

**Magnetresonanz-tomographische Merkmale
der Telomerase-Reverse-Transkriptase-
Promotermutationen –126 C>T und –146 C>T
in primären Glioblastomen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Tunc Faik Ersoy

aus Altindag, Türkei

2019

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias Simon
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Herrlinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 08. August 2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Vatter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Material und Methoden	9
1.3 Ergebnisse	12
1.4 Diskussion	14
1.5 Zusammenfassung	17
1.6 Abbildungsverzeichnis	18
1.7 Tabellenverzeichnis	19
1.8 Literaturverzeichnis	20
2. Veröffentlichung	27
Introduction	27
Materials and Methods	28
Results	29
Discussion	31
3. Danksagung	36

Abkürzungsverzeichnis

CET1W	T1-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenzen mit Kontrastmittelgabe
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FLAIR	Flüssigkeitsgedämpfte Inversion-Recovery-Sequenzen
FOV	Messfeld
GBM	Glioblastom
KPI	Karnofsky-Index
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNS-Methytransferase
nCET	Nicht-kontrastmittelaufnehmender Tumor
OR	Odds-Ratio (Quotenverhältnis)
SMA	Supplementär-motorisches Areal
SVZ	Subventrikuläre Zone
TE	Echozeit
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TERC	Telomerase-RNA-Komponente
VASARI	Visually AcceSAble Rembrandt Images
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Glioblastom ist der häufigste und leider auch einer der bösartigsten primären Tumoren des zentralen Nervensystems. Primäre Glioblastomen entstehen de novo. Sekundäre Glioblastome entwickeln sich aus vorbestehenden niedriggradigen Gliomen. Die molekulare Pathogenese der beiden Glioblastomunterformen unterscheidet sich dementsprechend. Primäre Glioblastomen werden derzeit molekulargenetisch durch das Fehlen einer Isocitrat-Dehydrogenase-1 (IDH1)- oder Isocitrat-Dehydrogenase-2 (IDH2)-Mutation definiert (Louis et al., 2016). In neueren Studien wurde eine Heterogenität auf der molekularen Ebene nicht nur zwischen zwei unterschiedlichen Tumoren, sondern auch innerhalb desselben Tumors nachgewiesen. Aufgrund dieser bisher nicht vollständig verstandenen komplexen Tumorbilogie bleiben vermutlich die bisherigen Therapieansätze nur eingeschränkt wirksam und es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Patienten in Bezug auf das Gesamtüberleben (Ellis et al., 2015; Henriksen et al., 2014; Inda et al., 2014; Sottoriva et al., 2013). Die mittlere Überlebenszeit der Patienten beträgt nur circa 15 Monate (Haines und Gabor, 2014; Koshy et al., 2012; Ostrom et al., 2015; Stupp et al., 2009).

Zur Standardtherapie gehört – bei einem operablen Befund – eine radikale Resektion des Tumors und anschließend eine adjuvante Radiotherapie (Fernandes et al., 2017). Abhängig vom Methylierungsstatus des Promoters eines für die Reparatur der alkylierten DNS zuständigen Proteins im Zellkern, O⁶-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) wird diese Therapie durch eine orale Chemotherapie mit Temozolomid ergänzt (Fernandes et al., 2017; Koshy et al., 2012).

Die Entdeckung der Auswirkung des Methylierungsstatus des MGMT-Promoters auf das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid ist ein Meilenstein in der Gliomtherapie (Riemenschneider et al., 2010). Alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid (TMZ), Lomustine (CCNU) oder Carmustine (BCNU) verhindern die Zellteilung, indem sie eine Methyl-Gruppe an Guanin (O⁶-Guanin) der DNS hinzufügen, welche eine Fehlpaarung mit Thymin verursacht und dadurch einen DNS-Bruch induziert. MGMT hebt diese Wirkung auf, indem sie diese Alkyl-Gruppen entfernt. Durch

Methylierung der CpG-Insel der Promoterregion wird MGMT epigenetisch stillgelegt. Somit können die alkylierenden Substanzen die Zellteilung und Tumorpheriferation bremsen. MGMT ist der erste etablierte Biomarker in der Gliomtherapie und spielt eine wesentliche prognostische Rolle (Hegi et al., 2005; Stupp et al. 2009).

Anhand dieser neuen Kenntnisse verlagert sich der Fokus der Gliomtherapie zunehmend auf individualisierte Therapien (Bleeker et al., 2012; Dunn et al., 2012; Oh et al., 2014). Die Identifikation von neuen molekulargenetischen Biomarkern würde einerseits neue Ziele für solche gezielten Therapien verschaffen und andererseits die aktuell mangelhafte Stratifikation der Patienten präzisieren. Die Zunahme der Bedeutung von molekulargenetischen Faktoren in den Gliomen schlägt sich auch in der Revision der WHO-Klassifikation für Tumoren des zentralen Nervensystems im Jahr 2016 nieder. Hirntumoren werden nicht mehr nicht nur nach konventionellen histopathologischen Kriterien klassifiziert, sondern auch unter Berücksichtigung der molekulargenetischen Veränderungen, die sie aufweisen. (Louis et al., 2016).

Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT)-Promotermutationen sind die häufigsten Mutationen in primären Glioblastomen. Über 70% der primären Glioblastome beherbergen eine TERT-Promotermutation (Killela et al., 2013; Louis et al., 2016; Simon et al., 2015). Sekundäre Glioblastome weisen viel weniger häufig TERT-Mutationen auf (Louis et al., 2016). Der Telomerase-Komplex besteht aus dem Enzym TERT und der Telomerase-RNA-Komponente (TERC). Dieser Enzym-Komplex wirkt der physiologischen Verkürzung der Telomeren bei der Zellteilung entgegen, die ab einer kritischen Telomerlänge weitere Zellteilungen verhindert. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus bei primären Glioblastomen für die sogenannte Tumorimmortalität essenziell ist. Die -124C>T (C228T) und -146C>T (C250T) Mutationen – die beiden häufigsten Mutationen im Promoter des TERT-Gens – erschaffen eine neue Bindungsstelle für die Ets/Ternary-Komplex-Transkriptionsfaktoren und steigern damit die Genexpression. Dieser Effekt ist jedoch nur beim Vorliegen des Wildtyp (AA)-Allels eines funktionellen Polymorphismus rs2853669 in der Promoterregion des Gens zu beobachten. Das G-Allel verhindert sonst die Bindung des Transkriptionsfaktors und reguliert die TERT-Genexpression herunter (Mosrati et al., 2015; Nenchä et al., 2016; Spiegl-Kreinecker et al., 2015). In niedriggradigen Gliomen und somit sekundären

Glioblastomen müssen alternative Mechanismen die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Tumorzellen sicherstellen.

Die Analyse und Identifikation der beschriebenen molekulargenetischen Veränderungen erfolgt derzeit durch konventionelle Labormethoden wie PCR, DNS- oder Pyrosequenzierung und ist daher auf eine Probeentnahme durch eine Operation bzw. eine stereotaktische Biopsie angewiesen. Die Radiogenomik ist neues Fachgebiet, welches radiologische Biomarker, d.h. Bildgebungskorrelate für eine molekulargenetische Veränderung eines Tumors identifizieren will. Radiogenomik versucht, einem Genotyp einen Radiophänotyp zuzuordnen.

In mehreren Studien konnten zum Beispiel gezeigt werden, dass quantitative kernspintomographische Eigenschaften wie u.a. das Tumolvolumen, das Ausmaß der Kontrastmittelaufnahme oder das Verhältnis von Tumolvolumen zum Ausmaß des perifokalen Ödems als Bildgebungsbiomarker für gewisse genetische Veränderungen gelten können (Aghi, 2005; Colen et al., 2014; Jain et al., 2013; Zinn et al., 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass das Nekrosenvolumen, die Ausdehnung des perifokalen Ödems und eine erhöhte Kontrastmittelaufnahme mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Lacroix et al., 2001). Neuere Studien konnten Korrelationen mit dem molekulargenetischen Profil von Tumoren aufzeigen (Diehn et al., 2008; Pope et al., 2008; Rao et al., 2016). Zum Beispiel wurde demonstriert, dass die Expression von vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), einem Ziel der antiangiogenetischen Therapie mit Avastin®, und von mehreren anderen Hypoxie-induzierten Genen mit einer gesteigerten Kontrastmittelaufnahme und dem kontrastmittelaufnehmenden Bereich des Tumors korreliert (Pope et al., 2008). Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), ein etabliertes Ziel der Brustkrebsantikörpertherapie, ist ein anderes Beispiel. Eine EGFR-Überexpression findet sich häufig in primären Glioblastomen und korreliert mit einem größeren Verhältnis von Kontrastmittelaufnahme (vitalen Gewebe) zur Nekrose (totes Gewebe) sowie einem größeren Verhältnis vom Tumolvolumen in den T2-gewichteten Sequenzen zu Tumolvolumen in den T1-gewichteten Sequenzen nach Kontrastmittelgabe (Diehn et al., 2008). Des Weiteren ist eine verschwommene Tumorgrenze in den T2-gewichteten Sequenzen mit einer EGFR-Amplifikation assoziiert (Aghi, 2005). Zusammenfassend könnte perspektivisch der radiogenomische Ansatz

nicht-invasiv, effizient und kostengünstig relevante Informationen über die komplexe Tumorbilologie gewinnen.

Wenn sich die Tumorgenetik im Radiophänotyp niederschlägt und genetische Faktoren den klinischen Verlauf entscheidend prägen, kann man hoffen, dass zukünftig die Patienten bereits bei der Aufnahme ausgehend von radiologischen Daten präziser stratifiziert und insgesamt zuverlässigere prognostische Aussagen getroffen werden können. Die Prognose der Patienten wird nach gegenwärtigem Wissensstand entscheidend durch klinische Faktoren beeinflusst. Jüngerer Alter, höherer Karnofsky-Index und tumor-assoziierte Krampfanfälle sind mit einer besseren Prognose assoziiert (Lacroix et al., 2001; Lote et al., 1998; Ohgaki et al., 2004). Interessanterweise sind tumor-assoziierte Krampfanfälle viel häufiger bei niedriggradigen Gliomen zu beobachten, welche wiederum in sekundäre Glioblastomen übergehen können (Armstrong et al., 2016). Es ist daher für die Forschung wichtig, Bildgebungsparameter und Molekulargenetik vor dem Hintergrund klinischer Parameter zu untersuchen. Vielleicht kann bereits in naher Zukunft ein multiparametrischer Ansatz basierend auf kernspintomographischen, molekulargenetischen und klinischen Daten die Patientenstratifikation und Gliomtherapie effektiv verbessern. (Buckner, 2003; Colen et al., 2014, 2015; Lacroix et al., 2001; Lamborn et al., 2004; Li et al., 2009; Zinn et al., 2012).

