

Aus der Klinik für Neurologie mit Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Tumorzellgehalt in Glioblastomen
Zu TERT-Promotormutationen, MGMT-Methylierung und prognostischer Bedeutung
von 'Reinheit' in GBM

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eva Schulze Heuling

aus Warendorf

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsch)	3
Abstract (Englisch)	4
Eidesstattliche Versicherung	5
Ausführliche Anteilserklärung	6
Auszug aus dem ISI Web of Knowledge	7
Publikation	9
Lebenslauf	37
Publikationsliste	39
Danksagung	40

Abstrakt

Mit der vorliegenden Studie ist es gelungen, die Entwicklung und den Einsatz einer quantitativen, allelspezifischen real-time PCR (qAS-PCR) zur Bestimmung von Genotyp und mutanter Allelfrequenz von Telomerase-Promotor-Mutationen (pTERT-Mutationen) als direktes Maß für den Tumorzellgehalt in Glioblastomen (GBM) nachzuweisen. Da der Tumorzellgehalt als möglicher Einflussfaktor auf die genaue Bestimmung anderer Biomarker in Glioblastomen gilt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen Tumorreinheit und der O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) in Gewebeproben aus Glioblastomen systematisch untersucht. Zugleich ist der Promotor-Methylierungsstatus des DNA-Reparaturenzyms MGMT ein wichtiger Biomarker in Glioblastomen: Zum einen hängen Therapiemöglichkeiten und -ansprechraten davon ab, zum anderen gilt er als wichtiges Einschlusskriterium für klinische Studien.

Daher werden in dieser Untersuchung Tumorzellgehalt, pTERT-Mutationen durch Sanger-Sequenzierung, MGMT-Methylierung durch Pyrosequenzierung, IDH1-Mutationsstatus und klinische Parameter in einer Kohorte von high-grade Gliomen (n=97) systematisch analysiert. Es zeigt sich, dass die qAS-PCR im Vergleich mit unabhängigen Methoden zuverlässig sowohl Genotyp als auch Tumorzellgehalt prognostiziert. Der Tumorzellgehalt korreliert darüber hinaus positiv und signifikant mit dem Ausmaß der Methylierung in MGMT-methylierten GBM. Dieses Ausmaß zeigt zugleich signifikant unterschiedlich hohe Level für beide Mutation-Hotspots (C228T vs. C250T). Abschließend konnte der Tumorzellgehalt als ein unabhängiger prognostischer Marker in GBM identifiziert werden.

In der Gesamtschau konnten nicht nur Zusammenhänge zwischen Tumorzellgehalt, pTERT-Mutationen und MGMT-Methylierung nachgewiesen werden; darüber hinaus belegt diese Studie auch, dass das Ausmaß der MGMT-Methylierung den Tumorzellgehalt widerspiegelt und der Tumorzellgehalt selbst als prognostisch bedeutsam in IDH1-Wildtyp-GBM betrachtet werden muss.

Abstract

Promoter methylation status of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), a DNA repair enzyme, is a critical biomarker in glioblastoma multiforme (GBM) as treatment decisions and clinical trial inclusion rely on its accurate assessment. However, interpretation of results is complicated by poor inter-assay reproducibility as well as weak a correlation between methylation status and expression levels of MGMT.

The present study systematically investigates the influence of tumor purity on tissue subjected to MGMT analysis. A quantitative, allele-specific real-time PCR (qAS-PCR) assay was developed to determine genotype and mutant allele frequency of telomerase promoter (pTERT) mutations as a direct measure of tumor purity. We studied tumor purity, pTERT mutation by Sanger sequencing, MGMT methylation by pyrosequencing, IDH1 mutation status, and clinical parameters in a cohort of high-grade gliomas (n=97).

The qAS-PCR reliably predicted pTERT genotype and tumor purity compared with independent methods. Tumor purity positively and significantly correlated with the extent of methylation in MGMT methylated GBMs. Extent of MGMT methylation differed significantly with respect to pTERT mutation hotspot (C228T vs. C250T). Interestingly, frontal lobe tumors showed greater tumor purity than those in other locations. Above all, tumor purity was identified as an independent prognostic factor in GBM.

