

Aus dem Zentrum für Neurochirurgie der Universität zu Köln
Klinik für Allgemeine Neurochirurgie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Goldbrunner

TERT und die GABPA/B - Bindungsproteine in den Gliomen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von Efthymios Papazacharias
aus Athen, Griechenland

promoviert am 17. Dezember 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2025

Dekan: **Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink**
1. Gutachter: **Universitätsprofessor Dr. med. R. Goldbrunner**
2. Gutachter: **Universitätsprofessor Dr. med. M. Fischer**

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten :

Herr Dr. med. Marco Timmer

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herr Dr. med. M. Timmer von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Dr. Röhn und Herr Dr. med. M. Timmer und der medizinisch-technischen Assistentin Frau Kuhl durchgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 09.05.2024

Die dieser Publikation (Papazacharias et al. *Oncotarget* 2021) zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. med. M. Timmer, Frau Dr. Röhn und Frau Kuhl durchgeführt worden. Die Struktur, Durchführung und Analyse der Experimente sowie die Erstellung der Publikationsschrift und Korrektur wurden von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. med. M. Timmer durchgeführt. Die Durchführung und Auswertung der PCR-Ergebnissen wurden von mir selbst durchgeführt. Statistische Analysen und Auswertungen wurden von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. med. M. Timmer durchgeführt. Bei der Publikation der Daten halfen Herr Dr. med. M. Timmer und Herr Prof. Goldbrunner.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonders meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. R. Goldbrunner für die Unterstützung im Rahmen der Promotion, dem Laborleiter und Betreuer Herrn Dr. med. M. Timmer für die Ideen und Durchführung des Projekts sowie Frau Dr. Röhn und Frau Kuhl ganz herzlich danken. Ebenfalls, danke ich meiner Familie für die mentale Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1. Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS)	11
2.1.1. Die primären ZNS-Tumore	11
2.1.2. Die sekundären ZNS-Tumore	13
2.1.3. Die Risikofaktoren	13
2.2. Die Gliome	14
2.2.1. Molekulare Marker der Gliome	14
2.2.1.1. Die IDH-Mutationen	14
2.2.1.2. Die 1p/19q-Kodeletion, ATRX und TP53-Mutationen	15
2.2.2. Die primären und sekundären Glioblastome	16
2.2.3. Therapie und Prognose	17
2.3. Die Telomerase	17
2.3.1. Aufbau und Funktion	18
2.3.2. Telomerase-Reverse-Transkriptase in den Gliomen	18
2.4. GA-Bindungsproteine (GABP)	20
2.4.1. Aufbau und Funktion der GABPA/B	21
2.4.2. GABPA/B in den Gliomen	21
2.5. Ziele der Arbeit	22
3. PUBLIKATION (MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE)	23
4. DISKUSSION	34

4.1.	Interpretation der Ergebnisse	34
4.2.	Limitationen	36
5.	LITERATURVERZEICHNIS	37
6.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	44

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATRX	<i>α-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked</i>
ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i>
A	Adenin
AR	<i>ankyrin repeat domain</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Bp	Basenpaaren
cIMPACT-NOW	<i>Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumour Taxonomy-Not Officially WHO</i>
C	Cytosin
ca.	circa
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CRISP	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DNA	Desoxyrubonukleinsäure
DBD	<i>DNA binding domain</i>
EANO	<i>European Association of Neuro-Oncology</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
Ets	<i>E-twenty-six</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
G	Guanin
GOF	<i>gain of function</i>
GABP	GA-Bindungsprotein
GABPA	GA-Bindungsprotein A
GABPB	GA-Bindungsprotein B
GABPB1 - L	GABPB1 - longer
GABPB1 - S	GABPB1 - shorter
Gy	Gray

HIV	Humanes Immundefizient-Virus
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1α</i>
HER-2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IDH	Isocitratdehydrogenase
KPS	<i>Karnofsky Performance Status</i>
LOF	<i>loss of function</i>
LZ	<i>leucine-zipper-like domain</i>
MTX	Methotrexat
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NOS	<i>no other specified</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung carcinoma</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
prim. GBM	primäres Glioblastoma multiforme
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PCV	Procarbazin, Lemustin, Vincristin
pTERT	Promoter der Telomerase Reverse Transkriptase
sek. GBM	Sekundäres Glioblastoma multiforme
SHH	<i>Sonic hedgehog subgroup</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	<i>sogennant</i>
TP53	Tumorsuppressorprotein p53

TMZ	Temozolomid
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
T-loop	<i>telomeric loop</i>
T	Thymin
TAD	<i>transcriptional activation domain</i>
u.a.	unter anderem
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	<i>Wingless subgroup tumors</i>
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel
α -KG	α -Ketoglutarat
2-HG	2-Hydroxyglutatarat
%	Prozent

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die primären Glioblastome und deren Rezidive, eine gesteigerte TERT mRNA Expression aufweisen, während die niedrig und hoch gradige Gliome eine deutlich reduzierte Expression präsentieren. Diese erhöhte Expression kann unter anderem durch die Entstehung von zwei spezifischen Mutationen, die C228T und C250T, im Promoter von TERT erklärt werden. Diese zwei Punktmutationen generieren eine besondere Bindungsstelle für das GABP-Proteinkomplex, welches selektiv an den mutierten pTERT bindet, diesen aktiviert und zur Überexpression von TERT führt ein Pathomechanismus, der ausführlich in dieser Arbeit analysiert wurde.

Durch die Erweiterung der Untersuchungen wurde betont, dass GABPA und die GABPB-Isoformen im Laufe der Progression ein ähnliches Muster der Überexpression aufweisen, mit der höchsten Expression in den sekundären Glioblastomen. Interessanterweise, zeigen die mit Chemotherapie behandelten sekundären Glioblastome dieser Studie eine niedrigere Expression von einzelnen GABP Proteine im Vergleich zu den unbehandelten Gliomen, als Hinweis auf einen potenziellen therapeutischen Ansatz mit Temozolomid in pTERT - mutierten und GABP - positiven Gliomen.

Die Ergebnisse dieser Studie, heben die wichtige Rolle von TERT und der verschiedenen GABPA/B-Bindungsproteine in der Entwicklung und Progression der Gliomen hervor und können somit als potenzielle, molekulare Marker für die Gliomagenese vorgestellt werden. Trotz dieser interessanten Erkenntnisse ist weitere Forschung erforderlich, um die genauen Beziehungen zwischen diesen Marker und dessen Rolle in der Gliomprogression zu eruieren. Als Ziel der zukünftige Studien soll das Verständnis der Entwicklung der Gliome sein und möglicherweise neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

2. EINLEITUNG

2.1. Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS)

Die Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) gehören zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen der Population zusammen mit dem Prostata-, Brust- und Bronchialkarzinom ¹. Die altersadaptierte Inzidenz liegt zwischen 11,5 und 42,8 pro 100.000 Einwohner und die Gehirntumore sind eine der häufigsten Ursachen der tumorbedingten Mortalität ¹.

Je nach Entstehungsort kann zwischen primären und sekundären ZNS-Tumoren unterschieden werden, die je nach klinischem Verlauf und histopathologischen Merkmalen in maligne und benigne Tumore unterteilt werden sowie je nach anatomischer Lokalisation, als intra- oder extraaxialen Tumore klassifiziert werden können.

2.1.1. Die primären ZNS-Tumore

Die Inzidenz primärer ZNS-Tumore liegt bei ca. 23,7 pro 100.000 Einwohner pro Jahr mit einer unterschiedlichen Verteilung je nach Histologie, Alter und Geschlecht ¹. Mit ca. 70,3% sind die benignen ZNS-Tumore die häufigste Tumorentität im Vergleich zu den malignen mit ca. 29,7% ¹. Für eine einheitliche Klassifikation und Gruppierung der primären Hirntumore erfolgte von Seiten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine strukturelle Einteilung anhand der histologischen Eigenschaften, die bereits mehrfach aktualisiert wurde ². Die primären Gehirntumore werden je nach Zytologie, Mitosen, Atypien, mikrovaskuläre Proliferation und Nekrosen untersucht und in Grad I bis IV eingestuft ². So sind die WHO Grad I Tumore durch eine niedrige Proliferationsrate gekennzeichnet und können durch eine operative Resektion geheilt werden. Die Grad II Tumore haben einen infiltrativen Charakter, eine niedrige Proliferationsrate und können zu einer höheren Malignität fortschreiten. Die Grad III Tumore weisen nukleäre Zellatypien und erhöhte mitotische Aktivität auf, in den meisten Fällen ist eine obligate postoperative Behandlung mit Radio- und/oder Chemotherapie erforderlich. Die Grad IV Tumore haben zahlreiche Mitosen und Nekrosen und sind charakterisiert durch einen malignen Verlauf und Progression der Tumorerkrankung trotz Behandlung ². Jede ZNS-Tumorentität wird gemäß der WHO klassifiziert und der Grad hat einen Einfluss sowohl auf die Therapie als auch auf die Prognose des Patienten ².

Durch die enorme zelluläre Heterogenität des parenchymatösen Hirngewebes und der angrenzenden Strukturen, entsteht eine große Vielfalt an primären ZNS-Tumoren. Aus den Gliazellen, die sich aus den Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten zusammensetzen, entstehen die Gliome. Die Gliome gehören mit 80% zu der häufigsten malignen zerebralen Tumorentität und machen mit 25% die primären ZNS-Tumore aus ¹. Die Gliome haben eine Inzidenz von 6 pro 100.000 Einwohner unter der europäischen und nordamerikanischen Population und sind verantwortlich für eine erhöhte Sterblichkeitsrate ³. Anhand ihres astrozytären und oligodendrogialen Phänotyps und gemäß der WHO Klassifikation werden sie entsprechend in

Grade unterschieden. So umfassen die Gliome die diffuse WHO Grad II und anaplastischen WHO Grad III Astrozytome, die Oligodendrogliome WHO Grad II und anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III sowie das Glioblastoma multiforme (GBM) WHO Grad IV, welches weiter in das primäre (prim. GBM) und das sekundäre Glioblastoma multiforme (sek. GBM) unterteilt wird ⁴. Eine besondere Gruppe stellen die Oligoastrozytome und anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad II-III dar, die sowohl astrozytäre als auch oligodendrogliale Eigenschaften aufweisen. Sie werden aktuell als *no other specified* (NOS) bezeichnet ⁴.

Aus den meningoepithelialen Zellen der Meningen entstehen die Meningeome. Die Meningeome sind mit 54,5% die häufigsten gutartigen intrakraniellen Tumore und haben eine Inzidenz von 9 zu 100.000 Einwohner ¹. Sie werden ebenfalls anhand der WHO Klassifikation in den typischen Grad I, atypischen Grad II und anaplastische Grad III klassifiziert ⁴. Die WHO Graduierung entscheidet über den postoperativen Vorgang mit der stereotaktischen Radiochirurgie oder fraktionierten Bestrahlung als Mittel der Wahl, abhängig vom Ausmaß des Resektats ⁵. Weitere häufige primäre ZNS-Tumore sind die Hypophysentumore mit 16,9%, die gemeinsam mit den Nervenscheidtumoren 25,5% der Hirntumore ausmachen. Diese sind zumeist nicht-maligne Tumore ¹.

Bei den kindlichen primären ZNS-Tumoren sieht die Verteilung der Inzidenz und der histopathologischen Prävalenz anders aus. Unter der kindlichen Population gehört das pilozytische Astrozytom WHO Grad I zu den wichtigsten Vertretern der kindlichen Gliome mit ca. 17% aller pädiatrischen ZNS-Tumore ³. Eine weitere Entität stellen die Medulloblastome dar, die eine embryonale Herkunft aufweisen und sich in der hinteren Schädelgrube manifestieren. Mit ca. 20% der primären Tumore gehören sie zu den häufigsten zerebralen Tumorerkrankungen im Kindesalter, vor allem unter 10 Jahren ⁶. Diese werden gemäß der WHO Klassifikation und deren molekularen Signalwege unterteilt mit der Gruppe der *Wingless subgroup tumors* (Wnt) sowie der *Sonic hedgehog subgroup* (SHH) als die wichtigsten Vertreter, die sich in ihrem Auftreten und klinischen Verlauf unterscheiden ^{4,7}. Zu den wichtigsten kindlichen Tumoren gehören ebenfalls die Ependymome, die ca. 5,2% der pädiatrischen ZNS-Tumore ausmachen, einen neuroektodermalen Ursprung haben und sich sowohl supra- und infratentoriell als auch spinal manifestieren können ^{8,9}. Zu 90% lokalisieren sie sich intrakraniell mit der Mehrheit in der hinteren Schädelgrube und sind die wichtigste Differentialdiagnose der Medulloblastome ¹⁰. Gemäß der WHO Klassifikation werden sie in Grad I bis III unterteilt ⁴.

Eine besondere Gruppe der primären ZNS-Tumore stellen die zerebralen Lymphome dar. Die Mehrheit hat einen aggressiven Verlauf. Sie sind meist Non-Hodgkin B-Zell Lymphome ohne systemische Organmanifestation und machen ca. 4% der primären ZNS Neoplasien unter den immunkompetenten aus, während die HIV/AIDS-assoziierten ZNS Lymphome eine deutlich erhöhte Inzidenzrate aufweisen ^{11,12}. Die Therapie beschränkt sich auf die Biopsie, die postoperative

Chemotherapie mit Methotrexat (MTX), die Bestrahlung sowie die autologe Stammzell-Transplantation ¹³.

