



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

(Direktor: Prof. Dr. Wilko Weichert)

Fachgebiet für Neuropathologie

(Leiter: Prof. Dr. Jürgen Schlegel)

Das Enzym Aldehyd-dehydrogenase 1 als Biomarker für Hirntumorstammzellen und als prädiktiver Faktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Glioblastompatienten

Julian M. Teufel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel

2. Prof. Dr. Bernhard Meyer

Die Dissertation wurde am 13.01.2017 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.07.2017
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	2
2	Einleitung	3
2.1	Problemstellung	3
2.2	Das Glioblastom	3
2.3	Tumorstammzellhypothese.....	8
2.4	Stammzellnische und Hypoxie.....	9
2.5	Der Tumorstammzellmarker ALDH1.....	11
2.6	Zielsetzung	13
3	Material und Methodik	14
3.1	Verwendete Antikörper	14
3.2	Immunhistochemie.....	14
3.3	Patientenkollektiv	16
3.4	Statistik	16
4	Ergebnisse	17
4.1	Charakterisierung ALDH1 ⁺ Zellpopulationen in Normalhirn und GBM	17
4.1.1	ALDH1 ⁺ Zellen im Normalhirn und der Subventrikulären Zone (SVZ) beim Gesunden	17
4.1.2	Charakterisierung ALDH1 ⁺ BTSC im GBM	19
4.1.3	ALDH1 ⁺ BTSC finden sich im GBM perivaskulär und in der Nähe hypoxischer Areale	22
4.2	Das Enzym ALDH1 ist ein potentieller prädiktiver Marker für die postoperative mediane Überlebensdauer bei GBM-Patienten.....	25
4.2.1	In Rezidivglioblastomen zeigt sich ein erhöhter Anteil ALDH1 ⁺ Tumorzellen	30
5	Diskussion	31
6	Zusammenfassung	37
7	Literatur	38

1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALDH1	Aldehyddehydrogenase 1
ALDH1A1	Aldehyddehydrogenase 1 Isoform A1
AML	Akute myeloische Leukämie
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex
ATRA	All-trans-Retinsäure
BTSC	Hirntumorstammzellen
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
GBM	Glioblastom
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasserstoffoxid
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IDH1 (R132)	Isocitratdehydrogenase Mutation R132
IgG	Immunglobulin G
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
NaCl	Natriumchlorid
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Reverse Transcriptase Polymerase-Kettenreaktion
RA	Retinsäure
R0-Resektion	Vollständige Tumorresektion
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese
SVZ	Subventrikuläre Zone
TMZ	Temozolomid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Einheiten

°C	Grad Celcius
cm	Centimeter
g	Gramm
Gy	Gray
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
pH	pH-Wert
rpm	Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
V	Volt
W	Watt
w/v	Massenkonzentration

2 Einleitung

2.1 Problemstellung

Das Glioblastom (GBM) ist einer der aggressivsten soliden Malignome des Menschen. Trotz der Fortschritte in Diagnostik (Bildgebung, Molekularpathologie) und Therapie (Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie) liegt die postoperative Überlebensdauer bei nur 12-15 Monaten (Stupp et al., 2005). Auf Grund des infiltrativen Wachstums des GBM sind einer R0-Resektion natürliche Grenzen gesetzt und ein Rezidiv unvermeidlich. Eine dauerhafte Remission lässt sich auch durch die moderne Strahlentherapie und Standardchemotherapie mit Temozolomid (TMZ) nicht erreichen. Dadurch wurde die Notwendigkeit eines neuen Modells zur Tumorigenese offenbar und inzwischen hat sich in der aktuellen Forschung die sogenannte Tumorstammzellhypothese etabliert. Demnach gilt eine kleine Zell-Subpopulation innerhalb maligner Tumore als wesentlich für Entstehung, Wachstum und Therapieresistenz. Die Basis für neue *targeted molecular therapies* bildet daher die molekularpathologische Charakterisierung dieser sogenannten Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSC).

2.2 Das Glioblastom

Epidemiologie und Risikofaktoren

Das GBM ist der häufigste und gleichzeitig mit der schlechtesten Prognose assoziierte Hirntumor. Die jährliche Inzidenz liegt bei ungefähr 2-3/100.000 Einwohner pro Jahr (Louis et al., 2007). Der Anteil der GBMs an allen malignen Gliomen liegt bei ungefähr 60-70% mit einem Altersmedian bei Diagnosestellung von 64 Jahren (Fisher et al., 2007). Eine Ursache für den Großteil maligner Gliome konnte bisher nicht identifiziert werden. Der einzige bekannte Risikofaktor ist die Exposition durch ionisierende Strahlung (Fisher et al., 2007). Genetische Ursachen konnten bei einem Großteil nicht identifiziert werden. Gesichert ist jedoch das Auftreten von familiären malignen Gliomen, die ca. 5% ausmachen. Weiterhin existieren seltenere genetische Syndrome mit gehäufterem Auftreten von Gliomen wie die Neurofibromatose 1 und 2, das Li-Fraumeni-Syndrom und das Turcot-Syndrom (Farrell and Plotkin, 2007).

Viel diskutiert wurde ein Zusammenhang zwischen dem Risiko für Gliome und der Nutzung von Mobiltelefonen. In der INTERPHONE-Studie (Interview-basierte Fall-Kontroll-Studie mit 2708 Gliompatienten) konnte jedoch kein erhöhtes Risiko durch Mobiltelefonnutzung gezeigt werden (INTERPHONE, 2010). Insgesamt sind die Ergebnisse epidemiologischer Studien jedoch inkonsistent. Ein erhöhtes Gliomrisiko scheint gegeben durch eine Langzeitnutzung über 10 Jahre sowie bei hoher kumulativer Expositionszeit (Corle et al., 2012). Hinsichtlich eines verminderten Risikos gibt es Hinweise auf immunologische Faktoren. Atopie-Patienten zeigen ein reduziertes Risiko für das Auftreten von Gliomen (Linos et al., 2007) und Gliom-Patienten mit erhöhtem IgE-Spiegel leben möglicherweise länger als solche mit normalem Serumspiegel (Wrensch et al., 2006). Aktuell von hohem Interesse ist außerdem die Erforschung genetischer Faktoren, welche Detoxifikation, DNA-Reparatur und die Regulation des Zellzyklus beeinflussen (Wen and Kesari, 2008).

Klassifikation der Astrozytome

Das GBM wird zu den Astrozytomen gerechnet. Nach der WHO-Klassifikation (Louis et al., 2007) werden Astrozytome anhand histopathologischer Kriterien in vier prognostische Grade eingeteilt: Grad I (subependymales Riesenzellastrozytom, pilozytisches Astrozytom), Grad II (pilomyxoides Astrozytom, diffuses Astrozytom, pleomorphes Xanthoastrozytom), Grad III (anaplastisches Astrozytom) und Grad IV (GBM, Riesenzell-GBM, Gliosarkom). Astrozytome Grad I werden als benigne angesehen und sind chirurgisch potentiell heilbar. Patienten mit Grad II-Tumoren überleben in der Regel länger als 5 Jahre, allerdings können diese in einen höhergradigen Tumor progredieren (Grad III und IV). Tumoren Grad III und IV werden als maligne angesehen. Daher liegt die Überlebensdauer von Grad-III-Tumoren bei ca. 2-3 Jahren und von Grad-IV-Tumoren bei nur ca. 12-15 Monaten (Louis et al., 2007).

Seltenere Varianten des GBM sind das Gliosarkom, das Riesenzell-GBM, das kleinzellige GBM und das GBM mit oligodendroglialer Komponente. Letzteres ist möglicherweise mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Homma et al., 2006).

Pathologischer Phänotyp des GBM

Das GBM ist ein zellreicher anaplastischer Tumor, der aus entdifferenzierten Astrozyten besteht. Histologisch imponiert die zelluläre Polymorphie mit kleinzelligen undifferenzierten Tumorzellen sowie verstärkter Mitoserate und hoher Zelldichte. Zellatypie (Grad II), Anaplasie und Mitoseaktivität (Grad III) charakterisieren die Gliome bis Grad III. Histomorphologisch fordert die WHO zur Einteilung in Grad-IV-Tumoren zusätzlich eine mikrovaskuläre Proliferation und/oder Nekrosen (Ohgaki and Kleihues, 2007). Charakteristisch für das GBM sind strichförmige Nekrosen mit sogenannten Pseudopalisaden, wobei letztere zur Diagnosestellung nicht vorhanden sein müssen. Die mikrovaskulären Proliferationen können weiterhin in eine endotheliale Proliferation sowie in eine glomeruloide mikrovaskuläre Proliferation unterschieden werden. Beide werden als Diagnosekriterium akzeptiert.

Pathogenese und molekulare Marker

Die molekulare Pathogenese des GBM folgt aus einer Akkumulation genetischer Aberrationen und einer Deregulierung der Signalwege von Wachstumsfaktoren. Anhand der Entstehung können zwei Subtypen unterschieden werden, die jedoch zunächst histopathologisch im Hämatoxylin-Eosin-Präparat nicht voneinander differenziert werden können. Das GBM kann sowohl *de novo* als primäres GBM (>90%), sowie als sekundäres GBM entstehen.

Das primäre GBM betrifft vor allem ältere Patienten und ist durch bestimmte genetische Charakteristika gekennzeichnet. Dazu gehören vor allem LOH 10q (70%), EGFR-Amplifikation (36%), p16 (INK4a)-Deletion (31%) sowie PTEN-Mutationen (25%) (Ohgaki and Kleihues, 2007). Fast ausschließlich bei primären Glioblastomen findet sich die EGFR-Amplifikation, in der Hälfte der Fälle die Variante EGFRvIII (Pelloski et al., 2007). Wichtig ist diese Variante als therapeutisches Target für Kinaseinhibitoren, Immunotoxine und Peptidvakzinierung (Furnari et al., 2007).

Sekundäre GBM treten vor allem bei jüngeren Patienten auf und entwickeln sich durch Progression aus einem diffusen Astrozytom (Grad II) oder anaplastischen Astrozytom (Grad III) (Ohgaki and Kleihues, 2007). Mutationen im TP53 sind hier die häufigsten und frühesten genetischen Veränderungen. Vor wenigen Jahren wurden in einer umfangreichen Sequenzierungsanalyse einige unbekannte genetische

Veränderungen gefunden, allen voran eine Mutation in der Isocitratdehydrogenase-1 (IDH-1, Punktmutation R132H) (Parsons et al., 2008). Diese fand sich insbesondere bei jüngeren Patienten, assoziiert mit einem besseren Gesamtüberleben. Das Auftreten einer IDH1-Mutation ist typisch für sekundäre GBM und kommt bei primären praktisch nicht vor (Balss et al., 2008).

Die mit Gliomen assoziierten genetischen Veränderungen sind jedoch nicht alle für ein Therapieansprechen relevant. Einzig die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promotormethylierung und der IDH1-Status ließen in einer großen Studie eine prognostische Zuordnung in Subgruppen zu (Weller et al., 2009).

2014 wurden von der International Society of Neuropathology (ISN) die Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification vorgeschlagen (Louis et al., 2014). Demnach wurden keine umfassenden Empfehlungen hinsichtlich einzelner Tumorentitäten ausgesprochen. Vielmehr soll die nächste WHO Klassifikation anhand der vorgeschlagenen Richtlinien die nicht-histologische Information, insbesondere aus der molekularen Diagnostik, berücksichtigen.

Therapie

Die Standardtherapie des GBM besteht aus chirurgischer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie. Der symptomatische Nutzen einer extensiven Resektion des raumfordernden Prozesses ist unbestritten. Eine R0-Resektion ist auf Grund des infiltrativen Wachstums nicht möglich, ein prognostischer Nutzen jedoch wahrscheinlich (Lacroix et al., 2001). Die Sicherheit der Operation und das Resektionsausmaß konnten weiterhin durch neue Technologien verbessert werden. Eine neue Technik ist beispielsweise die fluoreszenzgesteuerte Resektion durch 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) (Stummer et al., 2006). Die adjuvante fraktionierte Strahlentherapie mit 60 Gy 5 Tage pro Woche und 1,8 bis 2,0 Gy pro Tag verbessert das Überleben nach einer Tumorsektion von 3-4 Monaten auf 7-12 Monate (Stupp et al., 2005). Weiterhin gilt die konkomitante und adjuvante Gabe von TMZ als Standardtherapie und verbessert das mediane Überleben von 12,1 auf 14,6 Monate verglichen mit alleiniger Strahlentherapie (Stupp et al., 2005).

Die Prognose ist jedoch weiterhin infaust und die Therapie des GBMs letztlich palliativ. Trotz Strahlen- und Chemotherapie kommt es nach durchschnittlich 6,9

Monaten zum Rezidiv (Stupp et al., 2005). Symptomatisch kann eine erneute Resektion erwogen werden, jedoch mit nur mäßigem Erfolg (Keles et al., 2004). Auch eine erneute Strahlentherapie zeigt keine eindeutige Verbesserung der Prognose (Butowski et al., 2006).

Neue Therapiemöglichkeiten

Die molekularbiologische und pathologische Forschung hat in den letzten Jahren neue Therapiemöglichkeiten eröffnet. Ein neuer Therapieansatz ist die intraoperative lokale Implantation eines Gliadel Wafers (MGI Pharma), der den zytostatischen Nitrosoharnstoff Carmustin (Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea, BCNU) enthält (Westphal et al., 2003). Dies führte postoperativ alleinig und in Kombination mit einer konkomitanten TMZ-Therapie zu einer Verbesserung der medianen Überlebenszeit (McGirt et al., 2009).

Das Glioblastom gehört zu den am stärksten vaskularisierten Tumoren, weshalb ein vielversprechender Versuch unternommen wurde das Wachstum von Rezidivtumoren durch den Angiogenese-Hemmer Bevacizumab und den Topoisomerasehemmer Irinotecan zu unterdrücken (Vredenburgh et al., 2007). Möglicherweise birgt dieser Ansatz auch Erfolg bei Primärtumoren (Vredenburgh et al., 2011). Ein weiterer Angiogenesehemmer, das von Horst Kessler von der TU München und der MerckKGaA entwickelte Pentapeptid Cilengitide, zeigte in Rezidiv-Glioblastomen ebenfalls einen möglichen Überlebensvorteil (Reardon et al., 2008; Stupp et al., 2010).

