



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

**Intratumorale Heterogenität von Glioblastomen -
Subtypenausprägung in Primärtumoren und
korrespondierenden Rezidiven**

Karoline Elisabeth Mayer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München (TUM) zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Susanne Kossatz

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Priv.Doz. Dr. Friederike Liesche-Starnecker
2. Priv.Doz. Dr. Maria Wostrack
3. Priv.Doz. Dr. Friederike Schmidt-Graf

Die Dissertation wurde am 20.12.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.05.2022 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Danksagung	V
2	Abkürzungsverzeichnis	VI
3	Einleitung	1
3.1	Problemstellung	1
3.2	Das Glioblastom	2
3.2.1	Epidemiologie und Tumorcharakteristika	2
3.2.2	Heterogenität	4
3.3	Biomarker	8
3.3.1	Biomarker zur Tumorsubtypisierung	8
3.3.1.1	Aldehydehydrogenase 1A3 (ALDH1A3)	8
3.3.1.2	Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	9
3.3.1.3	YKL-40 (Chitinase-3-like protein 1)	10
3.3.1.4	Epidermal Growth Factor Receptor	11
3.3.1.5	Oligodendrocyte lineage factor 2 (Olig2)	12
3.3.1.6	p53	13
3.3.1.7	CD44	14
3.3.2	Marker mit Aussage zum Tumorwachstum und des Microenvironments	14
3.3.2.1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)	14
3.3.2.2	Molecular Immunology Borstel 1 (Mib1)	16
3.3.2.3	p62	17
3.3.2.4	MGMT	18
3.4	Zielsetzung	18
4	Methoden und Material	20
4.1	Patient*innenkollektiv	20
4.2	Ethikvotum	20
4.3	Gewebevorbereitung	20
4.4	Immunhistochemie	21
4.4.1	Methode und Grundlagen	21
4.4.2	Arbeitsschritte	22
4.4.3	Kontrollen	24
4.4.4	Auswertung	24
4.4.5	Areas of Interest (Aoi)	28
4.5	Immunfluoreszenz	28
4.6	850k-Methylierungsassay	29
4.7	Statistische Auswertung	30
5	Ergebnisse	32
5.1	Patient*innendaten und demographische Zusammensetzung	32

5.2	Primärtumoren.....	32
5.2.1	Beobachtungen.....	32
5.2.2	Immunhistochemie.....	34
5.2.2.1	Für Immunhistochemische Heterogenitätsstudien geeignete Biomarker.....	34
5.2.2.2	Hierarchische Clusteranalyse.....	34
5.2.2.3	PAM.....	36
5.2.2.4	Korrelationsanalyse.....	37
5.2.2.5	Zusammenschau der Ergebnisse.....	38
5.2.2.6	Probengröße und Heterogenität.....	46
5.2.3	Immunfluoreszenz.....	47
5.2.4	Epigenetische Analyse.....	48
5.3	Vergleich der Primärtumor-Rezidiv-Paare: Dominanz des mesenchymal Mikrogliadominierten Phänotyps.....	53
5.3.1	Epigenetische Analyse.....	60
5.4	Klinische Korrelation.....	60
6	Diskussion.....	62
6.1	Immunhistochemie-kompatible Marker zur Subklassifizierung von Glioblastomen.....	62
6.2	Regionale Heterogenität in Glioblastomen: Subklassifizierung in einen klassisch proliferativen und mesenchymal Mikrogliadominierten Phänotyp...63	63
6.3	Mesenchymal Mikrogliadominierter Subtyp und Tumormilieu.....	66
6.4	Klassischer Subtyp und Proliferation.....	68
6.5	Temporale Heterogenität: Dominanz des mesenchymal Mikrogliadominierten Phänotyps im Laufe der Tumorprogression.....	70
6.6	Funktionelle Heterogenität: Klinische Korrelation.....	71
6.7	Limitationen.....	72
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	74
8	Verzeichnisse.....	76
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	76
8.2	Tabellenverzeichnis.....	76
9	Appendix.....	86
9.1	Materialien.....	86
9.1.1	Antikörper Immunhistochemie.....	86
9.1.2	Antikörper Immunfluoreszenz.....	86
9.1.3	Chemikalien.....	87
9.1.4	Geräte und Hilfsmaterial.....	87
9.1.5	Software.....	88
9.2	Publikation.....	89

Die Resultate der vorliegenden Arbeit wurden 2020 im peer-reviewed Journal *Cancers* publiziert:

Liesche-Starnecker, F.* , Mayer, K.* , Kofler, F., Baur, S., Schmidt-Graf, F., Kempter, J., Prokop, G., Pfarr, N., Wei, W., Gempt, J., Combs, S., Zimmer, C., Meyer, B., Wiestler*, B., Schlegel, J*.

Immunohistochemically Characterized Intratumoral Heterogeneity Is a Prognostic Marker in Human Glioblastoma

Cancers (Basel). 2020. 12(10):2964. *gleichwertiger Beitrag

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation entsprechen den Analysen in der oben genannten Publikation, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist. Grafiken, die in gleicher oder ähnlicher Weise bereits in der Publikation verwendet wurden, enthalten einen Verweis in der Bildunterschrift. Die Publikation findet sich am Ende der Arbeit im Anhang.

1 DANKSAGUNG

Die Dissertation ist ein Projekt, das von konstruktivem, wissenschaftlichem Austausch, von Teamarbeit und gegenseitiger Motivation begleitet war. An dieser Stelle soll Platz sein, mich bei allen zu bedanken, die diesen Weg oder einen Teil davon mit mir gegangen sind.

Der Dank an erster Stelle gilt meiner Betreuerin Priv.-Doz. Dr. med. Friederike Liesche-Starnecker, die schon im Pathologie-Seminar die Faszination an der Neuropathologie in mir geweckt hat und mich so zu dieser Arbeit brachte. Zu jeder Zeit durfte ich um wissenschaftlichen Rat fragen, bekam konstruktives Feedback und mit ihrem stets herzlichen und motivierenden Wesen konnte sie die Begeisterung für das Projekt je aufs Neue steigern. Vielen Dank für die große Unterstützung und Begleitung! Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mentorin Priv.-Doz. Dr. med. Friederike Schmidt-Graf. Durch die interdisziplinäre Betreuung gewann das Projekt an Tiefe.

Bei Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel, dem Leiter der Abteilung, der die Arbeit ermöglichte und stets mit kreativen Denkanstößen und wissenschaftlichen Erläuterungen das Projekt erfolgreich begleitete, möchte ich mich bedanken. Hervorheben möchte ich seine kollegiale und wertschätzende Teamführung, die wesentlich zum guten Arbeitsklima und Miteinander beigetragen hat. Für die freundliche Aufnahme ins Team der Neuropathologie der Technischen Universität München (TUM) und die geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit möchte ich mich bei Sandra Baur, Johanna Kempfer, M.Sc. Laura Rihani, Christian Schustetter und Emma Wu Wie bedanken sowie bei Claudia Walter, die uns in organisatorischen Angelegenheiten unterstützt hat. Besonderer Dank gelten Priv.-Doz. Dr. med. Benedikt Wiestler und M.Sc. Florian Kofler aus dem Team der Neuroradiologie, die uns in statistischen Belangen tatkräftig unterstützten.

Danken möchte ich ebenfalls meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums unterstützte, besonders meiner Schwester Johanna, die stets motivierende Worte für mich hat und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank Euch allen!

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ALDH	Aldehydehydrogenase
AoI	Area of Interest
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure /-acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GAM	Gliom Assoziierte Makrophagen
GBM	Glioblastom
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Gy	Gray
H&E	Hämatoxylin-Eosin
Iba1	Ionized calcium bindig adaptor molecule 1
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRS	Immunreaktiver Score
mc	monoklonal
Mib1	Molecular Immunology Borstel 1
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Olig2	Oligodendrocyte lineage factor 2
PAM	Partion Around Medoids
PBS	Phospat Buffered Saline
pc	polyklonal
PCA	Principal Component Analysis
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Rezeptortyrosinkinase
st	Subtyp
TAM	Tumor Assoziierte Makrophagen
TCGA	The Cancer Genome Atlas

TNF	Tumor Nekrose Faktor
TUM	Technische Universität München
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Gendersternchen *

In der vorliegenden Arbeit wurde auf geschlechtergerechte Sprache geachtet und als Form hierfür das Gendern mit dem Sonderzeichen „*“ gewählt. Dies soll alle Geschlechter symbolisieren, auch jene, die durch die Sprach- / Grammatikwahl nicht abgebildet werden können.

3 EINLEITUNG

3.1 Problemstellung

Der ursprüngliche Beiname des Glioblastoms (GBM) *multiforme* beschreibt ein zentrales Charakteristikum dieser Tumorentität: Die Heterogenität. Er stammt aus den histomorphologischen Beschreibungen der Pathologen Percival Bailey und Harvey Cushing aus dem Jahr 1926 (Bailey & Cushing, 1926), knapp 50 Jahre nachdem Rudolph Virchow erstmals den Begriff *Gliom* geprägt hatte. Schon damals habe Virchow das Tumorgewebe als auffallend bunt und polymorph beschrieben (Stoyanov & Dzhenkov, 2018).

Die Prognose des Glioblastoms ist mit einer mittleren Überlebenszeit von nur knapp einem Jahr nach Diagnosestellung infaust (Louis et al., 2016). Seit der Etablierung der kombinierten Radiochemotherapie (Stupp et al., 2005) konnte nur wenig Fortschritt im Überleben der Patient*innen erreicht werden (Nørøxe et al., 2016). Für einen optimalen Therapieerfolg gilt Homogenität als Grundvoraussetzung – eine Eigenschaft, welche das Glioblastom nicht erfüllt. Um die Ursachen für die Stagnation des Therapieerfolgs zu verstehen, ist es daher unerlässlich, die Heterogenität als zentrales Merkmal des Glioblastoms in den Fokus der Forschung zu setzen.

Ein Durchbruch in Hinblick auf die Subtypisierung von Glioblastomen gelang 2010 der Arbeitsgruppe von Verhaak. Durch molekulare Analysen konnte eine Klassifikation in vier Subtypen mit je spezifischen genomischen Alterationen etabliert werden: *Mesenchymal*, *proneural*, *klassisch* und *neural* (Verhaak et al., 2010). In den folgenden Jahren wurden diese Subtypen weiter klassifiziert und Biomarker für die einzelnen Gruppen definiert. Seither wurde die Heterogenität vielfach auf *intertumoraler* Ebene beschrieben, wobei ein Tumor einem Subtyp zugeordnet wurde. In der Analyse von Glioblastomen erkennt man jedoch, dass jeder Tumor ein heterogenes Zellmilieu aufweist und sich die Heterogenität im Besonderen *intratumoral* präsentiert. Resistenz- und Selektionstheorien des Therapieversagens setzen an diesem Punkt an. Erste Studien zeigen, dass Tumorzellen im Glioblastom verschiedene Resistenzprofile aufweisen und somit ein unterschiedliches Ansprechen auf die Therapie haben (Meyer et al., 2015; Reinartz et al., 2017). Auf Einzelzellbasis wurde die *intratumorale* Heterogenität bereits beleuchtet (Patel et al., 2014). Die Tumor- und Subtyparchitektur kann mit

diesem Verfahren nicht hinreichend beschrieben werden. Eine geeignete Methode ist beispielsweise die Immunhistochemie (IHC), mit der das Tumorgewebe in seiner Ursprungsform analysiert werden kann. Immunhistochemische Studien zur Subtypisierung existieren und zeigen gute Ergebnisse. Jedoch untersuchen sie die Heterogenität überwiegend *intertumoral* (Cinque et al., 2015; Conroy et al., 2014; Le Mercier et al., 2012; Motomura et al., 2012).

Aufgrund der hohen Wachstumsrate und schnellen Invasion kommt es zu einem fast ausnahmslosen Auftreten von Rezidiven. Die Veränderung des Tumorgewebes unter der Therapie kann Aufschluss über die Tumorphysiologie geben. In der Literatur findet man bereits Studien über Alterationen einzelner Biomarker und erste Ansätze, die Subtypenexpression im Laufe der Tumorprogression zu beschreiben (Kim et al., 2015; J. Wang et al., 2016; Wood et al., 2016). Besonders die Synopsis von *regionaler* Subtypcharakterisierung und deren Veränderung im Laufe der Tumorprogression im Sinne einer *temporalen* Heterogenität verlangt noch tiefergehender Forschung.

Die Subtypisierung von Glioblastomen ist wissenschaftlich fortgeschritten, aber noch nicht ausgereift. Ein Verständnis der Heterogenität kombiniert mit Wissen über die molekularen Mechanismen und klinischen Korrelation der Subtypen soll aus dem Verständnis der Pathophysiologie Ansätze für effizientere Therapien liefern.

3.2 Das Glioblastom

3.2.1 Epidemiologie und Tumorcharakteristika

Das Glioblastom, eine hochmaligne Neoplasie glialen Ursprungs, stellt die häufigste Form der malignen Hirntumoren im Erwachsenenalter dar, wobei Männer um den Faktor 1,2-1,46 häufiger betroffen sind als Frauen (Ohgaki & Kleihues, 2013). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren. Das sehr rasche und infiltrative Wachstum bedingt die infauste Prognose dieser Erkrankung mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 15 Monaten nach Diagnosestellung trotz kombinierter Radiochemotherapie (Louis et al., 2016). Die Fünfjahresüberlebensrate liegt bei unter 10% (Stupp et al., 2009).

Laut der world health organisation (WHO) Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) schließt die Entität Glioblastom nur noch Isocitrat-Dehydrogenase-Wildtyp (IDH-wt) Tumoren ein (Louis et al., 2021). In früheren Klassifikationen wurden zusätzlich IDH-mutierte Glioblastome unterschieden, wobei es sich molekular um verschiedene Entitäten mit weitestgehend unterschiedlichen Eigenschaften handelt. Die früher als IDH-mutierte Glioblastome beschriebenen Tumoren entstehen sekundär aus niedrig-gradigen Gliomen und treten vor allem bei jüngeren Patient*innen auf. IDH-wt Glioblastome entstehen demgegenüber *de novo* (Ohgaki & Kleihues, 2013).

Die derzeitige Standardtherapie für Glioblastompatient*innen besteht aus einer Kombination von maximaler Resektion, Hochdosis-Strahlentherapie mit 60 Gray (Gy) und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid. Durch die kombinierte Therapie konnte eine mittlere Lebensverlängerung von zwei Monaten erreicht werden. Nichts desto trotz bleibt aufgrund der aggressiven Biologie des Tumors, vor allem wegen des invasiven Wachstums die Rezidivrate hoch. Im Durchschnitt tritt ein Rezidiv bereits nach 6,9 Monaten auf (Stupp et al., 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Operation auch in der Rezidivtherapie einen Überlebensvorteil für Patient*innen bringt (Wann et al., 2018).

Die Sicherung der Diagnose eines Glioblastoms erfolgt histologisch. Für die Diagnose des Tumors müssen als Voraussetzung allgemeine Malignitätskriterien, wie Atypie der Zellkerne, Mitosen oder Veränderung der Kern-Plasma-Relation gegeben sein (siehe *Abbildung 1*). Die Zelldichte ist hoch und durch das rasche Wachstum bedingt findet man flächenhafte Nekrosen, um die sich Tumorzellen häufig palisadenartig anordnen (siehe *Abbildung 2*). Ein weiteres Kriterium für die Diagnosestellung ist die Neoangiogenese, die im Hämatoxylin-Eosin (H&E) Präparat durch girlandenförmige Gefäßneubildungen mit Endothelhyperplasie zu erkennen ist (siehe *Abbildung 3*) (Klöppel et al., 2012).

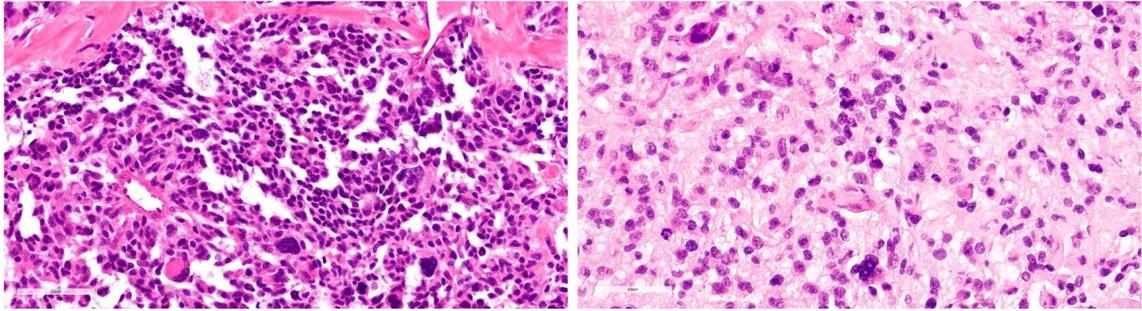


Abbildung 1: **Malignitätskriterien - Zellpolymorphie** im Glioblastom, H&E Färbung, Balkengröße = 60 µm.

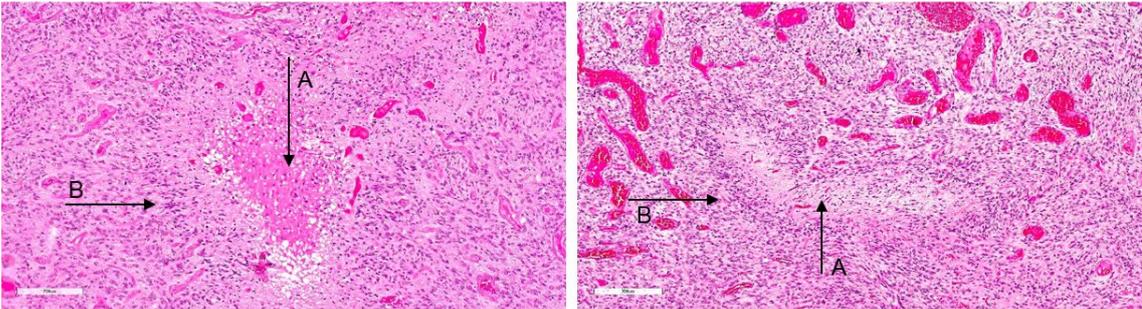


Abbildung 2: **Malignitätskriterien - Nekrose (A)** mit **palisadenartig** angereicherten Tumorzellen (B) im Glioblastom, H&E Färbung, Balkengröße linkes Bild = 200 µm, rechtes Bild = 300 µm.

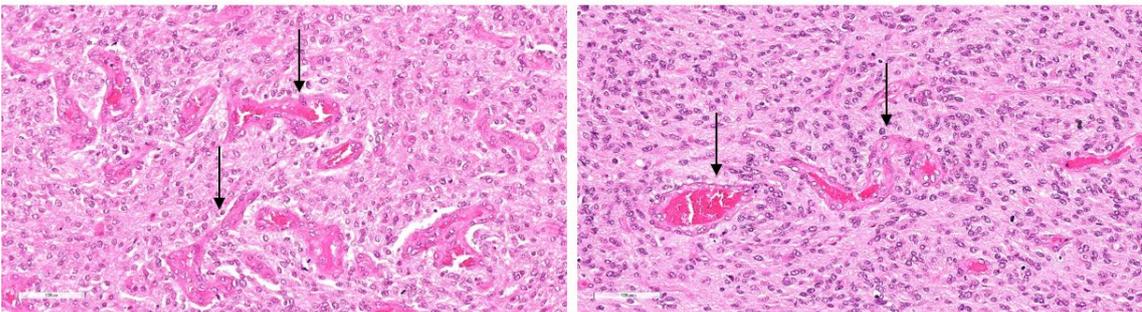


Abbildung 3: **Malignitätskriterien - Gefäßproliferate** im Glioblastom, H&E Färbung, Balkengröße = 100 µm.

3.2.2 Heterogenität

Diversität bringt einen evolutionären Vorteil – für die Menschheit und in gleicher Weise auf zellulärer Ebene in Tumoren. Tatsächlich besteht das Glioblastom aus einem heterogenen Zellensemble mit Unterschieden in Morphologie, Proliferationsrate und Resistenzen, dessen Entstehung im Folgenden erläutert werden soll:

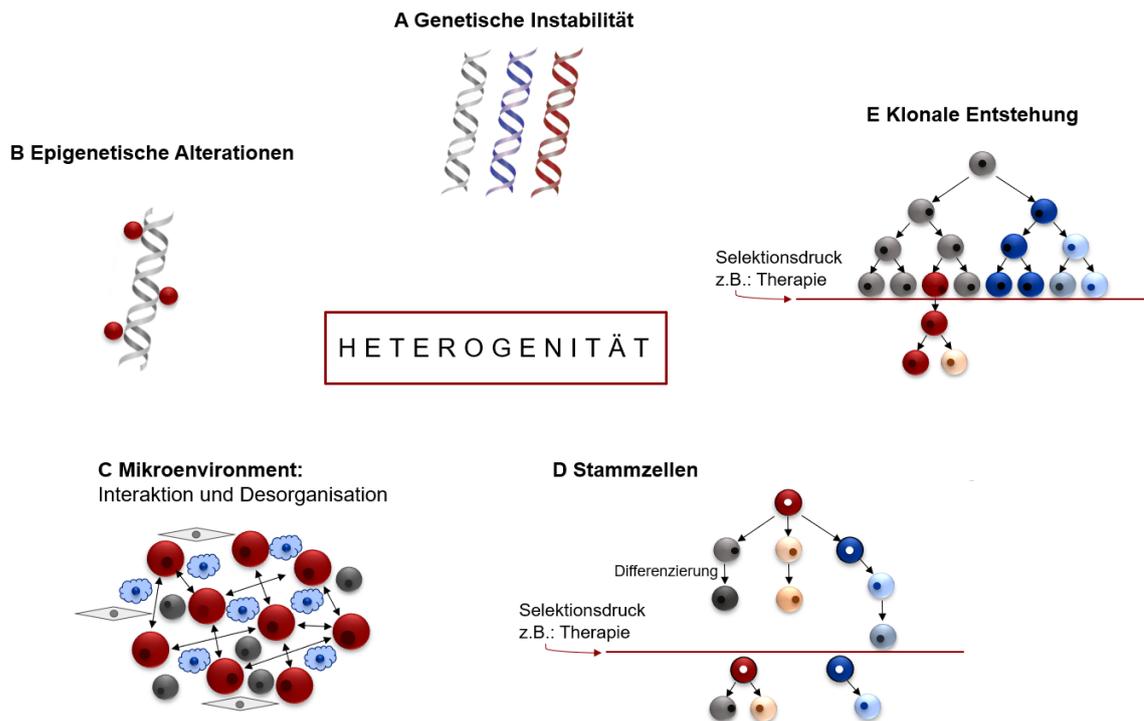


Abbildung 4: **Evolutionstheorien zur Heterogenität.** Dargestellt ist das Zusammenspiel aus den verschiedenen Faktoren, zu denen genetische Instabilität (A) und epigenetische Veränderungen an der Desoxyribonukleinsäure/-acid (DNA) (B) zählen. Das Mikromilieu des Tumors (C) beeinflusst die Tumorarchitektur auf zwei Arten, einerseits durch Interaktion mit den Tumorzellen, andererseits durch die veränderte Organisation des Zellverbandes. Veranschaulicht ist das Resultat des Selektionsdruckes: Nach der Stammzelltheorie entstehen neue Klone durch Selbsterneuerung (D), nach der Theorie der klonalen Entstehung setzt sich der stärkste Klon durch (E). Nach Rudy Bonavia et al., 2011; Marusyk et al., 2012.

Für die Evolution der Heterogenität existieren verschiedene Hypothesen (siehe *Abbildung 4*), die nicht zwangsläufig als exklusiv angesehen werden müssen, sondern durchaus ein Nebeneinander erlauben. Angelehnt an Charles Darwins Evolutionstheorien sieht die *clonal-evolution-Hypothese* Heterogenität als Resultat einer natürlichen Selektion ausgehend von einer einzigen Ursprungszelle (Nowell, 1976). Genetische Stabilität wird durch eine adäquate Reaktion auf Schäden im Erbgut gewährleistet, wie zum Beispiel durch Apoptose, DNA-Reparatur oder Zellzyklusblockade. Das Fehlen dieser Regulationsmechanismen in Tumorzellen führt zu einer genetischen Instabilität, die im Laufe der Tumorprogression begünstigt durch häufige Zellteilungen zur Akkumulation zufälliger Mutationen führt. Treten hier für den Tumor günstige Veränderung auf, kann sich ein bestimmter Klon im Zellverband ausbreiten. Die Einwirkung von Umweltfaktoren, beispielsweise durch die Therapie, kann den Mechanismus verstärken und zur Selektion eines besonders gut angepassten beziehungsweise des aggressivsten Klons führen (Bedard et al., 2013; Marusyk

et al., 2012; Merlo et al., 2006; Zhao et al., 2019). Demgegenüber steht das *Stammzellmodell*, das von einer hierarchischen Organisation des Tumorgewebes ausgeht (Shackleton et al., 2009; Singh et al., 2004). Demnach sind Tumorstammzellen für die Entstehung und Erhaltung des Tumorgewebes verantwortlich. Durch Selbsterneuerung entstehen verschiedene Tochterzellen, aus denen divergierende Subtypen resultieren können (Rudy Bonavia et al., 2011; Ho & Shim, 2017). Dass Heterogenität multifaktoriell bedingt ist, ist in der modernen Forschung weit verbreitet. Neben den beiden genannten Hypothesen tragen weitere Mechanismen zur Diversität bei. So sieht man das Tumorgewebe als komplexes Netzwerk, das eine Interaktion zwischen den einzelnen Zellpopulationen ermöglicht (*inter-clonal cooperativity*) (Lyons et al., 2008). Besonders interessant ist in diesem Hinblick die Kommunikation mit Mikrogliazellen, die eine Veränderung des Mikromilieus zugunsten des Tumorwachstums bewirkt (Dirkse et al., 2019; Ho & Shim, 2017; Shen et al., 2016). Auf phänotypischer Ebene führen unabhängig von der DNA-Sequenz epigenetische Alterationen zu Heterogenität (Wenger et al., 2019).

Die eben erläuterten Fakten sind nicht nur rein theoretisch-wissenschaftlichen Interesses, im Gegenteil, sie tragen wesentlich zur Aggressivität des Glioblastoms und zum schlechten Outcome bei. In Einzelzellanalysen konnten Unterschiede im Therapieansprechen und Resistenzprofil in Zellen ein- und desselben Tumors detektiert werden, wobei manche Tumoren sogar Unterschiede im Methylierungsprofil des Promoters der O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) als prädiktiver Marker für eine Therapie mit Temozolomid aufweisen (Meyer et al., 2015; Reinartz et al., 2017; Scorsetti et al., 2015). Von hohem Interesse in Bezug auf das Therapieansprechen ist der Vergleich von Primärtumoren zu ihren korrespondierenden Rezidiven. Unterschiede in der Biomarkerexpression lassen vermuten, dass die Therapie einen Selektionsdruck ausübt und therapieresistente Zellen zur Tumorprogression führen (Kim et al., 2015; Schäfer et al., 2019; Stark et al., 2003; J. Wang et al., 2016). Primärtumor und Rezidiv divergieren in Geno- und Phänotyp. In der Progression können sowohl Mutationen verloren gehen, als auch neue genomische Alterationen auftreten, ein Beispiel hierfür ist der Verlust von p53-Mutationen im Zuge des Krankheitsverlaufs (Kim et al., 2015). Ebenso werden Alterationen des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) vor allem in

Primärtumoren und weniger in Rezidiven gefunden (J. Wang et al., 2016). In Bezug auf die Subtypenexpression weist besonders der mesenchymale Typ eine hohe Stabilität auf; seine Expression steigt in Rezidiven im Vergleich zu Primärtumoren an (J. Wang et al., 2016; Wood et al., 2016). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die *intratumorale* Heterogenität einen wesentlichen Beitrag zum Therapieversagen in Glioblastomen liefert. Das aktuelle multimodale Therapieschema scheint nicht jeden Subtyp gleich anzugreifen, wodurch eine Selektion entsteht, die das Rezidivieren der Tumoren begünstigt. Diese Annahme unterstreicht eine Studie, die zeigen konnte, dass das Outcome umso schlechter ist, je stärker die *intratumorale* Heterogenität im Primärtumor ausgeprägt ist (Patel et al., 2014).

2006 gelang es der Arbeitsgruppe von Phillips et al., anhand von Genanalysen drei verschiedene Subtypen der high-grade Gliome (Grad III und IV) zu identifizieren: *Mesenchymal*, *proneural* und *proliferativ* (Phillips et al., 2006). Einen weiteren großen Erfolg in Hinblick auf eine Glioblastomsubtypisierung erreichte die Arbeitsgruppe von Verhaak et al., 2010. Aus Daten des *Cancer Genome Atlas* (TCGA) konnten sie eine molekulare Klassifizierung der Glioblastome in die Subtypen *mesenchymal*, *klassisch*, *proneural* und *neural* etablieren, in der jeder Subtyp durch spezifische genetische Alterationen definiert wird. Aus heutiger Sicht scheint der proneurale Subtyp, der häufig bei jungen Patient*innen auftritt und mit einem gutem Outcome korreliert (Verhaak et al., 2010), nicht den Glioblastomen, sondern IDH-mutierten Tumoren zugehörig (Klughammer et al., 2018). In früheren Versionen der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems wurden Glioblastome in IDH-mutierte und Wildtyp-Formen eingeteilt (Louis et al., 2016). Nach aktuellem Wissenstand werden IDH-mutierte Tumoren als eigenständige Entität angesehen und nicht zu Glioblastomen gezählt, wonach die Existenz eines proneuralen Subtyps fraglich ist. Die Subtypen unterscheiden sich in ihrem klinischen Outcome, wobei das schlechteste Verhalten dem mesenchymalen Typ zugeschrieben wird (N. R. Parker et al., 2016). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die heterogene Subtypenexpression nicht nur in verschiedenen Glioblastomen auftritt, sondern auch innerhalb eines*einer Patient*in und damit *intratumoral*. Diese *intratumorale* Heterogenität spielt sich einerseits auf der Ebene eines Primärtumors ab und spiegelt andererseits die individuellen Unterschiede eines

korrespondierenden Paares von Primär- und Rezidivtumor wider. Mittels Sequenzierung der Ribonucleic Acid (RNA) einzelner Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass ein einziger Tumor aus einem Konglomerat von Zellen besteht, die verschiedene Subgruppen repräsentieren (N. R. Parker et al., 2016; Patel et al., 2014; Qazi et al., 2017). Die Arbeitsgruppe der Neuropathologie der Technischen Universität München konnte mittels einer immunhistochemischen Studie pathophysiologisch unterschiedliche Subtypen definieren und deren regionales Auftreten beweisen (Bergmann et al., 2020). Die erfolgreichen Ergebnisse führten unter anderem dazu, die Forschung in diesem Bereich durch die vorliegende Arbeit zu intensivieren.

3.3 Biomarker

Die Grundlage dieser Arbeit basiert auf der Analyse verschiedener *Biomarker* im Glioblastom. Anhand der Markierung bestimmter Strukturen verknüpft mit dem Wissen über deren biologische Funktion können Rückschlüsse auf im Gewebe ablaufende Prozesse gezogen werden.

3.3.1 Biomarker zur Tumorsubtypisierung

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Biomarker dargestellt, ihre physiologische Funktion erläutert, ihre Bedeutung in Bezug auf das Glioblastom beschrieben und somit ihr Einschluss in diese Arbeit begründet.

3.3.1.1 Aldehyddehydrogenase 1A3 (ALDH1A3)

Die ALDH1A3 ist einer der 19 Subtypen der Proteinfamilie der Aldehyddehydrogenasen, welche Nicotinamidadeninucleotid (NAD)-abhängig für die Rückführung von Aldehyden in ihre ursprüngliche Carboxylsäureform (Aldehydoxidierung) verantwortlich sind (Vasiliou et al., 2013). Als ein Vertreter der drei Isoenzyme aus der Gruppe der ALDH1 (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3) ist die im Zytosol lokalisierte ALDH1A3 physiologisch im Organismus weit verbreitet; exemplarisch zu nennen sind hier die Retina, mesenchymale Zellen und Epithelzellen der Mamma. Die katalytische Aktivität des 1A3-Subtyps betrifft die Oxidierung von all-trans Retinal zu Retinsäure (Duan et al., 2016). Retinsäure bindet im Zellkern an als Transkriptionsfaktoren fungierenden Retinsäurerezeptoren. Über diesen Signalweg werden physiologisch

Zellproliferation und Differenzierung sowie Apoptose und Zellzyklusarrest reguliert (Ma & Allan, 2011). Durch die Aldehydoxidierung wirken die Enzyme der ALDH-Familie oxidativem Stress entgegen und schützen vor Zellschädigung (Marchitti et al., 2008; Raha et al., 2014).