2.1.2. Die sekundären ZNS-Tumore

Zu den sekundären ZNS-Tumoren oder zerebralen Metastasen gehören die Tumore, welche sich durch die systemische Verbreitung einer organspezifischen Tumorerkrankung zerebral manifestieren. Die Hirnmetastasen sind eine wichtige Komplikation einer Krebserkrankung und ihre Inzidenz liegt bei ca. 8,3 bis 14,3 pro 100.000 Einwohner ¹⁴. Diese Zahl hat eine steigende Tendenz, die sich durch die Fortschritte in der diagnostischen Bildgebung und Verbesserung der systemischen Therapie erklärt. Das Bronchialkarzinom zeigt die höchste Inzidenzrate mit ca. 20%, hauptsächlich das *non-small-cell lung carcinoma* (NSCLC) oder nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, gefolgt vom Mammakarzinom mit ca. 8%, vor allem mit dem *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2) als positiven und dreifach negativen Rezeptorstatus sowie das Maligne Melanom mit ca. 6,9% ^{15,16}. Die Therapie ist abhängig von mehreren Parametern wie z.B. dem molekularen Tumorstatus, dem *Karnofsky Performance Status* (KPS), der Anzahl der Metastasen und dem Alter ¹⁷. Die Therapie umfasst die Operation, die stereotaktische Radiochirurgie und postoperative Ganzhirn- oder fraktionierte Bestrahlung bis hin zur Optimierung der systemischen Chemotherapie mit *targeted therapy* Agenten und der Immuntherapie. Bezüglich der Therapie von Rezidiven besteht eine limitierte Studienlage ¹⁷.

2.1.3. Die Risikofaktoren

Über Risikofaktoren, welche die Entstehung von ZNS-Tumoren begünstigen, wurde bereits viel geforscht. Viele Parameter spielen eine Rolle für die Identifizierung der Faktoren. Sie sind je nach histologischem Typ unterschiedlich. So werden auf molekulare Ebene die sog. *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) in den unterschiedlichen Stellen der Chromosomen als genetische Variationen für die Entstehung von Gliomen verantwortlich gemacht ¹⁸. Weiterhin begünstigen familiäre syndromale Erkrankungen wie z.B. Neurofibromatose Typ I oder II, die Ausbildung von Meningeomen ¹⁹. Eine Assoziation wurde ebenfalls gestellt zwischen der Estrogen-Exposition und das Wachstum der Meningeome, welche die erhöhte Inzidenz bei Frauen vor allem im gebärfähigem Alter erklären könnte ²⁰. Ein gut etablierter, nicht genetisch bedingter Risikofaktor ist die ionisierende Strahlung, deren karzenogene Eigenschaften die Entstehung von Gliomen und Meningeomen fördern ²¹. Auf der anderen Seite, Menschen mit Allergien und atopischen Erkrankungen wie Dermatitis und Asthma, haben ein reduziertes Risiko an einem Gliom zu erkranken, welche wiederum eine protektive Eigenschaft darstellen ²². Zusammenfassend fördern, mehrere genetische, nicht genetische sowie umweltbedingte Einflussfaktoren die Entstehung der

ZNS-Tumore und zur Festlegung einer präklinischen Diagnostik und eines Risikoprofils muss weitere Forschung durchgeführt werden ²³.

2.2. Die Gliome

Wie bereits beschrieben, sind die Gliome die häufigsten bösartigen Hirntumore. Mit ca. 48,6% der malignen primären Tumore ist das GBM die häufigste histologische Gruppe unter den Gliomen, mit einer Inzidenz von 3,2 pro 100.000 Einwohner und einer deutlichen Prävalenz unter der älteren Population über 60 Jahren, während die mediane Überlebenszeit ohne Behandlung das eine Jahr nicht überschreitet ^{1,24,25}. Die typische klinische Manifestation umfasst epileptische Anfälle, neurologische und neurokognitive Defizite sowie Anzeichen von Hirndrucksymptomatik wie Kopfschmerzen und Übelkeit ²⁶. Die Diagnostik der Wahl ist eine Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) zur Evaluation der Kontrastmittel-Aufnahme und des Ausmaßes des perifokalen Ödems sowie zur Festlegung weiterer Differentiadiagnosen ²⁶. Eine Positron-Emissions-Tomographie (PET) kann berücksichtigt werden, zur Darstellung der metabolischen Aufnahme für die Planung einer Biopsie oder im Rahmen der postoperativen Kontrollen zur Identifikation einer fraglichen Progression ²⁷. Die endgültige Diagnose ist erst nach der Operation oder der Biopsie möglich und dient der postoperativen Einleitung der Therapie sowie auch der Einschätzung der Prognose ²⁶.

2.2.1. Molekulare Marker der Gliome

Die WHO Klassifikation ermöglicht eine Differenzierung der unterschiedlichen Gliome und eine Einteilung anhand deren histopathologischer Eigenschaften sowie die Festlegung einer potenziellen Malignität ². In der neuen WHO Klassifikation 2016 wurde zusätzlich die molekulare Diagnostik mit eingeführt ⁴. Dabei werden spezielle Mutationen oder molekulare Marker zusammen mit der Histologie der Gliome untersucht und dadurch entsteht eine integrierte Diagnostik ⁴. Anhand der WHO Klassifikation 2016 und durch die Empfehlungen der *Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumour Taxonomy-Not Officially WHO* (cIMPACT-NOW), erfolgte die Erneuerung der *European Association of Neuro- Oncology* (EANO) Leitlinien für die Diagnose und Therapie der Gliome ²⁸. Diese ermöglichen eine präzise histomolekulare Unterteilung der Gliome und geben wichtige klinische Informationen für den weiteren therapeutischen Verlauf ²⁸.

2.2.1.1. Die IDH-Mutationen

Einer der zentralen ursächlichen molekularen Marker für die Gliomagenese und Progression der Gliome, ist die Isocitrat-Dehydrogenase 1 und 2 Mutation (IDH1/2) ²⁹. Sequenzierungen zeigten, dass mehr als 70% der Grad II und III Gliome somatische Mutationen in die kodierenden Gene für IDH 1 und 2 aufweisen und ein frühes Ereignis während der Onkogenese sind ²⁹. IDH1/2

werden von zwei homologe Gene kodiert und ihre enzymatische Funktion zeigt sich im Zytosol und in den Mitochondrien der Zelle, entsprechend³⁰. Die Punktmutationen entstehen in den Codon an der Stelle R132 für IDH1, wobei meistens Arginin zu Histidin umgewandelt wird (R132H), und an der Stelle R172 für IDH2²⁹. IDH ist ein Enzym, welches seine normale Funktion im Citrat-Zyklus der Zelle entfaltet und durch oxidative Dekarboxylierung wird Isocitrat zu α -Ketoglutarat (α -KG) umgewandelt³¹. Mutationen in die kodierenden Gene für IDH1/2 führen zu einer verminderten Aktivität des Enzyms, welches wiederum eine Erhöhung von 2-Hydroxyglutarat (2-HG) und *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) verursacht und somit strukturelle Läsionen in den mutierten IDH Gliome bewirken, mit einer Progression als Ergebnis^{32,33}. Die IDH Mutationen verhalten sich in deren Verteilung je nach histologischem Typ anders, mit einer Häufigkeit von ca. 78-88% bei den Astrozytomen Grad II-III und ca. 75-79% bei den Oligodendrogliome Grad II-III³⁴. Bei den klinischen Eigenschaften, zeigen Patienten mit mutierten IDH Gliome ein früheres Alter bei der Manifestation der Erkrankung und haben eine bessere Prognose im Vergleich zum IDH Wildtyp²⁹.

2.2.1.2. Die 1p/19q-Kodeletion, ATRX und TP53-Mutationen

Während der Gliomagenese akkumulieren weitere genetische Veränderungen, die als diagnostische Marker benutzt werden. Die Diagnose der Oligodendrogliome wird durch den Nachweis von IDH Mutationen und den kombinierten, kompletten Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 (1p) und des langen Armes von Chromosom 19 (19q), auch als 1p/19q-Kodeletion beschrieben, bestätigt^{35,36}. Die 1p/19q-Kodeletion ist das Ergebnis einer nicht-balancierten Translokation t(1;19)(q10;p10) und deren Nachweis in den Oligodendrogliomen WHO Grad II-III ist mit einer besseren Prognose assoziiert^{36,37}. Auf der anderen Seite, ist der partielle 1p Verlust zusammen mit 19q Deletion in den Gliomen mit astrozytären Phänotyp zu finden und mit einer schlechteren Prognose verbunden³⁸. Zusätzlich wurden Mutationen im *α -thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked* (ATRX) Gen oder der Verlust der Expression, ein Chromatin-modifizierendes Protein welches im ATRX-Syndrom zum ersten Mal beschrieben wurde³⁹, bereits in einer Reihe von Tumoren identifiziert, u.a. bei Neuroblastomen⁴⁰. Auch ca. 36% der Gliome, zeigen die gleiche ATRX Mutation mit einer steigenden Tendenz von Grad II (ca. 33%), Grad III (ca. 46%) zu sek. GBM (ca.80%), sind meistens mit den IDH mutierten Status assoziiert, während nur 7% der prim. GBM und fast keine Oligodendrogliome, ATRX-Veränderungen aufweisen⁴¹.

Das Tumorsupressorprotein p53 (TP53) hat eine wichtige regulatorische Zellfunktion. Durch seine Aktivierung wirkt es als Transkriptionsfaktor mit Einfluss u.a. auf die DNA Reparatur, die Zell-Apoptose und die Autophagie⁴². Die Mutationen im Gen, welche das p53 kodieren, wurden bereits in mehreren Krebserkrankungen beschrieben wie z.B. das Ovarialkarzinom und das Plattenepithelkarzinom der Lunge. Sie führen dort zu einem Verlust der Funktion (*loss of function*, LOF) des Tumorsupressorproteins^{43,44}. TP53 Mutationen werden in ca. 60% der diffusen und anaplastischen Astrozytomen aufgefunden, sind zu ca. 94% mit IDH1/2 Mutationen assoziiert,

stellen eine Voraussetzung für ATRX-Gen Veränderungen dar und ihre Präsenz ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert^{36,41,45,46}. Diese Charakteristika weisen darauf hin, dass ATRX und TP53 Mutationen ein frühes Ereignis in den IDH-abhängigen Gliomen mit astrozytären Phänotyp sind und zur Progression der Gliomagenese führen⁴¹. Auf der anderen Seite, lösen sog. *gain of function* (GOF) Mutationen im TP53 Gen eine inflammatorische Reaktion über den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) Signalweg aus und beschleunigen das Wachstum in den Glioblastomen, ein Zeichen einer doppelten Funktion der TP53 Mutationen in den Gliomen⁴⁷.

2.2.2. Die primären und sekundären Glioblastome

Betrachtet man die prim. und sek. GBM separat, entsteht eine unterschiedliche Distribution der genetischen Merkmale und deren klinischen Präsentation. Die prim. GBM sind mit 95% häufiger im Vergleich zu sek. GBM mit 5%, haben weniger als 5% IDH1/2 Mutationen, weisen ein schnelleres Wachstum auf, mit einer kürzeren klinischen Dauer von ca. 6,3 Monaten. Währenddessen liegt das durchschnittliche Alter der Diagnose bei 62 Jahren und aufgrund der nicht vorherigen malignen Entartung werden die prim. GBM auch als *de novo* Tumore bezeichnet⁴⁸⁻⁵⁰.

Veränderungen im *epidermal growth factor receptor* (EGFR), eine transmembrane Tyrosinkinase deren onkogene Wirkung bereits in diversen Tumoren bestätigt worden ist, können sich u.a. als aktivierende Mutationen oder Vervielfältigungen manifestieren und zeigen eine unterschiedliche Verteilung zwischen den prim. GBM und deren Rezidiven. Die prim. GBM weisen ca. 52% mehr EGFR Mutationen mit aktivierendem Einfluss und zu ca. 81% eine Vervielfältigungen des Proteins im Vergleich zu den Rezidiven auf, mit ca. 10% und 45% entsprechend, welches als Beweis betrachtet werden kann, dass eine genetische Persistenz in der gleichen histologischen Gruppe unter der Progression existieren kann⁵¹.

Auf der anderen Seite, haben die sek. GBM eine längere klinische Präsentation mit ca. 16,8 Monaten, das durchschnittliche Alter bei der Diagnose liegt bei 45 Jahren. Zugleich weisen mehr als 80% IDH1/2 Mutationen auf, was ein Hinweis auf eine Progression aus niedrig-gradige Gliome mit Akkumulation von diversen molekularen Modifizierungen ist⁴⁸⁻⁵⁰. Der Nachweis von IDH1/2 Mutationen mit entsprechender histologischen Diagnose bestätigt das sek. GBM und wird als positiver prädiktiver Faktor geschätzt⁴⁹. Die oben erwähnten klinischen und molekularen Unterschiede zwischen dem prim. und sek. GBM unterstützen die Theorie, dass es sich um zwei verschiedene Tumorentitäten aus heterogene, neuronale Progenitorzellen handelt⁵⁰.

Aufgrund der Erneuerung der WHO 2016 Klassifikation durch *cIMPACT-NOW*, entsteht eine neue Definition der Glioblastome anhand des IDH-Status. Als Glioblastome werden so die diffusen Astrozytome ohne IDH-Mutation bezeichnet, während die IDH-mutierten Glioblastome als IDH-mutierte Astrozytome, WHO Grad IV definiert werden^{28,52}.

2.2.3. Therapie und Prognose

Die aktuelle Standardtherapie beinhaltet die komplette operative Resektion, gefolgt von Radiotherapie mit 50-60 Gray (Gy) und Temozolomid (TMZ) als zusätzlicher Begleit- und Erhaltungstherapie⁵³. So erfolgt eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 12,1 Monate, mit ausschließlicher Radiotherapie, auf 14,6 Monate bei kombinierter Radio- und Chemotherapie⁵³. TMZ ist ein Alkylanz, welches oral verabreicht wird und seine Funktion entfaltet sich durch die Methylierung der Purine und Pyrimidine der DNA mit der zellulären Apoptose als Ergebnis⁵⁴. Dieser Mechanismus wird durch die Methylierung des O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Promoters verstärkt. Das MGMT ist ein DNA-Reparatur Enzym, welches eine Alkyl-Gruppe von der O⁶-Guanin Position der DNA entfernt. Durch die Methylierung des Promoters wird seine Expression, mit fehlender Reparatur der DNA, reduziert⁵⁵.