Molecular targeted therapies besitzen auf Grund der Vielzahl weiterer Ziele mutmaßlich noch großes Potential (Wick et al., 2011). Zur Beschleunigung dieser neueren Entwicklung war unter anderem eine neue Hypothese zur Malignomentstehung entscheidend. Diese ließ einen gezielten Angriff auf Subpopulationen innerhalb eines Tumors zunehmend sinnvoll erscheinen.

2.3 Tumorstammzellhypothese

Aktuell existieren zwei unterschiedliche Modelle zur Entstehung von malignen Tumoren. Das *stochastische Modell* geht davon aus, dass alle Zellen das gleiche Potential zur Entstehung von Mutationen und Tumorentstehung besitzen. Das neue Modell, die Tumorstammzellhypothese, geht andererseits von einem *hierarchischen Modell* aus, demzufolge nur eine kleine Subgruppe von Zellen zur Tumorentstehung und Rezidivbildung fähig ist. Dies sind die sogenannten Tumorstammzellen (CSC) (Reya et al., 2001), deren entscheidende Eigenschaften die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur Multipotenz und ihre Bedeutung für die Therapieresistenz sind (Clarke et al., 2006). Die Tumorstammzellhypothese wurde bereits in den 1970er Jahren aufgestellt (Hamburger and Salmon, 1977), allerdings gelang deren Bestätigung erst etwa 20 Jahre später durch die Isolation primitiver hämatopoetischer Stammzellen (HSC) bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) (Bonnet and Dick, 1997). Seither wuchs auch das Interesse an CSC bei soliden Tumoren, welche seither unter anderem beim Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Kolonkarzinom oder Lungenkarzinom nachgewiesen werden konnten (Magee et al., 2012).

Aber auch bei Hirntumoren wurden Tumorstammzellen (*brain tumor stem cells*, BTSC) gefunden (Singh et al., 2004b). Die Isolierung von BTSCs gelang initial durch das Transmembranlykoprotein CD133, welches auch von neuronalen Stammzellen und Progenitorzellen exprimiert wird (Singh et al., 2004b). Jedoch gilt CD133 als umstrittener Marker, da gezeigt werden konnte, dass auch CD133-negative GBM-Zellen *in vivo* Tumorentstehung initiieren können (Beier et al., 2007). BTSCs aus Glioblastomgewebe bilden in Zellkultur Neurosphären aus und initiieren das Tumorentstehung, wenn sie in immungeschwächte Mäuse injiziert werden (Galli et al., 2004). Der Nachweis *in vivo* stellt den Goldstandard zum Nachweis von CSC dar.

Ein weiterer gut untersuchter neuraler Stammzellmarker ist Nestin, ein Typ 6 Intermediärfilament, welches in der Subventrikulären Zone (SVZ) des Vorderhirns vorkommt (Morshead et al., 1994), im GBM überexprimiert wird und mit Entdifferenzierung, erhöhter Zellmotilität, Invasivität und Malignität assoziiert ist (Dell'Albani, 2008). Weitere neurale Stammzellmarker konnten im GBM identifiziert werden wie Musashi-1 (Ma et al., 2008), Sox2 (Gangemi et al., 2009; Schmitz et al., 2007), SSEA-1 (Son et al., 2009) oder HIF2 α (Seidel et al., 2010).

Diese lange und dennoch unvollständige Liste potentieller Marker demonstriert vor allem Folgendes: Erstens ist die Suche nach einem universalen Biomarker oder die Kombination derselben zur Identifizierung und Isolierung von CSCs noch nicht abgeschlossen. Zweitens dürfen letztere nicht als Einzelgänger betrachtet werden, entscheidend sind vielmehr die komplexen Interaktionen dieser Zellen mit anderen Zellpopulationen und dem interzellulären Milieu, innerhalb dessen ihr Wachstum begünstigt wird.

2.4 Stammzellnische und Hypoxie

Aus der Tumorstammzellhypothese und der Heterogenität der Zellpopulationen im GBM folgen weitere Fragestellungen. Zum einen muss definiert werden, wo BTSC innerhalb des Tumors lokalisiert sind. Des Weiteren muss untersucht werden, welche Wechselwirkungen mit anderen Zellpopulationen, bzw. dem umgebenden Milieu stattfinden. Und schließlich, welche therapeutischen Optionen daraus folgen (Gilbertson and Rich, 2007).

Innerhalb des Tumors findet eine enge Interaktion zwischen sich selbst erneuernden BTSC und endothelialen Zellen statt. Letztere sezernieren Faktoren, welche BTSC in einem stammzellartigen Zustand halten (Calabrese et al., 2007). Dementsprechend führt eine erhöhte Anzahl an Endothelzellen und Blutgefäßen zu einer Expansion an sich selbst erneuernden Zellen und beschleunigt Tumorentstehung und -wachstum. Die Depletion von Blutgefäßen zeigt einen gegensinnigen Effekt. Dieses Umfeld wird als perivaskuläre Nische bezeichnet und gilt als eine Lokalisation der BTSC im GBM (Calabrese et al., 2007).

Weiterhin finden sich BTSC auch in sogenannten hypoxischen Nischen (Bar, 2011), welche einen CSC-Phänotyp aufrechterhalten (Heddleston et al., 2009) und durch sogenannte *hypoxia initiating factors* (HIFs) gesteuert werden (Keith and Simon, 2007). Hypoxische Nischen findet man innerhalb des GBM in der Nähe von mikrovaskulären Proliferationen (Rong et al., 2006), welche sich meist in der Nähe von Nekrosen bilden, sowie in der Umgebung von Pseudopalisaden (siehe Abbildung 1) (Bar, 2011). Letztere bestehen aus Tumorzellen, die wahrscheinlich in Folge eines thrombosierten Gefäßes von dem dadurch entstandenen hypoxischen Milieu wegmigrieren (Brat et al., 2004).

Hypoxische Bedingungen führen zu einer erhöhten Expression an Stammzellmarkern und fördern die Klonogenität von Neurosphären (Bar et al., 2010). Darüber hinaus wird die Expansion an CD133-positiven BTSC gefördert (Soeda et al., 2009). Bezeichnenderweise halten sich diese vermehrt unter hypoxischen Bedingungen im Kern des Tumors auf und sind durch vermehrte Expression von MGMT therapieresistenter (Pistollato et al., 2010). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine Hyperoxie *in vitro* zu einer Resensitivierung TMZ-resistenter GBM-Zellen führt (Sun et al., 2012).

BTSC findet man im GBM folglich perivaskulär und perinekrotisch unter hypoxischen Bedingungen. Diese schienen sowohl die Entstehung von BTSC zu begünstigen und aufrechtzuerhalten, als auch für die Therapieresistenz eine wichtige Rolle zu spielen. Darüber hinaus existieren zahlreiche Interaktionen mit weiteren Zellpopulationen (Charles et al., 2011).

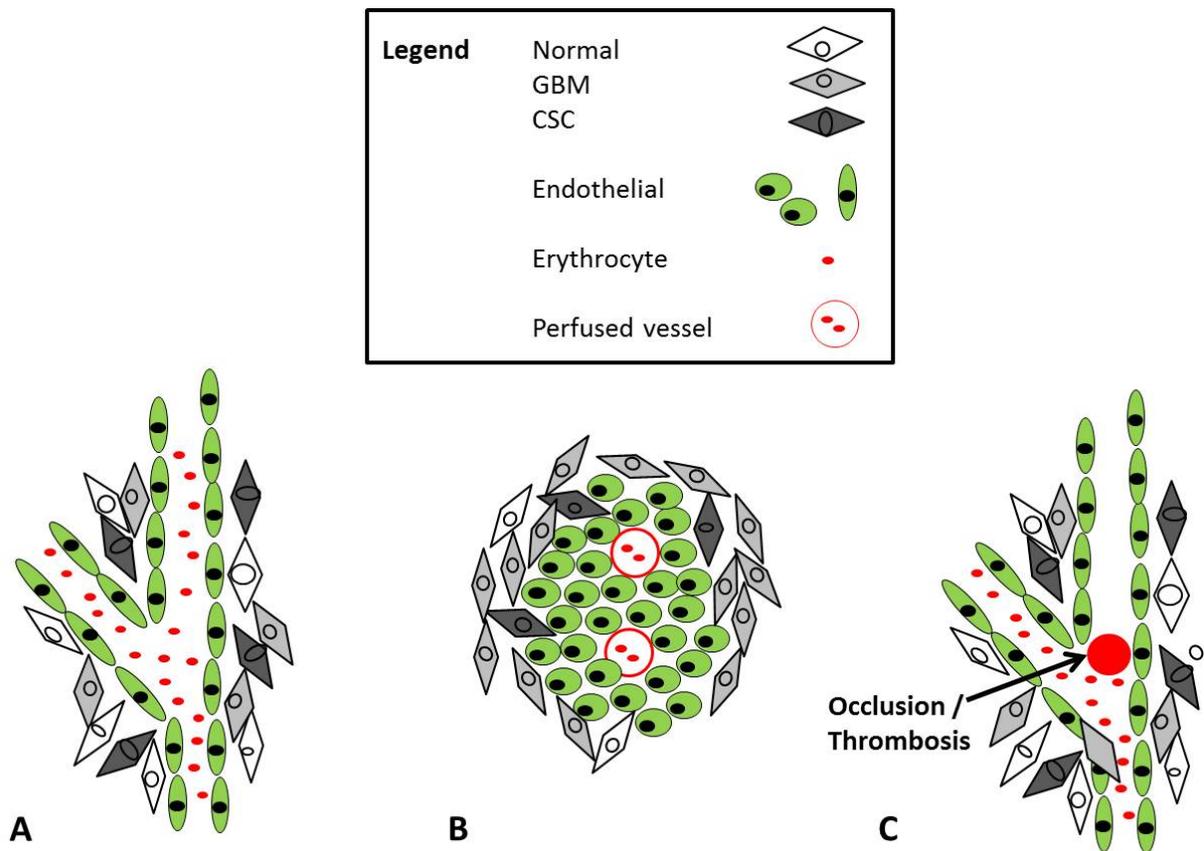


Abb. 1: Potentielle BTSC-Nischen im Glioblastom modifiziert nach Bar 2011 (Bar, 2011)
(A) Perivaskuläre Nische: Interaktionen mit Endothelzellen halten die BTSC in einem undifferenzierten Zustand. **(B) Hypoxische Nische,** angrenzend an ein glomeruloides Gefäßproliferat, welche häufig Nahe Nekrosen anzutreffen sind. **(C) Hypoxische Nische,** angrenzend an eine durch ein thrombosiertes Gefäß verursachte Nekrosezone.

2.5 Der Tumorstammzellmarker ALDH1

Aldehyde sind hochreaktive elektrophile Verbindungen, die in zahlreiche physiologische Prozesse eingreifen und in mutagenen, karzinogenen und zytotoxischen Vorgängen eine Rolle spielen (Vasiliou and Nebert, 2005). Die Funktion des zytosolischen Enzyms Aldehyddehydrogenase ist die irreversible Oxidation von Retinaldehyd zu Retinsäure (*retinoic acid*, RA). Diese wiederum bindet am nukleären Retinsäurerezeptor (*retinoic acid receptor*, RAR) (Elizondo et

al., 2009). Die RAR binden all-*trans*-RA (ATRA) und 9-*cis*-RA (Duester et al., 2003). Dadurch kann die RA in die Regulation von Genexpression und die Zelldifferenzierung eingreifen (Elizondo et al., 2009). Dies wird auch in der Stammzellforschung ausgenutzt, wo RA wie ATRA unter anderem zur Zelldifferenzierung eingesetzt werden (Tonge and Andrews, 2010). Bei niedrigen intrazellulären RA-Konzentrationen wird die Aktivität der ALDH gesteigert, was die Umsetzung von Retinaldehyd zu RA steigert (Elizondo et al., 2009). Die Konzentration dieser Verbindungen unterliegt einem Feedbackmechanismus, weshalb eine erhöhte Konzentration von RA zu einem gegenteiligen Effekt führt.

Die ALDH1 ist ein Enzym der ALDH-Familie und wurde in folgenden Geweben lokalisiert: Leber, Niere, rote Blutkörperchen, Skelettmuskel, Lunge, Mamma, Linse, Magenmukosa, Hirn, Pankreas, Hoden, Prostata und Ovar (Sladek, 2003).

Bereits 1990 konnte eine Anreicherung des Enzyms Aldehyddehydrogenase in hämatopoetischen Stammzellen gezeigt werden, weshalb sie seither auch als Marker für normale Stammzellen gilt (Kastan et al., 1990). Als sich in der neueren Forschung die Hinweise für die Tumorstammzellhypothese häuften, wurde auch in soliden Tumoren die ALDH1 als potentieller CSC-Marker untersucht. Dieser Nachweis gelang initial beim Mammakarzinom und wurde mittlerweile in zahlreichen Tumoren untersucht. Einerseits induzierten hierbei ALDH1-positive Zellen nach Xenotransplantation neues Tumorwachstum, andererseits konnte in einer immunhistochemischen Analyse eine Korrelation der ALDH1-Expression mit einer kürzeren Überlebenszeit gezeigt werden (Ginestier et al., 2007). Nachfolgend wurde die ALDH1 als Biomarker für CSC auch bei folgenden Karzinomen etabliert: kolorektales Karzinom (Hessman et al., 2012; Huang et al., 2009; Vogler et al., 2012), Prostatakarzinom (Kahlert et al., 2011), Lungenkarzinom (Jiang et al., 2009; Shien et al., 2012), Magenkarzinom (Katsuno et al., 2012), Blasenkarzinom (Su et al., 2010), Gallenblasenkarzinom (Liu et al., 2010) und Pankreaskarzinom (Kim et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnte beim Melanom (Prasmickaite et al., 2010) und beim hepatozellulären Karzinom (Suzuki et al., 2012) die ALDH1 jedoch nicht als CSC-Marker identifiziert werden. Weiterhin zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse beim Ovarialkarzinom (Chang et al., 2009).

Darüber hinaus wurde die Rolle der ALDH1 als Resistenzfaktor für die Strahlen- und Chemotherapie untersucht. In Zelllinien aus Lungenkarzinom und Mammakarzinom

erwies sich die ALDH1 im Gegensatz zu Sox2 oder CD133 als Marker für bestrahlungsresistente Subpopulationen (Mihatsch et al., 2011).