Die ALDH1A3 ist ein Tumormarker, der bei diversen Malignomen mit einem schlechtem Outcome assoziiert ist, so auch bei höhergradigen Gliomen (Ginestier et al., 2007; Jia et al., 2013; Saw et al., 2012; Wu et al., 2020; Xu et al., 2015; W. Zhang et al., 2015). Ihr wird zugeschrieben, ein Marker für Tumorstammzellen zu sein (Mao et al., 2013; Sullivan et al., 2017). Außerdem ist sie in Glioblastomen mit dem aggressiven mesenchymalen Subtyp assoziiert. Diskutiert wird ein Beitrag zur mesenchymalen Transformation während der Tumorprogression und Rezidiventwicklung (Li et al., 2018; Mao et al., 2013; W. Zhang et al., 2015). Die Rolle der ALDH1A3 in der Antwort auf oxidativen Stress lässt sie als therapeutisches Target interessant werden. Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) induzieren Lipidperoxidation. Bei diesem Prozess werden zytotoxische Aldehyde frei, die zum Zelltod führen. Aldehyddehydrogenasen, wie die ALDH1A3, reduzieren diese zu ihren weit weniger reaktiven korrespondierenden Säuren, wodurch Schäden an der DNA verhindert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass in Anwesenheit von ALDH das Tumorgewebe widerstandsfähiger ist und Therapeutika, wie zum Beispiel das Zytostatikum Temozolomid, ihre Wirkung weniger entfalten können (Mao et al., 2013; Raha et al., 2014; Wu et al., 2020).

3.3.1.2 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

Als Biomarker für Tumoren glialen Ursprungs und Bestandteil der Routinediagnostik eines Glioblastoms ist GFAP (siehe *Abbildung 5*) ein unabdingbarer Marker für diese Forschungsarbeit (Klöppel et al., 2012).

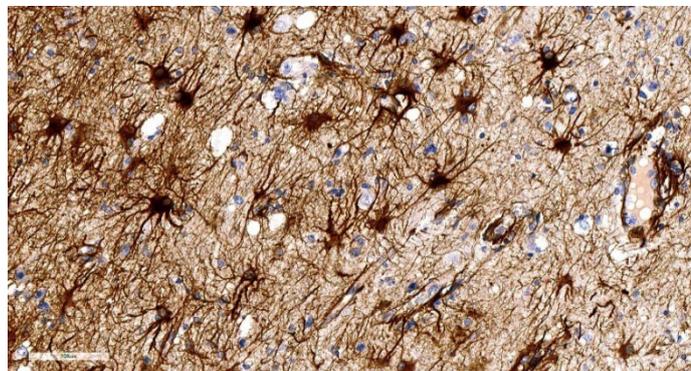


Abbildung 5: **Reaktive Astroglia**, Immunhistochemische Färbung mit GFAP, Balkengröße 100 µm.

Das saure Gliafaserprotein ist ein astrozytäres Intermediärfilament, das als Hauptbestandteil reifer Astrozyten deren Migration und Motilität beeinflusst (Moeton et al., 2014; Tan et al., 2016). Weitere wichtige Funktionen sind die Aufrechterhaltung der Ionen-, Neurotransmitter- und Wasserhomöostase sowie die Eingliederung in neuronale Kommunikation, die über Langzeitpotenzierung den Weg für synaptische Plastizität, Lernen und Gedächtnis bereitet (Middeldorp & Hol, 2011; Wilhelmsson et al., 2019). Als Antwort auf Schädigungen im ZNS reagieren Astrozyten initial mit Hypertrophie, Proliferation und einer GFAP-Vermehrung. Die entstehende reaktive Glia ist zum Beispiel bei neurodegenerativen Erkrankungen aber auch in Tumoren zu finden, wo sie häufig als Demarkierung zirkulär um die Läsion angeordnet ist und eine neuroprotektive Wirkung auf akuten Stress sowie Gewebszerstörung zu haben scheint. Für reaktive Zellen existieren jedoch verschiedene Aktivitätszustände, die ebenso eine schädliche Wirkung vermuten lassen (ungewollte Synapsen, die zu Epilepsie führen, Ausschüttung von Neurotoxinen etc.) (Faulkner et al., 2004; Liddel & Barres, 2017).

Es konnte ein Zusammenhang zwischen GFAP-positiven Tumorzellen und Invasion nachgewiesen werden (Herpers et al., 1984). In Mausmodellen wurde gezeigt, dass GFAP-positive Tumoren ein aggressives Wachstum indizieren (Irvin et al., 2017).

3.3.1.3 YKL-40 (Chitinase-3-like protein 1)

Angiogenese beschreibt den Prozess neuer Gefäßbildung, charakterisiert durch die Migration und Proliferation von Endothelzellen sowie die Rekrutierung von Perizyten und Muskelzellen, die für die Gefäßstabilität verantwortlich sind. Pathologische Gefäßproliferate sind neben dem Nachweis von Nekrosen ein histologisches Merkmal für Glioblastome (Klöppel et al., 2012). Der Biomarker YKL-40 alias Chitinase-3-like protein 1 ist ein wichtiger Spieler in angiogenetischen Signalwegen (Francescone et al., 2011; R. Shao et al., 2009).

Als eines der am stärksten induzierten Gene in Glioblastomen (Qin et al., 2017; Tanwar et al., 2002) ist YKL-40 neben der Angiogenese auch an anderen protumorösen Prozessen beteiligt. Ein erhöhter Serumspiegel bei Tumorpatient*innen korreliert mit Invasivität und gesteigerten Rezidivraten (Qin

et al., 2017), was unter anderem auf das komplexe Zusammenspiel mit Endothelzellen, Perizyten und Tumorzellen zurückgeführt wird. Hierbei aktiviert YKL-40 in Endothelzellen Signalwege, die für Zellmigration und Angiogenese verantwortlich sind, in Perizyten wird die Zelladhäsion und Permeabilität beeinflusst und in Glioblastomzellen werden Kaskaden aktiviert, die vor Apoptose im Rahmen einer Strahlentherapie schützen (Junker et al., 2005; Rong Shao et al., 2015). Der Marker korreliert zudem mit einem kürzerem Überleben (Francescone et al., 2011; Steponaitis et al., 2016), wobei hohe YKL-40-Plasmaspiegel ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor sind (Boisen et al., 2018). YKL-40 fungiert als Marker für den mesenchymalen Subtyp (Sharma et al., 2017; Verhaak et al., 2010).

3.3.1.4 Epidermal Growth Factor Receptor

Invasion, Proliferation und abnorm gesteigerte Angiogenese zählen zu den Hauptcharakteristika von Glioblastomen. Als pathologisch gesteigerte Mechanismen sind sie unter anderem für die hohe Letalität des Glioblastoms verantwortlich. Eine wesentliche Rolle in den Signalwegen spielt EGFR, ein Biomarker, der in den letzten Jahren unter anderem wegen seiner möglichen Eignung als Target zielgerichteter Therapien in den Fokus der Forschung geraten ist (R. Bonavia et al., 2012; Keller & Schmidt, 2017; Padfield et al., 2015). Als sehr heterogen exprimiertes Antigen und weiterer Repräsentant der Glioblastomdiversität (Furnari et al., 2015; Gill et al., 2014; Sottoriva et al., 2013) ist die Detektion und Visualisierung der EGFR-Expression in dieser Arbeit von hohem Interesse.

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ist eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) der ErbB-Familie (Her1= EGFR, Her2, Her3, Her4). RTKs weisen stets eine extrazelluläre Ligandenbindestelle, eine hydrophobe, transmembranäre Domäne und eine intrazellulär gelegene Tyrosinkinase auf. Bindet ein Ligand, kommt es über eine Phosphorylierung des intrazellulär gelegenen Anteiles und der Rekrutierung intrazellulärer Proteine zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel im Integrin-, WNT-, JAK/STAT- oder dem PI3K/Akt/mTOR Signalweg (Olayioye et al., 2000).

Unter den pathologischen Veränderungen des EGF-Rezeptors ist die Amplifikation am häufigsten zu finden. Daneben sind Punktmutationen im Gen zu beobachten. Bei der Variante EGFRvIII, die etwa zu 30% in hochmalignen Gliomen vorliegt (Gan et al., 2009), führt der Verlust der ligandenbindenden Domäne zu einer konstitutiven Rezeptoraktivierung (Huang et al., 1997; Keller & Schmidt, 2017). Die Freisetzung verschiedener Proteasen führt zur Degradierung der extrazellulären Matrix und ermöglicht auf diese Weise die Migration der Tumorzellen. Im Migrationspotential von Glioblastomen konnte eine phänotypische Heterogenität entdeckt werden, die mit dem EGFR-Amplifikationsstatus korreliert (J. J. Parker et al., 2018). Die heterogene Expression von EGFR konnte auch die Arbeitsgruppe von Verhaak nachweisen. In dieser Subtypisierung charakterisiert eine Hochregulierung von EGFR neben anderen Markern den klassischen Typ (Verhaak et al., 2010). Die *intratumorale* Heterogenität der EGFR-Expression wird wegweisend als Ursache für den bisher ausbleibenden Erfolg in spezifischen Therapien gesehen (Padfield et al., 2015).

3.3.1.5 Oligodendrocyte lineage factor 2 (Olig2)

Olig2 ist ein in Stammzellen exprimierter Transkriptionsfaktor des ZNS (Suvà et al., 2014; Trépant et al., 2015), dessen untergeordnete Signalwege eine wichtige Rolle für die Proliferation von Stammzellen spielen. Proliferation und Überleben von Tumorzellen beruhen hierbei auf ähnlichen Signalwegen wie in den frühen Phasen der Organogenese (Ligon et al., 2007). In der Entwicklung des ZNS stellt der mit einer basic helix-loop-helix Struktur ausgestattete Transkriptionsfaktor die Weichen für die Spezifizierung von Progenitorzellen in neurale Subtypen (Motoneurone, cholinerge Neurone oder Oligodendrozyten) (Emery et al., 2014). Eine Schlüsselrolle von Olig2 ist hierbei die Aufrechterhaltung des replikationskompetenten Status der Progenitorzellen (Lee et al., 2005).

Im Tumor inhibiert Olig2 den Tumorsuppressor p21, der für die Hemmung der Stammzellproliferation verantwortlich ist (Ligon et al., 2007; Tsigelny et al., 2016). Auf diesem Wege fördert Olig2 die Tumorbildung und das Wachstum (Lu et al., 2016). Der Biomarker wird auch im Zusammenhang mit Subtypenplastizität erwähnt. Eine experimentelle Olig2-Deletion führte zu einem Shift von einem proneuralen zu einem Astrozyten-assoziierten klassischen Subtyp (Hochregulierung von EGFR) (Kupp et al., 2016; Lu et al., 2016).

3.3.1.6 p53

Den Beinamen *Wächter des Genoms* trägt p53 nicht ohne Grund. Eingegliedert in Signalwege der Zellzyklusregulation trägt der Tumorsuppressor p53 zur Homöostase zellulären Wachstums und zur Reparatur von DNA-Schäden bei. In diesem Zusammenhang spielt er eine zentrale Rolle in der Verhinderung maligner Prozesse. In etwa der Hälfte aller Tumoren finden sich Alterationen in der Funktion von p53 und den zugehörigen Signalwegen (Khoo et al., 2014), so auch in etwa 25% der primären Glioblastome (Karsy et al., 2013).

Als Tumorsuppressorgen und Transkriptionsfaktor ist p53 in ein komplexes System verschiedener Signalwege involviert und reguliert über eine Blockade des Zellzyklus Differenzierung und Apoptose von (DNA-geschädigten) Zellen (Khoo et al., 2014). P53-Mutationen werden eingeteilt in *loss-of-function*, *gain-of-function* und *dominant-negativ-function* Mutationen. Bei Letzteren wird die antitumoröse Aktivität der Wildtypform herabreguliert. Bei p53 *loss-of-function* Mutationen kommt es zum Verlust inhibitorischer Signale auf das Zellwachstum und zur unkontrollierten Zellproliferation (Karsy et al., 2013; Ludwig & Kornblum, 2017). Als Tumorsuppressorgen ist eine *gain-of-function* Mutation zunächst irreführend. Sie führt unter anderem über Zunahme von Proliferation und genetischer Instabilität zum Tumorwachstum (C. Zhang et al., 2020). Zusätzlich zu den direkten Mutationen von p53 kann in Glioblastomen auch der Signalweg verändert sein, zum Beispiel die Amplifikation des negativen Regulierungsgens MDM2 (Network et al., 2008).

Verhaak et al. erwähnen p53 im Zusammenhang mit dem sogenannten proneuralen Subtyp, der in ihrer Forschung primär durch eine IDH-Mutation charakterisiert wird (Verhaak et al., 2010). Da nach aktuellem Wissenstand eine IDH-Mutation nicht mit der Diagnose eines Glioblastomen vereinbar ist, ist diese Zuordnung nicht mehr zeitgemäß. Ein Verlust der p53 Expression im Laufe der Tumorprogression (Rezidiv versus Primärtumor) ist ein interessantes Beispiel für das Vorliegen einer *intratumoralen* Heterogenität (Kim et al., 2015). Diese Beobachtung und das Interesse, welchen Subtyp von primären Glioblastomen p53 tatsächlich charakterisiert, sind die Beweggründe für die Aufnahme dieses Biomarkers in unsere Forschung.

3.3.1.7 CD44

CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das physiologisch Zellmotilität, die Entwicklung des ZNS und synaptische Plastizität beeinflusst. Diese Funktion erlangt es durch seine Gestalt als transmembranäres Glykoprotein, dessen intrazelluläre Domäne an Komponenten des Zytoskeletts bindet, während der extrazelluläre Teil ein Rezeptor für diverse Proteine der extrazellulären Matrix ist. Unter anderem interagieren Hyaluronsäure und Osteopontin mit CD44 (Mooney et al., 2016).

CD44 ist in zahlreichen Tumoren vermehrt exprimiert. In Glioblastomen scheint CD44 durch seine Funktion als Adhäsionsmolekül für invasives Wachstum verantwortlich zu sein und korreliert mit Metastasierung und Aggressivität (Brown et al., 2017; Pietras et al., 2014). CD44 zeigt eine Assoziation zum mesenchymalen Subtyp (Brown et al., 2015; Phillips et al., 2006). Die Einflussnahme auf das Überleben wird kontrovers diskutiert, obwohl die meisten Studien eine Assoziation mit einem schlechtem Outcome beschreiben (Brown et al., 2015; Grigorieva et al., 2017; Guadagno et al., 2016; Nishikawa et al., 2018; Tsidulko et al., 2017).

3.3.2 Marker mit Aussage zum Tumorwachstum und des Microenvironments

3.3.2.1 Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)

Neben den Tumorzellen findet man in Glioblastomen ausgeprägte Immuninfiltrate. Zu den Tumor assoziierten Makrophagen (TAM) zählen vor allem Makrophagen und Mikrogliazellen, die gemeinsam mit den Glioblastomzellen ein komplexes Milieu kreieren, das die Adaptationsfähigkeit von Tumoren fördert und den Tumorzellen Platz für Wachstum und Verbreitung schafft. Im Mittel sind 30 - 40% der zellulären Tumorbestandteile TAM, wodurch sie das heterogene Erscheinen des Glioblastoms wesentlich mitprägen (Chen & Hambardzumyan, 2018; See et al., 2015).

Das ionized calcium bindig adaptor molecule 1, kurz Iba1, dient der Detektion dieser interessanten Zellpopulation (siehe *Abbildung 6*). Die phagozytierenden Zellen des Gehirns entstammen verschiedenen Ursprungs: Unterschieden wird zwischen den

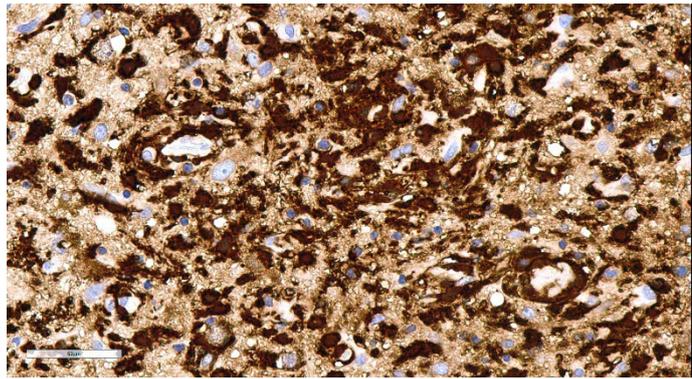


Abbildung 6: Glioblastomgewebe mit starker **Iba1-Expression**, Immunhistochemische Färbung mit Iba1, Balkengröße 60 μm .

im Gehirn residenten Mikrogliazellen und den aus dem Knochenmark über Chemokinsekretion angelockten und über die Zirkulation einwandernden Monozyten (Chen et al., 2017). Als Hauptimmunzellen des ZNS sind sie physiologisch für Homöostase verantwortlich und werden anhand ihres Polarisationsprofils in M1 (pro-inflammatorisch und anti-tumorös) und M2 (anti-inflammatorisch und pro-tumorös) klassifiziert (Poon et al., 2017). Die dem M1 Typen angehörigen Zellen nehmen eine protektive, antitumoröse Rolle ein. Durch die Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine wirken sie zytotoxisch gegen Mikroben, sind für Phagozytose und Tumorüberwachung zuständig. Der M2 Typ ist immunsuppressiv. Physiologischerweise ermöglichen die anti-inflammatorischen Zytokine eine Wundheilung durch Remodelling und Angiogenese. Im Tumor sind es genau diese Funktionen, die supportiv für dessen Progredienz wirken (Coniglio & Segall, 2013; Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Poon et al., 2017).

Physiologisch herrscht ein Gleichgewicht zwischen oben genannten Funktionen, wodurch sie ihrer zugeordneten Rolle als Wächter des Immunsystems im ZNS nachkommen können. Nach aktuellen Forschungsergebnissen ist im Tumor genau diese Funktion eingeschränkt und TAMs fördern das Tumorstadium durch ihre proangiogenetische und immunsuppressive Wirkung (Aloisi et al., 2000; Grauwet & Chiocca, 2016). Hierbei scheinen TAM und Tumorzellen miteinander zu kommunizieren. Die Tumorzellen machen sich die plastische Eigenschaft zunutze und induzieren - vermutlich durch Inhibition der Caspase 3 (Kurpius et al., 2007; Shen et al., 2016) eine Transformation zum tumorsupportiven M2 Phänotypen (Annovazzi et al., 2018; Oushy et al., 2018; van der Vos et al., 2016). Durch eine Herabregulierung von Tumornekrosefaktor α

(TNF α), einer Induktion immunsuppressiver Zytokine (IL-10, TGF β) (Chen & Hambardzumyan, 2018; Kostianovsky et al., 2008) und T-Zell Apoptose entsteht ein immunsuppressives Milieu, das den Tumorzellen optimale Wachstumsbedingungen bietet (Rodrigues et al., 2010; Schiffer et al., 2017).

Neben der immunsuppressiven Wirkung fördern Mikrogliazellen und Makrophagen durch ihre angiogenetische und invasive Wirkung, sowie der Sezernierung von Wachstumsfaktoren Zellproliferation und Migration (Coniglio & Segall, 2013; Sarkar et al., 2013). Die Iba1-Expression und damit das Vorkommen von Mikrogliazellen und Makrophagen zeigt eine Subtypenassoziation mit dem mesenchymalen Typen. Außerdem ist eine stärkere Expression im Rezidivtumor beschrieben (Q. Wang et al., 2017). Die Anzahl der TAM steigt mit der Malignität des Glioms. Auffallend ist ebenso die heterogene Expression; eine besonders hohe Iba1-Anreicherung findet sich in der perivaskulären Nische und den perinekrotischen Pseudopallisaden (Sørensen et al., 2017).

Aufgrund der zahlreichen immunologisch wichtigen und pro-tumorösen Signalwege, an denen TAM beteiligt sind, sind sie in den letzten Jahren vermehrt in den Blick von neuen Therapieansätzen gerückt (Coniglio & Segall, 2013; Poon et al., 2017; Q. Wang et al., 2017). Nicht nur deswegen, sondern vor allem aufgrund des so hohen Prozentsatzes der zellulären Tumorbestandteile, scheint eine Bestätigung der Subtypenzuordnung von Mikrogliazellen und Makrophagen essentiell.

3.3.2.2 Molecular Immunology Borstel 1 (Mib1)

Der Marker Mib1 ermöglicht die Visualisierung des Proteins Ki-67 und somit die Darstellung proliferativer Zellen in der Interphase des Zellzyklus. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen proliferierenden und nicht wachsenden Tumorarealen. In der Diagnostik werden neben weiteren Kriterien Proliferationsindices für die Graduierung von Gliomen verwendet, eine höhere Proliferationsrate geht mit einem höheren Tumorgrad einher (Johannessen & Torp, 2006). Mib1 gilt jedoch nicht als unabhängiger Prognosemarker innerhalb eines Tumorgrades (z.B.: Grad IV-Glioblastom) (Alkhaibary et al., 2019; Grigorieva et al., 2017). Wie es die Glioblastombiologie schon beinahe erwarten

lässt, zeigt Mib1 eine heterogene Expression mit starker Anreicherung um Nekroseareale und pathologische Blutgefäße (Lebelt et al., 2016). Ob es eine Subtypenassoziation gibt, sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden.

3.3.2.3 p62

Alternative Wege zum Energiegewinn gewährleisten eine zelluläre Homöostase und Überleben in Stresssituationen. Hierfür sind Zellen in der Lage, eigene Proteine und Organellen zu recyceln und dadurch das Energielevel der Zelle zu erhalten. Dieser Vorgang ist bekannt als unselektive Autophagie. Demgegenüber steht die selektive Autophagie, bei der nicht mehr benötigte (z.B.: falsch gefaltete Proteine) oder schädliche Stoffe (z.B.: intrazelluläre Bakterien) eliminiert werden (Galluzzi et al., 2014; Mizushima et al., 2008). Die zu verarbeitenden Substanzen werden in zytosolische Vakuolen, den Autophagosomen, aufgenommen, die anschließend mit Lysosomen fusionieren, in denen durch Hydrolasen die Degradierung erfolgt (Gozuacik & Kimchi, 2004).

P62 (= Sequestom 1) ist ein Rezeptor für Autophagie. Er wird selbst durch Autophagie degradiert; infolge akkumuliert er in der Zelle, wenn Autophagie inhibiert wird. Dieser Mechanismus macht p62 zum Indikator für Autophagie (Komatsu & Ichimura, 2010). Von besonderem Interesse ist die Rolle von autophagischen Prozessen in Tumoren. Der ansonsten für die Zelle positive Prozess wendet sich hier zum Gegenteil. Therapien und schnelles Tumorwachstum führen zu Stresssituationen und Nährstoffmangel in den Tumorzellen. Autophagie könnte durch den Energiegewinn in den Tumorzellen eine überlebens- und somit resistenzfördernde Rolle spielen (Hombach-Klonisch et al., 2018). In der Immunhistochemie muss man einige Besonderheiten beachten, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. P62 zeigt eine positive Anfärbung sowohl im Kern, diffus und als Punkte (*dot-like*) im Zytoplasma. Die Arbeitsgruppe von Schläfli et al., 2014 spricht sich dafür aus, dass das sogenannte *dot-like staining* den Autophagosomen entspricht. Trotz dieser nicht einfachen Auswertung haben wir uns entschlossen, p62 aufgrund seines interessanten Bezugs zum Glioblastom in diese Forschung aufzunehmen.

3.3.2.4 MGMT

Der Methylierungsstatus des Promotors der O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase in Glioblastomen ist ein wichtiger Prognosefaktor. MGMT kann als Reparaturenzym verstanden werden, das durch alkylierende Chemotherapeutika induzierte Schäden an der DNA behebt und somit das Ansprechen auf die Therapie vermindern könnte (Hegi et al., 2005).

Der Methylierungsstatus des Promotors des MGMT-Gens reguliert dessen Expression (Nakagawachi et al., 2003). Eine Hypermethylierung führt zu einer reduzierten Ausbildung des Proteins, wonach Patienten mit methyliertem MGMT Promotor besonders von der Therapie mit Temozolomid profitieren (Hegi et al., 2005). Der MGMT Status ist somit zur Vergleichbarkeit von Überlebensanalysen von Nöten und wurde in der vorliegenden Arbeit an allen Tumoren, von denen Überlebensdaten vorhanden sind, bestimmt.

3.4 Zielsetzung

Trotz multimodaler Therapie und moderner medizinischer Technik kann die Komplexität des Glioblastoms bislang nicht überwunden werden und die Prognose ist weiterhin infaust. Mit dieser Arbeit soll die Pathophysiologie des Tumors untersucht werden, um Gründe für das Therapieversagen herauszufinden und den Weg für zukünftige zielführende Therapien zu ebnen.

Der Schlüssel hierzu ist die Heterogenität auf *intratumoraler* Ebene, auf die der Fokus dieser Arbeit gesetzt ist. In einem ersten Schritt sollen durch die Untersuchung der Glioblastome im vorliegenden Kollektiv und dem Vergleich mit aus der Literatur bekannten Eigenschaften verschiedene Subtypen definiert werden. Anschließend soll untersucht werden, ob tatsächlich unterschiedliche Subtypen in einem Tumor nebeneinander vorliegen. Einen essentiellen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie birgt neben dieser *regionalen Heterogenität* die Entwicklung der Subtypenausprägung im Laufe der Tumorprogression, die sogenannte *temporale Heterogenität*. Die Untersuchung von Primärtumoren und korrespondierenden Rezidiven soll entscheidende Ergebnisse in Bezug auf mögliche subtypenspezifische Resistenzmechanismen beziehungsweise Resultate eines Selektionsdrucks liefern. Nicht minder

erkenntnisbringend ist die Korrelation der Forschungsergebnisse mit klinischen Überlebensdaten, die Auskunft über die Relevanz für Betroffene geben soll.

Können mit der vorliegenden Arbeit Erkenntnisse erbracht werden, so ist es für den universalen Einsatz von Nöten, dass die verwendete Methodik in der Routinediagnostik durchgeführt werden kann. Die Immunhistochemie soll als geeignetes Mittel aufgezeigt werden, da sie nicht bloß ein etabliertes und ökonomisch günstiges Verfahren darstellt, sondern Proteine in ihrer natürlichen Lokalisation nachweist und deren Integrität im Zellverband visualisiert, was eine Beurteilung der Tumorarchitektur zulässt und die regionale Heterogenität in den Fokus nimmt. Zusätzlich sollen mit Methylierungsanalysen die Ergebnisse verifiziert und eine mögliche epigenetische Komponente der Heterogenität detektiert werden.

Die Zusammenführung von Subtypencharakteristika (Biomarkerprofil und potenzielles Zusammenspiel), regionaler und temporaler Betrachtung der Heterogenität auf Protein- und epigenetischer Ebene, sowie die Korrelation mit dem Überleben soll einen Fortschritt zum Verständnis der Biologie von Glioblastomen bringen und Ansätze für eine erfolgreiche Therapie aufzeigen.

4 METHODEN UND MATERIAL

4.1 Patient*innenkollektiv

Das Kollektiv besteht aus Tumoren von 38 Patient*innen, von denen für 21 korrespondierende Primärtumor-Rezidivpaare existieren. Für 17 Patient*innen ist nur der Primärtumor vorhanden. Die Tumoren wurden in der Neurochirurgie des Klinikums rechts der Isar in den Jahren 2011-2017 operiert. Die histopathologische Diagnostik erfolgte durch die Neuropathologie der Technischen Universität München. Es handelt sich ausschließlich um IDH-wt Glioblastome, die für diese Studie nach der vierten Ausgabe der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems von 2016 als solche reevaluiert worden sind (Louis et al., 2016).

4.2 Ethikvotum

Artikel 27 aus dem Bayrischen Krankenhausgesetz ermöglicht eine anonymisierte Auswertung von Patient*innendaten zu wissenschaftlichen Zwecken. Die Studie folgt den Standards der Helsinki Deklaration von 1975 und seiner neuesten Erweiterungen und wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München geprüft und freigegeben (Referenznummer 164/19 S).

4.3 Gewebepreparation

Die von der Abteilung der Neurochirurgie resezierten Gewebeproben wurden in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE). Die Fixierung dient der Konservierung des ursprünglichen Zustands von Gewebeeigenschaften. Sie verhindert den Gewebszerfall und erleichtert das Schneiden zum Auftragen auf Objektträger. Vor dem Ausgießen mit Paraffin wurde dem Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe Wasser entzogen, wodurch die benötigte Härte erlangt wurde (Sobotta & Welsch, 2009). Die eben erläuterten Schritte wurden von Mitarbeitern des neuropathologischen Instituts nach Erhalt der Operationspräparate durchgeführt.

Für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz muss das Gewebe in 2µm dünnen Schnitten auf Objektträger aufgetragen werden. Diese wurden selbstständig mithilfe eines Mikrotoms angefertigt. Anschließend wurden die

Schnitte in ein Wasserbad überführt und von dort auf die Objektträger aufgezogen. Nach vollständiger Trocknung bei Raumtemperatur konnte mit der Färbung begonnen werden.

4.4 Immunhistochemie

4.4.1 Methode und Grundlagen

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zur Detektion von Antigenen in einem Gewebe. Der dadurch erlangte Nachweis zellulärer Strukturen *in loco* eröffnet vielfältige Rückschlüsse über das untersuchte Protein. So können Aussagen bezüglich der Lokalisation in der Zelle (Zytoplasma, Kern, Membran) getroffen, benachbarte Strukturen bestimmt und nicht zuletzt die Expression von bestimmten Markern im Wachstumsverband analysiert werden.

Die Immunhistochemie nahm ihren Anfang, als 1941 Professor Albert H. Coons und seine Arbeitsgruppe Streptokokkus pneumoniae in Gewebsschnitten mittels einer Antikörper- und Fluoreszinfarbreaktion detektierten (Coons et al., 1941). Bis zu der Form, wie sie heute verwendet wird, dauerte es noch einige Jahre, aber Coons hat mit seiner Forschung den Grundbaustein für die Entwicklung dieser wichtigen Methode gelegt. Heute bedient man sich unterschiedlicher Verfahren, die alle demselben Prinzip folgen: Zugrunde liegt die Affinität eines Antikörpers zu einer bestimmten Aminosäuresequenz des gesuchten Antigens. An diesen, auch als *Epitop* bezeichneten Bereich, bindet der jeweilige Primärantikörper spezifisch nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Die Ausbildung dieses Antigen-Antikörper-Komplexes ist die Basis für den immunhistochemischen Nachweis biologischer Gewebestrukturen. Um von der ersten spezifischen Bindung zum mikroskopierfertigen Schnitt zu gelangen, muss der biochemische Vorgang visualisiert werden. Hierfür stehen zwei Varianten zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist die *direkte Methode*, bei der ein fluoreszierender Farbstoff an den Primärantikörper gekoppelt ist und die Antigen-Antikörper-Verbindung sichtbar werden lässt. Bei der *indirekten Methode* erlangt man über einen weiteren Antikörper (sogenannter Sekundärantikörper), der an den Primärantikörper bindet und mit einem Enzym (z.B.: Peroxidase) gekoppelt ist, eine Signalverstärkung. Durch eine Farbreaktion entsteht am Ort des Antigen-Antikörper-Komplexes ein im Lichtmikroskop erkennbarer Farbniederschlag. Zur Orientierung und Einordnung von positiv gefärbten Zellen ist der letzte Schritt die

Gegenfärbung. Für die Lichtmikroskopie wird Hämalaun zur Kernfärbung genutzt. In dieser Arbeit wurde die sogenannte *Avidin-Biotin-Complex* (ABC) Methode verwendet (siehe *Abbildung 7*).

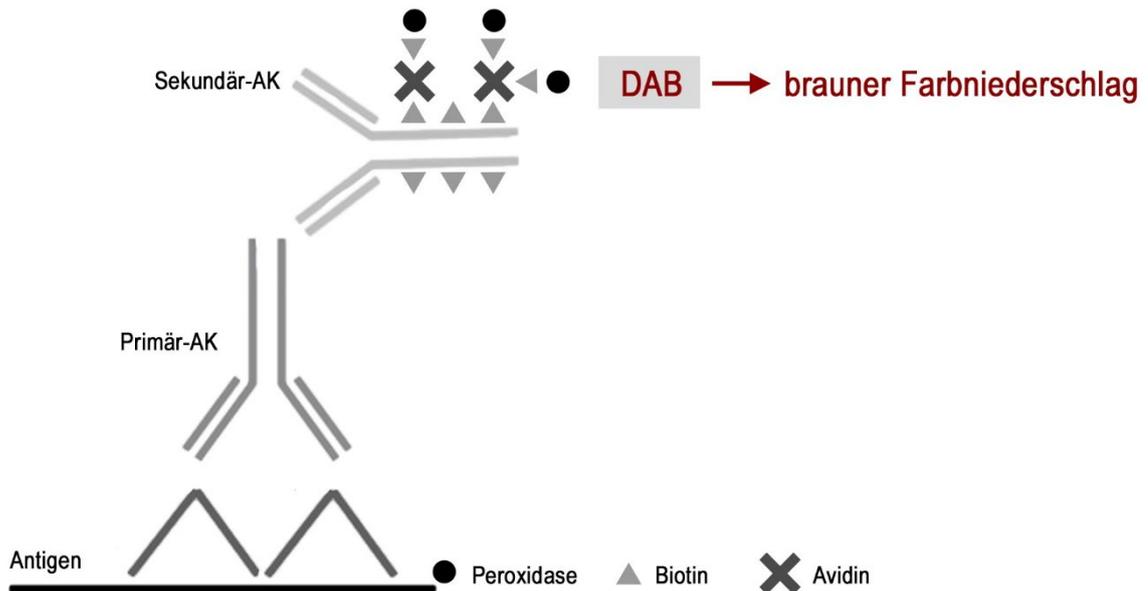


Abbildung 7: **ABC-Methode** in der Immunhistochemie angelehnt an (Renshaw, 2017) .