Einige Studien haben versucht, bildgebende Biomarker für den MGMT-Promotermethylierungsgrad zu identifizieren (Ahn et al., 2014; Carrillo et al., 2012; Drabycz et al., 2010; Ellingson et al., 2012; Moon et al., 2012). Vergleichbare Untersuchungen für TERT-Mutationen gab es bislang nicht. Das Ziel dieser Studie war, Bildgebungsbiomarker für TERT-Mutationen und MGMT-Promotermethylierung unter Berücksichtigung der klinischen Parameter zu identifizieren.

1.2 Material und Methoden

Die vorliegende retrospektive Arbeit stützte sich auf 67 Patienten aus einer initialen Kohorte von insgesamt 192 Patienten mit histopathologisch und genetisch verifizierten (IDH1-Wildtyp; s.u.) primären Glioblastomen, die bezüglich TERT-Promotermutationen untersucht wurden (Simon et al., 2015). Für alle 67 Patienten lag ein vollständiger präoperativer cMRT-Datensatz (außer diffusions- und susceptibilitätsgewichteten sowie T2*-Sequenzen) vor. Die folgenden klinischen Daten lagen für alle Fälle vor: Alter bei der Operation, Geschlecht, präoperativer Karnofsky-Index, das progressionsfreie Überleben, das Gesamtüberleben und das präoperative Auftreten von tumor-assoziierten Krampfanfällen. Das Alter und der Karnofsky-Index wurden sowohl kontinuierlich (für KPI von 0 – 100 % jeweils 10 %-Schritte) als auch kategorial untersucht, d.h. Alter \leq 50 Jahre bzw. $>$ 50 Jahre und KPI 90 – 100 % (hoch) bzw. \leq 80 % (niedrig). Alle Patienten wurden in der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie im Universitätsklinikum Bonn operiert. Es handelte sich in allen Fällen um eine Erstoperation. Keiner der Patienten enthielten zuvor eine anderweitige operative oder onkologische Vorbehandlung.

Die genomische DNS wurde vom Tumorgewebe und entsprechenden Blutproben mittels Standardtechniken isoliert (Simon et al., 2015). Die histopathologische Analyse des Tumorgewebes erfolgte im Institut für Neuropathologie im Universitätsklinikum Bonn. Nur Tumorgewebe, das über 90 % neoplastische Zellen enthielt, wurde für die Analysen verwendet. Die TERT-Mutationsanalysen wurden in der Abteilung für molekulargenetische Epidemiologie des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (Prof. R. Kumar und Prof. K. Hemminki) durchgeführt (Simon et al., 2015). Die TERT-Mutationen und der funktionelle rs2853669 Polymorphismus in der Promoterregion wurden mittels PCR und DNS-Sequenzierung nach Sanger bestimmt. Die IDH1-Mutationsanalysen und die Bestimmung der MGMT-Promotermethylierung wurden im Institut für Neuropathologie im Universitätsklinikum Bonn (PD. Dr. A. Waha) durchgeführt. Der IDH1-Mutationsstatus wurde in allen Fällen mittels direkter DNS-Sequenzierung analysiert und zur Verifizierung der Tumore als primäre Glioblastome gemäß der 2016 WHO-Klassifikation von Tumoren des Zentralnervensystems verwendet (Louis et al., 2016). Die MGMT-Promotermethylierung wurde mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Das Ergebnis wurde als „hypermethyliert“ versus „nicht hypermethyliert“ kategorisiert

(Mikeska et al., 2007).

Die Kernspintomographien wurden in der Klinik für Radiologie im Universitätsklinikum Bonn durchgeführt. Alle Patienten wurden mit dem gleichen 3-Tesla-Scanner (Achieva TX, Philips Healthcare, Best/Niederlande) untersucht. Der präoperative Datensatz enthielt in allen Fällen die folgenden Sequenzen: eine 3D-Kontrastmittel-unterstützte T1-gewichtete Sequenz (T1-KM), eine Gradienten-Echo-Sequenz [Echozeit (TE) 7,8 ms; Messfeld (FOV) 256 x 256; Flipwinkel 8°, Voxelgröße 1 x 1 x 1 mm], eine FLAIR-gewichtete 3D-Sequenz (Echozeit 250 ms; Messfeld 250 x 250 mm; Voxelgröße 1 x 1 x 1 mm) und axiale sowie koronare T2-gewichtete TSE-Sequenzen (TE 90 ms; FOV 512 x 512 mm; Voxelgröße 1 x 1 x 1,8 mm). Die Datensätze wurden manuell mit einer handelsüblichen Software (Tumor Tracking Tool, Intellispace Portal 5.0, Philips, Best/Niederlande) von drei unabhängigen Untersuchern (T. F. Ersoy, Dr. V. C. Keil und PD Dr. D. F. Hadizadeh, FA für Diagnostische Radiologie und Neuroradiologie) ausgewertet. Die volumetrischen Daten wurden im Sinne einer Konsensentscheidung der oben genannten drei Untersucher ausgewertet. Die kategorialen Daten wurden individuell analysiert. Zur Bestimmung der Interrater-Reliabilität für kategoriale Daten (z.B. Tumorlokalisation) wurden das Fleiss' Kappa herangezogen ($Kappa > 0,8$ = ausgezeichnet).

Die kernspintomographische Analyse nach Bildgebungsbiomarkern für die TERT-Mutationen (sowohl in Konjugation mit dem AA-Allel des funktionellen rs2853669 Polymorphismus als auch ohne) und MGMT-Promotermethylierung wurden gemäß den Kriterien des VASARI-Projekts durchgeführt. Dieses Projekt etablierte standardisierte Kriterien und Terminologie zur Beschreibung der kernspintomographischen Eigenschaften von Gliomen (National Cancer Institut, 2012). Die Kriterien f16 (Hämorrhagien) und f17 (Diffusionsstörungen) wurden nicht untersucht, da diffusions- und suszeptibilitätsgewichteten Sequenzen sowie T2*-Sequenzen in dem präoperativen Datensatz nicht bei allen Fällen vorhanden waren. Das Kriterium f1 (Tumorlokalisation) wurde erweitert untersucht: das Gehirn wurde hierfür in zwanzig Arealen unterteilt (**Tabelle 1**). Die Nekrose (Volumen 1) wurde als der nicht kontrastmittelaufnehmende zentrale Teil des Tumors mit einem Hyperintensitätssignal in den T2-gewichteten Sequenzen definiert (**Abbildung 1a**). Das vitale Tumorgewebe (Volumen 2) wurde als der

kontrastmittelaufnehmende Teil ohne die Nekrose definiert (Volumen 2 = Volume 3 – Volumen 1; **Abbildung 1b**). Das Gesamtvolumen des Tumors (Volumen 3) wurde als das hyperintense Gewebe in den T2-gewichteten Sequenzen innerhalb des äußeren kontrastmittelaufnehmenden Rings definiert (**Abbildung 1c**). Das hyperintense Gewebe außerhalb des äußeren kontrastmittelaufnehmenden Rings in den 3D-FLAIR-gewichteten Sequenzen wurde als perifokales Ödem (Volumen 4) definiert (**Abbildung 1d**). Das perifokale Ödem ist schwierig vom nicht-kontrastmittelaufnehmenden Anteil des Tumors zu unterscheiden, zumal uns die DWI-Datensätze nicht zur Verfügung standen. Ein uniform hyperintenses Signal mit pseudopodischen Extensionen in die Gyri ohne Infiltration der kortikalen Ränder wurde als Perifokalödem gewertet. Gemäß den VASARI-Kriterien wurde die oben genannten vier Volumina jeweils kontinuierlich und kategorial analysiert. Des Weiteren wurden die Verhältnisse von vitalem Tumorgewebe zum Ausmaß der Nekrose (Volumen 2 / Volumen 1) sowie vom Gesamtvolumen des Tumors zum Ausmaß des perifokalen Ödems (Volumen 4 / Volumen 3) untersucht.

Die statistischen Analysen wurden mit der SPSS 24.0 Software (IBM Corporation, Armonk/USA) durchgeführt. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Korrelationen der beiden molekulargenetischen Veränderungen und kategorialen Bildgebungskriterien bzw. kategorialen klinischen Parametern wurden mittels des exakten Tests nach Fisher und durch Mann-Whitney-U-Tests, die Korrelationen der beiden molekulargenetischen Veränderungen zu den quantitativen kernspintomographischen Kriterien bzw. kontinuierlichen klinischen Parametern wurden mittels Zweistichproben-Tests auf ihre Signifikanz hin geprüft. Das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben wurden mittels Kaplan-Meier-Schätzungen und Log-rank-Tests (Mantel-Cox) untersucht. Es erfolgte schlussendlich eine schrittweise logistische Regressionsanalyse.

Das Patienteneinverständnis erfolgte im Rahmen der Projekte „Molekulare Diagnostik zentralnervöser Tumoren“ bzw. „Molekulare Diagnostik, genetische Grundlagen und neue Therapieansätze von Tumorerkrankungen des (zentralen) Nervensystems“ und „Deutsches Gliomnetzwerk“. Diese Vorhaben wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikum Bonn unter der lfd. Nr. 128/98 (mehrfach aktualisiert, zuletzt lfd. Nr. 182/08) und der lfd. Nr. 184/03 (aktualisiert mit Schreiben vom 18.10.2011) befürwortet.

1.3 Ergebnisse

Von den 67 Patienten waren 43 Männer und 24 Frauen. Das Medianalter bei der Diagnose war 63,5. Der mittlere Karnofsky-Index war 80 %. Krampfanfälle wurde bei 30 Fällen vor der Operation beobachtet. In sämtlichen 67 Fällen wurde ein IDH1-Wildtyp nachgewiesen.

