiziert. Falls eine Standardabweichung von 0,5 Ct überschritten wurde, wiederholten wir die Analyse der Probe. Da die per Biopsie und Autopsie gewonnenen NB-Proben eine vergleichbare ATF5- und Glycerinaldehyd-3-

phosphatdehydrogenase- (GAPDH) Expression zeigten, wurden sie zu einer Gruppe zusammengefasst [5].

3.2.4 IHC-Färbungen

Wir führten IHC-Färbungen durch, um den IDH1 R132H-Mutationsstatus, sowie die Ki67 und ATF5 Proteinexpression in den Gewebeproben zu analysieren. Dafür fertigten wir 3µm dicke Schnitte der in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke an. Diese Schnitte wurde in einer abgestuften Reihe aus Xylol und Ethanol (100 %, 96 %, 70 %) und abschließend destilliertem Wasser rehydratisiert. Die Freisetzung der Epitope erfolgte durch Erhitzung der Proben auf 120 °C in Citratpuffer (pH=6,0) für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit 0,7 % Wasserstoffperoxid behandelt, um die Aktivität der humanen Peroxidase zu blockieren. Dann wurden die Schnitte mit 10 % Ziegenserum behandelt und entweder mittels des IDH1 R132H-, Ki67- oder ATF5-Antikörpers unter Verwendung des Envision Systems HRP DAB mit 3,3'-Diaminobuttersäure (DAB) gefärbt. Der Zellkern wurde mittels einer sauren Hämalaun-Lösung gegengefärbt [5].

Die Immunreaktion der IDH1 R132H-Färbung wurde mittels eines zweikategorialen Auswerteverfahrens als positiv oder negativ bewertet, je nachdem ob die Tumorzellen eine deutliche zytoplasmatische Anfärbung zeigten oder nicht. Für die Ki67-Färbung erhoben wir den Anteil der Zellen mit spezifischer positiver Färbung [5].

Die ATF5-Färbungen wurden semiquantitativ ausgewertet. Wir fertigten mittels eines LEICA DMI 3000B Mikroskops repräsentative Aufnahmen fünf verschiedener Areale jedes Schnittes bei standardisierten Bedingungen (40×-Objektiv; Belichtungszeit: 25 ms; Gain: 1,0×; Gamma: 1; ansonsten Standardeinstellungen) an. Anschließend wurden diese mittels der "batch processing" Funktion des Open-Source Programmes ImageJ bzw. Fiji [62-64] bezüglich ihrer Farbeintensität untersucht. Das verwendete Makro lautete wie folgt [5]:

```

⊗ imgName=getTitle();

⊗ run("Colour Deconvolution", "vectors=[H DAB]");

⊗ selectWindow(imgName+"-(Colour_3)");

⊗ close();

⊗ selectWindow(imgName+"-(Colour_1)");

⊗ close();

⊗ selectWindow("Colour Deconvolution");

⊗ close();

⊗ selectWindow(imgName+"-(Colour_2)");

⊗ run("Measure");

⊗ run("Close All");

```

Mittels der "color deconvolution" Funktion [65] wurden der Hämalun- und DAB-Farbkanal aus der ursprünglichen Aufnahme extrahiert. Anschließend bestimmten wir die mittlere Intensität der in 8-bit-Graustufen konvertierten DAB-Bilder und berechneten aus dieser die optische Dichte (OD) mittels der Annäherungsformel $OD = \log(255/\text{Mittlere Intensität})$. Um den Einfluss diverser Störfaktoren, wie gewebefreier Areale oder unspezifischer Hintergrundfärbung zu verringern, verwendeten wir die mediane OD aller fünf Aufnahmen pro Schnitt für die weiterführenden Analysen [5].

Da die optische Absorption von DAB nicht dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt und man deswegen keine lineare Korrelation der Antikörper-Bindung und der DAB-Intensität voraussetzen sollte [66], unterteilten wir unsere Proben anhand der medianen OD in eine Gruppe mit hoher optischer Dichte und eine Gruppe mit niedriger optischer Dichte, um den tolerierten statistischen Fehler zu minimieren [5].

3.2.5 HRM Analysen

Wir behandelten die aus den kryokonservierten Gewebeproben extrahierte DNA, sowie humane Kontrollen des Cell-to-CpG™ Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit nach Anleitungen des Herstellers mit dem Bisulfite Conversion Kit, um die unmethylierten Cytosine des DNA-Stranges zu Uracil zu desaminieren [5].

Anschließend untersuchten wir die Methylierung der Zellen per HRM. Bei dieser Methode wird eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit nachfolgender Schmelzanalyse der PCR-Produkte kombiniert, um die MGMT-Promotormethylierung zu bestimmen. Die Analysen wurden mit einem StepOnePlus™ PCR System durchgeführt [5].

Nach der Bisulfite Konversion zeigen die PCR-Produkte der unmethylierten DNA einen verhältnismäßig geringeren GC-Anteil als die hochmethylierten DNA-Stränge, was aufgrund der dadurch geringeren Wasserstoffbrückenbindungen zu einer erniedrigten Schmelztemperatur der DNA-Doppelstränge führt. Die HRM-Primer wurden auf Basis der Vorarbeiten von Adachi et al. [67] ausgewählt und mittels der Methyl Primer Express® Software verifiziert. Die Proben wurden zur Enzymaktivierung für 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend für 45 Zyklen aus jeweils 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C amplifiziert. Die Schmelzanalyse wurde bei 10 s bei 95 °C, 1 min bei 60 °C, 15 s bei 95 °C und 15 s bei 60 °C durchgeführt [5].

3.3 STATISTISCHE ANALYSEN

Die qPCR-Daten wurden anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet [68]. Als statistische Grundlage verwendeten wir den medianen Ct-Wert der technischen Replikate. Die erhobenen Daten aus multiplen Läufen wurden mittels der ExpressionSuite Software v1.0.3 überprüft und auf einheitliche Schwellenwerte angeglichen. Die weiteren statistischen Analysen wurden mittels der IBM SPSS Statistics 25 Software erstellt. Wir verglichen die Gruppen durch eine ANOVA (nach vorherigem Levene-Test) und, bei signifikantem Ergebnis, Scheffé-Test als post hoc-Test miteinander. Die Primärtumoren und ihre jeweiligen Tumorrezidive wurden mittels eines gepaarten zweiseitigen *t*-Tests miteinander verglichen. Um das PFS und das OS der Patienten zu untersuchen, teilten wir die Patientenpopulation anhand der medianen ATF5-Expression (6-fach) in eine hochexprimierende und eine niedrigexprimierende Gruppe ein [5].

Das Langzeitüberleben der Patienten wurde dabei mittels Kaplan-Meier-Analyse (Breslow) verglichen, während wir das Kurzzeitüberleben mittels einer zeitabhängigen Cox-Regression bewerteten. uni- und multivariate Analysen der Überlebensdaten wurden mittels des *cox proportional hazards*-Modell untersucht [5].

Wir verglichen die Schmelzkurven unter Verwendung der High-Resolution Melting Software und des *line of best fit*-Modells mit den entsprechenden HRM-Kontrollen. Die durchschnittliche optische Dichte der anti-ATF5-gefärbten NB- (n=8), LGG- (n=31) und GBM- (n=21) Gewebeproben wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten *t*-Tests miteinander verglichen. Aufgrund der kleinen Probenanzahl führten wir hierfür keine weiterführenden Subgruppenanalysen durch [5].

Bekannt prognostische Faktoren wurden bezüglich ihres Zusammenhangs mit PFS und OS in die Überlebenszeitanalysen miteinbezogen. So wurden neben der Durchführung multivariater Analysen die hochexprimierende und niedrigexprimierende Gruppe mittels nicht-parametrischer Tests auf eine ungleiche Verteilung untersucht [5].

3.4 LITERATURZUSAMMENFASSUNG UND GESAMTANALYSE

Um Publikationen, die Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung beschreiben, zu identifizieren, führten wir eine PubMed-Literaturrecherche mit den Suchbegriffen “MGMT AND glioblastoma AND relapse“, “O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase AND glioblastoma AND relapse“ und “MGMT AND methylation AND change“ durch. Die Literaturrecherche wurde letztmalig am 30.10.2019 und von zwei Investigatoren unabhängig voneinander durchgeführt (J. Feldheim, C. Hagemann) [3].

Wir schlossen nur Resultate in englischer Sprache ein. Artikel zu anderen Tumorentitäten, ohne Daten zur MGMT-Promotormethylierung, ohne Informationen zur MGMT-Promotormethylierung im Primär- und Rezidivtumor oder ohne gepaarte Primärtumoren und Tumorrezidive wurden aus den weiteren Analysen ausgeschlossen [3].

Zur Validierung führten wir eine ähnliche Suche über die Web-of-Science Datenbank durch. Bei dieser zeigten sich jedoch keine weiteren Berichte von entsprechender Qualität oder Thematik, um in unsere Analysen aufgenommen zu werden. Unsere Literaturzusammenfassung und Meta-Analyse wurden in Übereinstimmung mit den

PRISMA-Richtlinien (Abbildung 1) durchgeführt. Die durch Datenbanksuche erhobenen Publikationen wurden außerdem auf relevante Zitierungen inkl. Kreuzreferenzen untersucht. Hierdurch konnten wir mehrere Publikationen, die von ähnlichen Beobachtungen berichten, identifizieren. In die Gesamtanalyse/Meta-Analyse wurden nur Studien mit einer Fallzahl ≥ 10 Patienten eingeschlossen. Unabhängig von der verwendeten Technik wurde die Methylierung basierend auf dem *cut-off*-Wert der jeweiligen Studie in methyliert und unmethyliert unterschieden und nicht nach Methylierungsgrad. Falls die MGMT-Promotormethylierung in einer Studie mit mehreren unterschiedlichen Methoden untersucht wurde, konzentrierten wir uns auf die Methode mit der größeren Anzahl valide untersuchter Proben. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen sowohl im Primärtumor als auch im zugehörigen Rezidiv die MGMT-Promotormethylierung analysiert wurde. Deswegen wurde ein Großteil der eingeschlossenen Daten aus Tabellen oder dem Anhang der Publikationen erhoben und wird somit nicht zwangsläufig in der hier verwendeten Form direkt im Text der Quellen genannt [3].

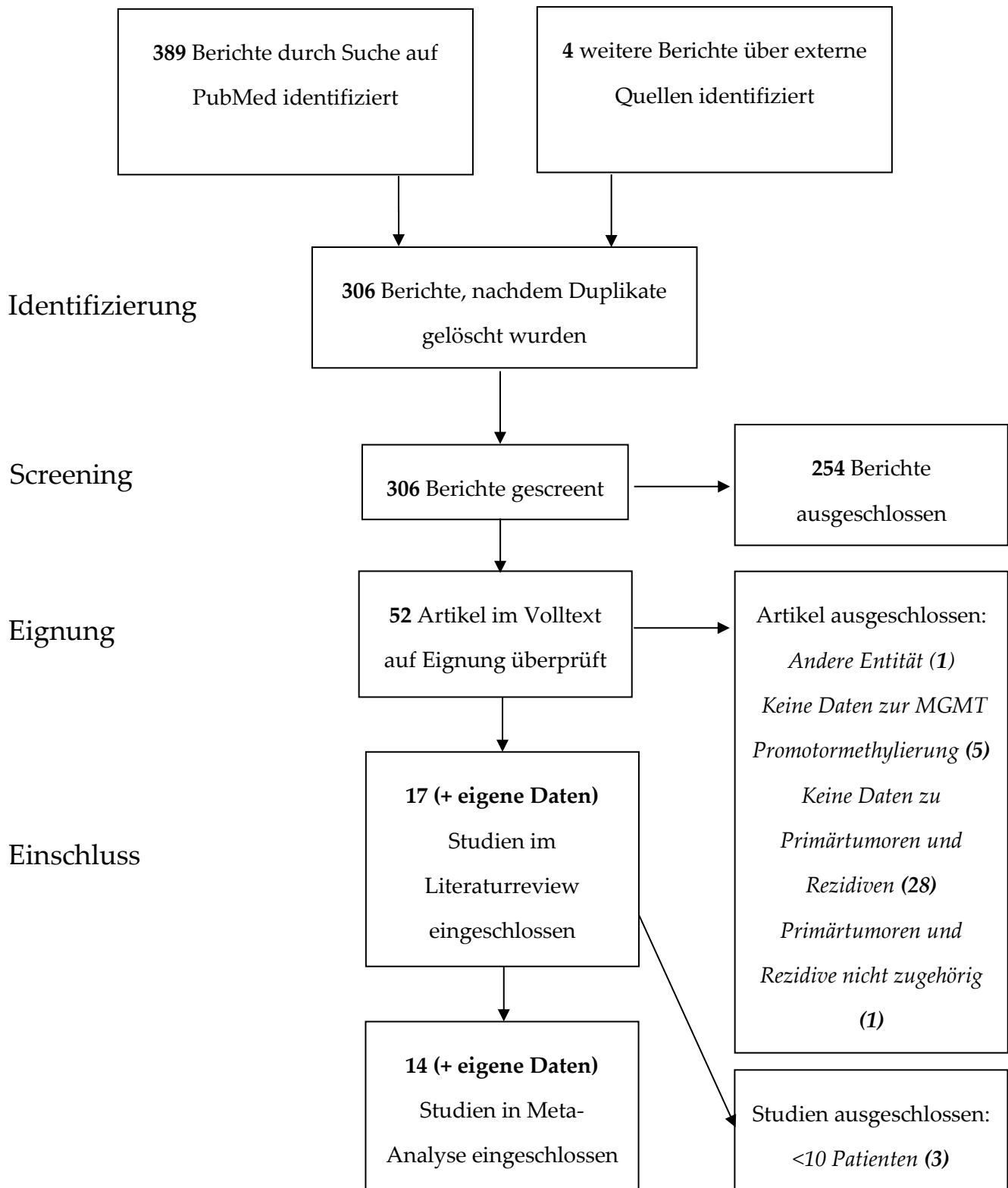


Abbildung 1: Systematische Zusammenfassung der ein-/ausgeschlossenen Literaturquellen in Bezug auf Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung im GBM-Rezidiv nach PRISMA-Richtlinien. Angepasst nach [3].

4 ERGEBNISSE

4.1 PATIENTENKOHORTE

Wir untersuchten insgesamt 40 Patienten mit einem nachgewiesenen LGG WHO Grad II und 79 Patienten mit einem bestätigten GBM WHO Grad IV auf ihre ATF5-mRNA-Expression. Für 51 der GBM-Patienten, die zwischen Januar 2011 und Dezember 2013 in unserer Institution behandelt wurden, erhoben wir retrospektiv die klinischen Daten [5].

Die Patientencharakteristika, sowie Informationen über deren Therapie, Überleben, etc. sind in Tabelle 7 zusammenfasst. Bei 9 dieser Patienten wurde primär ein multifokales GBM, bei 27 Patienten ein primär lokales GBM mit lokalem Rezidiv und bei 15 Patienten ein primär lokales GBM mit multifokalem Rezidiv diagnostiziert. Bei 5 der Patienten mit Lokalrezidiv (Erstrezidiv: n=5; Zweitrezidiv: n=1) und 1 Patienten mit Multifokalrezidiv war es uns auch möglich, das Gewebe des Rezidivtumors zu gewinnen und zu analysieren [5].

Einige der eingeschlossenen Patienten wurden post-/präoperativ teilweise oder komplett in externen Institutionen behandelt. Außerdem konnten einige Analysen bei insuffizienter Menge der Gewebeproben nicht durchgeführt werden. Deswegen fehlen punktuell die Informationen zur Chemotherapie (n=4), Strahlentherapie (n=3), MGMT-Promotormethylierung (n=9), IDH-Mutation (n=10), Ki67-Färbung (n=3) oder zum Resektionsausmaß des Tumors (n=1) [5].