Der Nachweis von methylierten MGMT-Promotern in den Gliomen zusammen mit der Standardtherapie von Radio- und Chemotherapie mit TMZ führt zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose von 21,7 Monaten im Vergleich zur Radiotherapie mit 15,3 Monaten⁵⁶. Unter den älteren Patienten über 70 Jahren ist die hypofraktionierte Radiotherapie mit insgesamt 34 Gy oder nur TMZ, abhängig von dem Status der Methylierung des MGMT-Promoters, die Therapie der Wahl⁵⁷. Bei den Oligodendrogliomen WHO Grad II-III erstreckt sich die Therapie von der operativen Resektion, gefolgt von Radiotherapie und Procarbazin, Lemustin und Vincristin (PCV) als Chemotherapie mit einer deutlich besseren Prognose und gutem therapeutischen Ansprechen⁵⁸. Ein ähnliches Therapieschema wird auch bei den Astrozytomen WHO Grad II-III mit PCV als Chemotherapie der Wahl für die IDH1/2 mutierten Grad II und TMZ für die Grad III Gliome eingesetzt, während bis aktuell noch kein festes Therapieprinzip bezüglich der Rezidive etabliert worden ist^{28,59,60}. Mehrere klinische Versuche zur Festlegung einer gezielten Antikörper-Therapie wurden bereits durchgeführt mit Bevacizumab als einem der wichtigsten Vertreter. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper der den *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A), ein exprimiertes Protein welches die Angiogenese und Vaskularisierung der Tumoren reguliert, gezielt angreift und in den Glioblastomen zusammen mit kombinierten Radiochemotherapie mit TMZ zu eine Verlängerung des progressionfreien Überlebens um 4,4 Monate führt, ohne einen positiven, prognostischen Effekt⁶¹⁻⁶³.

2.3. Die Telomerase

Die Gliomagenese ist charakterisiert durch eine enorme Komplexität. Durch die Entdeckung der unterschiedlichen molekularen Marker konnten die Gliome nicht nur in Gruppen klassifiziert werden, sondern es erfolgte deren Einbezug in die klinische Routine mit Einfluss auf die

Therapieentscheidung, das Therapieansprechen aber auch auf die Einschätzung der Prognose und den Verlauf der Progression. So hat die Untersuchung der weiteren genetischen Veränderungen zum Verständnis der Gliom-Entstehung beigetragen. Die Telomerase stellt einen wichtigen molekularen Marker dar, der für die Onkogenese der Gliome verantwortlich ist.

2.3.1 Aufbau und Funktion

Die Telomerase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die aus der Telomerase Reverse Transkriptase (TERT), eine katalytische Untereinheit mit der enzymatischen Funktion, und aus einer RNA Komponente besteht ⁶⁴. Die chromosomalen Enden bestehen aus Telomeren, ein hexamerischer nukleoprotein-Komplex aus repetitiven 5'-TTAGGG-3' Sequenzen, gefolgt von Guanin (G)-reichem Überhang am terminalen 3'-Ende der DNA Kette, bekannt als *telomeric loop* (T-loop) ^{65,66}. Sie erhalten mit dem Telosom oder *Shelterin-Komplex*, eine Einheit aus sechs unterschiedlichen Proteinen die sich an den Telomeren binden, die Integrität der chromosomalen Enden ⁶⁶. Die Telomerase entfaltet ihre Funktion durch das Zusammenfügen der hexamerischen DNA-Sequenzen am Ende der Chromosome. Auf diese Weise wird die Länge der Telomere verlängert ⁶⁷. Dieser Mechanismus ist eingeschränkt in den normalen, somatischen Zellen und durch jede Zellteilung verkürzt sich die Länge der Telomere mit der chromosomalen Instabilität und Apoptose als Ergebnis, während die Zellen mit deutlicher Selbsterneuerung, wie z.B. des hämatopoetischen Systems und die Stammzellen, durch eine erhöhte Telomerase-Aktivität charakterisiert sind ^{68,69}. Das Gleiche gilt für die Tumorzellen, die durch die gesteigerte enzymatische Aktivierung zur unkontrollierten Erhaltung der Telomere, Immortalisierung der Zelle und Förderung der Onkogenese beitragen ⁷⁰.

2.3.2 Telomerase Reverse Transkriptase in den Gliomen

Mehr als 90% der Krebserkrankungen zeigen eine gesteigerte Aktivität der Telomerase, die durch die unterschiedlichen Regulationsmechanismen von TERT beeinflusst wird ^{70,71}. Einen besonderen Stellenwert an der direkten Verbindung zwischen Telomerase und TERT-Regulation, nehmen die genetische Veränderungen in den Promoter von TERT (pTERT) ein ⁷². Studien zeigten, dass ca. 70% der malignen Melanome zwei somatische Punktmutationen im pTERT aufweisen, die als C228T und C250T bezeichnet werden. Diese sind entsprechend an der Stelle 1,295,228 und 1,295,250 auf dem Chromosom 5 lokalisiert, wobei Cytosin (C) zu Thymin (T) umgewandelt wird. Sie befinden sich -124 und -146 Basenpaaren (Bp) von dem TERT ATG-Startcodon entfernt ^{73,74}. Auch die Gliome weisen pTERT Mutationen auf, mit einer unterschiedlichen Verteilung unter den histologischen Gruppen. Die meisten prim. GBM zeigen mit ca. 83% eine erhöhte Anzahl an pTERT Mutationen mit einer unterschiedlichen Distribution zwischen den C228T und C250T, 73% und 27% entsprechend, während nur 28% der sek. GBM Mutationen im pTERT beinhalten ^{75,76}. Das

bestätigt auch die niedrige Anzahl der prim. GBM, die IDH Mutationen aufweisen im Vergleich zu den niedrig (Grad II)- und hochgradigen Gliomen (Grad III und sek. GBM), die ein umgekehrtes Muster zwischen TERT und IDH Veränderungen haben ⁷⁶.

Gemäß der erneuerten WHO Klassifikation, werden die pTERT-Mutationen in der integrierten Diagnostik berücksichtigt. Zusammen mit dem IDH-Wildtyp definieren sie die Diagnose des Glioblastoms ^{28,52}. In den Gliomen mit astrozytären Phänotyp erscheinen ca. 44% in den Grad II und ca. 60% in den Grad III Mutationen im Promoter, während nur 5% gleichzeitig IDH und pTERT Mutationen aufweisen ^{77,78}. Darüber hinaus sind genetische Veränderungen im EGFR-Gen, vor allem Vervielfältigungen des Proteins, charakteristisch für die prim. GBM und meistens in den pTERT mutierten GBM zu ca. 89% aufzufinden, während sehr wenige TP53 Mutationen identifiziert werden ^{76,79}. Zusätzlich sind Veränderungen im ATRX direkt assoziiert mit der Progression der Gliomagenese und werden meistens in den IDH mutierten Astrozytomen Grad II, Grad III und sek. GBM präsentiert ⁴¹. Genauer betrachtet, weisen nur 1,7% der Oligodendrogliome, 2% der IDH-mutierten und Wildtyp Astrozytome, 6% der IDH mutierten und fast keine IDH-Wildtyp GBM gleichzeitige pTERT Mutationen und ATRX-Veränderungen auf und schließen sich somit gegenseitig aus ^{77,80}. Auf der anderen Seite, weisen Oligodendrogliome WHO Grad II und III, die hauptsächlich durch IDH1/2 Mutationen und den Nachweis von 1p/19q-Kodeletionen charakterisiert sind ³⁵, zu ca. 74% pTERT Mutationen auf, mit einer ähnlichen Verteilung der C228T und C250T im Vergleich zu den prim. GBM ^{75,81}. So entsteht eine unterschiedliche Prävalenz der pTERT Mutationen in Kombination mit den bisherigen wichtigen molekularen Markern der Gliomagenese.

Das Schilddrüsenkarzinom beinhaltet ca. 10% pTERT Mutationen und die Analyse auf der Transkriptionsebene zeigte eine erhöhte Expression der *messenger* RNA (mRNA) von TERT ⁸². Auch in den Gliomen ist der Nachweis der pTERT Mutationen assoziiert mit einer gesteigerten mRNA Expression von TERT mit Einfluss auf die Telomerase-Aktivität ⁸³. Somit wurde eine direkte Assoziation zwischen dem mutierten pTERT Status und die mRNA TERT Expression bewiesen, die zu einer vermehrten Telomerase-Funktion führt und somit zu der Verlängerung der Telomere in den Tumorzellen ^{79,83}.

Bei den klinischen Eigenschaften haben die Patienten mit pTERT Mutationen im prim. GBM, mit konsekutiv erhöhter mRNA TERT Expression, eine schlechtere Prognose mit 13,8 Monaten im Vergleich zu den pTERT Wildtyp mit 29,1 Monaten und diese Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose älter ⁷⁹. Anders sieht es aus bei den niedrig-gradigen Gliomen WHO Grad II mit sowohl pTERT und IDH Mutationen als auch 1p/19q-Kodeletionen, die mit einer verlängerten Überlebensrate von mehr als 16 Jahren assoziiert sind ⁷⁹.

Die oben erwähnten Merkmale, betonen die Besonderheit der TERT Veränderungen sowohl auf der genetischen als auch auf der Transkriptionsebene mit unterschiedlichem klinischen Einfluss und sind somit für das Verständnis der Gliomagenese von großer Bedeutung.

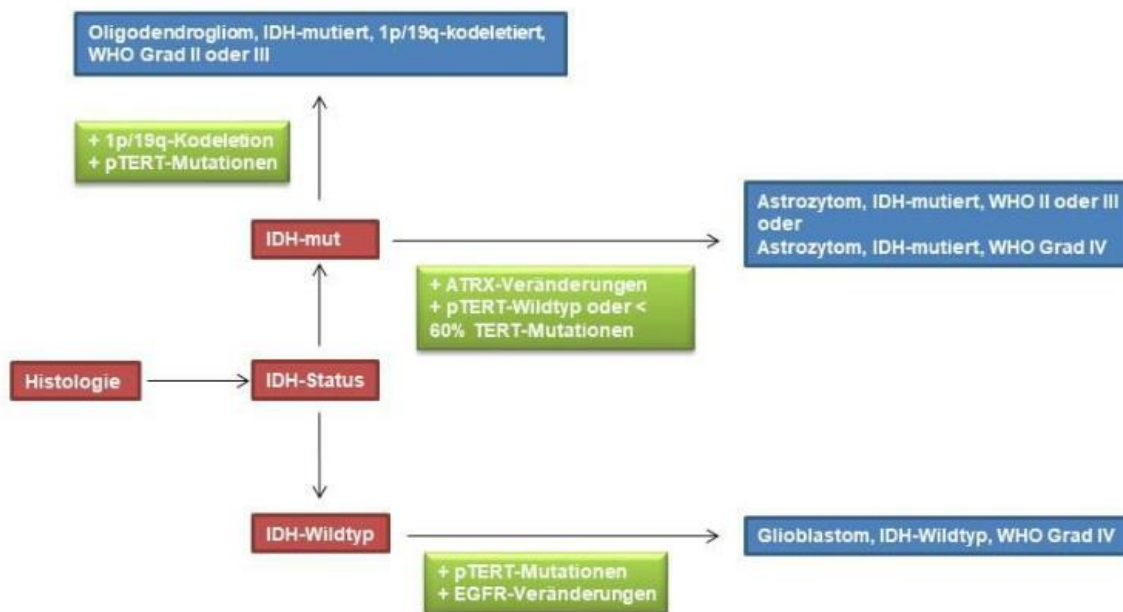


Abbildung 1: Integrierte Diagnostik in den Gliomen (modifiziert nach ^{4,28,77,78})

Abbildung 1 fasst den Algorithmus zusammen für die integrierte Diagnostik der Gliome. Die Gliome werden anhand deren histopathologischer Eigenschaften untersucht. Zusätzlich, erfolgt die Untersuchung der pTERT Mutationen und der wichtigen molekularen Marker (IDH, ATRX, EGFR, 1p/19q-Kodeletion, pTERT-Mutationen) um eine endgültige Diagnose und Klassifizierung in den WHO Graden zu ermöglichen ^{4,28}.

2.4. GA-Bindungs Proteine (GABP)

Der Nachweis von TERT und deren Rolle in der Entstehung der Gliome führte zu einer detaillierten Analyse der beteiligten molekularen Mechanismen die ursächlich für die Progression sind. So wurde bewiesen, dass die zwei Punktmutationen im Promoter von TERT eine genaue purinreiche Sequenz aus 5'-GGAA- 3' erzeugen, die von den Transkriptionsfaktoren der *E-twenty-six* (Ets) Familie erkannt werden ^{73,74}. Die Ets-Familie ist eine heterogene Gruppe aus 27 Transkriptionsfaktoren, die sich in normalen Zellfunktionen u.a. den Zellzyklus, Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese beteiligen ⁸⁴. Erhöhte Aktivität der Ets Faktoren ist ebenfalls mit der Onkogenese assoziiert. Sie sind in Prozessen wie Tumorprogression und Metastasierung involviert, während viele Krebserkrankungen wie Prostata- und Mammakarzinom, eine Reihe von diesen Faktoren exprimieren ⁸⁴⁻⁸⁶. Einer der wichtigsten und einzigartigsten Faktoren unter der Ets Familie ist das GA-Bindungsprotein (GABP). GABP als Transkriptionsfaktor hat eine besondere

Rolle im Zellzyklus. Es reguliert eine Reihe von Genen und interagiert in einer Vielzahl von molekularen Signalkaskaden mit weiteren Proteinen ⁸⁷.