Hierbei wird nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper die ABC-Lösung hinzugefügt. Das Coenzym *Biotin* kann an Antikörper binden, in diesem Fall an den Sekundärantikörper (= Biotinylierung) und hat eine hohe Affinität zu Avidin - ein Glykoprotein mit vier Bindungsstellen. Eine dieser Bindungsstelle gilt dem Biotin des Sekundärantikörpers, die andere einem an Biotin-gekoppeltem Enzym, der Peroxidase. Damit stellt Avidin eine Brücke für die Fortleitung der Reaktion dar. Durch Hinzufügen des Chromogens Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) wird die Reaktionskette vervollständigt und die Antikörperbindung sichtbar: Als Substrat der Peroxidase bildet DAB einen alkoholunlöslichen braunen Farbstoff (Lang, 2013; Renshaw, 2017; Sobotta & Welsch, 2009).

4.4.2 Arbeitsschritte

Zuerst wurden die Schnitte aufgrund der chemischen Eigenschaften der Färbelösung (hydrophil) mit Xylol entparaffiniert. Die erneute Rehydrierung erfolgte durch die absteigende Alkoholreihe in Isopropanol, Ethanol und zum

Schluss destilliertem Wasser, wobei ab diesem Schritt eine Austrocknung vermieden werden muss. Hierfür hielt man sich an folgende Zeitangaben:

Absteigende Alkoholreihe	
3x5 Minuten in	Xylol
2x3 Minuten in	Isopropanol
2x5 Minuten in	96% Ethanol
1x5 Minuten in	70% Ethanol
1x5 Minuten in	Aqua dest.

Tabelle 1: Zeitangaben **Alkoholreihe**

Nach der Alkoholreihe wurden die Schnitte zur Antigen-Demaskierung 30 Minuten im Citratpuffer mit einem pH von 6,0 gekocht. Auf diese Weise werden bei der Formaldehydfixierung entstandene Proteinvernetzungen gelöst. Die Schnitte wurden anschließend mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen und das Gewebe mit einem Fettstift umrahmt, um eine sichere Platzierung des Antikörpers zu gewähren. In einem nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase durch eine zehnmütige Inkubation in 10%-igem Wasserstoffperoxid blockiert, gefolgt von einem erneuten mehrmaligen Waschgang in destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten in einer Feuchtkammer mit Blocking Buffer und Avidin bedeckt. Nach zweimaligem Waschen in Phosphat Buffered Saline (PBS) folgte die Inkubation mit Biotin und dem Primärantikörper, die über Nacht bei 4° C auf dem Schnitt belassen wurden. Alle anderen Inkubationen – sofern nicht anders erwähnt – erfolgten bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper auf die Objektträger aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und es folgte die Benetzung mit dem vorbereiteten und bereits angesetzten ABC Kit Vektor. Die Immunreaktion wurde nach einem erneuten Waschgang mit dem Färbemittel DAB sichtbar gemacht. Zur Differenzierung der Morphologie wurde das Gewebe mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Als letzter Schritt folgte die aufsteigende Alkoholreihe zum Dehydrieren mit Abschluss in Xylol. Anschließend wurden die fertig gefärbten Objektträger mit Pertex-Eindeckmedium eingedeckt und ein Schutzglas befestigt.

Die Färbungen von CD44, EGFR, GFAP, Iba1, Olig2, p53 und Mib1 wurden mit einem voll automatischen maschinellen System durchgeführt (Ventana BenchMark ULTRA; Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA). Zunächst wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung in einer Lösung mit einem pH von 8,4 für 32 Minuten einer Temperatur von 95 °C ausgesetzt. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden sie anschließend mit H₂O₂ inkubiert. Die Schnitte wurden dann mit den Antikörpern (Verdünnung und Herkunft siehe Anhang) inkubiert. Zur Detektierung wurde der OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems) verwendet. Die Färbungen am Färbeautomaten wurden von Mitarbeitern des pathologischen Instituts der TU München durchgeführt.

4.4.3 Kontrollen

Um zuverlässige Erkenntnisse von immunreaktiven Analysen zu gewinnen, ist eine Kontrolle der Antikörperbindung obligat. Hierfür wurde für jeden Antikörper eine negative Kontrolle ausgearbeitet. Dabei wurden auf einen markierten Schnitt keine Primärantikörperlösung pipettiert. Dadurch lässt sich die Spezifität des Sekundärantikörpers und Detektionssystems kontrollieren. Zusätzlich dienten Positivkontrollen, die im Färbegang mitliefen, zur Qualitätssicherung.

4.4.4 Auswertung

Für die Analyse der Immunhistochemie wurden Scores verwendet, die sich bereits in anderen Studien bewährt haben:

Iba1, EGFR, GFAP und Olig2 wurden nach einem semiquantitativen immunreaktiven Score (IRS) bewertet. Dieser stellt das Produkt aus Scores für die Färbeintensität und den Anteil der gefärbten Zellen dar (Montgomery et al., 2015; Motomura et al., 2012; Popova et al., 2014; Wood et al., 2016):

Prozent der angefärbten Zellen		Intensität der Reaktion	
1	<5	0	keine
2	5-50	1	schwach
3	51-75	2	mäßig
4	75-100	3	stark

Tabelle 2: **Immunreaktiver Score für Iba1, EGFR, GFAP und Olig2** nach (Motomura et al., 2012; Popova et al., 2014).

Ein IRS von 1-3 entspricht einer schwachen, von 4-6 einer mittleren Immunreaktion und Werte größer als 8 entsprechen einer starken Antigenexpression (siehe *Abbildung 8*).

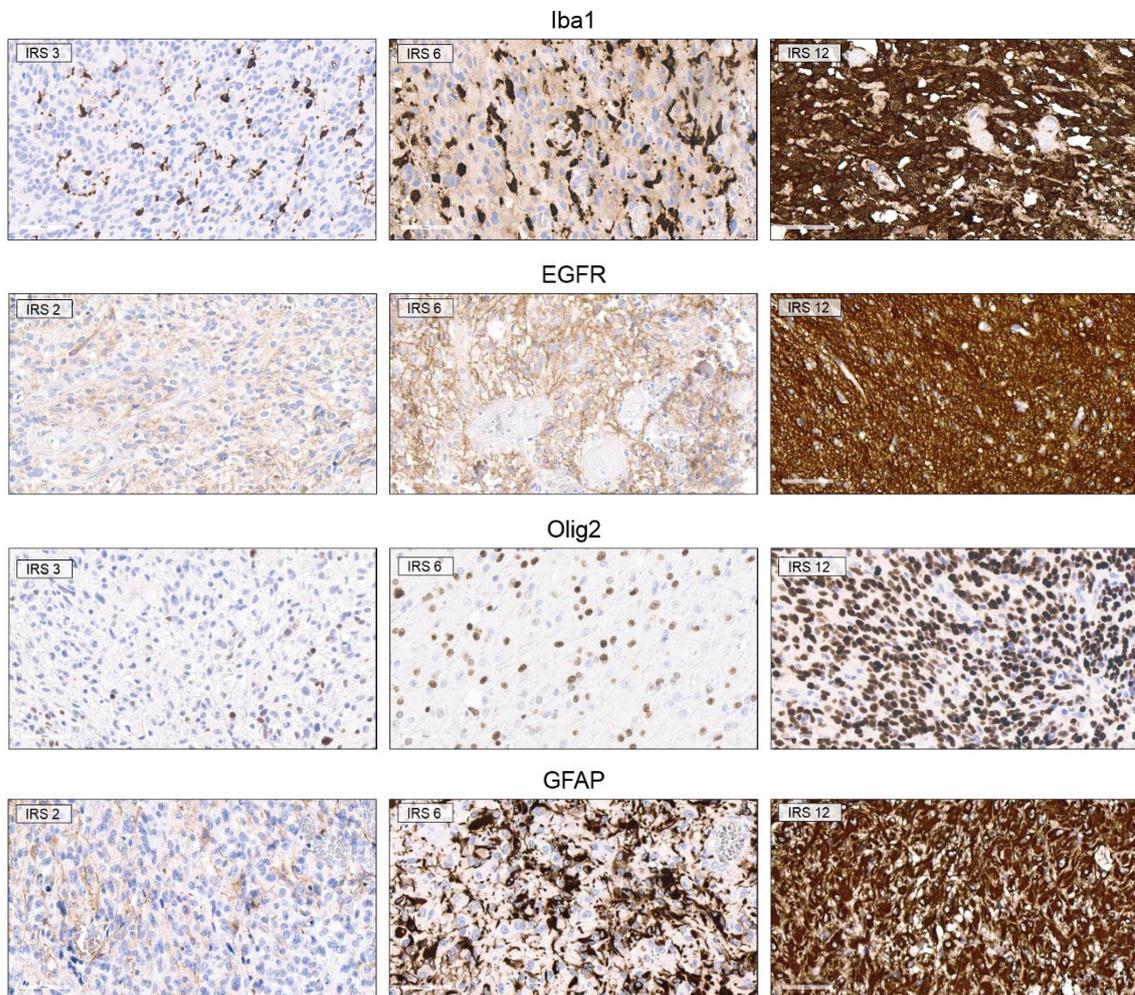


Abbildung 8: **Auswertung** der immunhistochemischen Färbungen von **Iba1**, **EGFR**, **GFAP** und **Olig2**, Balkengrößen 60 µm.

Für die ALDH1A3 wurde ein leicht abgewandelter Score verwendet, da es kein Tumorareal gab, bei dem 100% der Zellen positiv waren (siehe *Abbildung 9*).

Prozent der angefärbten Zellen		Intensität der Reaktion	
1	1-10	0	keine
2	11-20	1	schwach
3	21-49	2	mäßig
4	>50	3	stark

Tabelle 3: **Immunreaktiver Score** für **ALDH1A3**.

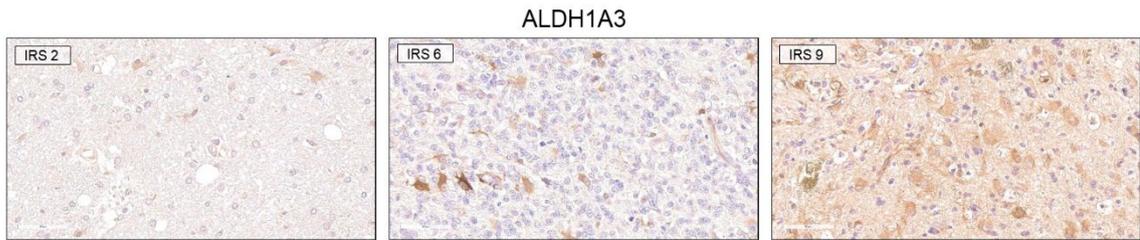


Abbildung 9: **Auswertung** der immunhistochemischen Färbungen von **ALDH1A3**, Balkengrößen 60 µm.

Für Mib1 wurde lediglich die Proliferationsrate als Prozentsatz ohne Berücksichtigung der Färbeintensität gezählt. Diese wurden anschließend der Vergleichbarkeit wegen in einen Score von 0-12 übersetzt, wobei eine Färbung von bis zu 19% der Zellen einem Score von 3 entspricht, von 20-29% von 6, von 30-39% von 9 und eine Positivität von >40% der Zellen einem Score von 12 (siehe *Abbildung 10*).

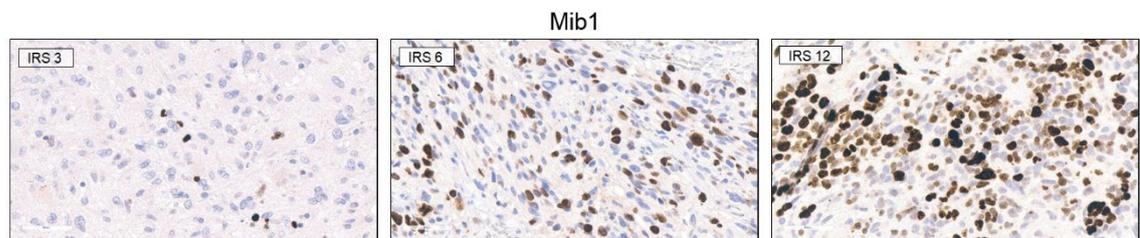


Abbildung 10: **Auswertung** der immunhistochemischen Färbungen von **Mib1**, Balkengrößen 60 µm.

Auch bei YKL-40 wurde lediglich der Prozentsatz ausgewertet und hierbei nur die stark positiven Zellen gezählt (siehe *Abbildung 11*). Der Score hält sich an in *Tabelle 2* genannten Grenzen (Motomura et al., 2012).

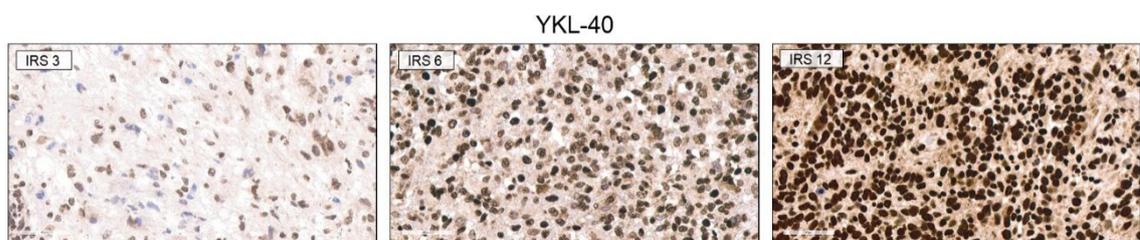


Abbildung 11: **Auswertung** der immunhistochemischen Färbungen von **YKL-40**, Balkengrößen 60 µm.

Bei p53 wurden ebenso nur die intensiv reaktiven Zellen gewertet (siehe *Abbildung 12*).

Hierbei bediente man sich folgender Einteilung (Takami et al., 2015):

Prozent der angefärbten Zellen	
0	0
3	1-10
8	11-89
12	>90

Tabelle 4: **Immunreaktiver Score** für **p53** nach (Takami et al., 2015).

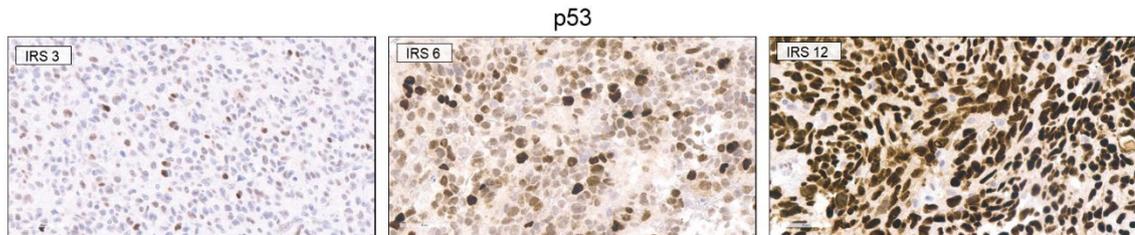


Abbildung 12: **Auswertung** der immunhistochemischen Färbungen von **p53**, Balkengrößen 60 μm .

CD44 zeigte in allen Tumoren eine homogene, starke Expression, die keine Differenzierung in einen Score zuließ (siehe *Abbildung 13*).

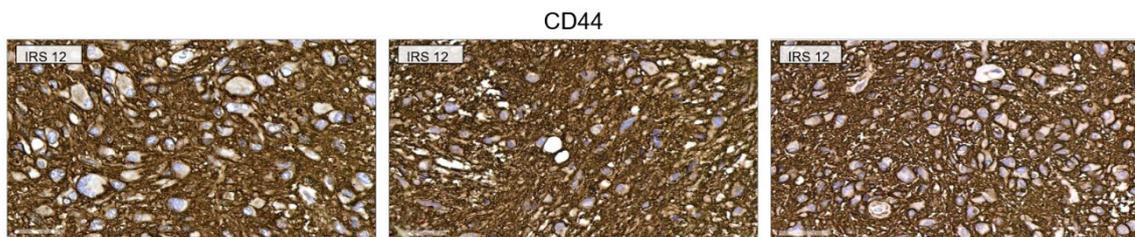


Abbildung 13: **Auswertung** der immunhistochemische Färbung von **CD44**. Die durchweg starke Expression lässt keine Differenzierung zu, Balkengrößen 60 μm .

Bei **p62** unterscheidet man eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas (*Abbildung 14A*), Pünktchen im Zytoplasma, die Autophagosomen darstellen könnten (*Abbildung 14B*), sowie eine Anreicherung im Zellkern (*Abbildung 14C*).

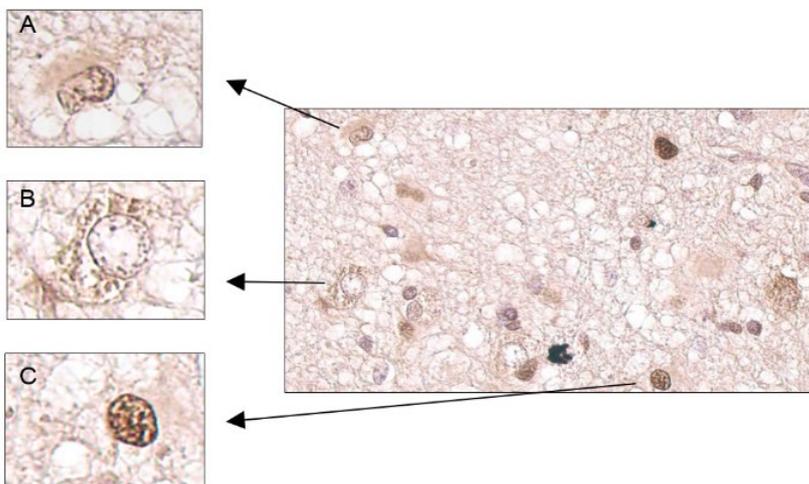


Abbildung 14: **Auswertung** der immunhistochemischen Färbung von **p62**.

4.4.5 Areas of Interest (Aoi)

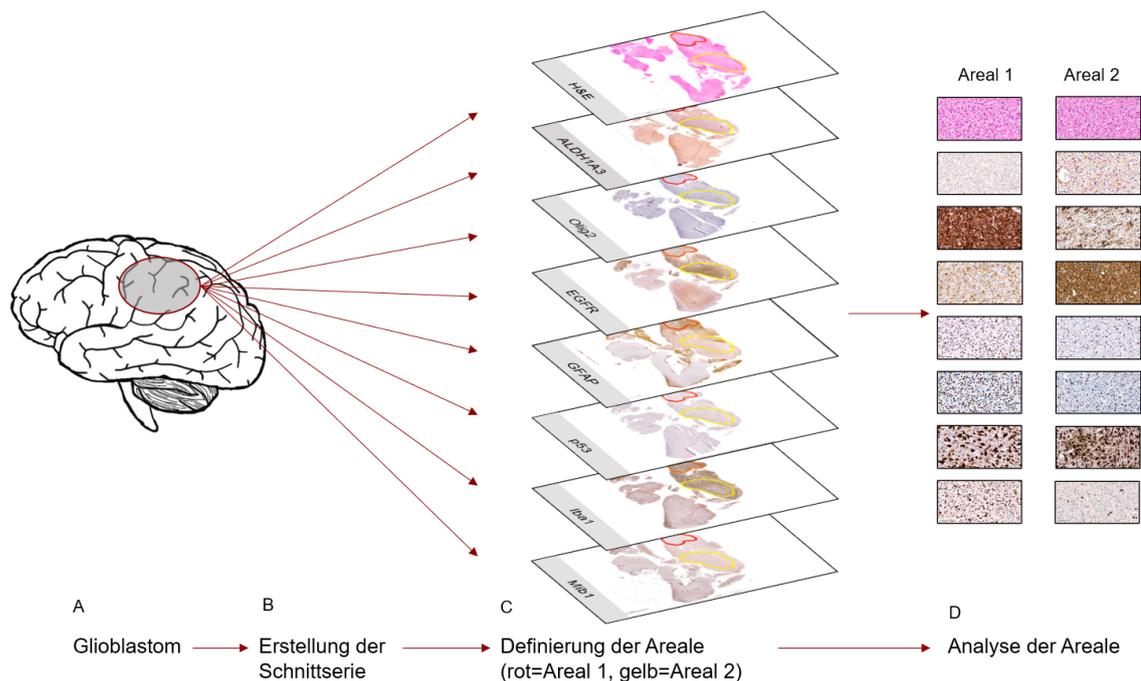


Abbildung 15: **Arbeitsschritte** von der Tumورprobe zur detaillierten Expressionsanalyse. Schematisch dargestellt ist ein Glioblastom, aus dem die Gewebeprobe entnommen und nach Aufbereitung die Schnittserie erstellt wurde (B). C zeigt das Übereinanderlegen der verschiedenen Interessensareale, deren Markerexpression anschließend ausgewertet wurde (D).

Abbildung 15 visualisiert die Abfolge der Arbeitsschritte. Von den Tumoren des Patient*innenkollektivs wurden Schnittserien erstellt. Die Analyse der Immunreaktion erfolgte in einem ersten Schritt am Mikroskop, wohingegen die detaillierte Auswertung digital durchgeführt wurde. Nach Einscannen der Schnittpräparate wurden mit der Software Aperio Image Scope (Version 12.3.0.5056) auffällige Areale, sogenannte Areas of Interest, ausgewählt. Für jeden Biomarker wurde hierbei ein Areal markiert, das eine besonders starke Expression aufwies und ein weiteres mit schwacher Reaktion. Die Software ermöglicht die Zusammenführung der Markierungen aus den jeweiligen Schnitten. Hierdurch ergaben sich pro Tumor ein Maximum von 16 und ein Minimum von einem Aoi. Insgesamt sind in den Primärtumoren somit 115 Areale und in den Rezidiven 80 Areale markiert worden. In diesen Arealen wurden anschließend die Expression für alle Marker ermittelt.

4.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ermöglicht das Anfärben von mehr als einem Antigen auf nur einem Objektträger. Dadurch kann überprüft werden, ob verschiedene

Proteine in derselben Zelle exprimiert werden. Mithilfe von Zellart-spezifischen Antigenen kann so die Expression von einem Protein in einer bestimmten Zellpopulation untersucht werden. In dieser Arbeit wurde eine Doppelfärbung von Iba1 und ALDH1A3 durchgeführt. Hierzu wurde folgendes Protokoll berücksichtigt:

Vergleichbar mit der Immunhistochemie wurden die Schnitte in Xylol und der folgenden absteigenden Alkoholreihe aufbereitet (Inkubationszeiten siehe Immunhistochemie). Nach 30-minütigem Kochen im Citratpuffer erfolgte die Inkubation mit dem Blocking Buffer (2,5% donkey Serum) bei Raumtemperatur und anschließendes Waschen in PBS. Die beiden Primärantikörper wurden zusammen über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde der Sekundärantikörper 45 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgetragen und anschließend mit PBS abgewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI). Nach einem letzten Waschgang wurden die Schnitte in Aqua poly Maunt eingedeckt. Bei der Durchführung sämtlicher Arbeitsschritte wurde auf eine geringe Raumbelichtung geachtet und die Schnitte wurden vor Sonneneinstrahlung und Licht geschützt.

4.6 850k-Methylierungsassay

Das Tumormethylom setzt sich aus einer Kombination von somatisch erworbenen Methylierungsveränderungen und Charakteristika der Tumorsprungszelle zusammen. DNA-Methylierungsprofile sind sehr robust und reproduzierbar und können bereits aus sehr kleinen Proben gewonnen werden. Die Arbeitsgruppe von Capper et al., 2018 etablierte eine standardisierte Methode, ZNS-Tumoren anhand ihrer Methylierungsprofile zu subklassifizieren. Mit dem Ziel, ein weltweites Netzwerk für die Subklassifizierung neurogener Tumoren zu generieren, entwickelten sie einen öffentlich zugänglichen Online-Classifizier, der genaue Entitätszuordnungen anhand des Tumormethylierungsmusters durchführt. Diese Zuordnung zu einer Methylierungsklasse basiert auf einem Algorithmus, der durch einen Vergleich mit über 2800 Referenzfällen einen Klassifizierungsscore zwischen 0 und 1 erstellt. Eine korrekte Vorhersage zur Tumorklasse wird bei einem Cutoff von $> 0,9$ erreicht (z.B.: „IDH-Wildtyp

Glioblastom“). Der Match zu einer Subklasse wird hingegen bei einem Score von $> 0,5$ gewährt (z.B.: „mesenchymaler Subtyp“) (Capper et al., 2018).

Zur Methylierungsanalyse wurde die DNA der ausgewählten Areale von Mitarbeitern des neuropathologischen Instituts der TUM aus dem Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebe extrahiert. Die Fixierung des Gewebes in Formalin zieht eine DNA-Degradation nach sich, was genetische Analysen erschwert und ein genaues Protokoll zur Vorbereitung der DNA verlangt. Der Hersteller Illumina bietet hierfür einen FFPE QC Kit, um die Qualität der DNA zu evaluieren und einen Restoring Kit zur Wiederherstellung der durch die Formalinfixierung geschädigten DNA. Die gewonnene DNA wurde gemäß des Infinium Assays zuerst amplifiziert und fragmentiert, bevor sie auf den sogenannten BeadChip übertragen (hybridisiert) werden kann (Pokholok et al., 2010). Der fertige Array wurde anschließend gescannt und in das Webportal hochgeladen (www.moleculareuropathology.org), wo die automatisierte Klassifikation durchgeführt wird (Capper et al., 2018). Aus den Rohdaten (idat-Files) konnten weitere Analysen mit dem BioConductor Paket „minfi“ durchgeführt werden (Aryee et al., 2014). Auf eine Qualitätskontrolle folgte die anschließende Bearbeitung (SWAN Normalisierung, Probenfilter mit $p > 0,05$). Um die Ähnlichkeit / Nähe der Proben zueinander zu visualisieren, wurden gliom-spezifische CpG von Ceccarelli et al., 2016 ausgewählt und eine Principal Component Analyse (PCA) mit den Daten durchgeführt. Die Proben wurden analog der beiden größten Eigenvektoren aufgetragen.

4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS sowie R.

In SPSS wurde ein **Test auf Normalverteilung** zur Voruntersuchung des Kollektivs für die Auswahl der weiteren Tests durchgeführt.

Die Grundlage der Clusteranalyse ist die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, mit der für jede Aol ein Expressionsprofil erstellt wurde. Die **hierarchische Clusteranalyse** erfolgte in R nach „wards method“ mit der Funktion „agnes“. Hierdurch wird jede Markerkombination zur Gesamtheit der Expressionsprofile in Bezug gesetzt und überprüft, ob bestimmte Profile im Kollektiv mehrmals auftreten und eine Systematik gefunden werden kann. Über

eine Distanzfunktion (aufgrund der nicht regelmäßigen Datenstruktur mittels Gower's distance) wurde in der Analyse ein Dendrogramm erstellt. Zu Beginn der Analyse erhält jede Tumorregion einen Platz im Dendrogramm. Der Zeitpunkt der Vereinigung gibt Aufschluss über die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der jeweiligen Areale: Je näher zwei Areale beisammen liegen, desto ähnlicher ist ihr Reaktivitätsprofil (Altman & Krzywinski, 2017). Die Partition Around Medoids (**PAM**)-Clusteranalyse wurde ebenfalls in *R* erstellt. Diese ist verwandt zum bekannteren k-means Clustering, im Unterschied hierzu jedoch anwendbar für ordinal skalierte Daten. Anders als beim hierarchischen Clustering wird im Voraus die Anzahl der gewünschten Cluster festgelegt, in diesem Fall $k = 2$. Auch bei dieser Variante werden anschließend die Expressionsprofile der verschiedenen Aols auf ihre Distanz zueinander verglichen und anhand dieses Maßes in Cluster eingeteilt. Die Analyse definiert zusätzlich den im Zentrum der Werte liegenden Tumor (= *Medoid*), der stellvertretend für den Cluster das Expressionsprofil zeigt.

Eine Korrelationsanalyse nach **Spearman** stellt die Korrelation der einzelnen Marker zueinander dar. Diese wurde mittels SPSS durchgeführt.

Die **Principal Component Analysen** wurden mit *R* erstellt. Die PCA ist ein Verfahren, das die Komplexität umfangreicher Datensätze aufhebt und eine Strukturierung zulässt, während möglichst viel Information erhalten bleibt. Mathematisch gesehen wird durch Linearkombinationen die Gesamtzahl der verwendeten Variablen auf sogenannte Hauptkomponenten (principal components) reduziert, die anschließend graphisch dargestellt und ausgewertet werden können (Lever et al., 2017).

Scatterplots dienen dem Vergleich der Markerexpression in Primärtumoren und Rezidiven und wurden in SPSS erstellt.

Mittels eines in SPSS durchgeführten **T-Tests** wurde der Zusammenhang von Probengröße und heterogener Subtypenexpression untersucht.

Die Berechnung der Überlebensdaten erfolgte mittels **Kaplan-Meier** Überlebenskurven. Aufgrund von fehlenden Verlaufsdaten der Patienten konnten nicht alle Tumorproben berücksichtigt werden.

5 ERGEBNISSE

5.1 Patient*innendaten und demographische Zusammensetzung

Parameter	Patient*innenanzahl	Daten	
Alter (in Jahren)	n = 38	Durchschnitt	59
		Median	60
		Minimum / Maximum	27 / 84
Geschlecht	n = 38	weiblich	9
		männlich	29
MGMT Promotor Status	n = 26	methyliert	6
		nicht-methyliert	20
Mittleres Überleben (in Monaten)	n = 20	Durchschnitt (95% KI)	22 (17-26)
		Median (95% KI)	19 (13-25)

Tabelle 5: **Patient*innendaten.** Tabelle nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

Das mittlere Alter bei Diagnose betrug 59 Jahre, wobei der jüngste Patient mit 27 und der älteste mit 84 Jahren erkrankte. 29 Proben stammten von männlichen Patienten, wohingegen im Kollektiv nur 9 Tumoren von Frauen integriert waren. Für die Überlebensanalysen wurden der Vergleichbarkeit wegen die Patienten anhand des MGMT-Promotor-Status selektiert. Aufgrund dessen und der teils fehlenden klinischen Daten ist die Zahl der analysierten Tumoren gering.

5.2 Primärtumoren

5.2.1 Beobachtungen

Die Heterogenität des Glioblastoms ist ein unverkennbares Charakteristikum, dessen Beobachtung vorerst keine statistische Auswertung verlangt. Das heterogene Bild ist meist bereits in der H&E Färbung, spätestens jedoch durch die einzelnen immunhistochemischen Färbungen klar ersichtlich. Beispielhaft soll die folgende Abbildung der *intratumoralen* Heterogenität einen ersten Einblick in die Ergebnisse dieser Arbeit geben (*Abbildung 16*).



Abbildung 16: **Beispielhafte Darstellung** zweier Areale eines Glioblastoms. In den Vergrößerungsaufnahmen der immunhistochemischen Färbungen zeigen sich Unterschiede bezüglich der Antikörperpositivität besonders eindrücklich für ALDH1A3, GFAP und EGFR. Balkengröße 60µm.

5.2.2 Immunhistochemie

5.2.2.1 Für Immunhistochemische Heterogenitätsstudien geeignete Biomarker

ALDH1A3, EGFR, GFAP, Iba1, Mib1, Olig2 und p53 zeigten eine heterogene Expression sowohl *inter-* als auch *intratumoral* und sind demnach für Heterogenitätsstudien geeignet.

CD44 zeigte durchwegs eine homogene, starke Expression, die keine Differenzierung zuließ. Aus diesem Grund wurde die Auswertung von CD44 nicht in die weitere Analyse miteinbezogen.

Für p62 bestätigten sich die bereits von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Schwierigkeiten in der Auswertung. Eine große Schwierigkeit bestand darin, dass die diffuse zytoplasmatische Anfärbung das *dot-like-staining* verkennen ließ. Ein weiteres Problem war die unklare biologische Signifikanz, da p62 durch die Inhibition von Autophagie akkumuliert, in der Literatur aber das positive *dot-like-staining* als Indikator für das Auftreten von Autophagie beschrieben wird (Schläfli et al., 2015). Um eine Missinterpretation und dadurch Verfälschung der Forschungsergebnisse zu vermeiden, haben wir uns entschlossen, auch p62 von den weiteren Analysen auszuschließen.

5.2.2.2 Hierarchische Clusteranalyse

Nun galt es, die beschriebenen Beobachtungen zu verifizieren und zu prüfen, ob sich wiederholende Ereignisse finden lassen, die eine Klassifikation der Heterogenität ermöglichen. Die Expressionsprofile der Aols wurden anhand der hierarchischen Clusteranalyse miteinander verglichen.