4.2 ATF5-EXPRESSION IN GLIOM-PROBEN

Verglichen mit den NB-Proben fand sich in der qPCR eine 7-fache Überexpression der ATF5-mRNA in den LGG- ($p < 0,001$) und eine 10-fache Überexpression in den GBM-Proben ($p < 0,001$) (Abbildung 2a). Die ATF5-Expression im LGG und GBM unterschied sich jedoch nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Da die ATF5-Expression im GBM nicht nur erhöht war, sondern auch eine deutliche Fluktuationsrate zur Darstellung kam, untersuchten wir, ob GBM unterschiedlicher Wachstumsmuster bei Diagnose des Primär- und Rezidivtumors unterschiedliche ATF5-Expressionen aufwiesen (Abbildung 2b) [5].

Grundlegende Patientendaten

Geschlecht	Weiblich: 19 / 37,3 %	Männlich: 32 / 62,7 %	
Alter bei D (Median)	59 Jahre		
Karnofsky Index bei D	0 - 40 %: 5 / 9,8 %	60 - 80 %: 17 / 33,3 %	90 - 100 %: 29 / 56,9 %
ECOG bei D	0: 26 / 50,9 %	1: 19 / 37,3 %	> 1: 6 / 11,8 %
Therapie			
Zeit von D bis Operation	0 - 7 d: 28 / 54,9 %	8 - 14 d: 15 / 29,4 %	> 14 d: 8 / 15,7 %
Operatives Verfahren	Biopsie: 9 / 17,6 %	Totalresektion: 11 / 21,6 %	Subtotale Resektion: 31 / 60,8 %
Chemotherapie mit TMZ	Ja: 38 / 80,9 %		Nein: 9 / 19,1 %
Strahlentherapie	Ja: 45 / 93,7 %		Nein: 3 / 6,3 %
Klinischer Verlauf			
OS	0 - 6 Monate: 5 / 9,8 %		> 6 Monate: 46 / 90,2 %
Rezidiv/Progress	Primär multifokal: 9 / 17,7 %	Lokalrezidiv: 27 / 52,9 %	Multifokalrezidiv: 15 / 29,4 %
PFS	0 - 6 Monate: 8 / 19 %		> 6 Monate: 34 / 81 %
Tumorcharakteristika			
Tumorvolumen (Median)	24,3 ccm		
Tumorlokalisation bei D	Linkshemisphärisch: 28 / 54,9 %	Rechtshemisphärisch: 18 / 35,3 %	Bihemisphärisch: 5 / 9,8 %
Tumorlokalisation bei D (Lappen)	Frontal: 15 / 29,4 %	Okzipital: 6 / 11,8 %	Temporal: 8 / 15,7 %
IDH1 Mutation	Wt IDH1: 36 / 87,8 %		Parietal: 5 / 9,8 %
MGMT Promotormethylierung	Unmethyliert: 10 / 23,8 %		Multifokal: 16 / 31,4 %
Ki67 Färbung (Median)	25 %		Andere: 1 / 1,9 %
			IDH1 R132H: 5 / 12,2 %
			Methyliert: 32 / 76,2 %

Tabelle 7: Zusammenfassung der klinischen Daten der GBM-Patienten

Angegeben sind jeweils die absoluten Zahlen der GBM-Patienten in jeder Gruppe sowie der Anteil an der untersuchten Population.

Abkürzungen: ccm, Kubikzentimeter; D, Diagnose; d, Tage; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group-Skala; GBM, Glioblastoma multiforme; IDH, Isozitrathydrogenase; MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA Methyltransferase; OS, Gesamtüberleben; PFS, Progressionsfreies Überleben; TMZ, Temozolomid;

WT, Wildtyp. Angepasst nach [5].

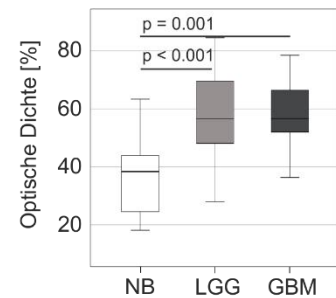
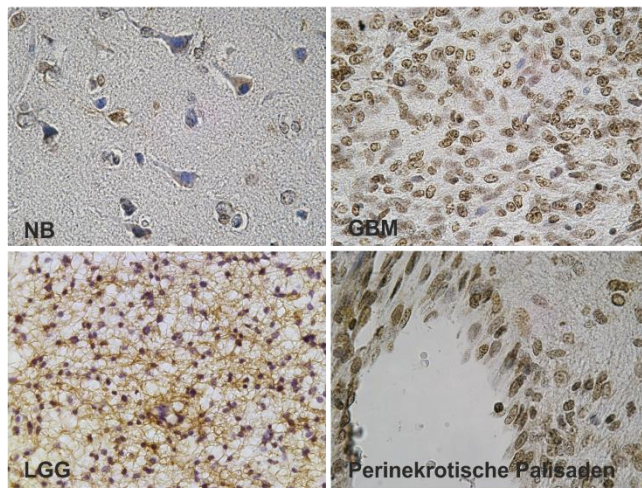
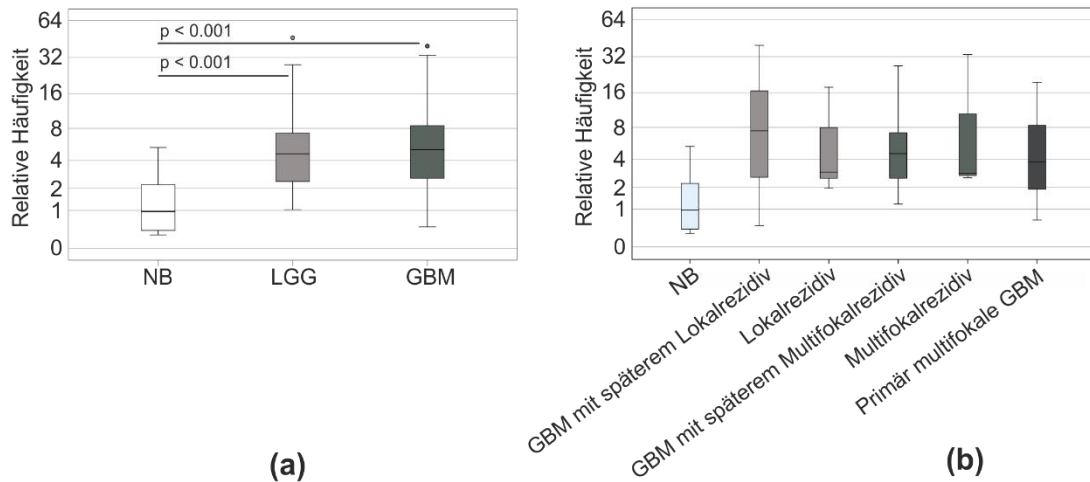


Abbildung 2: ATF5-Expression in Gliomproben

Wir untersuchten die ATF5-mRNA-Expression von kryokonservierten Tumorgewebsproben mittels qPCR und verwendeten GAPDH als endogenen Marker. **(a)** Vergleich der ATF5-mRNA-Expression in NB (n=10), LGG (n=40) und GBM (n=79). Die Punkte stellen jeweils statistische Ausreißer dar. **(b)** Expressionsanalyse der ATF5-mRNA in NB- (n=10) und GBM-Proben mit verschiedenen Wachstumsmustern (primär lokale Tumoren (n=27) und ihre Lokalrezidive (n=5), primär lokale Tumoren (n=15) und ihre Multifokalrezidive (n=1) und primär multifokal wachsende Tumoren (n=9)). ANOVA (Scheffé-Prozedur). Der Median und die Quartile sind dargestellt, die Fehlerbalken repräsentieren das 95 % CI. **(c)** Wir färbten ATF5 mittels eines DAB-basierten Protokolls in Paraffin eingebetteten NB- (n=8), LGG- (n=31) und GBM-Proben (n=21). Zudem stellten wir gezielt die perinecrotischen Palisaden in GBM dar. Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel in 400facher

Vergrößerung. **(d)** Quantifizierung der ATF5-Proteinexpression basierend auf der optischen Dichte (OD) der anti-ATF5-DAB-Färbungen in NB (n=8), LGG (n=31) und GBM (n=21). Wir unterteilten die OD anhand des Medians in die zwei Gruppen „hohe OD“ und „niedrige OD“ und verglichen diese anschließend mittels eines ungepaarten-zweiseitigen *t*-Tests. Der Median und die Quartile sind dargestellt, die Fehlerbalken repräsentieren das 95 % CI.

Abkürzungen: GBM, Glioblastoma multiforme; LGG, Gliom WHO Grad II; NB, Hirngewebe ohne Hinweis für / Nachweis einer Pathologie des zentralen Nervensystems. Angepasst nach [5]

Die von uns untersuchten Subgruppen der GBM-Primärtumoren mit späterem Lokalrezidiv, GBM-Primärtumoren mit späterem multifokalen Rezidiv und primär multifokal wachsenden GBM-Tumoren zeigten eine vergleichbare ATF5-Expression ($p=0,620$). Selbiges bestätigte sich im Vergleich der Primärtumoren mit ihren jeweiligen Lokal- ($p=0,928$) und Multifokalrezidiven ($p=0,985$) (Abbildung 2b), und ebenso für Tumoren unterschiedlicher Lokalisationen (links-, rechts- oder bihemisphärisch: ($p=0,524$); Lokalisation im Frontal-, Okzipital-, Temporal-, Parietal-, oder in multiplen Hirnlappen: ($p=0,829$)) [5].

Die ATF5-Expression zeigte keine signifikante Korrelation mit der Eastern Cooperative Oncology Group Skala (ECOG) oder dem Tumolvolumen und war für Patienten beider Geschlechter vergleichbar ($p>0,05$). Das Alter der Patienten bei Diagnosestellung hingegen korrelierte im nicht-parametrischen Test signifikant mit der ATF5-mRNA-Expression ($r=0,339$, $p=0,028$). Interessanterweise korrelierten außerdem der Proliferationsindex, den wir mittels der Ki67-Färbung bestimmten und die ATF5-mRNA-Expression signifikant invers miteinander ($r=-0,421$, $p=0,007$) (Tabelle 8) [5].

Um zu evaluieren, ob sich die beobachtete ATF5-mRNA-Überexpression der GBM im Vergleich zu NB ebenfalls auf der Proteinebene bestätigen ließ, färbten wir 8 NB-, 31 LGG- und 21 GBM-Proben immunhistochemisch auf ATF5 (Abbildung 2c). Im NB-Gewebe zeigte sich eine überwiegend zytoplasmatische Anfärbung der Neuronen, jedoch nicht der Astrozyten. Im Gegensatz dazu stellten sich die Tumorzellen mit einer starken nukleären Anfärbung dar. Diese war am stärksten in den GBM-Zellen ausgeprägt, die die perinekrotische Palisade bildeten (Abbildung 2c). Zur semiquantitativen Bestimmung der

ATF5-Proteinexpression bestimmten wir die OD (Abbildung 2d). Verglichen mit den NB-Proben (mittlere OD 37 %).

Variablen	Univariates Modell			Multivariates Modell (p<0.001)		
	HR	95 % CI	p-Wert	HR	95 % CI	p-Wert
Geschlecht (männlich)	1,654	0,427–6,403	0,466	3,589	0,662–19,454	0,138
Alter	1,054	0,993–1,118	0,084	0,948	0,851–1,056	0,329
ATF5 (niedrig)	0,24	0,051–1,133	0,072	0,103	0,011–0,967	0,047
Keine TMZ Therapie	12,721	3,480–46,498	<0,001	29,929	1,915–467,737	0,015
Keine Strahlentherapie	6,958	1,437–33,688	0,016	18,869	2,113–168,521	0,009
Tumorresektion						
Total	1	Referenz	0,005			
Subtotal	4,65E+07*	0–6,23E+141*	0,947			
Biopsie	3,72E+06*	0–4,99E+142*	0,937			
ECOG						
4	1	Referenz	0,984			
3	0*	0 bis unendlich*	0,992			
2	0*	0 bis unendlich*	0,992			
1	0,572	0,064–5,122	0,617			
0	0,508	0,059–4,346	0,536			
IDH Wildtyp	22,022*	0–4,95E+06*	0,623			
Ki67-Färbung (%)	1,015	0,952–1,082	0,652			
Unmethylierter MGMT-Promotor	6,605	0,686–63,591	0,102			

Tabelle 8: Uni- und multivariate Analysen des 12 Monats-OS von 42 GBM-Patienten

Durch Anwendung des „Cox proportional hazard“-Modells wurde das 12 Monats-OS mittels uni- und multivariater Analysen verglichen. Signifikante Resultate sind in **fett** dargestellt.

*HR-Kalkulationen waren durch die limitierte Fallzahl eingeschränkt.

Abkürzungen: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group-Skala; GBM, Glioblastoma multiforme; IDH, Isonitrat-Dehydrogenase, MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; OS, Gesamtüberleben; TMZ, Temozolomid. Angepasst nach [5]

war die OD der untersuchten LGG (mittlere OD 58 %, $p > 0,001$) und GBM (mittlere OD 57 %, $p = 0,001$) signifikant erhöht, was für eine ATF5-Überexpression im Gliomgewebe unterschiedlichen WHO-Grades auf der Proteinebene sprach. Die ATF5-Proteinexpression in LGG und GBM unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,666$) [5].

4.3 ÜBERLEBENSZEITANALYSE DER GBM-PATIENTEN, AUFGETEILT NACH SUBGRUPPEN HOHER UND NIEDRIGER ATF5-MRNA-EXPRESSION ZUM ZEITPUNKT DER ERST-OPERATION.

Um eine mögliche prognostische Signifikanz der ATF5-Expression auf den weiteren klinischen Verlauf der 42 GBM-Patienten mit retrospektiv komplett erhobenen klinischen Daten zu bestimmen, unterteilten wir unser Patientenkollektiv anhand der medianen ATF5-mRNA Expression zum Zeitpunkt der erstmaligen Operation in zwei gleich große Gruppen (jeweils $n = 21$) [5].

Im ersten Jahr nach Diagnosestellung zeigte sich eine deutliche Aufteilung der beiden Überlebenskurven mit einem signifikanten Überlebensvorteil der niedrigexprimierenden Gruppe (medianes OS 18 gegenüber 13 Monaten in der hochexprimierenden Gruppe, $p = 0,022$). Dieser signifikante Unterschied verschwand jedoch, bei sich schrittweise annähernden Überlebenskurven, im weiteren Verlauf nach 24 Monaten ($p = 0,084$); (Abbildung 3a, Tabelle 9 und Tabelle 8). Die Analysen des PFS zeigten ein ähnliches Ergebnis. In der niedrigexprimierenden Gruppe war die mediane Zeit bis zum erstmaligen Auftreten eines Tumorprogress/Tumorrezidivs 12 Monate, während Selbiges in der hochexprimierenden Gruppe im Median bereits nach 6 Monaten der Fall war ($p = 0,024$); (Abbildung 3b und Tabelle 10). Um mögliche Verzerr- und Störeffekte durch bekannte prognoserelevante Faktoren auszuschließen, führten wir für das ausgewählte Patientenkollektiv ($n = 42$) weitere Korrelationsanalysen durch [5]:

Wie erwartet, korrelierte das Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt signifikant sowohl mit dem OS ($r = -0,479$, $p = 0,001$) als auch dem PFS ($r = -0,473$, $p = 0,004$). Der ECOG korrelierte mit dem PFS ($r = -0,334$, $p = 0,047$). Zudem stellte sich eine signifikante Korrelation des Resektionsausmaßes ($r = 0,419$, $p = 0,006$) und der TMZ-Chemotherapie ($r = 0,614$, $p < 0,001$) mit dem OS dar (Tabelle 11) [5].