TERT-Mutationsstatus wurde bei allen 67 Fällen untersucht. TERT-Mutationen wurden in 51 Fällen nachgewiesen. Davon wiesen 16 Fälle den AA-Genotyp des funktionellen Polymorphismus rs2853669 auf. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen TERT-Mutationen (sowohl beim Vorliegen des AA-Genotyps des funktionellen Polymorphismus rs2853669 als auch ohne) mit den VASARI-Kriterien (Fleiss' Kappa: 0,87 bis 1,0). TERT-mutierte Glioblastomen kamen seltener in der Angularisregion (Region 8) vor (7/51 mutiert vs. 7/16 nicht-mutiert; $p = 0,03$). TERT-mutierte Glioblastome zeigten keine Assoziation zur subventrikulären Zone ($p = 0,552$). TERT-Mutationen (sowohl beim Vorliegen des AA-Genotyps des funktionellen Polymorphismus rs2853669 als auch ohne) korrelierten nicht mit den klinischen Parametern (**Tabelle 2**). Es wurde (statistisch allerdings nicht signifikante, $p = 0,07$) Assoziation zwischen TERT-Mutationen und dem Auftreten von tumor-assoziierten Krampfanfällen vor der Operation beobachtet ($p = 0,07$). Diese Patienten lebten signifikant länger (OS 17,0 Monate (11,5 – 28,0) vs. 9,0 Monate (4,0 – 12,0); Median und 95 %-Konfidenzintervall, $p = 0,02$). Diese Patienten hatten kleinere kontrastmittelaufnehmenden Läsionen (13,1 cm³ (9,0 – 19,0) vs. 24,0 cm³ (16,6 – 37,5); $p = 0,007$; **Abbildung 3**). Die schrittweise logistische Regressionsanalyse konnte einen möglichen Zusammenhang zwischen den TERT-Mutationen und tumor-assoziierten Krampfanfällen nicht erhärten. Es ergab sich ein Quotenverhältnis von 6,65 (Konfidenzintervall 1,80 – 24,55) und eine Regressionsabschätzung von 1,89 (Standardfehler 0,67) für das männliche Geschlecht und ein Quotenverhältnis von 0,97 (Konfidenzintervall 0,95 – 0,99) und Regressionsabschätzung von -0,03 (Standardfehler 0,01) für das Volumen der kontrastmittelaufnehmenden Läsion. Die beiden Faktoren ergaben zusammen einen χ^2 -Wert von 13,55 ($p = 0,02$).

Der MGMT-Promotermethylierungsgrad war bei insgesamt 55 Fällen (28 methyliert und 27 nicht methyliert) bekannt. Auch hier zeigte sich kein Zusammenhang mit den VASARI-Kriterien und klinischen Parametern (Fleiss' Kappa: 0,87 bis 1,0). MGMT-Promoter methylierte Glioblastomen wurden häufiger im Corpus callosum (Region 19) beobachtet

(methyliert 8/28 vs. nicht methyliert 1/27; $p = 0,03$) und waren in der temporomesialen Region (Region 11) unterrepräsentiert (methyliert 1/28 vs. nicht methyliert 8/27; $p = 0,01$; **Abbildung 2**).

1.4 Diskussion

TERT-Mutationen sind - wie bereits in der Einleitung erwähnt - die häufigsten Mutationen in primären Glioblastomen und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Simon et al., 2015). Die Methylierung des MGMT-Promoters ist ein entscheidender prognostischer Faktor, der aber auch eine zentrale Rolle als Prädiktor für das Therapieansprechen für eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid und damit bei der Entscheidung dafür oder dagegen spielt (Wick et al., 2012). Die vorliegende Arbeit versucht, mögliche Bildgebungskorrelate dieser molekulargenetischen Veränderungen zu charakterisieren. Die Literatur hierzu ist widersprüchlich oder sogar gar nicht existent.

Zur Standardisierung der Beschreibung und Evaluierung der kernspintomographischen Eigenschaften von Gliomen wurden vom „The Cancer Imaging Archive“ die VASARI-Kriterien etabliert (National Cancer Institut, 2012). Dieses System wird derzeit in den meisten radiogenomischen Studien verwendet. Bis auf die Kriterien Hämorrhagien (f16) und Diffusionsstörungen (f17) (in unserem Datensatz fehlten hierfür in vielen Fällen die diffusions- und suszeptibilitätsgewichteten Sequenzen sowie T2*-Sequenzen) wurden sämtliche VASARI-Kriterien mit TERT-Mutationen als MGMT-Promotermethylierung korreliert. Außerdem erfolgte eine genauere Analyse der Tumorlokalisierung durch Gliederung des Hirns in zwanzig Regionen, um herauszufinden, ob die beiden molekulargenetischen Veränderungen eine Assoziation mit gewissen Hirnarealen aufweisen.

In dieser Studie zeigten sich für die beiden molekulargenetischen Veränderungen keine statistisch signifikanten Korrelationen mit den VASARI-Kriterien. TERT-mutierte Glioblastomen fanden sich zwar in der Angularisregion seltener ($p = 0,03$). Eine Assoziation zwischen TERT-Mutationen und dem Parietallappen (gemäß dem VASARI-Kriterien) wurde jedoch nicht nachgewiesen. Eine Erklärung für diese Assoziation gibt es allerdings bisher in der Literatur nicht. Interessanterweise zeigte sich keine Korrelation zwischen TERT-mutierten Glioblastomen und Lokalisation des Tumors in der subventrikulären Zone ($p = 0,552$). Die subventrikuläre Zone gilt als eine Stammzellnische. Einige Autoren beobachteten beim Tumorwachstum in dieser Lokalisation eine besonders schlechte Prognose bzw. ein multifokales und invasiveres Wachstum (Jafri et al., 2013; Lim et al., 2007; Sanai et al., 2005). Es erscheint, dass

aufgrund der Stammzellcharakteristik der Tumorzellen in dieser Region die Verkürzung der Telomeren bei Tumorgenese über alternativen Mechanismen kompensiert werden (Caporaso et al., 2003; Chesler et al., 2012; Zhu et al., 2005), weswegen TERT-Mutationen hier nicht zu erwarten sind (Killela et al., 2013). Glioblastome mit einer Methylierung des MGMT-Promoters fanden sich häufiger im Corpus callosum ($p = 0,03$), wurden jedoch dafür seltener temporomesial beobachtet ($p = 0,01$). Die Ergebnisse bezüglich der Tumorlokalisation müssen jedoch aufgrund der Alphafehler-Kumulation bei mehrfachem Test mit Vorsicht interpretiert werden. Schlussfolgerungen bei fehlender Hypothese, warum konkret sich eine molekulargenetische Veränderung in einer bildgebenden Eigenschaft niederschlagen soll, sind sicher auch problematisch.

In einigen Studien wurden quantitative, nicht auf die Tumorlokalisation bezogene kernspintomographische Korrelationen mit der MGMT-Promotermethylierung beschrieben. Beispielsweise wurde demonstriert, dass ringförmige Kontrastmittelaufnahme vielmehr mit nicht MGMT-Promoter methylierten Tumoren korrelierte (Drabycz et al., 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass MGMT-Promoter methylierte Tumoren in der Kernspintomographie kleinere Nekrosenvolumen aufweisen (Iliadis et al., 2012). Unsere Studie konnte diese Befunde nicht bestätigen. In Übereinstimmung mit den Ergebnisse anderer Untersucher konnten wir keine Bildgebungsbiomarker für MGMT-Promotermethylierung identifizieren (Ahn et al., 2014; Carrillo et al., 2012).

Wie in der Einleitung beschrieben spielen klinische Faktoren eine zentrale prognostische Rolle. Wir beobachteten keine Korrelationen zwischen Alter oder Karnofsky-Index und den beiden molekulargenetischen Veränderungen. TERT-Mutationen waren jedoch bei Patienten, die vor der Operation tumor-assoziierten Krampfanfälle boten, relativ häufiger ($p = 0,07$). Die Patienten mit tumor-assoziierten Krampfanfällen wiesen kleinere Tumoren auf ($p = 0,007$) und hatten eine verlängerte Überlebenszeit ($p = 0,02$). Ob die verlängerte Überlebenszeit allerdings auf die kleinere Tumorgröße und infolgedessen auf bessere operative Ergebnisse zurückgeführt werden kann, ist strittig (Lee et al., 2014; Li et al., 2016; Okumus et al., 2012; Stark et al., 2012). Patienten mit tumor-assoziierten Anfällen werden vermutlich relativ früher im Krankheitsverlauf diagnostiziert und operiert als diejenigen mit vager Symptomatik wie Cephalgien oder Schwindel, ohne dass sich am

Gesamtverlauf im eigentlichen Sinne etwas ändert, sodass es sich hier vielmehr um eine Vorlaufzeit-Verfälschung handelt (Moon et al., 2012; Stark et al., 2012).

Schlussendlich könnte das Fehlen von TERT-Mutationen in vermeintlich primären Glioblastomen darauf hinweisen, dass einige dieser Tumoren eventuell doch sekundäre Glioblastome sind, die zum Beispiel eine IDH2- oder eine nicht untersuchte IDH1-Mutation enthalten (Louis et al., 2016). Das würde gegebenenfalls eine Assoziation zwischen TERT-Mutationen und schlechter Prognose erklären (Simon et al., 2015). Die vorliegende Analyse weist allerdings in eine andere Richtung. Tumor-assoziierte Krampfanfälle treten vor allem bei langsam wachsenden Gliomen auf, während aggressivere Tumoren infolge ihres raumfordernden Effekts schnell fokale neurologische Defizite aufweisen (Lee et al., 2010, 2014). Die Beobachtung von Anfällen bei eher kleinen, häufiger TERT-mutierten Tumoren spricht für einen anderen Mechanismus der Epileptogenese bei diesen Tumoren im Vergleich zum typischen niedriggradigen Gliom. Die Rolle von tumor-assoziierten Krampfanfällen als ein prognostischer Faktor sowie deren Zusammenhang mit TERT-Mutationen sollten unbedingt in einer neuen, größeren Kohorte analysiert werden.

Die vorliegende Studie hatte Limitationen. Die Daten wurden retrospektiv analysiert. Aus der originalen Kohorte von 192 Patienten lag lediglich für 67 Patienten ein kompletter präoperativer cMRT-Datensatz vor. Der Datensatz war auf Routine- bzw. Standardsequenzen beschränkt (u.a. keine diffusions- und susceptibilitätsgewichteten oder T2*-Sequenzen). Auch wenn es eine hohe Interrater-Reliabilität gab, erfolgte die Datenanalyse manuell und nicht mit einer automatisierten Software. Die bildmorphologischen Analysen wurden manuell durchgeführt. Die genetischen Veränderungen waren nicht für alle Patienten bekannt.

Schlussendlich ergeben sich aus dieser Arbeit und den genannten Einschränkungen wichtige Hinweise für Anschlussprojekte. Es müssen andere und neuere Bildsequenzen mit der Klinik und Molekulargenetik korreliert werden. Vermutlich müssen umfassendere, nicht auf einzelne Mutationen beschränkte molekulargenetische Befunde erhoben werden. Die mögliche Bedeutung von Krampfanfällen beim Glioblastom vor dem Hintergrund von TERT-Mutationen (und vielleicht noch anderen molekulargenetischen Veränderungen) bzw. MR-Bildgebung sollte unbedingt weiter untersucht werden.

1.5 Zusammenfassung

TERT-Mutationen sind die häufigsten Mutationen in primären Glioblastomen und mit einer schlechten Prognose assoziiert. MGMT-Promotermethylierung ist ein wichtiger prognostischer, aber auch prädiktiver Faktor, zumal v.a. MGMT-Promoter methylierte Tumoren auf eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid ansprechen. Das durchschnittliche Gesamtüberleben bleibt trotz eines multimodalen Therapieansatzes auf circa 15 Monate eingeschränkt.