Hierdurch resultierten für den vorliegenden Datensatz zwei voneinander abgrenzbare Cluster, innerhalb derer die Expressionsprofile zueinander ähnlicher sind als zu den Aols des anderen Clusters. Der agglomerative Koeffizient der Analyse betrug 0,95. Cluster A wurden 35 Areale aus 18 Tumoren zugeordnet, Cluster B 80 Areale aus 34 Tumoren. In *Abbildung 17* ist der Stammbaum der Clusteranalyse dargestellt. Zusätzlich sind die mittleren Expressionswerte, die dem typischen Biomarkerprofil der einzelnen Cluster entsprechen, gezeigt.

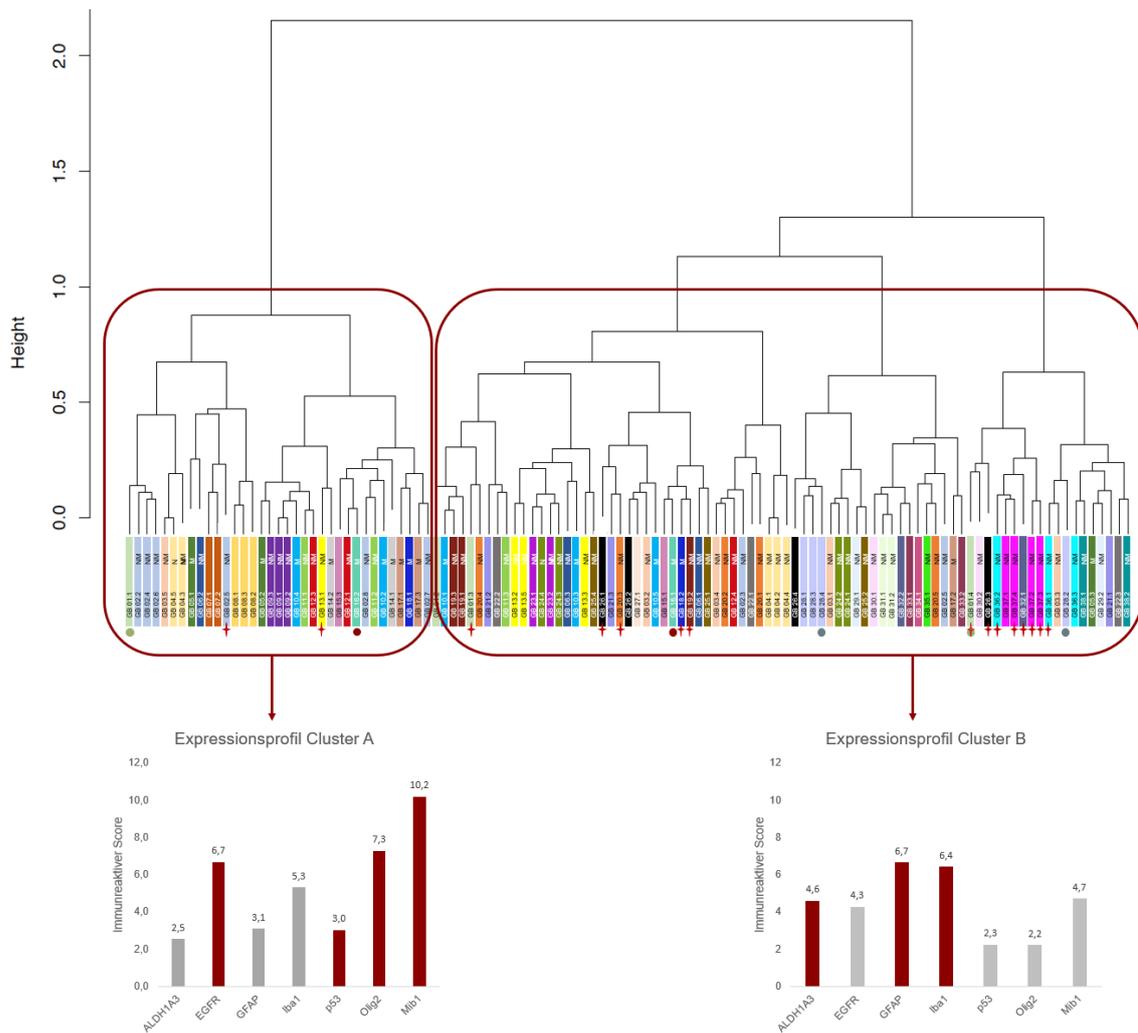


Abbildung 17: **Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse** mit Darstellung zweier voneinander abgrenzbarer Cluster. Das zugehörige mittlere Expressionsprofil ist in den Balkendiagrammen dargestellt. Ein roter Balken indiziert eine Expression, die den Mittelwert des gesamten Kollektivs überschreitet. Cluster A zeigt eine erhöhte Expression von EGFR, p53, Olig2 und Mib1, während das Expressionsprofil von Cluster B durch eine Überexpression von ALDH1A3, GFAP und Iba1 geprägt ist. Die Balken direkt unter dem Dendrogramm geben Auskunft über die Tumoren: Balken mit derselben Farbe zeigen verschiedene Aols eines Tumors; nachfolgende Abkürzungen geben Auskunft über den MGMT-Methylierungsstatus (NM = nicht methyliert, M = methyliert). Die mit Punkten markierten Tumoren wurden in der epigenetischen Analyse untersucht (Farben identisch in *Abbildung 32*). Die roten Kreuze zeigen Aols, die in der PAM Analyse einem anderen Cluster zugeordnet wurden. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

Die eben noch rein durch Beobachtung beschriebene Heterogenität gewann durch diese Analyse an Klarheit. Innerhalb der Markeralterationen konnten Übereinstimmungen gefunden werden, die zeigen, dass die Expression nicht willkürlich variiert, sondern einem Muster folgt – einem Muster, das zwei Gruppen anhand bestimmter Antigenexpression definiert und die Expression verschiedener Subtypen im Glioblastom untermauert.

Die Zuordnung der Areale in das Dendrogramm belegt zudem, dass die Heterogenität nicht nur auf *intertumoraler* Ebene repräsentiert ist, sondern die eben definierten Markerprofile auch innerhalb ein und desselben Tumors variieren. Dies indiziert das Vorhandensein einer *intratumoralen* Heterogenität.

5.2.2.3 PAM

Zur weiteren Veranschaulichung unserer Ergebnisse führten wir mit dem Datensatz eine zweite Analyse durch: Partition Around Medoids. Die aussagekräftigsten Ergebnisse ergaben sich für zwei Cluster ($k = 2$).

Dieses Analyseverfahren untermauert die Erkenntnisse der hierarchischen Clusteranalyse. Mit PAM konnten ebenfalls zwei Gruppen definiert werden, die sich durch ein unterschiedliches Markerprofil kennzeichnen und größtenteils mit den Werten der ersten Analyse übereinstimmen (siehe *Abbildung 18*). 46 Areale aus 23 Tumoren wurden Cluster A zugeteilt, wohingegen Cluster B aus 69 Aols von 33 Tumoren gebildet wurde.

100 der 115 (87,0 %) Areale wurden in beiden Methoden demselben Subtyp zugeordnet. Für 15 (13,0 %) Aols zeigte sich eine unterschiedliche Zuordnung. Diese sind in *Abbildung 17* mit einem roten Kreuz markiert.

Für die weiteren Auswertungen wurden die Resultate der PAM-Analyse verwendet, da bei dieser durch Distanzfunktionen neue Areale (zum Beispiel in Rezidiven) zu einem Subtyp zugeordnet werden können.

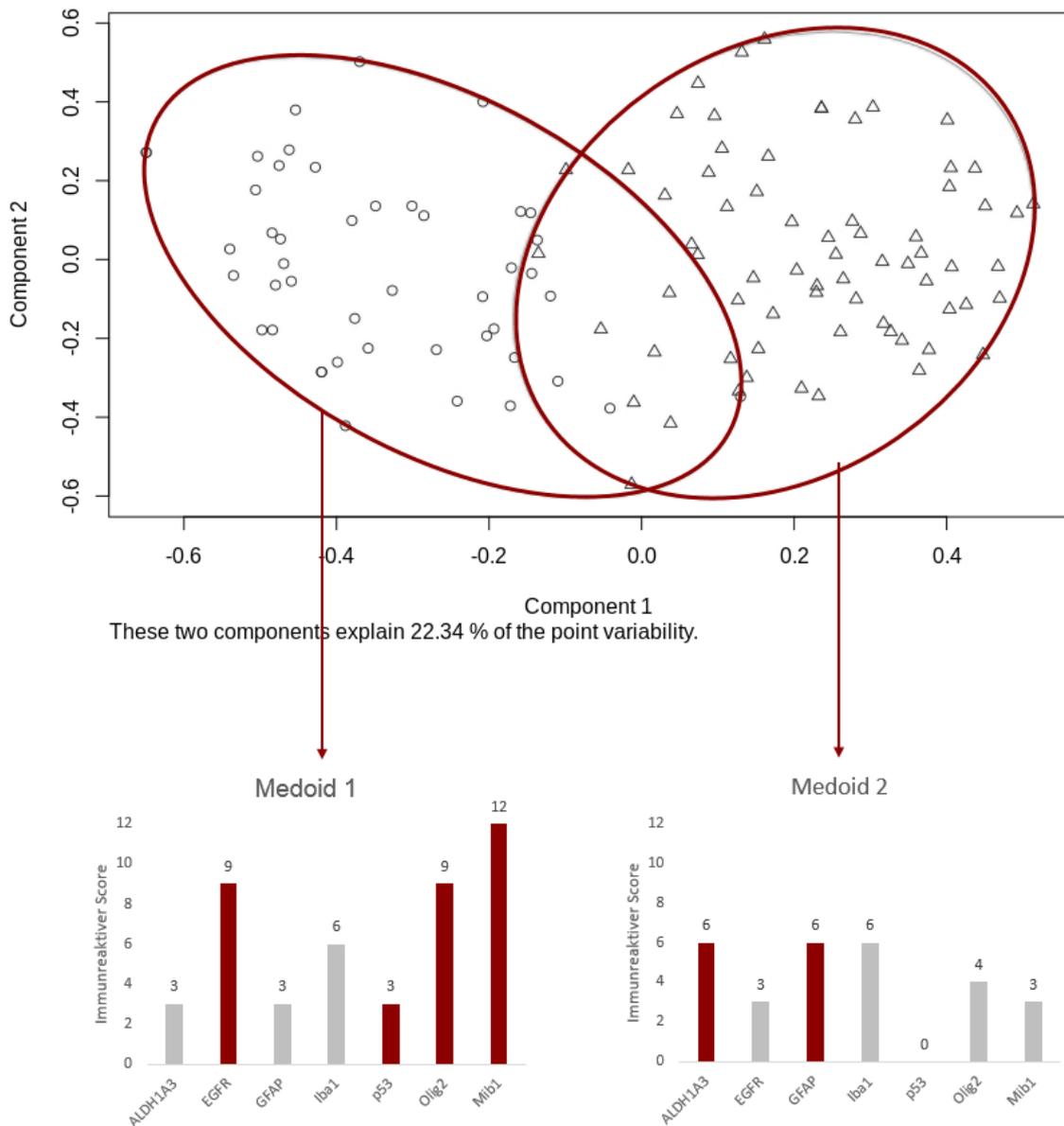


Abbildung 18: **PAM Clustering** für $k = 2$. Es lassen sich zwei verschiedene Gruppen definieren (die einzelnen Areale sind für Cluster A mit Punkten, für Cluster B mit Dreiecken dargestellt). Zusätzlich sind die zugehörigen Markerprofile der beiden im Zentrum gelegenen Medoids aufgeführt. Rote Balken zeigen einen, den Mittelwert des gesamten Kollektivs überschreitenden Expressionswert. Medoid 1 aus Cluster A weist eine starke EGFR -, p53 -, Olig2 - und Mib1 - Expression auf. Der Cluster B definierende Tumor hat eine starke ALDH1A3 - und GFAP - Expression. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

5.2.2.4 Korrelationsanalyse

Zur weiteren Identifizierung koexprimierter Biomarker diente eine Korrelationsanalyse aller Marker zueinander. Die Analyse nach Spearman-Rho zeigte eine signifikant positive Korrelation zwischen ALDH1A3 und GFAP ($r = 0,228$; $p = 0,014$), sowie ALDH1A3 und Iba1 ($r = 0,468$; $p = 0,00$). Mib1 und Olig2 wiesen eine positive Korrelation auf ($r = 0,415$; $p = 0,000$). Signifikant negativ korrelierten GFAP und EGFR ($r = -0,291$; $p = 0,002$), GFAP und Olig2

($r = -0,345$; $p = 0,000$), sowie GFAP und Mib1 ($r = -0,413$; $p = 0,000$). In *Tabelle 6* sind alle Werte der Korrelationsanalyse aufgeführt.

		ALDH1A3	GFAP	Iba1	EGFR1	p53	Olig2	Mib1
ALDH1A3	r_s		,228*	,468**	-0,064	0,111	-0,048	-0,121
	p		0,014	0,000	0,495	0,240	0,612	0,199
GFAP	r_s	,228*		0,085	-,291**	-0,115	-,345**	-,413**
	p	0,014		0,369	0,002	0,220	0,000	0,000
Iba1	r_s	,468**	0,085		-0,090	0,176	-0,131	0,018
	p	0,000	0,369		0,338	0,059	0,162	0,848
EGFR1	r_s	-0,064	-,291**	-0,090		-0,105	,326**	,282**
	p	0,495	0,002	0,338		0,263	0,000	0,002
p53	r_s	0,111	-0,115	0,176	-0,105		0,026	,298**
	p	0,240	0,220	0,059	0,263		0,783	0,001
Olig2	r_s	-0,048	-,345**	-0,131	,326**	0,026		,415**
	p	0,612	0,000	0,162	0,000	0,783		0,000
Mib1	r_s	-0,121	-,413**	0,018	,282**	,298**	,415**	
	p	0,199	0,000	0,848	0,002	0,001	0,000	
* . Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).								
** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).								

Tabelle 6: **Korrelationsanalyse** nach Spearman-Rho. Fett dargestellt sind die zweiseitig signifikanten Ergebnisse, N=115. Tabelle nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

5.2.2.5 Zusammenschau der Ergebnisse

Die aus den statistischen Analysen gewonnenen Ergebnisse ermöglichen die Definierung zweier Subtypen, die charakterisiert sind durch ein je spezifisches Immunreaktivitätsprofil, das im Folgenden erläutert wird.

Klassisch proliferativer Subtyp

Das mittlere Expressionsprofil des ersten Clusters der PAM Analyse (Cluster A) bildete sich aus 46 Regionen von 23 Tumoren und zeigte eine hohe positive Immunreaktivität für *EGFR*, *p53*, *Olig2* und *Mib1* (siehe *Abbildung 19*).

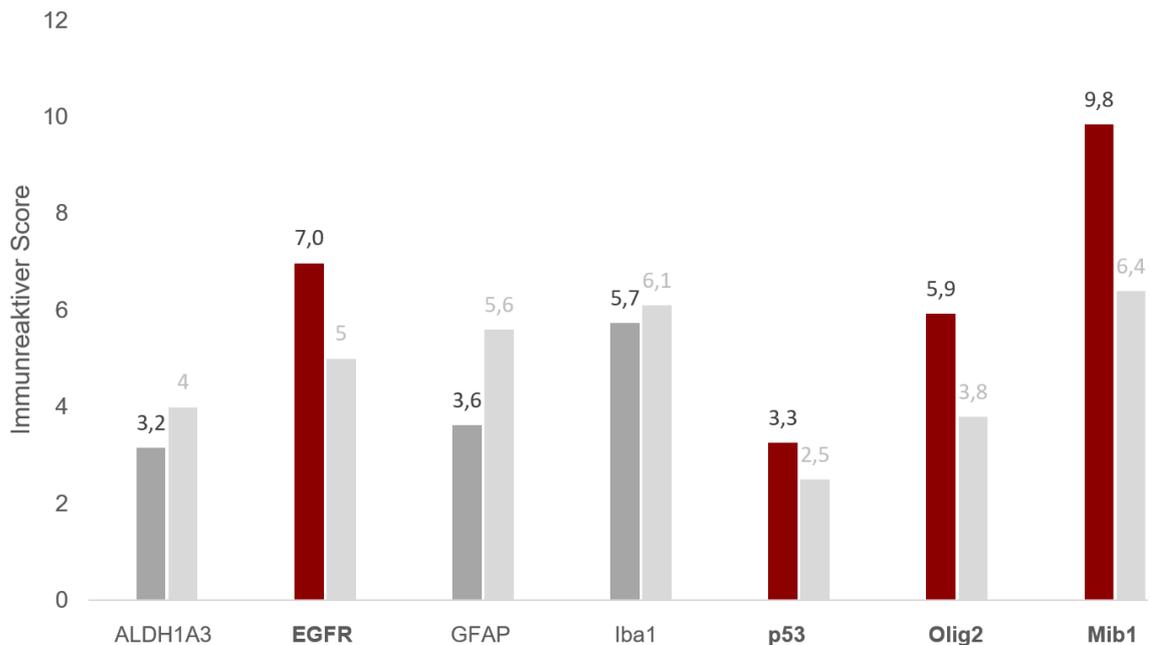


Abbildung 19: **Expressionsprofil des klassisch proliferativen Subtyps** (Cluster A). Zum Vergleich sind die Mittelwerte des gesamten Kollektivs (N=115) in hellgrau dargestellt. Rot gefärbte Säulen zeigen eine den Mittelwert des Kollektivs überschreitende Immunreaktivität an. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

Der Proliferationsmarker Mib1 wies in diesem Cluster mit einem durchschnittlichen Expressionswert von 9,8 (Mittelwert 38,8%, Variationsbreite 20-90%) den höchsten immunreaktiven Score auf. Der hohe Anteil an proliferierenden Zellen zeigt, dass dieser Subtyp geprägt ist von einer proliferativen Aktivität, weswegen er den Beinamen *proliferativ* erhält. Ein weiteres Charakteristikum dieses Clusters ist die hohe Expression des Wachstumsrezeptors EGFR. In der Fachliteratur ist er ein bekannter Marker, der den klassischen Subtyp der TCGA Klassifikation beschreibt (Verhaak et al., 2010). Die starke Positivität dieses Biomarkers legt nahe, dass die Tumoreale dieses Subtyps mit dem klassischen Tumorprofil vergleichbar sind. Die positive Korrelation von EGFR und Mib1 in der Analyse nach Spearman ($r = 0,282$; $p = 0,002$) bekräftigte das Ergebnis der Clusteranalyse an dieser Stelle. Olig2 ist der dritte Biomarker, der durch seinen hohen Score das Expressionsprofil dieses Clusters prägt und mit einer positiven Korrelation zu EGFR ($r = 0,326$, $p = 0,0$) und Mib1 ($r = 0,415$, $p = 0,0$) zu diesem Cluster zugehörig zu sein scheint. Die geringe Gesamtzahl an p53 positiven Tumoren hat eine niedrigere Aussagekraft dieses Ergebnisses zur Folge. Trotzdem korrelierte dieser Biomarker auf einem Niveau von $p = 0,01$ signifikant mit Mib1 ($r = 0,298$). Möglicherweise charakterisiert p53 einen eigenen Subtyp, der in unserem kleinen Kollektiv nicht

zur Ausprägung kommt. Eine hierarchische Analyse der Beziehung der Marker untereinander unterstreicht die exklusive Stellung von p53, was eine Zuordnung zu einem der beiden Cluster unseres Kollektivs erschwert (siehe *Abbildung 20*).

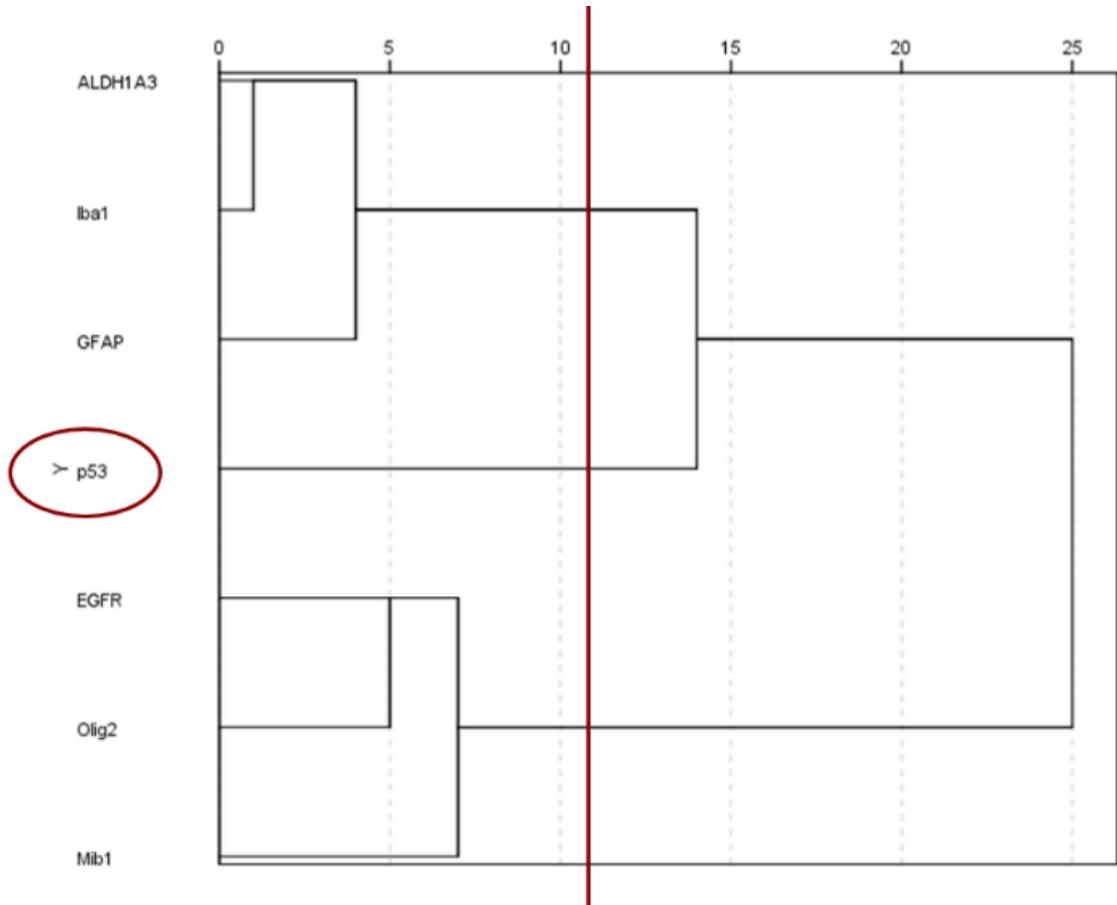


Abbildung 20: **Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse** der Biomarker. Während EGFR, Olig2 und Mib1, sowie Iba1, GFAP und ALDH1A3 eine Nähe zueinander aufweisen, ist p53 gekennzeichnet durch großen Abstand zu den Markern der beiden Cluster.

In *Abbildung 21* wird beispielhaft die Fotoserie eines Tumors mit klassisch proliferativem Immunreaktivitätsprofil gezeigt.

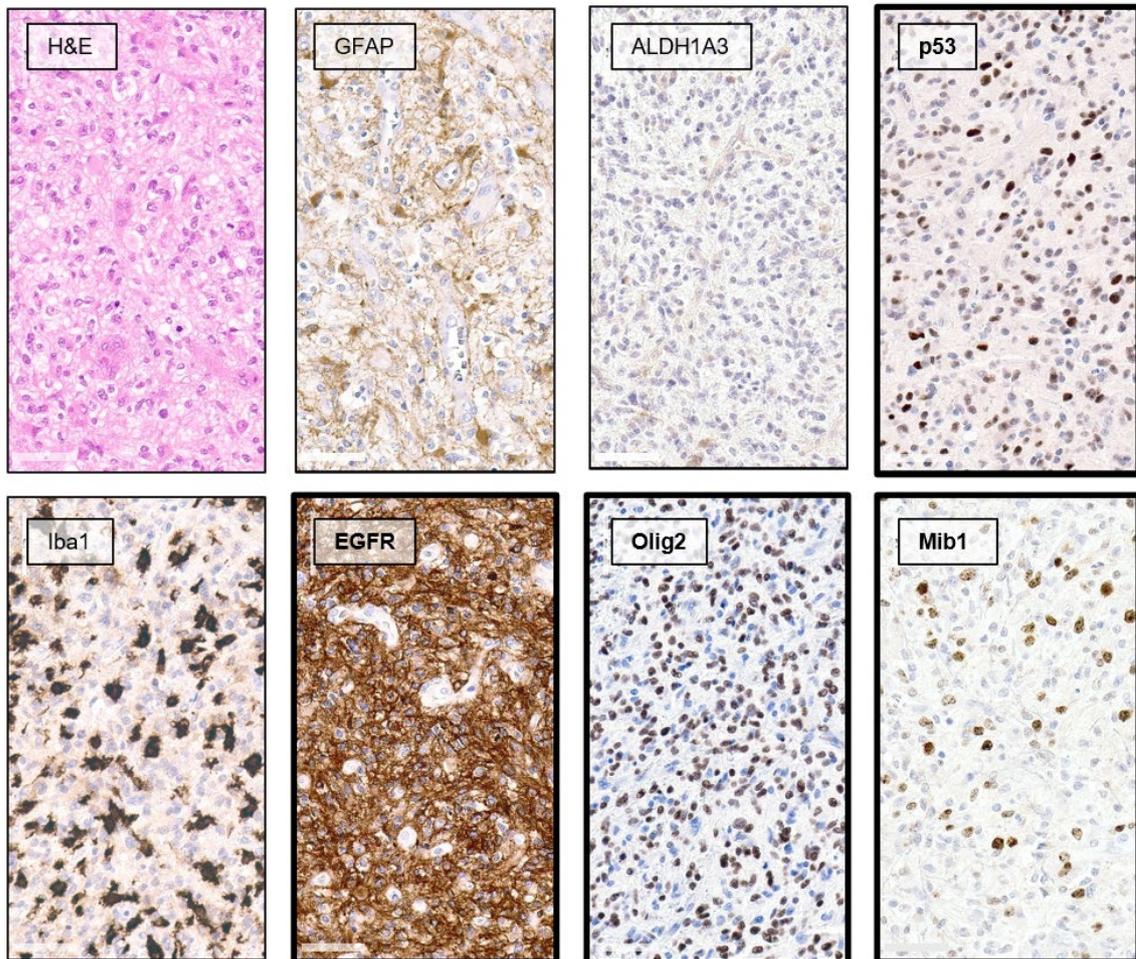


Abbildung 21: Immunreaktivitätsprofil einer klassisch proliferativen Region. Zu sehen sind Detailaufnahmen der Biomarkereexpression mit positiver Anreicherung von vor allem EGFR, Olig2 und Mib1, wohingegen GFAP, ALDH1A3 und Iba1 im Vergleich zu anderen Tumoren nur eine schwache Reaktivität zeigen. Die Kästen mit Markern, die den klassisch proliferativen Subtyp beschreiben, sind kräftig umrahmt. Balkengrößen 60µm.

Mesenchymal Mikroglia dominierter Subtyp

69 Regionen aus 33 Tumoren wurden dem zweiten Cluster (Cluster B) zugeordnet. Die mittleren Expressionswerte zeigen ein Immunreaktivitätsprofil, welches durch eine Positivität der mesenchymalen Biomarker ALDH1A3 und GFAP sowie dem Mikrogliamarker Iba1 gekennzeichnet ist (siehe *Abbildung 22*).

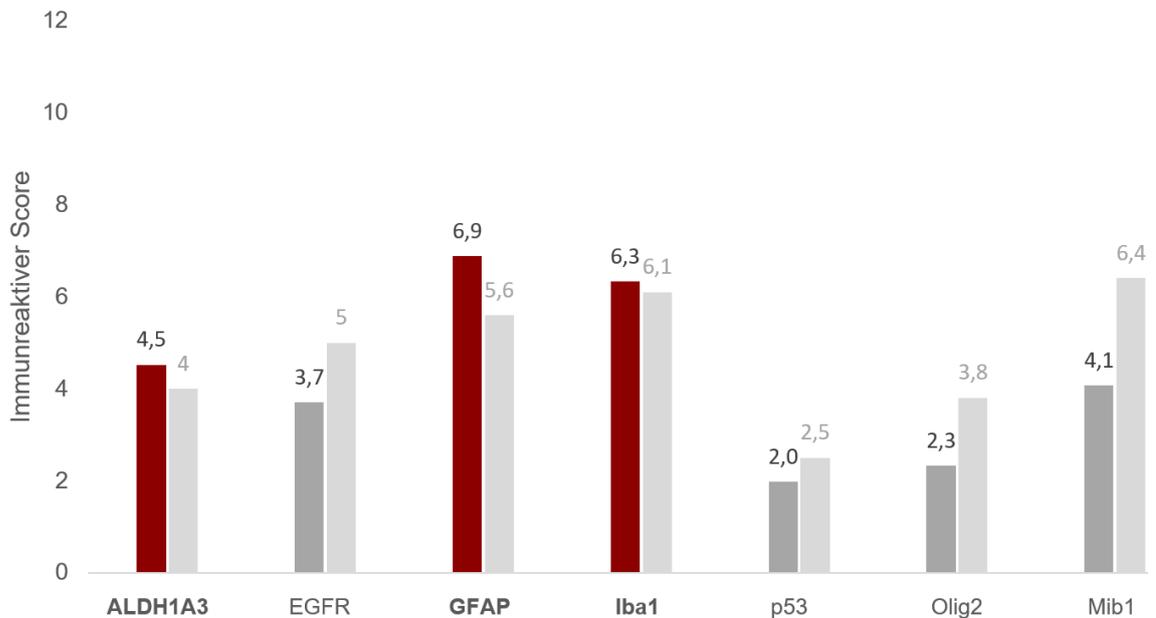


Abbildung 22: **Expressionsprofil mesenchymal Mikroglia dominierter Subtyp** (Cluster B) und mittlere Werte des gesamten Kollektivs (N=115) in hellgrau. Rot gefärbte Säulen zeigen eine den Mittelwert des Kollektivs überschreitende Immunreaktivität an. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

Der Stammzellmarker ALDH1A3 wurde in den Tumorealen dieses Clusters vermehrt exprimiert. Wie in *Kapitel 3.3.1.1* dargestellt, ist er assoziiert mit dem mesenchymalen Subtyp. GFAP zeigte meist eine konträre Expression zu EGFR, was mit der negativen Korrelation der Spearman-Analyse übereinstimmte ($r = -0,291$, $p = 0,002$). Diese Beobachtung und die hohen Werte in dieser Gruppe deuten darauf hin, dass es eine Korrelation der mesenchymalen Marker mit GFAP gibt (Korrelationsanalyse GFAP zu ALDH1A3 ($r = 0,228$; $p = 0,014$)). Besonders interessant ist die Assoziation mit den Mikrogliazellen. Während in dem als klassisch proliferativ definierten Cluster A zahlreiche Mib1-positive Zellen nachgewiesen werden konnten und in dieser Region wohl proliferative Vorgänge vorherrschend sind, scheinen hier Veränderungen im Mikroenvironment die ausschlaggebende Alteration zu sein. Die stark positive Korrelation von ALDH1A3 und Iba1 ($r = 0,468$, $p = 0,0$) bekräftigte dies.

Abbildung 23 zeigt beispielhaft die Fotoserie eines Tumors mit mesenchymal Mikroglia dominiertem Immunreaktivitätsprofil.