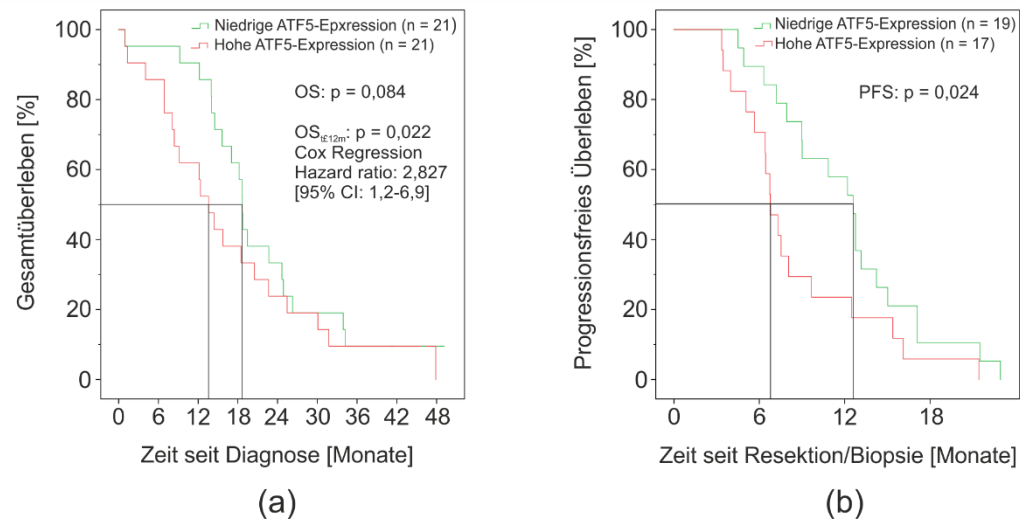


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Analysen der GBM-Patienten mit hoher bzw. niedriger ATF5-mRNA-Expression bei der initialen Operation

Das Kollektiv der GBM-Patienten wurde anhand der medianen ATF5-mRNA-Überexpression verglichen zum NB (6-fach) in eine Gruppe hoher ATF5-Expression und niedriger ATF5-Expression aufgeteilt. Mittels Kaplan-Meier-Analysen (Breslow) wurde das (a) OS und (b) PFS beider Gruppen verglichen.

Abkürzungen: GBM, Glioblastoma multiforme; OS, Gesamtüberleben; PFS, Progressionsfreies Überleben. Angepasst nach [5]

Variablen	Univariates Modell			Multivariates Modell (p<0.001)		
	HR	95 % CI	p-Wert	HR	95 % CI	p-Wert
Geschlecht (männlich)	1,056	0,519–2,150	0,88	1,318	0,594–2,927	0.497
Alter	1,053	1,015–1,092	0,005	1,058	1,009–1,110	0.02
ATF5 (niedrig)	0,564	0,276–1,150	0,115	0,676	0,292–1,567	0.361
Keine TMZ- Therapie	11,01	3,696–32,797	<0,001	6,585	1,917–22,623	0.003
Keine Strahlen- therapie	1,31	0,306–5,600	0,716	1,687	0,360–7,913	0.507
Tumorresektion						
Total	1	Referenz	0,001			
Subtotal	1,592	0,623–4,063	0,331			
Biopsie	9,195	2,655–31,846	<0,001			
ECOG						
4	1	Referenz	0,355			
3	0,306	0,026–3,576	0,345			
2	1,027	0,092–11,487	0,982			
1	0,342	0,073–1,611	0,175			
0	0,246	0,052–1,160	0,076			
IDH Wildtyp	3,942	0,516–30,131	0,186			
Ki67-Färbung (%)	1,002	0,958–1,048	0,928			
Unmethylierter MGMT- Promotor	2,248	0,946–5,343	0,067			

Tabelle 9: Uni- und multivariate Analysen des OS (kompletter Zeitraum) von 42 GBM-Patienten

Durch Anwendung des „Cox proportional hazard“-Modells wurde das OS mittels uni- und multivariater Analysen verglichen. Signifikante Resultate sind in **fett** dargestellt. HR-Kalkulationen waren durch die limitierte Fallzahl eingeschränkt.

Abkürzungen: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group-Skala; GBM, Glioblastoma multiforme; IDH, Isozitrat-Dehydrogenase, MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; OS, Gesamtüberleben; TMZ, Temozolomid. Angepasst nach [5].

Variablen	Univariates Model			Multivariates Model (p<0.001)		
	HR	95 % CI	p-Wert	HR	95 % CI	p-Wert
Geschlecht (männlich)	1,235	0,510–2,992	0,64	1,613	0,652–3,993	0,301
Alter	1,057	1,018–1,098	0,004	1,047	1,008–1,088	0,019
ATF5 (niedrig)	0,285	0,113–0,719	0,008	0,366	0,141–0,953	0,039
Keine TMZ Therapie	1,932	0,561–6,659	0,297			
Keine Strahlen- therapie	0,047*	0–710,216*	0,533			
ECOG						
4	1	Referenz	0,122			
3	3,737*	0,294–47,585*	0,31			
2	0,569	0,050–6,467	0,649			
1	0,652	0,138–3,088	0,59			
0	0,282	0,058–1,378	0,118			
IDH Wildtyp	0,447	0,100–2,004	0,293			
Ki67 Färbung (%)	0,944	0,889–1,004	0,066			
Unmethylierter MGMT Promotor	1,994	0,664–5,990	0,219			

Tabelle 10: Uni- und multivariate Analysen des PFS von 42 GBM-Patienten

Durch Anwendung des „Cox proportional hazard“-Modell wurde das 12 Monats-PFS mittels uni- und multivariater Analysen verglichen. Signifikante Resultate sind in **fett** dargestellt. *HR-Kalkulationen waren durch die limitierte Fallzahl eingeschränkt

Abkürzungen: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group-Skala; GBM, Glioblastoma multiforme; IDH, Isozitat-Dehydrogenase, MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; PFS, Progressionsfreies Überleben; TMZ, Temozolomid. Angepasst nach [5]

	Hohe Expression	Niedrige Expression	Verteilung	Korrelation mit		
				ATF5-mRNA	OS	PFS
Geschlecht (weiblich / männlich)	11 / 10	7 / 14	0,218	n.d.	n.d.	n.d.
Alter bei D (Median)	67 Jahre	49 Jahre	0,004	r = 0,339 p = 0,028	r = -0,532 p < 0,001	r = -0,509 p = 0,001
Zeit von D bis Operation (Median)	8 d	5 d	0,256	n.d.	r = -0,075 p = 0,599	r = -0,031 p = 0,845
OS (Median)	13 mo	18 mo	0,091	n.d.	n.d.	n.d.
Rezidiv / Progress (kein Rezidiv / lokal / multifokal)	4 / 13 / 4	2 / 10 / 9	0,095	r = 0,167 p = 0,290	n.d.	n.d.
PFS (Median)	6 mo	12 mo	0,029	r = -0,324 p = 0,054	r = 0,430 p < 0,001	n.d.
Karnofsky index bei D (Median)	80 %	90 %	0,146	r = -0,034 p = 0,830	r = 0,226 p = 0,111	r = 0,336 p = 0,029
ECOG bei D (Median)	1	0	0,112	r = -0,024 p = 0,878	r = -0,082 p = 0,566	r = -0,381 p = 0,013
Operative Intervention (Biopsie / Totalresektion / Subtotale Resektion)	5 / 11 / 5	1 / 16 / 4	0,477	n.d.	r = 0,490 p < 0,001	r = -0,042 p = 0,793
Tumorvolumen (Median)	23,1 ccm	45,8 ccm	0,261	r = -0,054 p = 0,749	r = 0,044 p = 0,773	r = 0,043 p = 0,793
Tumorlokalisation bei D (links / rechts / bihemisphärisch)	11 / 8 / 2	12 / 8 / 1	0,680	n.d.	n.d.	n.d.
Tumorlokalisation bei D (Lappen: frontal / okzipital / temporal / parietal / multifokal)	5 / 3 / 5 / 1 / 7	8 / 2 / 2 / 4 / 5	0,421	n.d.	n.d.	n.d.
Strahlentherapie (ja / nein)	20 / 1	19 / 2	0,554	n.d.	r = 0,159 p = 0,266	r = -0,265 p = 0,090
Chemotherapie mit TMZ (ja / nein)	15 / 6	19 / 2	0,120	n.d.	r = 0,601 p < 0,001	r = 0,280 p = 0,072
IDH1 Mutation (wt / mut)	18 / 1	15 / 1	0,896	r = -0,027 p = 0,883	r = 0,328 p = 0,036	r = -0,019 p = 0,916
MGMT Promotormethylierung (unmethyliert / methyliert)	3 / 16	6 / 11	0,183	r = 0,256 p = 0,131	r = 0,286 p = 0,066	r = 0,316 p = 0,068
Ki67 Färbung (Median)	20 %	30 %	0,016	r = -0,421 p = 0,007	r = 0,153 p = 0,299	r = 0,369 p = 0,019

Tabelle 11: Korrelationsanalysen der ATF5-mRNA-Expression mit den klinischen Daten von 42 GBM-Patienten

Signifikante Ungleichverteilungen und Korrelationen der klinischen Daten wurden mittels nicht-parametrischer Tests (Spearman's Rho) untersucht. Signifikante Korrelationen sind in **fett** dargestellt.

Abkürzungen: d, Tage; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group-Skala; GBM, Glioblastoma multiforme; IDH, Isozitat-Dehydrogenase; MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; mo, Monate; n.d., nicht bestimmt; PFS, Progressionsfreies Überleben; OS, Gesamtüberleben; TMZ, Temozolomid; WT, Wildtyp. Angepasst nach [5]

Zwischen der hoch- und niedrigexprimierenden Gruppe kam ein ähnliches Verteilungsmuster bezüglich des ECOG, des Tumorresektionsausmaßes und der TMZ-Chemotherapie zur Darstellung. Die Patienten in der hochexprimierenden Gruppe waren jedoch signifikant älter ($p=0,003$) und zeigten einen niedrigeren Ki67 Proliferationsindex ($p=0,014$) (siehe Tabelle 11). Um den möglichen prognostischen Effekt der ATF5-Expression unabhängig von dieser Ungleichverteilung abzuschätzen, führten wir weitere uni- und multivariate Analysen der Überlebenszeitdaten durch, bei welchen ATF5 signifikant prognostisch, jedoch abhängig mit dem Kurzzeit-OS ($t<12$ Monate, HR=0,103, 95 %iges-CI: 0,011-0,967, $p=0,047$) und dem PFS (12 Monate, HR=1,047, 95 % CI: 1,008 -1,088, $p=0,019$) assoziiert war (Tabelle 11) [5].

Zusammengefasst wurde ATF5 in den untersuchten Gliomen unabhängig des WHO-Grades, Wachstumsmusters und Rezidivverhaltens überexprimiert. Die ATF5-Expression war dabei prognostisch signifikant, jedoch nicht unabhängig, mit dem Kurzzeit-OS und PFS der Patienten assoziiert [5].

Während unserer Untersuchungen fiel bei einigen Patienten eine unerwartete Veränderung der MGMT-Promotormethylierung auf.

4.4 DIE MGMT-PROMOTORMETHYLIERUNG KANN SICH VOM PRIMÄRTUMOR ZUM REZIDIV ÄNDERN

Wir analysierten Primärtumoren und ihre jeweiligen zugehörigen Rezidive mittels HRM und einem *cut-off*-Wert von 10 % (siehe Tabelle 12). Bei 38 % der Patienten beobachteten wir eine Veränderung der MGMT-Promotormethylierung. Die Veränderungen traten dabei in beide Richtungen auf. Zusätzlich zu der Detektion globaler Veränderungen ermöglicht es die HRM, Unterschiede im Grad der Methylierung zu detektieren. Einige der Patienten mit einem *per definitionem* positiven Methylierungsstatus, sowohl im Primärtumor als auch im Rezidiv, zeigten trotzdem einen Anstieg der MGMT-Promotormethylierung von mindestens 20 %. Insgesamt stellte sich somit bei 62 % der eingeschlossenen Patienten eine instabile Methylierung dar. Bei drei der Patienten wurde neben einem Erst- auch ein späteres Zweitrezidiv diagnostiziert und therapiert. Einer dieser Patienten hatte interessanterweise

Patient	Patientencharakteristika			Tumorcharakteristika					Therapie			Prognose			
	Geschlecht	Alter [Jahre]	ECOG	Tumor- volumen [ccm]	Tumorlokalisation [Hemisphäre/Lappen]	IDH Mutation	MGMT		Ki67 Färbung [%]	Resektions- ausmaß	RT	TMZ	Rezidiv	OS [Monate]	PFS [Monate]
							Primär- tumor	Rezidiv							
1	Weiblich	69	1	33,6	Rechts / okzipital	Nein	Negativ	Negativ	20	Subtotal	Ja	Ja	Lokal	18	3
2	Weiblich	49	1	25,5	Links / parietal	Nein	Positiv	Positiv	35	Subtotal	Ja	Ja	Lokal	31	15
3	Männlich	42	0	54,1	Links / parietal	Nein	Positiv	Negativ	30	Subtotal	Ja	Ja	Lokal	45	12
4	Weiblich	70	1	9,3	Links / temporal	Nein	Positiv	Positiv	10	Subtotal	Ja	Ja	Lokal	30	3
5	Weiblich	59	0	8,2	Links / temporal	Nein	Positiv	Positiv	20	Subtotal	Ja	Ja	Lokal	14	4
6	Männlich	48	0	58,2	Rechts / frontal	Nein	Positiv	Positiv	30	Total	Nein	Ja	Lokal	34	22
7	Männlich	66	1	19,1	Links / frontal	Nein	Negativ	Positiv	20	Subtotal	Ja	Ja	Lokal	15	4
8	Männlich	58	3	89,9	Rechts / okzipital	Nein	Positiv	Positiv	25	Subtotal	Ja	Ja	Multifokal	24	4
9	Männlich	49	0	54,8	Links / frontal	Ja	Negativ	Positiv	30	Total	Ja	Ja	Lokal	48	6
10	Männlich	60	1	79,2	Links / temporal	Ja	Positiv	Negativ	25	Total	Ja	Ja	Lokal	25	7
11	Männlich	22	3	2,2	Links / frontal	Ja	Positiv	Positiv	35	Subtotal	Ja	Ja	Multifokal	27	10
12	Weiblich	47	1	2,3	Links / frontal	Nein	Positiv	Positiv	25	Subtotal	Ja	Ja	Multifokal	47	7
13	Männlich	74	0	60,7	Links / temporal	Nein	Negativ	Positiv	15	Subtotal	Ja	Nein	Lokal	12	7
Total	Weiblich: 5/38,5 %	Median: 58	Median: 1	Median: 33,6	Links: 10 / 76,9 % Rechts: 3 / 23,1 %	Nein: 10 / 76,9 %	Negativ: 4 / 30,8 %	Negativ: 3 / 23,1 %	Median: 25	Total: 3 / 23,1 %	Ja: 12 / 92,3 %	Ja: 12 / 92,3 %	Lokal: 10 / 76,9 %	Median: 27	Median: 7
	Männlich: 8/61,5 %				Frontal: 5 / 38,5 % Temporal: 4 / 30,8 % Okzipital: 2 / 15,4 % Parietal: 2 / 15,4 %	Ja: 3 / 32,1 %	Positiv: 9 / 69,2 %	Positiv: 10 / 76,9 %		Subtotal: 10 / 76,9 %	Nein: 1 / 7,7 %	Nein: 1 / 7,7 %	Multifokal: 3 / 23,1 %		

Tabelle 12: Zusammenfassung der klinischen Daten der GBM-Patienten mit Primärtumor und zugehörigem Rezidiv

Die MGMT-Promotormethylierung wurde mittels HRM mit einem *cut-off*-Wert von 10 % bestimmt. Entsprechend der Empfehlungen der WHO wurde für die Patienten mit einem Alter unter 55 Jahren und einer immunohistochemisch negativen IDH1R132H-Färbung eine ergänzende Pyrosequenzierung auf IDH1- und IDH2-Mutationen durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich alle dargestellten Informationen auf den Zeitpunkt der Diagnose.

