



**Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München**

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München

Direktor: Prof. Dr. Wilko Weichert

Fachgebiet für Neuropathologie

Leiter: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

**Die inter- und intratumorale Heterogenität des Glioblastoma multiforme:
Eine regionale Immunreaktivitätsanalyse**

Natalie Katharina Bergmann

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. Priv.-Doz. Dr. Fiederike Schmidt-Graf
3. Prof. Dr. Bernhard Meyer

Die Dissertation wurde am 24.04.2018 bei der Technischen Universität München ein-
gereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.12.2019 angenommen.

*Für meine Eltern,
weil niemand fester an mich glaubte,
für meine Schwester mit Paulina,
weil sie mich Lebensfreude lehrte
und für Lukas,
weil er mir immer beistand.*

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Motivation und Problemstellung	1
1.2 Zytologische und malignitätsorientierte Einteilung des Glioblastoms	2
1.3 Die Heterogenität des Glioblastoms	3
1.3.1 Morphologische Heterogenität	3
1.3.2 Intertumorale Heterogenität	4
1.3.3 Intratumorale Heterogenität	6
1.4 Biologische Grundlagen der Tumorentwicklung	8
1.5 Bedeutende Biomarker.....	10
1.5.1 Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH 1) – ein Stammzellmarker.....	10
1.5.2 Intermediärfilamente als Biomarker	11
1.5.2.1 Nestin	12
1.5.2.2 Vimentin	13
1.5.2.3 Saures Gliafaserprotein – GFAP	14
1.5.3 Neuronale Marker	15
1.5.3.1 MAP2 - Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2	15
1.5.3.2 NeuN – Neuronales Kernantigen	16
1.5.4 Mib1 – ein Proliferationsmarker	17
1.5.5 EGFR – ein epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor	18
1.5.6 CA-IX – ein Hypoxiemarker	19
2. Zielsetzung.....	21
3. Materialien und Methoden.....	22
3.1 Materialien.....	22
3.1.1 Gewebe.....	22
3.1.2 Immunologische Materialien	22
3.1.2.1 Primäre Antikörper	22
3.1.2.2 Sekundäre Antikörper	23
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	23
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	24
3.1.5 Kits	24
3.1.6 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel.....	24
3.1.7 Geräte	25

3.1.8	Software.....	25
3.1.9	Patientenkollektiv	25
3.2	Methoden	26
3.2.1	Anfertigung der Schnittserien.....	26
3.2.2	Immunmarkierung	26
3.2.2.1	Bedeutung und Prinzip.....	26
3.2.2.2	Durchführung	27
3.2.2.2.1	Immunhistochemie.....	27
3.2.2.2.2	Immunfluoreszenz	30
3.2.3	Bildanalyse.....	31
3.2.3.1	Immunhistochemie.....	31
3.2.3.2	Immunfluoreszenz.....	32
3.2.4	Statistische Auswertung.....	33
3.2.4.1	Korrelationsanalyse	33
3.2.4.2	Clusteranalyse	34
4.	Resultate	35
4.1	Korrelationsanalyse.....	35
4.2	Hierarchische Clusteranalyse.....	36
4.2.1	Stammbaumdarstellung	36
4.2.2	Markerprofile der Cluster.....	37
4.2.2.1	Transformierte neuronale Regionen (TNR).....	41
4.2.2.2	Proliferative Regionen (PR)	42
4.2.2.3	Mutationsregionen (MR)	44
4.2.2.4	Stammzell- und Resistenzregionen	44
4.2.2.5	Hypoxieregionen	45
4.2.2.6	Isolierter intratumoraler Arealnachweis.....	47
4.2.3	Zusammenfassung der Resultate der hierarchischen Clusteranalyse	48
5.	Diskussion.....	51
5.1	Fragestellung.....	51
5.2	Die Korrelationsanalyse hebt die inter- und intratumorale Heterogenität hervor.....	51
5.3	Parallelen zwischen einzelnen Clusterprofilen und den Subtypen nach Phillips.....	52
5.4	Hypoxie induziert Resistenz- und Stammzellfaktoren	55
5.5	Keine klare Beziehung der EGFR-Immunreaktivität zur Proliferationsaktivität	56

5.6 Die Glioblastomregionen sind möglicherweise Areale in unterschiedlichen Differenzierungsstufen der GBM-Progression.....	57
5.7 Vergleichbarkeit der GBM-Progression auf regionaler Ebene mit den Differenzierungsschritten der Neurogenese im adulten Gehirn.....	60
5.8 NSC als alternative Ursprungszelle der Gliogenese.....	60
5.9 Therapieaussicht.....	61
6. Zusammenfassung und Ausblick	64
7. Danksagung.....	66
8. Abkürzungsverzeichnis	67
9. Abbildungsverzeichnis	69
10. Tabellenverzeichnis	70
11. Literaturverzeichnis	71

1. Einleitung

1.1 Motivation und Problemstellung

Das Glioblastoma multiforme (GBM), eine hochmaligne solide Neoplasie aus der Gruppe der astrozytären Tumoren, ist die häufigste Form der primären Hirngeschwulste des Erwachsenenalters und stellt zwischen 35-50% aller intrakraniellen Tumoren dar (Penas-Prado et al. 2012). Die Erstdiagnose liegt durchschnittlich zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr, wobei das männliche Geschlecht häufiger betroffen ist als das weibliche. Aufgrund seiner raschen Wachstumsgeschwindigkeit, der diffus infiltrierenden Ausbreitung, dem fast ausnahmslosen Rezidivieren nach erfolgter multimodaler Therapie und dem raumfordernden Aspekt nahezu ohne intrakranielle Platzreserven geht die Erkrankung stets mit einer infausten Prognose einher (Hufschmidt et al. 2013). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt dabei zwischen 0-3% und die mittlere Überlebenszeit nach ausgeschöpfter Therapie bei ca. 15 Monaten (Wen und Kesari 2008; Westphal und Lamszus 2011). Unbehandelt würden die Patienten infolge des intrazerebralen Druckanstiegs mit sekundärer tonsillärer Herniation bereits nach etwa zwei Monaten versterben (Coffey et al. 1988).

Trotz intensiver internationaler Forschungsbemühungen bleibt die Therapieentwicklung in ihrer Dynamik weit hinter den Behandlungserfolgen anderer Tumorentitäten zurück. Seit der Etablierung der Tripletherapie, bestehend aus einer funktionellen neurochirurgischen Resektion des entarteten Hirngewebes, kombiniert mit einer adjuvanten Radiochemotherapie mit dem Wirkstoff Temozolomid, konnte seit Jahrzehnten keine durchschlagende Prognoseverbesserung in der Primärtherapie des Glioblastoms mehr verzeichnet werden (Carlsson et al. 2014).

Worauf ist dies zurückzuführen? Was ist der Grund für diese Stagnation? Mögliche Ursachen für die beschriebene Therapieresistenz wurden in den vergangenen Jahren vielfach diskutiert. Basierend auf langjähriger Forschungsarbeit nimmt man heutzutage an, dass die Diversität der Glioblastome mit ihrer ausgeprägten *inter- und intratumoralen Heterogenität* die wesentliche Komponente der Therapieresistenz darstellt.

Forschungsgruppen um Phillips und Verhaak verdeutlichen neben anderen das Vorliegen der *intertumoralen Heterogenität*, indem sie neuropathologisch diagnostiziertes Glioblastommaterial mittels molekularer Expressions-/Transkriptom-Analysen in weitere prognoserelevante Subtypen mit charakteristischen Markerprofilen und genetischen Alterationen untergliedern (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010; Brennan et al. 2013; Mao et al. 2013). Von dieser Herangehensweise verspricht man sich insbesondere die Identifizierung der jeweils relevanten molekularen Merkmale der Subgruppen sowie deren aggressivitäts- und resistenzverleihenden Mechanismen, um folglich eine subgruppenorientierte spezi-

fische Krebstherapie – an neuen Angriffspunkten ansetzend – entwickeln zu können (Phillips et al. 2006).

Das Problem dieser Subklassifizierungen besteht allerdings darin, dass eine Stichprobe aus dem Glioblastommaterial des Patienten aufgrund der zusätzlich vorliegenden ausgeprägten *intratumoralen* Diversität möglicherweise nicht repräsentativ für den Gesamttumor ist (Sottoriva et al. 2013).

Das Glioblastom besteht aus Zellen mit zahlreichen unterschiedlichen Eigenschaften und somit auch einem differierenden Resistenzgrad gegenüber angewandten Therapieformen. Das heißt, dass mittels der aktuellen Behandlungsmaßnahmen nur bestimmte Zelltypen der Tumormasse eliminiert werden, wohingegen andere Zellen persistieren und zur Rezidivbildung führen. Es ist daher angezeigt, die *intratumorale Heterogenität*, als zentrales Charakteristikum der Glioblastombiologie, näher zu untersuchen, um sie in weiterführenden Überlegungen hinsichtlich neuer Therapieansätze besser berücksichtigen zu können.

Homogenität ist die Grundvoraussetzung für maximalen therapeutischen Benefit unter Vermeidung unnötiger Toxizität. Auf den höchstmöglichen Ebenen, das heißt in der Gesamtheit der intraindividuellen Tumormasse und im interindividuellen Tumorvergleich, ist in der Glioblastombiologie keine Homogenität fassbar. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Ansatz gewählt, indem das Augenmerk auf die darunter liegende Ebene gerichtet und Regionen innerhalb eines Tumors analysiert werden, die untereinander sowie mit Regionen innerhalb von anderen Tumoren verglichen werden und zwar hinsichtlich ihrer Immunreaktivität bezüglich ausgewählter, in der Glioblastomforschung wichtiger Biomarker. Es wird also, unter Berücksichtigung der inter- und intratumoralen Heterogenität, eine regionale Betrachtung durchgeführt, sodass der Ort des natürlichen Vorkommens der veränderten Transkription und Translation in die Überlegungen mit einbezogen werden kann. Zusammenfassend konzentriere ich mich in dieser Arbeit auf die regionalen Besonderheiten innerhalb der Tumoren.

Ziel ist es, durch diesen verlagerten Betrachtungsfokus trotz der großen phänotypischen Heterogenität dennoch konstante Eigenschaften, also gewisse Gesetzmäßigkeiten, zu finden, die uns nähere Kenntnisse über die Pathophysiologie der Tumorprogredienz sowie Therapieresistenz ermöglichen und somit neue Therapieansatzpunkte sichtbar werden lassen.

1.2 Zytologische und malignitätsorientierte Einteilung des Glioblastoms

Das Glioblastom, ein Astrozytom Grad IV, gehört zur Gruppe der Gliome. Dies sind Hirntumoren, die anhand von morphologischen und immunhistochemischen Befunden der glialen, neuroepithelialen Zellreihe zugeordnet werden. Entsprechend der Ähnlichkeit zu einem der

drei großen physiologisch im zentralen Nervensystem vorkommenden Zelltypen der Makroglia werden Oligodendrogliome, Ependymome und Astrozytome unterschieden. Letztere machen dabei mehr als 70% der Gliome aus.

Neben der zytologischen Einteilung ist vor allem der Tumorgrad gemäß der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ein sehr aussagekräftiger Prognosevorhersagewert bei intrakraniellen Raumforderungen (Prados und Levin 2000). Die WHO-Klassifikation untergliedert Hirntumoren nach ihrer Malignitätsstufe (Louis et al. 2007). Langsam verdrängend wachsende, überwiegend gutartige Tumoren erhalten die Graduierung I, wohingegen hochmaligne Tumoren wie das Glioblastom mit raschem, diffus infiltrativem Wachstum, entdifferenzierten Zellen und geringer Überlebenszeit dem Grad IV zugeordnet werden. Tumoren der Stufe II und III nehmen eine Zwischenstellung ein, können sich jedoch im Verlauf in Neubildungen höherer Malignität transformieren oder nach der Krebstherapie als aggressivere Tumoren rezidivieren. Dabei lässt sich auf molekularer Ebene eine Herabregulation des Aktivitätsniveaus von Genen verzeichnen, die für neurale, neuroblastäre Genprodukte codieren, während Gene, welche der Zelle einen vorläufer- und stammzellähnlichen Charakter verleihen, vermehrt exprimiert werden (Phillips et al. 2006).

1.3 Die Heterogenität des Glioblastoms

Wie der Name *Glioblastoma multiforme* bereits erahnen lässt, handelt es sich bei dieser intrazerebralen Neoplasie um einen auf unterschiedlichen Ebenen sehr heterogenen Tumor. Das Glioblastom kann dabei als Paradebeispiel für die Heterogenität bei Krebserkrankungen angeführt werden.

1.3.1 Morphologische Heterogenität

Bereits bei der makroskopischen Betrachtung der tumorösen Schnittfläche lässt sich ein buntes Bild aus rötlichen Hämorrhagien, gelblichem Zerfallsgewebe und gräulich-weißlichem vitalen Tumor beobachten. Diese Variabilität setzt sich ebenso in der mikroskopischen Morphologie fort. Hier findet sich eine für das Glioblastom charakteristische Zellpolymorphie mit deutlicher Variation in Größe und Form. Das Erscheinungsbild wird zudem durch das Nebeneinander von einkernigen Tumorzellen und mehrkernigen Riesenzellen heterogenisiert (Abb. 1).

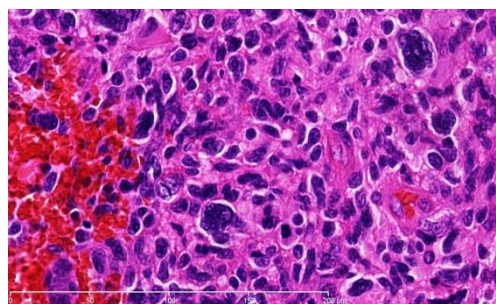


Abb. 1: HE-Färbung eines Glioblastoms (40x) mit ausgeprägter Zellpolymorphie und Hämorrhagie am linken Bildrand.

Doch nicht nur die zellulären Bestandteile, sondern auch das Mikromilieu mit der Neovaskularisation und der Ausbildung zahlreicher fragiler Gefäße, die gehäuft thrombosieren, tragen zur Heterogenität bei. Ein weiteres wichtiges Charakteristikum des Extrazellularraums sind flächige, streifenförmige Nekroseareale mit umgebenden pseudopalisadenartig angeordneten Tumorzellen (Abb. 2) (Vigneswaran et al. 2015). Die Abbildungen 1 und 2 der histologischen Präparate in HE-Färbung sollen die beschriebene morphologische Heterogenität nochmals veranschaulichen.

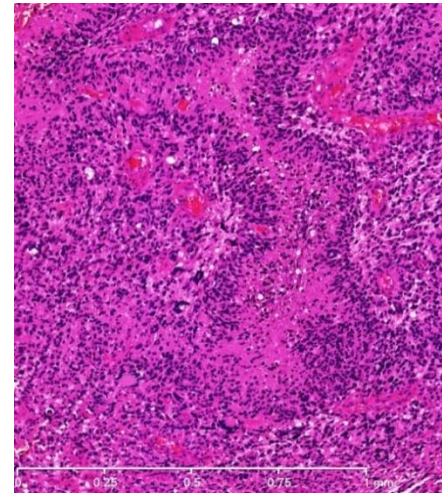


Abb. 2: HE-Färbung eines Glioblastoms (5x) mit pathologischen, teilweise thrombotisierten Gefäßen und einem zentral im Bild gelegenen bandförmigen Nekroseareal mit angrenzenden Palisadenzellen.

1.3.2 Intertumorale Heterogenität

Die Diagnose eines Glioblastoms wird durch den Neuropathologen anhand von morphologischen Kriterien gestellt. Unterstützend werden immunhistochemische Färbungen und molekulare Analysen eingesetzt. Gegenwärtige Studien zeigen, dass es sich um ein heterogenes Erkrankungsbild handelt, das weiter untergliedert werden kann. Über die Erzeugung von Genexpressionsprofilen gelang es jüngst in der molekularen Forschung, prognoserelevante Tumorsubgruppen zu differenzieren und damit die intertumorale Heterogenität zu erfassen (Abb. 3) (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010; Brennan et al. 2013; Mao et al. 2013). Phillips et al. beschreiben dabei basierend auf DNA-Mikroarrays als erste Arbeitsgruppe drei Tumorkategorien. Sie benennen den *proneuralen Typen* charakterisiert durch eine vermehrte Transkription der neuronalen, neuroblastären Biomarker NeuN und MAP2. Sie grenzen davon die *proliferative Subgruppe* der Tumoren ab, welche sich durch einen hohen Mib1-Index auszeichnet und somit eine starke Teilungsrate aufweist. Die dritte Gruppe mit *mesenchymaler Signatur* – geprägt durch Biomarker für einen stammzellähnlichen Charakter wie Nestin und Vimentin – stellt den aggressivsten Subtypen mit der schlechtesten Prognose dar (Phillips et al. 2006).

Gemäß Verhaak et al. sind – basierend auf Daten vom Cancer Genome Atlas – der *proneurale*, der *neurale*, der *klassische* sowie der *mesenchymale Subtyp* zu unterscheiden. Diese Subtypen werden jeweils über spezifische genetische Aberrationen oder die Expression von bestimmten Markergenen definiert. Der *klassische Subtyp* ist zum Beispiel durch die Amplifikation und konsekutive Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) charakterisiert (Verhaak et al. 2010). Xie et al. gelang es im Jahr 2015, die Bildung eben dieser vier GBM-Subtypen in der Zellkultur nachzuweisen. Diese

Klassifizierungen auf molekularer Ebene erfassen vorherrschende Tumoreigenschaften und erhalten aufgrund ihrer hohen prognostischen Bedeutung biologische sowie klinische Relevanz (Xie et al. 2015).

Bei dieser Kategorisierung handelt es sich jedoch nicht um eine starre Einteilung, sondern um ein dynamisches System. Über Verlaufsanalysen konnte beim Vergleich des Primärtumors mit dem Rezidivmaterial desselben Patienten ein Shift hin zum *mesenchymalen Subtypen* dokumentiert werden, was mit einem gesteigerten Malignitätsgrad sowie einer noch ausgeprägteren Therapieresistenz einherging (Phillips et al. 2006). Diese Transformation vom *proneuralen* Markerprofil hin zum *mesenchymalen* spiegelt sich auch auf zellulärer Ebene wider (Mao et al. 2013).

Die Einheitlichkeit einer Tumorgruppe ist jedoch die essentielle Voraussetzung für hohen Therapiebenefit unter gleichzeitiger Vermeidung unnötiger Toxizität. Das Wissen um die intertumorale Heterogenität birgt das vielversprechende Potential neuer Angriffspunkte für eine zielgerichtete personalisierte Therapie. Limitiert wird die Aussagekraft zu den Merkmalen der Subtypen allerdings durch die gleichzeitig vorliegende ausgeprägte intratumorale Heterogenität (Abb. 3). Glioblastome beherbergen Zellpopulationen, die sich in ihrer Wachstumsrate, ihrer Genetik, dem Ausmaß der Therapieresistenz und ihren Expressionsprofilen unterscheiden (Marusyk et al. 2012). Einzelzellanalysen belegen, dass die individuellen Zellen eines einzelnen Patienten in unterschiedliche Subklassen fallen, obwohl sie von ein und demselben Tumor stammen (Patel et al. 2014). Die Einteilung basierend auf einer kleinen Materialstichprobe ist möglicherweise nicht repräsentativ für den Gesamttumor (Abb. 3) (Sottoriva et al. 2013; Patel et al. 2014). Daraus geht hervor, wie wichtig es ist, auch die intratumorale Heterogenität näher zu beleuchten und in Studien zu berücksichtigen. Dies wird in der vorliegenden Immunreaktivitätsanalyse umgesetzt, indem sowohl inter- als auch intratumorale Regionen auf gleicher Ebene hinsichtlich ihrer Gewebeeigenschaften untersucht werden.

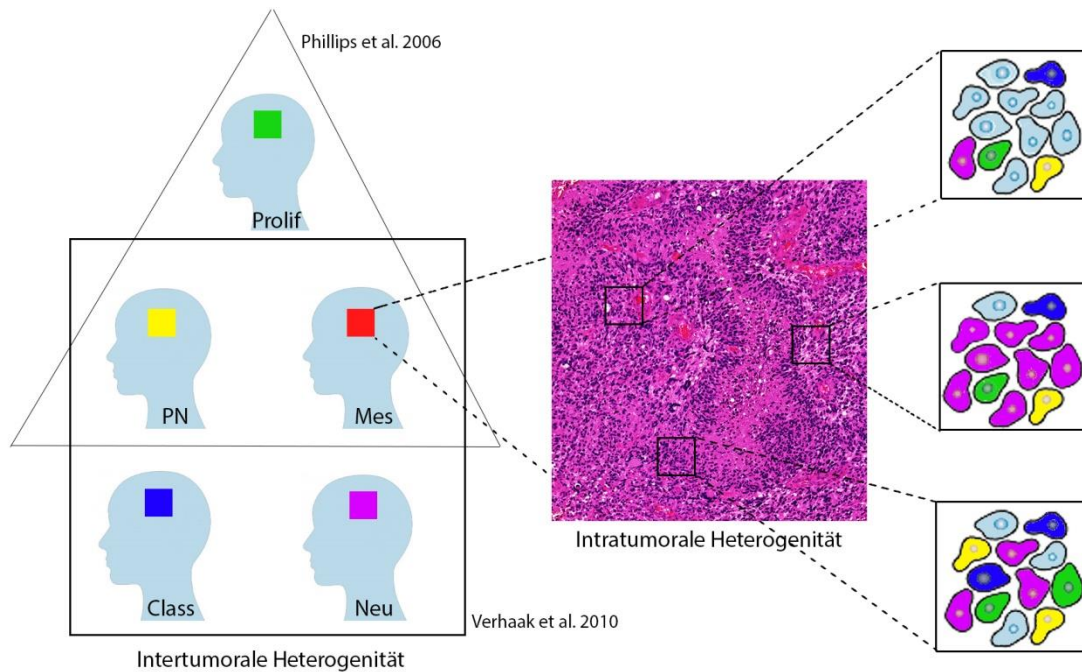


Abb. 3: In der graphischen Darstellung angelehnt an Marusyk et al. 2012; Neuropathologisch diagnostizierte Glioblastome (WHO Grad IV) lassen sich anhand von molekularen Eigenschaften in Tumorsubtypen untergliedern (intertumorale Heterogenität). Phillips et al. differieren den *proneuralen (PN)*, *proliferativen (Prolif)* und *mesenchymalen (Mes)* Subtypen. Verhaak et al. unterteilen das Glioblastom in vier Gruppen, nämlich den *neuronalen (Neu)*, *proneuralen (PN)*, *klassischen (Class)* und *mesenchymalen (Mes)* Subtypen. Neben den Unterschieden der Tumoren zwischen den einzelnen Patienten (intertumorale Heterogenität) ist auch die Tumormasse eines einzelnen Patienten heterogen aufgebaut (intratumorale Heterogenität). Je nachdem, welche Tumorregion eines einzelnen Tumors analysiert wird, zeigen sich unterschiedliche Zellcharakteristika.

1.3.3 Intratumorale Heterogenität

Der Grad der intratumoralen Heterogenität ist bereits isoliert betrachtet ein prognostischer Biomarker. Je ausgeprägter er ist, desto schlechter ist die Überlebenschance des Patienten (Marusyk et al. 2012). Unsere diesbezüglichen Kenntnisse stützen sich heute vor allem auf die Ergebnisse moderner Einzelzellexpressionsanalysen, die anhand der Sequenzierung proteincodierender (Patel et al. 2014) oder nicht-codierender RNA (Lv et al. 2016) eine intratumorale Heterogenität bis hinunter auf zelluläre Ebene beweisen. Die Profile der Zellen eines Tumors unterscheiden sich deutlich. Der Versuch, das Expressionsmuster einer einzelnen Zelle einem charakteristischen Tumorsubtypen zuzuordnen, zeigte, dass die Zellen unterschiedliche Subgruppen repräsentieren. Einige Zellen befinden sich zudem in Zwischenstadien: Sie weisen gemischte Eigenschaften zweier Gruppen auf (Lv et al. 2016). Zur Erklärung des Ursprungs der intratumoralen Heterogenität existieren vielfältige Hypothesen (Bonavia et al. 2011; Marusyk et al. 2012). Eine dieser Hypothesen basiert auf der in Tumorzellen generell erhöhten genetischen Instabilität, die zur Akkumulation verschiedener

Mutationen und einer primären Diversivität auf Ebene der Desoxyribonukleinsäure führt (Furnari et al. 2007). So kann beispielsweise die mutationsbedingte Inaktivierung des Tumorsuppressorgens TP53, bekannt aus dem Modell der sekundären Gliogenese (Ohgaki und Kleihues 2005), nur in einer Teilmenge der Zellen des insgesamt vorliegenden Tumormaterials detektiert werden (Bonavia et al. 2011). Wenn Zellen aufgrund der Anhäufung zufälliger Mutationen einen Überlebensvorteil erlangen, kommt es durch Selektionsdruck zum Hervortreten und zur Ausdehnung dieses Zelltyps, was als Theorie der klonalen Abstammung, als sogenannte *clonal evolution*, bezeichnet wird. Auch epigenetische Regulationsmechanismen – verändert zum Beispiel durch inflammatorische Prozesse – bilden eine Teilkomponente in der Entstehung intratumoraler Heterogenität. Aus einer variierenden epigenetischen Prägung, in Form von Methylierung oder Histonmodifikation, resultiert eine von der DNA-Sequenz unabhängige veränderte Genfunktion und -aktivität, welche auf der Ebene des Phänotyps fassbar ist. Größte Bedeutung kommt dabei dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors zu. Er ist bisher der einzige zuverlässige prognostische Marker für Therapieansprechen beim Glioblastom (Taylor und Schiff 2015). Das Stammzellmodell wiederum beschreibt eine variierende Expression entsprechend des jeweiligen Differenzierungsgrades und der Differenzierungsrichtung (Bonavia et al. 2011; Marusyk et al. 2012). In dieser Hypothese verfolgt man den Ansatz, dass sich eine hierarchisch abgestufte Ordnung ausgehend von selbsterneuerbaren Zellen mit Stammzellcharakter bildet (Gilbertson und Rich 2007).

Wesentlichen Einfluss auf die intratumorale Heterogenität hat auch die Beschaffenheit und Dynamik der Tumorzellumgebung. So interagieren Tumorzellen zum einen untereinander und reagieren zum anderen auch auf Faktoren, die von nicht-onkologischen Zellen sezerniert werden und damit das Mikromilieu verändern. Diese Kommunikation kann Auswirkung auf die Charaktereigenschaften von Zellpopulationen haben, sodass einige folglich verstärkt proliferieren, sich invasiver verhalten oder resistenter gegenüber der Therapie werden. Im Verlauf der Tumorprogression variiert auch der Extrazellularraum (Bissell et al. 2005). Fehlerhaft organisierte anatomische Strukturen wie irreguläre pathologische Gefäße treten vermehrt hervor. Bei unzureichender Vaskularisation entsteht eine lokal begrenzte Hypoxie, die wiederum Auswirkungen auf das Expressionsmuster dort ansässiger Zellpopulationen hat und Aggressivitätsfaktoren schürt. Das örtlich und zeitlich wechselnde Mikromilieu erzeugt innerhalb des Tumorgewebes einen Selektionsdruck und bedingt somit wiederum die zelluläre Heterogenität (Anderson et al. 2006).

Die Gesamtheit der soeben beschriebenen unterschiedlichen Einflussfaktoren bedingt ein Ensemble von Zellen außerordentlicher Heterogenität, die ein komplexes, interagierendes Glioblastomnetzwerk bilden (Abb. 4).

Der in dieser Studie gewählte Ansatz der Gewebsanalyse mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz ermöglicht es, den Ort und die Umgebung der untersuchten Zelleigenschaften, das heißt die Tumorarchitektur, in pathophysiologische Überlegungen miteinzubeziehen. Somit werden unter anderem unter Zuhilfenahme des Biomarkers CA-IX Areale mit chronischer Hypoxie visualisiert und folglich die große Bedeutung des Mikromilieus innerhalb des tumorösen Ensembles berücksichtigt.