Weiterhin ist schon seit längerem bekannt, dass hämatopoetische Stammzellen mit hoher ALDH-Aktivität resistent gegen das Alkylans Cyclophosphamid (CP) sind (Hilton, 1984; Kastan et al., 1990). CSC aus dem Mammakarzinom zeigten nach Therapie mit Paclitaxel und Epirubicin einen Anstieg sowohl der Expression an ALDH1 als auch einen Anstieg ALDH1-positiver Zellen (Tanei et al., 2009).

Ein völlig neuer Ansatz ist der gezielte Angriff auf ALDH1A1 (A1=Isoform A1) - positive Tumorzellen durch CD8-positive T-Zellen. In Xenotransplantaten von Brust-/Pankreas- und Kopf-/Halskarzinomen konnten ALDH1A1-positive Zellen spezifisch ausgeschaltet, das Wachstum von Tumor und Metastasen gehemmt und das Überleben der betroffenen immungeschwächten Mäuse verlängert werden (Visus et al., 2011).

Zusammenfassend identifiziert das Enzym ALDH1 in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren CSC und spielt eine wichtige Rolle in der Therapieresistenz bei Strahlen- und Chemotherapie.

2.6 Zielsetzung

Basierend auf Tumorstammzellhypothese, Stammzellnischenhypothese und Bedeutung der ALDH1 als Biomarker für CSC lassen sich folgende Hypothesen aufstellen: (a) ALDH1-positive Zellen sind Biomarker für BTSC im GBM und halten sich in perivaskulären und hypoxischen Nischen auf. (b) Hypoxische Bedingungen wiederum erhalten einen BTSC-Phänotyp, weshalb unter Hypoxie auch eine vermehrte ALDH1-Expression erwartet wird. Darüber hinaus sind BTSC zu Tumorigenese, -wachstum und Rezidivbildung fähig. (c) Daraus folgt, dass sie auch Prädiktor für eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit von GBM-Patienten sind.

3 Material und Methodik

3.1 Verwendete Antikörper

Nachfolgend werden die verwendeten Primärantikörper aufgelistet einschließlich der verwendeten Verdünnungen: anti-ALDH1 (1:500; clone 44, monoklonal, Isotyp IgG, BD Biosciences, USA; NCBI full gene name aldehyde dehydrogenase 1 family member A1), anti-HIF1 α (1:500; polyklonal, IgG, Millipore, USA), anti-CD68 (1:100; monoklonal, Ratte, Abcam, USA), anti-GFAP (1:1000; monoklonal, IgG1, Sigma-Aldrich, USA), anti-Nestin (1:1000; monoklonal, Maus, IgG1, R&D Systems, USA), anti-Ki-67 (1:100; polyklonal, Kaninchen, Millipore, USA), anti-IDH1 (R132H) (1:100; Klon H09, Dianova GmbH, Hamburg).

3.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde an FFPE (formalin fixed paraffin embedded) Tumormaterial durchgeführt, die nach der WHO-Klassifikation als Glioblastom Grad IV klassifiziert wurden (Louis et al., 2007). Das Paraffingewebe wurde 2 μ m dick geschnitten, auf Objektträger (SuperFrost[®] Plus, Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und aufgeklebt. Nach dem Trocknen in einem Ofen bei 56°C über Nacht folgte die Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe 3x10 min in Xylol, 2x5 min in Isopropanol, 5 min in 96% Ethanol, 5 min in 70% Ethanol und die Rehydrierung in 5 min Aqua dest. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Präparate je nach Antikörper unterschiedlich vorbehandelt. Entweder erfolgte die Demaskierung in 10 mM Citrat-Puffer bei pH 6,0 im Dampfkochtopf für 7 min oder die Präparate wurden 20 min. in einer Mikrowelle bei 900 W gekocht in bei pH 6,0 oder 9,0. Zum Quenchen der endogenen Peroxidase inkubierten die Präparate anschließend in Dunkelheit für 15 min in 3% H₂O₂ (verdünnt in aqua dest.). Dann folgte der erste Waschgang in TRIS-Puffer pH 7,6 für 3x5 min und im Anschluss für je 15 min die Inkubation mit Avidin-/Biotin-Block (DAKO, Californien, USA). Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen inkubierten die Präparate in 5% Ziegenserum, verdünnt in Antikörperverdünnungslösung (DAKO, Californien, USA), in welcher auch im Anschluss die Antikörper aufgetragen wurden. Im Gegensatz zu den bisherigen Schritten, die alle bei Raumtemperatur vollzogen wurden, inkubierten

die Präparate mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4° C. Zur Detektion wurde je 15 min bei Raumtemperatur mit biotinyliertem Sekundär- und Streptavidin-Peroxidase-Tertiär-Antikörper (DAKO, Californien, USA) behandelt und wieder 3x5 min gewaschen. Die Zugabe von DAB-Chromogen (DAKO, Californien, USA) als Substrat für die Peroxidase für 4 min und 10 min Waschen in TRIS-Puffer folgten. Nun wurden die Zellkerne und der Gewebehintergrund gegengefärbt mit Haemalaun (Apotheke, Klinikum rechts der Isar) und unter fließendem Wasser 10 min differenziert. Die Dehydrierung wurde in aufsteigender Alkoholreihe durchgeführt, danach erfolgte die Fertigstellung des Präparates durch Eindeckeln mit Pertex (Histolab, Göteborg, Schweden) Eindeckmedium und aufbringen eines Deckglases.

Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch die Auszählung der positiven Zellen durch den Autor dieser Arbeit sowie durch zwei erfahrene Neuropathologen. Innerhalb des Tumorgewebes wurden randomisiert insgesamt jeweils vier Gesichtsfelder ausgewertet und durchschnittlich etwa 200 Zellen ausgezählt. Das Verhältnis der positiven zu den negativen Zellen zeigte den Anteil der ALDH1⁺ Zellen an. Aus dem Durchschnitt aller drei Auswertungen ergab sich das zur Analyse verwendete Verhältnis in Prozent positiver zu negativen Zellen.

Immunhistochemische Doppelfärbungen

Zur Durchführung der Doppelfärbungen erfolgte die Färbung mit dem ersten Antikörper analog der oben beschriebenen Methodik bis einschließlich der Färbung mit DAB-Chromogen. Nach dem anschließenden Waschen wurde der zweite Antikörper ebenfalls über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Färbung des zweiten Antikörpers wurde dann nach der APAAP-Methode (*Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex*; DAKO, Californien, USA) durchgeführt. Bis auf den Peroxidase-Quench entspricht die weitere Durchführung der Einfachfärbung. Folgende Antikörperverdünnungen wurden gewählt anti-CD-68 1:500; anti-ki67 1:100.

Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus

Zunächst wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) der Tumorpräparate angefertigt. Auf diesen wurden dann die Tumorareale mit einem Stift markiert und mechanisch abgetragen. Aus diesem Material erfolgte dann die Probengewinnung zur Durchführung einer quantitativen real-time PCR (qRT-PCR), genannt MethyQESD (Bettstetter et al., 2008). Diese erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. Bettstetter vom Institut für Pathologie der TUM.

3.3 Patientenkollektiv

Für diese retrospektive Kohortenstudie wurden Patienten aus der Datenbank des Instituts für Pathologie der TU München aus den Jahren 2006-2011 ausgewertet. Einschlusskriterien waren folgende: 1. Diagnose eines primären Glioblastom WHO Grad IV durch einen Facharzt für Neuropathologie. 2. Alter unter 80 Jahre. 3. Mindestens zwei Monate Überlebenszeit nach Operation. 4. Begleitende adjuvante Therapie (konkomitante und/oder adjuvante Chemotherapie mit/ohne Radiotherapie oder alleinige Radiotherapie). Ausgeschlossen wurden 1. Patienten mit sekundären Glioblastomen. 2. postoperative Überlebenszeit < 2 Monate. 3. Keine adjuvante Therapie. 4. Patienten zu denen ausschließlich bioptisches Material vorhanden war.

3.4 Statistik

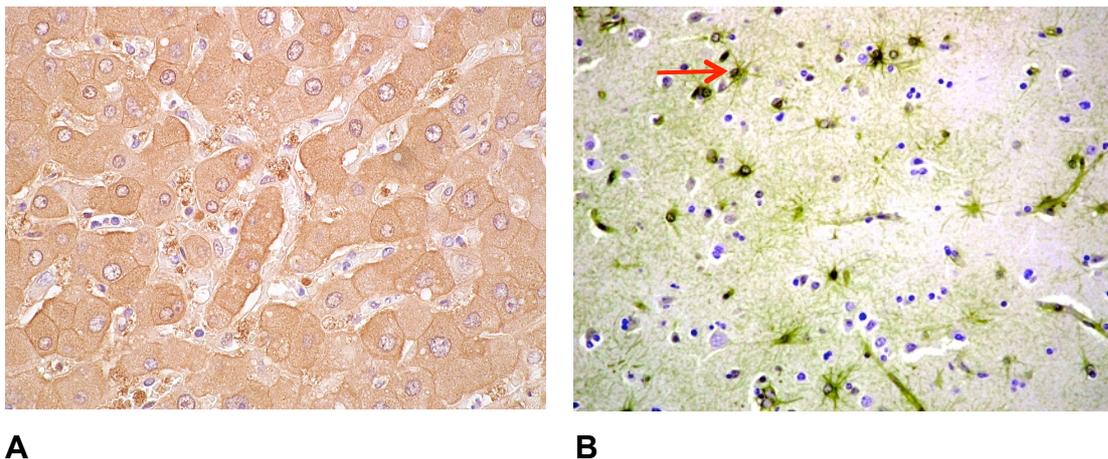
Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden Überlebenskurven nach Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Gruppenunterschiede wurden mittels des Log-Rang-Tests (Mantel-Cox) errechnet. Eine multivariate Analyse anhand der Cox-Regression diente dazu, die ALDH1-Expression als unabhängigen prädiktiven Faktor zu ermitteln. Die einzelnen Variablen waren Alter, Geschlecht, Art der Therapie und der MGMT-Status.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung ALDH1⁺ Zellpopulationen in Normalhirn und GBM

4.1.1 ALDH1⁺ Zellen im Normalhirn und der Subventrikulären Zone (SVZ) beim Gesunden

Als Positivkontrolle für die ALDH1-Immunhistochemie diente gesundes Lebergewebe (Abb. 2A). Im HE-gefärbten histologischen Schnitt von Hirngewebe zu dem nach Sektion kein pathologischer Befund erhoben wurde (nachfolgend Normalhirn genannt), zeigten sich ALDH1⁺ Zellen. Kortexnahes Gewebe von einem alten Menschen (81 Jahre) mit altersentsprechendem neuropathologischen Befund, sowie von einem kurz nach der Geburt verstorbenen Neugeborenen wiesen ein identisches Färbemuster auf (Abb. 2B). Im Normalhirn färbten sich die Zellen fast ausschließlich cytoplasmatisch und verglichen mit den nachfolgend beschriebenen GBM-Präparaten weniger intensiv an. Die multiplen Zellfortsätze lassen morphologisch einen differenzierten astrozytären Zelltyp erkennen.

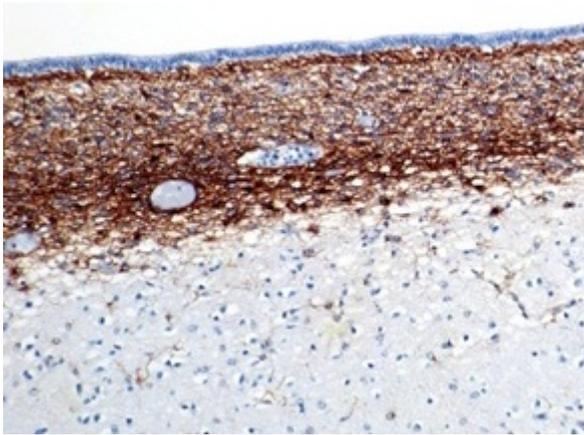


A

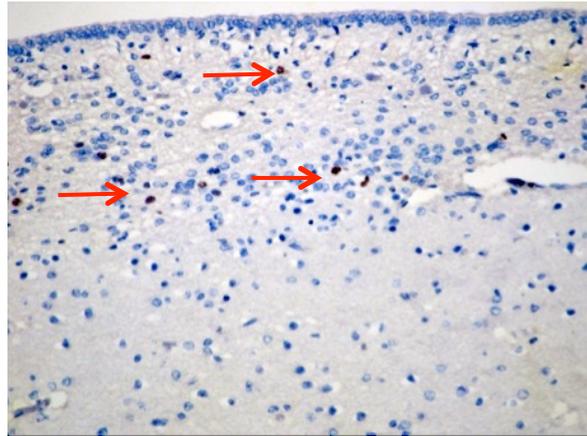
B

Abb. 2: ALDH1 positive Zellen in gesundem Lebergewebe (A) und Normalhirn (B)

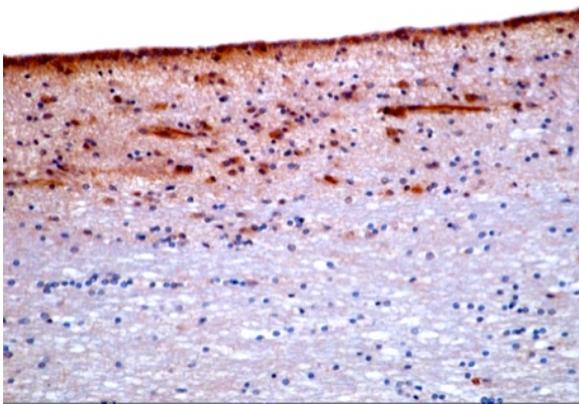
Die Immunhistochemie gesunden Lebergewebes diente als Positivkontrolle (Zellen braun gefärbt) (A). Auch in Normalhirn (B) fanden sich positive Zellen (roter Pfeil), die morphologisch einem differenzierten Zelltyp entsprechen.