Abkürzungen: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group-Skala; IDH, Isozitat-Dehydrogenase; MGMT, O⁶Methylguanin-DNA Methyltransferase; OS, Gesamtüberleben; PFS, Progressionsfreies Überleben; TMZ, Temozolomid. Angepasst nach [3]

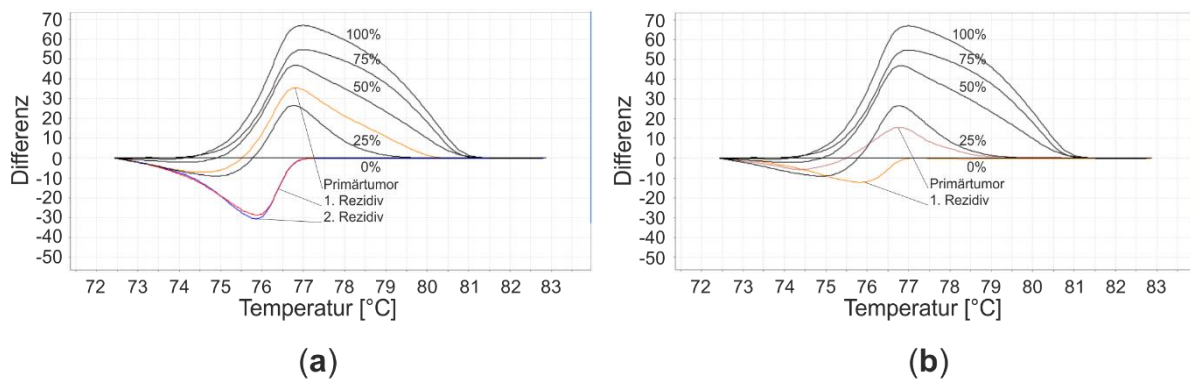


Abbildung 4: Beispiel von zwei Patienten mit einer Veränderung der MGMT-Promotormethylierung

Die MGMT-Promotormethylierung wurde mittels HRM bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Schmelzkurven inkl. Kontrollen. **(a)** Patient 3 hatte ein GBM, welches im Primärtumor zwischen 25 % und 50 % methyliert, in beiden Rezidiven jedoch komplett unmethyliert war. **(b)** Das GBM von Patient 7 war im Primärtumor zwischen 10 % und 25 % methyliert, das Tumorrezidiv hingegen unmethyliert. Detaillierte Angaben zu den Patienten sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Angepasst nach [3]

im Primärtumor einen positiven MGMT-Promotormethylierungsstatus, während beide Rezidivproben unmethyliert waren (Abbildung 4a) [3]. Zudem ist das Beispiel eines weiteren Patienten mit methyliertem Primärtumor und unmethyliertem Rezidiv dargestellt (Abbildung 4 b). In unseren Analysen zeigte sich keine Korrelation der MGMT-Promotormethylierung im Rezidiv mit dem OS der Patienten ($p > 0,05$) [5].

4.5 GESAMTANALYSE DER EINGESCHLOSSENEN STUDIEN

Um den Anteil der Patienten mit Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung in einem größeren Kollektiv zu analysieren, fassten wir alle Studien mit mindestens einer Fallzahl von 10 Patienten in einer Gesamtanalyse zusammen. Insgesamt beinhaltete diese somit 476 Patienten. Davon sahen wir bei 115 Patienten (24 %, CI: 0,21 bis 0,28) eine Veränderung ihrer MGMT-Promotormethylierung im klinischen Verlauf (Abbildung 5a). Diese Veränderungen teilten sich auf in 71 Patienten (30 %, CI: 0,24 bis 0,36), die von einem methylierten zu einem unmethylierten Zustand (Abbildung 5b) und 44 Patienten (18 %, CI: 0,14 bis 0,24) von einem unmethylierten zu einem methylierten Zustand wechselten (Abbildung 5c) [3].

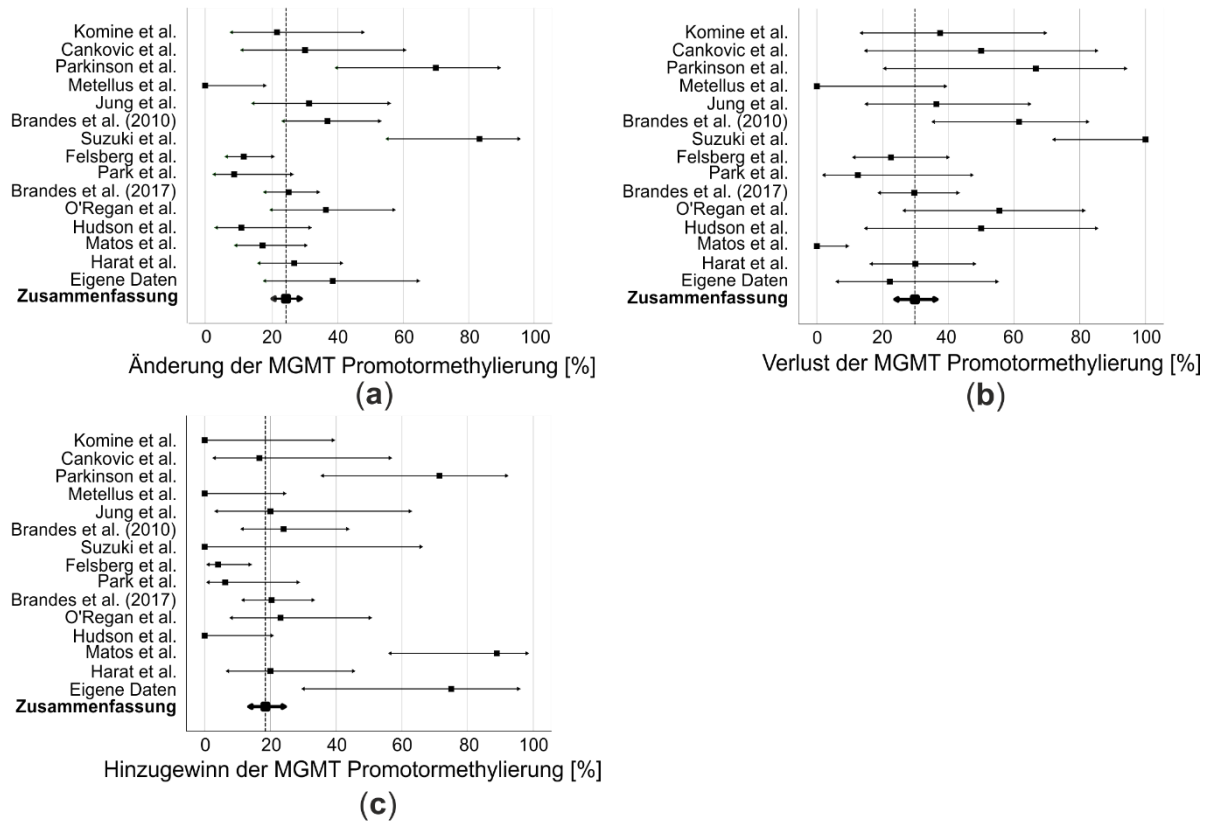


Abbildung 5: Gesamtanalyse ausgewählter Daten aus Publikationen, die von Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung im GBM-Rezidiv berichteten

Die Analyse wurde mit IBM-SPSS Statistics 25 durchgeführt. Es wurden nur Studien mit einer Fallzahl ≥ 10 Patienten eingeschlossen. **(a)** Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung in beide Richtungen.

(b) Verlust und **(c)** Hinzugewinn der MGMT-Promotormethylierung.

Schwarze Vierecke: Prozentzahl der Patienten mit einer Veränderung, einem Verlust oder Hinzugewinn der MGMT-Promotormethylierung. Die Pfeile zeigen das 95 %ige CI (berechnet aufgrund des Wilson-Score-Intervalls [69]). Die vertikale gestrichelte Linie gibt den Gesamtanteil der Veränderungen bzw. des Verlustes oder Hinzugewinns in der Gesamtanalyse der eingeschlossenen Publikationen an. Angepasst nach [3].

5 DISKUSSION

5.1 ATF5 IST ZWAR MIT DER PROGNOSE DER PATIENTEN ASSOZIIERT, JEDOCH KEIN UNABHÄNGIGER MARKER

In mehreren Vorpublikationen wurde bereits diskutiert, dass ATF5 einen prognostischen Marker für maligne Gliome darstellen könnte [54,57,70,71], was durch unsere Daten weiter unterstützt wird. Um einen *bias* unserer Ergebnisse durch Ungleichverteilung möglicher Störfaktoren zu vermeiden, untersuchten wir mehrere Charakteristika und Variablen, für die ein Zusammenhang mit der Prognose und dem Progress von GBM-Tumoren vorbeschrieben worden war. So zeigte sich neben einer negativen Assoziation der ATF5-Expressionen mit dem PFS und OS auch eine positive Korrelation mit dem ECOG, dem Resektionsausmaß und der Behandlung mit adjuvanter Chemo- und Strahlentherapie der Patienten. Wie zu erwarten, korrelierte zudem das Alter der Patienten bei Diagnosestellung negativ mit dem PFS und OS (Tabelle 8) [5].

Interessanterweise beobachteten wir eine negative Korrelation der ATF5-Expression und der Färbeintensität des Proliferationsmarkers Ki67. Es ist bekannt, dass eine hohe ATF5-Expression das Zellüberleben durch die Unterdrückung apoptotischer Signalwege fördert [72]. Eine solche Expression tritt bspw. in neuronalen Vorläuferzellen auf [51,52], was dafür spricht, dass hohe ATF5-Expressionen das Tumorstadium durch ein überlebensförderndes und apoptosevermeidendes Verhalten unterstützt [5,54,73,74].

Nichtsdestotrotz zeigte sich in von uns untersuchten GBM-Proben auch eine prozentual erhöhte Ki67-Anfärbung. Diese war jedoch im Tumorgewebe inhomogen verteilt, was erneut die hohe molekulare intratumorale Heterogenität unterstreicht [75]. Eine hohe ATF5-Expression korrelierte mit einer unvoreilhaften Prognose der GBM-Patienten sowie mit einem höheren Alter bei Diagnosestellung. Da das Alter bekanntermaßen einen Einfluss auf das OS der GBM-Patienten hat, könnte dies bedeuten, dass ATF5 kein unabhängiger prognostischer Marker ist [76]. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox-

Analyse unterstrichen. Nichtsdestotrotz zeigt die generelle ATF5-Überexpression unabhängig vom WHO-Grad oder Wachstumsmuster der malignen Gliome und ihre eindeutige Korrelation mit einem besseren PFS und Kurzzeit-OS bei niedriger ATF5-Expression das Potential von ATF5 als mögliches vielversprechendes Therapieziel auf [5].

5.2 ATF5 STELLT EIN VIELVERSPRECHENDES THERAPIEZIEL DAR

Der Goldstandard der GBM-Therapie fußt maßgeblich auf 3 Säulen: Operative Tumorexzision, um das Tumolvolumen zu verringern [77], Strahlentherapie für eine lokale und Chemotherapie für eine systemische Kontrolle des Tumorwachstums [78]. Das Spektrum innovativer neuer Therapiekonzepte ist jedoch weit. Hierzu zählen u. a. diverse immuntherapeutische Ansätze [40], zielgerichtete individualisierte Therapiekonzepte [79,80] und alternierende elektrische Wechselfelder [14,80]. Aufgrund ihrer molekularen Wirkmechanismen könnte eine Vielzahl solcher Therapiestrategien mutmaßlich durch ein (z.B. durch ATF5-Inhibition bedingtes) Heruntersetzen der Apoptoseschwelle unterstützt werden [5].

Inhibition der ATF5-Aktivität durch Applikation eines dominant-negativen ATF5-Proteins, welches künstlich hergestellt werden kann und sich durch fehlende N-terminale aktivierende und DNA-bindende Domänen und das Vorhandensein einer verstärkten bZip-Domäne auszeichnet, führte zu ausgeprägtem apoptotischen Zelltod in GBM-Zellkulturen. Der gleiche Effekt wurde durch einen *knockdown* der ATF5-Expression mittels spezifischer siRNAs erzielt [57,81]. In subkutanen und orthotopischen Mausmodellen wurde gezeigt, dass solche Konstrukte das Entstehen von experimentell-induzierten Gliomen verhindern oder diese sogar eradizieren konnten [5,57,81].

Außerdem unterstützt ATF5-Expression die Strahlentherapieresistenz in Tumorzellen der Lunge und eine Inhibition von ATF5 könnte sogar zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber einer Bestrahlung führen [82]. Der Effekt von ABT263 (Navitoclax), welches BH3-mimetisch und mittels Inhibition von BCL-2/BCL-xL wirkt [83], wird ebenfalls synergistisch durch ATF5-Inhibition verstärkt [5,56].

Deswegen wurde ein synthetisches dominant-negatives ATF5-Peptid CP-d/n-ATF5-S1 mit einer Zell-penetrierenden Domäne entwickelt, welches in *in vitro* und in sechs verschiedenen Tiermodellen einen Effekt auf *triple*-negativen Brustkrebs, Prostata-, Pankreas-, nicht-kleinzellige Lungen-, und kolorektale Karzinome sowie Melanome, hämatologische Neoplasien und GBM zeigte [55,56]. Es kann intraperitoneal oder subkutan appliziert werden, passiert die Blut-Hirn-Schranke, zeigt im Mausmodell eine spezieübergreifende Wirksamkeit und ist in humanem Blutserum stabil [5,55,56,84].

Im *in vivo* Setting führte dieses Peptid zu einer signifikanten Abschwächung des Tumorzustands durch eine pro-apoptische Wirkung auf Tumorzellen, jedoch nicht auf Astrozyten oder andere physiologische Zelltypen, wodurch bei therapeutischem Effekt auf das Tumorgewebe die Integrität des NB-Gewebes gewahrt wurde [5].

5.3 INITIALE UND INZIDENTELLE BEOBACHTUNGEN ZU VERÄNDERUNGEN DER MGMT-PROMOTORMETHYLIERUNG

Die erste Beobachtung einer Veränderung der MGMT-Promotormethylierung wurde von Komine et al. als inzidenteller Fund während eines Projektes zum protektiven Wert der MGMT-Promotormethylierung bei Patienten mit LGG berichtet (Tabelle 13) [85]. In einer weiteren Studie, deren primärer Schwerpunkt auf der Validierung eines vereinfachten Methylierungs-spezifischen-PCR- (MSP) Protokolls zur Bestimmung der MGMT-Promotormethylierung liegt, verglichen Cankovic et al. primäre Tumoren und Rezidive von astrozytären Tumoren unterschiedlicher Graduierung [86]. Detaillierte Informationen über den WHO-Grad der Tumoren bzw. die klinischen Daten der Patienten werden in beiden Studien jedoch aufgrund des anderweitigen Fokus der Projekte nicht mit bereitgestellt. Metellus et al. beschrieben den inzidentellen Fund eines sich ändernden MGMT-Methylierungsstatus im Rezidiv eines GBM-Patienten, der mittels Tumorresektion und Implantation eines *carmustine waver* behandelt worden war [3,87].