Der Fokus der Gliomtherapie verlagert sich zunehmend auf individualisierte Therapien. Hierfür müssen neue Biomarkern als Ziele identifiziert werden. Die Kernspintomographie könnte dafür eine nicht-invasive, effiziente und kostengünstige Alternative zu der konventionellen histopathologischen Bearbeitung anbieten, um sogenannte Bildgebungsbiomarker zu identifizieren. In dieser explorativen Studie konnten wir keinen spezifischen Bildgebungsbiomarker für TERT-Mutationen (sowohl beim Vorliegen des AA-Genotyps des funktionellen Polymorphismus rs2853669 als auch ohne) und für die MGMT-Promotermethylierung identifizieren. Patienten mit tumor-assoziierten Krampfanfällen hatten jedoch tendenziell häufiger Tumoren mit TERT-Mutationen. Diese Tumoren waren kleiner und das Gesamtüberleben war länger.

Zukünftige Projekte müssen vermutlich neue quantitative und dynamische bildgebende Parameter einschließen. Wahrscheinlich müssen auch umfassendere molekulargenetische Datensätze erhoben werden, welche sich nicht auf einzelne Mutationen oder molekulare Veränderungen beschränken. Der mögliche Zusammenhang zwischen Krampfanfällen, Prognose, Bildgebung und Molekularbiologie sollte in einer größeren unabhängigen Kohorte weiter untersucht werden.

1.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Illustration des Tumorzvolumens bei einem 82 Jahre alten Patient mit einem multifokalen rechts temporalen Glioblastom mittels T1-gewichteter Gradienten-Echo-Sequenzen mit Kontrastmittelgabe und T2-gewichteter TSE-Sequenzen.

a – c: T1-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenzen mit Kontrastmittelgabe; d: T2-gewichtete TSE-Sequenzen.

a: Der zentrale, nicht-kontrastmittelaufnehmende Teil der Läsion, welcher sich in den T2-gewichteten Sequenzen hyperintens darstellt, wurde manuell markiert und als Nekrose definiert (Volumen 1).

b: Das in hellgrau hinterlegte Volumen (äußerer Ring) wird durch eine Intensivierung der Hyperintensität in den T1-gewichteten Gradienten-Echo-Sequenzen nach Kontrastmittelgabe im Sinne erhöhter Kontrastmittelaufnahme charakterisiert und daher als der vitale Tumor definiert (Volumen 2, $\text{Volumen 2} = \text{Volumen 3} - \text{Volumen 1}$).

c: Das hinterlegte Volumen innerhalb des äußeren Kontrastmittelaufnehmenden Rings der Läsion inklusive der zentralen Nekrose wird als das Gesamttumorzvolumen (Volumen 3) definiert.

d: Das perifokale Ödem (Volumen 4, in gestrichelter grau) wird als das hyperintense Areal mit pseudopodischen Extensionen in die Gyri ohne Infiltration der kortikalen Ränder in den T2-gewichteten TSE-Sequenzen außerhalb des Kontrastmittelaufnehmenden äußeren Rands der Läsion definiert.

Abbildung 2: Heatmap zur Darstellung der Assoziation zwischen TERT-Mutationen und bildgebenden Parametern.

Die p-Werte sind in 12 Farben kodiert. Die letzten zwei blauen Schattierungen markieren einen Signifikanzwert unter der 5 %-Grenze. Diese Merkmale sind mit einem zentralen schwarzen Punkt markiert. Dargestellt werden VASARI-Parameter wie Mittellinienüberquerung und die 20 anatomischen Lokalisationen. Zur Codierung der Regionen s. Tabelle 1.

Abbildung 3: Tumorzgröße und tumor-assoziierte Krampfanfälle.

Axiale Schichten, T1-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenzen mit Kontrastmittelgabe.

a: 80 Jahre alter Patient mit einem links temporalen Glioblastom (TERT-Wildtyp) mit tumor-assoziierten Krampfanfällen (Gesamttumorzvolumen in den T1-gewichteten Sequenzen mit Kontrastmittelgabe: $6,40 \text{ cm}^3$).

b: 43 Jahre alter Patient mit einem rechts frontoinsularen Glioblastom (TERT-mutiert) ohne tumor-assoziierte Krampfanfälle (Gesamttumorzvolumen: $102,20 \text{ cm}^3$).

1.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorlokalisation: Unterteilung des Gehirns in 20 Regionen zur Beschreibung der Tumorlokalisation.

Zusätzlich zu den VASARI-Parametern wurde das Gehirn zur genaueren Beschreibung der Tumorlokalisationen in 20 Regionen unterteilt. Die Auswertung der Infiltration war analog zu den VASARI-Kriterien.

Tabelle 2: Klinischer und demographischer Überblick der Patientenkohorte.

Das Alter ist als Medianwert mit Angabe des 95 %-Konfidenzintervalls dargestellt. Die signifikanten Ergebnisse sind mit einem Stern markiert.

1.8 Literaturverzeichnis

Aghi M. Magnetic Resonance Imaging Characteristics Predict Epidermal Growth Factor Receptor Amplification Status in Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8600–8605

Ahn SS, Shin N-Y, Chang JH, Kim SH, Kim EH, Kim DW, Lee S-K. Prediction of methylguanine methyltransferase promoter methylation in glioblastoma using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance and diffusion tensor imaging. *J Neurosurg* 2014; 121: 367–373

Armstrong TS, Grant R, Gilbert MR, Lee JW, Norden AD. Epilepsy in glioma patients: mechanisms, management, and impact of anticonvulsant therapy: Table 1. *Neuro Oncol* 2016; 18: 779–789

Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* 2012; 108: 11–27

Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol* 2003; 30: 10–14

Caporaso GL, Lim DA, Alvarez-Buylla A, Chao M V. Telomerase activity in the subventricular zone of adult mice. *Mol Cell Neurosci* 2003; 23: 693–702

Carrillo JA, Lai A, Nghiemphu PL, Kim HJ, Phillips HS, Kharbanda S, Moftakhar P, Lalaezari S, Yong W, Ellingson BM, Cloughesy TF, Pope WB. Relationship between tumor enhancement, edema, IDH1 mutational status, MGMT promoter methylation, and survival in glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 1349–1355

Chesler DA, Berger MS, Quinones-Hinojosa A. The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 190–205

Colen RR, Vangel M, Wang J, Gutman DA, Hwang SN, Wintermark M, Jain R, Jilwan-Nicolas M, Chen JY, Raghavan P, Holder CA, Rubin D, Huang E, Kirby J, Freymann J, Jaffe CC, Flanders A, TCGA Glioma Phenotype Research Group PO, Zinn PO. Imaging genomic mapping of an invasive MRI phenotype predicts patient outcome and metabolic dysfunction: a TCGA glioma phenotype research group project. *BMC Med Genomics* 2014; 7: 30

Colen RR, Wang J, Singh SK, Gutman DA, Zinn PO. Glioblastoma: imaging genomic mapping reveals sex-specific oncogenic associations of cell death. *Radiology* 2015; 275: 215–227

Diehn M, Nardini C, Wang DS, McGovern S, Jayaraman M, Liang Y, Aldape K, Cha S, Kuo MD. Identification of noninvasive imaging surrogates for brain tumor gene-expression modules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 5213–5218

Drabycz S, Roldán G, de Robles P, Adler D, McIntyre JB, Magliocco AM, Cairncross JG, Mitchell JR. An analysis of image texture, tumor location, and MGMT promoter methylation in glioblastoma using magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2010; 49: 1398–1405

Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, Agarwalla PK, Chheda MG, Campos B, Wang A, Brennan C, Ligon KL, Furnari F, Cavenee WK, Depinho RA, Chin L, Hahn WC. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 2012; 26: 756–784

Ellingson BM, Cloughesy TF, Pope WB, Zaw TM, Phillips H, Lalezari S, Nghiemphu PL, Ibrahim H, Naeini KM, Harris RJ, Lai A. Anatomic localization of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylated and unmethylated tumors: a radiographic study in 358 de novo human glioblastomas. *Neuroimage* 2012; 59: 908–916

Ellis HP, Greenslade M, Powell B, Spiteri I, Sottoriva A, Kurian KM. Current Challenges in Glioblastoma: Intratumour Heterogeneity, Residual Disease, and Models to Predict Disease Recurrence. *Front Oncol* 2015; 5: 251

Fernandes C, Costa A, Osório L, Lago RC, Linhares P, Carvalho B, Caeiro C. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: De Vleeschouwer S, ed. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications, 2017: 197-241

Haines IE, Gabor Miklos GL. Bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370: 2048

Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross

JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997–1003

Henriksen M, Johnsen KB, Andersen HH, Pilgaard L, Duroux M. MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival in glioblastoma multiforme--a systematic overview. *Mol Neurobiol* 2014; 50: 896–913

Iliadis G, Kotoula V, Chatzisotiriou A, Televantou D, Eleftheraki AG, Lambaki S, Misailidou D, Selviaridis P, Fountzilias G. Volumetric and MGMT parameters in glioblastoma patients: survival analysis. *BMC Cancer* 2012; 12: 3

Inda M-D-M, Bonavia R, Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)* 2014; 6: 226–239

Jafri NF, Clarke JL, Weinberg V, Barani IJ, Cha S. Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro Oncol* 2013; 15: 91–96

Jain R, Poisson L, Narang J, Gutman D, Scarpace L, Hwang SN, Holder C, Wintermark M, Colen RR, Kirby J, Freymann J, Brat DJ, Jaffe C, Mikkelsen T. Genomic mapping and survival prediction in glioblastoma: molecular subclassification strengthened by hemodynamic imaging biomarkers. *Radiology* 2013; 267: 212–220

Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovannella BC, Grollman AP, He T-C, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih I-M, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang T-L, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 6021–6026

Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, Weichselbaum RR, McCarthy BJ. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* 2012; 107: 207–212

Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF,

McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95: 190–198

Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: Recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol* 2004; 6: 227–235

Lee JW, Norden AD, Ligon KL, Golby AJ, Beroukhir R, Quackenbush J, Wells W, Oelschlager K, Maetzold D, Wen PY. Tumor associated seizures in glioblastomas are influenced by survival gene expression in a region-specific manner: a gene expression imaging study. *Epilepsy Res* 2014; 108: 843–852

Lee JW, Wen PY, Hurwitz S, Black P, Kesari S, Drappatz J, Golby AJ, Wells WM, Warfield SK, Kikinis R, Bromfield EB. Morphological characteristics of brain tumors causing seizures. *Arch Neurol* 2010; 67: 336–342

Li S, Qiu X, Chen B, Zhang W, Ren H, Wang Z, Jiang T. Prognostic factors influencing clinical outcomes of glioblastoma multiforme. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 1245–1249

Li YM, Suki D, Hess K, Sawaya R. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *J Neurosurg* 2016; 124: 977–988

Lim DA, Cha S, Mayo MC, Chen M-H, Keles E, VandenBerg S, Berger MS. Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro Oncol* 2007; 9: 424–429