2.4.1. Aufbau und Funktion der GABPA/B

Die Analyse des strukturellen Aufbaus von GABP zeigt einen Proteinkomplex aus zwei verschiedene Proteinen, das GABPA und GABPB. Es ist der einzige Faktor der Ets Familie, der als Heterodimer oder -tetramer funktionieren kann ⁸⁸. GABPA wird von das entsprechende Gen kodiert und beinhaltet die *DNA binding domain* (DBD) am Carboxy-Terminus (C-Terminus), welche für die Bindung an der 5' -GGAA- 3' Ets spezifische Sequenz der DNA zuständig ist ^{87,88}. Das GABPB ist aufgrund der *transcriptional activation domain* (TAD) für die eigentlichen transkriptionalen Aktivität des Proteins verantwortlich ^{87,89}. Als einziges der GABP Untereinheiten, wird GABPB aus zwei homologen Genen kodiert ⁹⁰. Das GABPB1 Gen kodiert das GABPB1, während durch das Spleißen der mRNA zwei Isoformen entstehen, das GABPB1 - longer (GABPB1 - L) und das GABPB1 - shorter (GABPB1 - S) ⁹¹. GABPB1 - L hat einen verlängerten C-Terminus mit 50 Aminosäuren und GABPB1 - S einen verkürzten mit 15 Aminosäuren ⁹¹. Das GABPB2 Gen kodiert das GABPB2 und ist zu 87% indentisch mit GABPB1. Bis aktuell sind keine weitere Isoformen bekannt ⁹¹. Die GABPB1, - B1-L und -B2 können über einen *leucine-zipper-like domain* (LZ) am C-Terminus untereinander interagieren und Homodimere bilden, während GABPB1 – S, wegen dem Verlust von LZ am C-Terminus die Möglichkeit verliert, sich mit den anderen GABPB Proteine zu dimerisieren ⁹⁰. Der C-Terminus von GABPA interagiert mit dem *ankyrin repeat domain* (AR) am Amino-Terminus (N-Terminus) der GABPB und rekrutiert als einziger der Ets Familie die GABPB Proteine. Diese, bilden somit ein Dimer oder Tetramer aus GABPA und GABPB1, -B1-L, -B1-S oder -B2, die sich dann auf diese Weise an der Ets-Sequenz der DNA binden und die Transkription der gezielten Gene aktivieren ^{88,92}.

2.4.2. GABPA/B in den Gliomen

In den Gliomen wurde bewiesen, dass das GABP als einziger der Ets Faktoren an die C228T und C250T Mutationen bindet, den pTERT aktiviert und die transkriptionale Expression fördert ⁹³. Die Forschungsgruppe von Mancini et al. haben zuerst zeigen können, dass das Tetramer-bildende GABPB1 - L speziell an den mutierten pTERT bindet und die TERT mRNA Expression steigern kann ⁹⁴. Die Unterbrechung der GABPB1 - L mittels *small interfering RNA* (siRNA) führte ebenfalls zu einer verminderten Bindung an den pTERT und zum zellulären Tod in den GBM-Zelllinien ⁹⁴. So wurde der besondere Zusammenhang zwischen den GABPA/B-Isoformen in den pTERT mutierten GBM gestellt und dessen wichtige Rolle in der Onkogenese der Gliome vorgestellt.

2.5. Ziele der Arbeit

Es wurde soweit das Verständnis der molekularen Marker in der Onkogenese der Gliome erläutert. Ebenfalls, erfolgte die Vorstellung der TERT Veränderungen als ein wichtiger Marker in der Gliom-Forschung. Darüber hinaus, wurde die Assoziation der Mutationen von TERT mit GABP als ein wichtiger Transkriptionsfaktor betont und dessen Steuerung der TERT-Expression in den Gliomen beschrieben.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der mRNA Expression und Korrelation von den folgenden Proteinen:

- TERT
- GABPA/B-Isoformen

Diese wurden in Grad II, Grad III Gliome sowie in den primären und sekundären Glioblastomen mit und ohne Chemotherapie, untersucht. Ziel war, die Analyse der einzelnen Proteine in den Gliomen im Laufe der Progression und zugleich, die Eruierung eines Zusammenhangs zwischen diesen Markern, um deren Einfluss auf die Gliomagenese zu verstehen.

3. PUBLIKATION (MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE)

TERT and its binding protein: overexpression of GABPA/B in high grade gliomas

Efthymios Papazacharias¹, Saskia Kuhl¹, Gabriele Röhn¹, Lukas Görtz¹, Roland Goldbrunner¹ and Marco Timmer¹

¹Laboratory of Neurooncology and Experimental Neurosurgery, Department of General Neurosurgery, Center for Neurosurgery, Faculty of Medicine and University Hospital, University of Cologne, Cologne, Germany

Correspondence to: Marco Timmer, email: marco.timmer@uk-koeln.de

Keywords: TERT; GABPA; GABPB; glioma; astrocytoma

Received: November 13, 2020

Accepted: March 22, 2021

Published: June 22, 2021

Copyright: © 2021 Papazacharias et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/) (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Enhanced expression of TERT in gliomas is a result of two hotspot mutations, C228T and C250T, at the promoter region. GA-binding proteins selectively bind at these positions, respectively, causing an activation of the promoter and overexpression of TERT. GABP is a multimeric protein consisting of GABPA and GABPB with its isoforms GABPB1, GABPB1-L, GABPB1-S, GABPB2.

In this study, we investigated the mRNA expression and association between TERT and GABPA/B isoforms in tumor samples of different glioma grades. The expression was determined by quantitative real-time PCR and the results were statistically analyzed.

We present that TERT is mainly expressed in primary glioblastomas. All GA-binding proteins progress through the glioma grades and have the highest expression levels in secondary glioblastomas. In secondary glioblastomas after chemotherapy, GABPB1 and GABPB1-L are expressed on a lower level than without treatment. In high grades, TERT and GABPA, GABPB1, GABPB1-L, GABPB1-S are upregulated compared to low grades. Between primary and secondary glioblastomas with and without chemotherapy, TERT is elevated in the former while GABPB1 is increased in the secondary glioblastomas. GABPA and GABPB1, GABPB1-L and GABPB1-S positive correlate in primary glioblastomas.

The present study confirms the upregulation of TERT in primary glioblastomas while all GABP proteins rise with the malignancy of the gliomas. Further investigations must be made to elucidate the relation between TERT and all GABP proteins as it may play a key role in the gliomagenesis.

INTRODUCTION

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system (CNS). They comprise the diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas World Health Organization (WHO) grade II, the anaplastic astrocytomas and oligodendrogliomas WHO grade III and also the most frequent one, the glioblastoma multiforme (GBM) WHO grade IV [1]. Primary glioblastomas (prim. GBM) and secondary glioblastomas (sec. GBM) differ from each other in the frequency (95% vs. 5%), mean age of diagnosis (62 years vs. 45 years),

the time of clinical duration (6.3 vs. 16.8 months) and the median overall survival with treatment (11.3 vs. 27.1 months) suggesting that those two tumor entities are evolving from diverse precursor, neural cells [2–5]. The different approaches of treatment according to grading and clinical presentation of gliomas extent from gross total resection to radiotherapy of 50–60 Gy in concomitance and maintenance with temozolomide as chemotherapy [6]. While elderly patients over 70 years can profit from hypofractionated radiotherapy alone [7], no specific treatment has been presented for recurrent and secondary GBMs so far [8]. Many efforts have been made

to standardize the treatment of each glioma but still with disappointing outcome of the prognosis.

The need of further understanding and classifying the gliomas led to an emerging of molecular markers. One marker that has been introduced is telomerase. Telomerase reverse transcriptase (TERT) as the catalytic subunit which together with an RNA template prolong the telomeres adding hexameric 5' -TTAGGG- 3' repeats on the end of the chromosomes [9]. This function is limited in normal somatic cells and after each divisions the telomeres are being shortened whereas cancer cells have an increased telomerase activity contributing to the unrestricted elongation of the telomeres and immortalization of the cell [10]. One of the mechanisms affecting the upregulation of telomerase are the mutational alterations of the promoter region of TERT (pTERT) and its transcriptional regulations [11]. Two most common mutations in the pTERT are the C228T (1,295,228, C>T) and C250T (1,295,250, C>T) which are located at -124 base pairs (bp) and -146 bp upstream of the TERT ATG start codon, respectively [12]. These two point mutations occur frequently in tumor cells that do not need a continual regeneration such as melanomas and gliomas [13]. Among the gliomas, 83% of the primary glioblastomas harbor those hotspot mutations with a different distribution between C228T and C250T (73% vs. 27%) while in lower glioma grades they seem to be rare [13, 14]. In this way, the mutant promoter status correlates with the elevated mRNA levels of TERT and therefore with the increased telomerase activation [15]. Both non-coding mutations at the promoter generate a purine-rich GGAAG binding site for the transcription factor GA-binding protein (GABP) of the E-twenty-six (Ets) family [16]. It has been shown, that the GABP is recruited to these mutations, thus binding and activating the pTERT in glioblastomas [17]. GABP reveals its full function as a heterodimeric- or tetrameric complex consisting of the GABPA, as the DNA binding subunit, and the GABPB with the actual transcription activity [18, 19]. GABPB subunit is encoded by two distinct genes: GABPB1 gene encodes the GABPB1 with its isoforms GABPB1-longer (GABPB1-L) and GABPB1-shorter (GABPB1-S) as the products of a different mRNA splicing whereas GABPB2 is encoded by the GABPB2 gene as a single isoform [20]. While all of them can dimerize with GABPA only GABPB1, GABPB1L and GABPB2 can homodimerize and create a tetramer of two GABPA/B heterodimers due to an leucine-zipper-like domain (LZD) at the C-terminus end [21]. Recent studies showed that the GABP tetramer forming isoforms, especially GABPB1-L, activate the mutant TERT promoter and a disruption of B1L generates telomeric loss in glioblastoma cell lines introducing the importance of GABPA/B isoforms in the mutated TERT promoter dependent gliomas [22].

Consequently, in this study we investigated the mRNA expression level of TERT and all GABPA/B isoforms and their correlation and interplay in the grade II,

grade III gliomas as well as in the primary and secondary glioblastomas to understand their role in the gliomagenesis.

RESULTS

We collected 70 tumor samples and analyzed their expression levels in control, grade II gliomas, grade III, secondary glioblastoma (sec. GBM), secondary glioblastoma with chemotherapy (sec. GBM + CTx), primary glioblastoma (prim. GBM) and primary glioblastoma with chemotherapy (prim. GBM + CTx). Each group consisted of 10 tumor samples. Figure 1 summarizes the expression of each protein in the different glioma grades.

TERT in gliomas

Regarding the quantitative real-time PCR results and statistical analysis of our glioma cohorts we show that TERT mRNA is mostly expressed in primary GBM (mean = 0.097, 95% CI = 0.02–0.16) and in primary GBM which had been treated with chemotherapy (mean = 0.139, 95% CI = 0.02–0.25) compared to the control group (mean = 0.02, 95% CI = 0.01–0.03) with $p = 0.007$, respectively, without any difference between the two prim. GBM groups. Low grade gliomas, $p = 0.003$, sec. GBM with, $p = 0.03$, and without chemotherapy, $p = 0.01$, exhibit the lowest TERT levels compared to the normal brain tissue. Grade III gliomas express upregulation of TERT when compared to grade II, $p = 0.009$, without any significance to the peritumoral tissue. When primary and secondary glioblastomas each with different therapy status were compared, the results show significant elevation in both prim. GBM groups (prim. GBM vs. sec. GBM and sec. GBM + CTx: $p < 0.0001$ and $p = 0.0002$, respectively, prim. GBM + CTx vs. sec. GBM and sec. GBM + CTx: $p < 0.0001$ and $p = 0.002$, respectively) (Figure 1A).

GABPA, GABPB1, GABPB1-L, GABPB1-S and GABPB2 in gliomas

We further analyzed all GABP components expression in the different glioma grades. The results indicate that GABPA, -B1, -B1-L and -B1-S have the trend to progress with the malignancy of the gliomas. Specifically, GABPA is being gradually expressed from control (mean = 0.057, 95% CI = 0.03–0.07) to grade II (mean = 0.116, 95% CI = 0.1–0.3, $p = 0.0002$), to grade III (mean = 0.184, 95% CI = 0.15–0.21, $p = 0.0004$) which is elevated compared to the control with $p < 0.0001$. GABPB1 seems to follow the same pattern of expression with grade II (mean = 0.409, 95% CI = 0.07–0.74) and III (mean = 0.456, 95% CI = 0.35–0.55) having high levels as to the peritumoral tissue (mean = 0.128, 95% CI = 0.09–0.16), $p = 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively, but with no difference between them. GABPB1-L and -B1-

S rise from grade II to grade III, both with $p < 0.0001$, and in grade III they are overexpressed compared to the non-tumorous tissue with $p < 0.0001$ and $p = 0.004$. GABPB1, -B1L and -B1S expression is progressing from grade III to sec. GBM with $p = 0.016$, $p = 0.0009$ and $p = 0.002$. All the GABPA/B isoforms express the highest levels in the secondary glioblastomas (GABPA: mean = 0.221, 95% CI = 0.09–0.35, $p < 0.0001$; GABPB1: mean = 0.66, 95% CI = 0.52–0.8, $p < 0.0001$; GABPB1-L: mean = 0.705, 95% CI = 0.48–0.92, $p < 0.0001$ and GABPB1-S: mean = 0.836, 95% CI = 0.46–1.2, $p = 0.0004$). In sec. GBM with chemotherapy treatment GABPB1 and -B1-L levels are downregulated (GABPB1: mean = 0.308, 95% CI = 0.16–0.45, $p = 0.001$ and -B1-L: mean = 0.464, 95% CI = 0.1–0.81, $p = 0.035$) as to sec. GBM and overexpressed compared to the control with $p = 0.01$ and $p = 0.035$, respectively. GABPA and -B1-S are also overexpressed when sec. GBM with chemotherapy and peritumoral tissue are compared, with $p = 0.001$ and $p = 0.0006$, but without any significant difference among the two sec. GBM groups. In primary glioblastomas with and without chemotherapy GABPA, -B1, -B1-L and -B1-S are overexpressed as to the free of tumor cells group (prim.

GBM and prim. GBM + CTx in GABPA: $p = 0.0002$ and $p = 0.0006$; GABPB1: $p = 0.001$ and $p = 0.035$; GABPB1-L: $p = 0.001$ and $p = 0.043$; GABPB1-S: $p = 0.027$ and $p = 0.001$). GABPB2 did not show any statistically significant results in the gliomas. Figure 1B–F shows the expression levels of GABPA/B isoforms and their relation between the glioma grades.