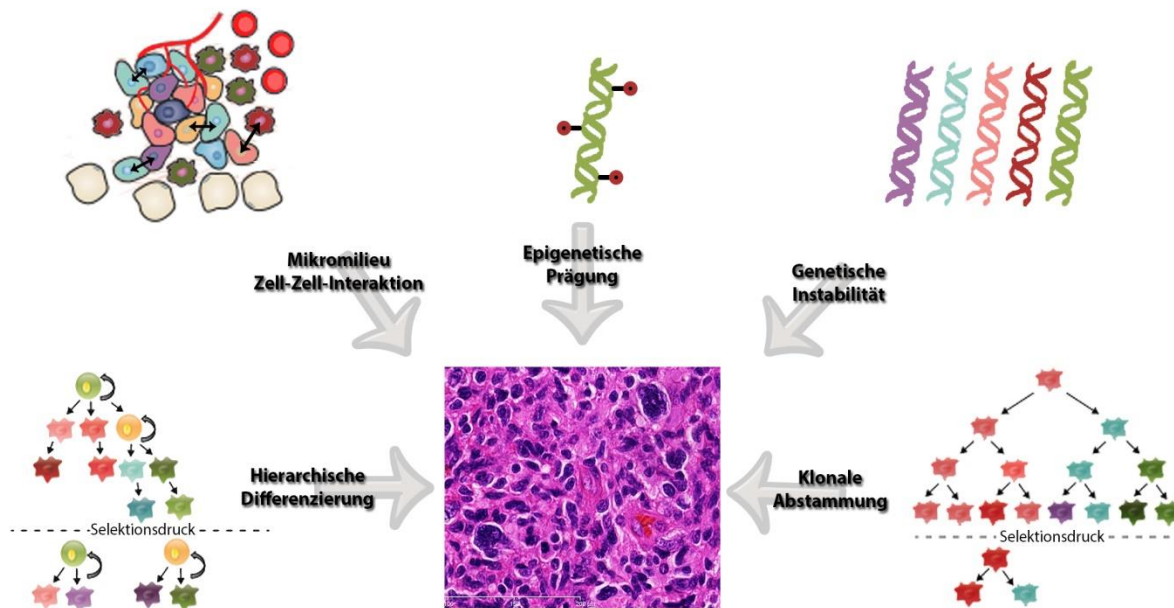


Abb. 4: Modifiziert nach Bonavia et al. 2011 und Marusyk et al. 2012; Übersichtsdarstellung der möglichen Ursachen für die Entstehung der intratumoralen Heterogenität.

1.4 Biologische Grundlagen der Tumorentwicklung

Bei einem Tumor handelt es sich um eine abnorme Gewebsmasse, die durch sich unkontrolliert teilende Zellen entsteht. Wenn zusätzlich bestimmte Malignitätsfaktoren nachweisbar sind, wird die Erkrankung mit dem Überbegriff Krebs bezeichnet. Ursächlich für die Stimuli-unabhängige Zellproliferation ist die Akkumulation von Mutationen in der codierenden und nicht-codierenden DNA, die im Verlauf von Alterung, durch wiederholte Zellteilung und den Einfluss von Kanzerogenen entstehen. Durch die Veränderung des genetischen Materials werden sogenannte Tumorsuppressorgene inaktiviert und andererseits Protoonkogene aktiviert, wodurch der fein regulierte Mechanismus der Zellproliferation aus dem Gleichgewicht gerät. Weitere die Tumorgenese begünstigende Faktoren sind epigenetische Abweichungen, chromosomale Alterationen sowie ein verändertes Mikromilieu (López-Lázaro 2015).

Es existieren zwei Modelle, die die grundlegenden Konzepte der Tumorentwicklung zusammenfassen: Die hierarchische Stammzelltheorie und das stochastische Modell, welches auch als *klonales Evolutionsmodell* bezeichnet wird. Bei letzterem geht man, angelehnt an Darwins Evolutionstheorie, davon aus, dass jede einzelne Tumorzelle als Tumorsprungszelle fungieren kann, da alle Zellen innerhalb eines Tumors primär mit den gleichen Fähigkeiten ausgestattet sind. Tumorwachstum ist somit allein von der stochastischen Wahrscheinlichkeit abhängig, mit der eine Tumorzelle in den Zellzyklus eintritt und proliferiert. Die Stammzelltheorie hingegen postuliert, dass nur eine kleine Subgruppe von Tumorzellen die Eigenschaft zur Tumorentstehung besitzt – die sogenannten TICs (*tumor inducing cells*). Da sie viele Parallelen zu den adulten neuronalen Stammzellen aufweisen, werden sie als Tumorstammzellen (CSCs) bezeichnet. Typische Stammzeleigenschaften sind dabei die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, das Vorhandensein von Pluripotenz mit der Möglichkeit zur Ausdifferenzierung in unterschiedliche Zelltypen sowie das Potential zur Tumorentstehung und Rezidivbildung (Singh et al. 2003; Neradil und Veselska 2015). Internationale Forschungsgruppen identifizierten in den letzten Jahren CSCs in unterschiedlichen Tumorentitäten, initial in hämatologischen Neoplasien und schließlich in soliden Malignomen, zu welchen auch das GBM zählt (Galli et al. 2004; Singh et al. 2004). In hochgradigen Hirntumoren werden diese Zellen seit ihrer Identifizierung im Jahr 2004 als GSCs (*glioblastoma stem-like cells*) bezeichnet. Die Entstehung dieser Zellen ist nicht abschließend geklärt. Sie stammen entweder von reifen Astrozyten ab, in deren DNA sich Mutationen akkumulieren und konsekutiv zur Dedifferenzierung führen oder sie nehmen ihren Ursprung in neuronalen Stammzellen, die aufgrund von Mutationen in CSCs übergehen (Chen et al. 2012).

CSCs weisen eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber der in der Tumorbehandlung eingesetzten Radio- und Chemotherapie auf (Galli et al. 2004; Singh et al. 2004; Bao et al. 2006), passen sich rasch an ein verändertes Tumormikromilieu an und scheinen die Hauptursache für Rezidiv- und Metastasenbildung zu sein. Die Entwicklung einer Behandlungsform, die tumorinduzierende Glioblastomstammzellen beseitigt oder deren Differenzierung induziert, stellt eine vielversprechende Option in der Therapie des häufigsten adulten Hirntumors dar. Unter diesem Aspekt kommen auch in der hier dargestellten Immunreaktivitätsanalyse unterschiedliche Stammzellmarker (ALDH, Nestin) zur Identifizierung von CSCs zum Einsatz. Ziel ist es, die Lokalisation der CSCs innerhalb des Tumornetzwerkes zu erfassen, Faktoren, die die Rekrutierung oder Ausbildung von CSCs begünstigen, zu identifizieren und somit mögliche zusätzliche Resistenzmechanismen aufzufindig zu machen.

1.5 Bedeutende Biomarker

Die spezifische Detektion von Strukturen innerhalb des Glioblastoms mittels Biomarkern ist in der hier dargestellten Immunreaktivitätsanalyse die Grundvoraussetzung für weiterführende pathophysiologische Aussagen. Nur wenn der jeweilige Biomarker gut gewählt ist und die Eigenschaft visualisiert, die man zu untersuchen beabsichtigt, können qualitativ hochwertige Schlussfolgerungen gezogen werden.

Was also sind Biomarker? Bei Biomarkern handelt es sich um Produkte von Organismen, die als Indikatoren für physiologische oder pathologische Prozesse herangezogen werden können (diagnostisch) und in der Forschung zumeist mittels spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert werden. Des Weiteren dienen sie dazu Risikopatienten zu identifizieren (prognostisch) oder die Wahrscheinlichkeit für das zukünftige Auftreten einer bestimmten Erkrankung abzuschätzen (prädiktiv). Im Zeitalter der personalisierten Medizin gewinnen Markerproteine zunehmend an Bedeutung hinsichtlich einer Steigerung der Therapieeffizienz durch den Einsatz spezifischer, individualisierter Behandlungsstrategien.

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Studie eingesetzten neun Biomarker aufgeführt und ihre Bedeutung für die Glioblastombiologie beschrieben.

1.5.1 Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH 1) – ein Stammzellmarker

Wie oben beschrieben geht man anhand der aktuellen Studienlage davon aus, dass Zellen mit stammzellähnlichen Charakteristika, die sogenannten GSCs, für die nahezu ausnahmslose Rezidivierung der Glioblastome verantwortlich sind (Ginestier et al. 2007; Singh und Settleman 2010). Derartige Zellen innerhalb des Tumorgewebes zu identifizieren, ihre Lokalisation ausfindig zu machen und Besonderheiten in ihrem Umgebungsmilieu zu erfassen ist eines der Ziele dieser Arbeit. Um dies in der immunhistochemischen Analyse realisieren zu können ist der Einsatz von Stammzellmarkern notwendig. Trotz intensiver Forschungsarbeit gibt es bisher jedoch keinen Konsens bezüglich eines spezifischen Biomarkers zum Nachweis von GSCs. In den vergangenen Jahren wurden jedoch Proteine identifiziert, die zur Detektion von Zellen mit Stammzellcharakter genutzt werden können. Zu diesen Markern gehören Oberflächen- und Transmembranproteine (wie z.B. CD44, CD15, CD133) (Hemmati et al. 2003; Singh et al. 2004; Liu et al. 2006; Son et al. 2009), nukleäre Proteine (wie Sox-2) (Hemmati et al. 2003) und zytoplasmatische Proteine wie die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Biomarker Nestin (Tunici et al. 2004) und Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH1) (Rasper et al. 2010; Schäfer et al. 2012; Raha et al. 2014).

ALDH 1 ist ein in unterschiedlichen malignen Neoplasien auffindbarer zytoplasmatisch lokalisierter Tumorstammzellmarker, der in zahlreichen soliden Geschwulsten mit einem schlech-

ten klinischen Outcome korreliert (Ginestier et al. 2007; Jiang et al. 2009; Li et al. 2010; Rasper et al. 2010; Nakano 2015; Ni et al. 2015). Das Protein stellt ein Mitglied der Enzymgruppe der humanen Aldehyddehydrogenasen dar, die unter Zuhilfenahme des Coenzym NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) die Oxidation von zahlreichen Aldehyden zu ihren korrespondierenden Säuren katalysieren (Marchitti et al. 2008). Aldehyddehydrogenasen sind im humanen Organismus weit verbreitet und in zahlreichen Organen an wichtigen biologischen Prozessen wie der Reaktion auf oxidativen Stress (Marchitti et al. 2008), der Zelldifferenzierung und -proliferation sowie der Therapieresistenz (Muramoto et al. 2010) beteiligt. Entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung werden sie in unterschiedliche Subgruppen und Isoformen eingeteilt. Bezüglich des Glioblastoma multiforme erlangten die Isoenzyme ALDH1A1 und ALDH1A3 (Nakano 2015) große Bedeutung. Ihr physiologisches Hauptsubstrat ist das Aldehyd Retinal, welches zum Produkt Retinolsäure oxidiert wird. Dies wiederum induziert intranukleär die Expression von Genen, deren Genprodukte am Zellzyklusarrest, der Apoptose, der Zelldifferenzierung und der Proliferation mitwirken (Campos et al. 2011; Raha et al. 2014). ALDH1 spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Folgen des oxidativen Stresses. In Phasen von oxidativem Stress kommt es zur vermehrten Ausbildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen im Gewebe. Dies führt zu Lipidperoxidation sowie Proteinoxidation und bedingt eine erhöhte Aldehydmenge im Gewebe, wobei es sich um hochreaktive Agentien handelt. Wenn aktive Dehydrogenasen verfügbar sind, erfolgt die Oxidation der zytotoxischen Moleküle zu wenig-reaktiven Säuren. Bei fehlender enzymatischer Entgiftungsfunktion, zum Beispiel im Rahmen von ALDH-blockierenden Therapieansätzen, entstehen DNA-Schäden, die konsekutiv den Zelltod bedingen (Brooks und Theruvathu 2005). Diese detoxifizierende Aktivität verleitet zu der Annahme, dass eine hochregulierte ALDH1 dem Gewebe eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Umgebungsbedingungen sowie in der Onkologie eingesetzten Therapeutika verleiht (Raha et al. 2014; Nakano 2015).

Der Stammzellmarker Nestin wird aufgrund seiner strukturellen Zuordnung zu den Intermediärfilamenten im folgenden Kapitel besprochen.

1.5.2 Intermediärfilamente als Biomarker

Intermediärfilamente (IFis), einer der drei Hauptkomponenten des formgebenden Zytoskeletts der Zelle, sind hochdynamische, zelltypspezifische Strukturen, die sich während der Entwicklung von Säugetieren wandeln. In der Diagnostik von Neoplasien haben sie als Biomarker einen hohen Stellenwert, insbesondere dann, wenn die Zellen maligner Tumore ihre histologische Ähnlichkeit zum Herkunftsgewebe verloren haben. Astrozytomzellen exprimie-

ren die Intermediärfilamente GFAP, Vimentin, Nestin und Synemin, die sich auch in reaktiven Astrozyten nachweisen lassen (Herpers et al. 1986; Skalli et al. 2013). Skalli et al. zeigten jüngst eine auf diesen Intermediärfilamenten basierende Einteilung des Glioblastoms in drei Subgruppen und unterstreichen somit erneut die intertumorale Heterogenität (Skalli et al. 2013). Im Allgemeinen unterstützen Intermediärfilamente Zellen und Gewebe dabei, unterschiedliche Arten von Stress (ischämisch, osmotisch) zu verkraften (Pekny und Lane 2007) und stellen somit möglicherweise eine weitere Resistenzkomponente der Glioblastomzellen dar. Zudem begünstigen IFis die Zellmotilität und steigern indirekt das Invasionspotential (Lepekhin et al. 2001). Die Hochregulation der IFis ist bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen zu beobachten. Die Reorganisation der Intermediärfilamente und der Wechsel zwischen den Subtypen – sei es in der Entwicklung eines Organismus, als Reaktion auf Stressoren oder im Rahmen von neurologischen Erkrankungen – ist ein hochkomplexes System und bedingt veränderte Zelleigenschaften. In der vorliegenden Studie werden spezifische Antikörper zur Detektion der Biomarker GFAP, Vimentin und Nestin eingesetzt. Vor dem Hintergrund, dass es sich dabei um resistenzverleihende Zellstrukturen handelt, soll im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, wo die für diese IFis-positiven Zellen innerhalb des Tumors lokalisiert sind und mit welchen weiteren regionalen Eigenschaften sie einhergehen.

1.5.2.1 Nestin

Nestin ist ein seit 1985 bekanntes, überwiegend im Zytoplasma lokalisiertes Protein, welches zu den IFis der Klasse VI gehört (Lendahl et al. 1990). Es nimmt eine besondere Stellung in der Entwicklung des ZNS bei Säugetieren ein. Während frühe embryonale Zellen Nestin-negativ sind und Zytokeratin exprimieren (Jackson et al. 1980), ist ab der Neurulationsphase in den proliferativen, neuroektodermalen Vorläuferzellen Nestin nachweisbar. Im Rahmen von Reifungs- und Differenzierungsprozessen beenden diese Zellen ihre Nestinproduktion wieder und exprimieren je nach Zelltyp Klasse III und IV IFis (GFAP in Astrozyten und Neurofilament in Neuronen) (Dahlstrand et al. 1992).

Im adulten Gehirn ist es physiologischerweise nur noch in neuronalen Stammzellen (Holmin et al. 1997) und in den durch asymmetrische Zellteilung entstehenden neuronalen Vorläuferzellen, sogenannten Progenitorzellen, nachweisbar (Filippov et al. 2003). Passend dazu bilden Nestin-positive Zellen *in vitro* besonders große Sphären, was die für Stammzellen charakteristische Fähigkeit zur Tumorentstehung und Selbsterneuerung repräsentiert. Auch die Koexpression mit CD 133 und Sox-2 verstärkt das Einsatzpotential von Nestin als Stammzellmarker.

Unter pathologischen Bedingungen wie Ischämie und Inflammation oder im Rahmen einer traumatischen Gehirnläsion werden reife Astrozyten aktiviert, was auf der Ebene des Zytoskeletts mit der Reexpression von Nestin einhergeht (Clarke et al. 1994). Diese Änderung der Intermediärfilamentexpression verleiht der Zelle eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Umgebungsbedingungen (Krum und Rosenstein 1999), womit dem Protein Nestin eine neuroprotektive Funktion zukommt (Sahlgren et al. 2006).

Große Bedeutung erlangt es auch als diagnostischer und prognostischer Biomarker in Bezug auf humane Malignome. Eine immunhistochemisch nachgewiesene erhöhte Nestinexpression korreliert mit schlechtem Überleben (Arai et al. 2012). In der Reihe der Gliome steigt die Höhe der intrazellulären Nestin-Rate mit dem Tumormalignitätsgrad an (Kitai et al. 2010). Seine Überexpression in Glioblastomzellen führt zu vermehrtem Zellwachstum sowie gesteigerter Sphärenbildung (Matsuda et al. 2015) und spricht zudem für das Vorliegen von transformierten Zellen mit großem invasiven Potential und ausgeprägter Motilität (Rutka et al. 1999).

Zusammengefasst lässt sich Nestin im adulten humanen Gehirn in subventrikulär lokalisierten neuronalen Stammzellen, in transformierten neoplastischen Zellen und in reaktiven Astrozyten nachweisen.

Intermediärfilamente kommen gehäuft in Koexpression mit anderen IFis vor. Nestin ist dabei der Hauptpartner von Vimentin, das im folgenden Abschnitt beschrieben wird (Chou et al. 2003). Der *mesenchymale Glioblastom-Subtyp* nach Phillips et al., die aggressivste GBM-Form mit der schlechtesten Überlebensrate, lässt sich vor allem über diese beiden Biomarker definieren (Phillips et al. 2006). In der hier dargestellten Studie werden sie zur Detektion von Zellen mit erworbenen Resistenzfaktoren genutzt.

1.5.2.2 Vimentin

Vimentin ist ein der Klasse III zugeordnetes fibroblastäres IFi, das vor allem in Zellen mesenchymaler Herkunft (Bindegewebe, Fett, Knorpel, Knochen, Gefäße) präsent ist. Es spielt eine große Rolle bei der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), einem Prozess der Embryogenese und Tumorausbreitung, bei dem Zellen ihre Form, ihre Polarität und ihr Bewegungsverhalten ändern und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen (Mendez et al. 2010; Kubelt et al. 2015). Über seine Beteiligung an mehreren Signalwegen moduliert es die Motilität und Invasivität von Tumorzellen. In Vimentin-losen Zellen ist dieses Potenzial zur Migration abgeschwächt (Lepekhn et al. 2001) und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Stressfaktoren reduziert (Pekny und Lane 2007).

Lin et al. zeigten im Jahr 2016, dass die Höhe der Vimentinexpression im Gewebe von Patienten mit hochmalignen Gliomen mit einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert (Lin et al. 2016). Bei Glioblastompatienten identifizierten sie ein vermindertes Ansprechen auf die Temozolomid-Chemotherapie bei ausgeprägter Vimentin-Expression im entarteten Gewebe.

Wie oben erwähnt tritt in Tumoren wiederholt auch die Koexpression verschiedener Intermediärfilamentsubtypen auf, was mit einem erhöhten Malignitätsniveau (gesteigerte Zellmotilität und Invasionspotential) einhergeht (Hendrix et al. 1996). In diesem Rahmen darf auch das astrozytäre Hauptfilament GFAP nicht außer Acht gelassen werden, das im Folgenden näher beleuchtet wird.

1.5.2.3 Saures Gliafaserprotein – GFAP

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) gehört ebenso wie Vimentin zur Klasse III der IFis und gilt als Hauptbestandteil des Zytoskeletts reifer Astrozyten. Beide Proteine weisen hinsichtlich biochemischer und biophysikalischer Aspekte wie Größe und molekulares Gewicht große Ähnlichkeit auf (Yung et al. 1985).

GFAP wurde erstmals aus Plaques von Patienten mit langjähriger Multipler Sklerose isoliert (Eng et al. 1971). Seither konnten, abhängig vom alternativen Splicing der mRNA, zahlreiche Isoformen mit variierenden Eigenschaften beschrieben werden (Middeldorp und Hol 2011). GFAP ist ein formgebendes Protein, das der Zelle Zugfestigkeit und mechanische Stabilität verleiht. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und -motilität, wirkt am zerebralen Glutamatstoffwechsel mit (Sullivan et al. 2007), fördert die synaptische Plastizität und steigert die Regenerationsfähigkeit. Reaktive Astrozyten zeigen eine Hochregulation des GFAP und anderer IFis, kombiniert mit einer zellulären Hypertrophie. Diese Anpassung als Reaktion auf schädigende Gewebeflässe ermöglicht in der akuten Phase eine erhöhte Resistenz gegenüber den Stressoren, limitiert den Gewebeschaden und begünstigt die Wiederherstellung der Homöostase (Hol und Pekny 2015).

Eine hohe GFAP-Expression in Astrozytomzellen geht einher mit einer verminderten Proliferationsrate und einem in vitro reduzierten Kolonienwachstum (Rutka und Smith 1993). Astrozyten von GFAP^{-/-} Mäusen wachsen schneller und erreichen verglichen mit Astrozyten von Wildtypmäusen eine höhere Zelldichte (Pekny et al. 1998).

Ebenso wie beim Protein Nestin wandelt sich die GFAP-Expression im Laufe der Entwicklung – durch Alterung und im Rahmen zahlreicher Erkrankungen (Middeldorp und Hol 2011). Im Hirntumorgewebe konnte mit steigender Gewebsanaplasie eine abnehmende GFAP-Rate

registriert werden (Duffy et al. 1982), was den dedifferenzierten Zustand der neoplastischen Zellen reflektiert.

Zusammengefasst ist GFAP ein Marker für Tumoren astrozytären Ursprungs (Rutka et al. 1999), für differenzierte Astrozyten im physiologischen Gewebe und für aktivierte Astrozyten mit gesteigerter Widerstandskraft.

Das gesamte Unterkapitel zu den IFis unterstreicht wiederholt die fundamentale Wichtigkeit der IFis in der Pathogenese und Progression hochgradiger Gliome und zeigt ihre Bedeutung als zelluläre Resistenzfaktoren auf, weshalb sie auch in der hier dargestellten Immunreaktivitätsanalyse zum Einsatz kamen.

1.5.3 Neuronale Marker

Ein spezifisches Markerprotein, dessen immunzytologischer Nachweis die Zuordnung einer Zelle zum neuronalen Gewebe erlaubt, wird als neuronaler Marker bezeichnet. Neuronen besitzen zahlreiche Marker, deren Erscheinen in Zellen als Indikator für eine neuronale Differenzierung dient (Alekseeva et al. 2015). An dieser Stelle wird nur auf die beiden in dieser Arbeit eingesetzten Biomarker NeuN und MAP2 eingegangen. Ihre Auswahl erfolgte aufgrund ihrer wichtigen Bedeutung bei der Zuordnung eines Glioblastoms zur *proneuralen Subgruppe* mit besserer Überlebenswahrscheinlichkeit (siehe Sektion 1.3.2) (Phillips et al. 2006). Im Rahmen dieser Studie stellt sich die Frage, ob eine derartige proneurale Konstellation auch auf regionaler Tumorebene, unabhängig von der jeweiligen Tumorsubgruppe, nachweisbar ist.

1.5.3.1 MAP2 – Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2

Neben den IFis stellen Mikrotubuli einen weiteren wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts dar. Sie sind einerseits an der Zellstabilisierung und andererseits an zahlreichen zytoplasmatischen Transportvorgängen beteiligt. In proliferierenden Zellen bilden sie zudem den Spindelapparat und ermöglichen somit die Trennung der Chromatiden eines Chromosoms während der Mitose (Johnson und Jope 1992). Mikrotubuli sind aus Tubulindimeren aufgebaute, gepolte Hohlzylinder mit erheblicher dynamischer Instabilität und ausgeprägter Längenvariabilität. Bei ihrem Auf- und Abbau spielen Begleitproteine, sogenannte MAPs, eine bedeutende Rolle. In nicht-phosphorylierter Form binden sie an die Mikrotubuli und stabilisieren deren Struktur, in phosphorylierter Form, katalysiert durch Kinasen, ist ihre Affinität zu den Mikrotubuli herabgesetzt, was eine Depolymerisierung herbeiführt (Hirokawa 1994; Sánchez et al. 2000). Zugleich vernetzen MAPs die zylindrischen Polymere untereinander sowie mit den

anderen Filamentsystemen. In der Literatur sind unterschiedliche MAP-Subtypen beschrieben. MAP2 – das quantitativ bedeutendste MAP des Gehirns – ist vor allem in zerebralen Neuronen zu finden (Dehmelt und Halpain 2004) und dort insbesondere in den Dendriten lokalisiert. Es fördert neurotransmitterabhängig die Ausbildung und Stabilisierung der Dendriten, unterstützt die synaptische Plastizität und wirkt an der lokalen neuronalen Signaltransduktion mit (Gardiner et al. 2011). Ungünstige Umgebungsbedingungen wie Hypoxie führen zu einer proteolytischen Degeneration von MAP2 und gehen konsekutiv mit einer verminderten Immunreaktivität auf monoklonale Anti-MAP2-Antikörper in den entsprechenden Arealen einher. Folglich wird angenommen, dass die regionale Visualisierung von MAP2 zur Detektion von Dendritenschädigungen im Rahmen von zahlreichen Pathologien des ZNS herangezogen werden kann (Kitagawa et al. 1989).

1.5.3.2 NeuN – Neuronales Kernantigen

Das Neuron-spezifische Kernprotein NeuN ist seit seiner Erstbeschreibung durch Mullen et al. im Jahr 1992 ein sowohl in der experimentellen Neurowissenschaft als auch in der diagnostischen Histopathologie weit verbreiteter Marker zur Identifizierung postmitotischer Zellen mit neuronalem Phänotyp im zentralen und peripheren Nervensystem der Wirbeltiere (Mullen et al. 1992). Es kann, abgesehen von wenigen Ausnahmen (wie zum Beispiel den zerebellären Purkinjezellen und den retinalen Photorezeptorzellen), die große Mehrheit von unterschiedlichen Neuronenarten des mamillären Nervensystems identifizieren. NeuN erscheint während der frühen Phase der Embryogenese in postmitotischen Neuroblasten und persistiert in entdifferenzierten adulten Neuronen. Somit steht seine Expression in Zusammenhang mit dem neuronalen Differenzierungsgrad. Seinen Namen erhielt es aufgrund der mittels des monoklonalen Antikörpers A60 überwiegend im Zellkern und perinukleär detektierbaren Immunreaktivität. In Gliazellen wie Oligodendrozyten, Mikroglia oder Astrozyten wird es nicht exprimiert. Über Doppelfärbungen mit dem Anti-GFAP-Antikörper konnte seine Abwesenheit auch in reaktiven Gliazellen bestätigt werden (Mullen et al. 1992).

Die molekulare Sequenz des Proteins blieb über lange Zeit unbekannt, bis Kim et al. im Jahr 2009 unter Anwendung von massenspektrometrischen Analysen das Ursprungsgen des NeuN-Antigen identifizieren konnten und anschließend seine Bedeutung als Regulationsfaktor beim alternativen Spleißen von prä-mRNA im Nervensystem beschrieben (Kim et al. 2009 und 2011). Zur Steigerung der diagnostischen Zuverlässigkeit fand der Biomarker NeuN auch Einzug in die histopathologische Analyse von neuroonkologischem Gewebe (Hagel et al. 2013). Hierbei dient er vor allem der Differenzierung unterschiedlicher Tumorformen und zur Subklassifizierung einzelner Tumorentitäten (vgl. *proneuraler Glioblastomsubtyp*, be-

schrieben in der Sektion 1.3.2) (Phillips et al. 2006). In schnell proliferierenden Tumoren entstehen Regionen mit hypoxischen Bedingungen; ebendort ist ein Rückgang der NeuN-Immunreaktivität in Gewebeproben nachweisbar. Dies ist vermutlich multifaktoriell bedingt und kann auf einen Nervenzelluntergang, die verminderte bzw. gestoppte NeuN-Produktion in geschädigten Zellen oder eine Abnahme der Antigenität zurückgeführt werden (Sugawara et al. 2002; Unal-Cevik et al. 2004).

1.5.4 Mib1 – ein Proliferationsmarker

Die Stimuli-unabhängige, unkontrollierte Proliferation von transformierten Zellen ist, wie oben beschrieben, eines der Hauptcharakteristika von Tumorerkrankungen (Hanahan und Weinberg 2011). Insbesondere das Glioblastom ist eine hochproliferative Neoplasie mit enormer Wachstumsgeschwindigkeit. In dieser Arbeit sollen die inter- und intratumoralen, regionalen Proliferationsunterschiede sichtbar gemacht und Zusammenhänge mit anderen Zelleigenschaften analysiert werden, um so möglicherweise Ursachen für die differierenden Wachstumsraten zu identifizieren. Einer der in der Immunhistochemie am weitest verbreitetsten Biomarker zur Detektion der wachsenden Zellfraktion im Gewebe ist der monoklonale Antikörper Mib1, der das im Zellzyklus exprimierte Protein Ki-67 visualisiert (Kordek et al. 1996). Dieses Antigen erscheint in proliferierenden Zellen, ist jedoch in reifen ruhenden Zellen, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, nicht nachweisbar. Somit stellt es einen wichtigen Biomarker für die proliferative Aktivität im Gewebe dar (Gerdes et al. 1984). Trotz seiner großen Bedeutung in der Diagnostik bleibt seine biologische Funktion weitestgehend unklar. Bullwinkel et al. beschrieben im Jahr 2006 eine Beteiligung an der ribosomalen RNA-Synthese (Bullwinkel et al. 2006). Zudem wurde von einer Stabilisierung des Spindelfaserapparates während der Mitose berichtet (Vanneste et al. 2009). Ki-67 ist ein nukleäres Protein, das während der Interphase insbesondere im Nukleolus lokalisiert ist. In der Mitose ist es Bestandteil der perichromosomalen Schicht, die sich unter Aussparung des Zentromers von einem Chromosomenende zum nächsten erstreckt. Dabei dient es als Leitschiene für die Reorganisation von Zellkernbestandteilen. Fehlt das Antigen Ki-67, so weisen entsprechende Zellen eine erhöhte Apoptoserate auf (Booth et al. 2014).