Diese Veränderung konnte jedoch nur mittels der MethyLight-Technik (cut off > 0 %) detektiert und nicht mittels MSP bestätigt werden. Ebenfalls inzidentell ist eine Fallbeschreibung eines epithelialen GBM mit multiplen Rezidiven und methyliertem MGMT-Promotor, dessen Histologie sich im Rezidiv zu einem herkömmlichen unmethylierten GBM

änderte [88]. Im Fokus einer anderen Studie stand die Identifizierung von molekularen Veränderungen nach Therapie und Wiederauftreten der Erkrankung mit besonderem Schwerpunkt auf DNA-Reparatur-Signalwege [89]. Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung wurden mittels Pyrosequenzierung mit einem *cut off* von 13 % erhoben. Jüngst wurden in einem Projekt Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen Primärtumoren und Rezidiven untersucht [90]. Als Randnotiz bestimmten die Autoren die MGMT-Promotormethylierung in einer Subgruppe der Patientenkohorte, bei welcher der Großteil unmethylierter Proben im primären GBM sich im Tumorprogress als methyliert darstellte. Leider geben auch die Autoren dieser Studie keine weiteren Subgruppenanalysen mit an, da die Veränderung der MGMT-Promotormethylierung nur eine Nebenbeobachtung darstellte [3,90].

Insgesamt implizieren diese Daten, dass die MGMT-Promotormethylierung im Krankheitsverlauf nicht immer stabil ist. Dies war der Anhaltspunkt für weitere Forschungsprojekte, um die potentiellen klinischen Implikationen dieser Veränderungen zu bestimmen [3].

5.4 SYSTEMATISCHE KLINISCHE STUDIEN ZU VERÄNDERUNGEN DER MGMT-PROMOTORMETHYLIERUNG

Die ersten, die sich systematisch mit der Variabilität der MGMT-Promotormethylierung in GBM beschäftigten, waren Parkinson et al. in einer kleinen, 2008 publizierten Studie (siehe Tabelle 13) [91]. Die Proben wurden nicht nur mittels MSP, sondern auch über Promotor-Sequenzierung analysiert, was schon die Detektion kleinerer Abweichungen erlaubte. Eine Zunahme der Methylierung wurde in 50 % der Patienten beobachtet, ein Verlust hingegen bei 20 %. Somit behielten lediglich 30 % der Patienten einen unmethylierten MGMT-Promotor-Status im Rezidiv. Interessanterweise wichen diese Ergebnisse von denen der MSP ab, bei der nur 2 von 4 Patienten eine Zunahme der Methylierung zeigten. Dieser Unterschied könnte durch die höhere Genauigkeit der Promotor-Sequenzierung entstehen, aber ebenso durch den veränderten *cut off*-Wert, der bspw. eine 4 %-Methylierung als positiv einordnet, während der aktuelle Standard in der klinischen Praxis bei 8 bis 10 % liegt [32,44]. Es sollte erwähnt werden, dass die Autoren einen Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor im Primär- und

Rezidivfall beschreiben, der eine Zunahme des Methylierungsgrades um 28 % zeigt, welche nicht mittels MSP dargestellt werden konnte [3,91].

Christmann et al. beleuchteten die Zusammenhänge zwischen dem MGMT-Methylierungsstatus und der MGMT-Aktivität in GBM-Patienten näher [92]. Allgemein zeigen ihre Daten eine gesamtübergreifende Korrelation zwischen einer Methylierung des MGMT-Promotors und fehlender oder geringer MGMT-Aktivität. Ebenfalls verglichen die Autoren primäre GBM-Proben mit ihren jeweiligen Rezidiven. Bei insgesamt 22 % der Proben beschrieben sie eine initiale Methylierung bei niedriger MGMT-Aktivität. Bei einem dieser Tumoren bildete sich eine verminderte und bei einem weiteren eine komplett verlorene MGMT-Promotormethylierung im klinischen Verlauf ab, wobei bei den Proben die MGMT-Aktivität aufrechterhalten bzw. weiter erhöht wurde [3,92].

Eine weitere Studie evaluierte Variationen der MGMT-Promotormethylierung und Proteinexpression nach adjuvanter Therapie in GBM-Patienten und kam dabei zu sehr ähnlichen Ergebnissen [93]. Zusammengefasst zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors und der MGMT-Proteinexpression in 65 % der analysierten Fälle. Bei 33 % der Rezidiv-GBMs beschrieben die Autoren eine Änderung der MGMT-Promotormethylierung im Vergleich zum passenden Primärtumor desselben Patienten. Ein direkter, kurzfristiger Einfluss der Therapie auf die MGMT-Promotormethylierung konnte im Zellkulturexperiment jedoch nicht verifiziert werden [3,93].

Eine japanische Forschungsgruppe beobachtete eine Korrelation der MGMT-mRNA-Expression mit der MGMT-Promotormethylierung [94]. Die Autoren analysierten astrozytäre Tumoren der WHO-Grade II bis IV, von welchen 83 % ihre initiale Methylierung verloren, während die primär unmethylierten Tumoren ihre Methylierung im klinischen Verlauf nicht änderten. Suziki et al. spekulierten, dass therapieresistente Klone oder Gliomstammzellen die Therapie überleben, um anschließend einen Rezidivtumor zu bilden [3,94].

In einer größeren Studie veränderten 37 % der GBM-Patienten, die mittels Strahlentherapie und TMZ-Chemotherapie behandelt wurden, ihre MGMT-Methylierung [95]. Sieben Jahre später konnten die Autoren ihre initiale Studie weiter ergänzen und berichteten von einer stabilen MGMT-Promotormethylierung bei 75 % der eingeschlossenen Patienten [3,48].

Aus einer anderen Perspektive gesehen bedeutet dies jedoch, dass 25 % der Patienten ihre MGMT-Promotormethylierung veränderten. In diese Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die adjuvant mittels RT und TMZ therapiert wurden, um den Einfluss verschiedener post-operativer Behandlungen auf die genetischen und epigenetischen Veränderungen als potentielle Störfaktoren auszuschließen. Beide Studien deckten eine signifikante Korrelation des OS mit dem MGMT-Methylierungsstatus des primären Tumors auf, jedoch keine ähnliche Korrelation im Rezidivfall. Daraus ergab sich keine definitive Implikation zur erneuten Testung der MGMT-Methylierung im Tumorprogress [3].

Im Kontrast zu vorherigen Beobachtungen berichten Felsberg et al. von einer relativ niedrigen Prozentzahl an Patienten (11 %), die ihre MGMT-Promotormethylierung im Verlauf änderten [96]. Von diesen 11 % waren ihrer Aussage nach nur 6 % „echte Veränderungen“, bei denen der Verlust oder die Verminderung der MGMT-Promotormethylierung bei Tumorrezidiv nicht durch einen niedrigen Tumorzellanteil in der jeweiligen Gewebeprobe erklärt werden konnte [96]. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die MGMT-Promotormethylierung sich bei einer Vielzahl der GBM-Patienten vom Primär- zum Rezidivtumor nicht verändert und sich daraus auch kein Zusatznutzen bzw. keine Implikation für wiederholte Testung der MGMT-Promotormethylierung in der täglichen klinischen Routine ergibt [3,96].

Ein ähnlich niedriger Wert von nur 8 % Veränderung der MGMT-Promotormethylierung, mittels MSP-detektiert, wird von Park et al. berichtet [97]. Die Autoren analysierten die Proben ihrer 12 Patienten jedoch außerdem mittels methylierungsspezifischer Multiplexligation-Probenamplifikation (MS-MLPA). Hierbei beobachteten sie eine Verminderung der MGMT-Promotormethylierungsrate bei 75 % der Proben. Sie schlussfolgern daraus, dass solche Änderungen häufig undetektiert bleiben könnten, wenn die Proben einzig mit MSP untersucht werden [3,97].

O'Regan et al. entschieden sich für ihre Analysen für Pyrosequenzierung mit einem *cut off*-Wert von 9 % [98]. Während 64 % der Patienten bezüglich ihres Methylierungsstatus stabil blieben, beobachteten die Autoren bei 36 % eine Veränderung. Die Autoren stellen im Folgenden die Hypothese auf, dass solche Veränderungen mit der TMZ-Therapie zusammenhängen könnten. Obwohl O'Regan et al. keinen signifikanten Einfluss der Veränderung der Methylierung mit dem PFS und OS der Patienten sehen, stellen sie in ihrer

Diskussion eine Notwendigkeit der Neubewertung der MGMT-Promotormethylierung nach Therapie heraus [3,98].

Eine weitere Studie berichtet von einer Veränderung der MGMT-Promotormethylierung in 27 % der Fälle [99]. Diese Studie unterscheidet sich wesentlich von ihren Vorgängern, da die Autoren mehrere Proben jedes individuellen Tumors entnahmen, je eine aus der Tumorperipherie und eine aus dem zentralen Bereich. Bei 80 % der Fälle zeigte sich ein homogenes Verteilungsmuster der MGMT-Promotormethylierung im gesamten Tumor. Bei 20 % war die periphere Probe unmethyliert, jedoch die Probe aus dem Tumorzentrum methyliert. Die Autoren beobachteten nur bei diesen heterogen methylierten Tumoren eine Veränderung der Methylierung im Rezidivfall. Sie spekulieren deswegen, dass die Veränderungen aufgrund einer klonalen Expansion von vorher heterogenen Tumorzellen entsteht, die ein homogenes Tumorzidiv hervorrufen [3,99].

Die aktuellste Publikation zu diesem Thema fokussiert sich auf Patienten mit astrozytären Tumoren verschiedener WHO-Grade [100]. Die Autoren beobachteten dabei 12 Fälle einer Veränderung der MGMT-Promotormethylierung bei Analyse mittels MS-MLPA. Jedoch trat keine dieser Veränderungen bei den eingeschlossenen GBM-Patienten auf und betraf stattdessen hauptsächlich Gliome WHO-Grad III, insbesondere im Zusammenhang mit adjuvanter RT, jedoch nicht mit RT in Kombination mit Chemotherapie [100]. Der primäre Schwachpunkt vieler der oben beschriebenen Studien ist ihre verhältnismäßig kleine Fallzahl [3].

Autoren	Tumortyp	Patientencharakteristika				MGMT-Status					Therapie			Prognose		Methode und Probenart
		Patienten gesamt	Männlich	Weiblich	Medianes Alter bei Diagnose	Methylierter Primärtumor	Unmethylierter Primärtumor	Methyliertes Rezidiv	Unmethyliertes Rezidiv	MGMT-Status im Rezidiv (Identisch / Verlust / Gewinn)	Resektionsausmaß (total / subtotal / Biopsie)	RT (nur RT/ konkomitant RT + TMZ)	Adjuvante TMZ Therapie	Medianes PFS [Monate]	Medianes OS [Monate]	
Komine et al. (2003)	LGG	14				8	6	11	3	11/3/0						MSP (PE)
Cankovic et al. (2007)	LGG GBM	10				4	6	3	7	7/2/1						MSP (PE)
Parkinson et al. (2007)	GBM	10	8	2	55	3	7	6	4	3/2/5	8/0	9			Promotor sequenzierung & MSP (FF)	
Metellus et al. (2009) ¹	GBM	18				6	12	6	12	18/0/0					MSP & methylLight technique (FF)	
Christmann et al. (2010) ^{2,3}	LGG GBM	9				2/0	7	1/1	8	7/2/0					MSP (PE)	
Jung et al. (2010)	GBM	16	7	9	53	11	5	9	7	11/4/1	15/1/0	14/2	16	19.5	MSP (PE)	
Brandes et al. (2010)	GBM	38	28	10	49	13	25	11	27	24/8/6	27/10/1	11/27	38	12.0	24.3	MSP (PE)
Suzuki et al. (2010)	LGG GBM	12	9	3	52	10	2	0	12	2/10/0		1 / 5	5	18.0		MSP (PE & FF)
Tanaka et al. (2010) ²	GBM	1	1	0	55	1	0	0	1	0/1/0	1/0/0	1/0	0			MSP
Felsberg et al. (2011) ³	GBM	80	58	22	57	31/3	49	26/3	54	71/7/2	40/33/6	16/64	56	9.1	18.3	MSP & Pyrosequenzierung (FF)
Park et al. (2012)	GBM	24	15	9	60	8	16	8	16	22/1/1		9/14	24	8.0		MSP & MS-MLPA (PE)
Brandes et al. (2017)	GBM	108	69	39	51	54	54	49	59	81/16/11	50/42/16	0/108		24.4		MSP & Pyrosequenzierung (PE)
O'Regan et al. (2017)	GBM	22	12	10	50	9	13	7	15	14/5/3		0/22	22			Pyrosequenzierung (PE)
Hudson et al. (2018)	GBM	19	12	7	60	4	15	2	17	17/2/0		0/19	19	7.0	15.0	Pyrosequenzierung (FF)
Matos et al. (2018) ⁴	GBM	47				38	9	46	1	39/0/8			47			MSP (PE)
Barresi et al. (2018) ⁵	GBM	11	4	7	60	4	10	3	8	11/0/0	11/0/0	0/11	11	16.0	27.0	MSP (PE)
Harat et al. (2019) ⁶	LGG GBM	45			45	30	15	27	18	33/9/3		14/20				MS-MLPA (PE)
Eigene Daten	GBM	13	8	5	58	9	4	10	3	8/2/3	3/10/0	1/11	12	7.0	27.0	HRM (FF)
Zusammenfassung⁵		485				238	253	229	260	377/64/44						

Tabelle 13: Zusammenfassung der bisherigen Publikationen, die sich mit Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung im Gliomrezidiv befassen

Falls die MGMT-Promotormethylierung in einer Studie mittels zweier verschiedener Methoden bestimmt wurde, ist nur die Methode, die bei der höheren Anzahl von Patienten valide Resultate erbrachte, in der Gesamtanalyse aufgeführt (Abbildung 5).

¹ In dieser Studie wurde eine Änderung mittels MethyLight-Technik, jedoch keine mittels MSP beschrieben.

² Wir schlossen diese Studien von der Gesamtanalyse aus, da die Anzahl eingeschlossener Patienten unter 10 lag.

³ In diesen Studien wurde positive Promotormethylierung in zwei Gruppen unterteilt und es fand eine Unterscheidung zwischen positiv und schwach-positiv bzw. hemimethyliert statt.

⁴ Die Autoren dieser Studie berichten nur die Anzahl der Patienten mit bzw. ohne Methylierung zum Diagnose- und Rezidivzeitpunkt, geben aber keine weiteren Informationen bezüglich individueller Veränderungen an. Aus diesem Grund bezogen wir die minimale Anzahl der Veränderungen, die stattgefunden haben mussten, in unsere Analysen mit ein.

⁵ Barresi et al. untersuchten Tumorheterogenität und gaben 3 Tumorproben mit methylierter Zentralregion und unmethylierter Peripherie an. Sie beschreiben die gemessenen Veränderungen nicht als „echte Veränderungen“, sondern als subklonale Expansionen im Tumorrezidiv. Für unsere Analyse wurden diese Tumoren sowohl als methyliert, als auch unmethyliert gewertet. Folglich ließ sich diese Studie jedoch nicht stimmig in unsere Gesamtanalyse einschließen, weswegen sie trotz suffizienter Patientenzahl hiervon ausgeschlossen wurde.

⁶ In dieser Studie wurden vier Methylierungsgruppen unterschieden. Wir fassten diese Informationen jedoch in eine „methylierte“ und eine „unmethylierte“ Gruppe zusammen.

Abkürzungen: FF, Kryokonserviertes Gewebe; GBM, Glioblastoma multiforme; HRM, Methylierungsspezifische, hochauflösende Schmelzpunktanalyse; LGG, Gliom WHO Grad II; MGMT, O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase; MS-MLPA, Methylierungsspezifische Multiplexligation-Probenamplifikation; MSP, Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion; PE, In Paraffin eingebettetes Gewebe; PFS, Progressionsfreies Überleben; RT, Strahlentherapie; TMZ, Temozolomid. Angepasst nach [3].