Lote K, Stenwig AE, Skullerud K, Hirschberg H. Prevalence and prognostic significance of epilepsy in patients with gliomas. *Eur J Cancer* 1998; 34: 98–102

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 803–820

Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hübner A, Ehrentraut D, Schramm J, Felsberg J, Kahl P, Büttner R, Pietsch T, Waha A. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation

analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 2007; 9: 368–381

Moon W-J, Choi JW, Roh HG, Lim SD, Koh Y-C. Imaging parameters of high grade gliomas in relation to the MGMT promoter methylation status: the CT, diffusion tensor imaging, and perfusion MR imaging. *Neuroradiology* 2012; 54: 555–563

Mosrati MA, Malmström A, Lysiak M, Kryzstofiak A, Hallbeck M, Milos P, Hallbeck A-L, Bratthäll C, Strandéus M, Stenmark-Askmal M, Söderkvist P. <i>TERT</i> promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget* 2015; 6: 16663–16673

National Cancer Institut, 2012: VASARI. <https://wiki.nci.nih.gov/display/CIP/VASARI> (Zugriffsdatum: 12.10.2017)

Nencha U, Rahimian A, Giry M, Sechi A, Mokhtari K, Polivka M, Schmitt Y, Di Stefano A-L, Alentorn A, Labussière M, Sanson M. TERT promoter mutations and rs2853669 polymorphism: prognostic impact and interactions with common alterations in glioblastomas. *J Neurooncol* 2016; 126: 441–446

Oh YT, Cho HJ, Kim J, Lee J-H, Rho K, Seo Y-J, Choi Y-S, Jung HJ, Song HS, Kong D-S, Seol HJ, Lee J-I, Yoon Y, Kim S, Nam D-H, Joo KM. Translational validation of personalized treatment strategy based on genetic characteristics of glioblastoma. Harrison JK, editor. *PLoS One* 2014; 9: e103327

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, Burkhard C, Schüller D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic Pathways to Glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64: 6892–6899

Okumus NO, Gursel B, Meydan D, Ozdemir O, Odabas E, Gonullu G. Prognostic significance of concomitant radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 116 patients. *Ann Saudi Med* 2012; 32: 250–255

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous

System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 2015; 17: iv1-iv62

Pope WB, Chen JH, Dong J, Carlson MRJ, Perlina A, Cloughesy TF, Liao LM, Mischel PS, Nghiemphu P, Lai A, Nelson SF. Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. *Radiology* 2008; 249: 268–277

Rao A, Rao G, Gutman DA, Flanders AE, Hwang SN, Rubin DL, Colen RR, Zinn PO, Jain R, Wintermark M, Kirby JS, Jaffe CC, Freymann J, TCGA Glioma Phenotype Research Group. A combinatorial radiographic phenotype may stratify patient survival and be associated with invasion and proliferation characteristics in glioblastoma. *J Neurosurg* 2016; 124: 1008–1017

Riemenschneider MJ, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 2010; 120: 567–584

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *N Engl J Med* 2005; 353: 811–822

Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, Schramm J, Hemminki K, Waha A, Kumar R. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2015; 17: 45–52

Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 4009–4014

Spiegel-Kreinecker S, Lötsch D, Ghanim B, Pirker C, Mohr T, Laaber M, Weis S, Olschowski A, Webersinke G, Pichler J, Berger W. Prognostic quality of activating TERT promoter mutations in glioblastoma: interaction with the rs2853669 polymorphism and patient age at diagnosis. *Neuro Oncol* 2015; 17: 1231–1240

Stark AM, van de Bergh J, Hedderich J, Mehdorn HM, Nabavi A. Glioblastoma: clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2012; 114: 840–845

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff R-O, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 459–466

Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M, NOA-08 Study Group of Neuro-oncology Working Group (NOA) of German Cancer Society. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 707–715

Zhu Y, Guignard F, Zhao D, Liu L, Burns DK, Mason RP, Messing A, Parada LF. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* 2005; 8: 119–130

Zinn PO, Sathyan P, Mahajan B, Bruyere J, Hegi M, Majumder S, Colen RR. A Novel Volume-Age-KPS (VAK) Glioblastoma Classification Identifies a Prognostic Cognate microRNA-Gene Signature. Lesniak MS, editor. *PLoS One* 2012; 7: e41522

2. Veröffentlichung

Neuroradiology
DOI 10.1007/s00234-017-1920-1



DIAGNOSTIC NEURORADIOLOGY

New prognostic factor telomerase reverse transcriptase promotor mutation presents without MR imaging biomarkers in primary glioblastoma

Tunc F. Ersoy^{1,2} · Vera C. Keil³ · Dariusch R. Hadizadeh³ · Gerrit H. Gielen⁴ · Rolf Fimmers⁵ · Andreas Waha⁴ · Barbara Heidenreich⁶ · Rajiv Kumar⁶ · Hans H. Schild³ · Matthias Simon^{1,2}

Received: 17 July 2017 / Accepted: 28 August 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract

Purpose Magnetic resonance (MR) imaging biomarkers can assist in the non-invasive assessment of the genetic status in glioblastomas (GBMs). Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter mutations are associated with a negative prognosis. This study was performed to identify MR imaging biomarkers to forecast the *TERT* mutation status.

Methods Pre-operative MRIs of 64/67 genetically confirmed primary GBM patients (51/67 *TERT*-mutated with rs2853669 polymorphism) were analyzed according to Visually AcceSable Rembrandt Images (VASARI) (<https://wiki.cancerimagingarchive.net/display/Public/VASARI+Research+Project>) imaging criteria by three radiological raters. *TERT* mutation and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase

TFE and VCK are joint first authors and contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00234-017-1920-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Vera C. Keil
vera.keil@ukbonn.de

- ¹ Department of Neurosurgery and Stereotaxy, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud Straße 25, D-53105 Bonn, Germany
- ² Ev. Krankenhaus Bielefeld, Department of Neurosurgery, Kantensiek 11, D-33617 Bielefeld, Germany
- ³ Department of Radiology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud Straße 25, D-53105 Bonn, Germany
- ⁴ Institute of Neuropathology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud Straße 25, D-53105 Bonn, Germany
- ⁵ IMBIE, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud Straße 25, D-53105 Bonn, Germany
- ⁶ DFKZ, Department of Molecular Genetic Epidemiology, Im Neuenheimer Feld 280, 69121 Heidelberg, Germany

(*MGMT*) hypermethylation data were obtained through direct and pyrosequencing as described in a previous study. Clinical data were derived from a prospectively maintained electronic database. Associations of potential imaging biomarkers and genetic status were assessed by Fisher and Mann-Whitney *U* tests and stepwise linear regression.

Results No imaging biomarkers could be identified to predict *TERT* mutational status (alone or in conjunction with *TERT* promoter polymorphism rs2853669 AA-allele). *TERT* promoter mutations were more common in patients with tumor-associated seizures as first symptom (26/30 vs. 25/37, $p = 0.07$); these showed significantly smaller tumors [13.1 (9.0–19.0) vs. 24.0 (16.6–37.5) all cm³; $p = 0.007$] and prolonged median overall survival [17.0 (11.5–28.0) vs. 9.0 (4.0–12.0) all months; $p = 0.02$]. *TERT*-mutated GBMs were underrepresented in the extended angularis region ($p = 0.03$), whereas *MGMT*-methylated GBMs were overrepresented in the corpus callosum ($p = 0.03$) and underrepresented temporomesially ($p = 0.01$).

Conclusion Imaging biomarkers for prediction of *TERT* mutation status remain weak and cannot be derived from the VASARI protocol. Tumor-associated seizures are less common in *TERT* mutated glioblastomas.

Keywords Imaging biomarker · *TERT* mutation · MRI · Glioblastoma · VASARI

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and aggressive primary malignancy of the adult central nervous system. Despite multimodal treatment, the prognosis remains poor with a median overall survival of approximately 15 months [1–4].

The complex genetic and clinical heterogeneity of GBMs gains increasing attention not only due to the revision of WHO criteria for CNS tumors in 2016 [5]. Several diagnostic and clinical markers were identified, which suggest individually heterogeneous outcomes. Clinical factors indicating longer survival are, for example, younger patient age, higher clinical performance status, and seizures as first clinical symptoms [6–8]. These are likely based on a genetic tumor heterogeneity, which may explain individual therapy resistance and divergences in long-term survival between patients but also points the way towards individualized therapeutic approaches [9–12]. O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) promoter methylation status was the first genetic biomarker to be applied in routine GBM diagnostics and therapy determination with *MGMT* hypermethylated GBMs responding superiorly to alkylating temozolomide-based chemotherapy with in consequence longer survival of the patient [13].

More recently, telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter mutations, the most common mutations observed in primary GBM and other tumors, were identified as epigenetic molecular markers to identify primary GBM and as a prognostic factor for overall survival (OS) [14, 15]. The negative prognostic effect of *TERT* mutations is however disputed to be confined to cases showing the rs2853669 AA-allele genotype [16–18].

Imaging biomarkers such as enhancement pattern in contrast-enhanced T1-weighted (T1W) magnetic resonance imaging (MRI) can contribute to a non-invasive assessment of GBM genetic status and patient prognosis. These non-invasive biomarkers can be particularly valuable when costly genetic sequencing techniques are not available [19–22]. Imaging biomarkers were, for example, identified for vascular endothelial growth factor and endothelial growth factor receptor expression, both being potentially relevant factors in the biology of GBM [19, 23–25]. Imaging and molecular/genetic data in combination with clinical and demographic pre-operative parameters, such as age or Karnofsky Performance Score (KPS), allowed more detailed insights in the complex interacting aspects determining patient survival [7, 20, 22, 26–29]. Clinical presentation with tumor-associated seizures is an interesting clinical factor in this context as it can indicate longer survival and is more frequent in lower-grade gliomas, which can develop into secondary glioblastomas [30]. Secondary glioblastomas on the other hand frequently do not show *TERT* mutations [15].

While several studies identified imaging biomarkers for the prognostic marker “*MGMT* promoter methylation status,” there are to date no imaging biomarkers identified to assess the status of “prognostic epigenetic factor of *TERT* mutations” [31–35]. The present study therefore aims to identify imaging biomarkers associated with the *TERT* mutations/rs2853669 genotype status in combination with additional clinical and demographic patient data and *MGMT* promoter status.

Materials and methods

Patient cohort and study setup

The study was approved by the university ethics committee and designed following the guidelines for cohort studies of the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) group. Written informed consent was obtained from all participants. Pre-operative MRI data sets were available from 67 (43 male, 24 female) glioblastoma patients with known *TERT* genetic status and known longer survival ($p = 0.04$) [15]. None of these patients had undergone previous brain surgery or any other oncological treatment. Multiparametric MRI data were assessed for associations with *TERT* mutation status, *MGMT* methylation status, and clinical information.