Subgrouping the different glioma groups in low and high grade gliomas (LGG and HGGs) consisting of grade III and secondary glioblastomas without chemotherapy, not only TERT but also GABPA, -B1, -B1-L and -B1-S were overexpressed in the HGGs (TERT: mean = 0.023, 95% CI = 0.01–0.03, $p = 0.023$, GABPA: mean = 0.196, 95% CI = 0.15–0.23, $p = 0.0005$, GABPB1: mean = 0.524, 95% CI = 0.44–0.6, $p = 0.016$, GABPB1-L: mean = 0.448, 95% CI = 0.34–0.55, $p < 0.0001$ and GABPB1-S: mean = 0.538, 95% CI = 0.37–0.69, $p < 0.0001$) (Figure 2).

Between the primary and secondary glioblastomas with and without chemotherapy treatment, TERT is significantly elevated in the prim. GBMs (mean = 0.118, 95% CI = 0.05–0.17) whereas GABPB1 is overexpressed in the sec. GBMs of the same therapeutical approach (mean = 0.484, 95% CI = 0.36–0.6) with $p < 0.0001$ and p

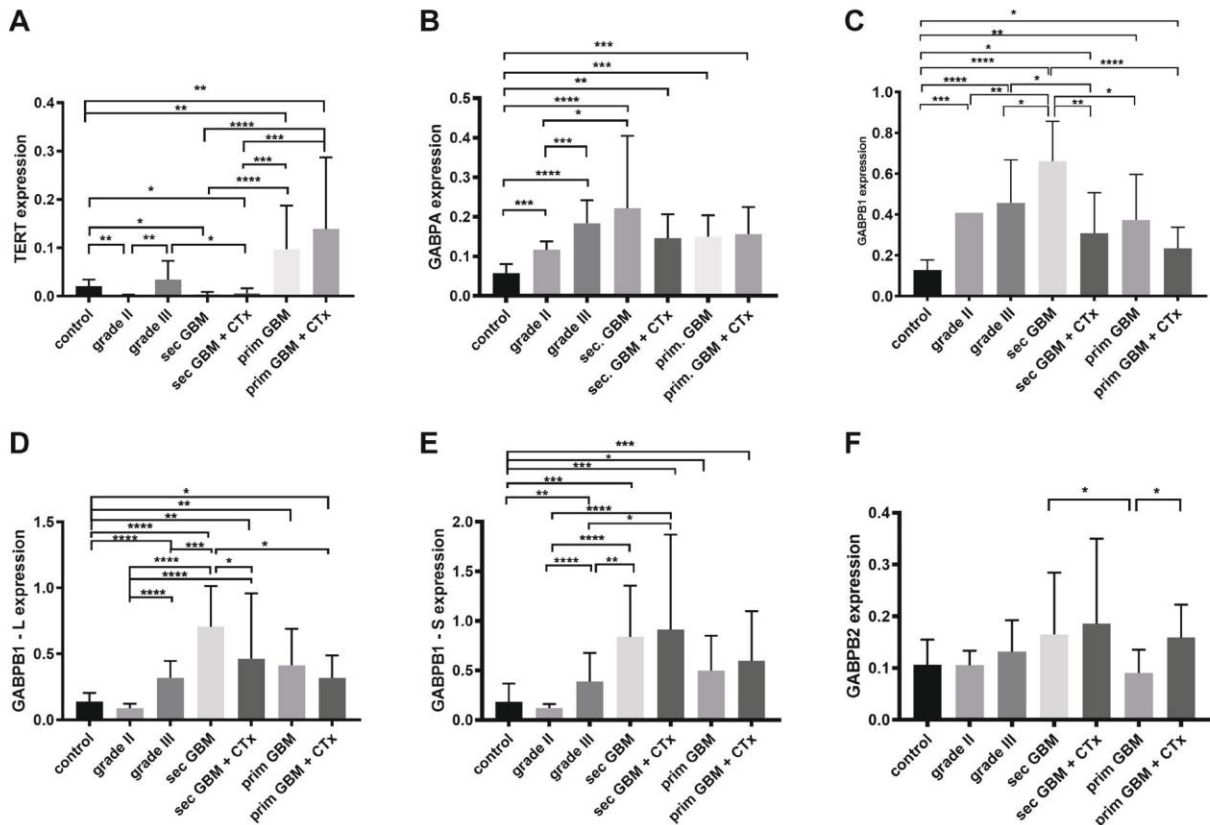


Figure 1: mRNA expression levels of (A) TERT, (B) GABPA, (C) GABPB1, (D) GABPB1-L, (E) GABPB1-S and (F) GABPB2 by quantitative real-time PCR in controls, glioma grade II, grade III, secondary glioblastomas (sec. GBM), recurrent secondary glioblastomas treated with chemotherapy (sec. GBM + CTx), primary glioblastoma (prim. GBM) and primary glioblastoma treated with chemotherapy (prim. GBM + CTx). Columns display the mean values [arbitrary units] and error bars the standard deviations. Statistical significance is marked with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

= 0.043, respectively. The other transcription factors did not show any significant results when these two groups were compared. GABPB2 mRNA status in both subgroups did not show any significant results (Figure 3).

Correlation of TERT and GABPA/B isoforms in gliomas

Analyzing the association between TERT and each GABP component, we found that GABPB1-S did not show a correlation with TERT in primary glioblastomas with and without chemotherapy treatment ($r = 0.18$, 95% CI = $-0.3-0.6$; $p = 0.48$). In grade III gliomas, GABPB1 negatively correlates with TERT significantly ($r = -0.65$, 95% CI = $-0.85-0.27$; $p = 0.003$). We further examined the relation between GABPA and every GABPB isoform. We found positive correlated relationship between GABPA and GABPB1 ($r = 0.6$, 95% CI = $0.06-0.91$; $p = 0.035$), GABPB1-L ($r = 0.8$, 95% CI = $0.56-0.97$; $p = 0.0008$) and GABPB1-S ($r = 0.6$, 95% CI = $0.02-0.9$; $p = 0.045$) in primary glioblastomas (Figure 4).

DISCUSSION

Cancer cells can replicate continuously overcoming normal cell death. One of the mechanisms contributing in immortalization and limitless progression is the

maintenance of the telomere endings of the chromosomes. Most of the malignant cells achieve it through upregulation of telomerase and fewer by an alternative lengthening of telomeres (ALT) [25]. The expression of TERT can be regulated by many molecular mechanisms such as transacting factors, epigenetic modifications and genetic promoter alterations which affect the activation of telomerase [26]. In this study, we presented that TERT mRNA expression levels are the highest in the primary glioblastomas compared to normal brain tissue. Similar data, regarding TERT gene expression on mRNA in prim. GBM have been previously described highlighting the positive association between expressional status and telomerase activity and suggesting that the promoter mutations are the major regulators of TERT expression [15, 27–29]. On the other hand, a common single nucleotide polymorphism, rs2853669 A>C, located at -246 bp upstream of the ATG start codon within a preexisting Ets2 binding site of the promoter which can be found in numerous GBMs, seems to cause a two-fold reduction of TERT transcription by disrupting the binding position [31, 32]. Both regulatory pathways have an impact on survival status where promoter mutations reduce overall survival compared to wild type (median 11–12 vs. 20 months) while in co-existence with the C-variant of rs2853669, the survival is shortened to 8–12 months [30]. In addition, the recurrent prim. GBMs of our cohort

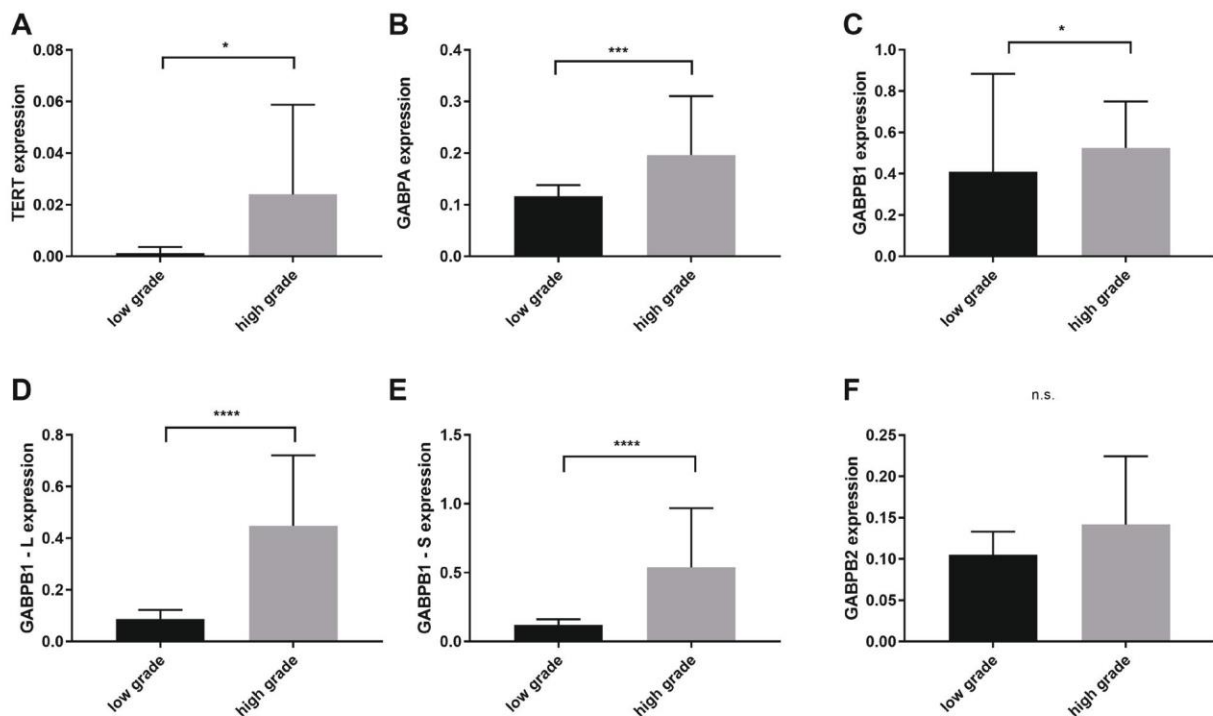


Figure 2: Comparison of TERT, GAPBA, GAPB1, GABPB1-L, GABPB1-S and GABPB2 mRNA expression levels between low grade (WHO II) and high grade gliomas (WHO III and secondary glioblastomas). (A) Overexpression of TERT in high grade gliomas. (B–E) Increased levels of GABPA, GAPB1, GABPB1-L, GABPB1-S in high grades. (F) GABPB2 shows no significant difference. Columns display the mean values and error bars the standard deviation. Statistical significance is marked with * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$, n.s.: no significance.

which have undergone chemotherapy, in most cases temozolomide, showed also elevated TERT levels. This data could provide proof of persisting TERT and other genomic alterations from primary to recurrent GBM as well as unstoppable cellular replication through telomere maintenance [10, 33]. Moreover, the transcription of TERT in a cohort of low grade gliomas and sec. GBM showed significant downregulation whereas grade III gliomas did not present any difference compared to the control. This could be explained due to the fewer amount of grade II (44%), III gliomas (60%) and sec. GBMs (28%) harboring TERT promoter mutations and therefore decreased transcriptional activation [14, 34, 35].

As we described before, the two somatic mutations in the promoter region of TERT create a *de novo* binding motif for GABP [16]. Analysis of the GABP structure reveals a multimeric complex consisting of GABPA and GABPB, two different proteins with different function, but both necessary components to create a functional, unique among the Ets family, transcription factor [18]. GABP as a tetrameric protein has been found to regulate lineage-restricted genes well defined in myeloid cells [36], to participate in cell cycle control while both molecule components can be found widely expressed in liver, muscle and brain cells [37]. The proof, that GABP

is recruited to the hotspot mutations of the promoter, thus reactivating and inducing TERT expression in glioblastoma cell lines, gave a significant role to GABP as a transcription regulator in a TERT dependent manner and provides evidence of specific cancer interaction in the promoter core which may lead to limitless replication [17]. Many molecular alterations have been found to occur during gliomagenesis and glioma progression. Isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH1/2) mutations occur at 70% of grade II and III gliomas as an early event with better prognostic survival [3]. Secondary GBMs seem to have more than 80% of IDH1 mutations indicating the progression from diffuse gliomas and primary GBMs harbor fewer than 5% of IDH1 missense mutations and are identified as *de novo* tumors [5]. TP53 mutations in 94% and loss of α -thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked (ATRX) in 33% of IDH mutant astrocytomas grade II/III and 1p/19q codeletions with IDH mutations classify the diffuse and anaplastic oligodendrogliomas [38–40]. We are the first to present an upregulation of all GABP components in the different glioma grades and GABPA, -B1, -B1-L, -B1-S are gradually expressed during malignancy progression from lower to higher grade while the most expression is observed in the sec. GBMs. This data may suggest that the different GABP proteins