Es ist bekannt, dass bestimmte genetische Veränderungen innerhalb des Tumors Auswirkung auf die Proliferationsrate haben können. Dazu zählen insbesondere auch die im folgenden Abschnitt thematisierten Aberrationen des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors.

1.5.5 EGFR – ein epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

Das Ausmaß der Expression des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) variiert sowohl zwischen Tumoren unterschiedlicher Patienten als auch in unterschiedlichen Arealen desselben Tumors (Libermann et al. 1984; Hatanpaa et al. 2010). Somit stellt EGFR einen zusätzlichen Marker dar, der die inter- und intratumorale Heterogenität auf genetischer Ebene beschreibt. Der *klassische Subtyp* nach Verhaak et al. ist zum Beispiel durch die Mutation und konsekutive Überexpression des EGFRs charakterisiert (Verhaak et al. 2010).

Die Amplifikation des EGFR-Gens ist bei einer Nachweisbarkeit von 40-60% der Glioblastome die häufigste genetische Alteration in diesen Malignomen und geht zumeist mit einer Proteinüberexpression einher (Voldborg et al. 1997). In der Hälfte der Fälle ist zusätzlich die sogenannte EGFRvIII-Mutation nachweisbar, bei der durch Deletion die Liganden-bindende Domäne des Rezeptors wegfällt und eine dauerhaft aktive Rezeptorvariante entsteht (Wong et al. 1992; Frederick et al. 2000). Die EGFRvIII-Mutation kann in wenigen Fällen auch unabhängig von der EGFR-Amplifikation im Tumor präsent sein. Das Auftreten von EGFR-betreffenden genetischen Alterationen ist ein frühes Ereignis innerhalb der Glioblastomentwicklung (Del Vecchio et al. 2013).

Das Wild-Typ-EGFR-Molekül ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Durch die extrazelluläre Bindung von spezifischen Liganden (v. a. Wachstumsfaktoren wie EGF) kommt es zur Dimerisierung, wodurch die intrazelluläre Signaltransduktionskette aktiviert wird (Azuaje et al. 2015). Dies wiederum führt zur vermehrten Entstehung von Genprodukten, die den Zellzyklus antreiben und den apoptotischen Zelltod vermindern.

Pathophysiologisch bedingen die EGFR-Amplifikation und die EGFRvIII-Mutation im Glioblastom zum einen die dysregulierte, unkontrollierte Proliferation und zum anderen eine gesteigerte Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (Lund-Johansen et al. 1990; Huang et al. 2009). Beides begünstigt somit die Ausprägung zweier Hauptcharakteristika der Glioblastome, nämlich die rasante Wachstumsgeschwindigkeit, kombiniert mit starker Invasivität, woraus ein diffus infiltrierendes Tumorgewebe resultiert. Passend dazu konnten Mazzoleni et al. im Jahr 2010 für GSCs mit erhöhter EGFR-Expression einen gesteigerten Malignitätsgrad im Gegensatz zu denjenigen ohne EGFR-Amplifikation nachweisen (Mazzoleni et al. 2010).

Aufgrund der großen Bedeutung der EGFR-Aberrationen für die Glioblastombiologie sind zahlreiche EGFR-zielgerichtete Therapiestrategien (Tyrosinkinase-Inhibitoren, spezifische Antikörper, Immuntherapie) in Entwicklung und klinischer Erprobung (Emrich et al. 2002; Choi et al. 2009; Karpel-Massler et al. 2009). Trotz der Erfolge bei anderen Tumorentitäten (wie NSCLC, Kolorektales Karzinom) bleibt der Einsatz der zielgerichteten Therapie bei Glioblastompatienten bisher ohne Überlebensvorteil (Rich et al. 2004; Raizer et al. 2010). Ein Grund dafür scheint die im Glioblastom auch bezüglich der EGFR-Expression bestehen-

de ausgeprägte intratumorale Heterogenität zu sein, die dazu führt, dass durch die zielgerichteten Therapeutika nicht alle neoplastischen Zellen erreicht werden und mittels induziertem Selektionsdruck sogar Resistenzmechanismen geschürt werden (Padfield et al. 2015). In dieser Studie kam ein monoklonaler Anti-EGFR-Antikörper zum Einsatz, um auf immunhistochemischem Wege die Verteilung der EGFR-Expression über die Tumormasse zu analysieren. Dabei wurde insbesondere die ortsgebundene Koexpression mit anderen Biomarkern untersucht, wobei, basierend auf der soeben beschriebenen Pathophysiologie, vor allem der ortsspezifische Proliferationsindex sowie die Koexpression von resistenzverleihenden Mechanismen von Interesse waren.

1.5.6 CA-IX – ein Hypoxiemarker

Wie oben beschrieben herrscht innerhalb der Tumormasse der Glioblastome eine sehr große intratumorale Zellheterogenität. Dies wird heutzutage als Hauptursache für die reduzierte Therapieeffizienz und das nahezu ausnahmslose Rezidivieren der Glioblastome angesehen. Aufgrund der unterschiedlichen Zellcharakteristika gelingt es mit dem Einsatz herkömmlicher onkologischer Therapeutika nur, einen Teil der Tumorzellen zu eliminieren. Eine Subpopulation von resistenten, widerstandsfähigen Zellen persistiert. Dabei handelt es sich insbesondere um GSCs, die sich zum einen zumeist im Ruhestadium befinden und somit durch die antitumorale Therapie schlecht erreicht werden (Chen et al. 2016) und zum anderen Mechanismen (wie aktive Transportsysteme, effektive DNA-Reparatur, erhöhte Expression von antiapoptotischen Proteinen) ausgebildet haben, die ihre Widerstandsfähigkeit erhöhen und zudem die Radio- und Chemoresistenz der Tumoren bedingt (Murat et al. 2008; Sørensen et al. 2015). GSCs sind vor allem in hypoxischen Regionen des Tumors lokalisiert (Persano et al. 2011).

Hypoxie, das heißt ein regional vermindertes Sauerstoffniveau, ist das zentrale Charakteristikum des Mikromilieus von hochproliferierenden soliden Tumoren, zu denen auch das GBM zählt. Sie entsteht durch das starke Tumorstadium, welches die Ausbildung suffizienter Blutgefäße deutlich übersteigt (Bar 2011). Dennoch sind hypoxische Glioblastomregionen hochvaskularisiert. Dabei handelt es sich allerdings vor allem um pathologische Gefäße mit ineffizientem Blutfluss und Okklusionsneigung. Hypoxie hat zahlreiche Auswirkungen auf das Tumorgewebe und begünstigt insbesondere Zellen im undifferenzierten Status. Sie fördert deren Fähigkeit zur Migration und steigert damit das invasive Potential. Neben anderen (McCord et al. 2009) zeigten Li et al. im Jahr 2013 die Zunahme von Stammzellmarkern wie Nestin und CD133 und die Abnahme von Markern für Zelldifferenzierung unter hypoxischen

Bedingungen (Li et al. 2013). Hypoxie führt durch Dedifferenzierung differenzierter Tumorzellen (Wang et al. 2017) zur Zunahme von GSCs innerhalb des Tumors.

Auf biochemischer Ebene induziert das sauerstoffarme Mikromilieu in den dort befindlichen Tumorzellen die Genexpression von zahlreichen resistenzverleihenden Faktoren; dazu zählt auch die Überexpression des Enzyms Carboanhydrase IX (CA-IX) (Lal et al. 2001; Proescholdt et al. 2005). CA-IX ist ein Transmembranprotein, das die Reaktion von Kohlensäure mit Wasser zu Bicarbonat und Wasserstoffionen katalysiert und somit in Tumorgebieten mit vermehrt anaerobem Stoffwechsel und der Akkumulation von Säureprodukten zur pH-Homöostase beiträgt (Kaluz et al. 2009). Dieser Metabolismus ermöglicht das Überleben der Tumorzellen unter ungünstigen Bedingungen und fördert gleichzeitig das Aggressivitätspotential in Form von gesteigerter Invasivität (Shin et al. 2011) und vermehrter Radiochemoresistenz. CA-IX ist ein unabhängiger prognostischer Marker für schlechtes Outcome. Hohe Raten des Enzyms im Tumor korrelieren mit einer verminderten Überlebenschance (Proescholdt et al. 2012). Da Hypoxie die Genexpression von CA-IX stark induziert und dieses in physiologischem Hirngewebe praktisch nicht vorkommt, dient das Enzym CA-IX in der Wissenschaft als tumorspezifischer Hypoxie-Marker (Loncaster et al. 2001). Moderne Studien zeigen unter dem kombinierten Einsatz von Temozolomid und dem CA-IX-Inhibitor Acetazolamid einen erhöhten Tumorzelluntergang (Amiri et al. 2016) und beschreiben damit die Hypoxie-induzierten Signalwege als neuen Therapieansatzpunkt.

Aufgrund der hohen Assoziation des hypoxischen Milieus mit der Ausbildung und Verstärkung von Resistenzmechanismen und Stammzeleigenschaften im Glioblastom kommt der Hypoxie große pathophysiologische Bedeutung zu. In der hier dargestellten regionalen Immunreaktivitätsanalyse wurde CA-IX als Biomarker genutzt, um die Lokalisation hypoxischer Regionen innerhalb des Tumorgewebes zu visualisieren, die Koexpression mit anderen Tumorzellcharakteristika wie Stammzeleigenschaften, Zytoskelettaufbau sowie Proliferationsrate zu analysieren und die Auswirkungen der Hypoxie auf Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu untersuchen.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe des Einsatzes der in Kapitel 1.5 dargestellten neun Biomarker das humane Glioblastomgewebe hinsichtlich seiner spezifischen Immunreaktivität auf regionaler Ebene zu analysieren und durch Einbeziehen der Lokalisation bestimmter Tumoreigenschaften zum Verständnisgewinn der tumorösen Heterogenität beizutragen. Da die jeweiligen Moleküle in der durchgeführten Studie an ihrem natürlichen Ort sichtbar gemacht werden, wird die Integrität des Zellverbandes, also die Architektur des Tumors, im Unterschied zu bisherigen Studien in höherem Maße berücksichtigt. Auf Grundlage der neu gewonnenen Informationen sollen Hypothesen zur molekularen Pathogenese, zur Entstehung tumoraler Resistenzfaktoren und zu Anpassungsreaktionen der Zellverbände auf bestimmte Umgebungsfaktoren erstellt werden.

Ziel ist es herauszufinden, ob sich in der Gesamtheit der Glioblastommasse Regionen identifizieren lassen, in denen stets dieselbe Immunreaktivität nachweisbar ist und damit indirekt immer wieder dieselben Proteine hochreguliert sind. Gibt es Immunreaktivitätsprofile, die sich in bestimmten Arealen des Tumorgewebes unterschiedlicher Patienten oder derselben Person wiederholen? Lassen sich in diesem Fall Hinweise auf mögliche Einflussfaktoren finden, die diese Eigenschaftskonstellation begünstigen? Ist in Regionen eines charakteristischen Mikromilieus ein bestimmtes Immunreaktivitätsmuster besonders häufig zu finden?

Durch den verlagerten Betrachtungsfokus soll bei all der phänotypischen Heterogenität dennoch in gewisser Weise vereinheitlicht und homogenisiert werden, indem konstante Eigenschaften sowie sich wiederholende Gesetzmäßigkeiten herausgefiltert werden, die uns möglicherweise nähere Kenntnisse über die Pathophysiologie der Tumorprogredivenz sowie Therapieresistenz liefern.

Am Ende soll diese Arbeit, unter Berücksichtigung der inter- und intratumoralen Heterogenität, dazu beitragen, durch ein verbessertes Verständnis der Gliogenese rezistenzverleihende Faktoren als Basis für einen hochspezifischen, personalisierten Behandlungsansatz zu identifizieren. Ein großer Vorteil des gewählten Ansatzes gegenüber bisherigen Studien (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010) ist die zusammengeführte Betrachtung der inter- sowie intratumoralen Heterogenität, indem Gewebe von unterschiedlichen Patienten weiter in einzelne Regionen unterteilt wird, die alle auf gleicher Ebene analysiert werden. Zudem gelingt es, durch die Wahl der Methode der Immunhistochemie und der Auswertung des Gewebes mittels Mikroskopie auch die Tumoranatomie zu berücksichtigen. Dabei stellt die weite Verbreitung der gewählten Methode mit schneller Verfügbarkeit und guter Anwendbarkeit über teilmechanisierte Arbeitsschritte einen weiteren Vorteil dar, was insbesondere für die Einfüh-

rung personalisierter Therapieansätze von großer Bedeutung ist. Aus ökonomischer Sicht besteht somit im Erfolgsfall auch Potential für eine Umsetzung in der Routinediagnostik.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Gewebe

Sämtliche Untersuchungen erfolgten an humanem, neurochirurgisch reseziertem, mit Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Glioblastomgewebe. Die Proben wurden entsprechend der Leitlinien zur Gewebeaufbewahrung der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München unter Zustimmung der Patienten aus den Kliniken rechts der Isar, München Bogenhausen sowie der Berufsgenossenschaftlichen Klinik Murnau gesammelt.

3.1.2 Immunologische Materialien

3.1.2.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1: Humanreaktive primäre Antikörper

Zielantigen	Spezies	Hersteller
ALDH1	Maus	BD Transduction Laboratories (Heidelberg, Deutschland)
CA-IX	Kaninchen	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)
EGFR	Maus	Dako (Glostrup, Dänemark)
FABP7	Kaninchen	Millipore (Billerica, MA, USA)
GFAP	Maus	Dako (Glostrup, Dänemark)
MAP2	Maus	Sigma (Saint Louis, MO, USA)
Mib1	Maus	Dako (Glostrup, Dänemark)
Nestin	Maus	BD Transduction Laboratories (Heidelberg, Deutschland)
NeuN	Maus	Chemicon International (Billerica, MA, USA)
Vimentin	Maus	Dako (Glostrup, Dänemark)

3.1.2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Biotinyliert Anti-Maus	Pferd	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Biotinyliert Anti-Kaninchen	Ziege	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Fab Anti-Maus	Ziege	Dianova GmbH (Hamburg, Deutschland)
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	Life Technologies (Eugene, OR, USA)

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Citronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Diamidine-phenylindole (DAPI)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Eindeckmedium Pertex	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Fluoreszenzbefestigungsmedium	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin-Eosin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Normalserum von Maus	Dako (Glostrup, Dänemark)
Normalserum vom Pferd	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Normalserum von Ziege	Dako (Glostrup, Dänemark)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Streptavidin Alexa Fluor 555	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tyramid biotinyliert	Sigma (Saint Louis, MO, USA)
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Name des Puffers	Zusammensetzung	Hersteller
Ammoniumchloridlösung 10x	26,745g NH ₄ Cl, 1000ml H ₂ O	Eigene Herstellung
Citratpuffer	2.1g C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O, 1000ml H ₂ O, mit NaOH auf pH 6	Eigene Herstellung
PBS 10x	80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na ₂ HPO ₄ , 2,4g KH ₂ PO ₄ , 1000ml H ₂ O, mit HCl auf pH 7,4	Eigene Herstellung
PBST	1x PBS; 0,1% Tween20	Eigene Herstellung
TRIS Puffer/TBS 10x	60,5g Tris, 90g NaCl, 700ml H ₂ O, mit HCl auf pH 7,6, mit H ₂ O auf 1000ml	Eigene Herstellung
Verdünnungslösung	Gemäß Hersteller	Dako (Glostrup, Dänemark)

3.1.5 Kits

Tabelle 5: Kits

Name des Kits	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako (Glostrup, Dänemark)
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Name des Materials	Hersteller
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG (Braunschweig, Deutschland)
Mikrotomklingen R35	Feather (Osaka, Japan)
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG (Braunschweig, Deutschland)
Parafilm Verschlussfolie	Pechiney Plastic Packaging, (Menasha, WI, USA)
Reagenz-, Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co., (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., (Nümbrecht, Deutschland)

3.1.7 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Name des Geräts	Hersteller
Dampfgarer: S03	Tefal (Offenbach, Deutschland)
Feinwaage: EMB 200-2	Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop: Axio Imager.Z2	Carl Zeiss (Oberkochen Deutschland)
Gewebefärbeautomat: TST 40/44C	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)
Immunfärbeautomat: Benchmark XI	Ventana, Medical Systems (Tucson, AZ, USA)
Lichtmikroskop: CH-2	Olympus (Tokio, Japan)
Magnetrührer: RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Objektträger-Schnelltrockner: TDO 66	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)
Objektträger-Strecktisch: OT S40	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)
Paraffin-Streckbad: TFB: 35	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)
pH-Meter: EL-20	Mettler-Toledo GmbH (Giessen, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Rotationsmikrotom: Microm HM 355 S	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Digital Slide Scanner: Nano Zoomer 2.0-HAT	Hamamatsu (Hamamatsu, Japan)
Vortexmischer: Minishaker MS1	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Kühlplatte: COP 20	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)

3.1.8 Software

Tabelle 8: Software

Name der Software	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe Systems incorporated (San Jose, CA, USA)
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy (LLC, Thornwood, NY, USA)
Definiens TissueStudioTM	Cognition Network Technology, Definiens AG (München, Deutschland)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, WA, USA)
SPSS Statistics Version 21	IBM (Armonk, NY, USA)
NDP. View	Hamamatsu (Hamamatsu, Japan)

3.1.9 Patientenkollektiv

In die hier dargestellte immunhistochemische Schnittserienanalyse ging das Glioblastomgewebe von insgesamt 61 Patienten ein, deren operative Tumorsektionen in den Jahren 2011 und 2012 erfolgten. Die Gewebeproben stammen von 30 Frauen und 31 Männern. Bei

53 Tumoren (w: 28; m: 25) handelt es sich um die Erstdiagnose eines Glioblastoms, acht Tumoren (w: 2; m: 6) sind Rezidive. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs bei Diagnosestellung liegt bei 60 Jahren.

3.2 Methoden

3.2.1 Anfertigung der Schnittserien

Das Formalin-fixierte und in Paraffinblöcke eingebettete Glioblastomgewebe wurde zunächst 20 Minuten auf einer Kühlplatte temperiert. Nach dem Einspannen ins Rotationsmikrotom wurden 2 µm dicke Serienschritte angefertigt. Für die spätere Vergleichbarkeit der einzelnen Areale eines Glioblastoms auf den unterschiedlichen Schnittschichten wurde darauf geachtet, dass innerhalb einer zwölf Schnitte umfassenden Serie kein Materialverlust erfolgte. Zur Entfaltung wurden die Gewebeschichten in ein 42°C warmes Wasserbad gelegt und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Es folgte ein 20-minütiges Strecken auf der Wärmeplatte, bevor die Schnitte in einem Glasrahmen bei 55°C über Nacht im Wärmeofen getrocknet wurden.

3.2.2 Immunmarkierung

3.2.2.1 Bedeutung und Prinzip

Sowohl die Immunhistochemie als auch die Immunfluoreszenz sind zwei in der pathologischen Diagnostik und der Forschung an Gewebeproben allgegenwärtige Methoden der Immunmarkierung. Ihre Entwicklung hat zu einer deutlichen Zunahme der diagnostischen Präzision beigetragen. Insbesondere bei onkologischen Krankheitsentitäten können mithilfe dieser Techniken, in Zusammenschau mit morphologischen Kriterien, Tumorzelleigenschaften wie Aggressivität, Wachstumsverhalten oder Abstammung detektiert werden. Große Bedeutung erlangen die Färbemethoden durch den Nachweis der Zielmoleküle am Ort ihres natürlichen Vorkommens und dem damit erfassbaren Verteilungsmuster der Struktur innerhalb der vorliegenden Gewebeprobe.

Das Grundprinzip ist bei beiden Methoden vergleichbar und basiert auf der Ausbildung stabiler Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Markierung der Zielmoleküle mittels spezifischer Antikörper, die als Sonden dienen, kann jeweils direkt oder indirekt erfolgen.

Bei der direkten Form ist das Detektionssystem, wie zum Beispiel ein Enzym oder ein fluoreszierender Farbstoff, unmittelbar an den primären Antikörper gekoppelt. Diese Methode ist

zeiteffektiver, hat jedoch den Nachteil, dass keine Signalpotenzierung möglich ist und jedes Antiserum gesondert konjugiert werden muss.

Demzufolge wird heutzutage überwiegend die auch von uns gewählte indirekte, mehrstufige Färbemethode angewandt. Dabei wird ein unmarkierter primärer Antikörper auf das Präparat aufgetragen und geht gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip über Oberflächenerkennung eine stabile Bindung mit dem Zielepitop ein. Im nächsten Schritt bindet der sekundäre Antikörper an die Fc-Region des primären Immunglobulins, sodass ein fester Komplex entsteht. Dieser zweite Antikörper ist dabei entweder mit einem bestimmten Nachweissystem konjugiert oder er dient als Brückenmolekül.

Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF) differieren in der Art der Visualisierungsreaktion. Die immunhistochemische Färbung basiert auf der enzymatisch katalysierten Umwandlung eines farblosen Substrates in ein farbiges Produkt, das unmittelbar in loco präzipitiert. Die ortsgebundene Ablagerung kann anschließend im Lichtmikroskop analysiert werden.

Grundlegend für die IF ist kein chemischer, sondern ein photophysikalischer Prozess am Fluoreszenzmikroskop. Nach Anregung der fluorchrom-markierten Immunglobulinfraktion mit Licht einer bestimmten Wellenlänge folgt eine Lichtemission in verschiedenen Bereichen des sichtbaren Spektrums.

Mithilfe dieser spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen kann ein Molekül wie ein Protein oder Peptid nicht nur im Gewebe identifiziert werden – auch das Verteilungsmuster lässt sich beobachten. Es kann genau visualisiert werden, ob sich die Zielstruktur im nukleären, membranösen oder zytoplasmatischen Kompartiment einer Zelle befindet (Murphy et al. 2009; Lang 2013). Folglich liefern diese beiden Färbemethoden ideale Voraussetzungen, um die intratumorale Heterogenität des Glioblastoms näher zu beleuchten.

3.2.2.2 Durchführung

3.2.2.2.1 Immunhistochemie

Ein Teil der immunhistochemischen Färbungen wurde gemäß Herstelleranweisung maschinell im Immunfärbeautomaten durchgeführt (Tab. 10).

Die Detektion der Zielantigene ALDH1 und CA-IX erfolgte manuell im neuropathologischen Labor. Da der Anti-CA-IX Antikörper in unserem Labor noch nicht am Glioblastom etabliert war, wurde über eine Verdünnungsreihe im Voraus die optimale Arbeitskonzentration sowie die am besten geeignete Vorbehandlung an nicht in die Studie integriertem Testmaterial ermittelt.

Zu Beginn des manuellen Färbeprozesses wurde das Gewebe in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe aus Isopropanol und Ethanol bis hin zu destilliertem Wasser rehydriert (Tab. 9).

Tabelle 9: Entparaffinieren und Rehydrieren

Substanz	Zeitintervall
Xylol	3x 10Min
Isopropanol	2x 3Min
Ethanol 96%	1x 3Min
Ethanol 70%	1x 3Min

Zur Demaskierung der Epitope wurden die Präparate für 20 Minuten in Citratpuffer bei einem pH-Wert von 6 im Dampfgerar erhitzt. Nach dem 20-minütigen Abkühlen in der Retrieval-Lösung und dreimaligem Waschen in verdünntem TRIS-Puffer folgte zunächst die Blockierung der endogenen Peroxidase mit einer 3%-Wasserstoffperoxidlösung, welche für 15 Minuten aufgetragen wurde. Inkubiert wurde stets, wenn nicht gesondert aufgeführt, bei Raumtemperatur. Zum Spülen wurde fortwährend TRIS-Puffer (1x) genutzt. Alle weiteren Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden für jeweils 15 Minuten mit Avidin- und Biotinblockierlösung aus dem Kit von Vector benetzt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden und die Hintergrundfärbung zu minimieren, wurde das Gewebe zudem für 30 Minuten mit 5% Normalserum (Ziege) im Auftragpuffer von Dako behandelt. Schließlich wurden pro Gewebeschnitt 200µl der primären Immunglobulinlösung aufpipettiert und die Flüssigkeit mit Parafilm als Verdunstungsschutz bedeckt. So vorbehandelt wurden die Präparate über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Art der primären Antikörper, deren gewählte Verdünnung sowie die jeweiligen Positivkontrollen als Verifizierung einer adäquaten Färbung können der Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Primäre Antikörper mit Verdünnung, Positivkontrolle und Färbemethode

Antikörper	Verdünnung	Positivkontrolle	Färbemethode
Anti-ALDH1	1:500	Leber	manuell
Anti-CA-IX	1:250	CA-IX positives Tumorgewebe	manuell
Anti-EGFR	1:50	Ösophagus	maschinell
Anti-GFAP	1:100	Gehirn	maschinell
Anti-MAP2	1:500	MAP2 positives Tumorgewebe	maschinell
Anti-Mib1	1:50	Appendix	maschinell
Anti-Nestin	1:100	Nestin positives Tumorgewebe	maschinell
Anti-NeuN	1:500	Gehirn	maschinell
Anti-Vimentin	1:300	Appendix	maschinell

Nach der Inkubation über Nacht wurde zur Detektion zunächst der sekundäre biotinylierte Antikörper aus dem Dako-Kit auf die Objektträger aufgetropft und nach einem Spülvorgang peroxidasekonjugiertes Streptavidin hinzugefügt. Beide Reagenzien wirkten für je 30 Minuten auf das Gewebe ein. Für die enzymatisch katalysierte Farbreaktion wurde das mit HRP-Substratpuffer verdünnte DAB-Chromogen auf das Glioblastomgewebe pipettiert. Nach wenigen Minuten konnte das kontrastreiche braune Endprodukt am Ort des Zielantigens beobachtet werden. Zur besseren morphologischen Orientierung wurden die Präparate mit Meyers Hämalaun nukleär gegengefärbt. Dem Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe folgte das Eindeckeln mittels Pertex-Eindeckmedium. Zum Trocknen wurden die Objektträger für 15 Minuten in den Wärmeofen gelegt.

Das Ergebnis ist eine 10-er Schnittserie zu jedem der 61 in die Studie eingeschlossenen Glioblastome, bestehend aus neun immunhistochemischen Färbungen und einer maschinell angefertigten HE-Färbung, zur Erfassung morphologischer Merkmale (Abb. 5).



Abb. 5: Beispielhafte Darstellung der 10-er Schnittserie an einem ausgewählten Glioblastompräparat der Immunreaktivitätsanalyse, bestehend aus neun immunhistochemischen Färbungen und einer HE-Färbung, die zur morphologischen Beurteilung des Gewebes dient.

3.2.2.2 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden nicht an der gesamten Tumorpalette durchgeführt, sondern an ausgewählten Präparaten der Studienglioblastome. Es wurden stets Doppelfärbungen hergestellt. Die Kombinationen und Konzentrationen der Antikörper sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Auch hierbei wurden in Vorversuchen die optimalen Verdünnungen und die Notwendigkeit von zwischengeschalteten Amplifikationsschritten zur Signalverstärkung über Testreihen ermittelt.

Tabelle 11: Primäre humanreaktive Antikörper mit Verdünnung, ihren Kombinationspartnern und der Angabe, bei welchen Doppelfärbungen eine Amplifikationsmethode zur Signalverstärkung notwendig war.

Antikörper	Verdünnung	Doppelfärbungen mit	Amplifikation
Anti-ALDH1	1:100	Anti-CA-IX; Anti-FABP7	Nein; Ja
Anti-CA-IX	1:100	Anti-ALDH1; Anti-GFAP	Ja; Ja
Anti-FABP7	1:100	Anti-ALDH1	Ja
Anti-GFAP	1:200	Anti-CA-IX; Anti-Mib1;	Nein
Anti-Mib1	1:50	Anti- GFAP; Anti-Nestin	Ja; Ja
Anti-Nestin	1:50	Anti-Mib1	Nein

Die Schritte bis zum Auftragen des ersten sekundären Immunglobulins in der Konzentration 1:200 für zwei Stunden erfolgten bis auf kleine Abweichungen wie bei der zuvor beschriebenen Immunhistochemie. Um die Autofluoreszenz zu reduzieren, wurde zusätzlich für zehn Minuten mit Ammoniumchloridlösung geblockt. Das über 30 Minuten auf dem Präparat belassene 5%-ige Normalserum zur Minimierung der Hintergrundfärbung wurde so gewählt, dass es die Spezies des sekundären Antikörpers abdeckte. Als Verdünnungslösung diente stets PBST.

Nach dem Spülvorgang zur Entfernung der nicht gebundenen sekundären Antikörper folgte zur Signalamplifikation die Benetzung der Präparate mit dem zuvor angesetzten ABC-Kit von Vektor über eine Stunde. Anschließend wurden die Gewebeproben gewaschen und biotinyliertes Tyramid 1:1000 in Kombination mit Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Die Markierung des ersten Zielantigens wurde zur späteren Detektion unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Streptavidin-Alexa 555 in der Konzentration 1:1000 abgeschlossen. Da dies ein lichtsensibles Reagenz ist, wurde der Raum für alle weiteren Schritte abgedunkelt und die Arbeitsgefäße mit Alufolie umhüllt.