Clinical data

Clinical and demographic patient data were derived from a prospectively maintained electronic database created from hospital files and patient questionnaires filled in during study inclusion. Items included patient gender, age at diagnosis, OS in months, pre-operative KPS, and initial clinical presentation with pre-operative tumor-associated seizures. Age was evaluated continuously as well as cluster-wise in two groups (by quartiles: ≤ 50 and > 50 years). KPS was similarly analyzed as a continuous (0–100%) as well as a categorical variable (high = KPS 90–100% vs. low = KPS $\leq 80\%$).

Molecular analyses: IDH, MGMT, and TERT

Genomic DNA was isolated applying standard methods on tissue samples containing $> 90\%$ neoplastic cells. Mutational status of isocitrate dehydrogenase (*IDH*) was performed by direct sequencing to confirm primary glioblastoma according to WHO 2016 criteria [5]. *TERT* promoter mutation status and rs2853669 genotypes were available for all 64 cases, and data on *MGMT* promoter hypermethylation in 52/64 cases. The methodology of molecular genetic analyses is described in detail in [15]. The *TERT* promoter region containing the previously described (– 124 C>T and – 146 C>T) mutations and the rs2853669 functional polymorphism had been analyzed by direct sequencing, while *MGMT* promoter methylation status had been determined by pyrosequencing [36].

MRI technique

All MRI studies were acquired at the same 3 T scanner (Achieva TX, Philips Healthcare, Best, the Netherlands) with identical sequence programs including a 3D contrast-enhanced T1W (CET1W) gradient-echo map [echo time (TE) 7.8 ms; field of view (FOV) 256 × 256; flip angle 8°],

a FLAIR-weighted 3D map (TE 250 ms; FOV 250 × 250 mm; voxel size 1 × 1 × 1 mm for both 3D maps), and a transverse as well as coronary T2-weighted TSE data sets (TE 90 ms; FOV 512 × 512 mm; 1 × 1 × 1.8 mm voxel size).

MR image processing and evaluation

MR data sets were triaged for motion artifacts and co-registered using commercially available software (Tumor Tracking Tool, IntelliSpace Portal 5.0, Philips, Best, the Netherlands). Volumetry was performed manually as a consensus evaluation by three raters (T.F.E, V.C.K, and D.H; 3, 6, and 12 years of experience in glioma imaging), while categorical imaging data was evaluated individually by each rater.

In order to identify potential MR biomarkers, each MR data set was analyzed according to 24-point criteria of the Visually Accessible Rembrandt Images (VASARI) project MRI feature set with exception of diffusion and hemorrhage as diffusion- and susceptibility-weighted images or T2*-weighted sequences were not available (<https://wiki.nci.nih.gov/display/CIP/VASARI>). According to VASARI criteria, necrosis was defined as the non contrast-enhancing inner core of the tumor with additional hyperintensity on T2W images (Fig. 1a). Vital tumor (volume 2) was defined as the contrast-enhancing part of the lesion without the centrally necrotic inner core (volume 2 = volume 3 – volume 1; Fig. 1b). Total tumor volume (volume 3) was defined as the entire T2-hyperintense tumor tissue within the borders of the contrast-enhancing rim of the lesion (Fig. 1c). All tissue peripheral of volume 3 showing hyperintensity on FLAIR-weighted images was defined as perifocal edema (volume 4; Fig. 1d).

To fulfill VASARI criteria, all four volumes were stratified into volume groups, but were additionally evaluated as continuous data within this trial. Volume ratios were defined for the proportion of necrosis (volume 2/volume 1), proportion of T2-hyperintense non-enhancing tumor, and proportion of edema (volume 4/volume 3). In addition to VASARI criteria, a more refined tumor location evaluation was performed (Table 1).

Statistics

All statistics were performed with SPSS 24.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The significance level was set at $p < 0.05$.

As no preliminary assumptions regarding the relationship between *TERT* mutation status and imaging biomarker criteria could be made, a non-multiple testing-corrected statistical analysis was opted for [37]. Putative associations between molecular genetic and radiological features were tested using conservative Fisher exact and Mann-Whitney *U* tests. Log-rank (Mantel-Cox) tests were used to evaluate OS. The

relationship of *TERT* mutation status and *TERT* in conjunction with the rs2853669 functional polymorphism AA genotype was additionally analyzed for associations with clinical and demographic data (Fisher exact tests). Radiographic volume and location parameters were tested for potential associations with patient demographics and clinical data (Mann-Whitney *U* tests or Fisher exact tests). Analyses for the *MGMT* promoter methylation status were executed accordingly. In case of significant results, these factors were further analyzed by step-wise logistic regression with a maximum of two contributing factors (limited by the cohort size $n = 67$) and an odds ratio (OR) analysis in order to identify dependencies.

Inter-rater agreement for categorical imaging data (tumor location, etc.) was evaluated with Fleiss' kappa. A kappa above 0.8 was considered excellent.

Results

Cohort analysis and inter-rater agreement of imaging data

All 67 cases were identified as IDH wildtype and thus declared primary glioblastoma cases by WHO CNS 2016 definition.

Regarding *TERT* mutation status, there was no significant gender-related, age-related, or clinically related difference (age range of patients 24–89 years; Table 2 states details about the cohort).

Fleiss' kappa ranged from 0.87 to 1.0 indicating excellent agreement among all three raters concerning the evaluation of categorical imaging data.

Imaging features for *TERT* promoter mutation and *MGMT* methylation status

VASARI imaging parameters were found to be significantly associated with neither the *MGMT* methylation status nor *TERT* promoter mutations (neither alone nor in conjunction with the rs2853669 AA genotype; Fig. 2).

TERT-mutated GBMs were significantly less common in the extended angularis region 8 (7/51 mutated vs. 7/16 non-mutated; $p = 0.03$).

MGMT-methylated GBMs were significantly more common in the corpus callosum (region 19; methylated 8/28 vs. non-methylated 1/27; $p = 0.03$; Fig. 2), and underrepresented in the temporomesial region (region 11; methylated 1/28; non-methylated 8/27; $p = 0.01$).

Clinical parameters and genetic markers

TERT mutational status (with or without AA-allele substratification of rs2853669 genotype) was not associated with any of the clinical and demographic parameters (Table 2).

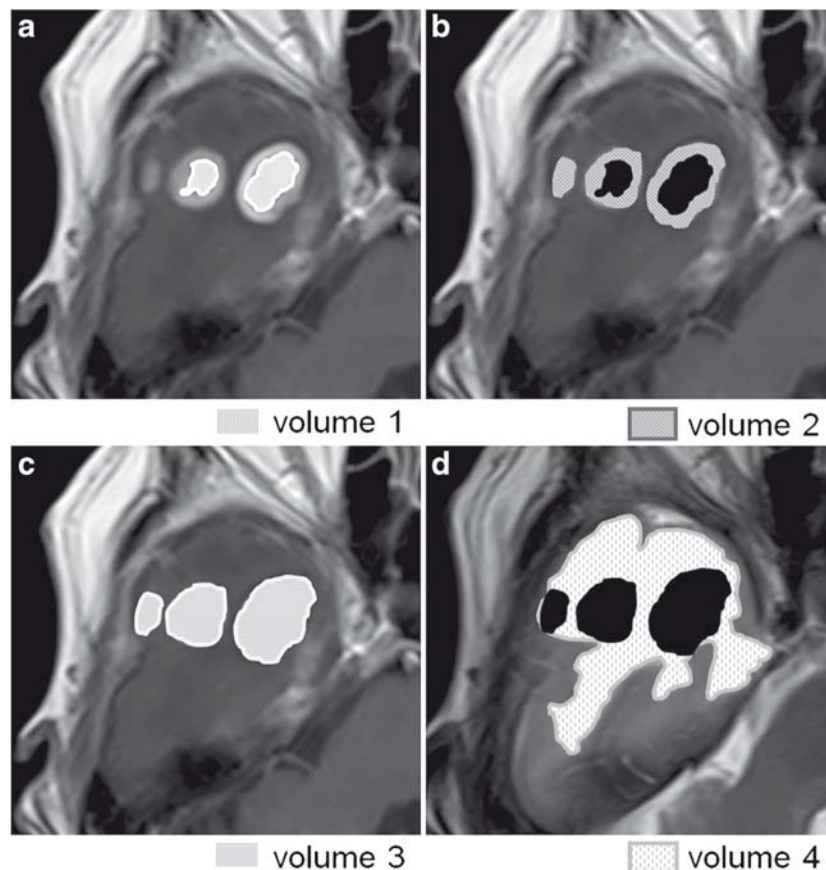


Fig. 1 Schematic definition of tumor volumes in an 82-year-old patient with multifocal right temporal glioblastoma using contrast-enhanced T1W gradient-echo images and T2W TSE images. **a** The central zone of the lesion is marked and is defined as the necrotic tumor (volume 1). **b** The volume highlighted in light gray is characterized by strong enhancement in T1W after contrast agent application and is defined as the vital tumor (volume 2 = volume 3 – volume 1; volume 1 in black). **c** The

highlighted volume (volume 3) marks the total tumor volume as defined by the outer rim of contrast-enhancing tumor and includes the necrotic core. **d** Perifocal edema (volume 4 in light dashed gray) is defined as T2 hyperintensities with pseudopod extension to the gyri and exemption of cortical matter (compare to tumor volume 3 in black). **a–c** Contrast-enhanced T1W gradient-echo images. **d** T2W TSE image

Table 1 Distribution of tumor locations: subdivision of the brain into 20 areas to define tumor location

Frontal	Parietal	Temporal	Occipital	Other
1 SMA	6	Postcentral gyrus	9 Wernicke's area (left hemisphere)	12 Trajectory of visual loop and visual cortex
2 Broca's area (left hemisphere only)				15 Cerebellum thalamus
3 Precentral gyrus (medial part)	7	Superior parietal lobule and precuneus	10 Anterior superior temporal gyrus, middle and inferior temporal gyrus	16 Thalamus
4 Precentral gyrus (lateral 4 cm starting from Sylvian fissure)	8	Extended angularis region	11 Hippocampus, parahippocampus, and uncus	13 Medial and lateral temporo-occipital gyrus
5 All other frontal areas		(angular/supramarginal, inferior parietal lobule)	(temporomesial brain)	14 All other occipital structures including cuneus
				17 Anterior basal ganglia including caudate
				18 Posterior basal ganglia
				19 Corpus callosum
				20 Midbrain to medulla oblongata

In addition to the 24 VASARI criteria, 20 brain areas per hemisphere were defined to assess tumor location. Assessment of infiltration was analogous to VASARI