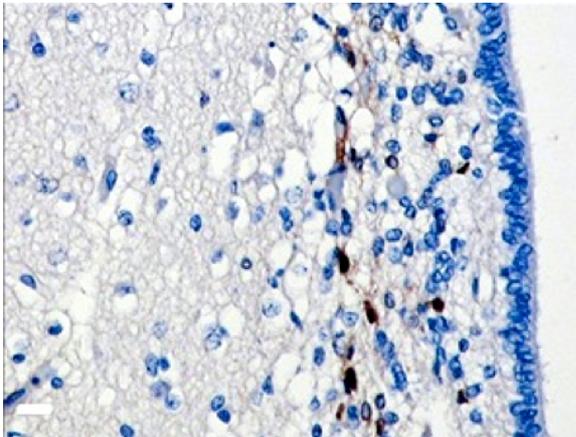
A



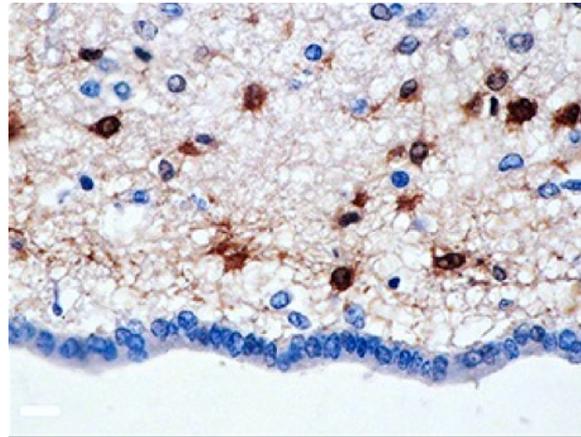
B



C



D



E

Abb. 3: Immunhistochemische Färbungen der Subventrikulärzone (SVZ) gesunden Hirngewebes (positive Zellen braun).

(A) GFAP⁺ Zellen in der SVZ, Ependymzellen und angrenzendes Hirngewebe sind negativ. (B) Vereinzelt ki67⁺ Zellen im Zellband der Schicht III (Pfeile). (C) Sowohl Ependymzellen (EP) als auch subventrikuläre Zellen sind Nestin⁺ (braun). (D) und (E) zeigen ALDH1⁺ Zellen (braun) im Zellband der Schicht III.

Zunächst wurde untersucht, ob sich im gesunden Hirngewebe ALDH1⁺ Zellen finden, welche sich bereits durch etablierte Marker identifizieren ließen. Astrozyten in der SVZ wurden als multipotente neurale Stammzellen identifiziert (Doetsch et al., 1999). In der SVZ eines kurz nach der Geburt an einem Herzfehler verstorbenen Neugeborenen ließ sich in allen Schichten der SVZ eine deutliche Reaktion mit dem astrozytären Marker GFAP nachweisen (Abb. 3 A). Um eine Zellproliferation im untersuchten Hirngewebe festzustellen, wurde der Proliferationsmarker ki67 verwendet. Es fanden sich nur vereinzelt positive Zellen (Abb. 3 B). Für den gut etablierten neuronalen Stammzellmarker Nestin fanden sich ebenfalls positive Zellen in der SVZ sowie auch positive Ependymzellen (Abb. 3 C). ALDH1⁺ Zellen fanden sich ausschließlich im Zellband der Schicht III (Abb. 3 D + E; Abbildungen bereits publiziert in (Rasper, M., Schäfer, A., Piontek, G., **Teufel, J.**, Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C. and Schlegel, J., 2010). In allen Färbungen war das angrenzende Hirngewebe negativ.

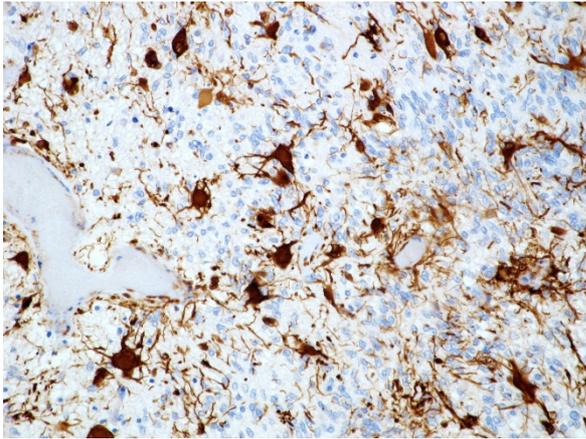
4.1.2 Charakterisierung ALDH1⁺ BTSC im GBM

Im GBM-Gewebe zeigten sich ALDH1⁺ Zellen in variabler Quantität (siehe Auswertung 4.4) und Qualität. Bezüglich des Färbemusters zeigten die Zellen im Tumorgewebe eine deutlich intensivere Färbung als im Normalhirn. Grundsätzlich handelt es sich bei dem Enzym ALDH1 um ein cytoplasmatisches sowie mitochondrial exprimiertes Protein. Ein hervorstechendes Merkmal der immunhistochemischen Färbungen im Tumorgewebe waren jedoch Zellen, welche sich sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär positiv angefärbt zeigten (Abb. 4 A). Rein morphologisch ließen sich unterschiedliche Typen des Tumorgewebes unterscheiden: bei geringerer Zelldichte fand sich vor allem ein großzelliger Phänotyp mit wenigen, dicken Fortsätzen (Abb. 4 A) und bei hoher Zelldichte fand sich ein eher kleinzelliger Phänotyp ohne sichtbare Zellfortsätze (Abb. 4 B).

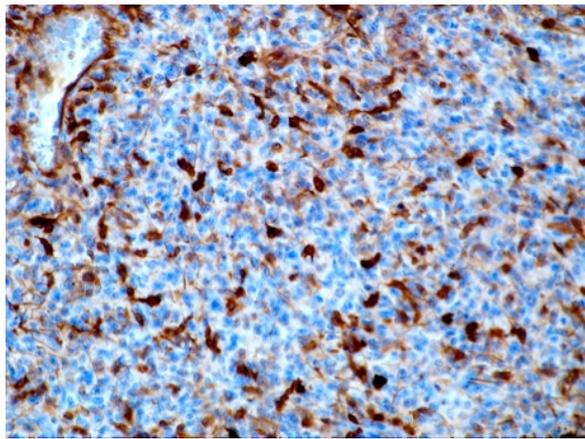
Der großzellige Phänotyp zeigte morphologisch eine den Mikrogliazellen ähnliche Erscheinung. Im GBM wurde bereits nachgewiesen, dass neoplastische Zellen phagozytische Eigenschaften besitzen (Persson and Englund, 2012). Zur weiteren Differenzierung wurde weshalb eine Doppelfärbung mit ALDH1 und dem Makrophagenmarker CD68 durchgeführt. Einige der Tumorzellen mit großzelligem Phänotyp zeigten eine positive Reaktion für beide Antikörper. Diese Zellen fanden

sich diffus im Gewebe verteilt ohne bevorzugte Lokalisation (Abb. 4 C + D). Die Mehrzahl der ALDH1⁺ Zellen zeigt jedoch keine Positivität für CD68.

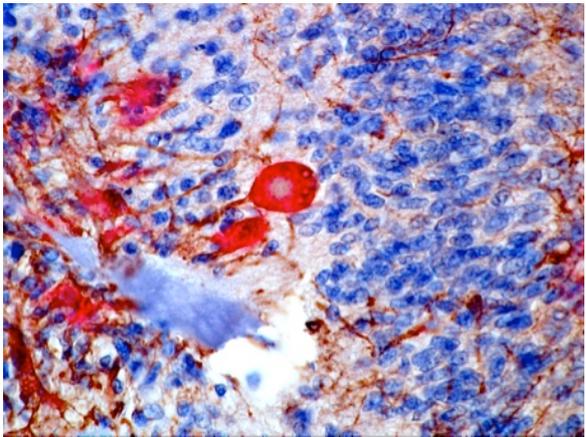
Wie bereits bei gesundem Gewebe wurde an einigen Präparaten eine Doppelfärbung mit ALDH1/ki67 durchgeführt mit der Frage, ob ALDH1⁺ Zellen vor allem in Bereichen des Tumors zu finden sind, die wenig proliferierende Zellen zeigen (Abb. 4 E + F). Morphologisch zeigte sich hier ein reverses Expressionsmuster. In Bereichen des Tumors, wo sich viele ki67⁺ Zellen fanden, zeigten sich wenige ALDH1⁺ Zellen und vice versa (Abb. 4 E + F). Eine Quantifizierung an der gesamten Kohorte wurde jedoch nicht durchgeführt.



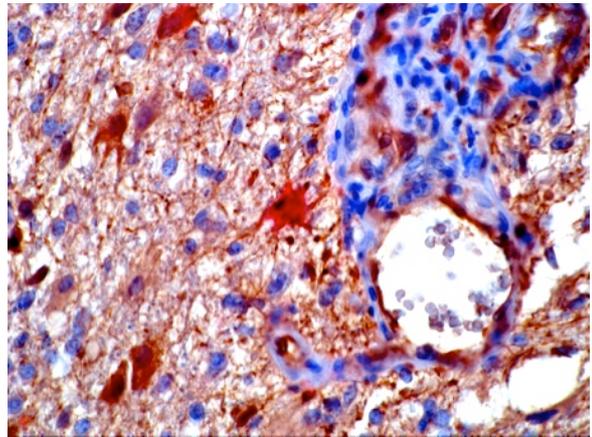
A



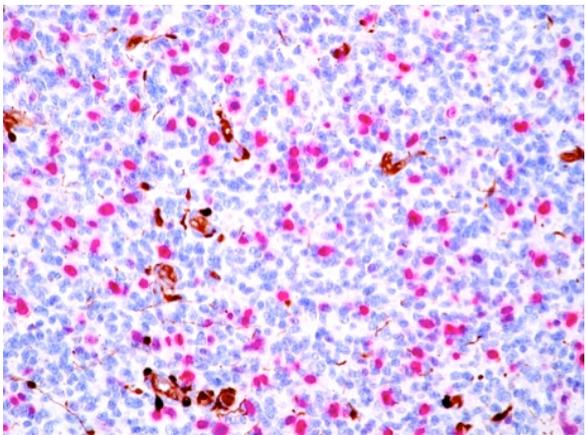
B



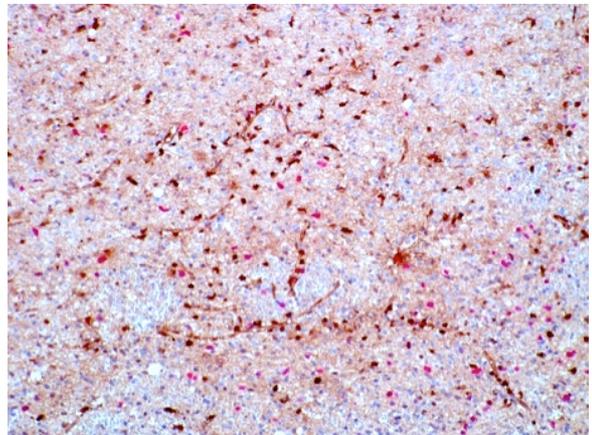
C



D



E



F

Abb. 4: Immunhistochemie von GBM-Gewebe mit ALDH1, ALDH1/CD68 und ALDH1/ki67

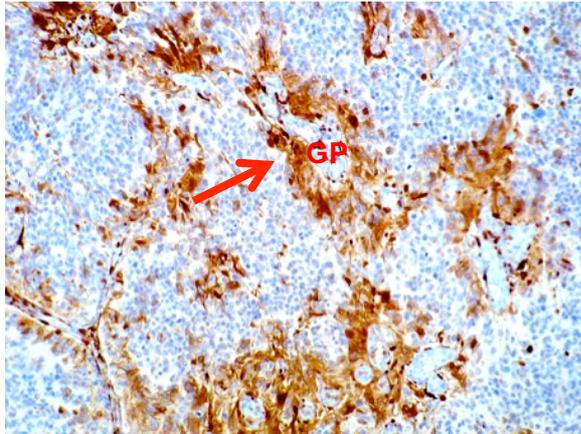
(A) zeigt einen großzelligen entdifferenzierten Phänotyp, (B) einen kleinzelligen Phänotyp ohne Fortsätze (jeweils braun). (C) und (D) zeigen einzelne CD68⁺ Zellen (rot), deren Fortsätze ALDH1⁺ sind (braun). In (E) und (F) finden sich ki67⁺ (rot) und ALDH1⁺ (braun) Zellen, die ein reverses Expressionsmuster zeigen. ALDH1⁺ Zellen finden sich vor allem in Arealen mit geringer Proliferation.

Alle untersuchten Tumoren waren positiv für den BTSC-Marker Nestin. Die Expression zeigte ein homogenes Muster innerhalb der Tumorareale mit einem hohen Anteil positiver Zellen (Abb. 7 A). Ein selektives Muster um Gefäße oder Nekrosezonen war demnach hierbei nicht erkennbar.

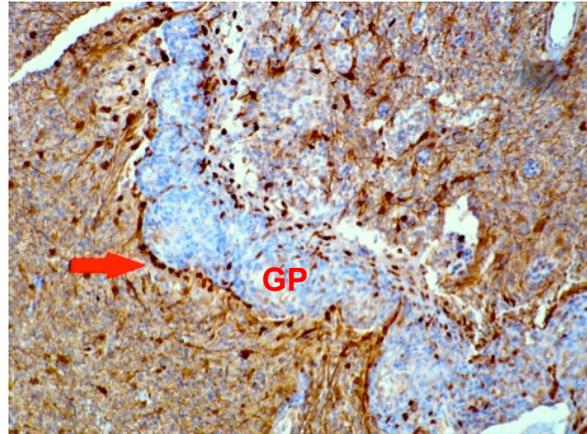
Zur Unterscheidung zwischen primären und sekundären GBM untersuchten wir die Expression der IDH1 (R132H). In allen von uns untersuchten Tumoren fand sich nur ein einziger positiver Fall, alle anderen waren negativ. Damit handelt es sich in der untersuchten Kohorte nahezu ausschließlich um primäre GBM.