5.5 ÄNDERUNGEN DER MGMT-PROMOTORMETHYLIERUNG ENTSTEHEN REGELMÄßIG, ES GIBT ZUM AKTUELLEN ZEITPUNKT JEDOCH KEINE EINDEUTIGE IMPLIKATION FÜR EINE ERNEUTE TESTUNG IM REZIDIVFALL

Die mittlerweile publizierte Vielzahl an Berichten über Veränderungen der MGMT Promotormethylierung, ist nicht mehr nur durch technische Fehler zu erklären [48,85-100]. Die Veränderungen können in beide Richtungen vorkommen, zeigten jedoch in der Gesamtanalyse tendenziell mehr Verluste (30 %) als Hinzugewinne (18 %) der MGMT Promotormethylierung. Da auf Grund der begrenzten Daten manche Störfaktoren nicht gänzlich zu vermeiden waren, weisen wir auf die Einschränkungen unserer Gesamtanalyse hin: Die Hauptlimitation liegt in der Inhomogenität der *cut-off*-Werte, unterschiedlicher Selektionskriterien, der verwendeten Methodik und einem potentiellen positiven Publikationsbias. Außerdem beschränkten vier der eingeschlossenen Studien ihre Patientenkohorte nicht nur auf GBM, sondern schlossen auch LGG ein [85,86,94,100]. Diese und weitere Limitierungen unserer Analyse ergeben sich damit direkt aus den Einschränkungen der originalen Studien [3].

Die Autoren mehrerer Publikationen sind sich einig, dass es trotz Hinweisen auf einen Zusatznutzen zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutige Implikation für eine erneute Testung der MGMT-Promotormethylierung im Rezidiv in der klinischen Praxis gibt [48,96]. In diesem Sinne zeigen unsere Analysen Resultate, die mit den generellen Schlussfolgerungen mehrerer Vorpublikationen vereinbar sind: Zum jetzigen Zeitpunkt sehen wir (noch) keine gerechtfertigte klinische Implikation zur Re-Evaluierung der MGMT-Promotormethylierung im Rezidiv [3].

Trotzdem steht fest, dass diese Veränderungen regelmäßig vorkommen und durch ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen entstehen. Selbst wenn über 75 % der Patienten eine stabile MGMT-Promotormethylierung zeigen, was vor allem bezüglich des Methylierungsgrades aktuell fragwürdig scheint, bleibt eine signifikante Anzahl an Patienten, bei denen bisher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden kann, dass diese von einer Doppelbestimmung profitieren würden [48]. Ob sich die Indikation zur Doppelbestimmung

auch längerfristig nicht stellt oder die bisherigen Analysen einen tatsächlich vorhandenen Zusatznutzen nur noch nicht abbilden konnten, bleibt deswegen abzuwarten [3].

5.6 WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN TMZ UND DER MGMT-PROMOTORMETHYLIERUNG

Interessanterweise könnte die MGMT-Promotormethylierung nicht nur ein Prädiktor für das Ansprechen der TMZ-Therapie sein, sondern auch direkt durch diese verändert werden. TMZ kann zu einer DNA-Hypermethylierung, gefolgt von einer globalen Demethylierung, führen, was die Frage aufwirft, ob TMZ eine Resistenz der Tumorzellen selbst induziert, indem es das Methylierungsmuster neu formt [101,102]. Auch in diesem Punkt kommen die bisherigen Studien teilweise zu gegensätzlichen Resultaten. Während einige der Vorpublikationen sich gegen einen Zusammenhang der TMZ-Therapie und einer Veränderung der MGMT-Promotormethylierung aussprachen [93,96], teilten andere Autoren diese Ansicht nicht [95,103]. Eine Studie beschreibt einen signifikanten Verlust der Methylierung bei 7 von 8 Patienten, die mittels konkomitanter Radio-Chemotherapie mit TMZ behandelt wurden, während es in der Vergleichsgruppe der Patienten, die mittels RT und anschließender TMZ-Therapie behandelt wurden, nur bei 1 von 5 Patienten zu einer Veränderung kam ($p=0,03$). Entsprechend dieser Beobachtung diskutieren die Autoren, ob das postoperative Therapieschema die MGMT-Methylierung beeinflussen könnte [3,95].

Mit unserer Arbeit haben wir mittels einer Subgruppen-Meta-Analyse diese Fragestellung stärker beleuchtet. Hierfür verglichen wir die Patienten, welche lediglich mit RT behandelt worden waren mit solchen, die eine konkomitante Radio-Chemotherapie erhalten hatten. Im Rahmen dieser Analyse zeigte sich jedoch, dass die Anzahl der Patienten aus Publikationen, die unsere Einschlusskriterien erfüllten und lediglich mit RT behandelt wurden, für eine valide Aussage ungenügend waren und solche Daten meistens nur aus älteren Publikationen vorlagen. Aus diesem Grund sind die Zusatzanalysen in der vorliegenden Arbeit nicht dargelegt. Felsberg et al. beschäftigen sich in ihrer Studie mit der gleichen Hypothese [96]. Ihr Vergleich zwischen der Patientengruppe, die mittels TMZ und RT oder nur mit RT behandelt worden waren, zeigte keine signifikanten Unterschiede bezogen auf Veränderungen des

MGMT-Promotor-Status [3,96].

Außerdem fiel in ihren Daten eine Korrelation zwischen der MGMT-Promotormethylierung und dem OS, ebenso wie zwischen der MGMT-Promotormethylierung zum Zeitpunkt der zweiten Operation und dem PFS auf. Dies steht im Kontrast zu den Beobachtungen von Brandes et.al., die eine signifikante Korrelation der MGMT-Promotormethylierung zum Zeitpunkt der ersten und zweiten OP mit dem OS beschrieben, jedoch nicht zum Zeitpunkt der zweiten Operation mit dem PFS [3,48,95,96]. Die von ihnen beobachteten Veränderungen teilten sich zu annähernd identischen Teilen in Verluste (n=16) und Hinzugewinne (n=11) einer MGMT-Promotor-Hypermethylierung auf [3].

5.7 DEN DIREKTEN UND INDIREKTEN TMZ-EFFEKTEN KOMMT ALS MÖGLICHE URSACHE DER VERÄNDERUNGEN BESONDERE BEDEUTUNG ZU

Die weitestverbreitete Methode zur MGMT-Bestimmung ist MSP, gefolgt von der Pyrosequenzierung, MS-MLPA-MethyLight-Technik und HRM (siehe Tabelle 13) [32]. MSP erlaubt dabei lediglich eine Klassifizierung in methyliert/unmethyliert, während die anderen Methoden zusätzliche Informationen wie z. B. eine Quantifizierung des Grades der Tumormethylierung sowie seines prozentualen Anstiegs oder Abfalls erheben [3,32].

Studien, die mehrere Methoden zur Detektion der MGMT-Promotormethylierung nutzten, wie auch unsere eigene, liefern klare Indizien dafür, dass zusätzliche Veränderungen vorliegen, die durch die Standardmethode MSP ggf. nicht ausreichend erfasst werden [87,91,97]. Hierdurch ergibt sich ein potentieller Zusatznutzen bei der Verwendung dieser anderen Verfahren. Fraglich ist außerdem der den Veränderungen zu Grunde liegende Mechanismus. Als Ursachen werden technische bzw. methodische Probleme, intratumorale Heterogenität oder Selektionsdruck bzw. direkte Auswirkungen der zytotoxischen Substanzen diskutiert [3,48].

So kann beispielsweise, obwohl die genannten Methoden allesamt gut etabliert sind und üblicherweise sehr genaue Ergebnisse produzieren [104], ihre Aussagekraft doch durch die Qualität der untersuchten Proben eingeschränkt sein [96]. Beispielsweise wurde berichtet, dass es zu fehlerhaften Bestimmungen einer negativen MGMT-Promotormethylierung mittels MSP

kommen kann, wenn ein hoher Anteil an nekrotischem Gewebe in der Probe vorliegt [105]. Kontaminierung des Tumorgewebes durch physiologische Gehirn- oder Entzündungszellen kann ebenso zu einer inkorrekten Einschätzung des Grads der MGMT-Promotormethylierung führen. Felsberg et al. gaben an, dass ungefähr die Hälfte ihrer beobachteten Veränderungen primär auf den niedrigen Tumorzellgehalt in der jeweiligen Probe zurückzuführen gewesen wäre [96]. Diese Aussage stellt sicherlich die Validität einiger der von uns besprochenen Vordaten, die keine detaillierten Informationen zur Tumorzellquantität in den analysierten Proben angeben, in Frage [3].

Allerdings scheinen nur größere Abweichungen des Tumorzellanteils die Ergebnisse der Messungen signifikant zu beeinflussen, da Proben mit einer Variabilität im Tumorzellanteil von bis zu 40 % in einer Studie zu ähnlichen Resultaten führten [106]. Es scheint deswegen wahrscheinlich, dass zwar ein Anteil der berichteten Veränderungen auf technische Ungenauigkeiten zurückzuführen ist, für einen Großteil jedoch andere Ursachen zugrunde liegen [3].

Häufig wird die MGMT-Promotormethylierung als intratumoral homogen beschrieben [91,105,107]. Einige Arbeitsgruppen berichten jedoch auch hierzu widersprüchliche Resultate [33,108]. Eine Studie beschrieb eine Heterogenität der MGMT-Promotormethylierung zwischen den verschiedenen intratumoralen Arealen bei bis zu 1/3 der untersuchten GBMs [108]. Diese Erkenntnisse sind kongruent zu den Beobachtungen von Barresi et al., die bei 20 % der GBMs von einem unmethylierten peripheren, jedoch methylierten zentralen Anteil des Tumors berichten. In ihrer Studie zeigte sich nur bei primär heterogenen Tumoren eine „Veränderung“ des Methylierungsstatus im Rezidiv [3,99].

Basierend auf den Daten dieser Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass intratumorale Heterogenität als ein zumindest partieller Grund für die Änderung der MGMT-Promotormethylierung in Erwägung gezogen werden sollte. Eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den angewandten Therapeutika könnte zu einer Expansion resistenter Tumorklone führen und damit diesen Effekt bedingen bzw. unterstützen [3].

Ein durch TMZ verursachter Selektionsdruck als Ursache der Veränderungen würde die höhere Anzahl an Verlusten des Methylierungsstatus erklären. Diese Hypothese wurde durch O'Regan et al. und Brandes et al. (2010) weiter unterstützt [95,98]. Felsberg et al beschreiben hingegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Veränderungen der MGMT-

Promotormethylierung bei Patienten, welche mit TMZ und RT oder nur RT behandelt wurden [96]. Dies könnte ein Anzeichen sein, dass die beobachteten Abweichungen nicht durch die TMZ-Behandlung beeinflusst wurden. In ihrer späteren Arbeit beschreiben Brandes et al. keine bevorzugte Richtung der Veränderungen, was für einen geringen bis überhaupt nicht vorhandenen Selektionsdruck der TMZ-Therapie auf Zellen unterschiedlicher MGMT-Promotormethylierung spricht [48]. Diese Ansicht wird von Storey et.al. geteilt, die jüngst ein mathematisches Modell vorschlugen, um die therapeutische Antwort der GBMs auf eine TMZ-Therapie vorherzusagen [103]. Die Autoren folgern, dass sich die Veränderungen der Methylierung nicht ausschließlich durch evolutionäre Selektionsmechanismen erklären ließen, sondern ebenfalls die direkten Effekte von TMZ auf das Methylierungsprofil der Zellen eine Rolle spielen könnten. Dies würde auch erklären, warum sich in der Gesamtanalyse zwar tendenziell mehr Verluste der MGMT-Promotormethylierung im Vergleich zu Hinzugewinnen zeigen, jedoch insgesamt signifikante Veränderung in beide Richtungen auffielen [3].

5.8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

ATF5 könnte ein vielversprechendes neues Therapieziel, nicht nur als Zusatz zur Standardtherapie bei GBM, sondern für maligne Gliome im Allgemeinen darstellen. Erste klinische Studien zur therapeutischen Anwendung könnten in der nahen Zukunft erfolgen [5].

Es gibt eindeutige Anzeichen dafür, dass die MGMT-Promotormethylierung vom Primärtumor zum Rezidiv sich bei ca. 24 % der Gliompatienten verändern kann. Die möglichen Ursachen, zugrunde liegende molekulare Mechanismen und die klinische Auswirkung dieser Veränderungen bleiben unklar und werden in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert [3].

Es ist wahrscheinlich, dass die Veränderungen einen multifaktoriellen Ursprung haben. Neueste Beobachtungen weisen jedoch darauf hin, dass direkte Veränderungen des allgemeinen Methylierungsprofils der Zellen durch TMZ eine wichtige Ursache für eine veränderte MGMT-Promotormethylierung im Rezidiv darstellen. Dies bietet einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen [3].

Obwohl es zum aktuellen Zeitpunkt keine definitive Implikation gibt, die Leitlinien oder den klinischen Standard bezüglich der erneuten MGMT-Testung zu verändern, ist unser aktueller Wissensstand sicherlich zu limitiert, um schon endgültige Schlussfolgerungen zu ziehen. Eine erneute Bestimmung der MGMT-Promotormethylierung im Rezidivtumor könnte für die weitere Therapie und damit für die Patienten einen Zusatznutzen bringen. Wir möchten anregen, dass zukünftige klinische Studien zu Rezidiv-GBM diese Änderung der MGMT-Promotormethylierung in Betracht ziehen und weiter untersuchen, ob diese Veränderungen in die Therapieentscheidung mit einbezogen werden sollten [3].

QUELLENVERZEICHNIS

1. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* **2016**, *131*, 803-820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
2. Louis, D.N.; Perry, A.; Burger, P.; Ellison, D.W.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Aldape, K.; Brat, D.; Collins, V.P.; Eberhart, C., et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* **2014**, *24*, 429-435, doi:10.1111/bpa.12171.
3. Feldheim, J.; Kessler, A.F.; Monoranu, C.M.; Ernestus, R.I.; Lohr, M.; Hagemann, C. Changes of O(6)-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) promoter methylation in glioblastoma relapse-a meta-analysis type literature review. *Cancers* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11121837.
4. Reifenberger, G.; Collins, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* **2004**, *82*, 656-670, doi:10.1007/s00109-004-0564-x.
5. Feldheim, J.; Kessler, A.F.; Schmitt, D.; Wilczek, L.; Linsenmann, T.; Dahlmann, M.; Monoranu, C.M.; Ernestus, R.I.; Hagemann, C.; Lohr, M. Expression of activating transcription factor 5 (ATF5) is increased in astrocytomas of different WHO grades and correlates with survival of glioblastoma patients. *Onco Targets Ther* **2018**, *11*, 8673-8684, doi:10.2147/OTT.S176549.
6. Noushmehr, H.; Weisenberger, D.J.; Diefes, K.; Phillips, H.S.; Pujara, K.; Berman, B.P.; Pan, F.; Pelloski, C.E.; Sulman, E.P.; Bhat, K.P., et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer cell* **2010**, *17*, 510-522, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.017.
7. Xu, W.; Yang, H.; Liu, Y.; Yang, Y.; Wang, P.; Kim, S.H.; Ito, S.; Yang, C.; Wang, P.; Xiao, M.T., et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell* **2011**, *19*, 17-30, doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014.
8. Schneider T. Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* **2010**, *107*, 799-807.
9. Weller, M.; Cloughesy, T.; Perry, J.R.; Wick, W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro Oncol* **2013**, *15*, 4-27, doi:10.1093/neuonc/nos273.
10. Osswald, M.; Jung, E.; Sahm, F.; Solecki, G.; Venkataramani, V.; Blaes, J.; Weil, S.; Horstmann, H.; Wiestler, B.; Syed, M., et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* **2015**, *528*, 93-98, doi:10.1038/nature16071.