Bei Doppelfärbungen mit zwei primären Immunglobulinen aus der gleichen Spezies wie bei Anti-GFAP und Anti-Mib1, beide aus der Maus, wurden zwei Blockierungsschritte, zum einen

mit Mausserum und zum anderen mit einem Anti-Maus-Antikörper, eingeschoben, jeweils in der Verdünnung 1:50 über eine Stunde.

Dann folgte die Inkubation mit dem gegen das zweite Zielmolekül gerichteten primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Ohne weitere Zwischenschritte zur Signalverstärkung wurde der mit Alexa 488 konjugierte sekundäre Antikörper 1:200 über zwei Stunden aufgetragen und mit DAPI 1:10000 über zehn Minuten nukleär gegengefärbt. Zuletzt wurden die Gewebeproben mit Fluoreszenzbefestigungsmedium behandelt, eingedeckelt und bei 4°C abgedunkelt aufbewahrt.

3.2.3 Bildanalyse

3.2.3.1 Immunhistochemie

Die Quantifizierung der arealbezogenen Markerexpression der immunhistochemisch gefärbten 10er-Schnittserien erfolgte softwaregestützt in Kooperation mit der Abteilung für Analytische Pathologie des Helmholtz Zentrums München. Zuvor wurden die Präparate per Scanner digitalisiert. Bei dem verwendeten Bildanalysestystem *Definiens Cognition Network Technology* handelt es sich um eine objektbezogene Software, die es dem Benutzer durch die Entwicklung spezifischer Regelsätze und Algorithmen ermöglicht, Strukturen, wie zum Beispiel Zellen, zu quantifizieren. Am Anfang der Auswertung wurden auf jedem digitalisierten Gewebeschnitt manuell Interessensareale (Rols) eingezeichnet, die das zu analysierende Gewebe begrenzen. Die Auswahl der Rols orientierte sich an ortsgebundener hervorstechender Markerexpression sowie an anatomischen Landmarken. Insgesamt entstanden 186 unterschiedliche Interessensareale. Auf allen Schnitten eines Glioblastoms wurden dieselben Rols markiert, sodass die Expression aller neun Zielmoleküle in der gleichen Region quantifiziert werden konnte (Abb. 6). In kleineren Gewebeproben ergaben sich weniger Interessensareale als bei Präparaten mit großer Gewebsfläche. Nekroseareale, Artefakte, Randzonen, Gefäße und flächige Hämorrhagien wurden bei der händischen Arealbegrenzung weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

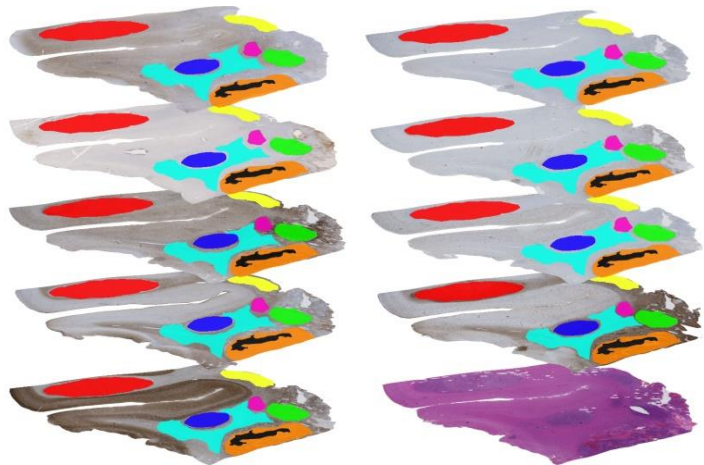


Abb. 6: Beispielfarbene Darstellung der manuell eingezeichneten Interessensareale auf den neun immunhistochemisch gefärbten Präparaten einer jeden individuellen Schnittserie. Die HE-Färbung dient der morphologischen Orientierung, sodass Gefäße, Nekrosen und Hämorrhagien sicher aus der Markierung ausgeschlossen werden konnten.

Nekroseareale, Artefakte, Randzonen, Gefäße und flächige Hämorrhagien wurden bei der händischen Arealbegrenzung weitestgehend ausgeschlossen.

Für jede Färbung wurden die Parameter und Algorithmen gesondert angepasst. Die automatisierte Segmentierung und Klassifizierung der Markerareale basierte auf morphometrischen Eigenschaften wie Farbe, Größe, Intensität und Form.

Um eine Aussage zum Zellvermehrungsverhalten in den markierten Arealen machen zu können, detektierte das Bildanalyzesystem alle Mib1-positiven, also braunen, Zellkerne und setzte diese ins Verhältnis zu allen vorkommenden Zellkernen. So ergibt sich die arealbezogene Proliferationsrate in Prozent (Abb. 7A). Das Ausmaß der NeuN-Expression wird als Dichtewert, also als Anzahl der positiven Zellen innerhalb der RoI-Fläche, angegeben. Der Expressionsgrad zytoplasmatischer Marker wird als prozentualer Anteil der Marker-positiven Fläche bezogen auf die Gesamtfläche des jeweiligen Interessensareals erfasst (Abb. 7B). Das Intermediärfilament Vimentin ist in zahlreichen Tumoren flächig exprimiert, sodass zur weiteren Differenzierung in der Auswertung auch die Markerintensität berücksichtigt wurde.

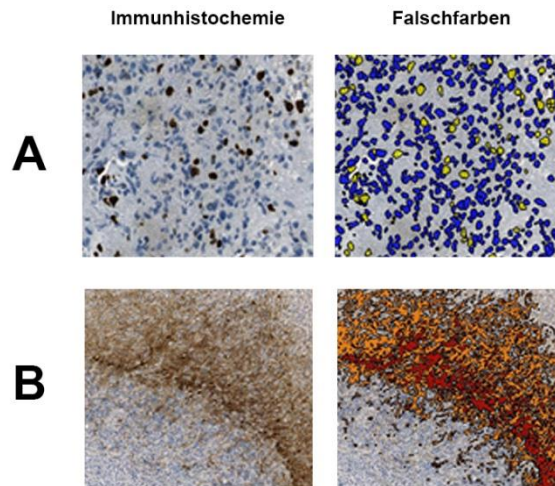


Abb. 7: Exemplarische Darstellung der digital mittels Bildanalyzesystem erfassten positiven Immunreaktivität innerhalb der Interessensregion; Gegenüberstellung desselben Areals in IHC-Färbung und Falschfarben. A) Detektion eines nukleären Proteins am Beispiel Mib1: Die vom Analysesystem als positiv erkannten Zellen sind gelb eingefärbt, die als negativ deklarierten blau. Daraus lässt sich die Proliferationsrate in % berechnen. B) Detektion eines zytoplasmatischen Proteins am Beispiel ALDH1: Die von der Software als positiv erkannte Fläche kommt je nach Markerintensität orange oder rot zur Darstellung und wird mit der Gesamtfläche des Rols ins Verhältnis gesetzt.

3.2.3.2 Immunfluoreszenz

Das Bildanalyzesystem kam zudem für die Quantifizierung eines Teils der am *Axiolmager* generierten Bilder des fluoreszierenden Glioblastomgewebes zum Einsatz. Zunächst wurden von ausgewählten Studienglioblastomen in den Doppelfärbungsreihen Mib1 mit Nestin sowie Mib1 mit GFAP mit dem Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung erstellt. Die Software unterschied Mib1-positive proliferierende Zellkerne von nicht-proliferierenden, mit DAPI gegengefärbten Zellkernen. Über einen angepassten Algorithmus wurde um jeden detektierten Zellkern ein Saum mit fixem Radius gezogen, der den Ort des Zelleibes und des Zytoplasmas angenähert darstellte (Abb. 8). Wurde innerhalb dieses

Saums eine über dem festgelegten Cut-off liegende GFAP oder Nestin-Menge detektiert, so wurde die entsprechende Zelle als bezüglich dieses Moleküls positiv gewertet.

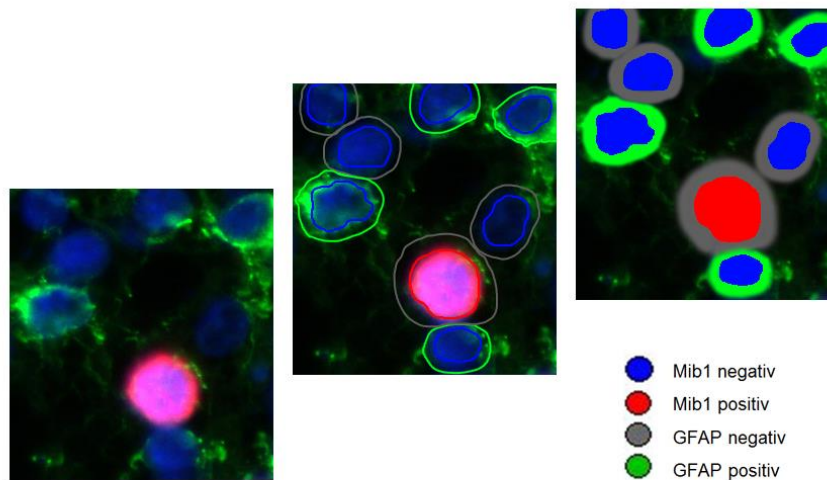


Abb. 8: Beispielhafte Darstellung der Software-gestützten Auszählungen der IF-Färbungen. Die proliferierenden Mib1-positiven Zellen besitzen einen roten Zellkern, Mib1-negative Zellen in der Ruhephase einen blauen. Dies wird von der Software detektiert. Anschließend wird um jeden Zellkern, zur Imitierung des Zelleibs, ein Saum mit festem Radius eingezeichnet. Wenn die Fläche innerhalb dieses Saums überwiegend grün fluoreszierend ist wird die Zelle als GFAP-positiv gewertet. In diesem Bildausschnitt liegt eine GFAP-negative proliferierende Zelle vor, vier GFAP-positive Zellen in der Ruhephase und drei Zellen, die bezüglich beider Faktoren negativ sind.

3.2.4 Statistische Auswertung

3.2.4.1 Korrelationsanalyse

Die mittels der Immunreaktivitätsanalyse gesammelten Daten wurden, mit Unterstützung durch die Kollegen des Institutes für medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar der TU München, mit dem SPSS Softwareprogramm ausgewertet. Dabei wurden die Markerkorrelationen aufgrund fehlender Normalverteilung der Daten nach Spearman berechnet. Von schwachen Korrelationen wird im Rahmen dieser Arbeit bei Korrelationskoeffizienten bis 0,39 gesprochen. Korrelationswerte von 0,4 bis 0,69 werden als mittelstarke Korrelation definiert. Ab einem Wert von 0,7 liegt eine starke Korrelation vor. Das Signifikanzniveau wurde bei dem Wert $p \leq 0,05$ festgelegt. Als weitere Subklassifizierung werden die Werte von $p \leq 0,01$ als signifikant mit sehr geringer Irrtumswahrscheinlichkeit definiert. Grafisch wird dies mittels Sternmarkierungen gekennzeichnet ($p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **).

3.2.4.2 Clusteranalyse

Im zweiten Schritt wurden die gewonnenen Rohdaten mittels hierarchischer Clusteranalyse ausgewertet. Die diesbezüglich anfallenden Berechnungen erfolgten in Kooperation mit den Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für extraterrestrische Physik in Garching bei München.

4. Resultate

Der optimale Therapieeffekt bei der Behandlung onkologischer Erkrankungen ist dann zu erwarten, wenn durch die jeweilige Therapie der gesamte Tumor einer Person eliminiert werden kann und das bei allen von derselben Erkrankung betroffenen Personen gilt. Dies erscheint dann möglich zu sein, wenn die Zellen des Tumors eines Patienten homogen sind und die Tumoren verschiedener Patienten vergleichbare Eigenschaften aufweisen. Beim GBM, das sich durch die zuvor in den Kapiteln 1.3.2 und 1.3.3 beschriebene ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität auszeichnet, ist dies jedoch nicht der Fall. Dennoch wird für die Entwicklung effektiver Therapien eine gewisse Homogenität benötigt, es muss also vereinheitlicht werden. Da dies auf der obersten Betrachtungsebene nicht gelingt, wurde im Rahmen dieser Studie ein neuer Ansatz gewählt und eine regionale, arealbezogene Analyse durchgeführt, mit dem Ziel, auf der nächst tieferen Ebene einheitliche Gesetzmäßigkeiten, systematische Zusammenhänge und pathophysiologische Eigenschaften zu identifizieren, die zur Homogenisierung genutzt werden können, um somit die Voraussetzung für die Entwicklung effektiver Therapieansätze zu schaffen. Dazu erfolgte mittels Immunhistochemie an Glioblastomschnittserien in ausgewählten Tumorarealen eine Analyse der Immunreaktivität bezüglich neun unterschiedlicher Biomarker, die jeweils Informationen über pathophysiologische Charakteristika liefern. Es handelt sich somit um eine indirekte Analyse der regionalen Proteinexpression des inter- und intraindividuellen Glioblastomgewebes.

4.1 Korrelationsanalyse

Im ersten Schritt der Auswertungen wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman (Tab. 12) durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob über die Gesamtheit der unselektierten Glioblastomareale eine lineare Abhängigkeit zwischen jeweils zwei Biomarkern detektiert werden kann, woraus ein indirekter pathophysiologischer Zusammenhang zwischen den beiden Faktoren abgeleitet werden könnte. Mit dieser zweidimensionalen Analyse sollte versucht werden, die Frage zu beantworten, ob in Regionen, in denen ein Biomarker eine starke Immunreaktivität zeigt, auch ein anderer Biomarker konstant stark ausgeprägt ist. Zusätzlich sollte evaluiert werden, ob dabei ein linearer Zusammenhang besteht, was einer positiven Korrelation zwischen diesen beiden Biomarkern entspräche. Andernfalls sollte untersucht werden, ob bei starker Immunreaktivität eines Biomarkers der andere Biomarker stets nur in einem niedrigen Prozentsatz bzw. niedriger Dichte detektierbar ist und beide zueinander einen umgekehrt linearen Verlauf zeigen. Dies würde einer negativen Korrelation entspre-

chen. Eine maximal positive Korrelation käme in dem Zahlenwert +1, eine vollständig negative Korrelation in dem Wert -1 zur Darstellung.

Bei der Betrachtung aller Glioblastomareale dieser Studie zeigten sich keine starken Korrelationen. Es ließen sich drei mittelstarke Korrelationen identifizieren. So besteht zwischen den neuronalen Biomarkern NeuN und MAP2 eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,533. Beide korrelieren zudem mit EGFR (MAP2-EGFR-Korrelationswert: 0,444; NeuN-EGFR-Korrelationswert: 0,401). Alle drei Analysen sind auf dem Niveau 0,01 statistisch signifikant ($p=0,01$; zweiseitig), was eine geringe Irrtumswahrscheinlichkeit belegt. Bezüglich der restlichen linearen zweidimensionalen Betrachtungen lassen sich nur schwache oder keine Korrelationen nachweisen. Der Tabelle 12 sind diesbezüglich die Einzelwerte zu entnehmen. Die Gesamtzahl der berücksichtigten Regionen liegt bei 186. Auf die detaillierte Anführung der jeweiligen n-Werte wurde an dieser Stelle wegen der hohen Datendichte verzichtet. Aufgrund von technisch bedingten Gewebeverlusten konnte nicht in jeder Gruppe auf die maximale Arealanzahl von 186 zurückgegriffen werden.

Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten aller neun Biomarker zueinander gemäß der Korrelationsanalyse nach Spearman; N-gesamt: 186

<i>Biomarker</i>	ALDH1	CA-IX	EGFR	GFAP	MAP2	Mib1	Nestin	NeuN	Vimentin
ALDH1	1,000	-0,102	0,041	0,108	0,113	-0,199 ^{**}	-0,048	0,176 [*]	0,010
CA-IX	-0,102	1,000	-0,122	0,003	-0,009	-0,003	0,060	-0,228 ^{**}	0,224 ^{**}
EGFR	0,041	-0,122	1,000	0,023	0,444^{**}	-0,054	0,192 ^{**}	0,401^{**}	-0,256 ^{**}
GFAP	0,108	0,003	0,023	1,000	-0,144	-0,219 ^{**}	-0,044	-0,038	0,199 ^{**}
MAP2	0,113	-0,009	0,444^{**}	-0,144	1,000	0,231 ^{**}	0,306 ^{**}	0,533^{**}	-0,042
Mib1	-0,199 ^{**}	-0,003	-0,054	-0,219 ^{**}	0,231 ^{**}	1,000	0,243 ^{**}	0,056	0,006
Nestin	-0,048	0,060	0,192 ^{**}	-0,044	0,306 ^{**}	0,243 ^{**}	1,000	0,021	0,344 ^{**}
NeuN	0,176 [*]	-0,228 ^{**}	0,401^{**}	-0,038	0,533^{**}	0,056	0,021	1,000	-0,180 [*]
Vimentin	0,010	0,224 ^{**}	-0,256 ^{**}	0,199 ^{**}	-0,042	0,006	0,344 ^{**}	-0,180 [*]	1,000

4.2 Hierarchische Clusteranalyse

4.2.1 Stammbaumdarstellung

Da sich bei der zweidimensionalen linearen Korrelationsanalyse bezogen auf alle markierten Tumoreale keine starken Korrelationen hinsichtlich der Immunreaktivität identifizieren lie-

ßen und somit keine pathophysiologischen Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden konnten, wurde im zweiten Schritt eine hierarchische Clusteranalyse (`lin_corr_norm_a3`; `linkage=1`) durchgeführt – mit dem Ziel der Homogenisierung auf regionaler Ebene und der Hoffnung auf Erkenntnisgewinn bezüglich der Tumorbiologie. Dabei wurde jede Region über die Immunreaktivität bezüglich aller neun Biomarker – das heißt einer gesamten Biomarkerpalette – charakterisiert und mit dem jeweiligen Profil aller anderen Regionen ins Verhältnis gesetzt. Dies bedeutet, dass nicht analysiert wurde, ob sich eine Eigenschaft über den gesamten Tumor hinweg nachweisen lässt, sondern ob regional begrenzt bestimmte Eigenschaftskombinationen wiederholt auftreten. Auf mathematischer Ebene wird die Immunreaktivität in eine räumliche Größe umgesetzt und jedes Areal/RoI durch einen Vektor in einem neun-dimensionalen Raum dargestellt. Je später die Items voneinander abzweigen und je näher sie in der daraus resultierenden Stammbaumdarstellung (Abb. 9) beieinander liegen, umso größer ist ihre Übereinstimmung hinsichtlich der Immunreaktivität.

Das im Rahmen dieser Arbeit analysierte Glioblastomgewebe lässt sich mittels Clusterverfahren an der Schnittstelle mit der Distanz 1,75 in acht Gruppen untergliedern (Abb. 9). Die Distanzweite wurde über die Betrachtung der Immunreaktivitätsprofile der einzelnen Interessensareale in der horizontalen Rot-Grün-Darstellung ermittelt. An der Schnittstelle 1,75 lässt sich bei guter Gruppenstärke eine klare Gruppenhomogenität nachweisen und das Expressionsprofil vom Nachbarcluster abgrenzen, weswegen dieser Distanzwert gewählt wurde. In jedes so entstandene Cluster fallen sowohl inter- als auch intraindividuelle Tumoreareale. Sie fassen zwischen 18 und 31 Regionen. Innerhalb eines Clusters verhalten sich die Elemente bezüglich ihrer Immunreaktivität ähnlicher zueinander als zu den Items in einem anderen Cluster. Die individuelle Immunreaktivität jeder einzelnen Region wird mittels Rot-Grün-Darstellung repräsentiert. Dabei handelt es sich um eine relative Farbskala, wobei kleine Werte in grün und große Werte in rot abgebildet werden. Extremwerte sind jeweils auf die Extremfarben gesetzt (d.h. hellgrün entspricht einem sehr niedrigen und hellrot einem sehr hohen Wert). Zusammengefasst zeigen die ersten Ergebnisse dieser Studie, dass sich das gesamte inter- und intraindividuelle Glioblastomgewebe, welches über die Interessensareale repräsentiert wird, basierend auf der Immunreaktivität bezüglich der neun ausgewählten Biomarker in acht Cluster einteilen lässt.

4.2.2 Markerprofile der Cluster

Jedes Cluster ist durch ein spezifisches Markerprofil charakterisiert. Die homogenisierten repräsentativen Markerprofile kommen in Abbildung 10 grafisch zur Darstellung. Jedes Säulendiagramm zeigt die clusterspezifische charakteristische Markerkombination. Je höher die

Säule des jeweiligen Biomarkers ist, desto stärker ist seine Immunreaktivität. Auf mathematischer Ebene wurden hierfür die markerspezifischen Mittelwerte über alle Rols pro Cluster mit dem kumulierten Mittelwert der jeweiligen Markergruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Säule des Biomarkers NeuN im fünften Cluster würde ungekürzt über das gewählte Skalenniveau hinausreichen und ist zur besseren Übersicht artifiziell gekürzt abgebildet. Fehlende Säulen entsprechen einer sehr heterogenen Markerausprägung (weder die Interessensareale mit grüner Farbnuance noch diejenigen mit roter Farbnuance erreichen mindestens 2/3 aller Interessensareale des gesamten Clusters) und gehen nicht in die Gruppencharakterisierung mit ein. Dies tritt wiederholt beim neuronalen Biomarker MAP2 auf, woraus die Abwesenheit der Säule an der MAP2-Position im zweiten, dritten, siebten und achten Cluster resultiert. Die Farben sind gemäß der in der Stammbaumdarstellung aufgeführten Farbskala gewählt. Die jeweilige Biomarker-Säule ist in derjenigen Farbnuance eingefärbt, die absolut betrachtet über alle Interessensareale des entsprechenden Clusters hinweg dominierend ist.

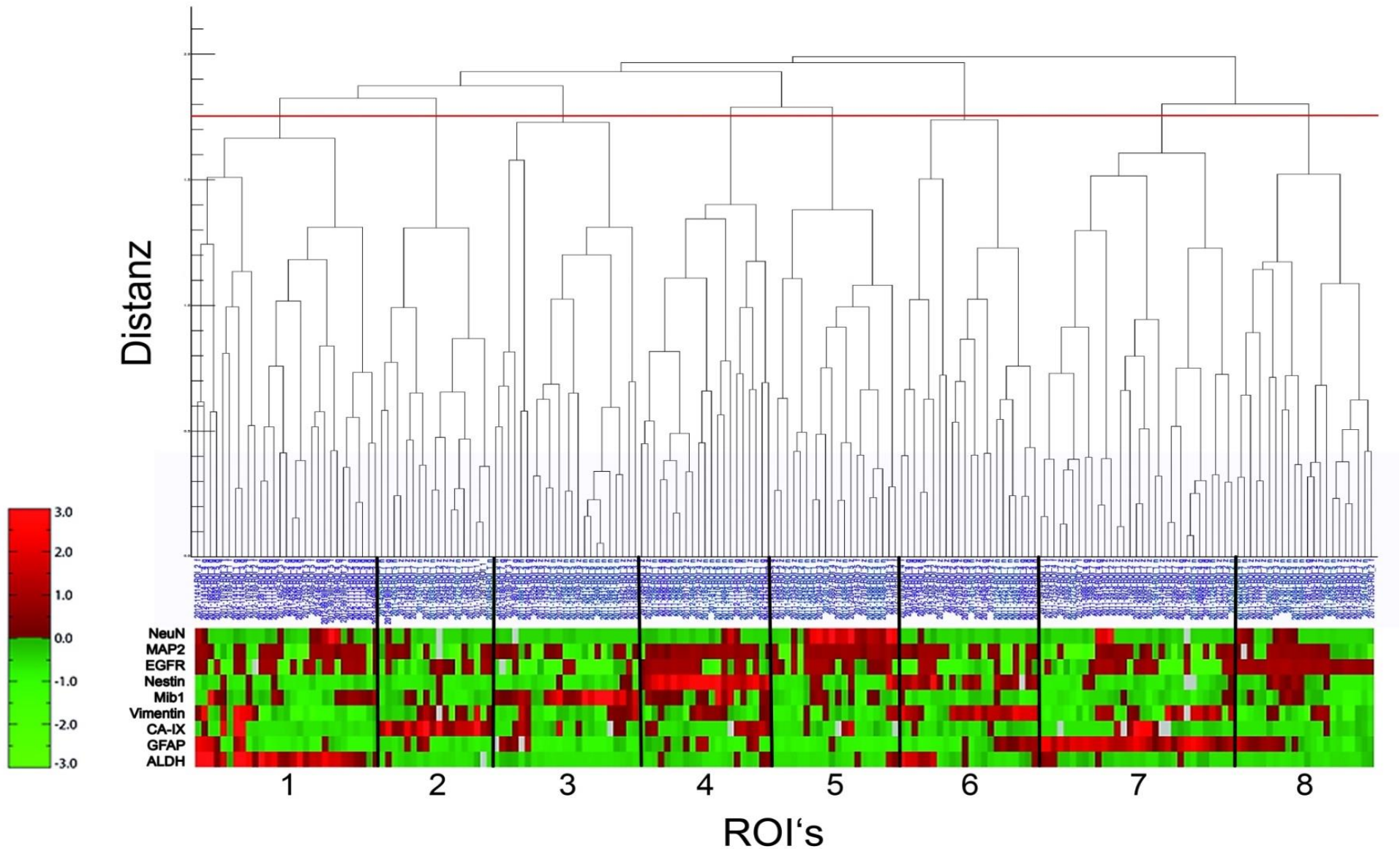


Abb. 9: Stammbaumdarstellung der hierarchischen Clusteranalyse (lin_corr_norm_a3; linkage=1). Auf der x-Achse sind die hinsichtlich ihrer jeweiligen Immunreaktivität analysierten Interessensareale/ROIs (n = 186) aufgeführt (blaue Identifikationsnummer). Die y-Achse repräsentiert die Distanz der Zweigstellen der Items. Bei der Schnittstelle mit der Distanz 1,75 (rote Linie) ergeben sich acht unterschiedliche Cluster (schwarze Nummerierung von 1-8). Die horizontale Rot-Grün-Darstellung vergegenwärtigt das Immunreaktivitätsprofil jeder einzelnen Interessensregion hinsichtlich der neun Biomarker (ALDH1, GFAP, CA-IX, Vimentin, Mib1, Nestin, EGFR, MAP2, NeuN). Der Ausprägungsgrad der einzelnen Merkmale ist der vertikalen relativen Farbskala zu entnehmen, wobei niedrige Werte in grün und hohe Werte in rot dargestellt werden. Extremwerte sind jeweils auf die Extremfarben gesetzt (d.h. sehr niedrig: hellgrün; sehr hoch: hellrot). Die graue Einfärbung entspricht technisch bedingt fehlendem Datenmaterial zur spezifischen Immunreaktivität.