In conclusion, we determined mutual associations of tumor purity with MGMT methylation and pTERT mutations and found that the extent of MGMT methylation reflects tumor purity. In turn, tumor purity is prognostic in IDH1 wildtype GBM.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Eva Schulze Heuling, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Tumorzellgehalt in Glioblastomen. Zu TERT-Promotormutationen, MGMT-Methylierung und prognostischer Bedeutung von 'Reinheit' in GBM“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autorinnen/Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung

Publikation:

Eva Schulze Heuling, Felix Knab, Josefine Radke, Eskil Eskilsson, Emmanuel Martinez-Ledesma, Arend Koch, Marcus Czabanka, Christoph Dieterich, Roel G. Verhaak, Christoph Harms, and Philipp Euskirchen, Prognostic Relevance of Tumor Purity and TERT Promoter Mutations for MGMT Promoter Methylation in Glioblastoma, Molecular Cancer Research, 2017

Beitrag im Einzelnen:

- Anteil am Studiendesign
- Aufbereitung von GBM-DNA und -RNA
- Zellkulturtechniken
- Experimentdesign
- Primerdesign
- Vorbereitung und Durchführung der qAS-PCRs
- Kontrolle der PCR-Ergebnisse durch Gelelektrophoresen
- qualitative Auswertung und Interpretation
- Berechnung von Allelfrequenzen
- Beteiligung am Schreiben und Revidieren des Manuskripts
- Planung, Design und Durchführung zusätzlicher Experimente für erste Revision der Publikation

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"ONCOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 217 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	24,539	187.040	0.064520
2	NATURE REVIEWS CANCER	46,017	37.147	0.084880
3	LANCET ONCOLOGY	38,110	33.900	0.121840
4	CANCER CELL	32,653	27.407	0.102790
5	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	149,617	24.008	0.284510
6	Nature Reviews Clinical Oncology	6,733	20.693	0.026750
7	Cancer Discovery	8,944	20.011	0.053350
8	JAMA Oncology	2,496	16.559	0.011280
9	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	38,391	12.589	0.062430
10	ANNALS OF ONCOLOGY	34,424	11.855	0.090850
11	LEUKEMIA	23,538	11.702	0.059710
12	CLINICAL CANCER RESEARCH	77,834	9.619	0.140920
13	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	4,889	9.452	0.009450
14	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	5,835	9.141	0.012360
15	CANCER RESEARCH	139,655	9.122	0.149120
16	CANCER TREATMENT REVIEWS	7,122	8.589	0.014410
17	Cancer Immunology Research	2,936	8.284	0.013960
18	Liver Cancer	565	7.854	0.001610
19	NEURO-ONCOLOGY	8,326	7.786	0.024240
20	OncolImmunology	4,157	7.719	0.015420
21	ONCOGENE	65,039	7.519	0.079990
22	JOURNAL OF PATHOLOGY	16,079	6.894	0.026920
23	Journal of Thoracic Oncology	12,094	6.595	0.032210
24	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	49,805	6.513	0.073900
25	CANCER LETTERS	26,657	6.375	0.040290
26	Journal of Hematology & Oncology	2,879	6.350	0.007910
27	BREAST CANCER RESEARCH	10,541	6.345	0.023820
28	Therapeutic Advances in Medical Oncology	787	6.294	0.002420
29	Advances in Cancer Research	2,187	6.267	0.003200
30	SEMINARS IN ONCOLOGY	5,448	6.212	0.008120
31	Molecular Cancer	9,134	6.204	0.018240
32	BRITISH JOURNAL OF CANCER	45,262	6.176	0.073220

33	Blood Cancer Journal	1,270	6.126	0.006310
34	CANCER	66,326	6.072	0.074010
35	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	27,303	6.029	0.047970
36	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	18,257	5.764	0.033540
37	STEM CELLS	20,822	5.599	0.038040
38	Gastric Cancer	3,900	5.454	0.008450
39	SEMINARS IN RADIATION ONCOLOGY	2,232	5.356	0.003900
40	Molecular Oncology	3,895	5.314	0.012380
41	ENDOCRINE-RELATED CANCER	6,547	5.267	0.011530
42	JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH	4,593	5.189	0.006840
43	Pigment Cell & Melanoma Research	3,903	5.170	0.007980
44	Oncotarget	30,241	5.168	0.078660
45	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	44,068	5.133	0.059930
46	CARCINOGENESIS	21,584	5.105	0.026120
47	NEOPLASIA	6,701	5.006	0.010600
48	Clinical Epigenetics	1,322	4.987	0.004480
49	MOLECULAR CANCER RESEARCH	7,764	4.974	0.016440
50	CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY	6,296	4.971	0.011220
51	ONCOLOGIST	10,533	4.962	0.022190
52	GYNECOLOGIC ONCOLOGY	22,924	4.959	0.038450
53	ORAL ONCOLOGY	8,242	4.794	0.014180
54	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	7,180	4.711	0.013710
55	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	5,685	4.697	0.007260
56	Journal of the National Comprehensive Cancer Network	4,197	4.675	0.014290
57	Clinical Colorectal Cancer	1,046	4.507	0.002240
58	RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY	15,639	4.328	0.027970
59	LUNG CANCER	10,841	4.294	0.019880
60	CANCER JOURNAL	2,824	4.218	0.006360
61	MOLECULAR CARCINOGENESIS	4,856	4.185	0.008000