11. Sahm, F.; Capper, D.; Jeibmann, A.; Habel, A.; Paulus, W.; Troost, D.; von Deimling, A. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol* **2012**, *69*, 523-526, doi:10.1001/archneurol.2011.2910.
12. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.A.; Kesari, S.; Steinberg, D.M.; Toms, S.A.; Taylor, L.P.; Lieberman, F.; Silvani, A.; Fink, K.L., et al. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial. *Jama* **2015**, *314*, 2535-2543, doi:10.1001/jama.2015.16669.
13. Hottinger, A.F.; Pacheco, P.; Stupp, R. Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. *Neuro Oncol* **2016**, *18*, 1338-1349, doi:10.1093/neuonc/nov182.
14. Mehta, M.; Wen, P.; Nishikawa, R.; Reardon, D.; Peters, K. Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients. *Critical reviews in oncology/hematology* **2017**, *111*, 60-65, doi:10.1016/j.critrevonc.2017.01.005.
15. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330.
16. Patil, C.G.; Yi, A.; Elramsisy, A.; Hu, J.; Mukherjee, D.; Irvin, D.K.; Yu, J.S.; Bannykh, S.I.; Black, K.L.; Nuno, M. Prognosis of patients with multifocal glioblastoma: a case-control study. *J Neurosurg* **2012**, *117*, 705-711, doi:10.3171/2012.7.JNS12147.
17. Waddington, C.H. The epigenotype. *Endeavour* **1942**, *1*, 18-20.
18. Dupont, C.; Armant, D.R.; Brenner, C.A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* **2009**, *27*, 351-357, doi:10.1055/s-0029-1237423.
19. Nicoglou, A.; Merlin, F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. *Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences* **2017**, *66*, 73-82, doi:10.1016/j.shpsc.2017.10.002.
20. Herman, J.G.; Baylin, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* **2003**, *349*, 2042-2054, doi:10.1056/NEJMra023075.
21. Bird, A.P. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation. 2. Symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of methylation pattern. *J Mol Biol* **1978**, *118*, 49-60, doi:10.1016/0022-2836(78)90243-7.
22. Greenberg, M.V.C.; Bourc'his, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2019**, 10.1038/s41580-019-0159-6, doi:10.1038/s41580-019-0159-6.
23. Moore, L.D.; Le, T.; Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 23-38, doi:10.1038/npp.2012.112.

24. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 6-21, doi:10.1101/gad.947102.
25. Jones, P.A.; Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 415-428, doi:10.1038/nrg816.
26. Jaenisch, R.; Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **2003**, *33 Suppl*, 245-254, doi:10.1038/ng1089.
27. Kulis, M.; Esteller, M. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics* **2010**, *70*, 27-56, doi:10.1016/b978-0-12-380866-0.60002-2.
28. M, J.D.; Wojtas, B. Global DNA methylation patterns in human gliomas and their interplay with other epigenetic modifications. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20143478.
29. Aoki, K.; Natsume, A. Overview of DNA methylation in adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol* **2019**, *36*, 84-91, doi:10.1007/s10014-019-00339-w.
30. Gussyatiner, O.; Hegi, M.E. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol* **2018**, *51*, 50-58, doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.010.
31. Zhao, H.; Wang, S.; Song, C.; Zha, Y.; Li, L. The prognostic value of MGMT promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. *World journal of surgical oncology* **2016**, *14*, 261, doi:10.1186/s12957-016-1012-4.
32. Weller, M.; Stupp, R.; Reifenberger, G.; Brandes, A.A.; van den Bent, M.J.; Wick, W.; Hegi, M.E. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* **2010**, *6*, 39-51, doi:10.1038/nrneurol.2009.197.
33. Dunn, J.; Baborie, A.; Alam, F.; Joyce, K.; Moxham, M.; Sibson, R.; Crooks, D.; Husband, D.; Shenoy, A.; Brodbelt, A., et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British journal of cancer* **2009**, *101*, 124-131, doi:10.1038/sj.bjc.6605127.
34. Hegi, M.E.; Diserens, A.C.; Gorlia, T.; Hamou, M.F.; de Tribolet, N.; Weller, M.; Kros, J.M.; Hainfellner, J.A.; Mason, W.; Mariani, L., et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 997-1003, doi:10.1056/NEJMoa043331.
35. Kaina, B.; Christmann, M.; Naumann, S.; Roos, W.P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair* **2007**, *6*, 1079-1099, doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.008.
36. Weller, M.; Tabatabai, G.; Kastner, B.; Felsberg, J.; Steinbach, J.P.; Wick, A.; Schnell, O.; Hau, P.; Herrlinger, U.; Sabel, M.C., et al. MGMT promoter methylation is a strong prognostic biomarker for benefit from dose-intensified temozolomide rechallenge in progressive glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 2057-2064, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2737.

37. Malmström, A.; Grønberg, B.H.; Marosi, C.; Stupp, R.; Frappaz, D.; Schultz, H.; Abacioglu, U.; Tavelin, B.; Lhermitte, B.; Hegi, M.E., 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. *The Lancet Oncology* **2012**, *13*, 916-926, doi:10.1016/S1470-2045(12)70265-6.
38. Wick, W.; Platten, M.; Meisner, C.; Felsberg, J.; Tabatabai, G.; Simon, M.; Nikkhah, G.; Papsdorf, K.; Steinbach, J.P.; Sabel, M., et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **2012**, *13*, 707-715, doi:10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
39. Wick, W.; Osswald, M.; Wick, A.; Winkler, F. Treatment of glioblastoma in adults. *Therapeutic advances in neurological disorders* **2018**, *11*, 1756286418790452, doi:10.1177/1756286418790452.
40. Weller, M.; van den Bent, M.; Tonn, J.C.; Stupp, R.; Preusser, M.; Cohen-Jonathan-Moyal, E.; Henriksson, R.; Le Rhun, E.; Balana, C.; Chinot, O., et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet. Oncology* **2017**, *18*, e315-e329, doi:10.1016/s1470-2045(17)30194-8.
41. Herrlinger, U.; Tzaridis, T.; Mack, F.; Steinbach, J.P.; Schlegel, U.; Sabel, M.; Hau, P.; Kortmann, R.D.; Krex, D.; Grauer, O., et al. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **2019**, *393*, 678-688, doi:10.1016/S0140-6736(18)31791-4.
42. Glas, M.; Happold, C.; Rieger, J.; Wiewrodt, D.; Bahr, O.; Steinbach, J.P.; Wick, W.; Kortmann, R.D.; Reifenberger, G.; Weller, M., et al. Long-term survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 1257-1261, doi:10.1200/jco.2008.19.2195.
43. Herrlinger, U.; Rieger, J.; Koch, D.; Loeser, S.; Blaschke, B.; Kortmann, R.D.; Steinbach, J.P.; Hundt, T.; Wick, W.; Meyermann, R., et al. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2006**, *24*, 4412-4417, doi:10.1200/jco.2006.06.9104.
44. Vlassenbroeck, I.; Califice, S.; Diserens, A.C.; Migliavacca, E.; Straub, J.; Di Stefano, I.; Moreau, F.; Hamou, M.F.; Renard, I.; Delorenzi, M., et al. Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **2008**, *10*, 332-337, doi:10.2353/jmoldx.2008.070169.
45. Felsberg, J.; Rapp, M.; Loeser, S.; Fimmers, R.; Stummer, W.; Goepfert, M.; Steiger, H.J.; Friedensdorf, B.; Reifenberger, G.; Sabel, M.C. Prognostic significance of molecular

- markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 6683-6693, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-08-2801.
46. Osuka, S.; Van Meir, E.G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *The Journal of clinical investigation* **2017**, *127*, 415-426, doi:10.1172/jci89587.
 47. Davis, M.E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing* **2016**, *20*, S2-8, doi:10.1188/16.cjon.s1.2-8.
 48. Brandes, A.A.; Franceschi, E.; Paccapelo, A.; Tallini, G.; De Biase, D.; Ghimenton, C.; Danieli, D.; Zunarelli, E.; Lanza, G.; Silini, E.M., et al. Role of MGMT Methylation Status at Time of Diagnosis and Recurrence for Patients with Glioblastoma: Clinical Implications. *Oncologist* **2017**, *22*, 432-437, doi:10.1634/theoncologist.2016-0254.
 49. Vinson, C.; Myakishev, M.; Acharya, A.; Mir, A.A.; Moll, J.R.; Bonovich, M. Classification of Human B-ZIP Proteins Based on Dimerization Properties. *Molecular and Cellular Biology* **2002**, *22*, 6321-6335, doi:10.1128/mcb.22.18.6321-6335.2002.
 50. Greene, L.A.; Lee, H.Y.; Angelastro, J.M. The transcription factor ATF5: role in neurodevelopment and neural tumors. *J Neurochem* **2009**, *108*, 11-22, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05749.x.
 51. Angelastro, J.M.; Mason, J.L.; Ignatova, T.N.; Kukekov, V.G.; Stengren, G.B.; Goldman, J.E.; Greene, L.A. Downregulation of activating transcription factor 5 is required for differentiation of neural progenitor cells into astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2005**, *25*, 3889-3899, doi:10.1523/jneurosci.3447-04.2005.
 52. Angelastro, J.M.; Ignatova, T.N.; Kukekov, V.G.; Steindler, D.A.; Stengren, G.B.; Mendelsohn, C.; Greene, L.A. Regulated expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2003**, *23*, 4590-4600.
 53. Mason, J.L.; Angelastro, J.M.; Ignatova, T.N.; Kukekov, V.G.; Lin, G.; Greene, L.A.; Goldman, J.E. ATF5 regulates the proliferation and differentiation of oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **2005**, *29*, 372-380, doi:10.1016/j.mcn.2005.03.004.
 54. Sheng, Z.; Li, L.; Zhu, L.J.; Smith, T.W.; Demers, A.; Ross, A.H.; Moser, R.P.; Green, M.R. A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications. *Nature medicine* **2010**, *16*, 671-677, doi:10.1038/nm.2158.
 55. Cates, C.C.; Arias, A.D.; Nakayama Wong, L.S.; Lame, M.W.; Sidorov, M.; Cayanan, G.; Rowland, D.J.; Fung, J.; Karpel-Massler, G.; Siegelin, M.D., et al. Regression/eradication of gliomas in mice by a systemically-deliverable ATF5 dominant-negative peptide. *Oncotarget* **2016**, *7*, 12718-12730, doi:10.18632/oncotarget.7212.

56. Karpel-Massler, G.; Horst, B.A.; Shu, C.; Chau, L.; Tsujiuchi, T.; Bruce, J.N.; Canoll, P.; Greene, L.A.; Angelastro, J.M.; Siegelin, M.D. A synthetic cell-penetrating dominant-negative ATF5 peptide exerts anticancer activity against a broad spectrum of treatment-resistant cancers. *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 4698-4711, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2827.
57. Angelastro, J.M.; Canoll, P.D.; Kuo, J.; Weicker, M.; Costa, A.; Bruce, J.N.; Greene, L.A. Selective destruction of glioblastoma cells by interference with the activity or expression of ATF5. *Oncogene* **2006**, *25*, 907-916, doi:10.1038/sj.onc.1209116.
58. Hua, X.M.; Wang, J.; Qian, D.M.; Song, J.Y.; Chen, H.; Zhu, X.L.; Zhou, R.; Zhao, Y.D.; Zhou, X.Z.; Li, L., et al. DNA methylation level of promoter region of activating transcription factor 5 in glioma. *J Zhejiang Univ Sci B* **2015**, *16*, 757-762, doi:10.1631/jzus.B1500067.
59. Agarwal, S.; Suri, V.; Sharma, M.C.; Sarkar, C. Therapy and progression--induced O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair alterations in recurrent glioblastoma multiforme. *Indian journal of cancer* **2015**, *52*, 568-573, doi:10.4103/0019-509x.178403.
60. Plummer, D.L. DispImage: A display and analysis tool for medical images. *Rivista di Neuroradiologia* **1992**, *5*, 489-495, doi:10.1177/197140099200500413.
61. Wen, P.Y.; Chang, S.M.; Van den Bent, M.J.; Vogelbaum, M.A.; Macdonald, D.R.; Lee, E.Q. Response assessment in neuro-oncology clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2017**, *35*, 2439-2449, doi:10.1200/JCO.2017.72.7511.
62. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B., et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **2012**, *9*, 676-682, doi:10.1038/nmeth.2019.
63. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **2012**, *9*, 671-675.
64. Schindelin, J.; Rueden, C.T.; Hiner, M.C.; Eliceiri, K.W. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular reproduction and development* **2015**, *82*, 518-529, doi:10.1002/mrd.22489.
65. Ruifrok, A.C.; Johnston, D.A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and quantitative cytology and histology* **2001**, *23*, 291-299.
66. van der Loos, C.M. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2008**, *56*, 313-328, doi:10.1369/jhc.2007.950170.

67. Adachi, J.; Mishima, K.; Wakiya, K.; Suzuki, T.; Fukuoka, K.; Yanagisawa, T.; Matsutani, M.; Sasaki, A.; Nishikawa, R. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in 45 primary central nervous system lymphomas: quantitative assessment of methylation and response to temozolomide treatment. *J Neurooncol* **2012**, *107*, 147-153, doi:10.1007/s11060-011-0721-3.
68. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
69. Wilson, E.B. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association* **1927**, *22*, 209-212, doi:10.1080/01621459.1927.10502953.
70. Dong, S.; Nutt, C.L.; Betensky, R.A.; Stemmer-Rachamimov, A.O.; Denko, N.C.; Ligon, K.L.; Rowitch, D.H.; Louis, D.N. Histology-based expression profiling yields novel prognostic markers in human glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* **2005**, *64*, 948-955.
71. Monaco, S.E.; Angelastro, J.M.; Szabolcs, M.; Greene, L.A. The transcription factor ATF5 is widely expressed in carcinomas, and interference with its function selectively kills neoplastic, but not nontransformed, breast cell lines. *Int J Cancer* **2007**, *120*, 1883-1890, doi:10.1002/ijc.22469.
72. Persengiev, S.P.; Green, M.R. The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **2003**, *8*, 225-228.
73. Dluzen, D.; Li, G.; Tacelosky, D.; Moreau, M.; Liu, D.X. BCL-2 is a downstream target of ATF5 that mediates the prosurvival function of ATF5 in a cell type-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 7705-7713, doi:10.1074/jbc.M110.207639.
74. Liu, D.X.; Qian, D.; Wang, B.; Yang, J.M.; Lu, Z. p300-Dependent ATF5 acetylation is essential for Egr-1 gene activation and cell proliferation and survival. *Molecular and cellular biology* **2011**, *31*, 3906-3916, doi:10.1128/mcb.05887-11.
75. Friedmann-Morvinski, D. Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Critical reviews in oncogenesis* **2014**, *19*, 327-336.
76. Stewart, L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet (London, England)* **2002**, *359*, 1011-1018.
77. Stummer, W.; Meinel, T.; Ewelt, C.; Martus, P.; Jakobs, O.; Felsberg, J.; Reifenberger, G. Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery. *J Neurooncol* **2012**, *108*, 89-97, doi:10.1007/s11060-012-0798-3.