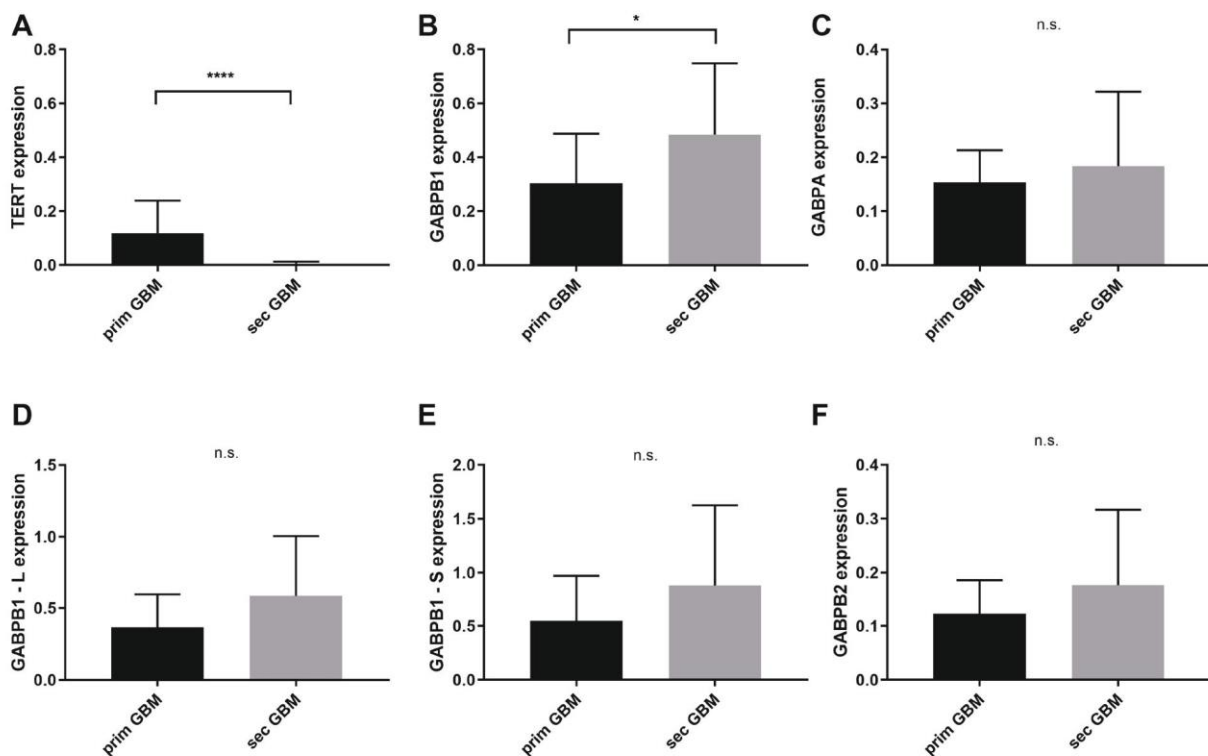


Figure 3: TERT and GABPA/B isoforms mRNA expressional status between primary and secondary glioblastomas with and without chemotherapy. (A) TERT is overexpressed in primary glioblastomas with $p < 0.0001$. (B) GABPB1 is highly expressed in secondary glioblastomas, $p = 0.043$. (C–F) No significant difference in GABPA, GABPB1–L, GABPB1–S and GABPB2. Columns display the mean values and error bars the standard deviation. Statistical significance is marked with * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$, n.s.: no significance.

could be new glioma specific markers of carcinogenesis. GABPB isoforms can heterodimerize with GABPA and function as dimers while all component interact with each other and can be modulated by different proteins which could affect their expression [36]. This can be confirmed also by our studies where the expression of GABPA and GABPB isoforms positive correlates in the prim. GBMs. Furthermore, GABPA/B1, B1-L, B1-S proteins in the primary GBMs of our cohort exhibit a significant upregulation compared to the normal brain tissue which

can confirm at some point the finding of Mancini et al. He proved, that the B1L isoform is the main regulator of TERT expression in promoter mutated glioblastomas and there is a positive association between TERT and B1L mRNA expression, unlike our correlation results [22]. At this point it should be mentioned, that we did not investigate the samples for the mutational status of TERT promoter. Also, another important finding of Mancini and his group was that siRNA inhibition of B1L leads to reduction of TERT expression, thus inducing telomeric

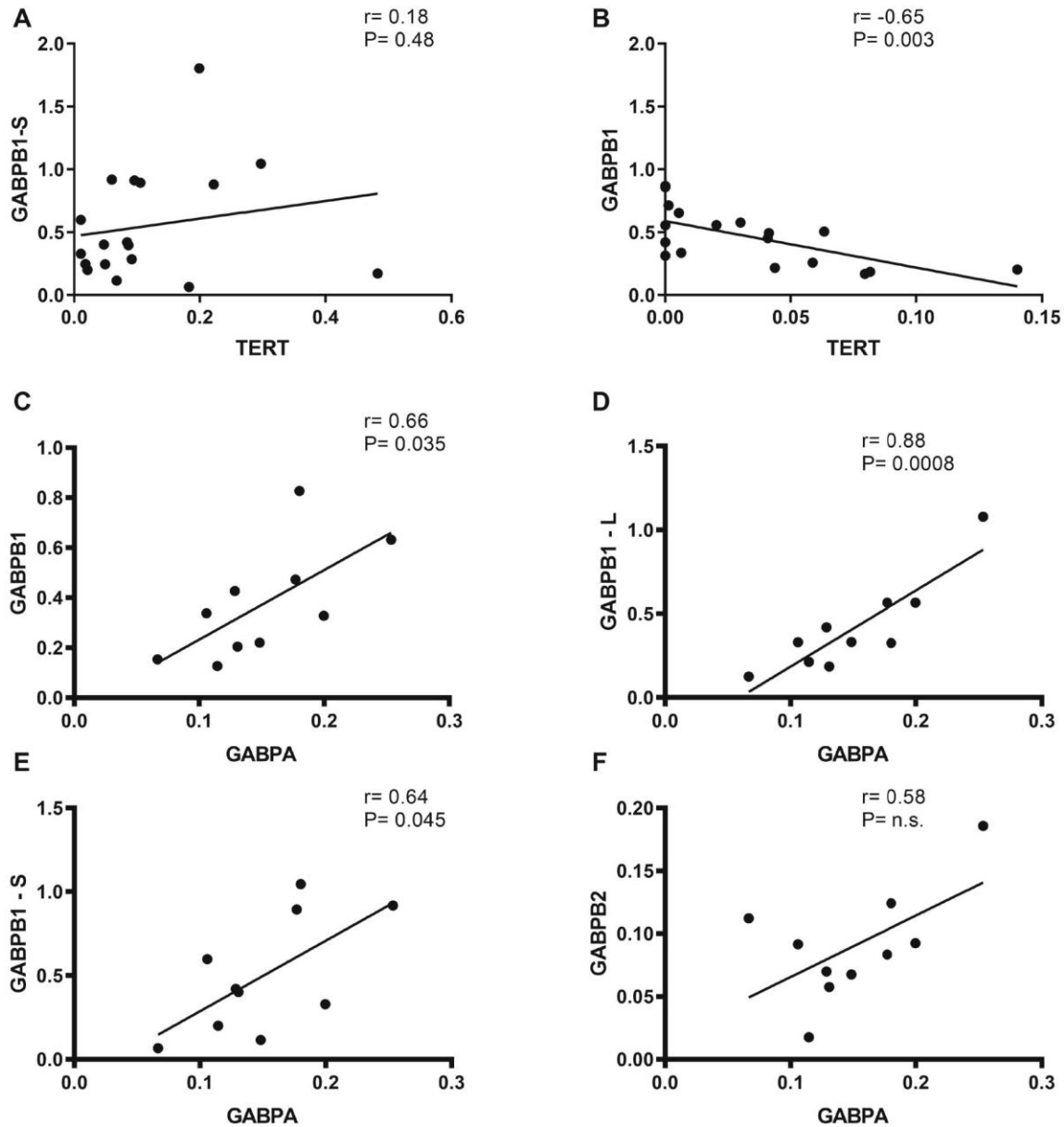


Figure 4: Correlation of TERT vs. GABPB1/-S and GABPB1, GABPB1-L, GABPB1-S and GABPB2 vs. GABPA mRNA expression in gliomas. Black line indicates trend-line and Pearson's rank order correlation was used to generate Pearson rho and *p*-values for each correlation. (A) No correlation between TERT and moreover, in primary glioblastomas ($r = 0.18$). (B) negative linear correlation between TERT and in addition, in grade III gliomas ($r = -0.65$, $p = 0.003$). (C-E) GABPA correlates positive with GABPB1, GABPB1-L and GABPB1-S in primary glioblastomas with $p = 0.035$, 0.0008 and 0.045 , respectively. (F) GABPA and GABPB2 have the tendency to slightly positive correlate in primary glioblastomas, without any statistical significance, n.s.: no significance.

Table 1: Oligosequences for primers

Protein	Oligoname	Function	Sequence 5'→3' (Forward)	Sequence 3'→5' (Reverse)
Telomerase reverse transcriptase	TERT	Catalytic enzyme of telomerase	CGGCGACATGGAGAACAAG	CCAACAAGAAATCATCCACCAA
GA-binding protein A	GABPA	Transcription factor	CCTGAACTGGTTGCACAGAA	ACAAATCATGTCCCCATCG
GA-binding protein B1	GABPB1	Transcription factor	GGCTGAAGCGCTAGAAATGG	GGAGAGAGGGGAAAGAGGGT
GA-binding protein B1 Long	GABPB1-L	Transcription factor isoform	AACCAGTGGAAATTGGTCAGC	TGTAGGCCTCTGCTTCCTGT
GA-binding protein B1 Short	GABPB1-S	Transcription factor isoform	AACCAGTGGAAATTGGTCAGC	ACCGGGTAAAAGACTCCTTAC
GA-binding protein B2	GABPB2	Transcription factor	AGCAAGTAATGGGGAGTGGA	AACCTTACCAGCAGGTACAG

loss and cellular death [22]. Our findings propose that chemotherapy treatment in sec. GBMs decreases GABPB1 and GABPB1L mRNA levels and it could be used as a potential therapeutical approach together with targeting therapy in TERT and GABP dependent glioblastomas.

MATERIALS AND METHODS

Patients

For this study we obtained the surgical specimen from 80 patients that had been treated at the Department of Neurosurgery of the University Hospital of Cologne from 1990 to 2012. We analyzed 70 tumor tissue samples altogether. Ten patients were followed for progression during the disease. Each sample was than histopathologically graded according to the WHO classification of the CNS tumors 2016 [23] from two independent neuropathologists. All patients gave their informed written consent to use the samples as stated by the Declaration of Helsinki and the study was approved by the local ethic committee of the University of Cologne (Application No. 03-170).

Glioma samples

The tumor samples were extracted during neurosurgery and snap-frozen in liquid nitrogen at -80°C and stored at our tumor bank after the neuropathologist's examination and prior to the RNA isolation. Ten micrometers cryostat sections were taken of each sample and stained with hematoxylin & eosin. Each group consists of ten tissue samples and peritumoral tissue free of tumoral cells was used as the control.

RNA extraction, cDNA synthesis and primers

RNA was isolated from the fresh frozen tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quantity and purity of the isolated RNA was assessed spectrophotometrically at 260 and 280 nm. The cDNA-synthesization was performed with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The

primers for telomerase reverse transcriptase (TERT) and the GA-binding protein A and B isoforms (GABPA/B isoforms) were designed and purchased from Eurofins, Genomics (Ebensberg, Germany). We used the succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein variant (SDHA) as the housekeeping gene [24] (QuantiTect PrimerAssay; Qiagen, Hilden, Germany) (Table 1).

Quantitative real time-PCR

The quantitative real time polymerase chain reaction was done in triplicates. We used the final volume of 20 μl consisting of 1 \times Rotor Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany), 10 μl Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 5 μl of each primer and 5 μl of cDNA diluted in 1:50. The amplification was performed on a Rotor-Gene Q cycler (Qiagen, Hilden, Germany) in a two-step cycling protocol and the cycling conditions are the following: initial denaturation for 5 min in 95°C , followed by 95°C for 5 sec, followed by 60°C for 10 sec, each 35–45 cycles depending on the gene. After each run a melting curve was added.

Statistical analysis

The analysis was performed using Graph Pad, Prism Version 8 (La Jolla, San Diego, California, USA). To determine the significant differences between the groups, we used the Kruskal-Wallis-Test as a non-parametric alternative to one-way Analysis of variance (ANOVA). Mann-Whitney-*U* Test was carried out to compare the mRNA expression levels between the different glioma groups and the control subjects by not normally distributed variables. To measure the linear relationship between TERT and GABPA/B isoforms, Pearson's correlation was performed. *P*-value of 0.05 or smaller was set as the statistically significant level.

CONCLUSIONS

In conclusion, the present study confirms the transcriptional status of TERT which is upregulated in the prim. GBMs while the other glioma grades exhibit no elevated activation. We further expanded our analysis

by investigating all molecular components of GABP and proved their enhanced expression among the glioma grades which exhibit a similar pattern of activation. We therefore can propose that GABP might be a potential biomarker in glioma classification, but further investigations must be made in order to elucidate the actual relationship between TERT and GABPA/B isoforms in gliomas, aiming for targeted therapy in the future.

Abbreviations

GBM: Glioblastoma; GII: WHO grade II; GIII: WHO grade III; GABP: GA-binding protein; Ets: E-twenty-six; OS: overall survival; PFS: progression-free survival; rt-PCR: real-time polymerase chain reaction; SDHA: Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein variant; TERT: Telomerase reverse transcriptase; WHO: World Health Organization.