4.1.3 ALDH1⁺ BTSC finden sich im GBM perivaskulär und in der Nähe hypoxischer Areale

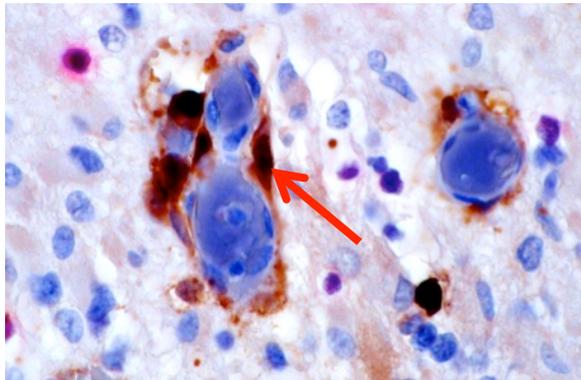
Auf Grund der Hypothese, dass GBM-BTSC in perivaskulären Stammzellnischen lokalisiert sind, wurden insbesondere diese Areale morphologisch untersucht. In allen angefärbten Präparaten zeigten sich perivaskulär ALDH1⁺ Zellen, sowohl um glomeruloide als auch um endotheliale Gefäßproliferate (Abb. 5 A + B), respektive Nischen mit hypoxischem Milieu. Meist fand sich eine intensivere Positivität dieser Zellen, die zudem von den Endothelzellen deutlich abgrenzbar waren (Abb. 5 C).



A



B

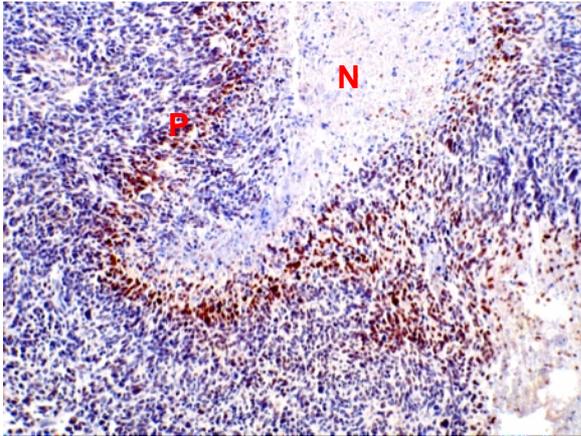


C

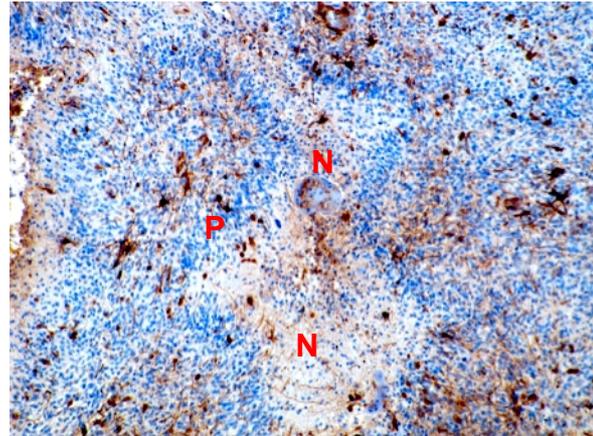
Abb. 5: ALDH1⁺ Zellen sind in perivaskulären Nischen lokalisiert

ALDH1⁺ Zellen sind im GBM vor allem perivaskulär lokalisiert (roter Pfeil). Diese finden sich sowohl um endotheliale (A) und glomeruloide (B) Gefäßproliferate (GP). (C) zeigt die enge Nachbarschaft mit den deutlich abgrenzbaren Endothelzellen, wobei die ALDH1⁺ Zellen (braun) morphologisch nicht von den umgebenden Tumorzellen zu unterscheiden sind.

Die eingangs beschriebene Hypothese der hypoxischen Nische fand sich durch die immunhistochemische Färbung mit HIF1 α bestätigt, hier zeigten sich positive Zellen mit deutlicher Assoziation zu Nekrosezonen, insbesondere im Bereich der Pseudopalisaden (Abb. 6 A). Auch ALDH1⁺ fanden sich in nekrotischen Arealen (Abb. 6 B). Jedoch verteilten sich diese eher diffus in und um die Nekrosezone. Eine Überlappung, bzw. dem HIF1 α korrespondierendes Färbemuster ließ sich nicht erkennen. Ebenso konnte insgesamt kein höherer Anteil ALDH1⁺ Zellen im Tumor festgestellt werden. Darüber hinaus imponierte die Expression der ALDH1⁺ Zellen insgesamt sehr heterogen, eine regionale Präferenz innerhalb des Tumorgewebes ließ sich nicht feststellen.



A



B

Abb. 6: Nekrosezonen mit angrenzenden HIF1 α ⁺ (A) sowie ALDH1⁺ Zellen (B)

Während sich die HIF1 α ⁺ (A) Zellen (braun) homogen im hypoxischen Bereich um die Nekrose (N) finden, sind die ALDH1⁺ (B) Zellen (braun) diffus in und um die Nekrose (N), bzw. Pseudopalisaden (P) verteilt.

4.2 Das Enzym ALDH1 ist ein potentieller prädiktiver Marker für die postoperative mediane Überlebensdauer bei GBM-Patienten

Insgesamt wurden in die Studie 70 Patienten eingeschlossen (medianes Lebensalter bei Diagnosestellung 63 Jahre; SD +/- 9; 35-80 Jahre), wovon 50 männlich und 20 weiblich waren. Die Tumorsektate stammten aus Neurochirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar (n=55) und der Berufsgenossenschaftlichen Klinik Murnau (n=15). 50 Patienten erhielten postoperativ die Standardtherapie nach Stupp et al., Radiotherapie mit konkomitanter und adjuvanter Chemotherapie mit TMZ. Vier Patienten erhielten Radiotherapie und konkomitante Chemotherapie mit TMZ, 14 Patienten wurden nur bestrahlt und 2 ausschließlich mit TMZ behandelt.

Die Patienten wurden hinsichtlich ihres MGMT- und ALDH1-Status untersucht. Das mediane Überleben der Patienten lag bei 16,6 Monaten (SD 1,66 Monate; verstorben n=54; noch lebend und in der Analyse zensiert n=16). Eine Angabe des medianen Gesamtüberlebens war nicht möglich, da nicht alle Überlebenszeiten jenseits des Medians lagen. Letztere wurden in der Analyse zensiert. Hinsichtlich der postoperativen Therapie wurden zwei Gruppen untersucht. Die erste Gruppe wurde nach der Standardtherapie (Stupp-Schema) behandelt, in die zweite Gruppe (Nicht-Stupp) wurden Patienten mit alleiniger postoperativer Radiotherapie oder jeweils konkomitanter / adjuvanter Chemotherapie mit TMZ eingeschlossen. Die Therapie zeigte sich unabhängig von Geschlecht (Chi-Quadrat nach Pearson $p=0,867$) oder MGMT-Status (Exakter Test nach Fisher $p=0,761$).

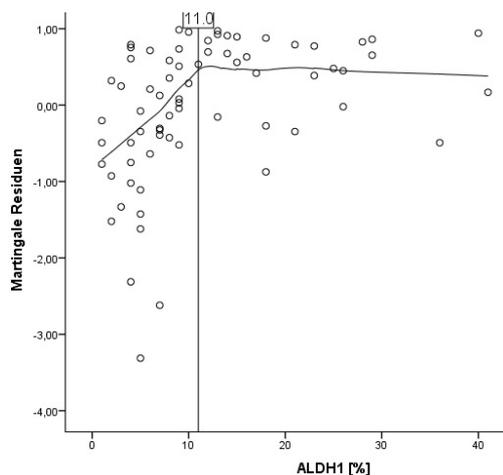


Abb. 7: Analyse der Martingale-Residuen nach Anteil der ALDH1⁺ Zellen [%]

Die Analyse der Martingale-Residuen zeigt visuell eine signifikante Änderung bei ca. 11% ALDH1⁺ Zellen an. Dieser Wert wurde als cut-off für die Korrelationsanalyse verwendet.

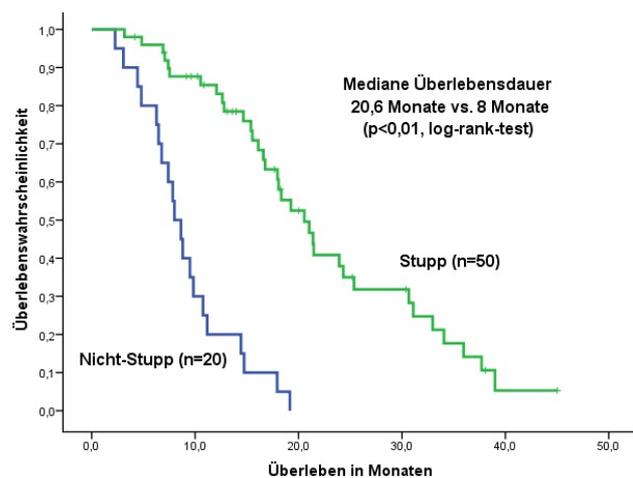


Abb. 8: Kaplan-Meier Analyse mit medianer Überlebensdauer nach Therapiegruppen

Die Kaplan-Meier Analyse zeigt eine längere mediane Überlebensdauer für die Stupp-Gruppe (n=50) an.

Der Anteil ALDH1⁺ Zellen innerhalb des Tumorgewebes der Primärtumoren variierte von 1% bis 40%. In der multivariaten Analyse zeigte sich die ALDH1-Expression unabhängig von Alter oder Geschlecht. Zur Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch den ALDH1-Status wurde zur Bestimmung des cut-off eine Analyse der Martingale Residuen durchgeführt. Ab ca. 11% ALDH1 zeigte sich ein linearer Einfluss des ALDH1-Status. Daher wurde der cut-off für die Auswertung bei $\leq 10\%$ für eine niedrige Expression (ALDH1^{low}) und $> 10\%$ für eine hohe Expression (ALDH1^{high}) fest. Für die quantitative Bestimmung der MGMT-Methylierung wurde der cut-off mittels quantitativer Analyse der Martingale-Residuen festgelegt (Grambsch et al., 1995). Die visuell bewertete Kurve zeigte eine Änderung bei 20%, weshalb für MGMT⁺ $\geq 20\%$ und MGMT⁻ $< 20\%$ festgelegt wurde. Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Patienten nach Therapie, Geschlecht, Alter sowie MGMT-/ALDH1-Status.

	MGMT					ALDH1			
	Gesamt	methyliert		Nicht methyliert		≤ 10%		> 10%	
	Anzahl	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Patienten	70	17	24	53	76	42	60	28	40
Therapie									
Standard ¹	50	13	19	37	53	33	47	17	24
Andere ²	20	4	6	16	23	9	13	11	16
Geschlecht									
Männlich	50	13	19	37	53	31	44	19	27
Weiblich	20	4	6	16	23	11	16	9	13
Alter [Jahre]³									
< 60	24	5	7	19	27	18	26	6	9
60-70	31	8	11	23	33	17	24	14	20
> 70	15	4	6	11	16	7	10	8	11

¹ Therapie nach Stupp et al.; ² Nicht-Stupp: postoperativ ausschließlich adjuvante Bestrahlung oder konkomitante Chemotherapie (TMZ) oder adjuvante Chemotherapie (TMZ); ³ Alter der Patienten bei Diagnosestellung

Tabelle 1: Verteilung der Patienten nach Therapie, Geschlecht, Alter sowie MGMT- und ALDH1-Status

Die Korrelationsanalyse ergab eine höhere mediane Überlebenswahrscheinlichkeit mit 21 Monaten für Patienten mit niedrigem ALDH1-Status (ALDH1^{low}; n=42) und eine geringere mediane Überlebenswahrscheinlichkeit mit 9,8 Monaten für Patienten mit hoher Expression der ALDH1 (ALDH1^{high}; n=28; p<0,0001). In der multivariaten Cox-Regression ließ sich ein Einfluss des Lebensalters ausschließen (p=0,857). Für die jeweiligen Therapiegruppen ergab die Cox-Regressionsanalyse eine Korrelation zwischen Überlebenswahrscheinlichkeit und ALDH1-Status lediglich für die Therapie nach Stupp (p<0,001). In der nicht-Stupp Gruppe zeigte die ALDH1-Expression keinen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (p=0,217) bei einem medianen Überleben von 8,6 Monaten für ALDH1^{low} und 6,7 Monaten für ALDH1^{high}.

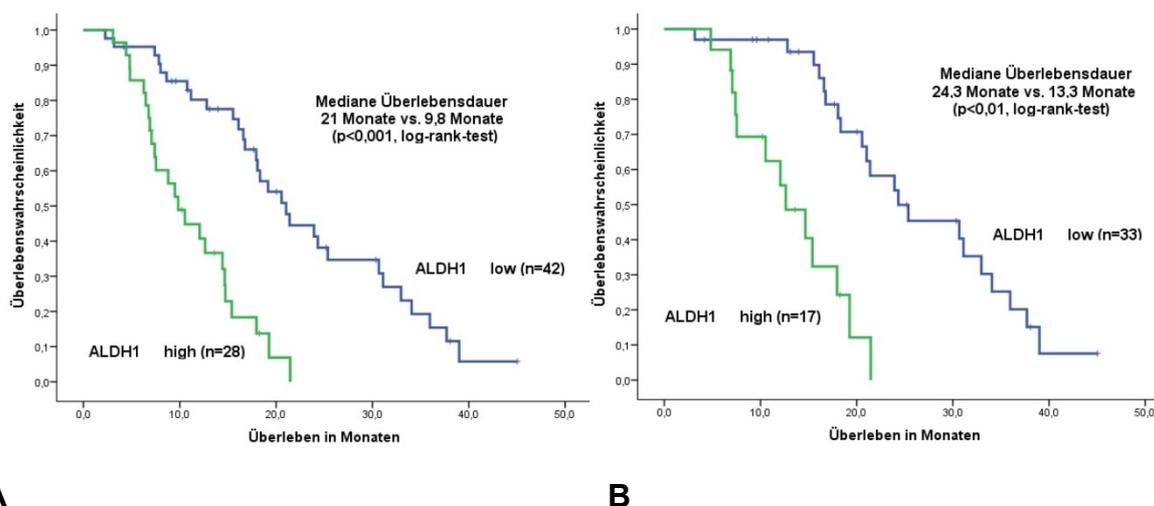


Abb. 9: Kaplan-Meier Analyse mit medianer Überlebensdauer nach ALDH1-Status der gesamten Kohorte (A) sowie der Stupp-Gruppe (B)

(A) Eine niedrige ALDH1-Expression (ALDH1^{low}) korreliert signifikant ($p < 0,001$) mit einer längeren postoperativen Überlebensdauer, unabhängig von Alter, Geschlecht und MGMT-Status. (B) Innerhalb der Therapiegruppe nach Stupp bleibt die Korrelation des ALDH1-Status mit dem postoperativen Überleben. Dies galt nicht für die Nicht-Stupp Gruppe. Die Abbildung wurde bereits publiziert in Schäfer, A., Teufel, J., Ringel, F., Bettstetter, M., Hoepner, I., Rasper, M., Gempt, J., Koeritzer, J., Schmidt-Graf, F., Meyer, B., Beier, C. P. and Schlegel, J. (2012).