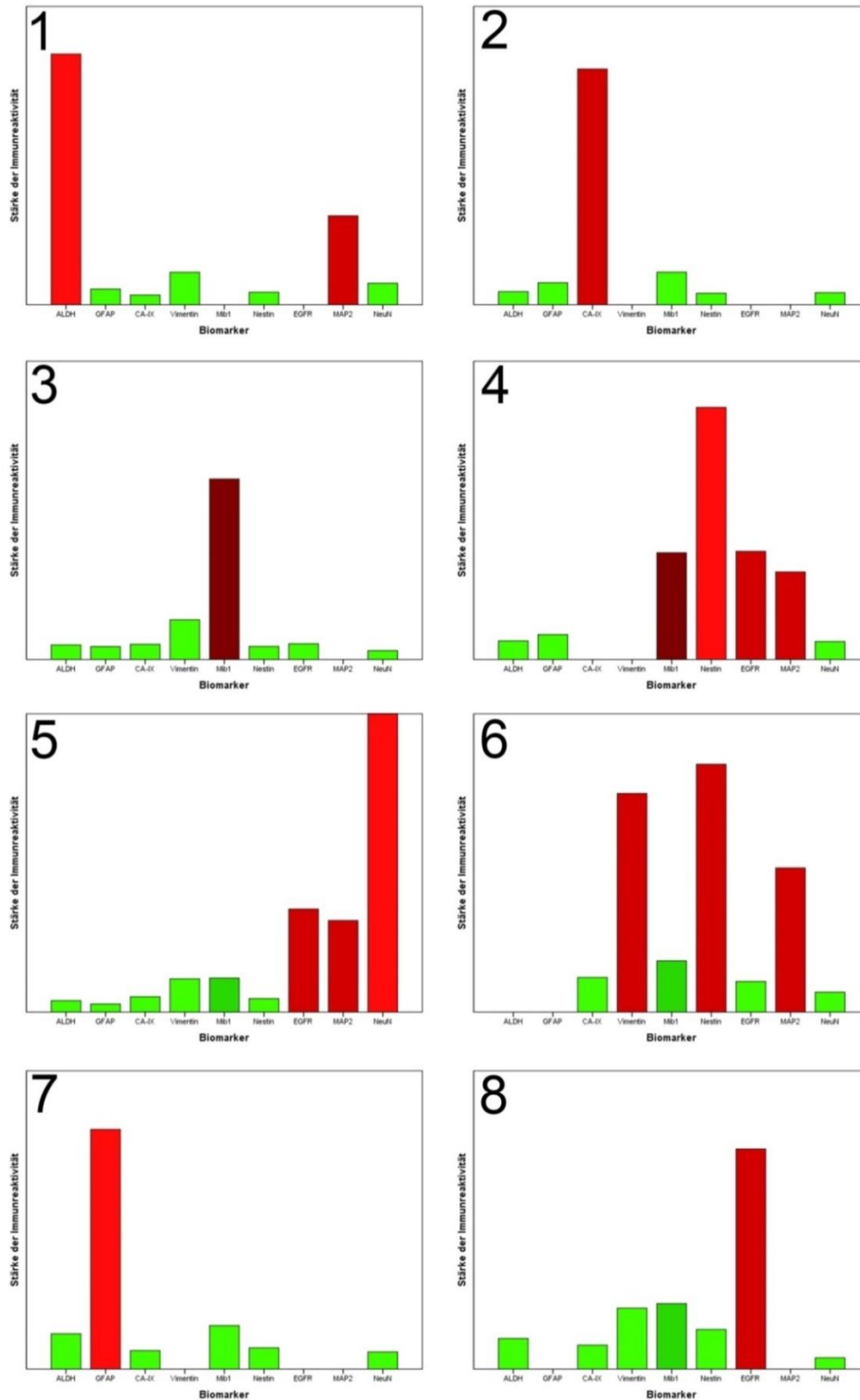


Abb. 10: Säulendiagramm des repräsentativen Markerprofils jedes einzelnen Clusters (Nummerierung 1-8). Auf der x-Achse sind jeweils die neun Biomarker aufgeführt (pro Biomarker ein Balken). Die y-Achse stellt die Stärke der Immunreaktivität dar (je höher der Balken, desto höher die gemittelte relative Immunreaktivität). Die Farbnuancen sind entsprechend der in der vorangehenden Abb. 9 aufgeführten Farbskala gewählt. Dabei kommt, absolut über alle Rols pro Cluster hinweg betrachtet, für jeden Biomarker die dominierende Farbe zum Einsatz. Fehlende Balken bedeuten, dass die Immunreaktivität der jeweiligen Marker aufgrund ihrer Heterogenität keine Vereinheitlichung zulässt. Die Säule des Biomarkers NeuN im fünften Cluster würde ungekürzt über das gewählte Skalenniveau hinausreichen und ist zur besseren Übersicht künstlich gekürzt abgebildet.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Markerprofile der Cluster eingegangen. Dabei wird eine Teilungsrate von bis zu 8% als schwach proliferativ definiert. Bei einer Wachstumsfraktion von 8% bis 16% ist im Rahmen dieser Studie von mittelstarker und bei Werten $\geq 16\%$ von starker Proliferation die Rede. Diese Untergliederung erfolgte empirisch, angepasst an die Spannweite der erhobenen arealbezogenen Proliferationsraten.

4.2.2.1 Transformierte neuronale Regionen (TNR)

Den Säulendiagrammen (Abb. 10) der vorliegenden Studie ist zu entnehmen, dass die Regionen des fünften Clusters eine sehr hohe NeuN-Immunreaktivität aufweisen und auch die Immunreaktivität des zweiten neuronalen Biomarkers MAP2 in diesen Regionen mittelstark ausgeprägt ist. Anzumerken ist zudem die erhöhte EGFR-Immunreaktivität. Die Zugehörigkeit dieser drei Biomarker zu einer Verwandtschaftsgruppe geht auch aus der Antikörperorientierten Clusteranalyse (Abb. 11) hervor. Die späte Aufzweigung bedeutet, dass zwischen NeuN, MAP2 und EGFR, verglichen mit den Biomarkern der beiden anderen Gruppen, eine größere Zusammengehörigkeit vorliegt.

In Anlehnung an die in der Einleitung (Sektion 1.5.3) beschriebene pathophysiologische Bedeutung der hervorstechenden Biomarker wurden die Areale, die das fünfte Cluster bilden, folglich als *transformierte neuronale Regionen (TNR)* bezeichnet. Die mittlere Proliferationsrate in diesen Bereichen liegt mit 7,7% auf einem niedrigen Niveau. Die Resistenzanzeigenden Biomarker ALDH1, Nestin, Vimentin und CA-IX sowie der astrozytäre Marker GFAP sind in diesen Regionen durchweg nur sehr gering ausgeprägt. Keiner der in die Studie miteinbezogenen Rezidivtumore enthält eine derartige neuronale Region. Das Durchschnittsalter der Patienten, in deren Glioblastomgewebe eine *TNR* nachgewiesen wurde, liegt bei 64 Jahren.

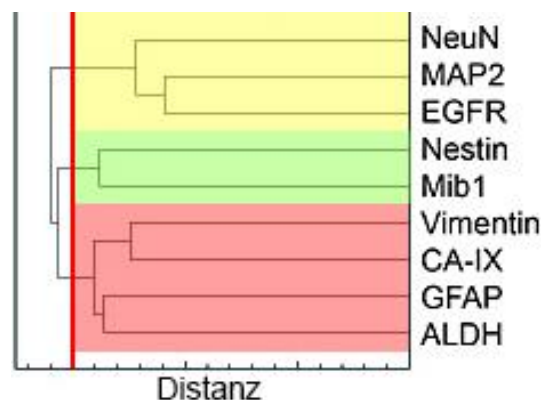


Abb. 11 Stammbaumdarstellung der Antikörperorientierten Clusteranalyse (lin_corr_norm_a3, linkage=1). Bei einer Trennlinie auf Höhe der Distanz 1,5 ergeben sich drei Antikörperverwandtschaftsgruppen (Gruppe 1: neuronale Gruppe (gelb); Gruppe 2: proliferative Gruppe (grün); Gruppe 3: Resistenz-/Stammzellgruppe (rot)).

4.2.2.2 Proliferative Regionen (PR)

Mit einer mittleren Proliferationsrate von 24% ist die größte Tumorstadiumsfraktion in den Arealen des dritten Clusters zu finden, weshalb hier von *hochproliferativen Regionen (HPR)* gesprochen wird. Die übrigen Biomarker zeigen in diesen Regionen nur ein niedriges Immunreaktivitätsniveau. Insbesondere NeuN ist kaum nachweisbar. Aus dem oben beschriebenen fünften Cluster wurde ersichtlich, dass in Tumorgebieten mit hoher NeuN-Expression eine niedrige Proliferationsrate vorliegt. Das dritte Cluster präsentiert ein umgekehrtes Bild. Daneben lässt sich über die Resultate der vorliegenden regionalen Glioblastomanalyse auch eine geringe GFAP-Immunreaktivität in stark proliferierenden Regionen objektivieren. Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Abb. 12A und B) machen sogar auf zellulärer Ebene sichtbar, dass sich teilende Mib1-positive Tumorzellen nur sehr vereinzelt das saure Gliafaserprotein als Intermediärfilament in ihrem Zytoplasma exprimieren. Durch Auszählungen an fluoreszenzmikroskopischen Gewebeaufnahmen zweier Tumoren, die Regionen des dritten Clusters enthalten, konnte quantifiziert werden, dass circa 95% der proliferierenden Zellen GFAP-negativ sind (Abb. 12C). Mittels Einbezug klinischer Daten erfahren wir, dass das Durchschnittsalter der Patienten, in deren Glioblastomgewebe eine *HPR* nachgewiesen werden konnte, bei circa 54 Jahren liegt.

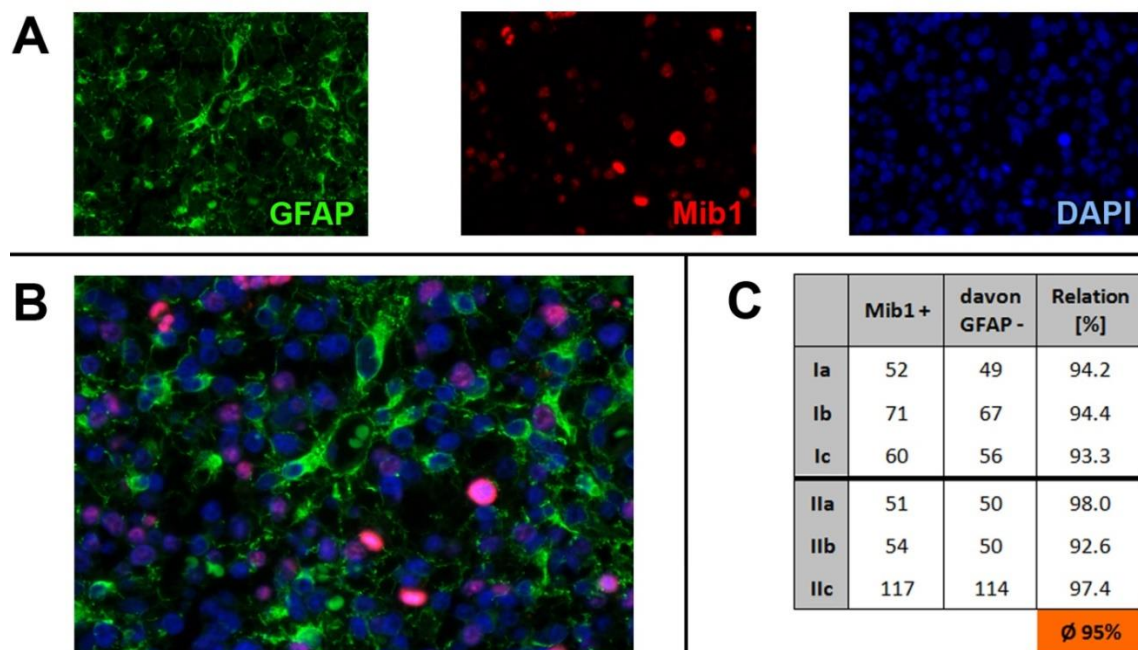


Abb. 12: A und B: IF-Doppelfärbung an ausgewähltem Glioblastomgewebe mit GFAP (grün) und Mib1 (rot) sowie DAPI (blau) als Kerngegenfärbung; proliferierende Zellen (Mib1-positiv) exprimieren nur sehr selten GFAP als Intermediärfilament in ihrem Zytoplasma; C: Auszählung von jeweils drei IF-Bildern zweier Glioblastome, die hochproliferative Regionen (Cluster-3-Regionen) enthalten; 95% der proliferierenden Zellen enthalten kein GFAP im Zytoplasma.

Im oben aufgeführten Antikörper-orientierten Clustering (Abb. 11) bildet Mib1, als Proliferationsmarker mit dem Intermediärfilament und Stamm- sowie Progenitorzellmarker Nestin, die zweite Gruppe. Sie weisen damit zueinander einen höheren Verwandtschaftsgrad auf als zu den anderen sieben Biomarkern. Während in den *hochproliferativen Regionen* des dritten Clusters nur eine sehr niedrige Nestin-Immunreaktivität detektierbar ist, existieren andere proliferative Regionen, nämlich die Regionen des vierten Clusters, die bei mittelstarker Proliferationsrate von 12% eine sehr hohe Nestinrate aufweisen.

Zur Verdeutlichung der immunhistochemischen Resultate wurde exemplarisch an einem ausgewählten Tumor mit Cluster-4-Region eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Mib1 und Nestin durchgeführt. Hiermit gelingt es auf einer einzigen Schnittebene nochmals zu bestätigen, dass im Glioblastom Regionen vorliegen, in denen Mib1 und Nestin in hohem Maße koexprimiert sind (Abb. 13A). Folglich werden die Areale des vierten Clusters *proliferative Progenitorzellregionen (PPR)* genannt. Eine Auszählung der IF-Bilder auf noch detaillierterer, also zellulärer Ebene, zeigt, dass 60% der proliferierenden Zellen innerhalb dieser Cluster-4-Region das Intermediärfilament Nestin in ihrem Zytoplasma exprimieren. Abbildung 13B präsentiert, mikroskopisch vergrößert, eine derartige Zelle.

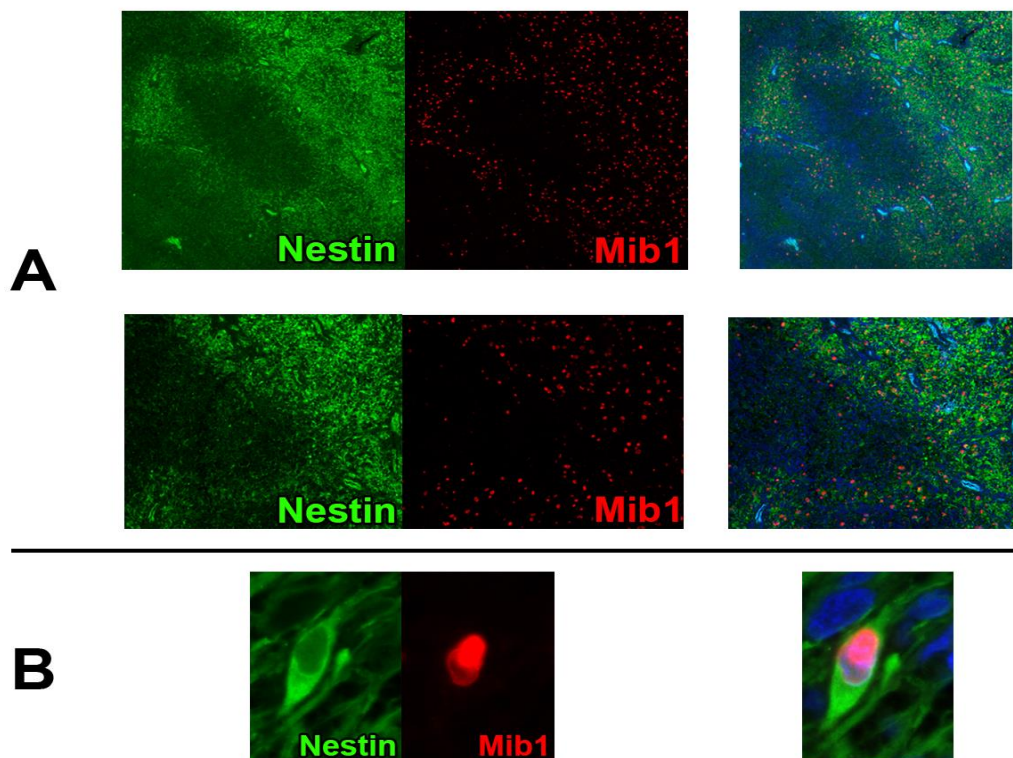


Abb. 13: A und B: IF-Doppelfärbungen mit Nestin (grün fluoreszierend) und Mib1 (rot fluoreszierend) an ausgewähltem Glioblastomgewebe mit *proliferativen Progenitorzellregionen*. Die Kerngegenfärbung mit DAPI kommt blau zur Darstellung. A: Darstellung der hohen Nestinexpression in Regionen mit mittelstarker Proliferationsrate (Koexpression von Nestin und Mib1) auf einer einzigen Schnittebene; B: Exemplarische Vergrößerung einer proliferierenden Zelle, die in ihrem Zytoplasma das Intermediärfilament Nestin stark exprimiert.

Zusammengefasst ist in beiden proliferativen Clustern sowohl die GFAP- als auch die NeuN-Immunreaktivität schwach ausgeprägt. Dagegen unterscheiden sie sich zum einen bezüglich der oben dargestellten Nestinrate sowie zum anderen hinsichtlich ihrer EGFR-Expression, die in den *hochproliferativen Regionen* gering und in den *proliferativen Progenitorzellregionen* hoch ist.

Aus Subanalysen mit Rückführung der Interessensareale auf den Ursprungstumor geht hervor, dass das Glioblastomgewebe einer Person entweder Cluster-3- oder Cluster-4-Regionen enthält. In keinem Tumor konnten Regionen beider Cluster nachgewiesen werden.

4.2.2.3 Mutationsregionen (MR)

Die Cluster-8-Regionen heben sich hervor, da sie stark EGFR-immunreaktiv sind. Dies kann gemäß den Beschreibungen im Abschnitt 1.5.5 auf eine Genamplifikation mit konsekutiver Überexpression von EGFR zurückzuführen sein, weswegen diese Regionen *Mutationsregionen (MR)* genannt werden. Zellen der Cluster-8-Regionen proliferieren mit einem Anteil von 6.6%, was gemäß der oben aufgeführten Definition einer schwachen Wachstumsrate entspricht. Dem gegenüber findet sich im dritten Cluster, das in der Sektion 4.2.2.2 beschrieben wurde, ein sehr hoher Proliferationsindex bei niedriger EGFR-Immunreaktivität. Eine gleich hohe Immunreaktivität weisen EGFR und Mib1 im vierten Cluster auf.

4.2.2.4 Stammzell- und Resistenzregionen

Neben der *neuronalen* und der *proliferativen Region* lassen sich über die hierarchische Stammbaumanalyse drei Cluster (eins, sechs, sieben) identifizieren, die durch die Dominanz von Stammzell- und Resistenzfaktoren charakterisiert sind. Im sechsten Cluster stechen die beiden Intermediärfilamente und Stammzellmarker Nestin und Vimentin aufgrund ihrer starken Ausprägung hervor. In Anlehnung an bisher publizierte Studien zur Glioblastomheterogenität (Phillips et al. 2006) werden diese Regionen als *mesenchymale Stammzellregionen (MSR)* bezeichnet. Das Durchschnittsalter der Patienten, in deren Glioblastomgewebe eine derartige Region nachgewiesen werden konnte, liegt bei 56 Jahren und somit etwas unter dem Gesamtdurchschnittsalter.

Im siebten Cluster dominiert die Immunreaktivität des sauren Gliafaserproteins, des Intermediärfilaments der Astrozyten, dessen Expression, wie im Abschnitt 1.5.2.3 beschrieben, unter ungünstigen Bedingungen oder infolge von Gewebeschädigung zunimmt und den verbleibenden Zellen vermehrte Widerstandsfähigkeit verleiht. Cluster-7-Regionen erhalten demnach die Betitelung *astrozytäre Resistenzregionen (ARR)*.

Des Weiteren kristallisieren sich über das Markerprofilendiagramm (Abb. 10) im ersten Cluster Areale heraus, die gemäß ihrer Immunreaktivität *ALDH1-positive Stammzellregionen (ASR)* genannt werden. Um zu verdeutlichen, dass es sich bei ALDH1-positiven Zellen tatsächlich um Zellen mit Stammzellcharakter handelt, wurden zusätzlich IF-Doppelfärbungen mit dem etablierten Stammzellmarker FABP7 (Morihiro et al. 2013) angefertigt (Abb. 14). Die orange Farbe der beiden zentral gelegenen Glioblastomzellen im Überlagerungsbild vergegenwärtigt die zytoplasmatische Koexpression beider Stammzellmarker innerhalb einer Zelle.

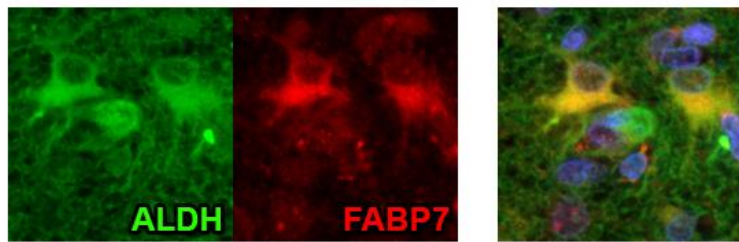


Abb. 14: Die IF-Doppelfärbung mit den beiden Stammzellmarkern ALDH (grün) und FABP7 (rot) zeigt die Koexpression (orange) beider Marker im Zytoplasma zweier Glioblastomzellen.

In der Stammbaumdarstellung (Abb. 9) spalten sich die *ASR*en und die CA-IX-positive Region spät voneinander ab und kommen direkt nebeneinander zu liegen. Auch die AK-orientierte Clusterdarstellung (Abb. 11, rote Gruppe) unterstreicht die Zusammengehörigkeit zwischen den Resistenzfaktor-detektierenden Biomarkern (ALDH, GFAP, Nestin, Vimentin) und dem Hypoxiemarker CA-IX.

4.2.2.5 Hypoxieregionen

In zahlreichen kürzlich publizierten Studien wurde die Hypoxie als Induktor für das Auftreten von Resistenzfaktoren in Tumorzellen sowie neoplastischem Gewebe beschrieben (McCord et al. 2009; Shin et al. 2011; Li et al. 2013; Wang et al. 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Biomarker CA-IX, welcher Regionen mit hypoxischen Bedingungen visualisiert, zunächst für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz am Glioblastomgewebe methodisch etabliert und schließlich als Hypoxiemarker in der Schnittserienanalyse eingesetzt. Die *Hypoxieregionen (HR)* bilden das zweite Cluster des Säulendiagramms (Abb. 10).

In der mikroskopischen Betrachtung der IHC- und IF-Färbungen zeigt sich ein charakteristisches Markermuster. Die chronisch hypoxischen Areale weisen überwiegend eine bandförmige Struktur auf und umrahmen insbesondere pathologische, zum Teil thrombosierte Tumorgefäße sowie Nekroseareale (Abb. 15).

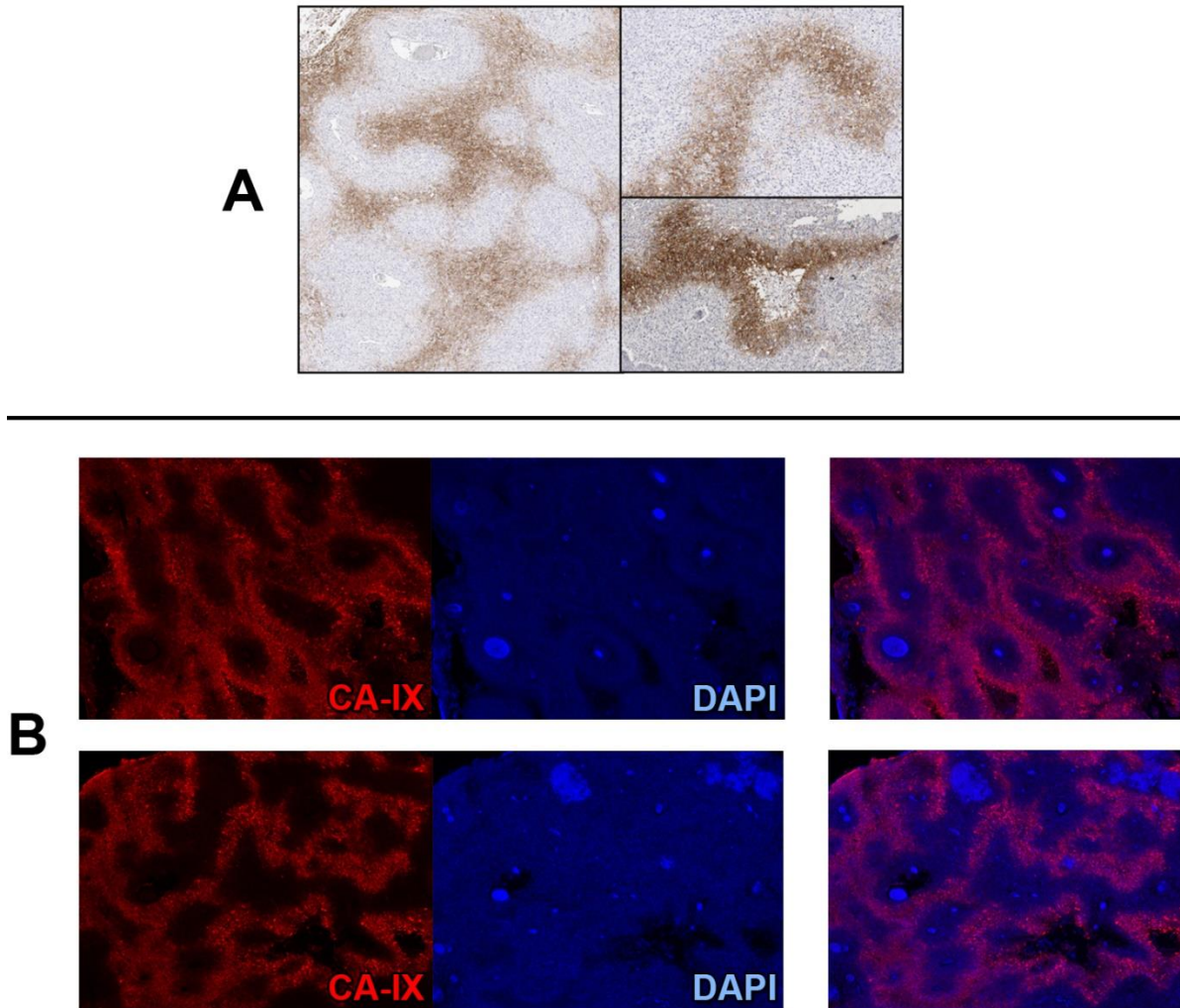


Abb. 15: A) IHC-Färbung und B) IF-Färbung von Glioblastomgewebe mit dem Antikörper CA-IX (A: braun, B: rot), einem Biomarker für chronische Hypoxie. Dargestellt ist das charakteristische bandförmige Muster der visualisierten hypoxischen Regionen, welche häufig in der unmittelbaren Nachbarschaft von pathologischen Gefäßen und Nekrosearealen liegen.

Diese *Hypoxieregionen*, die in der Stammbaumdarstellung (Abb. 9) das zweite Cluster bilden, zeigen ein eindrückliches Markerprofil, aus dem hervorgeht, dass in Regionen mit ausgeprägter chronischer Hypoxie die überwiegende Mehrheit der restlichen Biomarker nur eine geringe Immunreaktivität aufweist (Abb. 10). In den *HREN* selbst finden sich folglich keine Hinweise auf die in der Literatur beschriebene Resistenzfaktor-induzierende Wirkung der Hypoxie, sodass im nächsten Schritt an ausgewähltem Tumorgewebe, unter erneuter Zuhilfenahme von IF-Färbungen, die Randbereiche der *HREN* unter dem Immunfluoreszenzmikroskop inspiziert wurden. Aus der Doppelfärbung mit CA-IX und ALDH1 wird ersichtlich, dass sich ALDH1-positive Zellen zwar nicht in der Hypoxieregion befinden, was bereits aus dem Markerprofil des zweiten Clusters abzulesen war, jedoch vermehrt im Randbereich der

hypoxischen Regionen lokalisiert sind (Abb. 16A). Dort sind sie insbesondere in der unmittelbaren Umgebung pathologischer Tumorgefäße nachweisbar. Auch GFAP-positive Zellen kumulieren in den Hypoxie-Randregionen und reichen dabei etwas weiter in die hypoxischen Areale hinein. Die Zellen haben ein plumpe, zytoplasmareiches Erscheinungsbild (Abb. 16B).

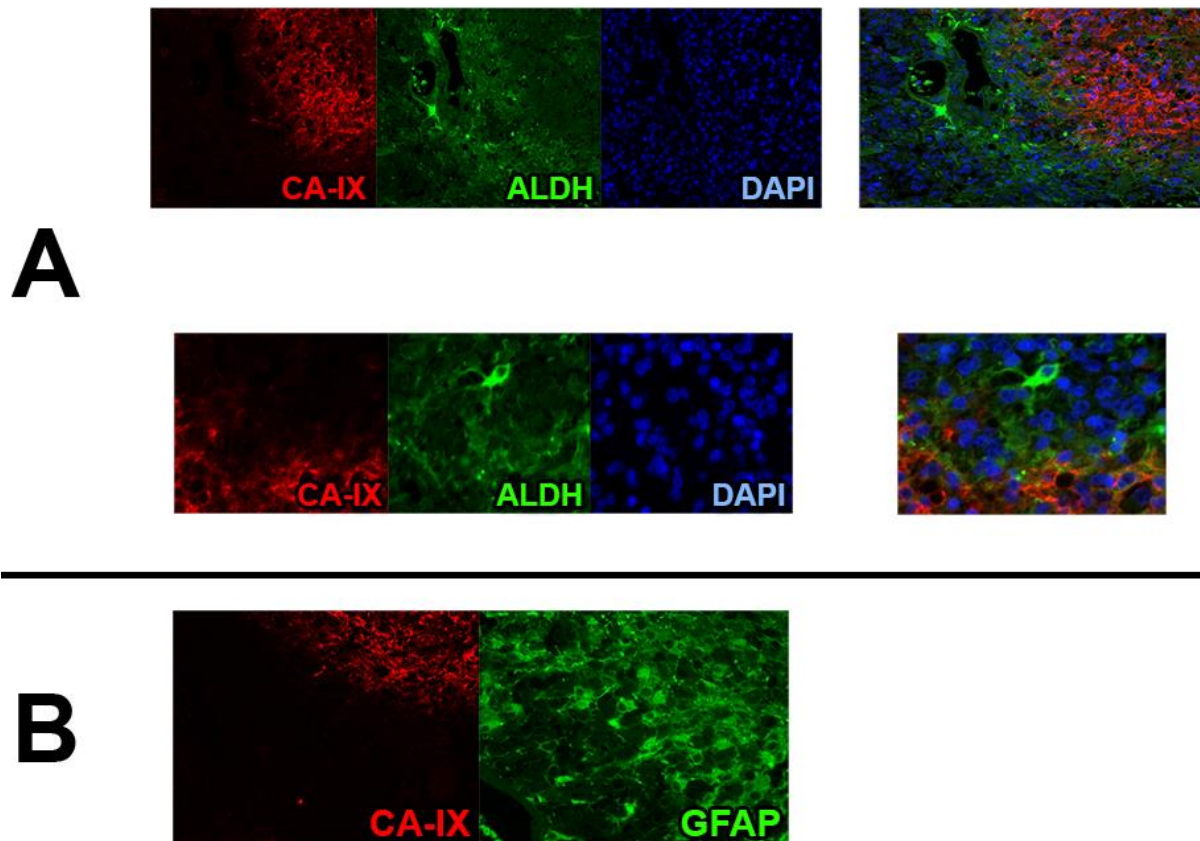


Abb. 16: IF-Doppelfärbungen (CA-IX: rot; ALDH/GFAP: grün) im Randbereich hypoxischer Glioblastomareale. A) ALDH-positive-GSCs sind in unmittelbarer Nähe der hypoxischen Tumorregion zu detektieren. Gehäuft stehen sie dabei in topischer Assoziation mit pathologischen Tumorgefäßen. B) GFAP-positive Tumorzellen kumulieren in der Hypoxie-Randregion und weisen dabei eine plumpe, geboosterte Zellmorphologie auf.