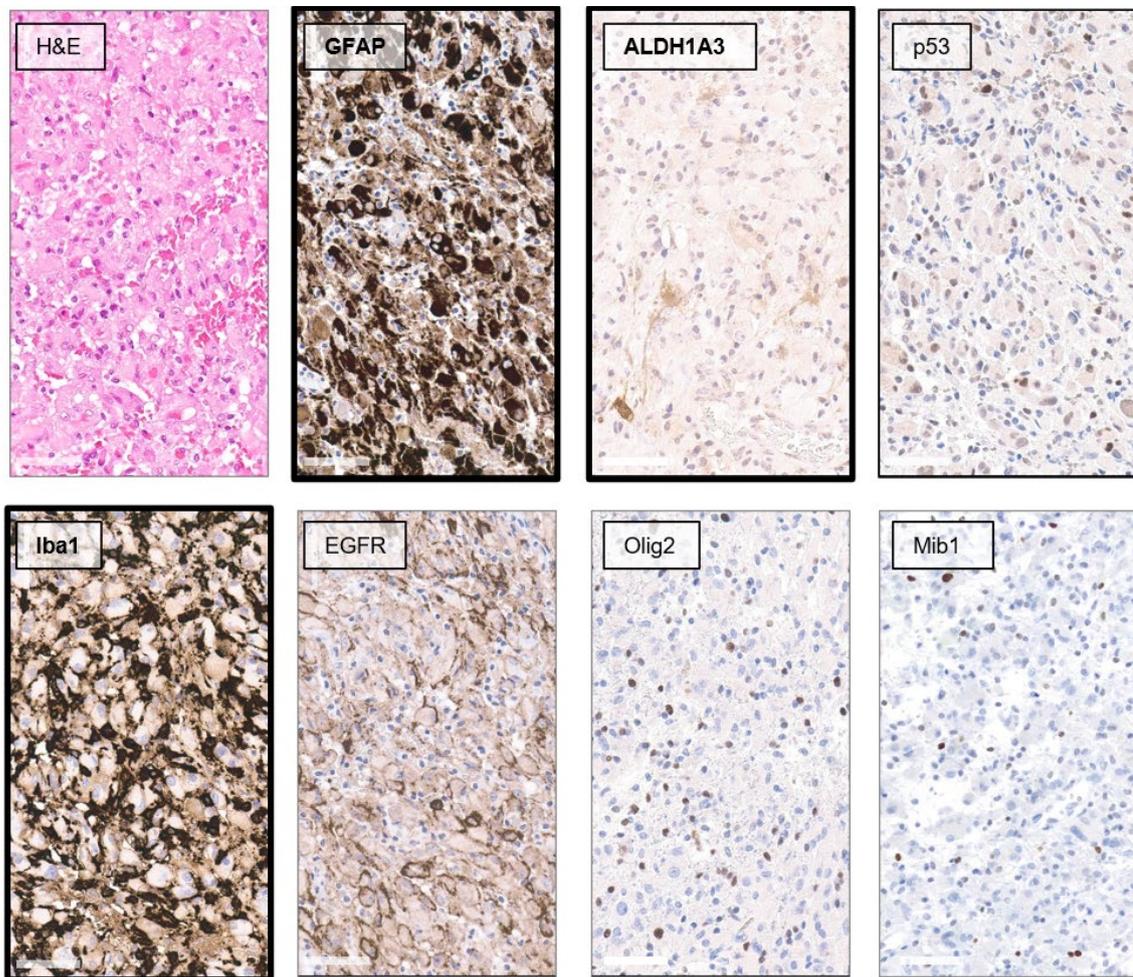


Abbildung 23: **Immunreaktivitätsprofil einer mesenchymal Mikroglia dominierten Region**, starke Anfärbung von ALDH1A3, GFAP und Iba1. Die Kästen mit Markern, die den mesenchymal Mikroglia dominierten Subtyp beschreiben, sind kräftig umrahmt. Balkengrößen 60µm.

Heterogene Subtypenexpression

Die nun folgenden Abbildungen zeigen die heterogene Subtypenexpression auf *intratumoraler* Ebene. Dargestellt sind die Immunreaktivitätsprofile in unterschiedlichen Regionen eines Tumors.

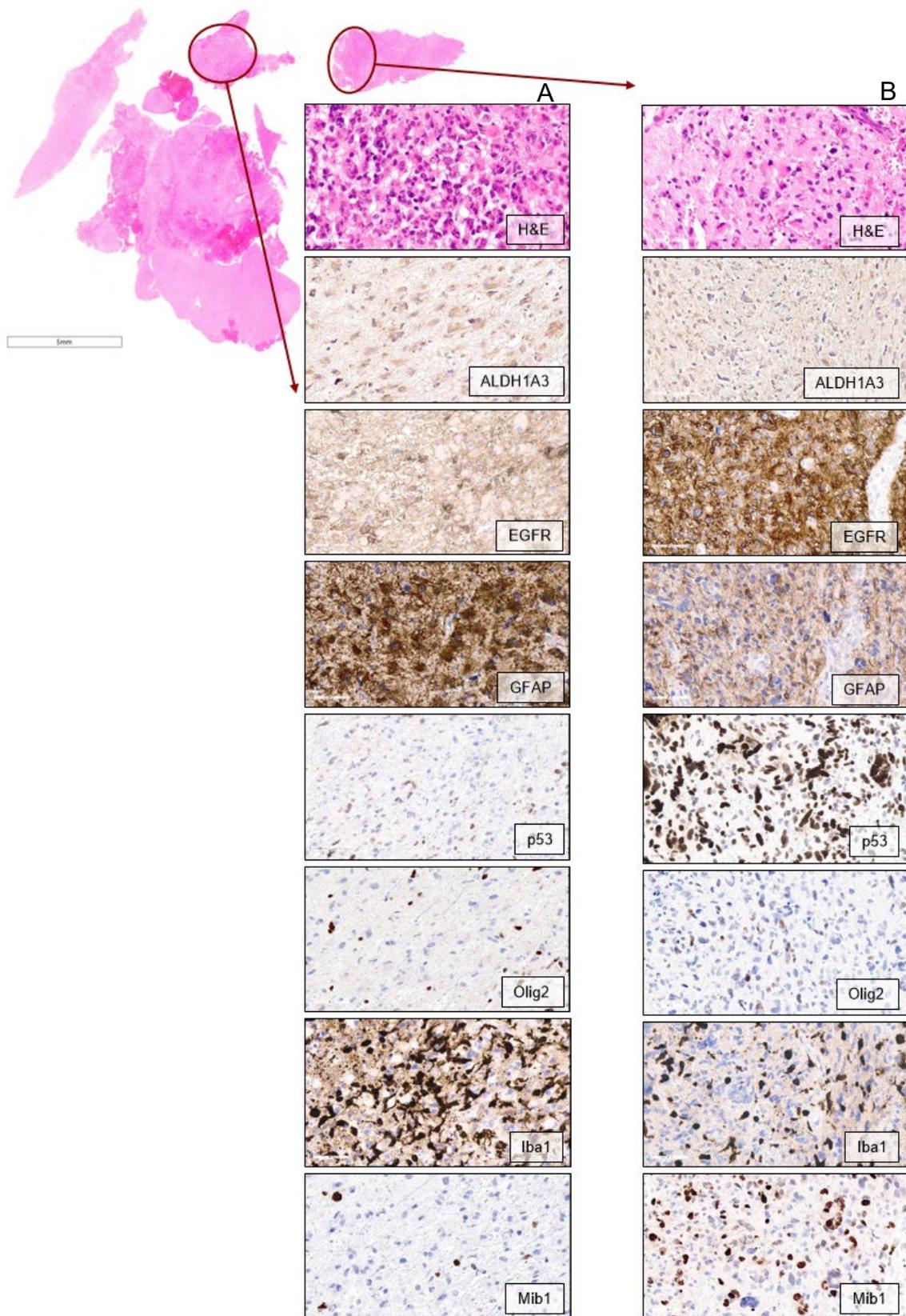


Abbildung 24: **Darstellung der intratumoralen Heterogenität** (Beispiel 1) anhand zweier Fotoserien eines Glioblastoms. A zeigt eine Region mit mesenchymalem Expressionsmuster: ALDH1A3, GFAP und Iba1 sind stark positiv. In B hingegen charakterisiert die Positivität von EGFR, p53, und Mib1 den klassischen Subtypen, Balkengrößen 60µm.

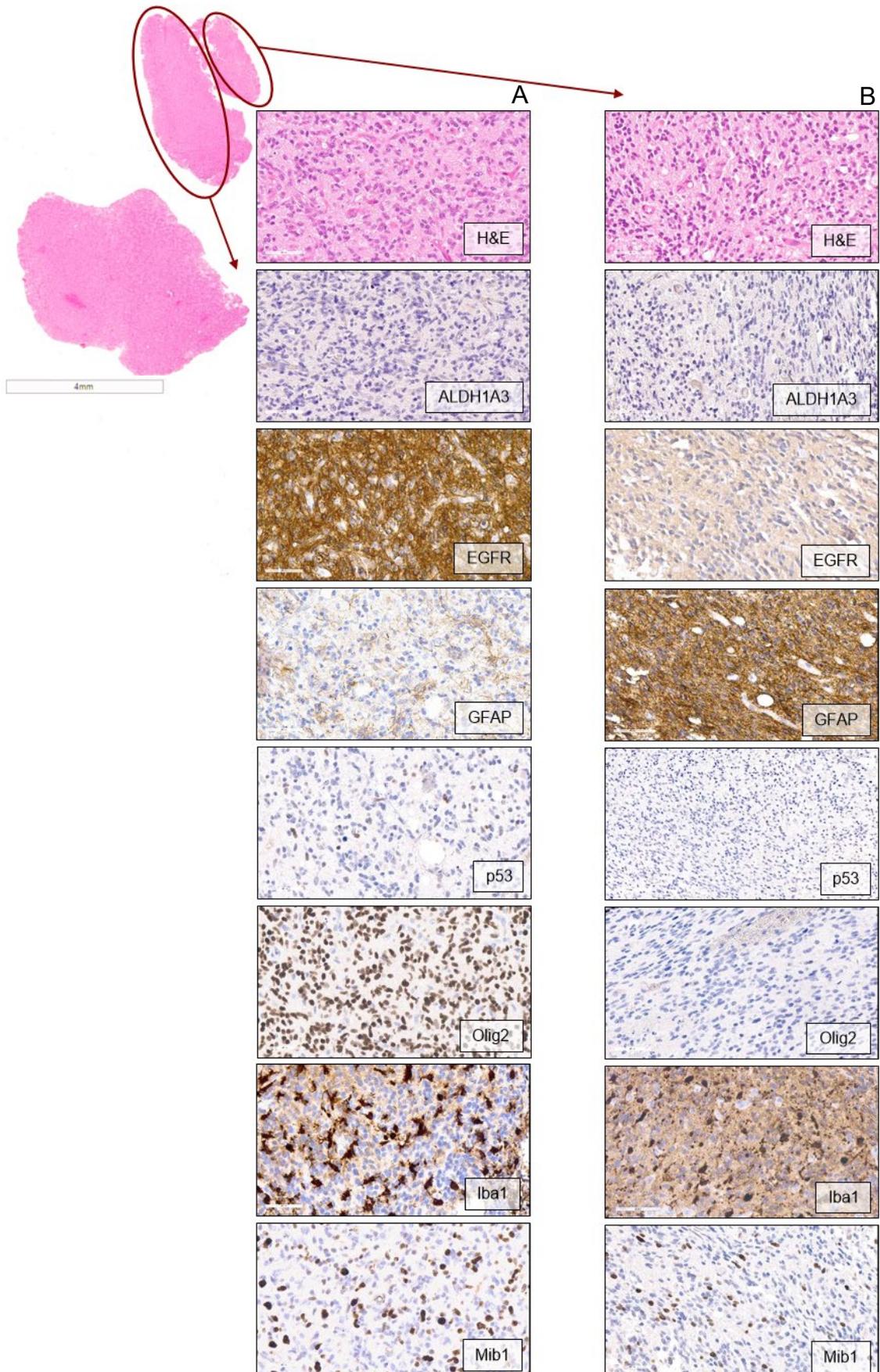


Abbildung 25: **Darstellung der intratumoralen Heterogenität** (Beispiel 2) anhand zweier Fotoserien eines Glioblastoms. In Areal A sind EGFR, Olig2 und Mib1 stark positiv, wohingegen Areal B durch eine Positivität von GFAP und Iba1 gekennzeichnet ist, Balkengrößen 60µm. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

Die Clusteranalyse der Daten unseres Kollektivs untermauert die Beobachtungen am Mikroskop: In den Tumoren konnte sowohl eine *inter-* als auch *intratumoral* heterogene Subtypenexpression nachgewiesen werden, die in den folgenden Diagrammen visualisiert wird (siehe *Abbildung 26*). 18 der 38 (47,4%) Primärtumoren exprimierten beide Subtypen und wurden als „Subtyp-heterogen“ (st-heterogen) klassifiziert. In 15 von 38 Tumoren (39,5%) herrschte eine Dominanz des mesenchymal Mikroglia dominierten Clusters, wohingegen der klassisch proliferative Subtyp nur 5 der 38 Tumoren (13%) dominierte. Tumoren, die vorrangig durch einen Cluster definiert wurden, wurden als „Subtyp-dominant“ (st-dominant) beschrieben.

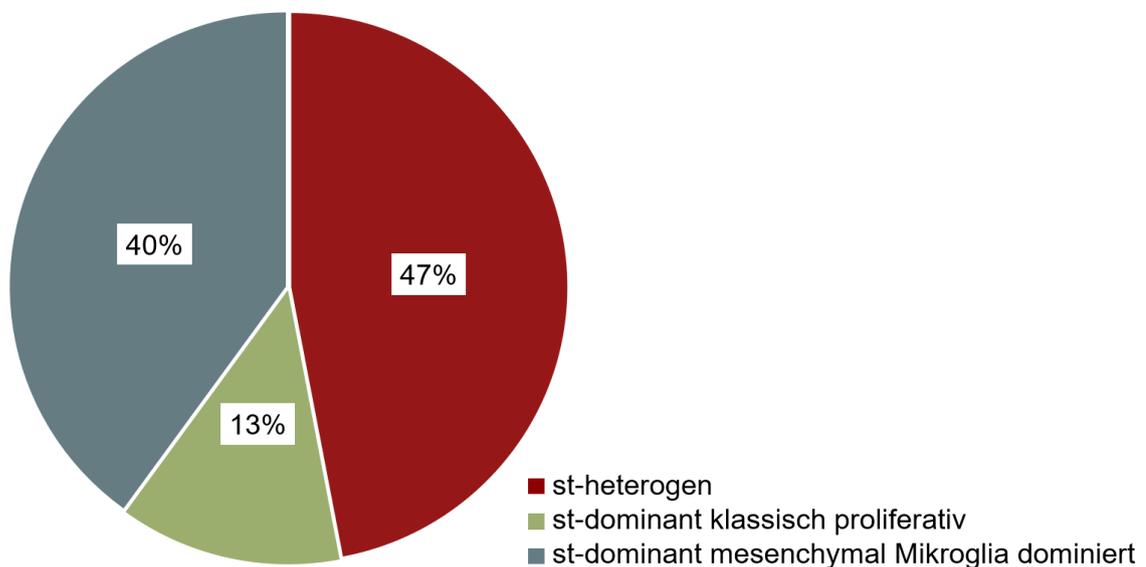


Abbildung 26: **Verteilungsmuster Primärtumoren:** 47% der Tumoren zeigten eine heterogene Subtypenexpression (rot), 40% der Glioblastome wurden von einem mesenchymal Mikroglia dominierten (blau) und 13% von einem klassisch proliferativen Immunreaktivitätsprofil (grün) dominiert.

5.2.2.6 Probengröße und Heterogenität

Da die Probengröße der einzelnen Tumoren stark differierten, was in der Natur des Tumors und der Operation liegt, stellte sich die Frage, ob die Größe der Gewebeprobe mit dem Auftreten von Heterogenität korreliert. Für die Analyse dieser Fragenstellung wurde eine Annäherung an die tatsächliche Fläche verwendet und jene mit der Anzahl der Cluster verglichen. Die Fläche der untersuchten Schnittpräparate variierte in einer Größe von 12,5 mm² bis 658,0 mm² und lag im Mittel bei 376,0 mm². Im Vergleich der Mittelwerte zeigte sich, dass subtyp-dominante Tumoren mit 323 mm² im Kontrast zu heterogenen mit

433 mm² im Mittel eine kleinere Fläche aufweisen. Im t-Test konnte kein Zusammenhang zwischen Probengröße und Heterogenität gefunden werden. Tatsächlich gab es Extremfälle, die eine Pauschalisierung verhindern. So wurden in einem Tumor mit einer Größe von lediglich 45,3 mm² drei Areale markiert, in einem weiteren mit einer Schnittfläche von 12,5 mm² zwei Areale. Demgegenüber wurden in einem Tumor mit 538 mm² ebenfalls nur zwei Areale markiert.

5.2.3 Immunfluoreszenz

Neben den oben genannten Untersuchungen führten wir für ALDH1A3 und Iba1 eine Doppelfärbung durch. Die besondere Beachtung dieser beiden Biomarker erfolgte einerseits aufgrund der positiven Korrelation und der daraus resultierenden Frage, ob ALDH1A3 tatsächlich von Tumorzellen exprimiert wird oder als Marker für Mikroglia Anwendung finden kann.

In der Doppelfärbung (siehe *Abbildung 27*) konnten wir für drei ausgewählte Tumoren zeigen, dass insbesondere Iba1-negative Zellen kräftig ALDH1A3-positiv werden, weswegen davon ausgegangen werden darf, dass weniger die Zellen der Mikroglia als vielmehr die Tumorzellen selbst ALDH1A3 exprimieren.

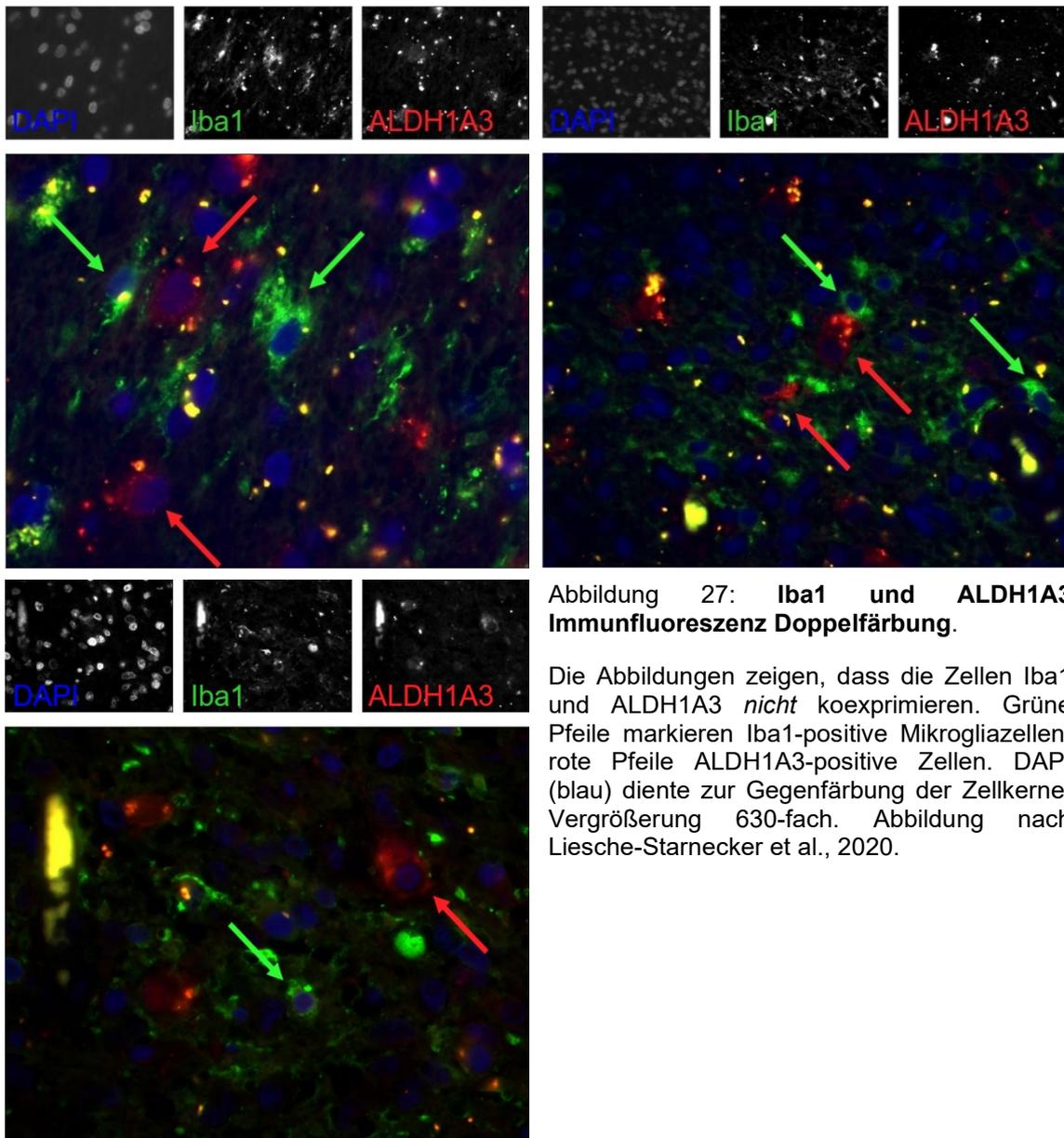


Abbildung 27: Iba1 und ALDH1A3 Immunfluoreszenz Doppelfärbung.

Die Abbildungen zeigen, dass die Zellen Iba1 und ALDH1A3 *nicht* koexprimieren. Grüne Pfeile markieren Iba1-positive Mikrogliazellen, rote Pfeile ALDH1A3-positive Zellen. DAPI (blau) diente zur Gegenfärbung der Zellkerne. Vergrößerung 630-fach. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

5.2.4 Epigenetische Analyse

Die Immunhistochemie erlaubt eine Aussage über die phänotypische Heterogenität auf Proteinebene. Zusätzlich wollten wir überprüfen, ob die gewonnenen Erkenntnisse auch auf epigenetischer Ebene vorhanden sind. Hierfür wurde eine epigenetische Analyse verschiedener Areale eines Tumors jeweils getrennt durchgeführt und die Methylierungsprofile innerhalb eines Tumors miteinander verglichen.

Die nachfolgend dargestellte Methylierungsanalyse unterstützt die aus der Immunhistochemie gewonnenen Erkenntnisse. Gegenübergestellt sind zwei Areale desselben Tumors, die in den vorangegangenen Clusteranalysen einmal

dem klassisch proliferativen und einmal dem mesenchymal Mikroglia dominierten Subtyp zugeordnet wurden. Der Übersicht wegen wurde für die nachfolgenden Abbildung die hierarchische Analyse zur graphischen Darstellung verwendet.

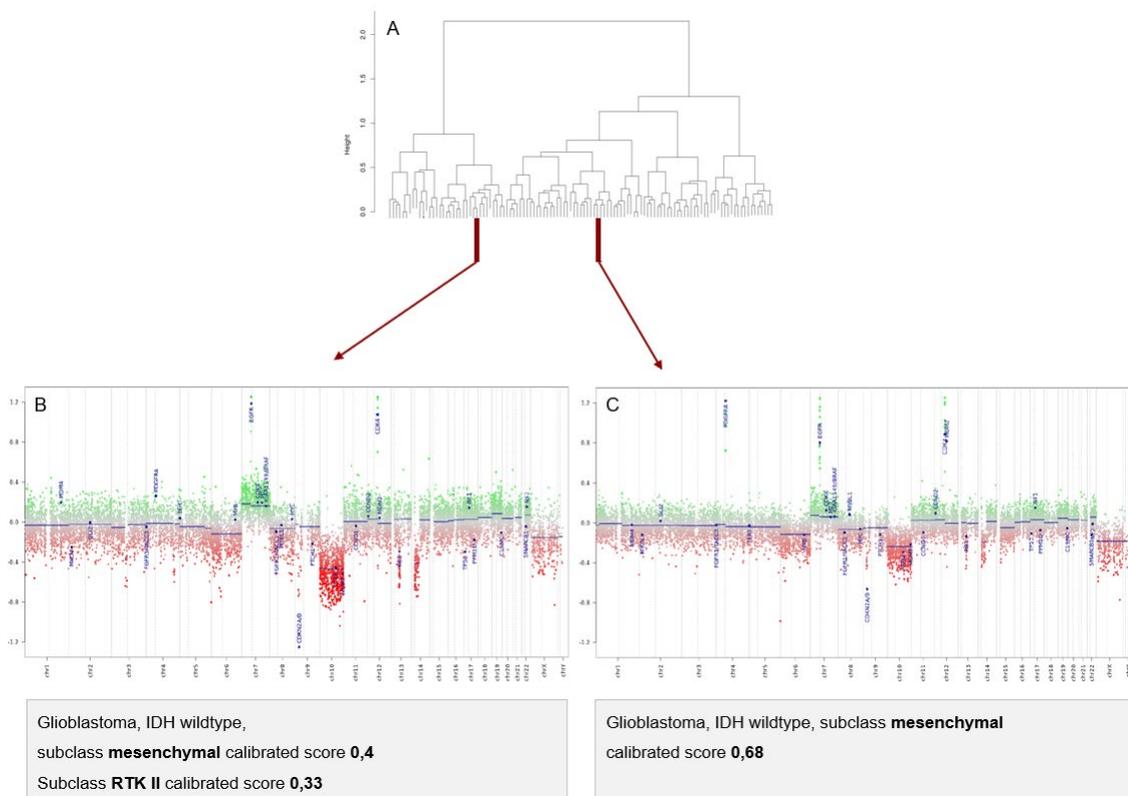


Abbildung 28: **Methylierungsprofile Glioblastom 1**. Zu sehen sind die Methylierungsprofile zweier Regionen eines ausgewählten Glioblastompräparates (B und C) mit Bezug zum Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse (A). Darstellung von Chromosom 1 bis 22, sowie X / Y. Amplifikationen werden durch eine grüne Positivität, Genverluste / Deletionen durch rote negative Abweichungen gezeigt. Zusätzlich sind 29 für Gehirntumoren relevante Genregionen hervorgehoben (Capper et al., 2018; Ceccarelli et al., 2016). In B gut zu erkennen sind eine EGFR-Amplifikation, sowie ein Verlust von Chromosom 10. Im Bildteil C fallen ebenfalls Veränderungen von Chromosomen 7 und 10 auf.

Abbildung 28 stellt ein Beispiel der *intratumoralen* Heterogenität auf epigenetischer Ebene dar. Das Methylierungsprofil in *Abbildung 28 B* wurde dem mesenchymalen Subtyp mit einem Score von 0,4 und dem Rezeptor-tyrosinkinase II (RTK II) Subtyp mit einem Score von 0,33 (sichere Zuordnung ab >0,5) zugeordnet. Der RTK II Subtyp umfasst Tumoren, die zur Mehrheit aus den beiden Großhirnhemisphären entstammen und ein mittleres Patient*innenalter von 61 Jahren aufweisen. Hier sind Veränderungen auf Chromosom 7 zu erwarten (>70%), ein 9p21 und Chromosom 10 Verlust, sowie Alterationen auf Chromosom 19 und 20. Dieser Typ entspricht damit dem klassischen Subtyp der TCGA Klassifikation (Capper et al., 2018; Verhaak et al., 2010).

Tumoren, die in der Analyse dem *mesenchymalen* Typ zugeordnet werden, wie die Region in *Abbildung 28 C* mit einem Score von 0,68, sind ebenfalls typischerweise in den Hemisphären lokalisiert. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 59 Jahren. Charakteristisch – wie auch in unserem Beispiel zu sehen – sind Veränderungen auf Chromosom 7 (>80%), Verlust von 9p21 (>60%) und ein Verlust von Chromosom 10 (>90%), sowie Alterationen im NF1 Gen. Dieses Profil ist zu vergleichen mit dem mesenchymalen Typ nach der TCGA-Klassifikation (Capper et al., 2018; Verhaak et al., 2010).

Das gezeigte Beispiel unterstützt die Hypothese der *intratumoralen* Heterogenität. Zwei Areale ein und desselben Tumors wiesen auf epigenetischer Ebene Charakteristika auf, die eine Zuordnung zu zwei unterschiedlichen Subtypen vermuten lässt. Nachfolgend sind zwei weitere Beispiele der epigenetischen Analyse aufgeführt.

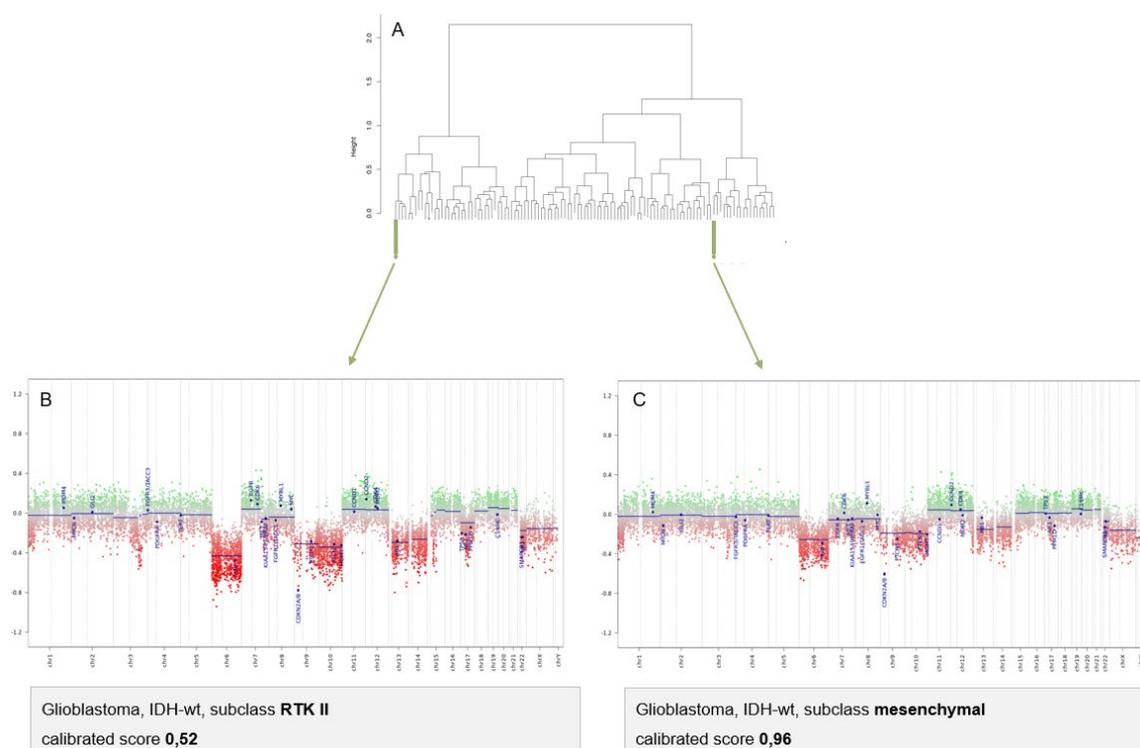


Abbildung 29: **Methylierungsprofil Glioblastom 2.** Zu sehen sind die Methylierungsprofile zweier Regionen eines ausgewählten Glioblastompräparates (B und C) mit Bezug zum Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse (A). Darstellung von Chromosom 1 bis 22, sowie X / Y. Amplifikationen werden durch eine grüne Positivität, Deletionen durch rote negative Abweichungen gezeigt (Capper et al., 2018; Ceccarelli et al., 2016).

Das Methylierungsprofil in *Abbildung 29 B* wurde mit einem Score von 0,52 dem Rezeptortyrosinkinase II (*RTK II*) Typ zugeordnet. Die Region in *Abbildung 29 C*

wurde mit einem Score von 0,96 als mesenchymaler Methylierungstyp eingestuft. Interessanterweise wurden im Gegensatz zur hierarchischen Clusteranalyse die beiden Areale mittels PAM dem gleichen Subtyp zugeordnet. Auch in der PCA wurden sie nahe beisammen lokalisiert.

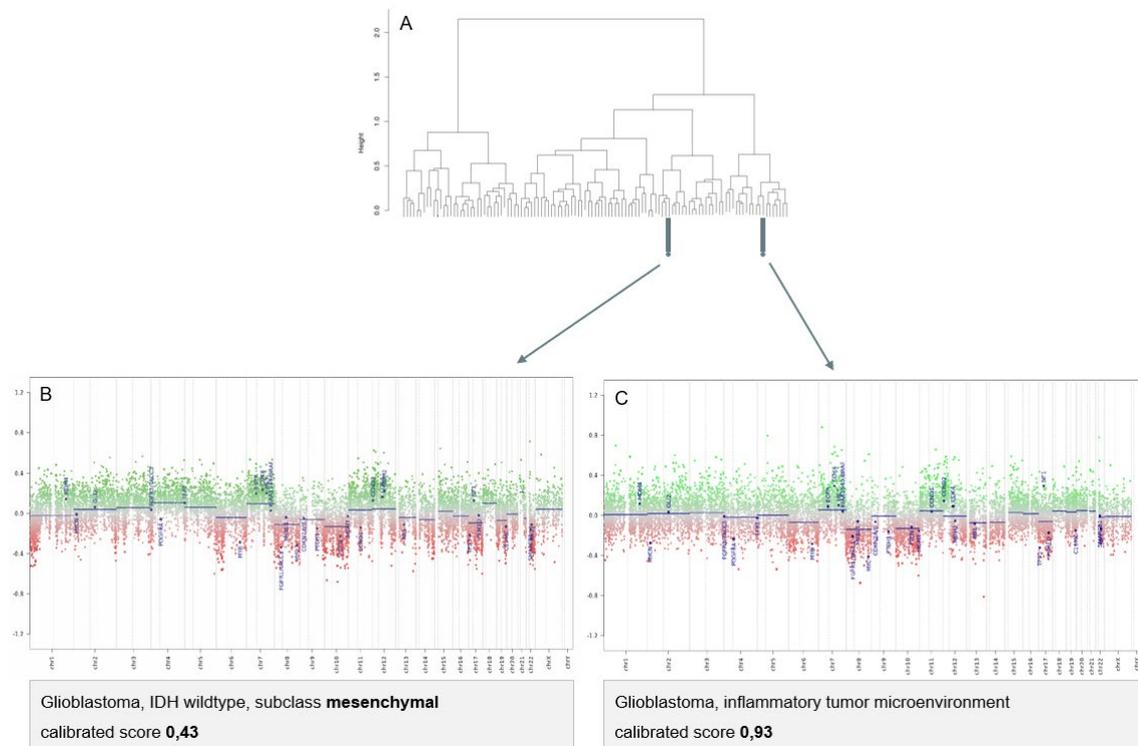


Abbildung 30: **Methylierungsprofil Glioblastom 3**. Zu sehen sind die Methylierungsprofile zweier Regionen eines ausgewählten Glioblastompräparates (B und C) mit Bezug zum Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse (A). Darstellung von Chromosom 1 bis 22, sowie X / Y. Amplifikationen werden durch eine grüne Positivität, Deletionen durch rote negative Abweichungen gezeigt (Capper et al., 2018; Ceccarelli et al., 2016).