Die Analyse der Therapiegruppen ergab einen deutlichen Überlebensvorteil für die Standardtherapie nach Stupp (log-rank-test $p < 0,01$). Deren medianes Überleben ($n = 50$) lag mit 24,3 Monaten deutlich über den 13,3 Monaten für die Nicht-Stupp Gruppe ($n = 20$). Weder in der Stupp-Gruppe ($p = 0,216$) noch in der Nicht-Stupp-Gruppe ($p = 0,882$) folgte jedoch aus dem Methylierungsstatus ein signifikanter Überlebensvorteil und korrelierte auch nicht mit der Überlebenswahrscheinlichkeit ($p = 0,171$) und war unabhängig vom Alter der Patienten ($p = 0,81$). Das mediane Überleben der MGMT⁻ Patienten lag bei 24,3 Monaten und der MGMT⁺ bei 19,2 Monaten ($p = 0,21$). Die weitere Analyse nach ALDH1-Status zeigte wiederum eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit für eine niedrige Expression. Dabei lag in der Gruppe der MGMT⁺ Fälle das mediane Überleben bei 21,4 Monaten für ALDH1^{low} und 12,6 Monaten für ALDH1^{high} ($p = 0,005$) sowie in der Gruppe der MGMT⁻ Fälle bei 32,9 Monaten für ALDH1^{low} und 14,6 Monaten für ALDH1^{high} ($p = 0,0004$).

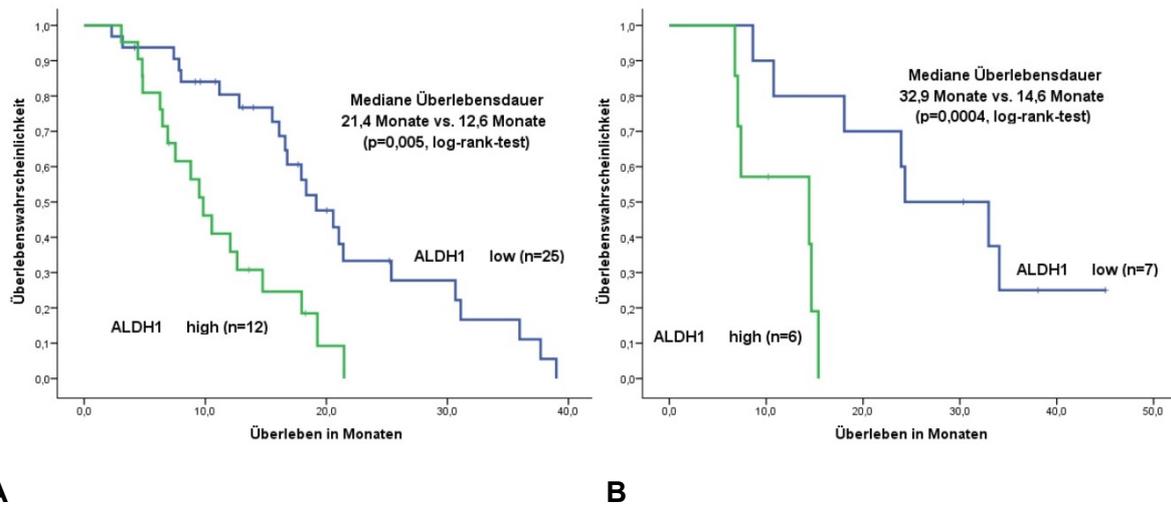


Abb. 10: Kaplan-Meier Analyse mit medianer Überlebensdauer nach ALDH1-Status für MGMT⁺ (A) und MGMT⁻ (B) Tumoren

Sowohl für (A) MGMT⁺ als auch für (B) MGMT⁻ Tumoren zeigt eine niedrige ALDH1-Expression ($\leq 10\%$ positive Zellen) eine längere mediane Überlebensdauer an (MGMT⁺/ALDH1^{low} 21,4 Monate; MGMT⁻/ALDH1^{low} 32,9 Monate). Die Abbildung wurde bereits publiziert in Schäfer, A., Teufel, J., Ringel, F., Bettstetter, M., Hoepner, I., Rasper, M., Gempt, J., Koeritzer, J., Schmidt-Graf, F., Meyer, B., Beier, C. P. and Schlegel, J. (2012).

4.2.1 In Rezidivglioblastomen zeigt sich ein erhöhter Anteil ALDH1⁺ Tumorzellen

Zusätzlich zu den Primärtumoren (n=70) wurden Tumorresektate von Rezidiv-GBM (n=14) hinsichtlich ihrer ALDH1-Expression quantitativ untersucht. Insgesamt fiel der Anteil der ALDH1⁺ Zellen bei den Rezidiven deutlich höher aus als bei den Erstpräparaten. Die mittlere ALDH1-Expression der Primärtumore lag bei 8,5%, wohingegen bei den Rezidivtumoren nach erneuter Resektion die Expression auf 28,6% anstieg (Abb. 11 A). Alle Rezidiv-GBM waren zuvor entsprechend der Standardtherapie nach dem Stupp-Schema sowohl radiotherapiert als auch mit TMZ chemotherapiert worden. Abb. 11 B zeigt exemplarisch die deutlich erhöhte Expression der ALDH1 in einem Rezidivtumor. (Abb. 11 A und B wurden bereits publiziert in Schäfer, A., **Teufel, J.**, Ringel, F., Bettstetter, M., Hoepner, I., Rasper, M., Gempt, J., Koeritzer, J., Schmidt-Graf, F., Meyer, B., Beier, C. P. and Schlegel, J. (2012).

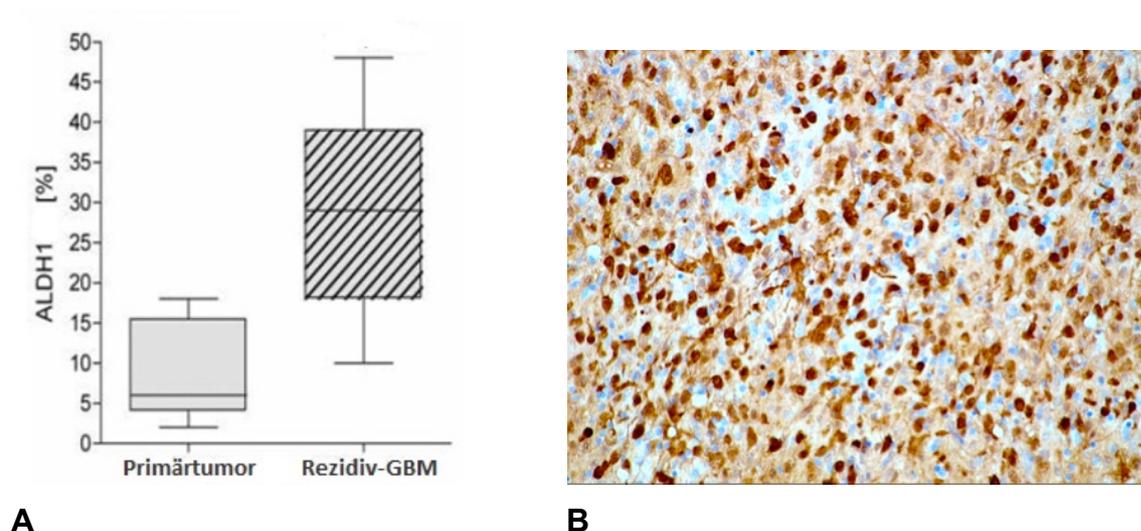


Abb. 11: ALDH1-Expression in Primärtumoren und Rezidiv-Glioblastomen

(A) Boxplot-Diagramm der ALDH1-Expression der Primärtumore (n=70) sowie der Rezidiv-GBM (n=14). Der mittlere Anteil ALDH1-positiver Zellen stieg von 8,5% auf 28,6% an. (B) ALDH1⁺ Tumorgewebe eines Rezidiv-GBM mit deutlich erhöhter Expression.

5 Diskussion

Grundlage dieser Arbeit ist ein neues Paradigma zur Tumorentstehung, welches von einem hierarchischen Modell ausgeht (Reya et al., 2001). Demzufolge initiiert eine kleine Subpopulation im GBM mit Stammzeleigenschaften das Tumorentstehung, macht sie therapieresistent und fördert Rezidive (Singh et al., 2004a). Die Charakterisierung dieser Zellen, insbesondere ihrer Lokalisation, spielt demzufolge eine wichtige Rolle zur Identifikation potentieller therapeutischer Ziele.

Die erste wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist der morphologische immunhistochemische Nachweis ALDH1⁺ Zellen in Bereichen, wo Stammzellen charakterisiert werden konnten. Beim gesunden Menschen konnten Astrozyten als neurale Stammzellen in der SVZ identifiziert werden (Doetsch et al., 1999), wo sie sich in Stammzellnischen aufhalten. Diese Nischen halten sowohl die normalen neuronalen, als auch die BTSC in einem stammzellartigen Zustand (Gilbertson and Rich, 2007). Anhand des Astrozyten-Markers GFAP fanden sich jene Zellen in allen Abschnitten der humanen SVZ vor allem im Zellband der Schicht III sowie direkt unter der dem Ependym angrenzenden hypozellulären Schicht (Quinones-Hinojosa et al., 2006).

An dieser Stelle sei bezüglich der Verwendung der Bezeichnung ALDH1 sowie ALDH1A1 (Isoform A1) eingegangen. Wie bereits im Methodenteil erwähnt, wurde der Antikörper anti-ALDH1 (clone 44, monoklonal, Isotyp IgG, BD Biosciences, USA) verwendet. In der 2010 von Rasper et al. publizierten Arbeit, wurde daher die Bezeichnung ALDH1 verwendet, da dies dem von der Firma angegebenen Immunogen entspricht (Human ALDH1). In der 2012 von Schäfer et al. publizierten Artikel wurde die Bezeichnung ALDH1A1 verwendet unter der Annahme, dass vom verwendeten Antikörper nur die Isoform A1 erkannt wird (NCBI full gene name aldehyde dehydrogenase 1 family member A1). Letztlich kann nicht ausgeschlossen werden, ob durch den verwendeten Antikörper nicht auch andere Isoformen erkannt werden und eine Kreuzreaktion stattfindet. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung ALDH1 verwendet.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich praktisch alle subventrikulären Zellen GFAP⁺. Weiterhin zeigten sich nach Färbung mit dem Proliferationsmarker ki67 nur vereinzelte proliferierende Zellen. In Hinblick darauf, dass sich Stammzellen in einem

Ruhezustand befinden, ist dieses Ergebnis konsistent. Der Nachweis ALDH1⁺ Zellen in der subventrikulären Zone deutet demnach darauf hin, dass es sich hierbei möglicherweise um astrozytäre neurale Stammzellen handelt. Allerdings können diese morphologisch nicht von anderen Zelltypen innerhalb der SVZ differenziert werden. Daher könnte es sich bei diesen auch um neuronale Vorläuferzellen oder Oligodendrozyten handeln. Weiterhin wurden für die SVZ unterschiedliche Astrozyten-Subpopulationen beschrieben (Typ B Zellen) (Sanai et al., 2004). Bisher ist nicht bekannt, ob lediglich eine oder auch alle dieser Subpopulationen Stammzeleigenschaften besitzen oder tatsächlich Stammzellen sind. Da sich im Verhältnis zu den GFAP⁺ Zellen nur wenige ALDH1⁺ Zellen fanden, könnte es sich bei den ALDH1⁺ Zellen um eine Subpopulation mit Stammzeleigenschaften handeln. Eine regionale Verteilung innerhalb der SVZ wurde für diese Subpopulation nicht untersucht. Es wurde jedoch an anderer Stelle beschrieben, dass sich in allen Abschnitten der SVZ GFAP⁺ Zellen finden und die neuronalen Marker Tuj 1 sowie NeuN eine regional beschränkte Expression aufweisen (Quinones-Hinojosa et al., 2006).

Im Gegensatz dazu konnten von Adam et al. keine ALDH1⁺ Zellen in Stammzellnischen eines wenige Wochen alten Fetus identifiziert werden (Adam et al., 2012). Darüber hinaus zeigte sich die Mehrheit (82%) der in dieser Arbeit untersuchten ALDH1-positiven GBM-Tumorzellen positiv für GFAP und S100, was auf eine astrozytäre Differenzierung hinweist. Von Adam et al. wurde daher postuliert, dass es sich bei der ALDH1 um einen Marker der astrozytären Differenzierung handelt.

Wie bereits erwähnt, wurden Astrozyten als neurale Stammzellen in der SVZ charakterisiert (Doetsch et al., 1999) und auch in den hier gezeigten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass neurale Stammzellen in der SVZ GFAP exprimieren. Dies unterstützt die Hypothese, dass die ALDH1⁺ Zellen Stammzeleigenschaften besitzen.

Die Expression von S100B definiert eine späte Entwicklungsphase astrozytischer Zellen. Wichtig ist jedoch, dass GFAP⁺ neurale Stammzellen in der SVZ mit der Expression von S100 ihre Stammzeleigenschaften verlieren (Raponi et al., 2007). Dies wurde mit dem Verlust der Fähigkeit zur Neurosphärenbildung begründet. Im Gegensatz dazu jedoch wurde von Rasper et al. die Fähigkeit zur Neurosphärenbildung ALDH1⁺ Zellen demonstriert (Rasper et al., 2010). Schließlich

könnten zwei unterschiedliche Typen ALDH1⁺ Zellen koexistieren – ALDH1⁺/S100B⁺ oder ALDH1⁺/S100B⁻ –, welche sich in ihren Eigenschaften (z.B. Neurosphärenbildung) unterscheiden. Immunhistochemische quantitative Analysen hierzu stehen jedoch noch aus.