Schulze Heuling, E., Knab, F., Radke, J., Eskilsson, E., Martinez-Ledesma, E., & Koch, A. et al. (2017). Prognostic Relevance of Tumor Purity and Interaction with MGMT Methylation in Glioblastoma. *Molecular Cancer Research*, 15(5), 532-540.

<http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-16-0322>

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Artikel:

Schulze Heuling, E., Knab, F., Radke, J., Eskilsson, E., Martinez-Ledesma, E., & Koch, A. et al. (2017). Prognostic Relevance of Tumor Purity and Interaction with MGMT Methylation in Glioblastoma. *Molecular Cancer Research*, 15(5), 532-540. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-16-0322>

Euskirchen, P., Radke, J., Schmidt, M., **Schulze Heuling, E.**, Kadikowski, E., & Maricos, M. et al. (2017). Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. *PLOS ONE*, 12(9), e0185376. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0185376>

Poster:

17. NOA (Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft) Tagung 2015 in Heidelberg und 20th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology, November 19 - 22, 2015, San Antonio, Texas:

Philipp Euskirchen, Josefine Radke, Marc Sören Schmidt, **Eva Schulze Heuling**, Eric Kadikowski, Meron Maricos, Felix Knab, Jun Cheng, Ulrike Grittner, Norman Zerbe, Marcus Czabanka, Christoph Dieterich, Hrvoje Miletic, Sverre Mørk, Arend Koch, Matthias Endres, Christoph Harms: ZEB1 is ubiquitously expressed across subtypes in human glioblastoma and a surrogate marker of tumor purity

Danksagung

Diese Dissertation wäre ohne die Hilfe zahlreicher Unterstützerinnen und Unterstützer nicht zustande gekommen.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Harms ganz herzlich für seine Bereitschaft bedanken, mein Dissertationsthema zu betreuen und es in allen Belangen mitzutragen. Seine stete Diskussionsbereitschaft, seine persönliche Förderung meiner Forschung sowie sein Rückhalt haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls ganz besonders großer Dank gilt Herrn Dr. Philipp Euskirchen für seine vorzügliche Betreuung meiner Arbeit, die intensive und effiziente fachliche Anleitung, zahllose fachliche Diskussionen, und vor allem auch dafür, dass er zu jeder Zeit erreichbar war und mich in gleichem Maße gefordert wie unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Dr. Gisela Lättig-Tünnemann für die Einführung in die Fluoreszenz-Mikroskopie, das geduldige Beantworten aller Fragen und die angenehme Zusammenarbeit. Dieser Dank gebührt ebenfalls Janet Lips, die immer und an jeder erforderlichen Stelle ausgeholfen und den Alltagsbetrieb im Labor aufrechterhalten hat.

Auch den weiteren Mitgliedern der AG Harms bin ich überaus dankbar für die reibungslose Zusammenarbeit, die sehr kollegiale und angenehme Atmosphäre im Labor sowie die selbstverständliche tatkräftige Unterstützung.

Der gesamten Experimentellen Neurologie an der Charité Mitte möchte ich nicht nur für ihre überaus wertvolle administrative Unterstützung danken, sondern insbesondere auch dafür, dass sie mich während der gesamten Zeit mit klugen Ratschlägen unterstützt hat.

Abschließend bedanke ich mich bei allen Co-Autoren und -Autorinnen für ihren Beitrag. Ohne ihr Wissen, ihre Leistung und ihre Kritik wäre dieses Projekt nicht so

weit gekommen.

Es war mir eine große Freude, mit euch allen zusammen zu arbeiten.

Berlin, im März 2017

Eva Schulze Heuling