N.B. some areas are exclusively left-hemispheric, *SMA* supplementary motor area

Table 2 Clinical and demographic data overview

	All patients (n = 67)	TERT mutation			p value (all TERT/only AA-allele)	Seizures as first symptom		p value
		Yes	No (n = 16)			Yes (n = 30)	No (n = 37)	
		All (n = 51)	With AA-allele (n = 16)					
Gender	43 male 24 female	34 17	12 4	9 7		23 7	20 17	0.07
Age at diagnosis (years)	63.5 (59.0–67.0)	63.0 (58.0–67.0)	65.5 (52.0–70.0)	64.0 (59.0–70.0)	0.55/0.37 0.94/0.99	59.5 (53.0–67.0)	67.0 (61.5–70.0)	0.10
Age ≤ 50 years	13	9	3	4	0.49/0.86	8	5	0.22
KPS	80%				0.96/0.95	90%	80%	0.06
KPS > 80%	28	22	6	6	0.96/0.88	18	10	0.01 ^a
Seizures as first symptom	30	26	7	4	0.09/0.88	–	–	–
TERT mutated with AA-allele	–	–	–	–	–	7	9	0.89
TERT mutated all	–	–	–	–	–	26	25	0.07

Age data are stated as median with 95% confidence interval analyzed by bootstrapping. Significant results marked with asterisks

KPS Karnofsky performance status, TERT telomerase reverse transcriptase

^a Significant results

TERT promoter mutations, however, were overrepresented in patients with tumor-associated seizures ($p = 0.07$). Patients with seizures as first symptom lived significantly longer [OS 17.0 months (11.5–28.0) vs. 9.0 months (4.0–12.0), median and 95% confidence interval, $p = 0.02$] and showed smaller contrast-enhancing lesion size [13.1 cm³ (9.0–19.0 cm³) vs. 24.0 cm³ (16.6–37.5 cm³); $p = 0.007$; Fig. 3]. Logistic stepwise regression rendered an OR of 6.65 (confidence interval 1.80–24.55) and regression estimate of 1.89 (standard error 0.67) for male gender and an OR of 0.97 (confidence interval 0.95–0.99) with a regression estimate of - 0.03 (standard error 0.01) for contrast-enhancing lesion size in relation to seizures as first symptom. The two factors together lead to a χ^2 score of 13.55 ($p = 0.02$).

Discussion

This study aimed to identify MR imaging biomarkers that allow a non-invasive prediction of the mutation status of the TERT promoter gene, a recently identified genetic biomarker associated with both primary glioblastoma and negative survival prognosis [15]. In this study, the extensive VASARI imaging feature set did not provide imaging biomarkers for either the TERT mutation status or MGMT methylation.

The only imaging criterion significantly associated with TERT mutation was an underrepresentation of TERT-mutated GBMs in the extended angularis region of the parietal lobe ($p = 0.03$). There are CNS tumors, for which an association between genetic subtype and tumor location could be identified, e.g., in medulloblastoma genetic subgroups [38]. However, to our knowledge,

no publications exist reporting glioblastomas of the angularis region being associated either with exceptional genetic patterns or with an influence on patient survival. In this study, a tumor location in the parietal lobe as defined by VASARI criteria, in contrast to its sublocation, the angularis region, was not significantly associated with TERT mutation status.

Similarly, MGMT promoter hypermethylation was found to be associated with location in the corpus callosum ($p = 0.03$), while we observed an underrepresentation in the temporomesial brain ($p = 0.01$). At the same time, MR signal-based imaging biomarkers of the VASARI repertoire remained inconclusive in this study. Our findings for MGMT are in line with groups that failed to identify imaging biomarkers associated with MGMT promoter methylation [32, 35], whereas some groups had reported the identification of non-location-based MR imaging biomarkers for MGMT status evaluation [31, 39].

We intentionally chose an exploratory approach with a very broad set of potential biomarkers to identify MR imaging biomarkers for TERT promoter mutations for this study. However, in our perspective, premature conclusions to have identified a true biomarker based on statistical associations in the absence of a hypothesis why a genetic feature translates into a certain tumor MR morphology or tumor location should be avoided: In glioblastomas, for instance, the subventricular region was shown to be a common site for recurrence of primary GBM under treatment, which was linked to shorter survival times [40, 41]. We observe a scarcity of research, which links genetics with radiology via histopathology in the radiogenomics literature. Future studies are needed to

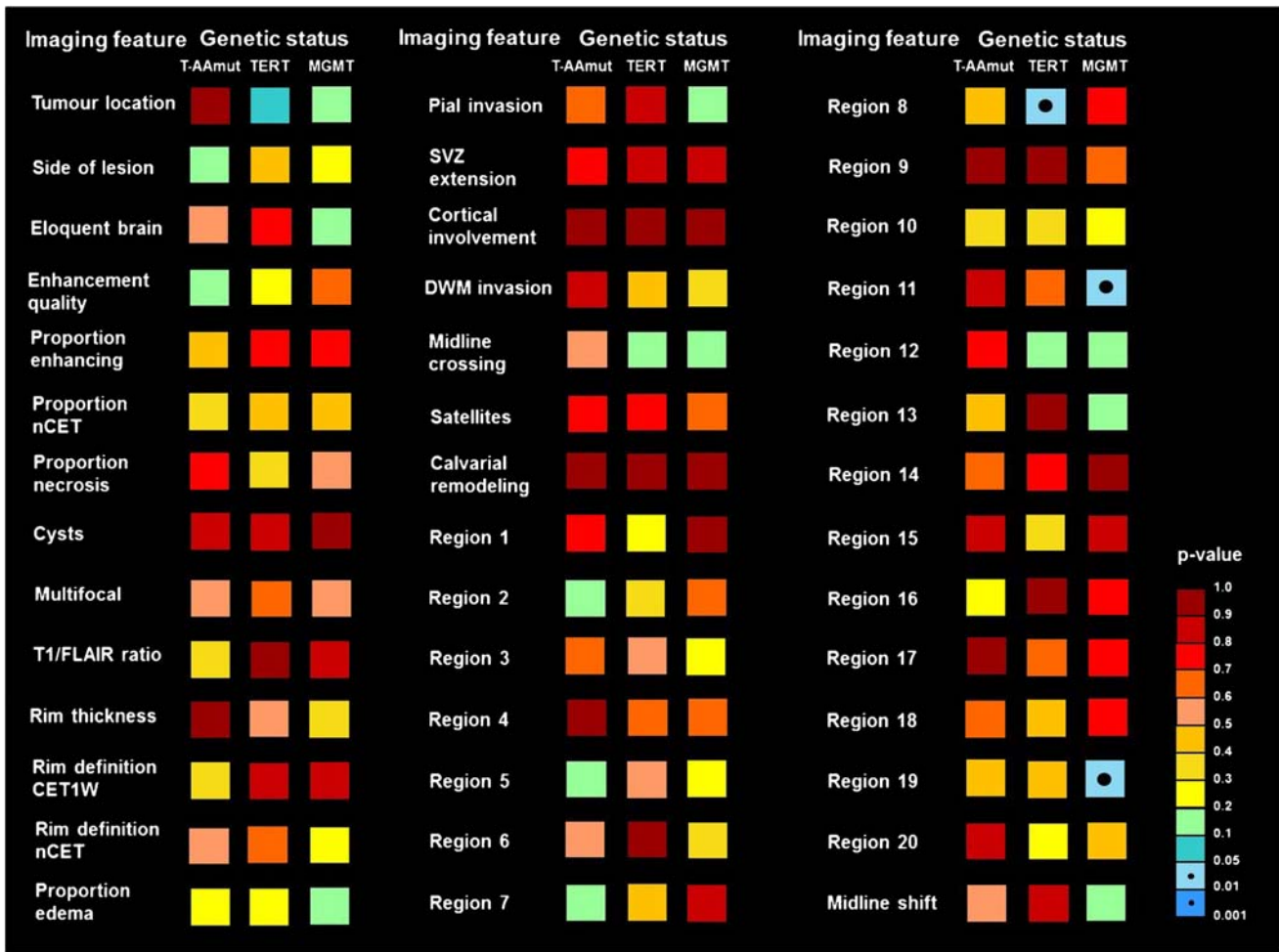


Fig. 2 Heat map depicting association of glioblastoma genetic status and imaging features. *p* values are encoded in 12 colors with 2 blue shades being below the 5% significance level threshold (marked with black center dots). Imaging features contain VASARI criteria plus midline shift as well as 20 additional tumor location features. Region codes are

identical to Table 1. *nCET* non-contrast-enhancing tumor; *CET1W* contrast-enhanced T1W MRI; *SVZ* subventricular zone; *DWM* deep white matter; *TERT* telomerase reverse transcriptase; *T-AAmut* *TERT* rs2853669 with AA-genotype allele

overcome this interdisciplinary challenge and find associations that may have an important impact on therapy planning.

We also analyzed clinical parameters of our patient cohort to identify possible confounders associated with imaging

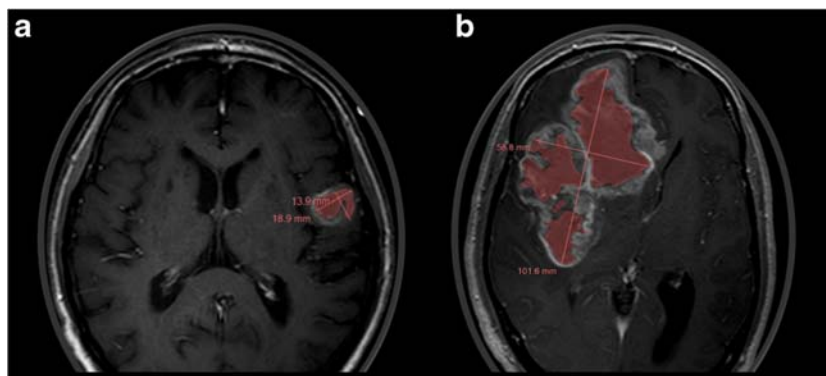


Fig. 3 Example of glioblastoma size and tumor-associated seizures. **a** An 80-year-old man with left temporal *TERT*-wild-type glioblastoma and tumor-associated seizures (total tumor volume on contrast-enhanced T1W images: 6.40 cm³). **b** A 43-year-old patient with right fronto-

insular *TERT*-mutated glioblastoma without seizures (total volume 102.20 cm³). Transverse slices; contrast-enhanced T1W MRI. *TERT* telomerase reverse transcriptase

biomarkers for *TERT* mutations. Regarding tumor-associated seizures as a first symptom of disease, this study showed a (though non-significant) trend for an association between the occurrence of seizures and the lack of *TERT* promoter mutations as a positive prognostic outcome predictor ($p = 0.07$) [15]. However, seizures were associated with significantly smaller tumor volumes and prolonged OS ($p = 0.007$ and 0.02 , respectively). Smaller tumors may favor complete tumor resection leading to longer survival times [42–44]. However, it has to be considered that early seizures leading to early diagnosis and tumor resection may also result in a lead time bias and only virtually extended OS [34]. In addition, a lack of *TERT* promoter mutations may also suggest differences in tumor genesis, suggesting that these GBMs are not primary, but rather secondary tumors that had been preceded by primarily more epileptogenic lower-grade lesions and hence render a longer OS. The meaning of the association of early seizures as a possible predictor of longer OS therefore remains to be determined, and further investigations regarding the relationship between *TERT* mutations and epileptogenesis in GBM patients are needed to further elucidate this relationship.