78. Hart, M.G.; Garside, R.; Rogers, G.; Stein, K.; Grant, R. Temozolomide for high grade glioma. *The Cochrane database of systematic reviews* **2013**, 10.1002/14651858.CD007415.pub2.
79. Carlsson, S.K.; Brothers, S.P.; Wahlestedt, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO molecular medicine* **2014**, *6*, 1359-1370, doi:10.15252/emmm.201302627.
80. Domingo-Musibay, E.; Galanis, E. What next for newly diagnosed glioblastoma? *Future oncology (London, England)* **2015**, *11*, 3273-3283, doi:10.2217/fon.15.258.
81. Arias, A.; Lame, M.W.; Santarelli, L.; Hen, R.; Greene, L.A.; Angelastro, J.M. Regulated ATF5 loss-of-function in adult mice blocks formation and causes regression/eradication of gliomas. *Oncogene* **2012**, *31*, 739-751, doi:10.1038/onc.2011.276.
82. Ishihara, S.; Haga, H. ATF5: development of oncogenic resistance to radiotherapy. *Aging (Albany NY)* **2015**, *7*, 453-454, doi:10.18632/aging.100775.
83. Tse, C.; Shoemaker, A.R.; Adickes, J.; Anderson, M.G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E.F.; Marsh, K.C.; Mitten, M.J.; Nimmer, P., et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer research* **2008**, *68*, 3421-3428, doi:10.1158/0008-5472.Can-07-5836.
84. York, D.; Sproul, C.D.; Chikere, N.; Dickinson, P.J.; Angelastro, J.M. Expression and targeting of transcription factor ATF5 in dog gliomas. *Veterinary and comparative oncology* **2017**, 10.1111/vco.12317.
85. Komine, C.; Watanabe, T.; Katayama, Y.; Yoshino, A.; Yokoyama, T.; Fukushima, T. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. *Brain Pathol* **2003**, *13*, 176-184.
86. Cankovic, M.; Mikkelsen, T.; Rosenblum, M.L.; Zarbo, R.J. A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Lab Invest* **2007**, *87*, 392-397, doi:10.1038/labinvest.3700520.
87. Metellus, P.; Coulibaly, B.; Nanni, I.; Fina, F.; Eudes, N.; Giorgi, R.; Barrie, M.; Chinot, O.; Fuentes, S.; Dufour, H., et al. Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. *Cancer* **2009**, *115*, 4783-4794, doi:10.1002/cncr.24546.

88. Tanaka, S.; Nakada, M.; Hayashi, Y.; Nakada, S.; Sawada-Kitamura, S.; Furuyama, N.; Suzuki, T.; Kamide, T.; Hayashi, Y.; Yano, S., et al. Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma: the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence. *Brain Tumor Pathol* **2011**, *28*, 59-64, doi:10.1007/s10014-010-0009-x.
89. Hudson, A.L.; Parker, N.R.; Khong, P.; Parkinson, J.F.; Dwight, T.; Ikin, R.J.; Zhu, Y.; Chen, J.; Wheeler, H.R.; Howell, V.M. Glioblastoma recurrence correlates with increased APE1 and polarization toward an immuno-suppressive microenvironment. *Front Oncol* **2018**, *8*, 314, doi:10.3389/fonc.2018.00314.
90. Matos, B.; Bostjancic, E.; Matjasic, A.; Popovic, M.; Glavac, D. Dynamic expression of 11 miRNAs in 83 consecutive primary and corresponding recurrent glioblastoma: correlation to treatment, time to recurrence, overall survival and MGMT methylation status. *Radiol Oncol* **2018**, *52*, 422-432, doi:10.2478/raon-2018-0043.
91. Parkinson, J.F.; Wheeler, H.R.; Clarkson, A.; McKenzie, C.A.; Biggs, M.T.; Little, N.S.; Cook, R.J.; Messina, M.; Robinson, B.G.; McDonald, K.L. Variation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neurooncol* **2008**, *87*, 71-78, doi:10.1007/s11060-007-9486-0.
92. Christmann, M.; Nagel, G.; Horn, S.; Krahn, U.; Wiewrodt, D.; Sommer, C.; Kaina, B. MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int J Cancer* **2010**, *127*, 2106-2118, doi:10.1002/ijc.25229.
93. Jung, T.Y.; Jung, S.; Moon, K.S.; Kim, I.Y.; Kang, S.S.; Kim, Y.H.; Park, C.S.; Lee, K.H. Changes of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncol Rep* **2010**, *23*, 1269-1276.
94. Suzuki, T.; Nakada, M.; Yoshida, Y.; Nambu, E.; Furuyama, N.; Kita, D.; Hayashi, Y.; Hayashi, Y.; Hamada, J. The correlation between promoter methylation status and the expression level of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in recurrent glioma. *Japanese journal of clinical oncology* **2011**, *41*, 190-196, doi:10.1093/jjco/hyq224.
95. Brandes, A.A.; Franceschi, E.; Tosoni, A.; Bartolini, S.; Bacci, A.; Agati, R.; Ghimenton, C.; Turazzi, S.; Talacchi, A.; Skrap, M., et al. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro Oncol* **2010**, *12*, 283-288, doi:10.1093/neuonc/nop050.
96. Felsberg, J.; Thon, N.; Eigenbrod, S.; Hentschel, B.; Sabel, M.C.; Westphal, M.; Schackert, G.; Kreth, F.W.; Pietsch, T.; Loffler, M., et al. 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**, *129*, 659-670, doi:10.1002/ijc.26083.

97. Park, C.K.; Kim, J.E.; Kim, J.Y.; Song, S.W.; Kim, J.W.; Choi, S.H.; Kim, T.M.; Lee, S.H.; Kim, I.H.; Park, S.H. The changes in MGMT promoter methylation status in initial and recurrent glioblastomas. *Transl Oncol* **2012**, *5*, 393-397.
98. O'Regan, C.J.; Kearney, H.; Beausang, A.; Farrell, M.A.; Brett, F.M.; Cryan, J.B.; Loftus, T.E.; Buckley, P.G. Temporal stability of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients undergoing STUPP protocol. *J Neurooncol* **2018**, *137*, 233-240, doi:10.1007/s11060-017-2722-3.
99. Barresi, V.; Caffo, M.; De Luca, G.; Giuffrè, G. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation can change in glioblastoma recurrence due to intratumor heterogeneity. *Glioma* **2018**, *1*, 208-213, doi:10.4103/glioma.glioma_38_18.
100. Harat, M.; Blok, M.; Harat, A.; Soszynska, K. The impact of adjuvant radiotherapy on molecular prognostic markers in gliomas. *Onco Targets Ther* **2019**, *12*, 2215-2224, doi:10.2147/ott.S200818.
101. Barciszewska, A.-M.; Gurda, D.; Głodowicz, P.; Nowak, S.; Naskręt-Barciszewska, M.Z. A new epigenetic mechanism of temozolomide action in glioma cells. *PloS one* **2015**, *10*, e0136669-e0136669, doi:10.1371/journal.pone.0136669.
102. Brown, R.; Curry, E.; Magnani, L.; Wilhelm-Benartzi, C.S.; Borley, J. Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2014**, *14*, 747, doi:10.1038/nrc3819.
103. Storey, K.; Leder, K.; Hawkins-Daarud, A.; Swanson, K.; Ahmed, A.U.; Rockne, R.C.; Foo, J. Glioblastoma recurrence and the role of O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation. *JCO Clin Cancer Inform* **2019**, *3*, 1-12, doi:10.1200/CCI.18.00062.
104. Switzeny, O.J.; Christmann, M.; Renovanz, M.; Giese, A.; Sommer, C.; Kaina, B. MGMT promoter methylation determined by HRM in comparison to MSP and pyrosequencing for predicting high-grade glioma response. *Clin Epigenetics* **2016**, *8*, 49-49, doi:10.1186/s13148-016-0204-7.
105. Grasbon-Frodl, E.M.; Kreth, F.W.; Ruitter, M.; Schnell, O.; Bise, K.; Felsberg, J.; Reifenberger, G.; Tonn, J.C.; Kretschmar, H.A. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer* **2007**, *121*, 2458-2464, doi:10.1002/ijc.23020.
106. Parker, N.R.; Hudson, A.L.; Khong, P.; Parkinson, J.F.; Dwight, T.; Ikin, R.J.; Zhu, Y.; Cheng, Z.J.; Vafaei, F.; Chen, J., et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci Rep* **2016**, *6*, 22477-22477, doi:10.1038/srep22477.
107. Hamilton, M.G.; Roldan, G.; Magliocco, A.; McIntyre, J.B.; Parney, I.; Easaw, J.C. Determination of the methylation status of MGMT in different regions within glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **2011**, *102*, 255-260, doi:10.1007/s11060-010-0307-5.

108. Della Puppa, A.; Persano, L.; Masi, G.; Rampazzo, E.; Sinigaglia, A.; Pistollato, F.; Denaro, L.; Barzon, L.; Palu, G.; Basso, G., et al. MGMT expression and promoter methylation status may depend on the site of surgical sample collection within glioblastoma: a possible pitfall in stratification of patients? *J Neurooncol* **2012**, *106*, 33-41, doi:10.1007/s11060-011-0639-9.

Weblinks

Weblink 1 (<https://www.dgn.org/leitlinien/2977-ll-76-gliome>; letzter Zugriff am 2020/03/12).

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Geräte	8
Tabelle 2	Medien, Kits und Chemikalien.....	9
Tabelle 3	Primer und Sonden	9
Tabelle 4	Software	10
Tabelle 5	Reaktionsansätze und Puffer	10
Tabelle 6	Antikörper und Verdünnungen	11
Tabelle 7	Zusammenfassung der klinischen Daten der GBM-Patienten.....	21
Tabelle 8	Uni- und multivariate Analysen des 12-Monats OS von 42 GBM Patienten	24
Tabelle 9	Uni- und multivariate Analysen des OS (kompletter Zeitraum) von 42 GBM-Patienten.....	27
Tabelle 10	Uni- und multivariate Analysen des PFS von 42 GBM-Patienten	28
Tabelle 11	Korrelationsanalysen der ATF5-mRNA-Expression mit den klinischen Daten von 42 GBM-Patienten.....	29
Tabelle 12	Zusammenfassung der klinischen Daten der GBM-Patienten mit Primärtumor und zugehörigem Rezidiv	31
Tabelle 13	Zusammenfassung der bisherigen Publikationen, die sich mit Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung im Gliomrezidiv befassen.....	41
Abbildung 1	Systematische Zusammenfassung der ein-/ausgeschlossenen Literaturquellen in Bezug auf Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung im GBM-Rezidiv nach PRISMA-Richtlinien.....	19
Abbildung 2	ATF5-Expression in Gliomproben	22
Abbildung 3	Kaplan-Meier-Analysen der GBM-Patienten mit hoher bzw. niedriger ATF5m-RNA-Expression bei der initialen Operation	26
Abbildung 4	Beispiel von zwei Patienten mit einer Veränderung der MGMT-Promotormethylierung	32
Abbildung 5	Gesamtanalyse ausgewählter Daten aus Publikationen, die von Veränderungen der MGMT-Promotormethylierung im GBM-Rezidiv berichteten	33

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	Varianzanalyse
ATF5	<i>Activating transcription factor 5</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
bZip	Leucin Zipper (Domäne)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
d	Tage
DAB	3,3'-Diaminobuttersäure
DICOM	<i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i> (Bildformat)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> -Skala
FF	Kryokonserviertes Gewebe
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
HRM	<i>High resolution melting PCR</i>
IDH	Isozitat-Dehydrogenase
IDHwt	IDH Wildtyp
LGG	Gliom WHO Grad II
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
miRNA	Micro RNS
mo	Monate
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	Methylierungsspezifischer PCR

MS-MLPA	Methylierungsspezifische Multiplexligations-Probenamplifikation
n.d.	Nicht bestimmt
NH	Hirngewebe ohne Hinweis für / Nachweis einer Pathologie des zentralen Nervensystems
OD	Optische Dichte
OS	Gesamtüberleben
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	In Paraffin eingebettetes Gewebe
PFS	Progressionsfreies Überleben
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
ROIs	Regionen von Interesse (<i>regions of interest</i>)
RT	Strahlentherapie
TMZ	Temozolomid
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Feldheim, J.; Kessler, A. F.; Schmitt, D.; Wilczek, L.; Linsenmann, T.; Dahlmann, M.; Monoranu, C. M.; Ernestus, R.-I.; Hagemann, C.; Lohr, M. Expression of activating transcription factor 5 (ATF5) is increased in astrocytomas of different WHO grades and correlates with survival of glioblastoma patients. *Onco Targets Ther* **2018**, *11*, 8673-8684, doi:10.2147/OTT.S176549.

Feldheim, J.; Kessler, A. F.; Monoranu, C. M.; Ernestus, R.-I.; Lohr, M.; Hagemann, C. Changes of O(6)-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse-A Meta-Analysis Type Literature Review. *Cancers* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11121837.

Feldheim, J.; Kessler, A. F.; Schmitt, D.; Salvador, E.; Monoranu, C. M.; Feldheim, J. J.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M.; Hagemann, C. Ribosomal Protein S27/Metalloproteinase-1 (RPS27) in Glioma-A New Disease Biomarker? *Cancers* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12051085.

Curtaz, C. J.; Schmitt, C.; Herbert, S. L.; **Feldheim, J.;** Schlegel, N.; Gosselet, F.; Hagemann, C.; Roewer, N.; Meybohm, P.; Wöckel, A., et al. Serum-derived factors of breast cancer patients with brain metastases alter permeability of a human blood-brain barrier model. *Fluids and barriers of the CNS* **2020**, *17*, 31, doi:10.1186/s12987-020-00192-6.

Kessler, A. F.; **Feldheim, J.;** Schmitt, D.; Feldheim, J. J.; Monoranu, C. M.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M.; Hagemann, C. Monopolar Spindle 1 Kinase (MPS1/TTK) mRNA Expression is Associated with Earlier Development of Clinical Symptoms, Tumor Aggressiveness and Survival of Glioma Patients. *Biomedicines* **2020**, *8*, doi:10.3390/biomedicines8070192.

***joined first authorship**

Der Lebenslauf ist in der digitalen Version dieser Dissertation nicht enthalten.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *ATF5 Expression und MGMT-Promotormethylierungsänderungen in glialen Tumoren* eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 12. Februar 2021

Unterschrift

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt...

- ... **PD Dr. Carsten Hagemann** für seine fachliche, aber vor allem auch stets menschliche Betreuung. Ich stand in 6 Jahren kein einziges Mal vor einer verschlossenen Tür und kenne keinen Betreuer, der auch nur annähernd so viel Zeit und Kraft für seine Schützlinge investiert, wie Du das für mich getan hast.
- ... **Dr. Almuth Keßler**, ohne deren (und Carstens) Idee mein Promotionsprojekt nie entstanden wäre und die mir nach mehr als einem langen Nachtdienst stets mit Rat und Tat zur Seite stand.
- ... **Prof. Dr. Mario Löhr, Prof. Dr. Anna-Leena Sirén und Prof. Dr. Ralf-Ingo Ernestus**, deren Unterstützung und Betreuung vom ersten Tag an meine Promotion erst möglich machte.
- ... **Prof. Dr. Matthias Eyrich, Prof. Dr. Andreas Rosenwald, Dr. Gabriele Blum-Oehler** und der **GSL Würzburg**, für ihre Betreuung, Unterstützung und Führung über sämtliche Hürden und Stolpersteine auf meinem Weg.
- ... dem **Institut für Klinische Epidemiologie und Biometrie Würzburg**, sowie **Dr. Mathias Dahlmann (DKFZ/MDC)** für die statistische Beratung.
- ... **PD Dr. Camelia Monoranu** für unzählige Erklärungen und Hilfestellungen, sowie eine menschlich und fachlich wertvolle Zusammenarbeit.
- ... **Elisabeth Karl** und **Siglinde Kühnel**, deren Engagement, Unterstützung und Hilfe sich nicht mit Worten beschreiben lässt. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft. Danke, danke, danke!
- ... **Gabi Hahn** und **Nadine Bernhard** für ihr Engagement und ihre große Hilfe bei der technischen Umsetzung.
- ... **meinen Freunden**, die mir auch in schwierigen Zeiten stets den nötigen Rückhalt gaben.
- ... **meinen Eltern**. Danke für alles.
- ... **meiner Frau**, meinem wichtigsten Teampartner in allen Lebensbereichen, auch der Forschung.
- ... **dem Team der Tumorbiologie**, für gute Freundschaft, Aufmunterung, sowie Unterstützung bei Problemen und für so viele schöne Momente in 6 Jahren!