4.2.2.6 Isolierter intratumoraler Arealnachweis

Die homogenisierende regionale Strukturierung der gesamten Glioblastommasse in acht Cluster und fünf Übergruppen entstand durch Tumorgrenzen-überschreitende Analysen, mit der Absicht, sowohl die inter- als auch die intratumorale Heterogenität zu berücksichtigen. In einer weiteren Subanalyse mit Rückführung der Areale auf ihren Ursprungstumor wurde untersucht, ob die einzelnen Regionen auch innerhalb des Tumorgewebes einer einzelnen Person nebeneinander vorliegen können. Dabei zeigt sich, dass, mit zwei Ausnahmen, alle möglichen Arealkombinationen in den intraindividuellen Tumoren der Schnittserienanalyse

nachweisbar sind. So finden sich zum Beispiel in fünf Studienglioblastomen sowohl eine *TNR* als auch eine *HR*, in fünf anderen Tumoren lässt sich wiederum die Kombination aus *MSR* und *PPR* erfassen – um nur zwei Beispiele zu nennen.

In keinem Tumor jedoch besteht sowohl eine *HPR* als auch eine *PPR*; diese beiden Regionen, die zur Übergruppe der *proliferativen Regionen* gehören, scheinen sich gegenseitig auszuschließen. Und auch für die Kombination aus *MSR* und *MR* findet sich kein exemplarischer Tumor. Mit den beiden anderen Arealen aus der Übergruppe der *Resistenz- und Stammzellregionen*, nämlich der *ASR* und der *ARR*, bildet die Mutationsregion jedoch zahlreiche Kombinationen (aus den aktuellen Daten ergeben sich vier Beispieltumoren für die Kombination *MR – ASR* und sieben für die Kombination *MR – ARR*), sodass sich die *Mutationsregion* und die *Stammzell- und Resistenzregionen* auf Übergruppenebene nicht ausschließen.

Aufgrund der vielfachen Kombinationsmöglichkeiten von Arealen drängt sich im nächsten Schritt die Frage auf, ob sich die charakteristischen Tumorareale auch allesamt in einem einzigen individuellen Tumor nachweisen lassen. Um diesbezüglich eine repräsentative Aussage treffen zu können muss ein ausreichend großes Tumorgewebsstück vorliegen, was für zwei Gewebeproben der immunhistochemischen Schnittserienanalyse zutrifft. In einem Präparat wurden, gemäß der in Sektion 3.2.3.1 aufgeführten Kriterien, manuell sieben Regionen markiert und hinsichtlich ihrer jeweiligen Immunreaktivität analysiert. Die sieben Regionen fallen in sechs unterschiedliche Cluster (eins, zwei, 2x drei, fünf, sieben und acht). In dem vorliegenden Tumorabschnitt findet sich also eine *transformierte neuronale Region (TNR)*, zwei *hochproliferative Regionen (HPR)*, eine *Hypoxieregion (HR)* und zwei *Resistenzregionen*, nämlich zum einen die *ALDH1-positive Stammzellregion (ASR)* sowie zum anderen die *astrozytäre Resistenzregion (ARR)*. Zudem lässt sich über das Vorhandensein der Cluster-8-Region eine erhöhte EGFR-Immunreaktivität nachweisen, die für das wahrscheinliche Vorliegen einer EGFR-Amplifikation spricht. Innerhalb des Tumorgewebes eines Patienten sind demnach alle in dieser Arbeit neu beschriebenen fünf Arealübergruppen nachweisbar. Im zweiten Präparat fanden sich dieselben Regionen, jedoch ohne Nachweis einer EGFR-Amplifikation.

4.2.3 Zusammenfassung der Resultate der hierarchischen Clusteranalyse

Das GBM ist durch eine starke inter- und intratumorale Heterogenität geprägt (Abb. 17), die ein großes Hindernis in der Entwicklung effektiver Therapieformen darstellt (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010; Sottoriva et al. 2013; Patel et al. 2014).

Ziel dieser Studie ist es, trotz der phänotypischen Heterogenität, auf regionaler Ebene zu homogenisieren und Eigenschaften oder Gesetzmäßigkeiten zu finden, die regelmäßig und konstant wiederkehren und uns nähere Kenntnisse über die Pathophysiologie der Tumorprogression sowie die Ursachen der Therapieresistenz bringen.

Die soeben dargestellten Resultate zeigen zusammengefasst, dass sich die Gesamtheit der analysierten inter- und intraindividuellen Glioblastomregionen in acht Cluster untergliedern lässt (Abb. 17), wodurch eine interindividuell übergreifende Substrukturierung des Gewebes gelingt. Dies bedeutet, dass innerhalb der Glioblastome acht Arealsubgruppen existieren, die im Gewebe regelmässig wiederkehren. Sie werden durch spezifische, immunhistochemisch detektierte Markerkombinationen charakterisiert und lassen sich fünf pathophysiologischen Übergruppen zuordnen. Die Regionen werden entsprechend der Bedeutung der vorherrschenden Immunreaktivität als *transformierte neuronale Region* (NeuN, MAP2, EGFR), als *Mutationsregion* (EGFR), als *proliferative Region (hochproliferative Region (Mib1)*, als *proliferative Progenitorzellregion* (Mib1, Nestin)), als *Hypoxieregion* (CA-IX) und als *Resistenzregion* (Abb. 17) bezeichnet. Die Resistenzregion lässt sich dabei weiter untergliedern in die *mesenchymale Stammzellregion* (Nestin, Vimentin), die *ALDH1-positive Stammzellregion* sowie die *astrozytäre Resistenzregion* (GFAP). Da innerhalb des Studienkollektivs kein Tumor einer einzelnen Person sowohl eine *hochproliferative Region* als auch die *proliferative Progenitorzellregion* enthält, ist davon auszugehen, dass sie sich gegenseitig ausschließen. Besonders hervorzuheben ist, dass die *Resistenz- und Stammzellregionen* überwiegend in unmittelbarer Nähe von *Hypoxieregionen* anzutreffen sind und dass keiner der in die Studie miteinbezogenen Rezidivtumoren eine *transformierte neuronale Region* enthält. Zur visuellen Veranschaulichung der in dieser Arbeit erfolgten regionalen Subgruppierung soll die nachfolgende Abbildung 17 dienen.

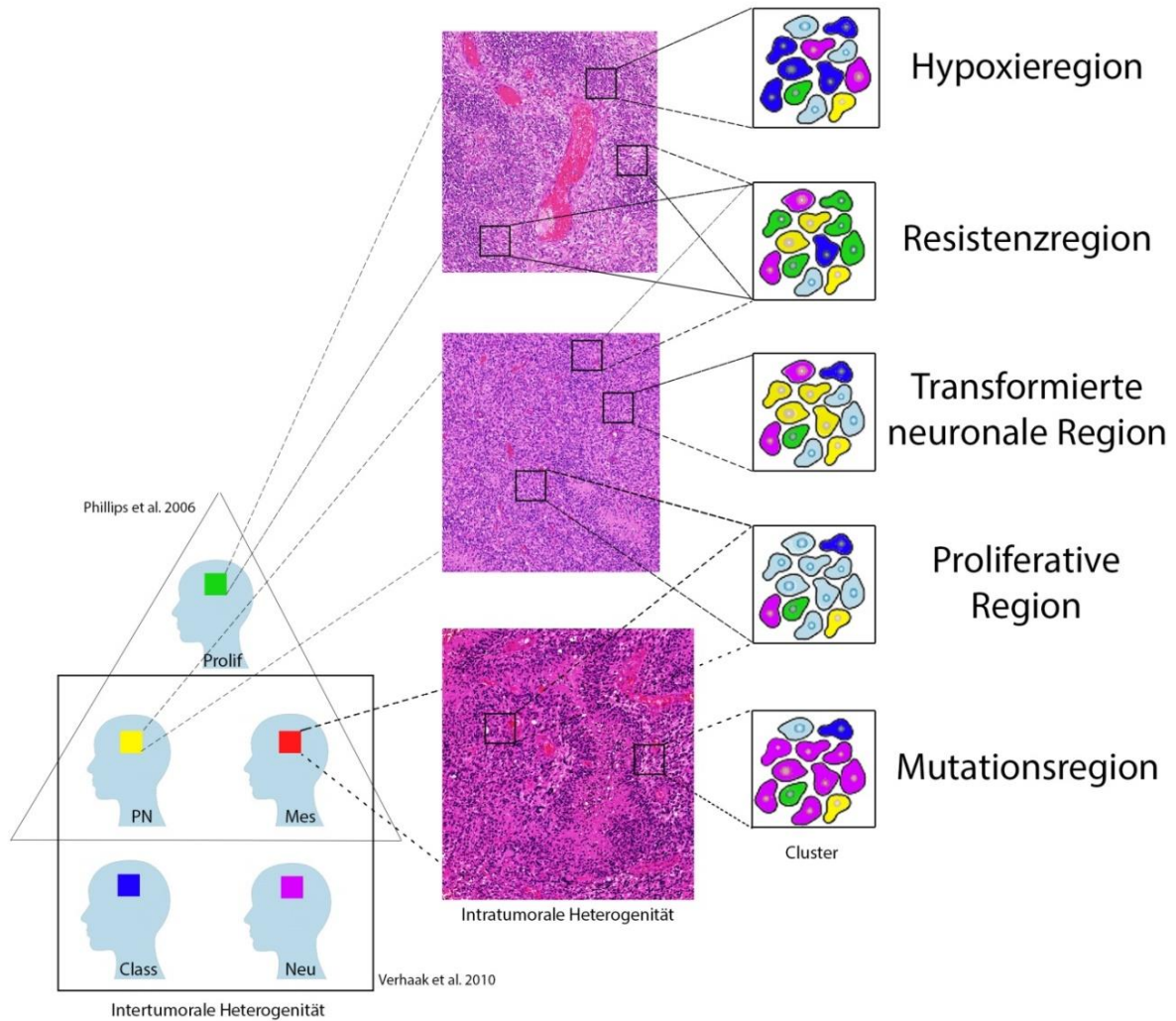


Abb. 17: In der Darstellungsart angelehnt an Marusyk et al. 2012 und um die im Rahmen dieser Studie neu identifizierten Glioblastomareale erweitert; neuropathologisch diagnostizierte Glioblastome sind durch eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität gekennzeichnet. Die vorliegende Studie zeigt, dass die Gesamtheit der Glioblastommasse sowohl in inter- wie auch intraindividuelle Hinsicht anhand ihrer Immunreaktivitätsprofile in acht Cluster und fünf pathophysiologische Übergruppen (*transformierte neuronale Region, Mutationsregion, proliferative Region, Hypoxieregion, Resistenzregion*) untergliedert werden kann.

5. Diskussion

5.1 Fragestellung

Die infauste Prognose von Patienten mit der Diagnose eines Glioblastoms ist gemäß der aktuellen Studienlage vor allem auf die ausgeprägte tumorale Heterogenität zurückzuführen (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010; Bonavia et al. 2011; Marusyk et al. 2012; Mao et al. 2013). Das GBM besteht aus zahlreichen Zellen, die sich hinsichtlich ihrer Proteinexpression, ihrer Wachstumseigenschaften, ihres Zytoskeletts, ihres Invasivitätspotentials und ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Umgebungsbedingungen unterscheiden. Daraus resultiert der stark limitierte Therapieerfolg bei angewandter Standardtherapie, mit der es lediglich gelingt, einen Teil der Tumorzellen zu eliminieren, während andere persistieren und zur Progression sowie Rezidivbildung führen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Heterogenität als zentrales Charakteristikum der Glioblastombiologie näher zu beleuchten, wiederkehrende konstante Eigenschaften innerhalb des Tumorgewebes zu identifizieren und insbesondere mit der Beantwortung folgender Fragen zur regionalen Strukturierung beizutragen:

- Wo im Tumorgewebe sind die therapieresistenten Zellen lokalisiert?
- Welche Eigenschaften verleihen den Tumorzellen solch hohe Widerstandsfähigkeit?
- Wie passen sich die Zellen an ungünstige Umgebungsbedingungen an?
- Was ist der Hauptinduktor für die Entwicklung von Resistenzmechanismen?

Zur Untersuchung dieser Fragen wurde die in Kapitel 3 beschriebene regionale Betrachtung des Tumorgewebes hinsichtlich seiner Immunreaktivität bezüglich ausgewählter Biomarker durchgeführt. Dabei konnten die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse erzielt werden. Der entscheidende Schritt war die Wahl der Methode der Immunhistochemie, da somit auch der Ort des natürlichen Vorkommens der analysierten Eigenschaften sichtbar gemacht wurde und folglich in die Diskussion mit einbezogen werden kann.

5.2 Die Korrelationsanalyse hebt die inter- und intratumorale Heterogenität hervor

Wie in Abschnitt 4.1 dargestellt, zeigen sich in der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Analyse keine starken Korrelationen. Über die Gesamtheit des analysierten Gewebes lässt sich kein starker paralleler Verlauf zwischen zwei (über Biomarker detektierte) Eigenschaften nachweisen. Bezüglich der beiden neuronalen Biomarker NeuN (Mullen et al. 1992) und MAP2 (Dehmelt und Halpain 2004) besteht jedoch eine mittelstarke positive Korrelation. Dies bedeutet, dass in Regionen mit hoher NeuN-Immunreaktivität auch eine gesteigerte MAP2-Immunreaktivität vorhergesagt werden kann. Ihr gemeinsames Auftreten ist auf pathophyso-

logischer Ebene nachvollziehbar, da sie als neuronale Biomarker die Zuordnung einer Zelle zum neuronalen Gewebe erlauben und folglich das Vorliegen einer neuronalen Zelldifferenzierung im entsprechenden Tumorareal beschreiben. Zudem zeigt die Analyse mittelstarke Korrelationen zwischen EGFR und dem jeweiligen neuronalen Marker. Die EGFR-Amplifikation mit konsekutiver Überexpression ist in mehr als der Hälfte der *de novo* entstehenden Glioblastome vorzufinden und stellt einen frühen Schritt der Tumorentstehung dar (Voldborg et al. 1997). Hinter der Korrelation zwischen der hohen MAP2- oder NeuN-Immunreaktivität mit der EGFR-Überexpression steht auf pathophysiologischer Ebene möglicherweise einer der Ursprungsmechanismen der Gliogenese, nämlich die Transformation von Zellen im neuronal differenzierten Gewebe zu onkologischen Zellen über den Erwerb von Mutationen (in diesem Fall die EGFR-Amplifikation). Somit kann angenommen werden, dass die Entstehung der EGFR-Amplifikation vorwiegend in differenzierten Zellen stattfindet und weniger in anderen Zellstadien der Neurogenese, wie den neuronalen Stammzellen (NSCs) oder den passager amplifizierenden Zellen (TACs).

Die überwiegende Mehrzahl der in Abschnitt 4.1 dargestellten Korrelationskoeffizienten zeigt jedoch lediglich schwache oder fehlende Korrelationen an. Für die meisten zweidimensionalen Betrachtungen ist folglich, auf das gesamte Tumorgewebe bezogen, kein linearer Zusammenhang fassbar. Es sind kaum Eigenschaften nachweisbar, die sich über das gesamte Tumorgewebe hinweg fortsetzen und allgemeingültige Rückschlüsse auf eine über das gesamte Gewebe hinweg konstante pathophysiologische Abhängigkeit erlauben. Es lässt sich keine konstante regionale Koexpression erkennen und somit auch kein einheitliches Verhalten der Zellen innerhalb des gesamten neoplastischen Geschehens. Dieses Ergebnis der Korrelationsanalyse untermauert die Existenz der vielfach in der Literatur beschriebenen inter- und intratumoralen Heterogenität des GBM (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010; Sottoriva et al. 2013; Patel et al. 2014), die wiederholt die Bemühungen zerschlägt, auf oberster Ebene – also im gesamten Tumormaterial einer einzelnen Person sowie über alle Betroffenen hinweg (interpersonell) – stabile Gewebeeigenschaften zu finden.

5.3 Parallelen zwischen einzelnen Clusterprofilen und den Subtypen nach Phillips

Da sich bei der zweidimensionalen linearen Korrelationsanalyse bezogen auf alle markierten Tumorareale keine starken Korrelationen identifizieren ließen und somit nur vereinzelte pathophysiologisch gehaltvolle Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden konnten, wurde im zweiten Schritt eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, bei der die Tumorregionen über ihre neun Eigenschaften umfassende Markerpalette verglichen wurden. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden bereits in Sektion 4.2 dargestellt. Dabei ergab sich eine Einteilung in

acht Cluster und fünf Übergruppen. Dies bedeutet, dass das Glioblastomgewebe acht Regionen enthält, die sich jeweils durch ein spezifisches Markerprofil auszeichnen und topografisch betrachtet regelmäßig wiederkehren. Drei dieser Regionen, die *hochproliferative Region* (*HPR*: drittes Cluster), die *transformierte neuronale Region* (*TNR*: fünftes Cluster) und die *mesenchymale Stammzellregion* (*MSR*: sechstes Cluster) ähneln aufgrund ihrer charakteristischen Markerpalette den drei GBM-Subtypen nach Phillips et al. aus dem Jahr 2006. Die Arbeitsgruppe definierte unter anderem den *proneuralen Glioblastomtyp* (*PN*) aufgrund seiner prädominanten Expression der beiden neuronalen Proteine NeuN und MAP2 (Abb. 18A), Marker zur Identifizierung von Zellen mit neuronaler Differenzierung, wie zum Beispiel Neuronen und Neuroblasten. Dieser Subtyp ist vor allem bei jüngeren Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 40 Jahren nachweisbar und mit einer besseren Prognose und längerem Überleben assoziiert (Phillips et al. 2006). In der vorliegenden Studie sind die *transformierten neuronalen Regionen* (*TNRen*) des fünften Clusters ebenso durch die sehr hohe NeuN- und die hohe MAP2-Immunreaktivität charakterisiert (Abb. 18A) und visualisieren die in diesen Regionen vorliegende neuronale Zelldifferenzierung. Passend dazu sind die Stammzellmarker ALDH1 und Nestin ebenso wie der mesenchymales Gewebe beschreibende Biomarker Vimentin in diesen Regionen durchweg nur sehr gering ausgeprägt. Als weitere Übereinstimmung findet sich auch die relativ niedrige Proliferationsrate des *PNs* innerhalb der Cluster-5-Areale mit einer mittleren Teilungsrate von circa 7,7% wieder. Eine Abweichung besteht bezüglich des Status des EGFRs. Während in den neu beschriebenen *TNRen* eine mittelhohe EGFR-Immunreaktivität vorliegt, zeigt sich der EGFR-Lokus im *PN* unmutiert (Phillips et al. 2006).

In dieser Studie liegt nicht nur ein regionales Pendant zum *proneuralen*, sondern auch zum *proliferativen Subtyp* (*Prolif*) vor, der von Phillips et al. aufgrund seines extrem hohen Proliferationsindex entsprechend benannt wurde und als weiteres Charakteristikum den niedrigsten GFAP-Gehalt aller drei Subtypen aufweist (Abb. 18B) (Phillips et al. 2006). Ebendiese beiden Details des *Prolif* finden sich übereinstimmend auch in der *hochproliferativen Region* des dritten Clusters wieder. In der aktuellen Studie konnte sogar auf zellulärer Ebene bestätigt werden, dass proliferierende Zellen in Cluster-3-Regionen nur in fünf Prozent GFAP in ihrem Zytoplasma exprimieren. Damit bestätigen sich am humanen Glioblastomgewebe Erkenntnisse, die man bisher lediglich anhand von Zellkulturen gewann (Skalli et al. 2013). Weitere einheitliche Eigenschaften zwischen *Prolif* und *HPR* sind zudem die geringe NeuN-Immunreaktivität/-Expression und der relativ niedrige Vimentin-Gehalt, der jedoch leicht über dem Niveau vom *PN* und der *TNR* liegt.

Dieser mesenchymale Biomarker führt uns direkt zur dritten Tumorform nach Phillips, nämlich dem *mesenchymalen Subtyp* (*Mes*), der durch die starke Vimentin-Expression in Kombi-

nation mit einer sehr hohen Expression des Stammzellmarkers Nestin charakterisiert ist (Abb. 18C). Dabei handelt es sich um die aggressivste Subform, die insbesondere bei älteren Patienten auftritt und mit der kürzesten Überlebenszeit einhergeht (Phillips et al. 2006). Die entsprechende Biomarkerkombination spiegelt sich in der neu detektierten *mesenchymalen Stammzellregion* des sechsten Clusters wider. Das immunhistochemisch zusätzlich auffallende mittelstark-ausgeprägte MAP2 findet sich auch im Markerprofil des Mes. Dagegen ist das zweite neuronale Protein (NeuN) sowohl in der MR als auch im Mes nur sehr selten nachweisbar. Eine pathophysiologische Erklärung hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Zusammenfassend zeigen diese Parallelen, dass innerhalb des Glioblastomgewebes Areale vorliegen, die vom Markerprofil her den drei Subtypen nach Phillips et al. aus dem Jahr 2006 entsprechen.

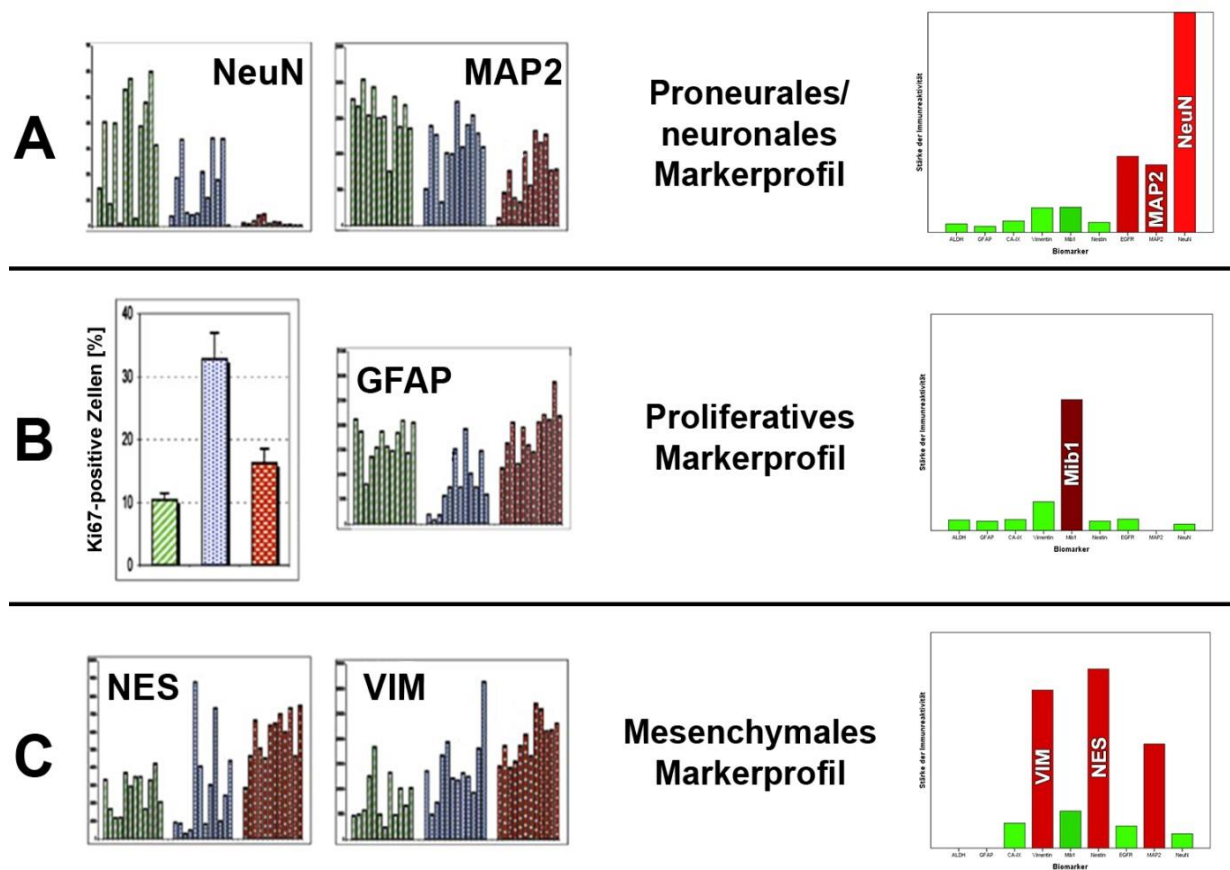


Abb. 18: Modifiziert nach Phillips et al. 2006; Übersicht über die vergleichbaren Markerprofile zwischen den links dargestellten drei Tumorsubtypen nach Phillips et al. (*proneuraler (PN: grün)*, *proliferativer (Prolif: blau)* und *mesenchymaler (Mes: rot)* Subtyp) und der im Rahmen dieser Studie neu definierten rechts abgebildeten Glioblastomregionen (*transformierte neuronale Region (TNR)*, *hochproliferative Region (HPR)*, *mesenchymale Stammzellregion (MSR)*), entnommen aus dem Säulendiagramm (Abb. 10). A) Das proneurale/neuronale Markerprofil ist charakterisiert durch einen hohen NeuN- und MAP2-Gehalt; B) Die proliferative Markerpalette ist durch zahlreiche Mib1/Ki-67-positive Zellen sowie eine niedrige GFAP- und NeuN-Rate charakterisiert; C) Das mesenchymale Markerprofil zeichnet sich durch einen hohen Vimentin- und Nestingehalt aus.

Mittels Rückführung der Regionen auf den individuellen Tumor wird sichtbar, dass die *TNR*, die *HPR* und die *MSR* intratumoral nebeneinander existieren können und sich nicht gegenseitig ausschließen. Eine Ausnahme bilden die Rezidivtumoren, bei denen die *TNR* fehlt, was wiederum mit dem bei Phillips et al. beschriebenen Subgruppen-Shift unter multimodaler Therapie hin zum *Mes* übereinstimmt (Phillips et al. 2006).

Biopsie- und Einzelzellanalysen dokumentierten bereits, dass individuelle Zellen bzw. Biopsieproben eines einzelnen Patienten in unterschiedliche molekulare Tumorsubklassen fallen, obwohl sie von ein und demselben Tumor stammen (Sottoriva et al. 2013; Patel et al. 2014). Sie vergegenwärtigen uns die sich aus der vorliegenden intratumoralen Heterogenität ergebende Limitierung der Subgruppeneinteilung.

Auf der im Rahmen dieser Studie neu herausgearbeiteten Grundlage, dass Regionen innerhalb des Glioblastomgewebes existieren, deren Markerprofil den Tumorsubgruppen entspricht, ergeben sich folglich zwei Erklärungsansätze für die Entstehung der Tumorsubtypen. Entweder existieren sie tatsächlich, weil eine dieser drei Regionen im Gesamttumor quantitativ überwiegt; oder aber sie ergeben sich fälschlicherweise, weil eine dieser drei Regionen nur in dem kleinen für die Analyse zur Verfügung stehenden Tumorabschnitt dominiert und damit eine Gruppenzuordnung bedingt, die nicht repräsentativ für den Gesamttumor ist.

5.4 Hypoxie induziert Resistenz- und Stammzellfaktoren

Eine pathophysiologisch sehr bedeutende Glioblastomregion ist die *Hypoxieregion (HR)*. Während das Enzym CA-IX in dieser Region hoch exprimiert ist und folglich als Biomarker zur Visualisierung hypoxischer Regionen dient (Loncaster et al. 2001), zeigen die meisten anderen Marker in diesem Bereich nur eine geringe Immunreaktivität. Mögliche zu diskutierende Gründe für diese Beobachtung sind der Verlust der Antigenität, zum Beispiel durch proteolytische Degeneration (Kitagawa et al. 1989), eine verminderte Proteinexpression oder ein gesteigerter Zelltod (Sugawara et al. 2002; Unal Cevik et al. 2004), allesamt induziert durch die nachteiligen Sauerstoffmangelbedingungen, welche die Zellen zur Herabregulation von Stoffwechselprozessen zwingen.