Weiterhin stehen die Ergebnisse von Adam et al. im Gegensatz zu denen von Campos et al., welche zeigen konnten, dass die ALDH1-Expression mit zunehmender Malignität astrozytärer Tumoren zunimmt (Campos et al., 2011).

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse als nächster Schritt eine weitere Charakterisierung der ALDH1⁺ Zellen notwendig, da möglicherweise nur eine Subpopulation dieser Zellen Stammzeleigenschaften besitzt. Weitere Marker könnten über eine Coexpression hierüber Aufschluss geben. Zu beweisen ist darüber hinaus letztlich die Fähigkeit ALDH1⁺ Zellen zur Tumorbildung *in vivo*.

Beim GBM zeigen die in der vorliegenden Arbeit sowie auch bei Adam et al. sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär ALDH1 positive Tumorzellen. Die Bedeutung der zusätzlich nukleären Expression innerhalb der Tumorzellen im Vergleich zu der grundsätzlich zu erwartenden cytoplasmatischen Expression ist aktuell noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Aktuelle Ergebnisse beim kleinzelligen Lungenkarzinom zeigen innerhalb der untersuchten Kohorte (n=89) insgesamt 3 Tumoren mit nukleärer Expression (Lopez-Gonzalez et al., 2014b). Es wurde vermutet, dass die ALDH1 hier eine Rolle in der Zellzykluskontrolle spielen könnte (Lopez-Gonzalez et al., 2014a). Zudem wurde hierbei eine Assoziation zu einer besseren medianen Überlebenszeit gefunden für die Tumoren mit nukleärer Expression. Weitere Studien mit größeren Kohorten sowie in unterschiedlichen Tumoren sind folglich notwendig um die noch präliminären Ergebnisse zu bestätigen. Sofern es sich bei den ALDH1⁺ Zellen tatsächlich um Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften handelt, so würde man einen Ruhezustand mit niedriger Proliferationsaktivität erwarten. Tatsächlich fand sich in den hier untersuchten Tumoren ein reverses Expressionsmuster. Zumindest beim ALDH1⁺ Mammakarzinom, einem aggressiveren Subtyp (Ginestier et al., 2007), konnte eine Korrelation mit einer hohen Expression des Proliferationsmarkers ki67 gezeigt werden. Jedoch fand sich innerhalb des Tumors, dass ALDH1⁺ Tumorzellen meist ki67⁻ waren und ALDH1⁻ Zellen ki67⁺ (Morimoto et al., 2009).

Phänotypisch imponierten in den untersuchten GBM klein- und großzellige ALDH1⁺ Tumorzellen. Letztere imponierten wie Mikrogliazellen und es zeigte sich teilweise

eine Coexpression mit CD68, einem Makrophagen-Marker. Bekannt ist, dass maligne Astrozyten einen Makrophagen-Phänotyp exprimieren (Leenstra et al., 1995). Wie bereits eingangs erwähnt, bestehen enge Interaktionen von Tumorstammzellen innerhalb ihrer Nische mit dem umgebenden Milieu einschließlich der Mikrogliazellen (Charles et al., 2011; Gilbertson and Rich, 2007). Weiterhin scheint der Makrophagen-Phänotyp das Tumorstammzellwachstum durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und Angiogenesefaktoren zu unterstützen. Die auch als Tumor assoziierte Makrophagen (TAM) werden von GBM-Zellen rekrutiert und stellen ein potentiell Ziel in der Immuntherapie dar (Zhou and Bao, 2014).

Ein wesentlicher Punkt in der Charakterisierung von BTSC ist deren Lokalisation innerhalb des Tumors (Calabrese et al., 2007; Gilbertson and Rich, 2007). Entsprechend dieser Hypothese fanden wir ALDH1⁺ Zellen vornehmlich perivaskulär und um glomeruloide und endotheliale Gefäßproliferate lokalisiert. Bereits 1940 wurde von Scherer im GBM Tumorzellen beschrieben, welche in normales Hirngewebe migrieren und sich als sogenannte perivaskuläre Satellitosen formieren (Scherer, 1940). Unterstützt wurde diese Beobachtung weiterhin dadurch, dass die Anzahl der Kapillaren mit der Prognose korreliert (Leon et al., 1996). BTSC im GBM scheinen starke angiogenetische Eigenschaften zu besitzen und induzieren während der Tumorigenese die Formierung neuer Gefäße (Calabrese et al., 2007).

Darüber hinaus unterstützt das hypoxische Milieu die Gefäßneubildung und den stammzellartigen Zustand der BTSC. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen hinsichtlich der als hypoxisch beschriebenen Bereiche innerhalb des Tumors zwar eine Assoziation zu pathologischen Gefäßen, jedoch fand sich morphologisch keine eindeutige Assoziation zu Nekrosezonen wie für den Hypoxiemarker HIF1 α gezeigt.

Vorausgesetzt es handelt sich bei ALDH1 um einen BTSC-Marker mit Stammzeleigenschaften, so wäre zu erwarten, dass eine hohe Expression dieses Enzyms mit einer signifikant schlechteren Prognose korreliert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte retrospektive Kohortenstudie zeigt eine geringere mediane Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einer höheren ALDH1-Expression (21 Monate für ALDH1^{low} vs. 9.8 Monate für ALDH1^{high}). Dies zeigte sich nur für die Gruppe, in der alle Patienten einheitlich nach dem Stupp-Schema therapiert wurden. In der heterogenen Gruppe der übrigen postoperativen Therapien (Radiotherapie und konkomitante Chemotherapie mit TMZ, alleinige Radiotherapie, alleinige

Chemotherapie mit TMZ) zeigte sich dieser Effekt nicht. Hier muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass unterschiedliche postoperative Therapien eine andere Prognose zur Folge haben. Damit ist eine Vergleichbarkeit nicht möglich. Allerdings fand sich kein Unterschied im Überleben für den MGMT-Methylierungsstatus. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ALDH1 ein potentieller prädiktiver Marker für die Überlebenswahrscheinlichkeit bei GBM-Patienten darstellt. Limitationen dieser Studie ergeben sich aus dem Design. Die Daten müssen erst mit einer größeren Kohorte in einem prospektiven Design von unterschiedlichen Arbeitsgruppen bestätigt werden, bevor eine sichere Aussage getroffen werden kann.

Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen fanden Adam et al. eine Korrelation von hoher ALDH1-Expression mit einer besseren Prognose (Adam et al., 2012). Dies widerspricht nicht nur unseren Ergebnissen, sondern auch denen von Campos et al., welche zeigen konnten, dass eine hohe ALDH1-Expression mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist (Campos et al., 2011). Bei genauerer Analyse (Suppl. Table S1; Adam et al., 2012) zeigt sich, dass der Effekt bei Adam et al. hauptsächlich in einer heterogenen Auswahl an Tumoren bedingt ist. Im Gegensatz zu den in der eigenen Studie ausgewählten Präparaten, wurden Proben von stereotaktischen Biopsien verwendet, welche eine sinnvolle Beurteilung der heterogenen Expression der ALDH1 innerhalb des GBM unwahrscheinlich macht. Technisch betrachtet ist innerhalb einer quantitativen immunhistochemischen Analyse auf Grund des vorliegenden Expressionsmusters bioptisches Material nicht mit einem extensiven Gewebeschnitt aus einer Tumorresektion vergleichbar. Zumal Patienten, welche nur biopsiert und nicht operiert werden nachvollziehbarerweise eine schlechtere Prognose zu erwarten haben. Darüber hinaus schloss die multivariate Analyse von Adam et al. den MGMT-Status und das Alter mit ein, beides unabhängige Faktoren in der vorliegenden Arbeit, jedoch nicht die Auswahl der Präparate und die Behandlung. Doch insbesondere in letzterer zeigte sich der ausschlaggebende Bias innerhalb derer aus klinischer Sicht keine Vergleichbarkeit heterogener Therapieschemata gegeben sein kann. Darüber hinaus zeigte sich in einer separaten Analyse der Überlebensdauer innerhalb der Gruppen Biopsie vs. Resektion kein Unterschied zwischen einer hohen vs. einer niedrigen Expression der ALDH1. Das mediane Gesamtüberleben für ALDH1^{high} vs. ALDH1^{low} der Resektionsgruppe war 19 Monate vs. 17 Monate (p=0.35), bzw. 9 Monate vs. 5 Monate (p=0.17) in der Biopsiegruppe. Weiterhin wurde bei ähnlichem maximalem

relativen Anteil der Expression (40% vs. 49% bei Adam et al.) ein anderer Cut-off gewählt ohne diesen statistisch zu begründen, sondern nach Gesichtspunkten des besten p-Wertes zu wählen. Im Gegensatz dazu wurde der cut-off von 10% in der vorliegenden Studie anhand der Martingale-Residuen gewählt.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fand sich bei Adam et al. eine signifikant höhere Expression ALDH1⁺ Zellen in Tumoren nach erneuter Resektion, wobei nicht beschrieben wurde, ob es sich um Primärtumoren oder Rezidive handelte. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme der Expression von 8,5% auf 28,6% in Rezidivtumoren. Möglicherweise handelt es sich um eine therapieresistente Subpopulation, welche ein erneutes Tumorwachstum initiiert. Von Schäfer et al. wurde gezeigt, dass *in vitro* eine hohe Expression der ALDH1 eine TMZ-Resistenz zur Folge hat (Schäfer et al., 2012). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der ALDH1 mittels des Inhibitors Dimethylaminobenzaldehyd (DEAB) oder ein *knockdown* mit shRNA eine Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber TMZ bedingt. Schließlich haben, wie bereits in der Einleitung ausgeführt, hypoxische Bedingungen eine erhöhte Expression von Stammzellmarkern zur Folge (Bar, 2011). Daher könnte dies sowohl eine entscheidende Rolle sowohl für die von der ALDH1 bedingte Therapieresistenz sein (Schäfer et al., 2012) als auch zur Initiierung erneuten Tumorwachstums führen.

6 Zusammenfassung

Das Enzym ALDH1 konnte in zahlreichen Tumoren als Biomarker für Stammzellen identifiziert werden. Auch für das GBM konnte dies anhand des Neurosphärenassays gezeigt werden (Rasper et al., 2010), wobei *in vitro* eine hohe Expression mit einem undifferenzierten stammzellartigen Stadium der Tumorzellen einherging. Darüber hinaus fand sich für eine Überexpression der ALDH1 eine Resistenz gegenüber dem beim GBM in der Therapie etablierten Chemotherapeutikum Temozolomid (Schäfer et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte der immunhistochemische Nachweis erbracht werden, dass die ALDH1 sowohl in gesundem Hirngewebe zu finden ist, wo Stammzellen anzutreffen sind als auch innerhalb des GBM. Insbesondere zeigten sich positive Zellen auch in den Regionen, in denen BTSC vermutet werden, perivaskulär und in hypoxischen Arealen. Dabei scheinen auch Interaktionen mit anderen Zelltypen wie der Mikroglia eine Rolle zu spielen. Im Rahmen einer quantitativen immunhistochemischen retrospektiven Kohortenanalyse konnte gezeigt werden, dass für Patienten, welche nach Standardtherapie behandelt wurden, eine hohe Expression ALDH1 mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit korrelierte. Im Vergleich mit anderen Daten in der Literatur sind diese Ergebnisse teilweise widersprüchlich, aktuell spricht die Datenlage für die hier dargelegte Hypothese. In postoperativen Rezidivglioblastomen zeigt sich immunhistochemisch ein erhöhter Anteil ALDH1-positiver Zellen im Vergleich zu Gewebe nach der ersten Resektion. Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit der Persistenz therapieresistenter GBM-Zellen, welche ALDH1 überexprimieren. Ein weiterer begünstigender Faktor könnte eine Hypoxie sein, welche in umschriebenen Regionen des GBM vorherrscht.

Insgesamt ist das Enzym ALDH1 ein vielversprechender Biomarker im GBM, jedoch bedarf es weiterer experimenteller Nachweise zu dessen Potential wie z.B. die Fähigkeit zur Tumorigenese *in vivo*. In Zukunft könnte hier ein potentiell Therapieziel bestätigt werden, welches eine verbesserte Prognose für diese maligne Erkrankung mit derzeit kurzer Überlebensdauer nach Diagnosestellung bietet.

7 Literatur

Adam, S. A., Schnell, O., Poschl, J., Eigenbrod, S., Kretzschmar, H. A., Tonn, J. C. and Schuller, U. (2012). ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients. *Brain Pathol*, 788-797.

Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C. and von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*, 116 (6), 597-602.

Bar, E. E. (2011). Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. *Brain Pathol*, 21 (2), 119-129.

Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W. and Eberhart, C. G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol*, 177 (3), 1491-1502.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U. and Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, 67 (9), 4010-4015.

Bettstetter, M., Dechant, S., Ruemmele, P., Vogel, C., Kurz, K., Morak, M., Keller, G., Holinski-Feder, E., Hofstaedter, F. and Dietmaier, W. (2008). MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Lab Invest*, 88 (12), 1367-1375.

Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3 (7), 730-737.

Brat, D. J., Castellano-Sanchez, A. A., Hunter, S. B., Pecot, M., Cohen, C., Hammond, E. H., Devi, S. N., Kaur, B. and Van Meir, E. G. (2004). Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*, 64 (3), 920-927.

Butowski, N. A., Sneed, P. K. and Chang, S. M. (2006). Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. *J Clin Oncol*, 24 (8), 1273-1280.

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A. and Gilbertson, R. J. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 11 (1), 69-82.

Campos, B., Centner, F. S., Bermejo, J. L., Ali, R., Dorsch, K., Wan, F., Felsberg, J., Ahmadi, R., Grabe, N., Reifenberger, G., Unterberg, A., Burhenne, J. and Herold-Mende, C. (2011). Aberrant expression of retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas. *Am J Pathol*, 178 (5), 1953-1964.

Chang, B., Liu, G., Xue, F., Rosen, D. G., Xiao, L., Wang, X. and Liu, J. (2009). ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol*, 22 (6), 817-823.

Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R. and Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, 59 (8), 1169-1180.

Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. and Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells-- perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66 (19), 9339-9344.

Corle, C., Makale, M. and Kesari, S. (2012). Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. *J Neurooncol*, 106 (1), 1-13.