Author contributions

Efthymios Papazacharias: performed most experiments, wrote manuscript; Saskia Kuhl: performed experiments, helped with statistics; Gabriele Röhn: analysis of experiments; Lukas Görtz: statistics; Roland Goldbrunner: wrote manuscript; Marco Timmer: idea, wrote manuscript, statistics.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the article content was composed in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 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; 131:803–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>. [PubMed]
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004; 64:6892–99. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1337>. [PubMed]
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009; 360:765–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>. [PubMed]

- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:6002–07. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0715>. [PubMed]
- Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:764–72. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>. [PubMed]
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, et al, and European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352:987–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>. [PubMed]
- Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R, and Nordic Clinical Brain Tumour Study Group (NCBTSG). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13:916–26. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70265-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70265-6). [PubMed]
- Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Le Rhun E, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC, Dhermain F, et al, and European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Glioma. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 2017; 18:e315–29. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30194-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30194-8). [PubMed]
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science.* 2007; 315:1850–53. <https://doi.org/10.1126/science.1138596>. [PubMed]
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266:2011–15. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>. [PubMed]
- Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* 2008; 99:1528–38. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00878.x>. [PubMed]
- Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.* 2013; 339:959–61. <https://doi.org/10.1126/science.1230062>. [PubMed]
- Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovannella BC, Grollman AP, He TC, He Y, et al. 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*. 2013; 110:6021–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>. [PubMed]
14. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2013; 126:931–37. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1163-0>. [PubMed]
 15. Spiegl-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; 17:1231–40. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov010>. [PubMed]
 16. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013; 339:957–59. <https://doi.org/10.1126/science.1229259>. [PubMed]
 17. Bell RJA, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, Choi S, Hong C, He D, Pekmezci M, Wiencke JK, Wensch MR, Chang SM, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*. 2015; 348:1036–39. <https://doi.org/10.1126/science.aab0015>. [PubMed]
 18. Rosmarin AG, Resendes KK, Yang Z, McMillan JN, Fleming SL. GA-binding protein transcription factor: a review of GABP as an integrator of intracellular signaling and protein-protein interactions. *Blood Cells Mol Dis*. 2004; 32:143–54. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.005>. [PubMed]
 19. Sawada J, Goto M, Sawa C, Watanabe H, Handa H. Transcriptional activation through the tetrameric complex formation of E4TF1 subunits. *EMBO J*. 1994; 13:1396–402. [PubMed]
 20. Wu H, Xiao Y, Zhang S, Ji S, Wei L, Fan F, Geng J, Tian J, Sun X, Qin F, Jin C, Lin J, Yin ZY, et al. The Ets transcription factor GABP is a component of the hippo pathway essential for growth and antioxidant defense. *Cell Rep*. 2013; 3:1663–77. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.020>. [PubMed]
 21. de la Brousse FC, Birkenmeier EH, King DS, Rowe LB, McKnight SL. Molecular and genetic characterization of GABP beta. *Genes Dev*. 1994; 8:1853–65. <https://doi.org/10.1101/gad.8.15.1853>. [PubMed]
 22. Mancini A, Xavier-Magalhães A, Woods WS, Nguyen KT, Amen AM, Hayes JL, Fellmann C, Gapinske M, McKinney AM, Hong C, Jones LE, Walsh KM, Bell RJ, et al. Disruption of the β 1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2018; 34:513–28. e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.003>. [PubMed]
 23. Wen PY, Huse JT. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. *Continuum (Minneapolis)*. 2017; 23:1531–47. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000536>. [PubMed]
 24. Röhn G, Koch A, Kricshek B, Stavrinou P, Goldbrunner R, Timmer M. ACTB and SDHA Are Suitable Endogenous Reference Genes for Gene Expression Studies in Human Astrocytomas Using Quantitative RT-PCR. *Technol Cancer Res Treat*. 2018; 17:1533033818802318. <https://doi.org/10.1177/1533033818802318>. [PubMed]
 25. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010; 11:319–30. <https://doi.org/10.1038/nrg2763>. [PubMed]
 26. Ramlee MK, Wang J, Toh WX, Li S. Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes (Basel)*. 2016; 7:50. <https://doi.org/10.3390/genes7080050>. [PubMed]
 27. Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, Ursino S, Ali G, Pieracci N, Basolo F, Parenti G, Fontanini G. Telomerase activity and hTERT mRNA expression in glial tumors. *Int J Oncol*. 2006; 28:1555–60. <https://doi.org/10.3892/ijo.28.6.1555>. [PubMed]
 28. Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins VP, Kawahara N, Shibui S, Ichimura K. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol*. 2013; 126:267–76. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1141-6>. [PubMed]
 29. Park CK, Lee SH, Kim JY, Kim JE, Kim TM, Lee ST, Choi SH, Park SH, Kim IH. Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. *Oncotarget*. 2014; 5:3399–407. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1975>. [PubMed]
 30. Mosrati MA, Malmström A, Lysiak M, Kryzstofiak A, Hallbeck M, Milos P, Hallbeck AL, Brathäll C, Strandéus M, Stenmark-Askmalin M, Söderkvist P. TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget*. 2015; 6:16663–73. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4389>. [PubMed]
 31. Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, Wiklund NP, Steineck G, Schadendorf D, Hemminki K, Kumar R. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110:17426–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310522110>. [PubMed]
 32. Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, Bruno A, Patera R, Marie Y, Rahimian A, Finocchiaro G, Houlston RS, Hoang-Xuan K, et al. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer*. 2014; 111:2024–32. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.538>. [PubMed]
 33. Neilsen BK, Sleightholm R, McComb R, Ramkissoon SH, Ross JS, Corona RJ, Miller VA, Cooke M, Aizenberg MR. Comprehensive genetic alteration profiling in primary and

- recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* 2019; 142:111–18. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03070-2>. [PubMed]
34. Liu J, Zhang X, Yan X, Sun M, Fan Y, Huang Y. Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. *Oncol Lett.* 2019; 17:95–102. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9634>. [PubMed]
35. Yang P, Cai J, Yan W, Zhang W, Wang Y, Chen B, Li G, Li S, Wu C, Yao K, Li W, Peng X, You Y, et al, and CGGA Project. Classification based on mutations of TERT promoter and IDH characterizes subtypes in grade II/III gliomas. *Neuro Oncol.* 2016; 18:1099–108. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now021>. [PubMed]
36. Rosmarin AG, Caprio DG, Kirsch DG, Handa H, Simkevich CP. GABP and PU.1 Compete for Binding, yet Cooperate to Increase CD18 (β 2 Leukocyte Integrin) Transcription. *J Biol Chem.* 1995; 270:23627–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.40.23627>. [PubMed]
37. LaMarco K, Thompson C, Byers B, Walton EM, McKnight SL. Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science.* 1991; 253:789–92. <https://doi.org/10.1126/science.1876836>. [PubMed]
38. van den Bent MJ, Bromberg JE, Buckner J. Low-grade and anaplastic oligodendroglioma. *Handb Clin Neurol.* 2016; 134:361–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00022-0>. [PubMed]
39. Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, Morozova O, Robertson AG, Nounshmehr H, Laird PW, et al, and Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 2015; 372:2481–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402121>. [PubMed]
40. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzenuber J, Majewski J, Dong Z, Siegel P, Albrecht S, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* 2012; 124:615–25. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1031-3>. [PubMed]

4. DISKUSSION

4.1. Interpretation der Ergebnisse

Die Tumorzellen sind charakterisiert durch eine ununterbrochene Verlängerung der Telomere. Diese sind direkt verbunden mit der Onkogenese. Viele zelluläre Prozesse sind involviert in der Verlängerung der chromosomalen Enden und Replikation der malignen Zellen^{67,70}. Einer der wichtigsten vorgestellten Mechanismen ist die Telomerase, welche mit den genetischen und transkriptionalen Veränderungen im TERT assoziiert ist⁷⁰. In dieser publizierten wissenschaftlichen Arbeit, wurde durch die Untersuchung des transkriptionalen Status von TERT in allen WHO Graden der Gliome bewiesen, dass die mRNA von TERT im Vergleich zu den peripheren, gesunden Hirngewebe zumeist in den prim. GBM exprimiert wird⁹⁵. Dies bestätigen auch aktuelle Studien, welche die Mutationen im Promoter von TERT als den führenden Regulationsmechanismus für die Überexpression von TERT und die gesteigerte enzymatischen Aktivität in den prim. GBM präsentieren^{79,81,83,96}. Die mRNA TERT Expression kann auch in Gliomen mit Wildtyp-Promoter erhöht sein. Somit werden alternative Prozesse für die Regulation der Expression von TERT angeboten⁹⁷. Dazu gehören epigenetische Faktoren, wie die Methylierung von pTERT und Modifikation der Histone, die molekulare Steuerung durch Transkriptionsfaktoren und chromosomale Veränderungen⁹⁸.

Ein weiterer Mechanismus mit potenziellem Einfluss auf die TERT Expression als mögliche Alternative für Telomerase-unabhängige Erhaltung der Telomere, ist der sog. *alternative lengthening of telomeres* (ALT)⁹⁷. ALT ist charakterisiert durch eine homologe Rekombination der Telomere in Tumorzellen, die keine Telomerase Aktivität aufweisen. Ca. 11% der prim. GBM und 20% der Oligodendrogliome zeigen einen ALT positiven Phänotyp^{99,100}. Eine positive Korrelation zwischen ALT und die gleichzeitige Veränderungen im ATRX wurden bereits bewiesen¹⁰¹. Wie schon beschrieben, schließen ATRX und pTERT Mutationen sich gegenseitig aus. Demnach könnte die Präsenz von ALT/ATRX Veränderungen entsprechend die Aktivierung der Telomerase in den Gliomen beeinflussen, was bereits Gegenstand weiterer Forschungen ist^{75,77,79,80}.

Auf der anderen Seite, befindet sich ein unter den Tumorzellen sehr verbreiter SNP mit der Bezeichnung rs2853669 (oder T349C), auf der Stelle 1,295,349 des Chromosoms 5, -245 Bp von dem ATG Startcodon von TERT entfernt¹⁰². Seine Präsenz verursacht eine Umwandlung von T zu C (oder A zu G) und unterbricht eine präformierte Bindungsposition des Transkriptionsfaktors Ets 2 der Ets Familie an dieser Stelle¹⁰². In den GBM weisen ca. 66,6% diesen Polymorphismus im pTERT auf, mit einer unterschiedlichen Distribution zwischen den Homo- und Heterozygoten C-Allel. Diese zeigen eine zweifache Reduktion der Expression von TERT bei gleichzeitiger Präsenz von C228T oder C250T Mutationen, was als Hinweis auf einen entgegenwirkenden Mechanismus in den TERT abhängigen Gliomen gesehen werden kann^{79,103}. Während der Nachweis von rs2853669 in den pTERT mutierten Blasenkarzinome einen positiven prognostischen Effekt hat, führt die Präsenz des Polymorphismus zu einer

deutlichen Reduktion der Überlebensrate auf ca. 8,2 Monate in den prim. GBM, mit weiterhin kontroverse Ergebnisse bezüglich der Prognose ^{102,104,105}.

Wie bereits beschrieben, entstehen während der Gliomagenese viele Mutationen, die zur Progression führen und in den Rezidiven nachweisbar sind ⁵¹. In dieser Studie, wurden die Untersuchungen erweitert und es konnte gezeigt werden, dass die prim. GBM mit chemotherapeutischer Behandlung, meistens TMZ, ebenfalls eine signifikante Erhöhung der TERT Expression aufweisen ⁹⁵. Die aktuelle Studienlage beweist, dass die pTERT Mutationen stabil, während der Progression von prim. GBM in den Rezidiven, sind und später im Verlauf der Onkogenese entstehen ^{106,107}. Das könnte die erhöhte TERT Expression in der Kohorte der Rezidiven dieser Studie erklären und Hinweise auf weitere persistierende, molekulare Mechanismen mit Einfluss auf die Regulation von TERT geben ⁹⁸. Experimentelle Ergebnisse berichten ebenfalls über eine erhöhte Transkription von TERT, nach in vitro TMZ-Behandlung und hypoxischen Bedingungen ¹⁰⁸.

Anders sieht es in den niedrig- und hoch-gradigen Gliomen dieser Studie aus. Die Grad II Gliome sowie die sek. GBM und deren Rezidive mit TMZ-Behandlung zeigen eine signifikant niedrige mRNA Expression, während die Grad III Gliome keinen besonderen Unterschied zu dem peritumoralen Gewebe aufweisen ⁹⁵. Dies könnte durch die geringe Anzahl an Grad II, Grad III Gliome und sek. GBM mit pTERT Mutationen erklärt werden, die dementsprechend zu einer verminderten transkriptionalen Aktivierung führen ^{76,78}.

Die zwei somatischen Punktmutationen im pTERT der GBM erstellen eine besondere Sequenz und durch die genaue Bindung von GABP an dem Promoter wird die Transkription von TERT gesteigert ⁹³. Diese Entdeckung zeigt die besondere Rolle von GABP in den pTERT mutierten, abhängigen Gliomen. GABP ist der einzige unter der Ets-Familie, der als Dimer oder Tetramer funktionieren kann und stellt einen Proteinkomplex aus den zwei funktionell unterschiedlichen Einheiten, das GABPA und das GABPB, dar ⁸⁸. In dieser Arbeit, wurde die Expression der einzelnen GABPA/B Proteine in den Gliomen untersucht. Diesbezüglich zeigte sich eine Überexpression von GABPA, -B1, -B1 - L und -B1 - S, während der malignen Progression der Gliome von niedrig- zu hoch-gradigen, mit der meisten Expression in den sek. GBM ⁹⁵. Soweit bekannt, präsentiert diese Studie zum ersten Mal die GABPA/B-Isoformen als potenzielle Marker der Progression in der Gliomagenese. Wie bereits erwähnt, muss GABPA mit den GABPB-Isoformen Heterodimere bilden, um eine volle Funktion auszuüben. Die einzelnen GABPB Proteine, außer -B1 - S, können untereinander interagieren und Homodimere bilden ^{88,90,92}. Dies könnte einerseits die positive lineäre Korrelation zwischen GABPA und alle GABPB Isoformen in den prim. GBM dieser Studie erklären und andererseits, Hinweise auf weitere molekulare Mechanismen geben, die die Expression der GABP Einheiten steuern können ^{87,95}.

In den prim. GBM mit und ohne Behandlung dieser Arbeit, zeigt sich ebenfalls eine gesteigerte Expression von GABPA, -B1, -B1 - L und -B1 - S ⁹⁵. Bell et al. betonten die besondere Funktion

von GABPA als den sensitivsten unter der Ets Familie, der speziell an pTERT Mutationen bindet und die GABPB Proteine in den GBM rekrutiert, während weitere Studien über die potenzielle onkogene Eigenschaften von GABPA in den Tumorzellen berichten ^{93,109}. In seine Untersuchungen, führte die siRNA *knockdown* von GABPA zur Reduktion der TERT Expression und präsentiert GABPA als den wichtigen Faktor für die gesteigerte TERT Transkription ⁹³. Auf der anderen Seite, weisen Mancini et al. das GABPB1 - L als den wichtigen Regulator der TERT Expression in den Promoter mutierten GBM mit signifikante positiver Korrelation zwischen deren mRNA und fehlende Korrelation zwischen TERT und GABPB1 - S, -B2 nach, was wiederum die Ergebnisse dieser Studie teilweise bestätigen ^{94,95}. Darüber hinaus wurde, auch in den Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms das gleiche Prinzip bestätigt. Hier diente die Rekrutierung von den GABPA/B-Isoformen, in den mutierten pTERT und die Überexpression von GABPB1 in diesen Zellen, als Hinweis auf einen Pathomechanismus, der ubiquitär in den unterschiedlichen Tumorzellpopulationen vorkommen könnte ¹¹⁰.