Die späte Abzweigung der *ALDH1-positiven Stammzellregion* (erstes Cluster) von der *HR* (zweites Cluster) in der hierarchischen Clusteranalyse (Absatz 4.2, Abb. 9) deutet auf eine gewisse Zusammengehörigkeit der beiden Regionen hin. Tatsächlich konnte über IF-Doppelfärbungen gezeigt werden, dass ALDH1-positive Zellen in den Randbereichen von hypoxischen Regionen gehäuft auftreten. Über die Koexpression von ALDH1 und FABP7 in denselben Zellen wurde direkt am Studiengewebe nochmals die Stammzeleigenschaft ALDH1-positiver-Zellen bestätigt und somit die Bezeichnung *ALDH1-positiv-Stammzellregion* gerechtfertigt.

Es finden sich im Glioblastom also regelmäßig Stammzellregionen direkt neben Hypoxieregionen. Diese topographische Beziehung verstärkt die Annahme, dass Hypoxie die Ausbildung von Resistenzfaktoren in Zellen der unmittelbaren Nachbarschaft direkt induziert, worauf Studienergebnisse anderer Arbeitsgruppen bereits hinwiesen (McCord et al. 2009; Shin et al. 2011; Li et al. 2013; Wang et al. 2017). Das Enzym ALDH1 unterstützt GSCs bei der Abwehr von Stress-induzierten Schädigungen, wie Hypoxie sie hervorruft, und macht ihr vermehrtes Auftreten als Resistenzfaktor unter Hypoxie-Einfluss pathophysiologisch verständlich (Marchitti et al. 2008; Raha et al. 2014; Nakano 2015). Auch *GFAP-positive Resistenzregionen* sind gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit in direkter Hypoxie-Nähe vorzufinden, was die Hypothese, dass Hypoxie Resistenzfaktoren schürt, nochmals unterstreicht. Pathophysiologisch bedingt die verstärkte GFAP-Expression eine gesteigerte mechanische Stabilität der Zelle und erhöht somit die Resistenz gegenüber schädigenden Einflüssen (Hol und Pekny 2015). Zudem verleiht das GFAP eine verbesserte Regenerationsfähigkeit. Auch die dritte Resistenzregion, die *mesenchymale Region*, erlangt ihre Widerstandsfähigkeit durch die starke Expression von IFis, nämlich Vimentin und Nestin (Krum und Rosenstein 1999; Lepekhin et al. 2001; Pekny und Lane 2007).

Wenn man bedenkt, dass Hypoxie die Expression verschiedener IFis und Enzyme fördert, die zellprotektive Funktion haben und zudem die Zellmotilität erhöhen, wird verständlich, dass Hypoxie das Malignitätsniveau und das Invasionspotential des Tumors steigert. Die entstandenen Stammzellen infiltrieren das angrenzende Gehirngewebe diffus und werden für die funktionelle Neurochirurgie schlechter eliminierbar. Parallel dazu ist die Wirkung der onkologischen Therapie aufgrund der erhöhten Widerstandsfähigkeit geringer. Diese Interpretationen lassen somit annehmen, dass Hypoxie-induzierte Resistenz- und Stammzellregionen maßgeblich an dem fast ausnahmslosen Rezidivieren der Glioblastome beteiligt sind.

5.5 Keine klare Beziehung der EGFR-Immunreaktivität zur Proliferationsaktivität

Wie in Sektion 1.5.5 beschrieben spielt EGFR eine wichtige Rolle bei der Proliferation. Seine physiologische Aktivierung treibt den Zellzyklus an und begünstigt somit das Gewebewachstum. Die Amplifikation des EGFR-Gens – die häufigste genetische Alteration der Glioblastome – führt, wie in mehreren Studien gezeigt, zur dysregulierten Proliferation und gesteigerten Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (Lund-Johansen et al. 1990; Huang et al. 2009). Aufgrund dieser pathophysiologischen Kenntnisse würde man bei den Ergebnissen der regionalen Glioblastomanalyse primär erwarten, dass in Arealen mit hoher EGFR-Immunreaktivität auch eine hohe Proliferationsaktivität nachweisbar ist. Eine derart klare Beziehung ist aus den in Sektion 4.2.2.3 aufgeführten Resultaten jedoch nicht abzuleiten. Innerhalb der

Glioblastome finden sich sowohl Regionen mit starker EGFR-Immunreaktivität und niedrigem Mib1-Niveau (Cluster 8), als auch Areale mit hohem Proliferationsindex und minimaler EGFR-Immunreaktivität (Cluster 3). Nur in den *PPR* des vierten Clusters sind beide Eigenschaften stark ausgeprägt. Wie lässt sich dies erklären? Die Cluster-8-Konstellation könnte sich zum Beispiel dadurch ergeben, dass der EGFR-Rezeptor in den entsprechenden Arealen zwar überexprimiert ist, jedoch seine Funktionstüchtigkeit verloren hat. Der spezifische Antikörper der Immunhistochemie kann am Epitop binden und das Vorhandensein anzeigen, jedoch fehlt die Weiterleitung des proliferativen Signals. Für Areale mit Cluster-3-Konstellation, gekennzeichnet durch eine hohe Teilungsrates bei niedriger EGFR-Immunreaktivität, gibt es mehrere Deutungshypothesen. So könnte in der entsprechenden Region das Wachstum unabhängig vom EGFR durch einen anderen Mechanismus angetrieben werden. Alternativ sind die Rezeptoren funktionell aktiv, jedoch hat sich das Epitop so verändert, dass kein Antigen-Antikörper-Komplex mehr gebildet werden kann. Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass lediglich die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors eine Amplifikation erfahren hat, wie es bereits im Jahr 1988 von Malden et al. beschrieben wurde (Malden et al. 1988).

Zusammenfassend hebt dieser Abschnitt das Problem sowie die Limitation dieser Studie hervor, die darin bestehen, dass von einer positiven Immunreaktivität nicht in jedem Fall direkt auf die pathophysiologische Funktion des Proteins am entsprechenden Ort geschlossen werden kann. Es ist stets zu berücksichtigen, dass sich eine positive Immunreaktivität ergibt, wenn das Epitop in seiner Struktur vom spezifischen Antikörper erkannt wird, auch wenn gegebenenfalls im funktionellen Teil des entsprechenden Moleküls Abweichungen vorliegen.

5.6 Die Glioblastomregionen sind möglicherweise Areale in unterschiedlichen Differenzierungsstufen der GBM-Progression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde über eine regionale Immunreaktivitätsanalyse nach Tumorearealen mit Bedeutung für die Tumorprogression und -resistenz gesucht. Gefunden wurden mittels clusteranalytischer Auswertung acht pathophysiologisch bedeutsame Glioblastomregionen mit jeweils charakteristischem Markerprofil, die sich in fünf regionale Übergruppen einordnen lassen und im intra- sowie interpersonellen Gewebevergleich regelmäßig wiederkehren. An zwei Beispielen konnte gezeigt werden, dass bei ausreichend großem zur Analyse zur Verfügung stehendem Glioblastommaterial Repräsentanten aller fünf regionalen Übergruppen innerhalb eines einzigen Glioblastoms nebeneinander vorliegend nachweisbar sein können. Je nach genetischem Alterationsstatus ist die *Mutationsregion* des achten Clusters entweder vorhanden oder nicht. Diese Daten deuten darauf hin, dass bei genügend gro-

ßem Analysegewebe möglicherweise jede dieser Überregionen (mit Ausnahme der Mutationsregion) in jedem unbehandelten Glioblastom vorliegt. Zur Verifizierung dieser Hypothese wären jedoch größere Fallzahlen notwendig. Die Gewichtung der unterschiedlichen Regionen kann für die molekulare Subklassenentstehung verantwortlich sein (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010).

Aufgrund der Zusammenschau der zuvor dargestellten Untersuchungsergebnisse mit Erkenntnissen aus der Literatur ist schlussfolgernd davon auszugehen, dass es sich bei den neu identifizierten Tumorregionen um Areale in unterschiedlichen Differenzierungs- bzw. Entwicklungsstufen der Glioblastomentstehung und -progression handelt (Abb. 19B). Die ursprünglichste Region stellt die *TNR* dar. In differenziertem Gewebe – gekennzeichnet durch die hohe Expression von NeuN und MAP2 – kommt es durch Akkumulation von Mutationen, in diesem konkreten Fall durch die EGFR-Amplifikation und -Überexpression, zur Entstehung transformierter Zellen. Bei qualitativem Überwiegen der *TNRen* würde sich in der Gesamtbetrachtung der *PN* nach Phillips ergeben (Abb. 19B). Die transformierten Zellen nehmen nun das Hauptcharakteristikum von Tumoren an und beginnen unkontrolliert zu proliferieren, wodurch die *proliferativen Regionen* entstehen. Unter günstigen Umgebungsbedingungen werden in den *HPRen* sehr hohe Teilungsraten mit einem mittleren Index von 24% erreicht. Bei quantitativem Dominieren dieser Region im Gesamttumor wäre er dem *Prolif* nach Phillips et al. zuzuordnen (Abb. 19A). Durch die starke Zellvermehrung ist in diesem Stadium davon auszugehen, dass die Zellen sich topographisch so weit voneinander entfernt haben, dass sie regional betrachtet unter dem Einfluss unterschiedlicher Umgebungsbedingungen stehen. In *proliferativen Regionen*, in denen das Wachstum die Neovaskularisation übersteigt, entsteht eine Minderversorgung mit Hypooxygenierung (Bar 2011). Zellen in Arealen mit länger andauernder Hypoxie exprimieren vermehrt das Resistenzprotein CA-IX (Lal et al. 2001; Proescholdt et al. 2005) und bilden die immunhistochemisch visualisierbaren *Hypoxieregionen* (Abb. 19B). Während im Zentrum der Hypoxie die Immunreaktivität zahlreicher Biomarker sehr gering ausgeprägt ist, was pathophysiologisch mit vermehrtem Zelluntergang und verminderter Proteinexpression unter den ungünstigen Sauerstoffmangelbedingungen erklärbar ist, rüsten sich die Zellen im Hypoxierandbereich mit dem Ausbau von Resistenzfaktoren (Li et al. 2013; Wang et al. 2017) und bilden konsekutiv *Resistenz- und Stammzellregionen* (Abb. 19B). Dies verleiht ihnen Widerstandsfähigkeit in Form einer robusteren Struktur (IFis), ermöglicht ein besseres Stress-Coping (ALDH1), begünstigt die Homöostase, also die Konstanthaltung des inneren Zellmilieus (CA-IX) (Kaluz et al. 2009) und steigert die Migrationsfähigkeit (CA-IX). Aufgrund der zuletzt beschriebenen Eigenschaft ist anzunehmen, dass derartige neu entstandene GSCs mit aggressiverem Phänotyp in andere Regionen einwandern und für die Ausbreitung der malignitätssteigernden

Eigenschaften sorgen, was eine mögliche Variante der Entstehung des *mesenchymalen Subtyps* darstellt (Abb. 19A).

Neben der Entstehung der *Resistenz- und Stammzellregionen* im Rahmen der soeben beschriebenen Tumorprogression begünstigt auch die onkologische Radio- und Chemotherapie selbst das vermehrte Auftreten von Zellen mit höherem Malignitätsprofil. Dies ist zum einen Folge der Selektion von Zellen mit erworbenen Widerstandsmechanismen und zum anderen die Konsequenz aus der direkten Induktion von Stammzellcharakteristika (Marusyk et al. 2012). Durch die Abwesenheit der *TNRen* innerhalb der in die Studie eingeschlossenen Rezidivtumoren liefert die Immunreaktivitätsanalyse auch für die Zunahme des tumorösen Aggressivitätsniveaus im Anschluss an die onkologische Therapie ein wichtiges Indiz. In den rekurrenten Tumoren überwiegen deutlich die *HPRen* sowie *Resistenz- und Stammzellregionen* mit ausgewogenem Auftreten der Arealsubklassen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit dem Therapie- und Progressions-induzierten Shift der GBM-Subtypen vom *PN* zum *Mes* (Phillips et al. 2006).

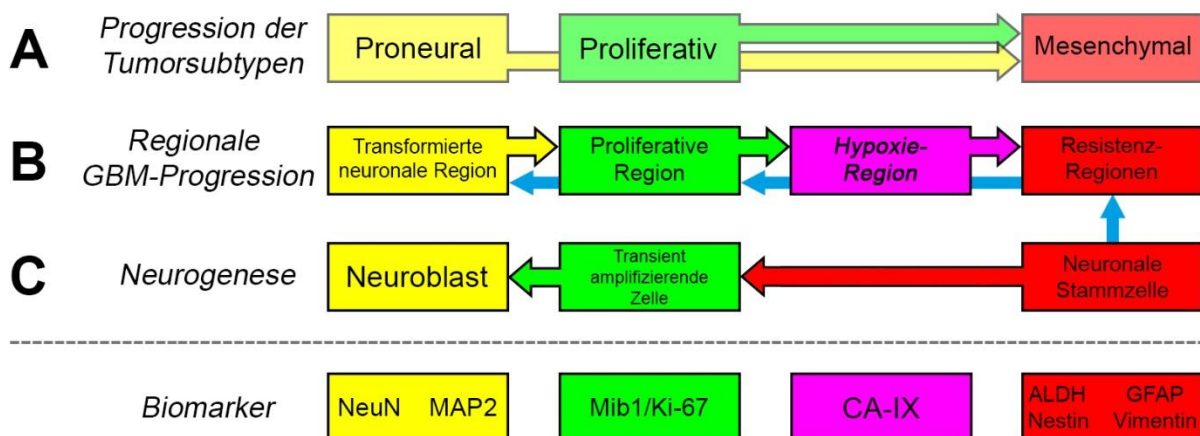


Abb. 19: Modifiziert nach Phillips et al. 2006: A) Es ist davon auszugehen, dass sich die Subtypen nach Phillips aufgrund des quantitativen Vorherrschens der entsprechenden Region innerhalb des Tumors einer einzelnen Person ergeben. B) Darstellung der GBM-Progression mit den unterschiedlichen Differenzierungsstufen auf regionaler Ebene: Durch die Akkumulation von Mutationen in neuronal differenziertem Gewebe entsteht die ursprünglichste Glioblastomregion, die sogenannte *transformierte neuronale Region (TNR)*. Aufgrund der sich anschließenden unkontrollierten Teilung der Tumorzellen bilden sich die *proliferativen Regionen (PR: HPR, PPR)* aus. Bei hoher Teilungsrate übersteigt die Proliferation die Neovaskularisation. Die Folge der daraus resultierenden Hypoxygenierung ist das Auftreten von *Hypoxieregionen (HR)*. Die Hypoxie wiederum schürt die Ausbildung von Resistenz- und Stammzellfaktoren (IFis zur strukturellen Stabilisierung; Enzyme zum Abbau schädlicher Substanzen sowie zur Konstanthaltung des inneren Zellmilieus), *Resistenz- und Stammzellregionen (RR, SR)* entstehen. C) Parallelen der GBM-Progression auf regionaler Ebene mit der Neurogenese im adulten Gehirn. Der blaue vertikale Pfeil symbolisiert den Übergang von einer NSC zur GSC und stellt damit einen weiteren Entstehungsweg von GBM-Stammzellregionen dar. Die blauen horizontalen Pfeile beschreiben den möglichen weiteren Differenzierungsvorgang von der *MSR* zur *PPR*. Die unterste Zeile vergegenwärtigt die charakteristischen Biomarker der jeweiligen Differenzierungsstufe.

5.7 Vergleichbarkeit der GBM-Progression auf regionaler Ebene mit den Differenzierungsschritten der Neurogenese im adulten Gehirn

Der Entdifferenzierungsprozess hin zu Regionen mit stammzellähnlichem Charakter erinnert an die Entwicklungsstufen der Neurogenese – jedoch in entgegengesetzter Richtung (Abb. 19B und C) (Kempermann et al. 2004). Die *TNRen* sind gekennzeichnet durch die Expression der neuronalen Biomarker, kombiniert mit einer geringen Proliferationsrate. Diese Eigenschaftskonstellation aus hoher NeuN- und MAP2-Expression bei niedriger Mib1-Rate trifft auch für unreife Neuronen und Neuroblasten des adulten Gehirns zu. Die *PRen* zeigen eine vergleichbar hohe Teilungsrate wie neuronale Vorläuferzellen, sogenannten transient amplifizierende Zellen der Neurogenese, die ein Zwischenstadium von neuronal differenzierten und undifferenzierten Zellen darstellen (Filippov et al. 2003; Fukuda et al. 2003). Die in den Resistenzregionen vorkommenden GSCs können aufgrund ihrer Stammzellcharakteristika und dem spezifischen Biomarkerprofil mit neuronalen Stammzellen verglichen werden, die wiederum in begrenztem Ausmaß den Ursprung für neuronale Plastizität und Regenerationsfähigkeit des zerebralen Netzwerkes bei Erkrankungen und Verletzungen des ZNS darstellen (Abb. 19 C) (Rietze et al. 2001; Sieber-Blum 2003). Eine entsprechende Parallele konnte bereits für die molekularen Glioblastomsubgruppen durch Phillips et al. im Jahr 2006 beschrieben werden (Phillips et al. 2006).

5.8 NSC als alternative Ursprungszelle der Gliogenese

Die Parallelen zur Neurogenese leiten uns gedanklich zu einem zweiten möglichen Gliogeneseweg. Neben der oben erwähnten Entstehung von tumorösen Zellen durch Transformationen im differenzierten Gewebe kann möglicherweise auch der mutationsbedingte Übergang einer NSC zur GSC der entscheidende Tumor-initiiierende Schritt sein (Abb. 19B und C). In diesem Fall wäre die Resistenzregion die ursprünglichste Glioblastomregion. Da neuronale Stammzellen das IFi Nestin exprimieren sind vor allem *MSR* als Ursprungsregionen zu erwarten. Nun stellt sich die Frage, welche weitere Differenzierungsregion auf die Resistenzregion folgt.

Im Ergebnisteil wurde darauf aufmerksam gemacht, dass die *proliferativen Regionen* sich in zwei Subregionen, die *HPR* und die *PPR*, einteilen lassen, die in keinem Tumor nebeneinander existieren und sich folglich intraindividuell auszuschließen scheinen. Eine Begründung, in welchem Tumor sich welche proliferative Subregion ausbildet wurde im Rahmen dieser Studie noch nicht diskutiert. Beweise für die Tatsache, dass in manchen Tumoren das Tumorstadium in den Vordergrund rückt (*HPR*), wohingegen in anderen die Ausbildung von Stabilitätsverleihenden Faktoren gefordert ist und nur eine mittelstarke Wachstumsge-

schwindigkeit erreicht werden kann (*PPR*), liefert die vorliegende Studie nicht. Jedoch ergeben sich Hinweise, darauf, dass die Art der Ursprungszelle die Subform der proliferativen Region bestimmt.

Parallel zur Differenzierung in der Neurogenese kann davon ausgegangen werden, dass sich an die *MSR*, die durch Transformation der neuronalen Stammzelle entstanden ist, eine proliferative Region anschließt (Abb. 19C). Das Markerprofil der Cluster-4-Regionen mit der Dominanz von Nestin legt nahe, dass die *PPR* die nächste Differenzierungsstufe beschreibt. Diese Annahme wird durch die Resultate der Rückführung der *PRen* auf ihren Ursprungstumor bestärkt. Denn hier zeigt sich, dass die *PPR* in fünf individuellen Tumoren gemeinsam mit der *MSR* vorkommt, während sich die Kombination aus *HPR* und *MSR* auf einen einzigen Tumor beschränkt. Bei weiterer Ausdifferenzierung entsteht entsprechend der Neurogenese eine Region mit neuronaler Differenzierung, die *TNR*. Das Vorliegen auch der übrigen Regionen (*HR*, *ASR*, *ARR*) in derartig entstandenen Glioblastomen spricht dafür, dass die *PPR* eine Weggabelung darstellt, die einerseits zur Differenzierung führen kann oder andererseits bei gegenüber der Proliferation nachhinkender Neovaskularisation zur Hypoxie (Abb. 19B) führt – mit allen in Sektion 5.4 beschriebenen Konsequenzen, nämlich insbesondere der Ausbildung von Resistenz- und Stammzeleigenschaften.

Somit belegt die Immunreaktivitätsanalyse, dass einige Aspekte und Erkenntnisse, die ursprünglich mittels Zellkultur und Tiermodell gewonnen wurden, tatsächlich auch für das humane Glioblastomgewebe zutreffen. Besonders die Beachtung topographischer Beziehungen brachte dabei entscheidende Ergebnisse.

5.9 Therapieaussicht

Zusammenfassend unterstreichen die innerhalb dieser Studie identifizierten Glioblastomregionen die hohe Dynamik, mit der Tumorzellen Resistenz- und Stammzeleigenschaften erwerben, ausbauen und wieder verlieren, jeweils beeinflusst durch die regional vorherrschenden Umgebungsbedingungen und externen Einflussfaktoren. Um die Gesamtheit der Tumorzellen eliminieren zu können, scheint es folglich notwendig zu sein, eine Kombination aus Therapeutika zu wählen, die jede der neu beschriebenen Glioblastomregionen berücksichtigt. Als passende Angriffspunkte bieten sich dabei die Hauptcharakteristika der entsprechenden Areale an.

Da die Hypoxie im Rahmen dieser Studie als wichtigster Induktor von resistenz- und widerstandsverleihenden Eigenschaften in Glioblastomzellen herausgearbeitet wurde, erscheint es vielversprechend, insbesondere eine CA-IX-Blockade als zentralen Bestandteil der anti-tumoralen Therapie in weiterführenden Studien zu prüfen. Im Jahr 2012 zeigten Proescholdt

et al. bereits ein vermindertes Invasionspotential und eine erhöhte Sensitivität gegenüber adjuvanten Therapieformen bei Glioblastomzellen mit stillgelegtem CA-IX-Gen (Proescholdt et al. 2012). Seit 2010 existieren spezifische CA-IX-Inhibitoren (Gluszok et al. 2010). In Kombination mit den klassischen Chemotherapeutika erfolgt gleichzeitig eine Elimination der Zellen in den *proliferativen Regionen*. Ein erster Hinweis auf einen möglichen Therapievorteil ausgehend von einer derartigen Kombinationstherapie ist den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Amiri aus dem Jahr 2016 zu entnehmen, die eine erhöhte Zelleliminationsrate unter dem Einsatz von Temozolomid gemeinsam mit dem CA-IX-Inhibitor Acetazolamid beschrieben (Amiri et al. 2016).

Da in den individuellen Glioblastomen zusätzlich zu den *HRen* und *PRen* unterschiedliche Resistenzregionen nachweisbar sind (*ASR*, *ARR*, *MSR*, siehe Sektion 4.2.2.4) führt uns die vorliegende Arbeit im nächsten Schritt auf die Ebene der personalisierten Medizin. Wenn gemäß der histologischen Immunreaktivitätsanalyse *ALDH1-positive Stammzellregionen* im individuellen Tumor vorhanden sind, so sollte ein ALDH-Inhibitor in die Kombinationstherapie integriert werden. Schäfer et al. zeigten unter der Verwendung von DEAB und Triscott et al. mit dem Einsatz von Disulfiram, dass mittels ALDH-Blockern die Wachstumsrate von Temozolomid-resistenten Tumorzellen reduziert werden kann (Schäfer et al. 2012; Triscott et al. 2012). In den Glioblastomfällen, in denen eine *MSR* vorliegt, können gegebenenfalls Substanzen zur gezielten Hemmung des Aufbaus der widerstandsverleihenden IFis Nestin und Vimentin zur Steigerung der Tumorzelleliminationsrate führen. Entsprechend liegt beim Nachweis von *ARRen* der Einsatz von GFAP-blockierenden Therapeutika nahe. Das GFAP ist jedoch, wie in Sektion 1.5.2.3 beschrieben, das Haupt-IFi der Astrozyten, die im Gehirn ubiquitär vorkommen und große Bedeutung bei der Narbenbildung und Wundheilung haben. Welche Auswirkungen GFAP-Inhibitoren durch die gleichzeitige Hemmung physiologischer Astrozyten haben muss in weiteren Studien abgeschätzt werden.

Die letzte Komponente der Kombinationstherapie wäre ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor bei Patienten, deren Glioblastome in der Immunreaktivitätsanalyse eine *MR* aufweisen. Der fehlende Erfolg in bisherigen prospektiven Interventionsstudien mit EGFR-Inhibitoren bei Glioblastompatienten (Rich et al. 2004; Raizer et al. 2010) ist möglicherweise Folge der in diesen Analysen nicht berücksichtigten intratumoralen Heterogenität.

Die in dieser Studie identifizierten Glioblastomregionen bieten also neue Ankerpunkte für die Entwicklung einer erweiterten antitumoralen Therapie. Das grundlegende Prinzip besteht darin, eine Kombinationstherapie zusammenzustellen, die für jede vertretene Glioblastomregion eine medikamentöse Komponente bereithält, die die dort vorherrschende widerstandsverleihende Eigenschaft blockiert.

Wie eine derartige personalisierte Kombinationstherapie im Konkreten aussehen könnte muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Insbesondere ist zu berücksichtigen, welches Ausmaß an medikamentöser Toxizität vom menschlichen Körper toleriert werden kann. Gegebenenfalls ist eine gestaffelte Intervalltherapie zielführend.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Glioblastom ist der häufigste und aggressivste primäre Hirntumor des Erwachsenenalters. Mit einer mittleren Überlebenszeit von 15 Monaten trotz interdisziplinärer multimodaler onkologischer Therapie geht diese Diagnose stets mit einer infausten Prognose einher (Hufschmidt et al. 2013). Nahezu alle betroffenen Patienten erleiden ein Rezidiv. Als Hauptursache dieser Therapieresistenz wird heutzutage die ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität der Glioblastome angenommen. Aufgrund dieser Diversität gelingt es mit der aktuellen leitliniengerechten Therapie, die bestimmte Tumorzellcharakteristika als Angriffspunkte nutzt, lediglich einen Teil der transformierten Zellen zu beseitigen. Zellen mit bisher ungeklärten Resistenzmechanismen und konsekutiv erhöhter Widerstandsfähigkeit überdauern die onkologische Therapie und bedingen das erneute Auftreten des Hirntumors, zumeist mit noch höherem Malignitätsprofil (Phillips et al. 2006). Es ist folglich notwendig, einen tieferen Einblick in die Tumorbilogie zu erhalten, die Heterogenität näher zu beleuchten und trotz der phänotypischen Vielfältigkeit nach wiederkehrenden Eigenschaften und verbreiteten Resistenzmechanismen als neue Angriffspunkte für antitumorale Therapieformen zu suchen.

Mit dem Ziel, zur Systematisierung und Homogenisierung – als Grundvoraussetzung für den Therapieerfolg – beizutragen, wurden im Rahmen dieser Studie mittels immunhistochemischen Färbungen 10er-Schnittserien von Glioblastomgewebe auf das Vorkommen sich regional wiederholender Charakteristika analysiert, die einen Rückschluss auf pathophysiologische Eigenschaften der Tumorzellen erlauben. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der Tumorarchitektur und damit des Ortes des natürlichen Vorkommens der betrachteten Proteine, fortwährend unter Einbezug der inter- sowie intratumoralen Heterogenität.

Die Ergebnisse der gegenwärtigen Studie zeigen, dass sich das gesamte Glioblastomgewebe ohne inter- und intraindividuelle Unterschiede, basierend auf charakteristischen regionalen Immunreaktivitätsprofilen, in acht Cluster einteilen lässt, die wiederum zu fünf Übergruppen zusammengefasst werden können. Das bedeutet folglich, dass das GBM acht Regionen besitzt, die im Gewebe wiederkehrend nachweisbar sind und somit eine regionale Strukturierung zulassen. Identifiziert wurden die *transformierte neuronale Region (TNR)*, zwei *proliferative Regionen (hochproliferative Region (HPR), proliferative Progenitorzellregion (PPR))*, die *Mutationsregion (MR)*, die *Hypoxieregion (HR)* sowie drei *Resistenz- und Stammzellregionen (ALDH1-positive Stammzellregion (ASR), astrozytäre Resistenzregion (ARR), mesenchymale Stammzellregion (MSR))*.

Die charakteristischen Markerpaletten dreier dieser Regionen, die der *TNR*, der *HPR* sowie der *MSR*, weisen deutliche Parallelen zu den von Phillips et al. im Jahr 2006 definierten Glioblastomsubtypen auf (Phillips et al. 2006). Die Studie zeigt also, dass Glioblastome ein-

zelne Regionen beinhalten, die gemäß ihrer Eigenschaftskombinationen den Subtypen von Phillips et al. entsprechen. Diese Regionen können dabei auch gemeinsam innerhalb eines individuellen Tumors vertreten sein.

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den neu identifizierten Tumorregionen um Areale in unterschiedlichen Differenzierungs- bzw. Entwicklungsstufen der Glioblastomentstehung und -progression handelt. Der Entdifferenzierungsprozess während der GBM-Progression hin zu Regionen mit stammzellähnlichem Charakter ist dabei vergleichbar mit den Entwicklungsschritten der Neurogenese im adulten Gehirn – jedoch in entgegengesetzter Richtung. Aus diesen Differenzierungsschritten leiten sich zwei mögliche Ursprünge der Gliogenese ab: Entweder entwickeln sich die Tumorzellen durch Transformation von Zellen in neuronal differenziertem Gewebe oder aber sie entstehen durch den mutationsbedingten Übergang einer NSC in eine GSC.