This study has several limitations. First, the size of the cohort (67 patients) was limited, which is due to the complex interdisciplinary study design. Some imaging biomarkers may have not been identified due to the sample size and the unbalanced size of *TERT* promoter-mutated and wild-type groups. Second, fully automatized statistical mapping techniques may help to avoid reading errors, while the present study was based on human rating [33]. There was however a high inter-rater agreement in this study, indicating a high reliability of readings. It is uncertain how far computerized assessments are superior to human assessments of MRI biomarkers.

In conclusion, this study could not reveal any reliable MR imaging biomarkers, which could have served as non-invasive predictors of the presence of *TERT* mutations alone or the prognostically negative subgroup of the AA genotype plus absence of the variant G allele in the functional polymorphism (rs2853669) of the *TERT* promoter. However, in patients with early tumor-associated seizures, smaller tumors and longer overall survival rates within the glioblastoma cohort were observed.

Compliance with ethical standards

Funding This study was funded by the Department of Radiology, Bonn University Hospital, Germany.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in the studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and

its later amendments or comparable ethical standards. For this type of study formal consent is not required.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Abbreviation

CET1W	contrast-enhanced T1-weighted MRI
<i>IDH</i>	isocitrate-dehydrogenase
GBM	glioblastoma
KPS	Karnofsky Performance Score
<i>MGMT</i>	O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase
MRI	magnetic resonance imaging
OR	odds ratio
OS	overall survival
SVZ	subventricular zone
T1W	T1-weighted
T2W	T2-weighted
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase

References

1. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC et al (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10(5):459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
2. Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ et al (2012) Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neuro-Oncol* 107(1):207–212. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0738-7>
3. Gilbert MR, Sulman EP, Mehta MP (2014) Bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370(21):2048–2049. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1403303>
4. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C et al (2015) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro Oncol* 17(Suppl 4):iv1–iv62. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>
5. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al (2016) The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 131(6):803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

6. Lote K, Stenwig AE, Skullerud K, Hirschberg H (1998) Prevalence and prognostic significance of epilepsy in patients with gliomas. *Eur J Cancer* 34(1):98–102
7. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F et al (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95(2):190–198. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190>
8. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL et al (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64(19):6892–6899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1337>
9. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S (2012) Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neuro-Oncol* 108(1): 11–27. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0793-0>
10. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC et al (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(10):4009–4014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219747110>
11. Ellis HP, Greenslade M, Powell B, Spiteri I, Sottoriva A, Kurian KM (2015) Current challenges in glioblastoma: intratumour heterogeneity, residual disease, and models to predict disease recurrence. *Front Oncol* 5:251. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00251>
12. YT O, Cho HJ, Kim J, Lee JH, Rho K, Seo YJ et al (2014) Translational validation of personalized treatment strategy based on genetic characteristics of glioblastoma. *PLoS One* 9(8): e103327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103327>
13. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 120(5):567–584. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0736-4>
14. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettgowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr et al (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(15):6021–6026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>
15. Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M et al (2015) TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro-Oncology* 17(1):45–52. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou158>
16. Mosrati MA, Malmstrom A, Lysiak M, Krysztofiak A, Hallbeck M, Milos P et al (2015) TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget* 6(18): 16663–16673. [10.10832/oncotarget.4389](https://doi.org/10.10832/oncotarget.4389)
17. Spiegel-Kreinecker S, Lotsch D, Ghanim B, Pirker C, Mohr T, Laaber M et al (2015) Prognostic quality of activating TERT promoter mutations in glioblastoma: interaction with the rs2853669 polymorphism and patient age at diagnosis. *Neuro-Oncology* 17(9):1231–1240. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov010>
18. Nencha U, Rahimian A, Giry M, Sechi A, Mokhtari K, Polivka M et al (2016) TERT promoter mutations and rs2853669 polymorphism: prognostic impact and interactions with common alterations in glioblastomas. *J Neuro-Oncol* 126(3):441–446. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1999-3>
19. Aghi M, Gaviani P, Henson JW, Batchelor TT, Louis DN, Barker FG 2nd (2005) Magnetic resonance imaging characteristics predict epidermal growth factor receptor amplification status in glioblastoma. *Clin Cancer Res: Off J Am Assoc Cancer Res* 11(24 Pt 1): 8600–8605. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0713>
20. Zinn PO, Sathyan P, Mahajan B, Bruyere J, Hegi M, Majumder S et al (2012) A novel volume-age-KPS (VAK) glioblastoma classification identifies a prognostic cognate microRNA-gene signature. *PLoS One* 7(8):e41522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041522>
21. Jain R, Poisson L, Narang J, Gutman D, Scarpace L, Hwang SN et al (2013) Genomic mapping and survival prediction in glioblastoma: molecular subclassification strengthened by hemodynamic imaging biomarkers. *Radiology* 267(1):212–220. <https://doi.org/10.1148/radiol.12120846>
22. Colen RR, Vangel M, Wang J, Gutman DA, Hwang SN, Wintermark M et al (2014) Imaging genomic mapping of an invasive MRI phenotype predicts patient outcome and metabolic dysfunction: a TCGA glioma phenotype research group project. *BMC Med Genet* 7:30. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-30>
23. Pope WB, Chen JH, Dong J, Carlson MR, Perlina A, Cloughesy TF et al (2008) Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. *Radiology* 249(1):268–277. <https://doi.org/10.1148/radiol.2491072000>
24. Diehn M, Nardini C, Wang DS, McGovern S, Jayaraman M, Liang Y et al (2008) Identification of noninvasive imaging surrogates for brain tumor gene-expression modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13):5213–5218. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801279105>
25. Rao A, Rao G, Gutman DA, Flanders AE, Hwang SN, Rubin DL et al (2015) A combinatorial radiographic phenotype may stratify patient survival and be associated with invasion and proliferation characteristics in glioblastoma. *J Neurosurg*:1–10. <https://doi.org/10.3171/2015.4.JNS142732>
26. Buckner JC (2003) Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol* 30(6 Suppl 19):10–14
27. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD (2004) Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro-Oncology* 6(3):227–235. <https://doi.org/10.1215/S1152851703000620>
28. Li SW, Qiu XG, Chen BS, Zhang W, Ren H, Wang ZC et al (2009) Prognostic factors influencing clinical outcomes of glioblastoma multiforme. *Chin Med J* 122(11):1245–1249
29. Colen RR, Wang J, Singh SK, Gutman DA, Zinn PO (2015) Glioblastoma: imaging reveals sex-specific oncogenic associations of cell death. *Radiology* 275(1):215–227. <https://doi.org/10.1148/radiol.14141800>
30. Armstrong TS, Grant R, Gilbert MR, Lee JW, Norden AD (2016) Epilepsy in glioma patients: mechanisms, management, and impact of anticonvulsant therapy. *Neuro-Oncology* 18(6):779–789. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov269>
31. Drabycz S, Roldan G, de Robles P, Adler D, McIntyre JB, Magliocco AM et al (2010) An analysis of image texture, tumor location, and MGMT promoter methylation in glioblastoma using magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 49(2):1398–1405. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.049>
32. Carrillo JA, Lai A, Nghiemphu PL, Kim HJ, Phillips HS, Kharbanda S et al (2012) Relationship between tumor enhancement, edema, IDH1 mutational status, MGMT promoter methylation, and survival in glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 33(7):1349–1355. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2950>
33. Ellingson BM, Cloughesy TF, Pope WB, Zaw TM, Phillips H, Lalezari S et al (2012) Anatomic localization of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylated and unmethylated tumors: a radiographic study in 358 de novo human glioblastomas. *NeuroImage* 59(2): 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.09.076>
34. Moon WJ, Choi JW, Roh HG, Lim SD, Koh YC (2012) Imaging parameters of high grade gliomas in relation to the MGMT promoter methylation status: the CT, diffusion

- tensor imaging, and perfusion MR imaging. *Neuroradiology* 54(6):555–563. <https://doi.org/10.1007/s00234-011-0947-y>
35. Ahn SS, Shin NY, Chang JH, Kim SH, Kim EH, Kim DW et al (2014) Prediction of methylguanine methyltransferase promoter methylation in glioblastoma using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance and diffusion tensor imaging. *J Neurosurg* 121(2):367–373. <https://doi.org/10.3171/2014.5.JNS132279>
36. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J et al (2007) Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 9(3): 368–381. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060167>
37. Rothman KJ (1990) No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1(1):43–46
38. Perreault S, Ramaswamy V, Achrol AS, Chao K, Liu TT, Shih D et al (2014) MRI surrogates for molecular subgroups of medulloblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 35(7):1263–1269. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3990>
39. Iliadis G, Kotoula V, Chatzisitiriou A, Televantou D, Eleftheraki AG, Lambaki S et al (2012) Volumetric and MGMT parameters in glioblastoma patients: survival analysis. *BMC Cancer* 12:3. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-3>
40. Kroonen J, Nassen J, Boulanger YG, Provenzano F, Capraro V, Bours V et al (2011) Human glioblastoma-initiating cells invade specifically the subventricular zones and olfactory bulbs of mice after striatal injection. *Int J Cancer* 129(3):574–585. <https://doi.org/10.1002/ijc.25709>
41. Jafri NF, Clarke JL, Weinberg V, Barani IJ, Cha S (2013) Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro-Oncology* 15(1):91–96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos268>
42. Stark AM, van de Bergh J, Hedderich J, Mehdorn HM, Nabavi A (2012) Glioblastoma: clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clin Neurol Neurosurg* 114(7):840–845. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.01.026>
43. Lee JW, Norden AD, Ligon KL, Golby AJ, Beroukhim R, Quackenbush J et al (2014) Tumor associated seizures in glioblastomas are influenced by survival gene expression in a region-specific manner: a gene expression imaging study. *Epilepsy Res* 108(5):843–852. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.02.021>
44. Li YM, Suki D, Hess K, Sawaya R (2015) The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: can we do better than gross-total resection? *J Neurosurg*:1–12. <https://doi.org/10.3171/2015.5.JNS142087>

3. Danksagung

Bei Herrn Prof. M. Simon möchte ich mich für die Überlassung des Themas und viel Unterstützung bedanken, bei Frau Dr. V. Keil und bei Herrn PD Dr. Hadizadeh für die Einführung in die Grundlagen der Neuroradiologie und natürlich Anleitung und Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse. Auf diesem Wege möchte ich mich auch bei allen Ko-Autoren der aus dieser Promotionsarbeit hervorgegangenen Publikation nochmals herzlich bedanken.