Für die dritte Analyse wurde ein Tumor gewählt, dessen Areale in der auf Immunhistochemie basierten Auswertung dem mesenchymalen Cluster zugeordnet wurden, wobei eine Region eine starke p53 Positivität aufwies. In der epigenetischen Untersuchung zeigte sich in *Abbildung 30 B* ein mesenchymales Profil (Zuordnungsscore 0,43), wohingegen die Region in *Abbildung 30 C* einer inflammatorischen Tumorumgebung zugeordnet wurde (Score 0,93). Diese entspricht keinem eigenen Subtyp, sondern spiegelt ein Tumoreal mit starker Leukozyteninfiltration wider. Häufig wird sie in nekrotischen oder hämorrhagischen Bereichen gefunden (Capper et al., 2018).

Die Detailergebnisse wollten wir anschließend miteinander in Bezug setzen. Hierzu verwendeten wir die PCA. Zur Veranschaulichung der Arealzuordnung

wurde in den obigen Grafiken das Dendrogramm der hierarchischen Analyse hinzugefügt. In den nachfolgenden Analysen wurde nur der Vergleich zur PAM Analyse gezogen.

In *Abbildung 31* ist die PCA Analyse der drei Glioblastomproben dargestellt. Die in blau dargestellten Areale von Glioblastom 3 (vgl. *Abbildung 30*) platzierten sich sehr nahe nebeneinander. Beide wurden auch mittels PAM dem mesenchymalen Subtyp zugeordnet. So verhält es sich auch für das in grün gezeigte Glioblastom 2 (vgl. *Abbildung 29*), das analog der PAM Analyse dem klassisch proliferativen Subtyp entspricht. Die Proben von Glioblastom 1 (vgl. *Abbildung 28*) splitteten sich hingegen auf und Areal 1 (klassisch proliferativ) wanderte Richtung Glioblastom 2, wohingegen Areal 2 (mesenchymal Mikroglia dominiert) näher zu Glioblastom 3 rückte.

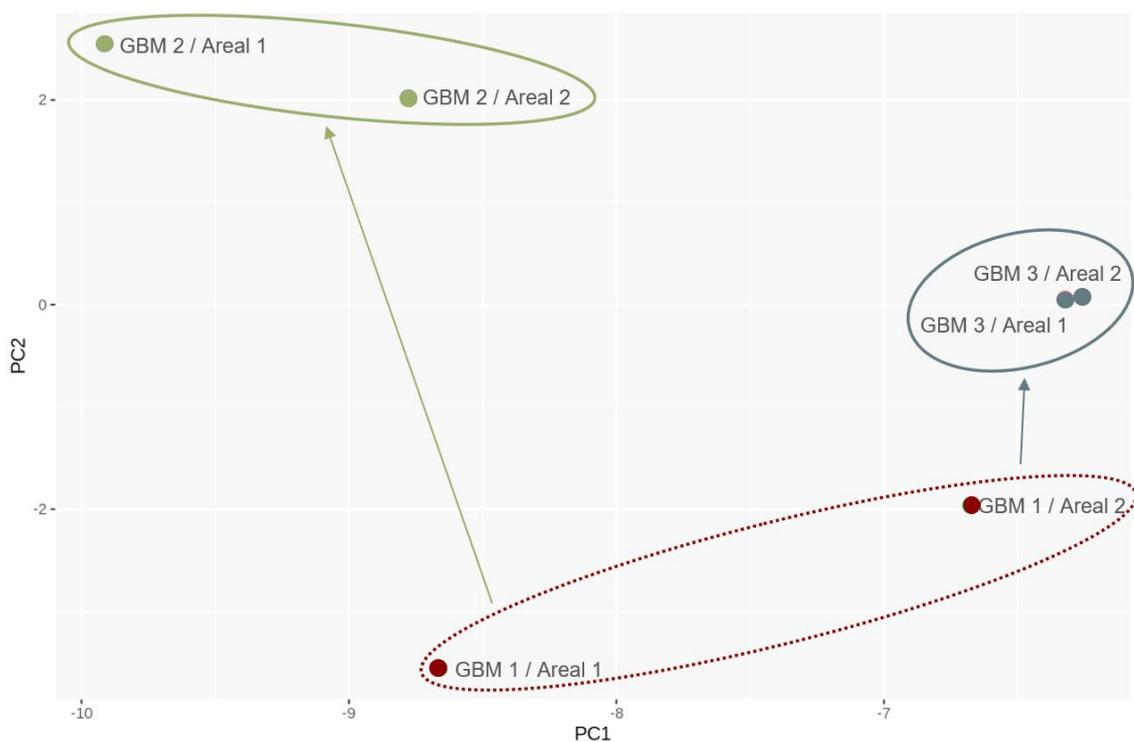


Abbildung 31: **PCA** der Primärtumoren mit dem Classifier von Ceccarelli et al., 2016. Die Areale aus Glioblastom 2 (klassisch proliferativ - grün) und 3 (mesenchymal Mikroglia dominiert - blau) ordneten sich jeweils nahe beisammen an, wohingegen sich Glioblastom 1 (rot) aufsplittete: Ein Areal bewegte sich Richtung Glioblastom 2 und das zweite Richtung Glioblastom 3. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

5.3 Vergleich der Primärtumor-Rezidiv-Paare: Dominanz des mesenchymal Mikroglia dominierten Phänotyps

Intratumorale Heterogenität ist kein Ereignis, das sich exklusiv auf die Analyse von Primärtumoren beschränkt. Im Gegenteil, sie ist auch auf einer zeitlichen Ebene durch den Vergleich korrespondierender Primärtumor-Rezidivpaare präsent. Die Analyse der Phänotypveränderung im Laufe der Tumorprogression ist von besonderem Interesse, da sie Rückschlüsse auf das Therapieansprechen ermöglicht. Im Falle einer temporalen *intratumoralen* Heterogenität können Alterationen in der Subtypenexpression Hinweise auf mögliche Resistenzen eines Subtyps geben.

Im Kollektiv sind 21 korrespondierende Tumorkaare enthalten, die in die folgende Analyse miteinbezogen wurden. Zuerst wurden die Areale der Rezidive durch Distanzberechnungen den beiden Clustern zugeordnet. Hierbei zeigte sich ein starker Überhang des mesenchymalen Immunreaktivitätsprofils, der im folgenden Abschnitt genauer erläutert wird.

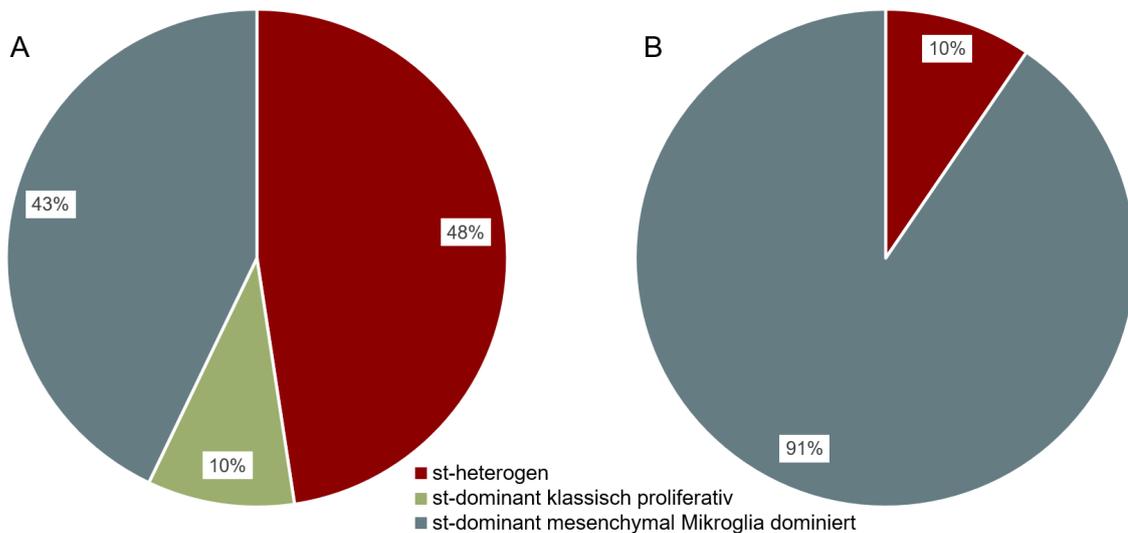


Abbildung 32: **Vergleich der Clusterexpression** in Primärtumoren (A) und ihren korrespondierenden Rezidiven (B). Zu sehen ist ein Zuwachs des mesenchymal Mikroglia dominierten Subtyps in den Rezidiven (blau).

Abbildung 32 zeigt die Clusterzuordnung der Primärtumoren (A) neben der Verteilung der Rezidive (B). Nur 9,5% der Rezidive zeigten eine heterogene Subtypenexpression wohingegen der Wert bei den Primärtumoren bei 47,6% lag. Besonders interessant ist das vermehrte dominante Auftreten des mesenchymal Mikroglia dominierten Subtyps. 90,5% der Rezidive hatten ein mesenchymales Immunreaktivitätsprofil. Dieses Ergebnis verdeutlicht die *intratumorale* Hetero-

genität auf Ebene korrespondierender Tumorklaress und indiziert eine Selektion des mesenchymalen Phänotyps.

Zur Veranschaulichung der temporalen Heterogenität in Primärtumoren und zugehörigen Rezidiven dient zusätzlich *Abbildung 33*. Das sogenannte Sankey-Diagramm visualisiert die Veränderung der untersuchten Tumoren im Detail. Von den 21 Tumorklaress ist die Clusterzuordnung einmal links im Bild im Primärtumor und rechts im Rezidiv dargestellt. Dazwischen liegt die Phase der Therapie und des anschließend erneuten Tumorwachstums. In den Analysen sieht man zwar nur das Ergebnis dieser Phase in der Clusterzuordnung, doch dadurch können etwaige Rückschlüsse auf die Biologie der Tumorprogression gezogen werden. Von den 21 Primärtumoren (links im Bild) wurden zwei als subtyp-dominant klassisch proliferativ eingeteilt, die im Laufe der Tumorprogression einen Switch hin zu einem mesenchymal Mikroglia dominierten Subtyp erfuhren. Alle neun der im Primärtumor als subtyp-dominant mesenchymal definierten Tumoren wiesen eine hohe Stabilität in der Subtypenzuordnung auf und behielten ihre Zuteilung im Rezidiv. Besonders interessant ist die Gruppe der heterogenen Tumoren: Nur zwei der 10 untersuchten Samples sind auch im Rezidiv noch als heterogen einzustufen, bei allen anderen Tumoren dominierte im Verlauf der Erkrankung der mesenchymale Subtyp.

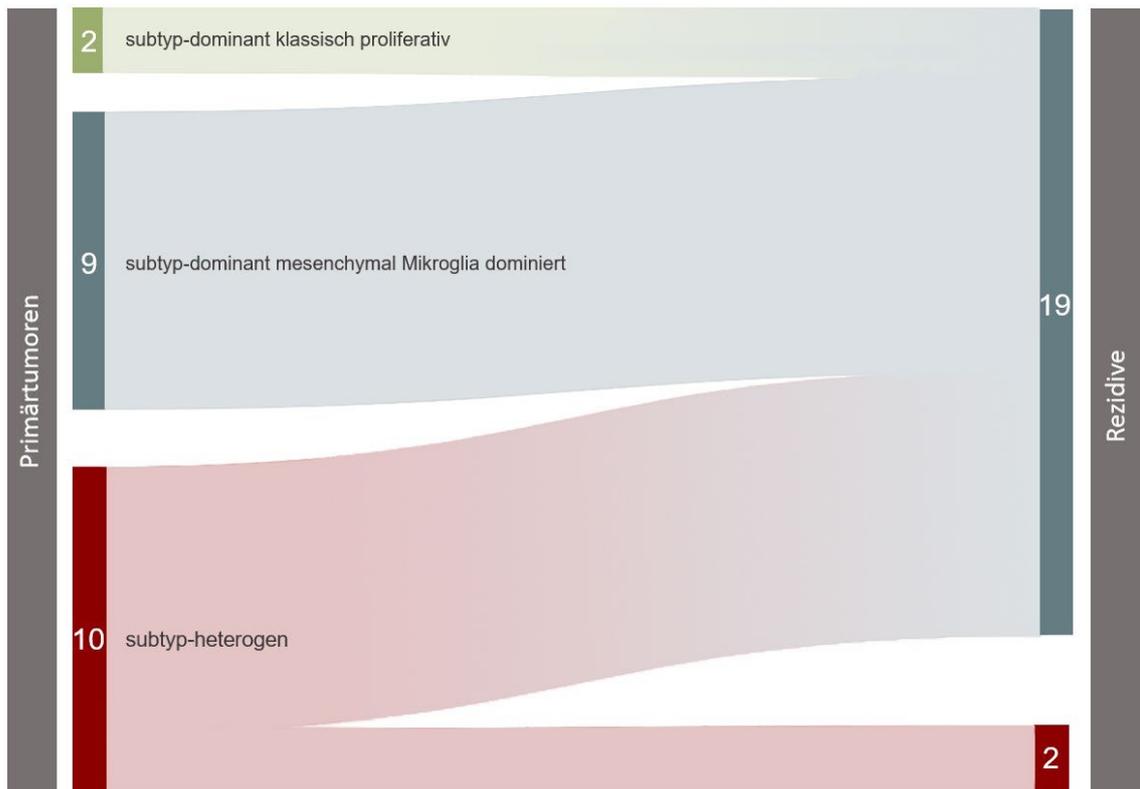


Abbildung 33: **Sankey-Diagramm.** Veränderung der Clusterzuordnung zwischen Primärtumor und Rezidiv. Links im Bild ist die Einteilung der Primärtumoren zu sehen: 10 wurden als st-heterogen, 9 als st-dominant mesenchymal Mikroglia dominiert und 2 als st-dominant klassisch proliferativ eingeteilt. Diese Zuteilung veränderte sich im Rezidiv: Hier war die Mehrzahl (19/21) st-dominant mesenchymal Mikroglia dominiert. Nur zwei der als heterogen eingestuft Tumoren behielten ihre Zuordnung im Rezidiv, der Rest war entweder stabil (9 bleiben st-dominant mesenchymal Mikroglia dominiert), erfuhren einen Subtypenswitch (die beiden st-dominant klassisch proliferativen wurden zu st-dominant mesenchymal Mikroglia dominiert) oder es dominierte der mesenchymal Mikroglia dominierte Subtyp.

In der folgenden Abbildung sind einzelne Biomarker und deren Expressionswerte im Vergleich zwischen Primärtumoren und Rezidiven dargestellt.

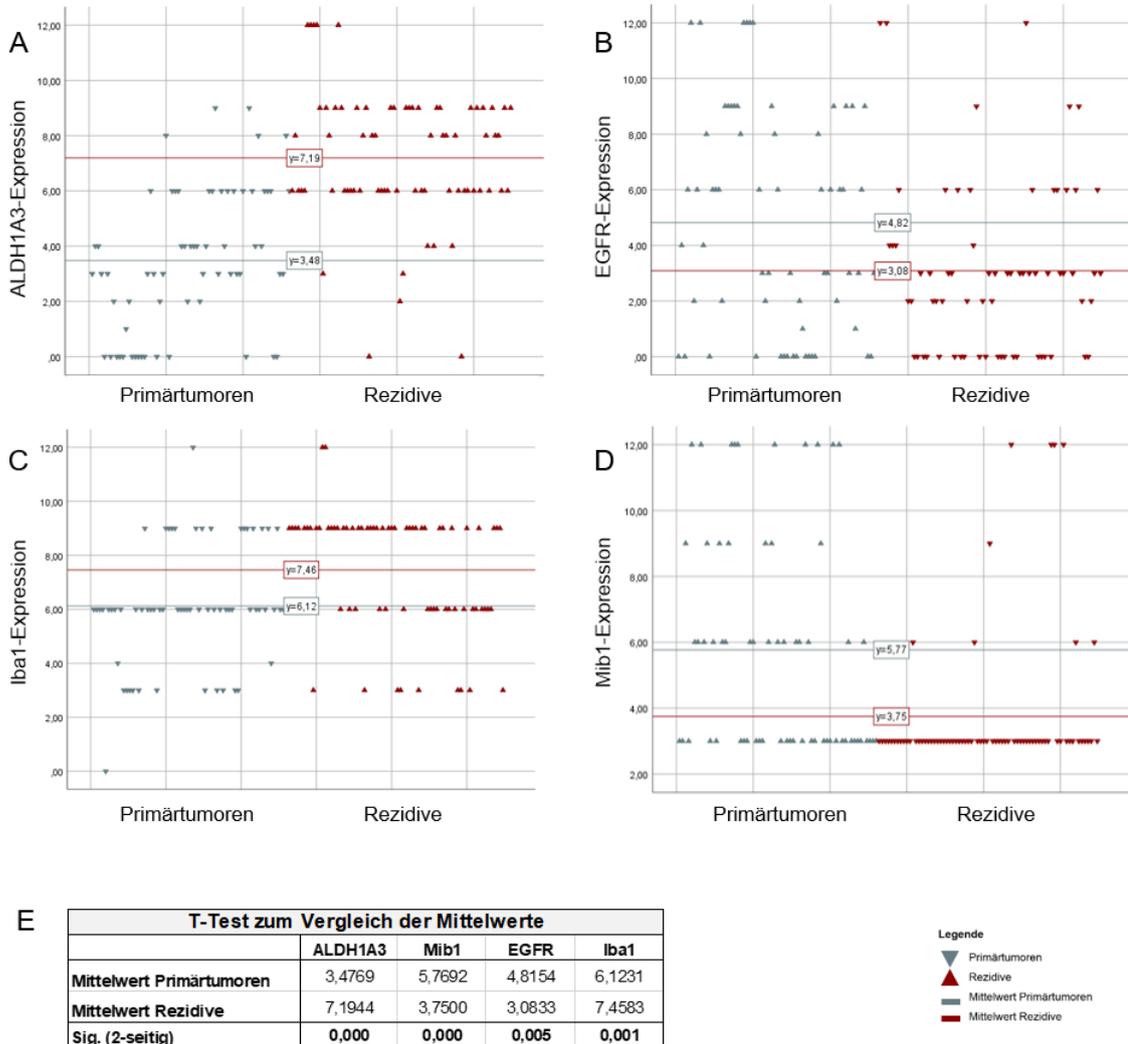


Abbildung 34: **Gegenüberstellung der Expressionen in Primärtumoren und Rezidiven** dargestellt in einem Punktdiagramm. Beigefügt sind die zugehörigen T-Tests zum Vergleich der Mittelwerte (E). Primärtumoren werden in blauen Dreiecken abgebildet, Rezidive sind dunkelrot. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der beiden Gruppen ebenso gekennzeichnet. ALDH1A3 (A) und Iba1 (C) weisen im Rezidiv eine Zunahme der Expression auf, wohingegen EGFR (B) und Mib1 (D) in den Primärtumoren vermehrt exprimiert werden. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

Abbildung 34 A zeigt einen signifikanten Anstieg der ALDH1A3-Expression in Rezidiven. Im Vergleich zu den Primärtumoren, bei denen der immunreaktive Score im Mittel 3,5 betrug, stieg dieser in den Rezidiven auf einen Wert von 7,2 ($p=0,000$). Eine ebenfalls starke und signifikante Erhöhung der Immunreaktivität wies Iba1 auf (siehe Abbildung 34 C). Der Mittelwert für die Mikrogliazellen lag hier bei 6,1 im Primär- und bei 7,5 im Rezidivtumor ($p=0,001$).

Diese zwei Beispiele spiegeln die Dominanz des mesenchymalen Phänotyps im Laufe der Tumorprogression wider.

Demgegenüber stehen die beiden Marker EGFR (siehe *Abbildung 34 B*) und Mib1 (siehe *Abbildung 34 D*). Ihre immunreaktiven Scores waren in den Rezidiven signifikant verringert ($p=0,005$ und $p=0,000$). Dies indiziert eine verminderte Ausprägung von proliferativen Regionen im Rezidiv, wohingegen die Veränderung des Mikroenvironments, gekennzeichnet durch den Iba1-Anstieg charakteristisch für die Tumorprogression zu sein scheint.

Der nun folgende Vergleich zweier korrespondierender Tumorpaaare in den *Abbildungen 35 und 36* soll die eben erläuterten Ergebnisse veranschaulichen.

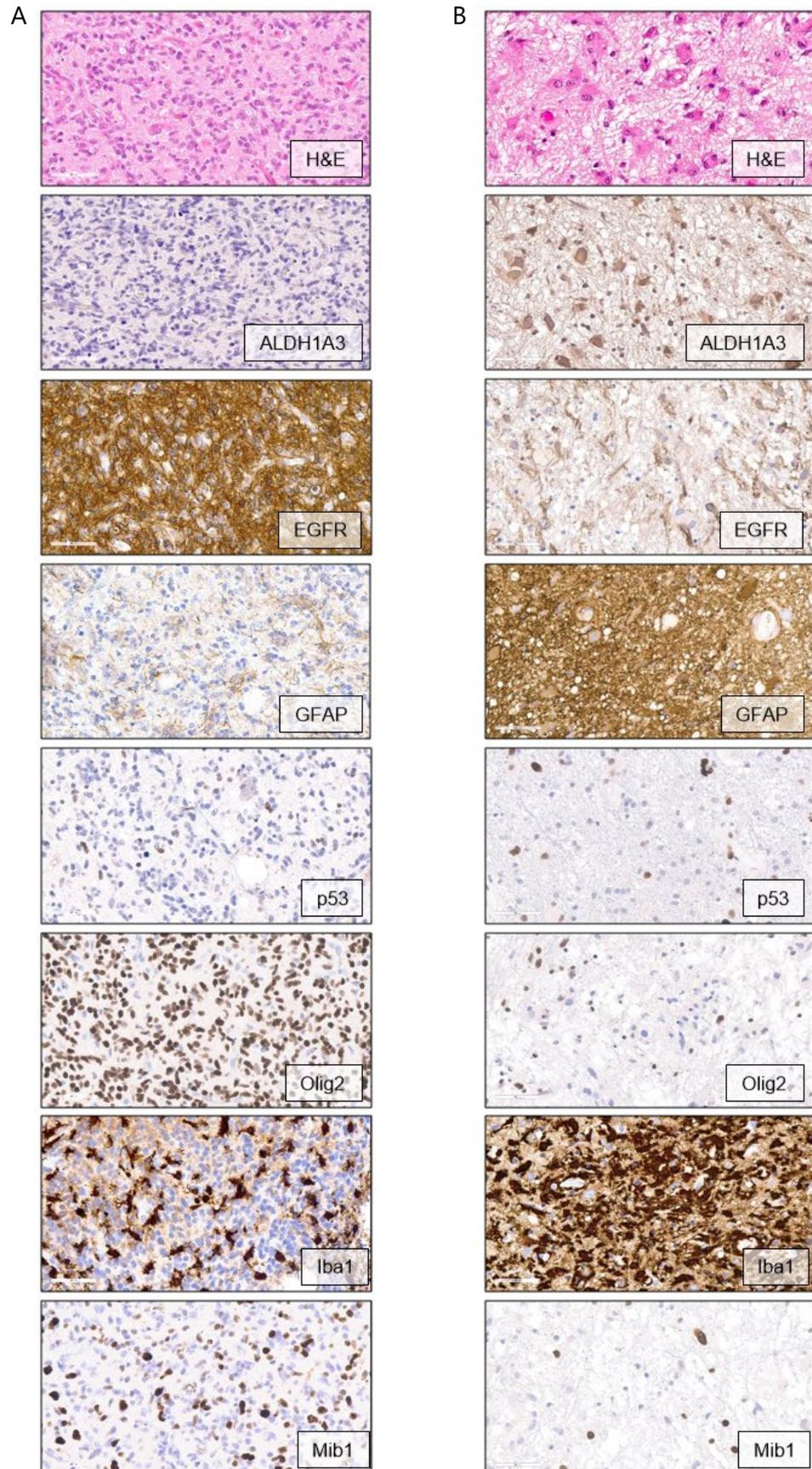


Abbildung 35: **Darstellung der temporalen Heterogenität (Beispiel 1)** in einem korrespondierenden Primärtumor - Rezidiv - Paar. Zu erkennen ist ein klassisch proliferatives Immunreaktivitätsprofil im Primärtumor (A), wohingegen das Rezidiv (B) eine hohe Positivität an mesenchymalen Markern aufweist, Balkengrößen 60µm.

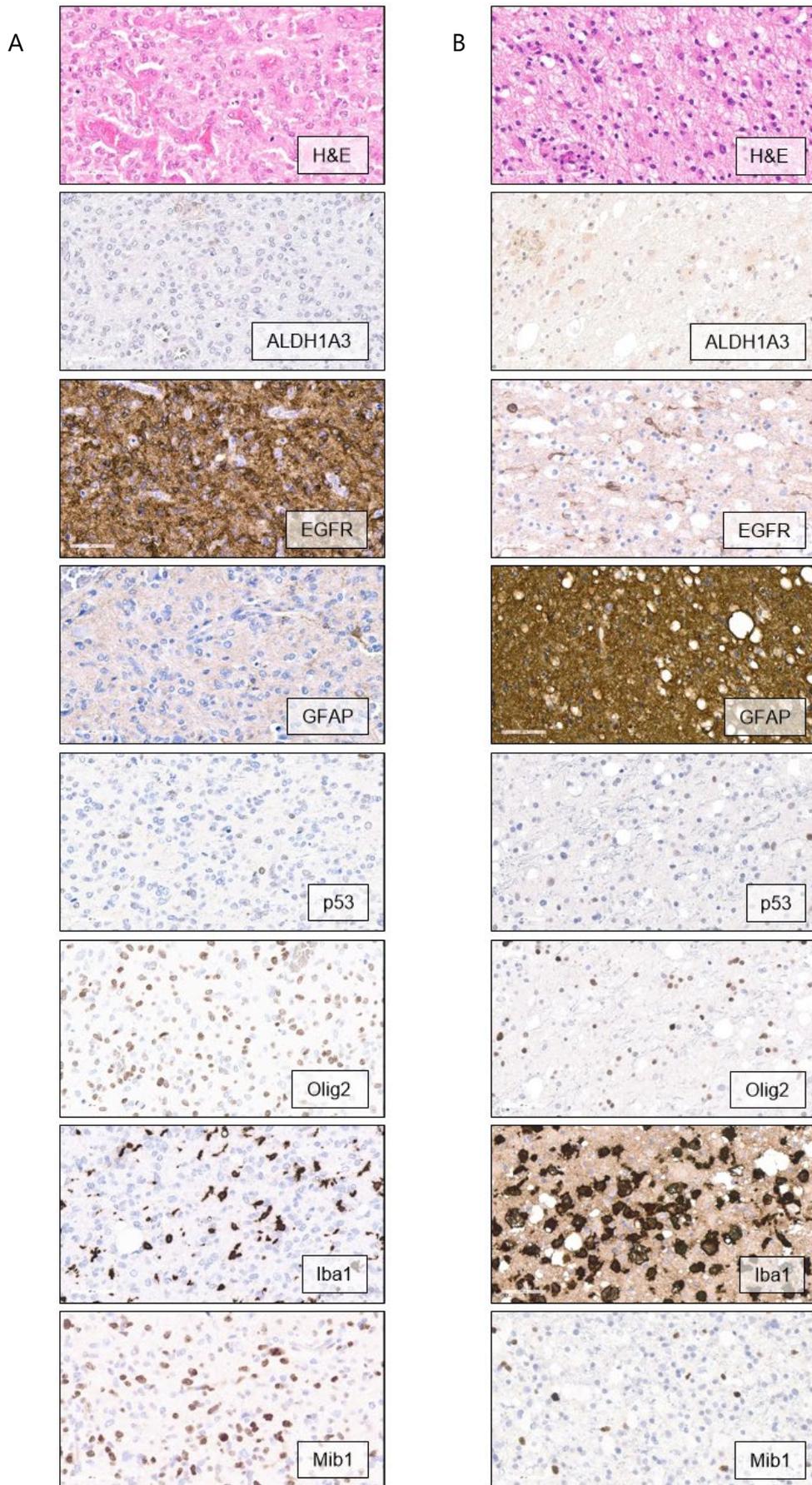


Abbildung 36: **Darstellung der temporalen Heterogenität (Beispiel 2)** in einem korrespondierenden Primärtumor - Rezidiv - Paar. Der Primärtumor ist charakterisiert durch ein klassisch proliferatives Immunreaktivitätsprofil (A), während sich im Laufe der Tumorprogression eine Dominanz des mesenchymalen Phänotyps zeigt (B), Balkengrößen 60µm.

5.3.1 Epigenetische Analyse

Die Tumorbio­logie auf epigenetischer Ebene sollte nun bei Primärtumor-Rezidivpaaren untersucht werden. Hierfür wurden exemplarisch Tumorpaa­re ausgewählt und analog des Verfahrens wie bei den Primärtumoren analysiert. In *Abbildung 37* sind die Ergebnisse der PCA visualisiert: Die Proben einzelner Patient*innen sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Die drei Proben (Aol), die in der PAM Analyse dem klassisch proliferativen Subtyp zugeteilt sind, ordneten sich im Graphen in der linken Bildhälfte an, wohingegen die mesenchymalen Tumorproben rechts gesammelt auftraten. Das in grün gehaltene Tumorbeispiel veranschaulicht eine ausgeprägte temporale *intratumorale* Heterogenität. Die gelb markierten Proben verdeutlichen die Distanz von Primärtumor und Rezidiv, wenn auch beide als mesenchymal zugeordnet sind.

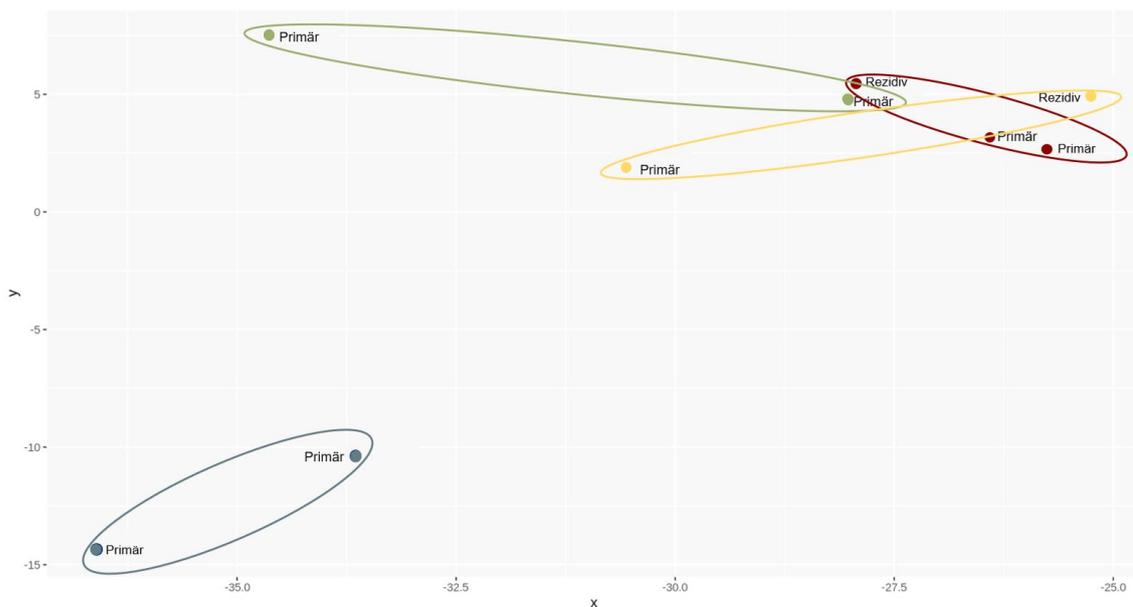


Abbildung 37: **PCA** der EPIC-Daten aus der Analyse von Primärtumoren und Rezidiven. Zusammengehörige Paare sind jeweils in der gleichen Farbe abgebildet. Dunkelblau umkreist sind diejenigen Tumorsamples, die in der Clusteranalyse dem klassisch proliferativen Subtyp zugeordnet wurden, wohingegen die rot umrahmten Beispiele mesenchymalen Proben entsprechen.

5.4 Klinische Korrelation

Dass die eben beschriebenen Ergebnisse nicht rein wissenschaftlichen Interesses sind, sondern eine klinische Relevanz aufweisen, zeigt die Korrelation mit klinischen Überlebensdaten. 20 Patient*innen mit bestätigtem nicht-methylierten MGMT-Promotor-status sind in dieser Analyse integriert. Im Mittel

lag die Überlebenszeit bei 22 Monaten. Patient*innen mit subtyp-dominanten Tumoren (n=10) hatten mit einem mittleren Überleben von 25 Monaten ein besseres Outcome, wohingegen die als heterogen eingestuft Patient*innen (n=10) durchschnittlich schon nach 19 Monaten verstorben sind. In *Abbildung 38* ist die Kaplan-Meier-Überlebenskurve dargestellt. Subtyp-heterogene Tumoren (rote Kurve) zeigten im Vergleich zu subtyp-dominanten Tumoren (blaue Kurve) eine Tendenz zu einem kürzeren Überleben. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,166$).