Besonders wichtig ist die Erkenntnis, dass die Analysen und dargestellten topographischen Beziehungen die Hypoxie als Hauptinduktor für die Ausbildung von Resistenzfaktoren und widerstandsverleihenden Mechanismen in Tumorzellen hervorheben. Somit scheint es vielversprechend zu sein, insbesondere eine CA-IX-Blockade als zentralen Bestandteil einer antitumoralen Kombinationstherapie in weiterführenden Studien zu prüfen.

Durch die Identifizierung der verschiedenen Glioblastomregionen wurde das Studienziel erreicht, nämlich zur Homogenisierung und Strukturierung der Tumorentität beizutragen. Es wurden neue Ankerpunkte für die Entwicklung einer Kombinationstherapie geschaffen. Dies ist allerdings erst der Ausgangspunkt einer personalisierten Therapieform; weitere Studien sind notwendig, um einzelne Therapiekomponenten zu entwickeln, ihre Auswirkung zu prüfen und ihre Kombinationsfähigkeit zu testen. Zukünftige Analysen werden zeigen, ob die im Rahmen dieser Studie herausgearbeiteten regional differierenden resistenzverleihenden Eigenschaften effektive Therapieangriffspunkte darstellen und ob unter Berücksichtigung der ausgeprägten Heterogenität eine Prognoseverbesserung erzielt werden kann.

7. Danksagung

Ohne den wertvollen Beitrag vieler Personen wäre diese Arbeit in ihrer aktuellen Form nicht möglich gewesen. Daher möchte ich meinen Dank all denjenigen aussprechen, die mich während meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Jürgen Schlegel, der die Idee zu dieser Arbeit hatte und mir mit dem Überlassen des Dissertationsthemas die Möglichkeit gab meine Doktorarbeit in seinem Team anzufertigen. Ich bedanke mich bei ihm für die kontinuierliche, ideenreiche Betreuung und insbesondere das in mich gesetzte Vertrauen, welches mir ein selbstständiges und kreatives Arbeiten ermöglichte.

Besonderen Dank schulde ich Frau Ingrid Hoepner, die mir mit ihrer jahrelangen Erfahrung stets hilfsbereit zur Seite stand. Auch bei Frau PD Dr. Frauke Neff möchte ich mich für die Ermöglichung der Digitalisierung meiner pathologischen Gewebeschnitte bedanken.

Großen Dank richte ich zudem an Herrn PD Dr. Lucas Schirmer, Mitarbeiter der Neurologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, der mir seine Protokolle für die Durchführung von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen zur Verfügung stellte.

Weiterhin danke ich dem Leiter der Abteilung für analytische Pathologie am Helmholtzzentrum München, Herrn Prof. Axel Walch, und insbesondere auch seiner Mitarbeiterin Frau Dr. Annette Feuchtinger für die Bereitstellung und Unterstützung bei der Nutzung der Bildanalyseplattform.

Ein großer Dank geht zudem an die beiden Physiker des Max-Planck-Instituts für extraterrestrische Physik in Garching bei München, Herrn Dr. Wolfram Bunk und Herrn Dr. Thomas Aschenbrenner, die der Erststellung der hierarchischen Clusteranalyse beigewirkt und somit die Arbeit entscheidend gefördert haben.

Ebenfalls nennen möchte ich meine Kollegin Frau Dr. Claire Delbridge und bedanke mich hiermit nicht nur für wissenschaftliche Hilfestellungen, sondern vor allem für zahlreiche gute Gespräche und eine unterhaltsame Zeit.

Meinen ganz besonderen Dank spreche ich zwei sehr guten Freunden aus, zum einen Herrn Dr. Ludwig Bulst, der mir in unersetzlicher Weise bei der Visualisierung von Kernaussagen und der Strukturierung der Arbeit beigestanden hat, sowie Herrn Dominik Pürner, einem stets zuverlässigen Ansprechpartner, für seine wegweisenden Ratschläge.

Bei Lukas Meier möchte ich mich von ganzem Herzen für tiefgründige, sehr bereichernde Diskussionen, seine Unterstützung auf persönlicher Ebene und sein Verständnis bedanken. Zu guter Letzt möchte ich in großer Dankbarkeit meine Eltern hervorheben, die mich während der gesamten Zeit fortwährend unterstützt haben und mit nahezu grenzenloser Geduld viel mit mir durchgestanden haben.

8. Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Avidin/biotin complex</i> (Avidin/Biotin Komplex)
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ARR	Astrozytäre Resistenzregion
ASR	ALDH1-positive Stammzellregion
°C	Grad Celsius
CA-IX	Carboanhydrase-IX
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppe)
Class	<i>Classical subtype</i> (Klassischer Subtyp)
CSC	<i>Cancer stem cell</i> (Krebsstammzelle)
DAB	3,3`-Diaminobenzidin
DAPI	4`-6-Diamidin-2-phenylindol
DEAB	4-Diethylaminobenzaldehyd
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> (Antigenbindendes Fragment)
FABP7	<i>Fatty-acid-binding protein</i> (Fettsäurebindendes Protein)
Fc	<i>Fragment crystallisable</i> (Krystallisierbares Fragment)
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (Saures Gliafaserprotein)
GSC	<i>Glioblastoma stem-like cell</i> (Stammzell-ähnliche Zelle des Glioblastoms)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	Hypoxieregion
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFi	Intermediärfilament
IHC	Immunhistochemie
m	männlich
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Mes	Mesenchymaler Subtyp
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Mib1	<i>Molecular immunology Borstel</i>

Min	Minute(n)
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MR	Mutationsregion
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MSR	Mesenchymale Stammzellregion
n	Anzahl
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
Neu	Neuronaler Subtyp
NeuN	<i>Neuronal nuclear antigen</i> (Neuronales Kernantigen)
NSC	<i>Neuronal stem cell</i> (Neuronale Stammzelle)
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatsalzpufferlösung)
PBST	<i>Phosphate-buffered saline with Tween</i> (Phosphatsalzpufferlösung mit Tween)
PN	Proneuraler Subtyp
PPR	Proliferative Progenitorzellregion
PR	Proliferative Region
Prolif	Proliferativer Subtyp
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RoI	<i>Region of interest</i> (Interessensareal)
Sox-2	<i>Sex determining region Y (SRY)- box 2</i> (Geschlechtsbestimmende Region Y- Box 2)
TAC	<i>Transit amplifying cell</i> (Passager amplifizierende Zelle)
TIC	<i>Tumor inducing cell</i> (Tumorinduzierende Zelle)
TNR	Transformierte neuronale Region
TP53	Tumor-Protein p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
w	weiblich
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: HE-Färbung mit Zellpolymorphie und Hämorrhagie.....	3
Abb. 2: HE-Färbung mit pathologischen Gefäßen, Nekroseareal und Palisadenzellen.....	4
Abb. 3: Darstellung der inter- und intratumoralen Heterogenität beim GBM.....	6
Abb. 4: Darstellung möglicher Ursachen für die Entstehung intratumoraler Heterogenität.....	8
Abb. 5: Beispielhafte Darstellung der 10-er Schnittserie.....	29
Abb. 6: Darstellung der 10-er Schnittserie inkl. eingezeichneter Interessensareale.....	31
Abb. 7: Darstellung der mittels Bildanalyzesystem erfassten Immunreaktivität.....	32
Abb. 8: Darstellung der Software-gestützten Auszählungen der IF-Färbungen.....	33
Abb. 9: Stammbaumdarstellung der hierarchischen Clusteranalyse.....	39
Abb. 10: Säulendiagramm des repräsentativen Markerprofils jedes einzelnen Clusters.....	40
Abb. 11: Stammbaumdarstellung der Antikörper-orientierten Clusteranalyse.....	41
Abb. 12: GFAP-Mib1-IF-Doppelfärbung inkl. qualitativer Auszählung.....	42
Abb. 13: Nestin-Mib1-IF-Doppelfärbung.....	43
Abb. 14: ALDH1-FABP7-IF-Doppelfärbung.....	45
Abb. 15: IHC-Färbung und IF-Färbung mit dem Antikörper CA-IX.....	46
Abb. 16: CA-IX-ALDH1/GFAP-IF-Doppelfärbungen.....	47
Abb. 17: Untergliederung der Glioblastommasse in acht Cluster und fünf Übergruppen.....	50
Abb. 18: Markerprofilvergleich zw. Phillips-Tumorsubtypen und den Glioblastomregionen....	54
Abb. 19: Darstellung der GBM-Progression mit den unterschiedlichen Differenzierungsstufen auf regionaler Ebene; Parallelen der GBM-Progression auf regionaler Ebene mit der Neurogenese im adulten Gehirn.....	59

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humanreaktive primäre Antikörper.....	22
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper	23
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	23
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 5: Kits	24
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel.....	24
Tabelle 7: Geräte.....	25
Tabelle 8: Software	25
Tabelle 9: Entparaffinieren und Rehydrieren	28
Tabelle 10: Primäre Antikörper mit Verdünnung, Positivkontrolle und Färbemethode.....	29
Tabelle 11: Primäre humanreaktive Antikörper mit Verdünnung und Kombinationspartnern.	30
Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten aller neun Biomarker	36

11. Literaturverzeichnis

- Alekseeva, O.S., Gusel'nikova, V.V., Beznin, G.V., Korzhevskii, D.E. (2015) Prospects of the nuklear protein NeuN application as an index of functional state of the vertebrate nerve cells. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 51, 313–323.
- Amiri, A., Le, P.U., Moquin, A., Machkalyan, G., Petrecca, K., Gillard, J.W., Yoganathan, N., Maysinger, D. (2016) Inhibition of carbonic anhydrase IX in glioblastoma multiforme. *Eur J of Pharm Biopharm* 109, 81–92.
- Anderson, A.R., Weaver, A.M., Cummings, P.T., Quaranta, V. (2006) Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 127, 905–915.
- Arai, H., Ikota, H., Sugawara, K., Nobusawa, S., Hirato, J., Nakazato, Y. (2012) Nestin expression in brain tumors: its utility for pathological diagnosis and correlation with the prognosis of high-grade gliomas. *Brain Tumor Pathol* 29, 160–167.
- Azuaje, F., Tiemann, K., Niclou, S.P. (2015) Therapeutic control and resistance of the EGFR-driven signaling network in glioblastoma. *Cell Commun Signal* 13, 23.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.
- Bar, E.E. (2011) Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. *Brain Pathol* 21, 119–129.
- Bissell, M.J., Kenny, P.A., Radisky, D.C. (2005) Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 343–356.
- Bonavia, R., Inda, M.-d.-M., Cavenee, W.K., Furnari, F.B. (2011) Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res* 71, 4055–4060.
- Booth, D.G., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C.P., Tollervey, D., Earnshaw, W.C., et al. (2014) Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Elife* 3, e01641.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
- Brooks, P.J., Theruvathu, J.A. (2005) DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 35, 187–193.
- Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 206, 624–635.

- Campos, B., Centner, F.-S., Bermejo, J.L., Ali, R., Dorsch, K., Wan, F., Felsberg, J., Ahmadi, R., Grabe, N., Reifenberger, G., et al. (2011) Aberrant expression of retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas. *Am J Pathol* 178, 1953–1964.
- Carlsson, S.K., Brothers, S.P., Wahlestedt, C. (2014) Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med* 6, 1359–1370.
- Chen, J., McKay, R.M., Parada, L.F. (2012) Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* 149, 36–47.
- Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., Zeniou, M. (2016) Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. *Stem Cells Int* 2016, 1–16.
- Choi, B.D., Archer, G.E., Mitchell, D.A., Heimberger, A.B., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Sampson, J.H. (2009) EGFRvIII-targeted vaccination therapy of malignant glioma. *Brain Pathol* 19, 713–723.
- Chou, Y.-H., Khuon, S., Herrmann, H., Goldman, R.D. (2003) Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell* 14, 1468–1478.
- Clarke, S.R., Shetty, A.K., Bradley, J.L., Turner, D.A. (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* 5, 1885–1888.
- Coffey, R.J., Lunsford, L.D., Taylor, F.H. (1988) Survival after stereotactic biopsy of malignant gliomas. *Neurosurgery* 22, 465–473.
- Dahlstrand, J., Zimmerman, L.B., McKay, R.D., Lendahl, U. (1992) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci* 103, 589–597.
- Dehmelt, L., Halpain, S. (2004) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6, 204.
- Del Vecchio, C.A., Giacomini, C.P., Vogel, H., Jensen, K.C., Florio, T., Merlo, A., Pollack, J.R., Wong, A.J. (2013) EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene* 32, 2670–2681.
- Duffy, P.E., Huang, Y.Y., Rapport, M.M. (1982) The relationship of glial fibrillary acidic protein to the shape, motility, and differentiation of human astrocytoma cells. *Exp Cell Res* 139, 145–157.
- Emrich, J.G., Brady, L.W., Quang, T.S., Class, R., Miyamoto, C., Black, P., Rodeck, U. (2002) Radioiodinated (I-125) monoclonal antibody 425 in the treatment of high grade glioma patients: ten-year synopsis of a novel treatment. *Am J Clin Oncol* 25, 541–546.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., Gerstl, B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28, 351–354.

- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23, 373–382.
- Frederick, L., Wang, X.-Y., Eley, G., James, C.D. (2000) Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60, 1383–1387.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T. (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23, 9357–9366.
- 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., et al. (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683–2710.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., Vescovi, A. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011–7021.
- Gardiner, J., Overall, R., Marc, J. (2011) The microtubule cytoskeleton acts as a key downstream effector of neurotransmitter signaling. *Synapse* 65, 249–256.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710–1715.
- Gilbertson, R.J., Rich, J.N. (2007) Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 7, 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., et al. (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.
- Gluszok, S., Frédérick, R., Foulon, C., Klupsch, F., Supuran, C.T., Vullo, D., Scozzafava, A., Goossens, J.-F., Masereel, B., Depreux, P., et al. (2010) Design, solid-phase synthesis, and biological evaluation of novel 1,5-diarylpyrrole-3-carboxamides as carbonic anhydrase IX inhibitors. *Bioorg Med Chem* 18, 7392–7401.
- Hagel, C., Treszl, A., Fehlert, J., Harder, J., von Haxthausen, F., Kern, M., von Bueren, A.O., Kordes, U. (2013) Supra- and infratentorial pediatric ependymomas differ significantly in NeuN, p75 and GFAP expression. *J Neurooncol* 112, 191–197.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hatanpaa, K.J., Burma, S., Zhao, D., Habib, A.A. (2010) Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 12, 675–684.

- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., Kornblum, H.I. (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15178–15183.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Chu, Y.W., Trevor, K.T., Seftor, R.E. (1996) Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 15, 507–525.
- Herpers, M.J., Ramaekers, F.C., Aldeweireldt, J., Moesker, O., Slooff, J. (1986) Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathol* 70, 333–339.
- Hirokawa, N. (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 74–81.
- Hol, E.M., Pekny, M. (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32, 121–130.
- Holmin, S., Almqvist, P., Lendahl, U., Mathiesen, T. (1997) Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* 9, 65–75.
- Huang, P.H., Xu, A.M., White, F.M. (2009) Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal* 2, re6.
- Hufschmidt, A., Amtage, F. (Eds.) (2013) *Neurologie compact: für Klinik und Praxis*. Thieme, Stuttgart, 6th ed.
- Jackson, B.W., Grund, C., Schmid, E., Bürki, K., Franke, W.W., Illmensee, K. (1980) Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17, 161–179.
- Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N.W., Deepak, J., Xing, L., Wang, H., Liu, Z., Su, Y., Stass, S.A., et al. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 7, 330–338.
- Johnson, G.V., Jope, R.S. (1992) The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res* 33, 505–512.
- Kaluz, S., Kaluzová, M., Liao, S.-Y., Lerman, M., Stanbridge, E.J. (2009) Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: a one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta* 1795, 162–172.
- Karpel-Massler, G., Schmidt, U., Unterberg, A., Halatsch, M.-E. (2009) Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol Cancer Res* 7, 1000–1012.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27, 447–452.
- Kim, K.K., Adelstein, R.S., Kawamoto, S. (2009) Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* 284, 31052–31061.

- Kim, K.K., Kim, Y.C., Adelstein, R.S., Kawamoto, S. (2011) Fox-3 and PSF interact to activate neural cell-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 39, 3064–3078.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Niinobe, M., Mikoshiba, K., Hata, R., Ueda, H., Handa, N., Fukunaga, R., Isaka, Y., Kimura, K., et al. (1989) Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage—immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* 31, 401–411.
- Kitai, R., Horita, R., Sato, K., Yoshida, K., Arishima, H., Higashino, Y., Hashimoto, N., Takeuchi, H., Kubota, T., Kikuta, K.-I. (2010) Nestin expression in astrocytic tumors delineates tumor infiltration. *Brain Tumor Pathol* 27, 17–21.
- Kordek, R., Biernat, W., Alwasiak, J., Liberski, P.P. (1996) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 immunopositivity in human astrocytic tumours. *Acta Neurochir* 138, 509–512.
- Krum, J.M., Rosenstein, J.M. (1999) Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *Exp Neurol* 160, 348–360.
- Kubelt, C., Hattermann, K., Sebens, S., Mehdorn, H.M., Held-Feindt, J. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas. *Int J Oncol* 46, 2515–2525.
- Lal, A., Peters, H., St Croix, B., Haroon, Z.A., Dewhirst, M.W., Strausberg, R.L., Kaanders, J.H., van der Kogel, A.J., Riggins, G.J. (2001) Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst* 93, 1337–1343.
- Lang, G. (2013) *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. Springer, Wien/New York, 2th ed.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.
- Lepekhn, E.A., Eliasson, C., Berthold, C.H., Berezin, V., Bock, E., Pekny, M. (2001) Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J Neurochem* 79, 617–625.
- Li, P., Zhou, C., Xu, L., Xiao, H. (2013) Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci* 10, 399–407.
- Li, T., Su, Y., Mei, Y., Leng, Q., Leng, B., Liu, Z., Stass, S.A., Jiang, F. (2010) ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. *Lab Invest* 90, 234–244.
- Libermann, T.A., Razon, N., Bartal, A.D., Yarden, Y., Schlessinger, J., Soreq, H. (1984) Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res* 44, 753–760.
- Lin, L., Wang, G., Ming, J., Meng, X., Han, B., Sun, B., Cai, J., Jiang, C. (2016) Analysis of expression and prognostic significance of vimentin and the response to temozolomide in glioma patients. *Tumor Biol* 37, 15333–15339.

- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., Yu, J.S. (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5, 67.
- Loncaster, J.A., Harris, A.L., Davidson, S.E., Logue, J.P., Hunter, R.D., Wycoff, C.C., Pastorek, J., Ratcliffe, P.J., Stratford, I.J., West, C.M. (2001) Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 61, 6394–6399.
- López-Lázaro, M. (2015) Stem cell division theory of cancer. *Cell Cycle* 14, 2547–2548.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O., Cavenee, W.K. (Eds.) (2007) WHO classification of tumours of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 4th ed.
- Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., Humphrey, P.A., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Laerum, O.-D. (1990) Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* 50, 6039–6044.
- Lv, D., Wang, X., Dong, J., Zhuang, Y., Huang, S., Ma, B., Chen, P., Li, X., Zhang, B., Li, Z., et al. (2016) Systematic characterization of lncRNAs' cell-to-cell expression heterogeneity in glioblastoma cells. *Oncotarget* 7, 18403–18414.
- Malden, L.T., Novak, U., Kaye, A.H., Burgess, A.W. (1988) Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 48, 2711–2714.
- Mao, P., Joshi, K., Li, J., Kim, S.-H., Li, P., Santana-Santos, L., Luthra, S., Chandran, U.R., Benos, P.V., Smith, L., et al. (2013) Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8644–8649.
- Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D., Vasiliou, V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 697–720.
- Marusyk, A., Almendro, V., Polyak, K. (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12, 323–334.
- Matsuda, Y., Ishiwata, T., Yoshimura, H., Hagio, M., Arai, T. (2015) Inhibition of nestin suppresses stem cell phenotype of glioblastomas through the alteration of post-translational modification of heat shock protein HSPA8/HSC71. *Cancer Lett* 357, 602–611.
- Mazzoleni, S., Politi, L.S., Pala, M., Cominelli, M., Franzin, A., Sergi Sergi, L., Falini, A., De Palma, M., Bulfone, A., Poliani, P.L., et al. (2010) Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res* 70, 7500–7513.
- McCord, A.M., Jamal, M., Shankavaram, U.T., Lang, F.F., Camphausen, K., Tofilon, P.J. (2009) Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol. Cancer Res* 7, 489–497.

- Mendez, M.G., Kojima, S.-I., Goldman, R.D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24, 1838–1851.
- Middeldorp, J., Hol, E.M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421–443.
- Morihiro, Y., Yasumoto, Y., Vaidyan, L.K., Sadahiro, H., Uchida, T., Inamura, A., Sharifi, K., Ideguchi, M., Nomura, S., Tokuda, N., et al. (2013) Fatty acid binding protein 7 as a marker of glioma stem cells. *Pathol Int* 63, 546–553.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201–211.
- Muramoto, G.G., Russell, J.L., Safi, R., Salter, A.B., Himgurg, H.A., Daher, P., Meadows, S.K., Doan, P., Storms, R.W., Chao, N.J., et al. (2010) Inhibition of aldehyde dehydrogenase expands hematopoietic stem cells with radioprotective capacity. *Stem Cells* 28, 523–534.
- Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W.L., Shay, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Regli, L., Wick, W., Kouwenhoven, M.C.M., et al. (2008) Stem cell-related “self-renewal” signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 26, 3015–3024.
- Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M., Janeway, C.A. (2009) *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum, Heidelberg, 7th ed.
- Nakano, I. (2015) Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. *J Neurosurg* 122, 324–330.
- Neradil, J., Veselska, R. (2015) Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci* 106, 803–811.
- Ni, W., Luo, L., Ping, Z., Yuan, H.-P., Zhao, X.-D., Xu, W. (2015) Prognostic value of ALDH1A3 promoter methylation in glioblastoma: a single center experience in Western China. *Asian Pac J of Cancer Prev* 16, 591–594.
- Ohgaki, H., Kleihues, P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93–108.
- Padfield, E., Ellis, H.P., Kurian, K.M. (2015) Current therapeutic advances targeting EGFR and EGFRvIII in glioblastoma. *Front Oncol* 5, 5.
- Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., et al. (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344, 1396–1401.
- Pekny, M., Eliasson, C., Chien, C.L., Kindblom, L.G., Liem, R., Hamberger, A., Betsholtz, C. (1998) GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Exp Cell Res* 239, 332–343.
- Pekny, M., Lane, E.B. (2007) Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res* 313, 2244–2254.

- Penas-Prado, M., Armstrong, T.S., Gilbert, M.R. (2012) Glioblastoma. *Handb Clin Neurol* 105, 485–506.
- Persano, L., Rampazzo, E., Della Puppa, A., Pistollato, F., Basso, G. (2011) The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. *Sci World J* 11, 1829–1841.
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173.
- Prados, M.D., Levin, V. (2000) Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol* 27, 1–10.
- Proescholdt, M.A., Mayer, C., Kubitza, M., Schubert, T., Liao, S.-Y., Stanbridge, E.J., Ivanov, S., Oldfield, E.H., Brawanski, A., Merrill, M.J. (2005) Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors. *Neuro Oncol* 7, 465–475.
- Proescholdt, M.A., Merrill, M.J., Stoerr, E.-M., Lohmeier, A., Pohl, F., Brawanski, A. (2012) Function of carbonic anhydrase IX in glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 14, 1357–1366.
- Raha, D., Wilson, T.R., Peng, J., Peterson, D., Yue, P., Evangelista, M., Wilson, C., Merchant, M., Settleman, J. (2014) The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res* 74, 3579–3590.
- Raizer, J.J., Abrey, L.E., Lassman, A.B., Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Yung, W.K., Gilbert, M.R., Aldape, K.A., Wen, P.Y., et al. (2010) A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro Oncol* 12, 95–103.
- Rasper, M., Schafer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C., Schlegel, J. (2010) Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol* 12, 1024–1033.
- Rich, J.N., Rasheed, B.K., Yan, H. (2004) EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *N Engl J Med* 351, 1260–1261.
- Rietze, R.L., Valcanis, H., Brooker, G.F., Thomas, T., Voss, A.K., Bartlett, P.F. (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412, 736–739.
- Rutka, J.T., Smith, S.L. (1993) Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acidic protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. *Cancer Res* 53, 3624–3631.
- Rutka, J.T., Ivanchuk, S., Mondal, S., Taylor, M., Sakai, K., Dirks, P., Jun, P., Jung, S., Becker, L.E., Ackerley, C. (1999) Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int J Dev Neurosci* 17, 503–515.

- Sahlgren, C.M., Pallari, H.-M., He, T., Chou, Y.-H., Goldman, R.D., Eriksson, J.E. (2006) A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J* 25, 4808–4819.
- Sánchez, C., Díaz-Nido, J., Avila, J. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61, 133–168.
- Schäfer, A., Teufel, J., Ringel, F., Bettstetter, M., Hoepner, I., Rasper, M., Gempt, J., Koeritzer, J., Schmidt-Graf, F., Meyer, B., Beier, C.P., Schlegel, J. (2012) Aldehyde dehydrogenase 1A1—a new mediator of resistance to temozolomide in glioblastoma. *Neuro Oncol* 14, 1452–1464.
- Shin, H.-J., Rho, S.B., Jung, D.C., Han, I.-O., Oh, E.-S., Kim, J.-Y. (2011) Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J Cell Sci* 124, 1077–1087.
- Sieber-Blum, M. (2003) Ontogeny and plasticity of adult hippocampal neural stem cells. *Dev Neurosci* 25, 273–278.
- Singh, A., Settleman, J. (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821–5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.
- Skalli, O., Wilhelmsson, U., Örndahl, C., Fekete, B., Malmgren, K., Rydenhag, B., Pekny, M. (2013) Astrocytoma grade IV (glioblastoma multiforme) displays 3 subtypes with unique expression profiles of intermediate filament proteins. *Hum Pathol* 44, 2081–2088.
- Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.-H., Lee, J., Fine, H.A. (2009) SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440–452.
- Sørensen, M.D., Fosmark, S., Hellwege, S., Beier, D., Kristensen, B.W., Beier, C.P. (2015) Chemoresistance and chemotherapy targeting stem-like cells in malignant glioma. *Adv Exp Med Biol* 853, 111–138.
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., Tavare, S. (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4009–4014.
- Sugawara, K., Kurihara, H., Negishi, M., Saito, N., Nakazato, Y., Sasaki, T., Takeuchi, T. (2002) Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest* 82, 345–351.
- Sullivan, S.M., Lee, A., Björkman, S.T., Miller, S.M., Sullivan, R.K.P., Poronnik, P., Colditz, P.B., Pow, D.V. (2007) Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. *J Biol Chem* 282, 29414–29423.

- Taylor, J.W., Schiff, D. (2015) Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 15, 507.
- Triscott, J., Lee, C., Hu, K., Fotovati, A., Berns, R., Pambid, M., Luk, M., Kast, R.E., Kong, E., Toyota, E., et al. (2012) Disulfiram, a drug widely used to control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide. *Oncotarget* 3, 1112–1123.
- Tunici, P., Bissola, L., Lualdi, E., Pollo, B., Cajola, L., Broggi, G., Sozzi, G., Finocchiaro, G. (2004) Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Mol Cancer* 3, 25.
- Unal-Cevik, I., Kiliç, M., Gürsoy-Ozdemir, Y., Gurer, G., Dalkara, T. (2004) Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res* 1015, 169–174.
- Vanneste, D., Takagi, M., Imamoto, N., Vernos, I. (2009) The role of Hk1p2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr Biol* 19, 1712–1717.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.
- Vigneswaran, K., Neill, S., Hadjipanayis, C.G. (2015) Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med* 3, 95.
- Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., Poulsen, H.S. (1997) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 8, 1197–1206.
- Wang, P., Lan, C., Xiong, S., Zhao, X., Shan, Y., Hu, R., Wan, W., Yu, S., Liao, B., Li, G., et al. (2017) HIF1 α regulates single differentiated glioma cell dedifferentiation to stem-like cell phenotypes with high tumorigenic potential under hypoxia. *Oncotarget* 8, 28074–28092.
- Wen, P.Y., Kesari, S. (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492–507.
- Westphal, M., Lamszus, K. (2011) The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 12, 495–508.
- Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., Vogelstein, B. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2965–2969.
- Xie, Y., Bergström, T., Jiang, Y., Johansson, P., Marinescu, V.D., Lindberg, N., Segerman, A., Wicher, G., Niklasson, M., Baskaran, S., et al. (2015) The human glioblastoma cell culture resource: validated cell models representing all molecular subtypes. *EBioMedicine* 2, 1351–1363.
- Yung, W.K., Luna, M., Borit, A. (1985) Vimentin and glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. *J Neurooncol* 3, 35–38.