Dell'Albani, P. (2008). Stem cell markers in gliomas. *Neurochemical Research*, 33 (12), 2407-2415.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97 (6), 703-716.

Duester, G., Mic, F. A. and Molotkov, A. (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact*, 143-144 201-210.

Elizondo, G., Medina-Diaz, I. M., Cruz, R., Gonzalez, F. J. and Vega, L. (2009). Retinoic acid modulates retinaldehyde dehydrogenase 1 gene expression through the induction of GADD153-C/EBPbeta interaction. *Biochem Pharmacol*, 77 (2), 248-257.

Farrell, C. J. and Plotkin, S. R. (2007). Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol Clin*, 25 (4), 925-946.

Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M. and Wiemels, J. L. (2007). Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*, 25 (4), 867-890.

Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A. and Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 21 (21), 2683-2710.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 64 (19), 7011-7021.

Gangemi, R. M., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., Ravetti, G. L., Zona, G. L., Daga, A. and Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*, 27 (1), 40-48.

Gilbertson, R. J. and Rich, J. N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer*, 7 (10), 733-736.

Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S. and Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1 (5), 555-567.

Grambsch, P. M., Therneau, T. M. and Fleming, T. R. (1995). Diagnostic plots to reveal functional form for covariates in multiplicative intensity models. *Biometrics*, 51 (4), 1469-1482.

Hamburger, A. W. and Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197 (4302), 461-463.

Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B. and Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*, 8 (20), 3274-3284.

Hessman, C. J., Bubbers, E. J., Billingsley, K. G., Herzig, D. O. and Wong, M. H. (2012). Loss of expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 correlates with advanced-stage colorectal cancer. *Am J Surg*, 203 (5), 649-653.

Hilton, J. (1984). Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia. *Cancer Res*, 44 (11), 5156-5160.

Homma, T., Fukushima, T., Vaccarella, S., Yonekawa, Y., Di Patre, P. L., Franceschi, S. and Ohgaki, H. (2006). Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (9), 846-854.

Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J. Z., Wicha, M. S. and Boman, B. M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*, 69 (8), 3382-3389.

INTERPHONE. (2010). Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol*, 39 (3), 675-694.

Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N. W., Deepak, J., Xing, L., Wang, H., Liu, Z., Su, Y., Stass, S. A. and Katz, R. L. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*, 7 (3), 330-338.

Kahlert, C., Bergmann, F., Beck, J., Welsch, T., Mogler, C., Herpel, E., Dutta, S., Niemiets, T., Koch, M. and Weitz, J. (2011). Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 11 275.

Kastan, M. B., Schlaffer, E., Russo, J. E., Colvin, O. M., Civin, C. I. and Hilton, J. (1990). Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 75 (10), 1947-1950.

Katsuno, Y., Ehata, S., Yashiro, M., Yanagihara, K., Hirakawa, K. and Miyazono, K. (2012). Coordinated expression of REG4 and aldehyde dehydrogenase 1 regulating tumorigenic capacity of diffuse-type gastric carcinoma-initiating cells is inhibited by TGF-beta. *J Pathol*, 391-404.

Keith, B. and Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 129 (3), 465-472.

Keles, G. E., Lamborn, K. R., Chang, S. M., Prados, M. D. and Berger, M. S. (2004). Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy. *J Neurosurg*, 100 (1), 41-46.

Kim, M. P., Fleming, J. B., Wang, H., Abbruzzese, J. L., Choi, W., Kopetz, S., McConkey, D. J., Evans, D. B. and Gallick, G. E. (2011). ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*, 6 (6), e20636.

Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F. F., McCutcheon, I. E., Hassenbusch, S. J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D. and Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*, 95 (2), 190-198.

Leenstra, S., Das, P. K., Troost, D., de Boer, O. J. and Bosch, D. A. (1995). Human malignant astrocytes express macrophage phenotype. *J Neuroimmunol*, 56 (1), 17-25.

Leon, S. P., Folkerth, R. D. and Black, P. M. (1996). Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer*, 77 (2), 362-372.

Linos, E., Raine, T., Alonso, A. and Michaud, D. (2007). Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 99 (20), 1544-1550.

Liu, D. C., Yang, Z. L. and Jiang, S. (2010). Identification of musashi-1 and ALDH1 as carcinogenesis, progression, and poor-prognosis related biomarkers for gallbladder adenocarcinoma. *Cancer Biomark*, 8 (3), 113-121.

Lopez-Gonzalez, A., Salas, C., Provencio, M., Cordoba, M. and Gamallo, C. (2014a). Aldehyde dehydrogenases in early stage lung cancer: nuclear expression. *Clin Transl Oncol*,

Lopez-Gonzalez, A., Salas, C., Provencio, M., Cordoba, M. and Gamallo, C. (2014b). Aldehyde dehydrogenases in early stage lung cancer: nuclear expression. *Clin Transl Oncol*, epub ahead of print.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W. and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114 (2), 97-109.

Louis, D. N., Perry, A., Burger, P., Ellison, D. W., Reifenberger, G., von Deimling, A., Aldape, K., Brat, D., Collins, V. P., Eberhart, C., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giangaspero, F., Giannini, C., Hawkins, C., Kleihues, P., Korshunov, A., Kros, J. M., Beatriz Lopes, M., Ng, H. K., Ohgaki, H., Paulus, W., Pietsch, T., Rosenblum, M., Rushing, E., Soylemezoglu, F., Wiestler, O., Wesseling, P. and International Society Of, N.-H. (2014). International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol*, 24 (5), 429-435.

Ma, Y. H., Mentlein, R., Knerlich, F., Kruse, M. L., Mehdorn, H. M. and Held-Feindt, J. (2008). Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*, 86 (1), 31-45.

Magee, J. A., Piskounova, E. and Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, 21 (3), 283-296.

McGirt, M. J., Than, K. D., Weingart, J. D., Chaichana, K. L., Attenello, F. J., Olivi, A., Lattera, J., Kleinberg, L. R., Grossman, S. A., Brem, H. and Quinones-Hinojosa, A. (2009). Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 110 (3), 583-588.

Mihatsch, J., Toulany, M., Bareiss, P. M., Grimm, S., Lengerke, C., Kehlbach, R. and Rodemann, H. P. (2011). Selection of radioresistant tumor cells and presence of ALDH1 activity in vitro. *Radiother Oncol*, 99 (3), 300-306.

Morimoto, K., Kim, S. J., Tanei, T., Shimazu, K., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Terada, N. and Noguchi, S. (2009). Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci*, 100 (6), 1062-1068.

Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Craig, C. G., McBurney, M. W., Staines, W. A., Morassutti, D., Weiss, S. and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, 13 (5), 1071-1082.

Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170 (5), 1445-1453.

Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. and Kinzler, K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321 (5897), 1807-1812.

Pelloski, C. E., Ballman, K. V., Furth, A. F., Zhang, L., Lin, E., Sulman, E. P., Bhat, K., McDonald, J. M., Yung, W. K., Colman, H., Woo, S. Y., Heimberger, A. B., Suki, D., Prados, M. D., Chang, S. M., Barker, F. G., 2nd, Buckner, J. C., James, C. D. and Aldape, K. (2007). Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol*, 25 (16), 2288-2294.

Persson, A. and Englund, E. (2012). Phagocytic properties in tumor astrocytes. *Neuropathology*, 32 (3), 252-260.

Pistollato, F., Abbadi, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., Sarto, E., Scienza, R., D'Avella, D. and Basso, G. (2010). Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells*, 28 (5), 851-862.

Prasmickaite, L., Engesaeter, B. O., Skrbo, N., Hellenes, T., Kristian, A., Oliver, N. K., Suo, Z. and Maelandsmo, G. M. (2010). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity does not select for cells with enhanced aggressive properties in malignant melanoma. *PLoS One*, 5 (5), e10731.

Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M. S., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*, 494 (3), 415-434.

Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C. and Deloulme, J. C. (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, 55 (2), 165-177.

Rasper, M., Schäfer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C. and Schlegel, J. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol*, 12 (10), 1024-1033.

Reardon, D. A., Fink, K. L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T. F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J. J., Rich, K. M., Schiff, D., Shapiro, W. R., Burdette-Radoux, S., Dropcho, E. J., Wittemer, S. M., Nippgen, J., Picard, M. and Nabors, L. B. (2008). Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 26 (34), 5610-5617.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414 (6859), 105-111.

Rong, Y., Durden, D. L., Van Meir, E. G. and Brat, D. J. (2006). 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (6), 529-539.

Sanai, N., Tramontin, A. D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M. T., McDermott, M. W., Parsa, A. T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M. S. and Alvarez-Buylla, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427 (6976), 740-744.

Schäfer, A., Teufel, J., Ringel, F., Bettstetter, M., Hoepner, I., Rasper, M., Gempt, J., Koeritzer, J., Schmidt-Graf, F., Meyer, B., Beier, C. P. and Schlegel, J. (2012). Aldehyde dehydrogenase 1A1--a new mediator of resistance to temozolomide in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 14 (12), 1452-1464.

Scherer, H. (1940). Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am. J. Cancer*, 1 (1), 159-198.

Schmitz, M., Temme, A., Senner, V., Ebner, R., Schwind, S., Stevanovic, S., Wehner, R., Schackert, G., Schackert, H. K., Fussel, M., Bachmann, M., Rieber, E. P. and Weigle, B. (2007). Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer*, 96 (8), 1293-1301.

Seidel, S., Garvalov, B. K., Wirta, V., von Stechow, L., Schanzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A. T., Nister, M., Reifenberger, G., Lundeberg, J., Frisen, J. and Acker, T. (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*, 133 (Pt 4), 983-995.

Shien, K., Toyooka, S., Ichimura, K., Soh, J., Furukawa, M., Maki, Y., Muraoka, T., Tanaka, N., Ueno, T., Asano, H., Tsukuda, K., Yamane, M., Oto, T., Kiura, K. and Miyoshi, S. (2012). Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. *Lung Cancer*, 77 (1), 162-167.

Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T. and Dirks, P. B. (2004a). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23 (43), 7267-7273.

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. and Dirks, P. B. (2004b). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432 (7015), 396-401.

Sladek, N. E. (2003). Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol*, 17 (1), 7-23.

Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A. B., Pollack, I. F. and Park, D. M. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, 3949-3959.

Son, M. J., Woolard, K., Nam, D. H., Lee, J. and Fine, H. A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell*, 4 (5), 440-452.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F. and Reulen, H. J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7 (5), 392-401.

Stupp, R., Hegi, M. E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P. M., Grabenbauer, G. G., Ochsenbein, A. F., Simon, M., Dietrich, P. Y., Pietsch, T., Hicking, C., Tonn, J. C., Diserens, A. C., Pica, A., Hermisson, M., Krueger, S., Picard, M. and Weller, M. (2010). Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*, 28 (16), 2712-2718.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E. and Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352 (10), 987-996.

Su, Y., Qiu, Q., Zhang, X., Jiang, Z., Leng, Q., Liu, Z., Stass, S. A. and Jiang, F. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19 (2), 327-337.

Sun, S., Lee, D., Lee, N. P., Pu, J. K., Wong, S. T., Lui, W. M., Fung, C. F. and Leung, G. K. (2012). Hyperoxia resensitizes chemoresistant human glioblastoma cells to temozolomide. *J Neurooncol*, 467-475.

Suzuki, E., Chiba, T., Zen, Y., Miyagi, S., Tada, M., Kanai, F., Imazeki, F., Miyazaki, M., Iwama, A. and Yokosuka, O. (2012). Aldehyde dehydrogenase 1 is associated with recurrence-free survival but not stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 1100-1111.

Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y. and Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*, 15 (12), 4234-4241.

Tonge, P. D. and Andrews, P. W. (2010). Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. *Differentiation*, 80 (1), 20-30.

Vasiliou, V. and Nebert, D. W. (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics*, 2 (2), 138-143.

Visus, C., Wang, Y., Lozano-Leon, A., Ferris, R. L., Silver, S., Szczepanski, M. J., Brand, R. E., Ferrone, C. R., Whiteside, T. L., Ferrone, S., DeLeo, A. B. and Wang, X. (2011). Targeting ALDH(bright) human carcinoma-initiating cells with -specific CD8(+) T cells. *Clin Cancer Res*, 17 (19), 6174-6184.

Vogler, T., Kriegl, L., Horst, D., Engel, J., Sagebiel, S., Schaffauer, A. J., Kirchner, T. and Jung, A. (2012). The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors. *Exp Mol Pathol*, 92 (1), 111-117.

Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Marcello, J., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., Wagner, M., Bailey, L., Bigner, D. D., Friedman, A. H. and Friedman, H. S. (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 25 (30), 4722-4729.

Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Reardon, D. A., Peters, K. B., Herndon, J. E., 2nd, Marcello, J., Kirkpatrick, J. P., Sampson, J. H., Bailey, L., Threath, S., Friedman, A. H., Bigner, D. D. and Friedman, H. S. (2011). The addition of bevacizumab to standard radiation therapy and temozolomide followed by bevacizumab, temozolomide, and irinotecan for newly diagnosed glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 17 (12), 4119-4124.

Weller, M., Felsberg, J., Hartmann, C., Berger, H., Steinbach, J. P., Schramm, J., Westphal, M., Schackert, G., Simon, M., Tonn, J. C., Heese, O., Krex, D., Nikkhah, G., Pietsch, T., Wiestler, O., Reifenberger, G., von Deimling, A. and Loeffler, M. (2009). Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol*, 27 (34), 5743-5750.

Wen, P. Y. and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359 (5), 492-507.

Westphal, M., Hilt, D. C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P. C., Whittle, I. R., Jaaskelainen, J. and Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol*, 5 (2), 79-88.

Wick, W., Weller, M., Weiler, M., Batchelor, T., Yung, A. W. and Platten, M. (2011). Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro Oncol*, 13 (6), 566-579.

Wensch, M., Wiencke, J. K., Wiemels, J., Miike, R., Patoka, J., Moghadassi, M., McMillan, A., Kelsey, K. T., Aldape, K., Lamborn, K. R., Parsa, A. T., Sison, J. D. and Prados, M. D. (2006). Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival. *Cancer Res*, 66 (8), 4531-4541.

Zhou, W. and Bao, S. (2014). Reciprocal Supportive Interplay between Glioblastoma and Tumor-Associated Macrophages. *Cancers (Basel)*, 6 (2), 723-740.