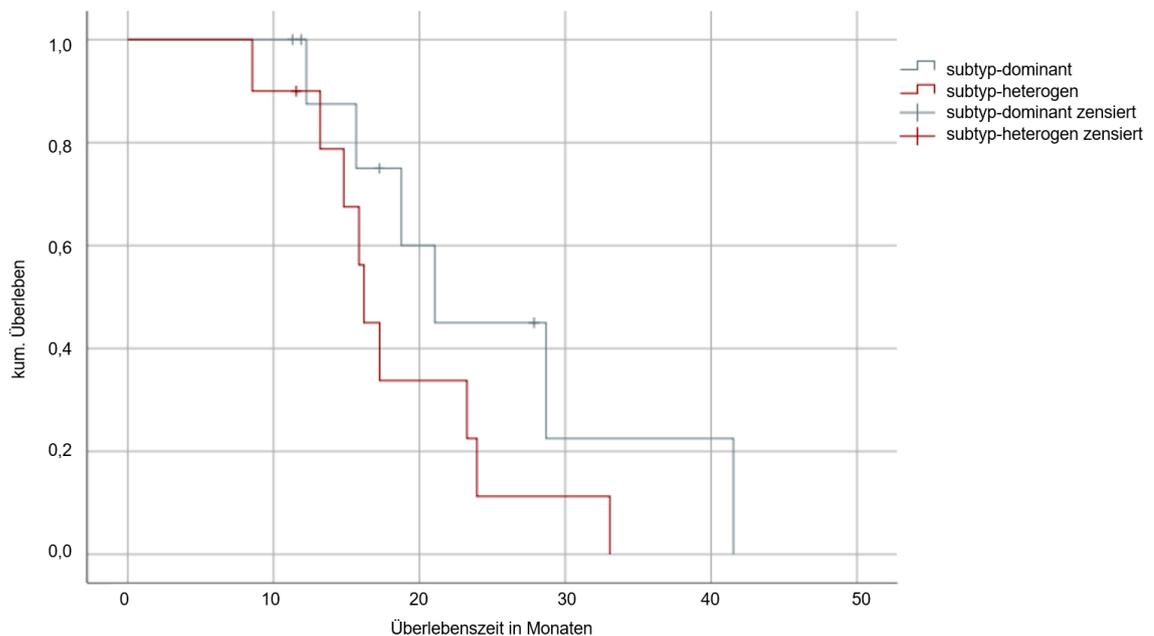


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Zu sehen ist eine Tendenz zu einem kürzeren Überleben der subtyp-heterogenen Tumoren (rot) im Vergleich zur Gruppe der subtyp-dominanten Tumoren (blau) ($p = 0,166$). Eingeschlossen wurden nur Tumoren mit nicht-methyliertem MGMT-Promotor, die in *Abbildung 17* als solche gekennzeichnet sind. Abbildung nach Liesche-Starnecker et al., 2020.

6 DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit demonstrieren, dass die Heterogenität ein zentrales Attribut des Glioblastoms ist. Mittels der Immunhistochemie können zwei in ihrem Expressionsprofil differierende Subtypen definiert werden, die dem klassischen und dem mesenchymalen Typ nach Verhaak zugeordnet werden können (Verhaak et al., 2010). Diese treten lokal in ein und demselben Tumor auf (*intratumorale* Heterogenität) und finden sich ebenso auf *intertumoraler* Ebene. Die hier definierte Heterogenität spiegelt sich in der Tumorprogression wider, wobei der mesenchymale Subtyp in den Rezidivtumoren dominiert.

6.1 Immunhistochemie-kompatible Marker zur Subklassifizierung von Glioblastomen

Für die Immunphänotypisierung sind ALDH1A3, EGFR, GFAP, Iba1, Mib1, Olig2 und p53 geeignete Biomarker, da sie eine *inter-* und *intratumoral* stark variierende Ausprägung zeigen und reproduzierbar und eindeutig auswertbar sind.

Um eine mögliche heterogene Verteilung der Autophagieaktivität zu detektieren, wurde der Biomarker **p62** verwendet. Jedoch erlaubt das Färbungsmuster von p62 keine konkrete Aussage. Die parallele Immunreaktivität von Kernstrukturen, diffuser Zytoplasmaanfärbung und sogenanntem Dot-like-Staining ist für eine valide Auswertung nicht spezifisch genug. Diese Schwierigkeiten sind kongruent zu Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, wobei jene ein positives Dot-like-Staining als Indikator für Autophagie vorschlägt (Schläfli et al., 2015). Unserer Ansicht nach ist die Gefahr einer Missinterpretation bei den diversen Färbungsmustern zu hoch, wonach der Antikörper nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde.

Ebenso ungeeignet für immunhistochemische Heterogenitätsstudien ist der Biomarker **CD44**, der durch seine kräftige, universal homogene Positivität keine Aussage über die Heterogenität der Glioblastome zulässt. In der vorliegenden Arbeit werden die Tumoreale zu einem klassisch proliferativen und einem mesenchymal Mikrogliia dominierten Subtyp zugeordnet. Eine den mesenchymalen, klassischen und proneuralen Subtypen definierende Studie zeigte, dass CD44 in Glioblastomen vom klassischen und mesenchymalen

Subtyp eine homogene Anreicherung aufweist (Pietras et al., 2014). Diese Ergebnisse stimmen mit den hier gewonnenen Resultaten überein und legen nahe, dass CD44 nicht zur Differenzierung zwischen klassischem und mesenchymalem Subtyp in Glioblastomen geeignet ist.

Letztlich wurde auch der Biomarker **YKL-40** aus den Untersuchungen ausgeschlossen. In der Clusteranalyse zeigt sich sowohl in mesenchymalen als auch in klassisch proliferativen Tumoren eine annähernd gleich starke Expression, die keine eindeutige Zuteilung zu einem Subtyp erlaubt.

6.2 Regionale Heterogenität in Glioblastomen: Subklassifizierung in einen klassisch proliferativen und mesenchymal Mikroglia dominierten Phänotyp

Durch eine Clusteranalyse der immunhistochemisch nachgewiesenen Biomarkerexpression kann die Subklassifizierung der Glioblastome in einen klassisch proliferativen und mesenchymalen Mikroglia dominierten Phänotyp bestätigt werden. Die statistischen Ergebnisse stützen die Beobachtung, dass diese Subtypen sowohl *inter-* als auch *intratumoral* vorkommen. Die *intratumorale* Heterogenität wurde bislang hauptsächlich durch Einzelzellanalysen beschrieben (Patel et al., 2014), doch ist es die Immunhistochemie, die die regionale Heterogenität im Tumorgewebe sichtbar werden lässt und zeigt, dass tatsächlich abgrenzbare Areale unterschiedlichen Subtyps im Glioblastom existieren.

Dass die Subklassifizierung mittels der Immunhistochemie möglich ist und somit auch in die Routinediagnostik miteinfließen kann, ist eine wichtige Erkenntnis. Die bislang mit dieser Methode publizierten Ergebnisse beschreiben ebenfalls eine Heterogenität auf Proteinebene, sind jedoch häufig vor der WHO-Klassifikation von 2016 (Louis et al., 2016) entstanden und beschränken sich vielfach auf *intertumorale* Untersuchungen. Conroy et al. 2014 beschreiben beispielsweise drei Subtypen, wobei der *klassische* durch EGFR charakterisiert wird, und GFAP als potentieller *mesenchymaler* Marker diskutiert wird. Soweit stimmt dies mit den hier vorliegenden Erkenntnissen überein. Der dritte Subtyp – der *Proneurale* – sei durch IDH-mutierte Tumoren gekennzeichnet, die nach aktuellem Kenntnisstand als eigene Entität gelten und demnach getrennt

analysiert werden müssen (Klughammer et al., 2018). Le Mercier et al., 2012 versuchten durch einen neuen Ansatz die Heterogenitätsstudien zu vereinfachen. Mit immunhistochemischen Analysen von den drei Biomarkern EGFR, PDGFRA und p53 gelang ihnen eine Einteilung in *proneurale* (PDGFRA und p53), *klassische* (EGFR) und *andere* Typen, die keinen der genannten Marker exprimieren. Eine mit den vorliegenden Ergebnissen weitgehend übereinstimmende, sich jedoch in der Nomenklatur unterscheidende Einteilung schlägt die Arbeitsgruppe von Motomura et al., 2012 vor. GFAP und CD44 charakterisieren hiernach den *mesenchymalen* Subtyp, wohingegen p53 und Olig2 für den *oligodendrocyte precursor* Subtyp ausschlaggebend sind. Von Popova et al., 2014 stammt eine weitere immunhistochemische Studie, die die Subklassifizierung in mesenchymal und klassisch vorschlägt, doch auch hier wird ein proneuraler Subtyp definiert. Eine aktuelle Studie, die ebenfalls IDH-mutierte Glioblastome einschloss, zeigt die Subtypisierung auf *intertumoraler* Ebene. Unter den IDH-wt Glioblastomen erstellen sie eine Einteilung in klassische und mesenchymale Tumoren (Nagy et al., 2019).

Die eben dargestellten Ergebnisse aus vorhandenen Studien werden durch die Erkenntnisse der vorliegenden Forschungsarbeit untermauert. In ihnen konnte ebenfalls eine Subklassifizierung der Glioblastome dargestellt werden und der mesenchymale und klassische Subtyp sind in der Markerexpression kongruent mit den hier gewonnenen Ergebnissen. Die oben aufgeführten Untersuchungen beschränken sich auf *intertumorale* Differenzen. Für einen Fortschritt in der Therapie von Glioblastomen ist vor allem die *intratumorale* Heterogenität von Bedeutung, da sie als einer der Kerngründe angesehen wird, die einen maximalen Therapieerfolg (bislang) verhindert.

Im Vergleich zu älteren Heterogenitätsstudien an Glioblastomen fehlt in dieser Arbeit der *proneurale* Subtyp (Le Mercier et al., 2012; Motomura et al., 2012). Zu diesem Subtyp gehören vor allem Tumoren, die durch ein besseres Überleben sowie ein jüngeres Patient*innenalter gekennzeichnet sind (Verhaak et al., 2010). Die Assoziation des proneuralen Subtyps zu den mit besserem Outcome beschriebenen IDH-Mutationen (Conroy et al., 2014; Klughammer et al., 2018) legt nahe, dass dieser Subtyp mit IDH-mutierten Tumoren übereinstimmt, weswegen er in dieser Arbeit nicht zur Ausprägung kommt.

In frühen Heterogenitätsstudien wird ein vierter, der *neurale* Subtyp genannt (Verhaak et al., 2010). Eine aktuelle Überlegung hierzu ist, dass dieser aus Kontamination mit normalem Hirngewebe entsteht, da er vermehrt am Tumorrand aufgefunden wird (Q. Wang et al., 2017).

Das Vorliegen einer Heterogenität wird durch die Methylierungsanalyse validiert. Die Methylierungsprofile stimmen weitestgehend mit den definierten Subtypen überein und unterstreichen das Vorhandensein der Heterogenität, sowohl *inter-*, als auch *intratumoral*. In den letzten Jahren wurde vermehrt der Fokus auf epigenetische Untersuchungen an Glioblastomen gesetzt. In Einzelzellanalysen konnten bereits variable Methylierungsprofile des MGMT-Promotors gefunden werden (Meyer et al., 2015; N. R. Parker et al., 2016). Die *intratumorale* Heterogenität von MGMT erlaubt zwar keinen direkten Vergleich mit den hier vorliegenden Erkenntnissen, doch ist sie ein Hinweis auf die *intratumorale* Heterogenität auf epigenetischer Ebene. Das unterstreicht eine Studie von Wenger et al., 2019, in der gezeigt wurde, dass Differenzen in der Methylierung innerhalb desselben Tumors größer sein können als zwischen unterschiedlichen Tumoren und jene eine größere Ähnlichkeit zu Samples von anderen Patient*innen aufweisen. Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass von den untersuchten Tumoren die meisten Methylierungsprofile von mehr als einem Subtyp aufweisen (Klughammer et al., 2018). Die epigenetischen Analysen untermauern die Ergebnisse zur Heterogenität. Selbstverständlich müssen die Untersuchungen an einem größeren Kollektiv verifiziert werden, doch auch die kleine Anzahl lässt heterogene Methylierungsprofile erkenntlich werden.

Das regionale Auftreten von Subtypen im Glioblastom ist eine wichtige Erkenntnis bei der Entnahme von Biopsien zur Therapieplanung. Ging man bislang davon aus, hiermit eine Aussage über den gesamten Tumor von Patient*innen treffen zu können, ist dies nun mit Einschränkung zu sehen. Eine Biopsie reflektiert die Tumorkomposition nicht adäquat und Entscheidungen, die auf dem hier dominanten Phänotyp beruhen, sind möglicherweise nicht korrekt (Marusyk et al., 2012). Auch wenn in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Tumorgröße und dem Auftreten beider Subtypen festgestellt werden konnte, weisen die Daten darauf hin, dass in größeren Tumorproben eher Heterogenität zu finden ist. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer anderen

Arbeitsgruppe, die nur eine schwache Korrelation zwischen Heterogenitätsindex und Tumorgroße beweisen konnte (Klughammer et al., 2018). Nimmt man diese Erkenntnisse zusammen, könnte man wahrscheinlich so weit gehen, zu postulieren, dass die Probeentnahme eines „homogenen“ Glioblastoms schlichtweg nicht ausreichend groß war.

6.3 Mesenchymal Mikroglia dominierter Subtyp und Tumormilieu

Der mesenchymale Subtyp ist in dieser Studie durch eine positive Immunreaktivität von **ALDH1A3** und **GFAP** charakterisiert. Neben der Reaktivität jener Biomarker sind mesenchymale Tumorregionen durch eine Infiltration von **Mikroglia** gekennzeichnet.

Verhaak et al. beschreiben die Entstehung des mesenchymalen Subtyps durch eine Dedifferenzierung und Transition von einem epithelialen zu mesenchymalem Muster. Gekennzeichnet sei er durch Deletionen im NF1-Genlokus und einer Positivität für den mesenchymalen Marker YKL-40. Außerdem scheine der mesenchymale Subtyp durch ausgedehnte nekrotische Areale bestimmt zu sein. (Verhaak et al., 2010)

Dass der Biomarker ALDH1A3 eine Subtypassoziation zeigt, wird bereits in anderen Studien erwähnt (Li et al., 2018; Mao et al., 2013; W. Zhang et al., 2015). Seine physiologische Rolle in Zelladhäsion und Tumordinvasion könnte zur schlechten Prognose des mesenchymalen Subtyps beitragen (Chang et al., 2018; Cheng et al., 2016; Li et al., 2018). Besonders relevant in Bezug hierauf ist seine Rolle in der Antwort auf oxidativen Stress und die damit verbundenen Resistenztheorien (Mao et al., 2013; Raha et al., 2014; Wu et al., 2020). Die Doppelfärbungen mit Immunfluoreszenz von ALDH1A3 und Iba1 erlauben die Abgrenzung zwischen ALDH1A3-positiven Tumorzellen und Iba1-positiven Zellen der Mikroglia. Die Assoziation von GFAP zum mesenchymalen Subtyp wird ebenfalls von Motomura et al., 2012 beschrieben. Die Eigenschaften der mesenchymalen Biomarker sind definiert durch eine protumoröse, aggressive Pathophysiologie, deren Zusammenspiel vermutlich einen wesentlichen Beitrag zur aggressiven Natur des mesenchymalen Subtyps leistet.

Mikrogliazellen zeigen eine starke Assoziation zum mesenchymalen Subtyp. Als Immunzellen des zentralen Nervensystems tragen sie maßgeblich zur Ausbildung des Tumormilieus bei, welches für das Tumorwachstum entscheidend ist. Die starke Iba1-Positivität in mesenchymalen Regionen, die in manchen Tumoren sogar eine Dominanz der Mikroglia gegenüber den Tumorzellen beweist, ruft die Frage nach ihrer Rolle in der Tumorbilogie hervor. Sind sie etwa der Grund für die Aggressivität des mesenchymalen Subtyps, ja tragen sie sogar maßgeblich zum Therapieversagen bei? Welche Zellentität im Tumor wird angesichts der großen Anzahl an Mikrogliazellen tatsächlich therapiert? Das sind Fragen, die für das Verständnis der Heterogenität von Bedeutung sind und deren Antwort eine Näherung zur erfolgreicherer Therapie liefern könnte. Die Funktion der Mikrogliazellen wurde bereits vielfach untersucht, über die Subtypenassoziation ist jedoch wenig publiziert. Mikrogliazellen tragen zu einem immunsuppressiven Milieu bei und liefern hierdurch die optimalen Wachstumsbedingungen für Tumorzellen (Grauwet & Chiocca, 2016; Rodrigues et al., 2010; Schiffer et al., 2017). Dies wird durch eine Kommunikation mit den Tumorzellen erreicht, die sich die Plastizität der Immunzellen zunutze machen (Kurpius et al., 2007; Shen et al., 2016) und eine Transformation zum immunsuppressiven M2-Phänotyp induzieren (Annovazzi et al., 2018; Oushy et al., 2018; van der Vos et al., 2016). Die Assoziation zum mesenchymalen Subtyp ist von besonderem Interesse, die auch von Wang et al., 2017 beschrieben wird. In einer immunhistochemischen Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in mesenchymalen Zellpopulationen signifikant mehr Mikrogliazellen zu finden sind. Selbige Studie beschreibt eine Assoziation von kurzem Überleben und höherer Genexpression von Mikroglia-Genen in mesenchymalen Glioblastomen (Engler et al., 2012). Eine aktuelle Studie, die Glioblastome anhand Methylierungsanalysen untersucht hat, konnte ebenfalls feststellen, dass in mesenchymalen Regionen die Immunzellendichte erhöht ist (Klughammer et al., 2018). Dass die mesenchymale Differenzierung mit einer Anreicherung der Mikrogliafraktion korreliert und zwar vor allem des tumor-supportiven M2 Subtyps, unterstreicht die Wichtigkeit der Forschung an Mikrogliazellen (Q. Wang et al., 2017). Unsere Arbeit zeigt, dass die Iba1-Expression in Rezidiven erhöht ist, was mit den Ergebnissen von Klughammer et al., 2018 und Wang et al. 2017 übereinstimmt. Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass Mikrogliazellen eine Resistenz

gegenüber der Therapie haben und die Tumorprogression unterstützen (Coniglio & Segall, 2013; Poon et al., 2017). Daraus resultiert die Frage, welche neuen Therapieverfahren dies vorbeugen können. Eine Möglichkeit wäre die Kombinationstherapie aus Strahlentherapie und M2 Inhibitoren (Q. Wang et al., 2017). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor) Inhibitoren, von dem Differenzierung und das Überleben von Tumor assoziierten Makrophagen abhängig ist, eine drastische Lebensverlängerung und eine Verlangsamung des intrakraniellen Wachstums erreicht wird. Hierbei sinkt nicht die Zahl der Mikroglia, sondern die Polarisation wird verändert und der M2 Phänotyp supprimiert. Die starke Limitation dieser Studie ist jedoch die exklusive Verwendung von proneuralen Glioblastomen (Pyonteck et al., 2013).

Die Schilderungen demonstrieren die Wichtigkeit der Mikrogliazellen in Bezug auf die Malignität von Glioblastomen. Dass sie dem mesenchymalen Subtyp zugeordnet werden können, ist eine interessante Erkenntnis. Der mit schlechterem Überleben korrelierte Subtyp (Shahar et al., 2017) könnte diese Eigenschaft aufgrund der hohen Mikroglia population erhalten. Neue Therapieversuche scheinen vielversprechend zu sein und verlangen weitere intensive Forschung.

6.4 Klassischer Subtyp und Proliferation

Der zweite in dieser Arbeit definierte Subtyp ist charakterisiert durch eine positive Immunreaktivität für **EGFR**, **Olig2**, **p53** und einem **hohen Proliferationsindex**. Nach Verhaak et al. ist dieser Typ gekennzeichnet durch eine Amplifikation von Chromosom 7, die zu einer starken EGFR-Expression führt, sowie einem Verlust von Chromosom 10.

EGFR ist der am deutlichsten erhöhte Marker in diesem Subtyp und für Angiogenese und Proliferation verantwortlich (R. Bonavia et al., 2012; Keller & Schmidt, 2017). Die heterogene Expression wurde bereits in der Literatur beschrieben (Furnari et al., 2015). Interessant ist eine phänotypische Heterogenität im Migrationspotenzial von Tumorzellen, die EGFR abhängig zu sein scheint (J. J. Parker et al., 2018). Wir haben EGFR als Indikator verwendet, weil er laut aktueller Literatur dem klassischen Subtyp zugeordnet wird (Verhaak

et al., 2010). Die stark negative Korrelation von EGFR und GFAP lässt einen unterschiedlichen strategischen Fokus der Tumorzellen vermuten: Zellproliferation in EGFR-positiven Arealen versus Tumordinvasion bei hoher GFAP-Expression (Herpers et al., 1984). Wobei hier zu beachten ist, dass keiner der Tumoren gesamt GFAP-negativ war, da dies ja ein wichtiger Biomarker für Gliome ist. Der Stammzellmarker Olig2 (Suvà et al., 2014; Trépant et al., 2015) ist in unseren Ergebnissen mit dem klassisch proliferativen Subtyp assoziiert. Er ist in die Proliferation von Stammzellen miteingebunden (Ligon et al., 2007; Tsigelny et al., 2016) und für Tumorstadium verantwortlich (Lu et al., 2016). Konträr zu unseren Ergebnissen, fungiert Olig2 in einigen Studien als Marker für den proneuralen Subtyp (Le Mercier et al., 2012; Motomura et al., 2012). Dass Olig2 in mesenchymalen Tumoren jedoch niedrig exprimiert wird, stimmt mit den Erkenntnissen von Verhaak et al., 2010 überein. Die Assoziation von Olig2 entweder zum proneuralen oder klassischen Subtyp lässt sich nicht endgültig klären. Die Ergebnisse hier zeigen, dass Olig2 im Vergleich zu mesenchymalen Regionen in klassischen stärker exprimiert wird. Ein abschließender Vergleich der Expression in IDH-mutierten Tumoren ist von Nöten, um eine korrekte Zuordnung treffen zu können.

Im Gegensatz zum mesenchymalen Subtyp, der durch die erhöhte Mikrogliafraktion gekennzeichnet ist durch Veränderung im Mikromilieu, scheint in klassischen Tumorebenen die Proliferation der vorherrschende Pathomechanismus zu sein, was durch die Assoziation zu Mib1 indiziert wird (Duregon et al., 2016).

Eine abschließend wichtige Frage ist, wie p53 in das Bild des klassischen Subtyps passt. Der nur leicht erhöhten p53-Positivität liegt wohl die sehr geringe Gesamtzahl an p53-positiven Tumoren zugrunde. Möglicherweise charakterisiert p53 einen eigenen Subtyp, der in unserem kleinen Kollektiv nicht zur Ausprägung kommt. Eine hierarchische Analyse der Beziehung der Marker untereinander unterstreicht die exklusive Stellung von p53, was eine Zuordnung zu einem der beiden Cluster unseres Kollektivs erschwert. Die Beobachtung von abgeschlossenen, exklusiv p53-positiven Arealen wurde eingangs erläutert. Eine Mutation nur in einer bestimmten Tumorregion ist ungewöhnlich und äußerst interessant, vor allem unterstreicht sie unsere Hypothese der *intratumoralen*

Heterogenität. Für die Validierung eines p53-definierenden Subtyps sind Untersuchungen an einem größeren Kollektiv notwendig. Ein anderer Erklärungsversuch ist die Zuordnung von p53 zu IDH-mutierten, proneuralen Tumoren (Le Mercier et al., 2012). Warum hier trotzdem p53-positive Areale zu finden sind, ließe sich damit allerdings nicht abschließend klären.

6.5 Temporale Heterogenität: Dominanz des mesenchymal Mikroglia dominierten Phänotyps im Laufe der Tumorprogression

Die Veränderungen im Laufe der Tumorprogression lässt sich durch eine Analyse von Primärtumoren und ihren korrespondierenden Rezidiven. Die Ergebnisse zeigen, dass neben der regionalen auch eine temporale Heterogenität in Glioblastomen vorhanden ist. In den Rezidiven dominiert der mesenchymale Phänotyp. Die einzelnen Marker zeigen Veränderungen in ihrer Expression und ebenso die Subtypenausprägung. Diese Erkenntnis ist für das Verständnis der Malignität dieses Tumors von bedeutendem Interesse. Die Analyse von Tumoren in ihrer Tumorprogression lässt Rückschlüsse auf das Therapieansprechen ziehen. So legt die mesenchymale Dominanz nahe, dass – was mit der Biologie der untersuchten Biomarker übereinstimmt – es besonders dieser Subtyp ist, der für die Therapieresistenz und damit das fast ausnahmslose Rezidivieren verantwortlich ist.

In immunhistochemischen Studien wurde dieses Phänomen als mesenchymale Transition oder Phänotypswitch benannt (Phillips et al., 2006; Schäfer et al., 2019; Wood et al., 2016). Da die Heterogenität ein stabiles Merkmal von Glioblastomen zu sein scheint, ist es vermutlich angemessener anstelle einer Transition von der *Dominanz* des mesenchymalen Subtyps zu sprechen, da dieser in der Progression am stabilsten ist und in den Rezidiven besonders stark ausgeprägt ist (J. Wang et al., 2016; Q. Wang et al., 2017). In früheren Studien konnte bereits belegt werden, dass der mesenchymale Subtyp mit schlechtem Outcome assoziiert sei (N. R. Parker et al., 2016), was unter anderem auf die Rolle der ALDH1 zurückzuführen sei (Wu et al., 2020). In kombinierter Betrachtung mit den Ergebnissen der vorliegenden Analyse kann man schließen, dass der mesenchymale Subtyp in heterogenen Glioblastomen durch Resistenzmechanismen bei einer Therapie selektiert wird und es so zum fast

ausnahmslosen Rezidivieren kommt. Ob hierfür die hohe Zellpopulation der Mikroglia verantwortlich ist oder Eigenschaften der Tumorzellen, wie sie beispielsweise durch die ALDH1A3 hervorgerufen werden, ist nicht abschließend geklärt und verlangt weiterer Forschung.

Demgegenüber steht die geringere Expression von EGFR, Mib1 und dem klassisch proliferativen Subtyp in Rezidiven, was sich mit Ergebnissen aus der Literatur deckt (Klughammer et al., 2018; Stark et al., 2003; J. Wang et al., 2016). Auch für p53 sind Unterschiede in der Tumorprogression festzuhalten, wobei ebenfalls die Expression in Primärtumoren stärker ist (Kim et al., 2015).

Die longitudinalen Veränderungen in der Tumorarchitektur implizieren, dass die Heterogenität kein rein deskriptives Merkmal des Glioblastoms, sondern durch ihren Einfluss auf das Therapieansprechen (Meyer et al., 2015; Reinartz et al., 2017) funktioneller Natur ist. Der Term *funktionelle Heterogenität* soll den Beitrag zum Therapieversagen durch Selektion resistenter Zellpopulationen, Infiltration und Rezidivieren des Tumors beschreiben. Weiterhin gilt deshalb sowohl im Rezidiv als auch im Primärtumor die Kombinationstherapie als Standard (Scorsetti et al., 2015). Es existieren bereits experimentelle Versuche zur Verwendung kombinierter zielgerichteter Therapien, die als Lösungsansatz für das heterogene Ansprechen der Zellklone auf die Therapie diskutiert werden. Eine Arbeitsgruppe konnte hierbei unter Laborbedingungen durch die kombinierte Verwendung einer Vierfach-Antikörper-Therapie eine höhere Effektivität zeigen (Akgül et al., 2019).

6.6 Funktionelle Heterogenität: Klinische Korrelation

Heterogenität ist ein, man könnte beinahe sagen *das* Charakteristikum des Glioblastoms. Jedoch ist die Heterogenität nicht rein deskriptiv, sondern beeinflusst maßgeblich die Aggressivität des Tumors und somit das Überleben der Patient*innen. Die Daten aus unserem Kollektiv deuten auf einen Unterschied in der Überlebenszeit zwischen als heterogen und subtyp-dominant definierten Tumoren und damit auf eine *funktionelle* Heterogenität hin. Die klinische Auswirkung der *intratumoralen* Heterogenität wird bereits von Patel et al., 2014 beschrieben und könnte ein Grund für das Versagen vieler aktueller Phase 3 Studien sein (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014; Stupp et al., 2014). Eine

Arbeitsgruppe, die sich mit Heterogenität auf Methylierungsebene beschäftigt, schlägt ebenfalls eine Assoziation zwischen epigenetischer Plastizität und aggressiven Tumoren vor (Klughammer et al., 2018). Soweit stimmen unsere Ergebnisse mit den aktuellen Forschungsdaten überein. Die fehlende Signifikanz ist vermutlich auf die kleine Stichprobe zurückzuführen. Der Unterschied zeigt jedoch die Wichtigkeit der Heterogenität in Bezug auf Überlegungen zu einer effektiven Therapie des Glioblastoms auf. Das Versagen vieler neuer Therapiestudien zeigt, wie wichtig neue Ansätze mit Fokus auf die heterogene Tumorarchitektur sind. Erst wenn die Biologie der Subtypen, deren Zusammenspiel und der Einfluss der mit dem mesenchymalen Subtyp assoziierten Mikrogliazellen verstanden sind, wird die Therapie zielführend und erfolgversprechend sein.

6.7 Limitationen

Die vorliegende Studie zeigt die *intratumorale* Heterogenität in Glioblastomen auf regionaler und temporaler Ebene auf und verweist mit der klinischen Korrelation auf den funktionellen Aspekt der Heterogenität. Die Ergebnisse sind eindeutig und größtenteils signifikant. Aufgrund des kleinen Kollektivs ist es notwendig, die hier gesammelten Daten an einer größeren Patient*innenstichprobe zu verifizieren. Dies gilt vor allem für die klinische Korrelation, bei der aufgrund der schwierigen Verfolgung von Patient*innendaten die schlussendlich in die Auswertung miteinbezogene Patient*innenzahl gering ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte an vielen Glioblastomproben Heterogenität nachgewiesen werden. Die Klassifizierung wurde allerdings nur auf Basis eines Tumorschnitts durchgeführt und spiegelt nicht den gesamten Tumor wider. So könnte es sein, dass die Anzahl der heterogenen Tumoren in der Stichprobe tatsächlich größer ist. Dieser Aspekt muss bei jeder Biopsie mitbedacht werden, da sie – bei nachgewiesener Heterogenität – immer nur ein kleiner Ausschnitt des gesamten Tumors ist. In Bezug auf diese Thematik wurde versucht, ein Zusammenhang zwischen Probengröße und Auftreten mehrerer Subtypen herzustellen. In den vorliegenden Daten konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden, was ebenfalls an einer größeren Stichprobe verifiziert werden sollte.

Die Immunhistochemie als ein in der Routinediagnostik etabliertes und kostengünstiges Verfahren wurde in dieser Arbeit als Hauptmethode ausgewählt mit dem Ziel, Heterogenitätsanalysen in die alltägliche Diagnostik an pathologischen Instituten aufnehmen zu können. Die hier angewendete Methode zur Auswertung ist sehr zeitaufwendig und komplex, weswegen eine Vereinfachung - zum Beispiel durch die Einführung eines Heterogenitätsindex notwendig ist.

Eine weitere Limitation betrifft die Methylierungsanalysen. Die epigenetische Datenanalyse ist in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund gerückt - zurecht: Durch eine universal verfügbare Methode mit Qualitätskontrolle kann viel Information über das Tumorgewebe erfasst werden. In dieser Studie wurde die Methylierungsanalyse additiv zur Immunhistochemie gewählt, um einerseits die Ergebnisse zu verifizieren und andererseits einen tieferen Einblick in die Tumorbilogie zu bekommen. Jedoch ist die Zahl der analysierten Tumoren klein, sodass sie ebenfalls eine Verifizierung an einem größeren Kollektiv verlangt.

7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Heterogenität ist ein zentraler Aggressivitätsfaktor des Glioblastoms und trägt wesentlich zur infausten Prognose bei. Erst kürzlich wurde deutlich, dass das Glioblastom nicht nur zwischen Patient*innen (*intertumoral*) heterogen ist, sondern innerhalb individuellen Patient*innen. Die vorliegende retrospektive Studie setzt den Fokus auf ebendiese *intratumorale* Heterogenität.

Mittels Immunhistochemie und Methylierungsanalysen konnten zwei Subtypen definiert werden: Der mesenchymal Mikroglia dominierte Subtyp wird durch ALDH1A3 und GFAP sowie einer hohen Mikrogliafraktion charakterisiert. Der klassisch proliferative Subtyp exprimiert vor allem EGFR und Olig2 und weist einen hohen Proliferationsindex auf. Durch die Markierung verschiedener Areale in einem Tumor konnte gezeigt werden, dass zwei biologisch unterschiedliche Subtypen in einem Tumor nebeneinander vorliegen können – die Heterogenität des Glioblastoms auf *regionaler* Ebene wurde somit nachgewiesen.