Die chemotherapeutisch behandelte sek. GBM, in allen Fällen dieser Arbeit TMZ, zeigten eine signifikante Reduktion der GABPB1 und -B1 - L Expression im Vergleich zu den sek. GBM ohne Behandlung ⁹⁵. Zusätzlich, in weiteren Studien führte die in vivo Behandlung der pTERT-mutierten GBM mit GABPB1 - L siRNA zu einer verminderten Expression von TERT und zum Verlust der Telomere, welcher Mechanismus die zelluläre Apoptose induzierte ⁹⁴. Andere Forschungsgruppen haben versucht, mittels *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISP), die Punktmutationen im Promoter zu korrigieren und mit Adenovirus-basierter Therapie die pTERT mutierte GBM zu behandeln, ein Versuch mit vielversprechenden Resultaten ¹¹¹. Unsere Ergebnisse, präsentieren TMZ als eine potenzielle Chemotherapie, die in Kombination mit gezielter Protein-Blockade in GABPA/B und pTERT abhängigen Gliomen eingesetzt werden kann.

4.2. Limitationen

Diese wissenschaftliche Arbeit fokussiert auf die mRNA Expression von TERT und der GABPA/B-Isoformen in allen Gliom-Graden, deren Zusammenhang untersucht wurde. Die wichtige Rolle der Mutationen im Promoter von TERT wurde bereits ebenso betont, wie auch die Assoziation des pTERT Status mit der mRNA Expression. In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Punktmutationen im pTERT in den Gliomen und deren Verknüpfung mit den GABPA/B Proteine nicht identifiziert. Ebenfalls, wird nicht zwischen astrozytären- und oligodendroglialen Phänotyp differenziert. Zudem werden die Gliome nur anhand der WHO Klassifikation gruppie

5. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol* 2020; **22**: iv1-iv96.
- 2 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 97–109.
- 3 Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013; **15 Suppl 2**: ii1-56.
- 4 Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; **131**: 803–20.
- 5 Goldbrunner R, Minniti G, Preusser M, et al. EANO guidelines for the diagnosis and treatment of meningiomas. *Lancet Oncol* 2016; **17**: e383-91.
- 6 Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol* 2018; **20**: iv1-iv86.
- 7 Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012; **123**: 465–72.
- 8 Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol* 2016; **18**: v1-v75.
- 9 Rudà R, Reifenberger G, Frappaz D, et al. EANO guidelines for the diagnosis and treatment of ependymal tumors. *Neuro Oncol* 2018; **20**: 445–56.
- 10 Kilday J-P, Rahman R, Dyer S, et al. Pediatric ependymoma: biological perspectives. *Mol Cancer Res* 2009; **7**: 765–86.
- 11 Hoffman S, Propp JM, McCarthy BJ. Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999. *Neuro Oncol* 2006; **8**: 27–37.
- 12 Olson JE, Janney CA, Rao RD, et al. The continuing increase in the incidence of primary central nervous system non-Hodgkin lymphoma: a surveillance, epidemiology, and end results analysis. *Cancer* 2002; **95**: 1504–10.
- 13 Hoang-Xuan K, Bessell E, Bromberg J, et al. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients: guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. *Lancet Oncol* 2015; **16**: e322-32.
- 14 Nayak L, Lee EQ, Wen PY. Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep* 2012; **14**: 48–54.
- 15 Martin AM, Cagney DN, Catalano PJ, et al. Brain Metastases in Newly Diagnosed Breast Cancer: A Population-Based Study. *JAMA Oncol* 2017; **3**: 1069–77.

- 16 Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, Vignea FD, Lai P, Sawaya RE. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 2865–72.
- 17 Soffiotti R, Abacioglu U, Baumert B, et al. Diagnosis and treatment of brain metastases from solid tumors: guidelines from the European Association of Neuro-Oncology (EANO). *Neuro Oncol* 2017; **19**: 162–74.
- 18 Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* 2009; **41**: 899–904.
- 19 Rogers L, Barani I, Chamberlain M, et al. Meningiomas: knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. *J Neurosurg* 2015; **122**: 4–23.
- 20 Fan Z-X, Shen J, Wu Y-Y, Yu H, Zhu Y, Zhan R-Y. Hormone replacement therapy and risk of meningioma in women: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* 2013; **24**: 1517–25.
- 21 Preston DL, Ron E, Yonehara S, et al. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 1555–63.
- 22 Amirian ES, Zhou R, Wrensch MR, et al. Approaching a Scientific Consensus on the Association between Allergies and Glioma Risk: A Report from the Glioma International Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016; **25**: 282–90.
- 23 Ostrom QT, Adel Fahmideh M, Cote DJ, et al. Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro Oncol* 2019; **21**: 1357–75.
- 24 Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011; **103**: 714–36.
- 25 Bergenheim T, Malmström A, Bolander H, et al. Registration on regional basis of patients with primary brain tumors. Regional differences disclosed. *Lakartidningen* 2007; **104**: 332-8, 340-1.
- 26 Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol* 2017; **18**: e315-e329.
- 27 Albert NL, Weller M, Suchorska B, et al. Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro Oncol* 2016; **18**: 1199–208.
- 28 Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; **18**: 170–86.
- 29 Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; **360**: 765–73.
- 30 Miller JJ, Shih HA, Andronesi OC, Cahill DP. Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: Evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer* 2017; **123**: 4535–46.
- 31 Geisbrecht BV, Gould SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30527–33.
- 32 Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* 2009; **324**: 261–65.

- 33 Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; **462**: 739–44.
- 34 Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2009; **174**: 1149–53.
- 35 Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; **131**: 242–51.
- 36 Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2481–98.
- 37 Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006; **66**: 9852–61.
- 38 Idbaih A, Marie Y, Pierron G, et al. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann Neurol* 2005; **58**: 483–87.
- 39 Gibbons RJ, Pellagatti A, Garrick D, et al. Identification of acquired somatic mutations in the gene encoding chromatin-remodeling factor ATRX in the alpha-thalassemia myelodysplasia syndrome (ATMDS). *Nat Genet* 2003; **34**: 446–49.
- 40 Cheung N-KV, Zhang J, Lu C, et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 2012; **307**: 1062–71.
- 41 Liu X-Y, Gerges N, Korshunov A, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol* 2012; **124**: 615–25.
- 42 Bieganski KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 359–70.
- 43 Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; **474**: 609–15.
- 44 Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; **489**: 519–25.
- 45 Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2011; **28**: 177–83.
- 46 Okamoto Y, Di Patre P-L, Burkhard C, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2004; **108**: 49–56.
- 47 Ham SW, Jeon H-Y, Jin X, et al. TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma. *Cell Death Differ* 2019; **26**: 409–25.
- 48 Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; **64**: 6892–99.
- 49 Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 6002–07.

- 50 Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 764–72.
- 51 Neilsen BK, Sleightholm R, McComb R, et al. Comprehensive genetic alteration profiling in primary and recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2019; **142**: 111–18.
- 52 Louis DN, Wesseling P, Aldape K, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol* 2020; **30**: 844–56.
- 53 Stupp R, Mason WP, van den Bent, Martin J, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–96.
- 54 Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 2012; **5**: 102–14.
- 55 Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW. Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5612–19.
- 56 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 997–1003.
- 57 Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 916–26.
- 58 van den Bent, Martin J, Carpentier AF, Brandes AA, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 2715–22.
- 59 Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, et al. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N Engl J Med* 2016; **374**: 1344–55.
- 60 van den Bent, Martin J, Baumert B, Erridge SC, et al. Interim results from the CATNON trial (EORTC study 26053-22054) of treatment with concurrent and adjuvant temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma: a phase 3, randomised, open-label intergroup study. *Lancet* 2017; **390**: 1645–53.
- 61 Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; **359**: 845–48.
- 62 Chi AS, Sorensen AG, Jain RK, Batchelor TT. Angiogenesis as a therapeutic target in malignant gliomas. *Oncologist* 2009; **14**: 621–36.
- 63 Chinot OL, Wick W, Mason W, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; **370**: 709–22.
- 64 Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998; **12**: 1073–85.

- 65 Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 6622–26.
- 66 Lange T de. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; **19**: 2100–10.
- 67 Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; **350**: 569–73.
- 68 Shammass MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; **14**: 28–34.
- 69 Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995; **85**: 2315–20.
- 70 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; **266**: 2011–15.
- 71 Cifuentes-Rojas C, Shippen DE. Telomerase regulation. *Mutat Res* 2012; **730**: 20–27.
- 72 Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci* 2008; **99**: 1528–38.
- 73 Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 2013; **339**: 957–59.
- 74 Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 2013; **339**: 959–61.
- 75 Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. 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* 2013; **110**: 6021–26.
- 76 Nonoguchi N, Ohta T, Oh J-E, Kim Y-H, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 2013; **126**: 931–37.
- 77 Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2499–508.
- 78 Liu J, Zhang X, Yan X, Sun M, Fan Y, Huang Y. Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. *Oncol Lett* 2019; **17**: 95–102.
- 79 Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, et al. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer* 2014; **111**: 2024–32.
- 80 Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol* 2017; **133**: 1001–16.
- 81 Arita H, Narita Y, Fukushima S, et al. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol* 2013; **126**: 267–76.
- 82 Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun* 2013; **4**: 2185.

- 83 Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, et al. Telomerase activity and hTERT mRNA expression in glial tumors. *Int J Oncol* 2006; **28**: 1555–60.
- 84 Gutierrez-Hartmann A, Duval DL, Bradford AP. ETS transcription factors in endocrine systems. *Trends Endocrinol Metab* 2007; **18**: 150–58.
- 85 Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 2005; **41**: 2462–78.
- 86 Sizemore GM, Pitarresi JR, Balakrishnan S, Ostrowski MC. The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**: 337–51.
- 87 Rosmarin AG, Resendes KK, Yang Z, McMillan JN, Fleming SL. GA-binding protein transcription factor: a review of GABP as an integrator of intracellular signaling and protein-protein interactions. *Blood Cells Mol Dis* 2004; **32**: 143–54.
- 88 LaMarco K, Thompson CC, Byers BP, Walton EM, McKnight SL. Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science* 1991; **253**: 789–92.
- 89 Sawada J, Goto M, Sawa C, Watanabe H, Handa H. Transcriptional activation through the tetrameric complex formation of E4TF1 subunits. *EMBO J* 1994; **13**: 1396–402.
- 90 de la Brousse, F C, Birkenmeier EH, King DS, Rowe LB, McKnight SL. Molecular and genetic characterization of GABP beta. *Genes Dev* 1994; **8**: 1853–65.
- 91 Wu H, Xiao Y, Zhang S, et al. The Ets transcription factor GABP is a component of the hippo pathway essential for growth and antioxidant defense. *Cell Rep* 2013; **3**: 1663–77.
- 92 Batchelor AH, Piper DE, de la Brousse, F C, McKnight SL, Wolberger C. The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* 1998; **279**: 1037–41.
- 93 Bell RJA, Rube HT, Kreig A, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* 2015; **348**: 1036–39.
- 94 Mancini A, Xavier-Magalhães A, Woods WS, et al. Disruption of the β 1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner. *Cancer Cell* 2018; **34**: 513-528.e8.
- 95 Papazacharias E, Kuhl S, Röhn G, Görtz L, Goldbrunner R, Timmer M. TERT and its binding protein: overexpression of GABPA/B in high grade gliomas. *Oncotarget* 2021; **12**: 1271–80.
- 96 Heidenreich B, Rachakonda PS, Hosen I, et al. TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences. *Oncotarget* 2015; **6**: 10617–33.
- 97 Masui K, Komori T, Kato Y, et al. Elevated TERT Expression in TERT-Wildtype Adult Diffuse Gliomas: Histological Evaluation with a Novel TERT-Specific Antibody. *Biomed Res Int* 2018; **2018**: 7945845.
- 98 Ramlee MK, Wang J, Toh WX, Li S. Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes (Basel)* 2016;
- 99 Heaphy CM, Subhawong AP, Hong S-M, et al. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am J Pathol* 2011; **179**: 1608–15.

- 100 Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 1997; **3**: 1271–74.
- 101 Heaphy CM, Wilde RF de, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 2011; **333**: 425.
- 102 Rachakonda PS, Hosen I, Verdier PJ de, et al. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 17426–31.
- 103 Park C-K, Lee S-H, Kim JY, et al. Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. *Oncotarget* 2014; **5**: 3399–407.
- 104 Mosrati MA, Malmström A, Lysiak M, et al. TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget* 2015; **6**: 16663–73.
- 105 Nenchu U, Rahimian A, Giry M, et al. TERT promoter mutations and rs2853669 polymorphism: prognostic impact and interactions with common alterations in glioblastomas. *J Neurooncol* 2016; **126**: 441–46.
- 106 Miki S, Satomi K, Ohno M, et al. Highly sensitive detection of TERT promoter mutations in recurrent glioblastomas using digital PCR. *Brain Tumor Pathol* 2020; **37**: 154–58.
- 107 Körber V, Yang J, Barah P, et al. Evolutionary Trajectories of IDH(WT) Glioblastomas Reveal a Common Path of Early Tumorigenesis Instigated Years ahead of Initial Diagnosis. *Cancer Cell* 2019; **35**: 692-704.e12.
- 108 Chen C, Han S, Meng L, Li Z, Zhang X, Wu A. TERT promoter mutations lead to high transcriptional activity under hypoxia and temozolomide treatment and predict poor prognosis in gliomas. *PLoS One* 2014; **9**: e100297.
- 109 Guo Y, Yuan X, Li K, et al. GABPA is a master regulator of luminal identity and restrains aggressive diseases in bladder cancer. *Cell Death Differ* 2020; **27**: 1862–77.
- 110 Stern JL, Theodorescu D, Vogelstein B, Papadopoulos N, Cech TR. Mutation of the TERT promoter, switch to active chromatin, and monoallelic TERT expression in multiple cancers. *Genes Dev* 2015; **29**: 2219–24.
- 111 Li X, Qian X, Wang B, et al. Programmable base editing of mutated TERT promoter inhibits brain tumour growth. *Nat Cell Biol* 2020; **22**: 282–88.

6. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN

Papazacharias E, Kuhl S, Röhn G, Görtz L, Goldbrunner R, Timmer M. TERT and its binding protein: overexpression of GABPA/B in high grade gliomas. *Oncotarget* 2021; **12**: 1271–80.