Die longitudinale Betrachtung der Heterogenität zeigte, dass im Verlauf der Tumorprogression eine starke Dominanz des mesenchymalen Subtyps vorliegt. Dies lässt vermuten, dass subtypenspezifische Resistenzmechanismen zu einer Selektion der besonders aggressiven mesenchymalen Zellpopulation führen und ein Grund für das fast ausnahmslose Rezidivieren und die fatale Prognose sind. Diese *temporale* Ebene ist ein weiterer Aspekt der Heterogenität.

Entscheidend ist die Auswirkung auf das Überleben. In der Korrelation mit klinischen Daten wurde dargestellt, dass Patient*innen mit subtyp-heterogenen Tumoren eine Tendenz zu einer kürzeren Überlebenszeit aufweisen, die Heterogenität also *funktionelle* Bedeutung hat.

Die mittels Immunhistochemie und Methylierungsanalysen erzielten Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Heterogenität für das klinische Outcome auf. Dass der mesenchymale Subtyp eine besonders hohe Stabilität aufweist, ist ein Hinweis für seine Aggressivität. Der hohe Anteil an Mikrogliazellen in diesem Subtyp wirft die Frage auf, welche Rolle diese Zellpopulation tatsächlich spielt und sollte ein essentieller Aspekt für die Glioblastomforschung der Zukunft sein. Es konnten für immunhistochemische Heterogenitätsstudien geeignete Marker definiert werden.

Für die Aufnahme in die Routinediagnostik sind jedoch weiterführende Studien notwendig, die eine Vereinfachung der Methodik zum Ziel haben sollten.

8 VERZEICHNISSE

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Malignitätskriterien - Zellpolymorphie	4
Abbildung 2: Malignitätskriterien - Nekrose	4
Abbildung 3: Malignitätskriterien - Gefäßproliferate	4
Abbildung 4: Evolutionstheorien zur Heterogenität	5
Abbildung 5: Reaktive Astroglia	9
Abbildung 6: Iba1-Expression	15
Abbildung 7: ABC-Methode	22
Abbildung 8: Auswertung von Iba1, EGFR, GFAP und Olig2	25
Abbildung 9: Auswertung von ALDH1A3	26
Abbildung 10: Auswertung von Mib1	26
Abbildung 11: Auswertung von YKL-40	26
Abbildung 12: Auswertung von p53	27
Abbildung 13: Auswertung von CD44	27
Abbildung 14: Auswertung von p62	27
Abbildung 15: Arbeitsschritte	28
Abbildung 16: Beispielhafte Darstellung zweier Areale eines Glioblastoms	33
Abbildung 17: Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse	35
Abbildung 18: PAM Clustering	37
Abbildung 19: Expressionsprofil des klassisch proliferativen Subtyps	39
Abbildung 20: Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse	40
Abbildung 21: Immunreaktivitätsprofil einer klassisch proliferativen Region	41
Abbildung 22: Expressionsprofil mesenchymal Mikroglia dominierter Subtyp	42
Abbildung 23: Immunreaktivitätsprofil einer mesenchymal Mikroglia dominierten Region	43
Abbildung 24: Darstellung der intratumoralen Heterogenität (Beispiel 1)	44
Abbildung 25: Darstellung der intratumoralen Heterogenität (Beispiel 2)	45
Abbildung 26: Verteilungsmuster Primärtumoren	46
Abbildung 27: Iba1 und ALDH1A3 Immunfluoreszenz Doppelfärbung	48
Abbildung 28: Methylierungsprofile Glioblastom 1	49
Abbildung 29: Methylierungsprofile Glioblastom 2	50
Abbildung 30: Methylierungsprofile Glioblastom 3	51
Abbildung 31: PCA der Primärtumoren	52
Abbildung 32: Vergleich der Clusterexpression in Primärtumoren und Rezidiven	53
Abbildung 33: Sankey-Diagramm	55
Abbildung 34: Gegenüberstellung der Expressionen in Primärtumoren und Rezidiven	56
Abbildung 35: Darstellung der temporalen Heterogenität (Beispiel 1)	58
Abbildung 36: Darstellung der temporalen Heterogenität (Beispiel 2)	59
Abbildung 37: PCA der EPIC-Daten aus der Analyse von Primärtumoren und Rezidiven	60
Abbildung 38: Kaplan-Meier-Überlebenskurve	61

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alkoholreihe	23
Tabelle 2: Immunreaktiver Score für Iba1, EGFR, GFAP und Olig2	24
Tabelle 3: Immunreaktiver Score für ALDH1A3	25
Tabelle 4: Immunreaktiver Score für p53	27
Tabelle 5: Patient*innendaten	32
Tabelle 6: Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho	38
Tabelle 7: Primärantikörper Immunhistochemie	86
Tabelle 8: Sekundärantikörper Immunhistochemie	86
Tabelle 9: Primärantikörper Immunfluoreszenz	86
Tabelle 10: Sekundärantikörper Immunfluoreszenz	86

Tabelle 11: Chemikalien & Reagenzien	87
Tabelle 12: Puffer	87
Tabelle 13: Geräte	87
Tabelle 14: Verbrauchsmaterial	88
Tabelle 15: Software	88

8.3 Literaturverzeichnis

- Akgül, S., Patch, A.-M., D'Souza, R. C. J., Mukhopadhyay, P., Nones, K., Kempe, S., . . . Day, B. W. (2019). Intratumoural Heterogeneity Underlies Distinct Therapy Responses and Treatment Resistance in Glioblastoma. *Cancers*, *11*(2).
- Alkhaibary, A., Alassiri, A. H., AlSufiani, F., & Alharbi, M. A. (2019). Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter? *Hematology/oncology and Stem Cell Therapy*, *12*(2), 82–88.
- Aloisi, F., Simone, R. de, Columba-Cabezas, S., Penna, G., & Adorini, L. (2000). Functional Maturation of Adult Mouse Resting Microglia into an APC Is Promoted by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interaction with Th1 Cells. *The Journal of Immunology*, *164*(4), 1705–1712.
- Altman, N., & Krzywinski, M. (2017). Clustering. *Nature Methods*, *14*(6), 545–546.
- Annovazzi, L., Mellai, M., Bovio, E., Mazzetti, S., Pollo, B., & Schiffer, D. (2018). Microglia immunophenotyping in gliomas. *Oncology Letters*, *15*(1), 998–1006.
- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., & Irizarry, R. A. (2014). Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(10), 1363–1369.
- Bailey, P., & Cushing, H. (1926). A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. *British Journal of Surgery*, *14*(55), 554–555.
- Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J., & Siu, L. L. (2013). Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, *501*(7467), 355–364.
- Bergmann, N., Delbridge, C., Gempt, J., Feuchtinger, A., Walch, A., Schirmer, L., . . . Schlegel, J. (2020). The Intratumoral Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry Analysis. *Frontiers in Oncology*, *10*, 494.
- Boisen, M. K., Holst, C. B., Consalvo, N., Chinot, O. L., & Johansen, J. S. (2018). Plasma YKL-40 as a biomarker for bevacizumab efficacy in patients with newly diagnosed glioblastoma in the phase 3 randomized AVAglio trial. *Oncotarget*, *9*(6), 6752–6762.
- Bonavia, R. [R.], Inda, M. M., Vandenberg, S., Cheng, S.-Y. [S-Y], Nagane, M., Hadwiger, P., . . . Furnari, F. B. [F. B.] (2012). Egfrviii promotes glioma angiogenesis and growth through the NF- κ B, interleukin-8 pathway. *Oncogene*, *31*(36), 4054–4066.
- Bonavia, R. [Rudy], Inda, M.-M., Cavenee, W. K. [Webster K.], & Furnari, F. B. [Frank B.] (2011). Heterogeneity maintenance in glioblastoma: A social network. *Cancer Research*, *71*(12), 4055–4060.
- Brown, D. V., Daniel, P. M., D'Abaco, G. M., Gogos, A., Ng, W., Morokoff, A. P., & Mantamadiotis, T. (2015). Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies proneural and mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*, *6*(8), 6267–6280.
- Brown, D. V., Filiz, G., Daniel, P. M., Hollande, F., Dworkin, S., Amiridis, S., . . . Mantamadiotis, T. (2017). Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PloS One*, *12*(2).
- Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., . . . Pfister, S. M. (2018). Dna methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, *555*(7697), 469–474.
- Ceccarelli, M., Barthel, F. P., Malta, T. M., Sabedot, T. S., Salama, S. R., Murray, B. A., . . . Verhaak, R. G. W. (2016). Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*, *164*(3), 550–563.
- Chang, P. M.-H., Chen, C.-H., Yeh, C.-C., Lu, H.-J., Liu, T.-T., Chen, M.-H., . . . Huang, C.-Y. F. (2018). Transcriptome analysis and prognosis of ALDH isoforms in human cancer. *Scientific Reports*, *8*(1), 2713.
- Chen, Z. [Zhihong], Feng, X., Herting, C. J., Garcia, V. A., Nie, K., Pong, W. W., . . . Hambardzumyan, D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Research*, *77*(9), 2266–2278.
- Chen, Z. [Zhihong], & Hambardzumyan, D. (2018). Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1004.
- Cheng, P., Wang, J. [Jia], Waghmare, I., Sartini, S., Coviello, V., Zhang, Z., . . . Nakano, I. (2016). Foxd1-ALDH1A3 Signaling Is a Determinant for the Self-Renewal and Tumorigenicity of Mesenchymal Glioma Stem Cells. *Cancer Research*, *76*(24), 7219–7230.
- Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R. [Ryo], . . . Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, *370*(8), 709–722.
- Cinque, B., Miconi, G., Palumbo, P., Dehcordi, S. R., La Torre, C., Lombardi, F., . . . Cifone, M. G. (2015). Immunophenotypic characterization of human glioblastoma stem cells: Correlation with clinical outcome. *Journal of Cellular Biochemistry*, *116*(5), 864–876.
- Coniglio, S. J., & Segall, J. E. (2013). Review: Molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, *32*(7-8), 372–380.

- Conroy, S., Kruyt, F. A. E., Joseph, J. V., Balasubramanian, V., Bhat, K. P., Wagemakers, M., . . . den Dunnen, W. F. A. (2014). Subclassification of newly diagnosed glioblastomas through an immunohistochemical approach. *PLoS One*, 9(12).
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 47(2), 200–202.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., . . . Gan, W.-B. (2005). Atp mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758.
- Dirkse, A., Golebiewska, A., Buder, T., Nazarov, P. V., Muller, A., Poovathingal, S., . . . Niclou, S. P. (2019). Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nature Communications*, 10(1), 1787.
- Duan, J.-J., Cai, J. [Jiao], Guo, Y.-F., Bian, X.-W., & Yu, S.-C. (2016). Aldh1a3, a metabolic target for cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Cancer*, 139(5), 965–975.
- Duregon, E., Bertero, L., Pittaro, A., Soffietti, R., Rudà, R., Trevisan, M., . . . Cassoni, P. (2016). Ki-67 proliferation index but not mitotic thresholds integrates the molecular prognostic stratification of lower grade gliomas. *Oncotarget*, 7(16), 21190–21198.
- Emery, B., Mitew, S., Hay, C. M., Peckham, H., Xiao, J., & Koenning, M. (2014). Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience*, 276, 29–47.
- Engler, J. R., Robinson, A. E., Smirnov, I., Hodgson, J. G., Berger, M. S., Gupta, N., . . . Phillips, J. J. (2012). Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS One*, 7(8).
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(9), 2143–2155.
- Francescone, R. A., Scully, S., Faibish, M., Taylor, S. L., Oh, D., Moral, L., . . . Shao, R. [Rong] (2011). Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 15332–15343.
- Furnari, F. B. [Frank B.], Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K. [Webster K.], & Mischel, P. S. (2015). Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nature Reviews. Cancer*, 15(5), 302–310.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., & Kroemer, G. (2014). Metabolic control of autophagy. *Cell*, 159(6), 1263–1276.
- Gan, H. K., Kaye, A. H., & Luwor, R. B. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 16(6), 748–754.
- Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., . . . Mehta, M. P. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 370(8), 699–708.
- Gill, B. J., Pisapia, D. J., Malone, H. R., Goldstein, H., Lei, L., Sonabend, A., . . . Canoll, P. (2014). Mri-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12550–12555.
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., . . . Dontu, G. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555–567.
- Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), 2891–2906.
- Grauwet, K., & Chiocca, E. A. (2016). Glioma and microglia, a double entendre. *Nature Immunology*, 17.
- Grigorieva, E. V., Tsidulko, A. Y., Kazanskaya, G. M., Kostromskaya, D. V., Aidagulova, S. V., Kiselev, R. S., . . . Krivoshapkin, A. L. (2017). Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(9).
- Guadagno, E., Borrelli, G., Califano, M., Cali, G., Solari, D., & Del Basso Caro, M. de (2016). Immunohistochemical expression of stem cell markers CD44 and nestin in glioblastomas: Evaluation of their prognostic significance. *Pathology, Research and Practice*, 212(9), 825–832.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., Tribolet, N. de, Weller, M., . . . Stupp, R. (2005). Mgmt gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003.
- Herpers, M. J., Budka, H., & McCormick, D. (1984). Production of glial fibrillary acidic protein (GFAP) by neoplastic cells: Adaptation to the microenvironment. *Acta Neuropathologica*, 64(4), 333–338.
- Ho, I. A. W., & Shim, W. S. N. (2017). Contribution of the Microenvironmental Niche to Glioblastoma Heterogeneity. *BioMed Research International*, 2017, 9634172.

- Hombach-Klonisch, S., Mehrpour, M., Shojaei, S., Harlos, C., Pitz, M., Hamai, A., . . . Ghavami, S. (2018). Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacology & Therapeutics*, *184*, 13–41.
- Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R. [R.], Ji, X. D., . . . Cavenee, W. K. [W. K.] (1997). The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(5), 2927–2935.
- Irvin, D. M., McNeill, R. S., Bash, R. E., & Miller, C. R. (2017). Intrinsic Astrocyte Heterogeneity Influences Tumor Growth in Glioma Mouse Models. *Brain Pathology*, *27*(1), 36–50.
- Jia, J., Parikh, H., Xiao, W., Hoskins, J. W., Pflicke, H., Liu, X. [Xuelu], . . . Amundadottir, L. T. (2013). An integrated transcriptome and epigenome analysis identifies a novel candidate gene for pancreatic cancer. *BMC Medical Genomics*, *6*, 33.
- Johannessen, A. L., & Torp, S. H. (2006). The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathology Oncology Research : POR*, *12*(3), 143–147.
- Junker, N., Johansen, J. S., Hansen, L. T., Lund, E. L., & Kristjansen, P. E. G. (2005). Regulation of YKL-40 expression during genotoxic or microenvironmental stress in human glioblastoma cells. *Cancer Science*, *96*(3), 183–190.
- Karsy, M., England, B., & Huang, T. (2013). Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *34*(4), 2063–2074.
- Keller, S., & Schmidt, M. H. H. (2017). Egfr and EGFRvIII Promote Angiogenesis and Cell Invasion in Glioblastoma: Combination Therapies for an Effective Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6).
- Khoo, K. H., Hoe, K. K., Verma, C. S., & Lane, D. P. (2014). Drugging the p53 pathway: Understanding the route to clinical efficacy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(3), 217–236.
- Kim, H. [Hoon], Zheng, S., Amini, S. S., Virk, S. M., Mikkelsen, T., Brat, D. J., . . . Verhaak, R. G. W. (2015). Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Research*, *25*(3), 316–327.
- Klöppel, G., Kreipe, H. H., Remmele, W., Paulus, W., & Schröder, J. M. (2012). *Pathologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Klughammer, J., Kiesel, B., Roetzer, T., Fortelny, N., Nemc, A., Nanning, K.-H., . . . Bock, C. (2018). The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nature Medicine*, *24*(10), 1611–1624.
- Komatsu, M., & Ichimura, Y. (2010). Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Letters*, *584*(7), 1374–1378.
- Kostianovsky, A. M., Maier, L. M., Anderson, R. C., Bruce, J. N., & Anderson, D. E. (2008). Astrocytic regulation of human monocytic/microglial activation. *Journal of Immunology*, *181*(8), 5425–5432.
- Kupp, R., Shtayer, L., Tien, A.-C., Szeto, E., Sanai, N., Rowitch, D. H., & Mehta, S. (2016). Lineage-Restricted OLIG2-RTK Signaling Governs the Molecular Subtype of Glioma Stem-like Cells. *Cell Reports*, *16*(11), 2838–2845.
- Kurpius, D., Nolley, E. P., & Dailey, M. E. (2007). Purines induce directed migration and rapid homing of microglia to injured pyramidal neurons in developing hippocampus. *Glia*, *55*(8), 873–884.
- Lang, G. (2013). *Histotechnik*. Vienna: Springer Vienna.
- Le Mercier, M., Hastir, D., Moles Lopez, X., Nève, N. de, Maris, C., Trepan, A.-L., . . . Salmon, I. (2012). A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One*, *7*(9).
- Lebelt, A., Rutkowski, R., Och, W., Jaczun, K., Dziemiańczyk-Pakiela, D., Milewski, R., . . . Reszeć, J. (2016). Survivin, caspase-3 and MIB-1 expression in astrocytic tumors of various grades. *Advances in Medical Sciences*, *61*(2), 237–243.
- Lee, S.-K., Lee, B., Ruiz, E. C., & Pfaff, S. L. (2005). Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes & Development*, *19*(2), 282–294.
- Lever, J., Krzywinski, M., & Altman, N. (2017). Principal component analysis. *Nature Methods*, *14*(7), 641–642.
- Li, G., Li, Y. [Yiming], Liu, X. [Xing], Wang, Z. [Zheng], Zhang, C. [Chuanbao], Wu, F., . . . Zhang, W. [Wei] (2018). Aldh1a3 induces mesenchymal differentiation and serves as a predictor for survival in glioblastoma. *Cell Death & Disease*, *9*(12), 1190.
- Liddelov, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, *46*(6), 957–967.
- Liesche-Starnecker, F., Mayer, K., Kofler, F., Baur, S., Schmidt-Graf, F., Kempfer, J., . . . Schlegel, J. (2020). Immunohistochemically Characterized Intratumoral Heterogeneity Is a Prognostic Marker in Human Glioblastoma. *Cancers*, *12*(10).

- Ligon, K. L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J. A., . . . Rowitch, D. H. (2007). Olig2-Regulated Lineage-Restricted Pathway Controls Replication Competence in Neural Stem Cells and Malignant Glioma. *Neuron*, 53(4), 503–517.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. von, Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K. [Webster K.], . . . Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., . . . Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251.
- Lu, F., Chen, Y. [Ying], Zhao, C., Wang, H., He, D., Xu, L., . . . Lu, Q. R. (2016). Olig2-Dependent Reciprocal Shift in PDGF and EGF Receptor Signaling Regulates Tumor Phenotype and Mitotic Growth in Malignant Glioma. *Cancer Cell*, 29(5), 669–683.
- Ludwig, K., & Kornblum, H. I. (2017). Molecular markers in glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 134(3), 505–512.
- Lyons, J. G., Lobo, E., Martorana, A. M., & Myerscough, M. R. (2008). Clonal diversity in carcinomas: Its implications for tumour progression and the contribution made to it by epithelial-mesenchymal transitions. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(6), 665–677.
- Ma, I., & Allan, A. L. (2011). The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2), 292–306.
- Mao, P., Joshi, K., Li, J. [Jianfeng], Kim, S.-H., Li, P. [Peipei], Santana-Santos, L., . . . Nakano, I. (2013). Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), 8644–8649.
- Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., & Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: The aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(6), 697–720.
- Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*, 12.
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 924–935.
- Meyer, M., Reimand, J., Lan, X., Head, R., Zhu, X., Kushida, M., . . . Dirks, P. B. (2015). Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), 851–856.
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. [E. M.] (2011). Gfap in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069–1075.
- Moeton, M., Kanski, R., Stassen, O. M. J. A., Sluijs, J. A., Geerts, D., van Tijn, P., . . . Hol, E. M. [Elly M.] (2014). Silencing GFAP isoforms in astrocytoma cells disturbs laminin-dependent motility and cell adhesion. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(7), 2942–2954.
- Montgomery, R. M., Queiroz, L. d. S., & Rogerio, F. (2015). Egfr, p53, IDH-1 and MDM2 immunohistochemical analysis in glioblastoma: Therapeutic and prognostic correlation. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, 73(7), 561–568.
- Mooney, K. L., Yang, I., Choy, W., Sidhu, S. [Sabrin], Pelargos, P., Bui, T. T., . . . Barnette, N. (2016). The role of CD44 in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 34, 1–5.
- Motomura, K., Natsume, A., Watanabe, R., Ito, I., Kato, Y., Momota, H., . . . Wakabayashi, T. (2012). Immunohistochemical analysis-based proteomic subclassification of newly diagnosed glioblastomas. *Cancer Science*, 103(10), 1871–1879.
- Nagy, Á., Garzuly, F., Padányi, G., Szűcs, I., Feldmann, Á., Murnyák, B., . . . Kálmán, B. (2019). Molecular Subgroups of Glioblastoma- an Assessment by Immunohistochemical Markers. *Pathology Oncology Research : POR*, 25(1), 21–31.
- Nakagawachi, T., Soejima, H., Urano, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Satoh, Y., . . . Mukai, T. (2003). Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene*, 22(55), 8835–8844.
- Network, T. C. G. A. R., McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., van Meir, E. G., Brat, D. J., . . . Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), 1314–1318.

- Nishikawa, M., Inoue, A., Ohnishi, T., Kohno, S., Ohue, S., Matsumoto, S., . . . Kunieda, T. (2018). Significance of Glioma Stem-Like Cells in the Tumor Periphery That Express High Levels of CD44 in Tumor Invasion, Early Progression, and Poor Prognosis in Glioblastoma. *Stem Cells International*, 2018, 5387041.
- Nørøxe, D. S., Poulsen, H. S., & Lassen, U. (2016). Hallmarks of glioblastoma: A systematic review. *ESMO Open*, 1(6).
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, 194(4260), 23–28.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), 764–772.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., & Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: Receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19(13), 3159–3167.
- Oushy, S., Hellwinkel, J. E., Wang, M. [Mary], Nguyen, G. J., Gunaydin, D., Harland, T. A., . . . Graner, M. W. (2018). Glioblastoma multiforme-derived extracellular vesicles drive normal astrocytes towards a tumour-enhancing phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 373(1737).
- Padfield, E., Ellis, H. P., & Kurian, K. M. (2015). Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 5, 5.
- Parker, J. J., Canoll, P., Niswander, L., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Foshay, K., & Waziri, A. (2018). Intratumoral heterogeneity of endogenous tumor cell invasive behavior in human glioblastoma. *Scientific Reports*, 8(1), 18002.
- Parker, N. R., Hudson, A. L., Khong, P., Parkinson, J. F., Dwight, T., Ikin, R. J., . . . Howell, V. M. (2016). Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Scientific Reports*, 6, 22477.
- Patel, A. P., Suvà, M. L., Regev, A., Bernstein, B. E., Tirosh, I., Trombetta, J. J., . . . Rozenblatt-Rosen, O. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6190), 1396–1401.
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., . . . Aldape, K. [Ken] (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9(3), 157–173.
- Pietras, A., Katz, A. M., Ekström, E. J., Wee, B., Halliday, J. J., Pitter, K. L., . . . Holland, E. C. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell*, 14(3), 357–369.
- Pokholok, D. K., Le, J. M., Steemers, F. J., Ronaghi, M., & Gunderson, K. L. (Eds.) (2010). *Analysis of restored FFPE samples on high-density SNP arrays*: American Association for Cancer Research.
- Poon, C. C., Sarkar, S., Yong, V. W., & Kelly, J. J. P. (2017). Glioblastoma-associated microglia and macrophages: Targets for therapies to improve prognosis. *Brain : A Journal of Neurology*, 140(6), 1548–1560.
- Popova, S. N., Bergqvist, M., Dimberg, A., Edqvist, P.-H., Ekman, S., Hesselager, G., . . . Alafuzoff, I. (2014). Subtyping of gliomas of various WHO grades by the application of immunohistochemistry. *Histopathology*, 64(3), 365–379.
- Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F., . . . Joyce, J. A. (2013). Csf-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine*, 19(10), 1264–1272.
- Qazi, M. A., Singh, S. K. [S. K.], Vora, P., Venugopal, C., Sidhu, S. S., Moffat, J., & Swanton, C. (2017). Intratumoral heterogeneity: Pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(7), 1448–1456.
- Qin, G., Li, X., Chen, Z. [Zilong], Liao, G., Su, Y., Chen, Y. [Yaode], & Zhang, W. [Wei] (2017). Prognostic Value of YKL-40 in Patients with Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Molecular Neurobiology*, 54(5), 3264–3270.
- Raha, D., Wilson, T. R., Peng, J., Peterson, D., Yue, P., Evangelista, M., . . . Settleman, J. (2014). The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Research*, 74(13), 3579–3590.
- Reinartz, R., Wang, S., Kebir, S., Silver, D. J., Wieland, A., Zheng, T., . . . Scheffler, B. (2017). Functional Subclone Profiling for Prediction of Treatment-Induced Intratumor Population Shifts and Discovery of Rational Drug Combinations in Human Glioblastoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(2), 562–574.
- Renshaw, S. (2017). *Immunohistochemistry: Essential Methods*. Hoboken, UNITED KINGDOM: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Rodrigues, J. C., Gonzalez, G. C., Zhang, L., Ibrahim, G., Kelly, J. J., Gustafson, M. P., . . . Parney, I. F. (2010). Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. *Neuro-Oncology*, 12(4), 351–365.

- Sarkar, S., Zemp, F. J., Silva, C., Lun, X., Wang, X., Kelly, J., . . . Yong, V. W. (2013). Therapeutic activation of macrophages and microglia to suppress brain tumor-initiating cells. *Nature Neuroscience*, 17.
- Saw, Y.-T., Yang, J., Ng, S.-K., Liu, S. [Shubai], Singh, S. [Surendra], Singh, M., . . . Ng, S.-W. (2012). Characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes in ovarian cancer tissues and sphere cultures. *BMC Cancer*, 12, 329.
- Schäfer, N., Gielen, G. H., Rauschenbach, L., Kebir, S., Till, A., Reinartz, R., . . . Glas, M. (2019). Longitudinal heterogeneity in glioblastoma: Moving targets in recurrent versus primary tumors. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 96.
- Schiffer, D., Mellai, M., Bovio, E., & Annovazzi, L. (2017). The neuropathological basis to the functional role of microglia/macrophages in gliomas. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 38(9), 1571–1577.
- Schläfli, A. M., Berezowska, S., Adams, O., Langer, R., & Tschan, M. P. (2015). Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 59(2), 2481.
- Scorsetti, M., Navarria, P., Pessina, F., Ascolese, A. M., D'Agostino, G., Tomatis, S., . . . Bello, L. (2015). Multimodality therapy approaches, local and systemic treatment, compared with chemotherapy alone in recurrent glioblastoma. *BMC Cancer*, 15, 486.
- See, A. P., Parker, J. J., & Waziri, A. (2015). The role of regulatory T cells and microglia in glioblastoma-associated immunosuppression. *Journal of Neuro-Oncology*, 123(3), 405–412.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., & Morrison, S. J. (2009). Heterogeneity in cancer: Cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5), 822–829.
- Shahar, T., Rozovski, U., Hess, K. R., Hossain, A., Gumin, J., Gao, F., . . . Lang, F. F. (2017). Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival. *Neuro-Oncology*, 19(5), 660–668.
- Shao, R. [R.], Hamel, K., Petersen, L., Cao, Q. J., Arenas, R. B., Bigelow, C., . . . Yan, W. [W.] (2009). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene*, 28(50), 4456–4468.
- Shao, R. [Rong], Taylor, S. L., Oh, D. S., & Schwartz, L. M. (2015). Vascular heterogeneity and targeting: The role of YKL-40 in glioblastoma vascularization. *Oncotarget*, 6(38), 40507–40518.
- Sharma, A., Bendre, A., Mondal, A., Muzumdar, D., Goel, N., & Shiras, A. (2017). Angiogenic Gene Signature Derived from Subtype Specific Cell Models Segregate Proneural and Mesenchymal Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 7, 146.
- Shen, X., Burguillos, M. A., Osman, A. M., Frijhoff, J., Carrillo-Jiménez, A., Kanatani, S., . . . Joseph, B. (2016). Glioma-induced inhibition of caspase-3 in microglia promotes a tumor-supportive phenotype. *Nature Immunology*, 17(11), 1282–1290.
- Singh, S. K. [Sheila K.], Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., . . . Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401.
- Sobotta, J., & Welsch, U. (Eds.) (2009). *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie* (2., völlig überarb. Aufl., 4. Nachdr). München: Elsevier Urban & Fischer.
- Sørensen, M. D., Dahlrot, R. H., Boldt, H. B., Hansen, S., & Kristensen, B. W. [B. W.] (2017). Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype. *Neuropathology and Applied Neurobiology*.
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G. M., Touloumis, A., Collins, V. P. [V. Peter], Marioni, J. C., . . . Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 4009–4014.
- Stark, A. M., Witzel, P., Strega, R. J., Hugo, H.-H., & Mehdorn, H. M. (2003). P53, mdm2, EGFR, and msh2 expression in paired initial and recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(6), 779–783.
- Steponaitis, G., Skiriutė, D., Kazlauskas, A., Golubickaitė, I., Stakaitis, R., Tamašauskas, A., & Vaitkienė, P. (2016). High CHI3L1 expression is associated with glioma patient survival. *Diagnostic Pathology*, 11, 42.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Gorlia, T., Erridge, S. C., Perry, J., Hong, Y.-K., . . . Weller, M. (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 15(10), 1100–1108.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J. B., Janzer, R. C., . . . Mirimanoff, R.-O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466.

- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., . . . Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996.
- Sullivan, K. E., Rojas, K., Cerione, R. A., Nakano, I., & Wilson, K. F. (2017). The stem cell/cancer stem cell marker ALDH1A3 regulates the expression of the survival factor tissue transglutaminase, in mesenchymal glioma stem cells. *Oncotarget*, 8(14), 22325–22343.
- Suvà, M. L., Rheinbay, E., Gillespie, S. M., Patel, A. P., Wakimoto, H., Rabkin, S. D., . . . Bernstein, B. E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3), 580–594.
- Takami, H., Yoshida, A., Fukushima, S., Arita, H., Matsushita, Y., Nakamura, T., . . . Ichimura, K. (2015). Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry--A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 25(3), 256–265.
- Tan, S. T., Bradshaw, A., Wickremsekera, A., Peng, L., Davis, P. F., & Itinteang, T. (2016). Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Surgery*, 3, 21.
- Tanwar, M. K., Gilbert, M. R., & Holland, E. C. (2002). Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Research*, 62(15), 4364–4368.
- Trépant, A.-L., Bouchart, C., Rorive, S., Sauvage, S., Decaestecker, C., Demetter, P., & Salmon, I. (2015). Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(3), 1943–1953.
- Tsidulko, A. Y., Kazanskaya, G. M., Kostromskaya, D. V., Aidagulova, S. V., Kiselev, R. S., Volkov, A. M., . . . Grigorieva, E. V. (2017). Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(9), 1010428317724282.
- Tsigelny, I. F., Kouznetsova, V. L., Lian, N., & Kesari, S. (2016). Molecular mechanisms of OLIG2 transcription factor in brain cancer. *Oncotarget*, 7(33), 53074–53101.
- Van der Vos, K. E., Abels, E. R., Zhang, X. [Xuan], Lai, C., Carrizosa, E., Oakley, D., . . . Breakefield, X. O. (2016). Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro-Oncology*, 18(1), 58–69.
- Vasiliou, V., Thompson, D. C., Smith, C., Fujita, M., & Chen, Y. [Ying] (2013). Aldehyde dehydrogenases: From eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, 202(1-3), 2–10.
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., . . . Hayes, D. N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110.
- Wang, J. [Jiguang], Cazzato, E., Ladewig, E., Frattini, V., Rosenbloom, D. I. S., Zairis, S., . . . Rabadan, R. (2016). Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nature Genetics*, 48(7), 768–776.
- Wang, Q., Hu, B. [Baoli], Hu, X., Kim, H. [Hoon], Squatrito, M., Scarpace, L., . . . Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32(1), 42–56.
- Wann, A., Tully, P. A., Barnes, E. H., Lwin, Z., Jeffree, R., Drummond, K. J., . . . Khasraw, M. (2018). Outcomes after second surgery for recurrent glioblastoma: A retrospective case-control study. *Journal of Neuro-Oncology*, 137(2), 409–415.
- Wenger, A., Ferreyra Vega, S., Kling, T., Olsson Bontell, T., Jakola, A. S., & Carén, H. (2019). Intra-Tumor DNA Methylation Heterogeneity in Glioblastoma; Implications for DNA Methylation-Based Classification. *Neuro-Oncology*.
- Wilhelmsson, U., Pozo-Rodríguez, A., Kalm, M., Pablo, Y. de, Widestrand, Å., Pekna, M., & Pekny, M. (2019). The role of GFAP and vimentin in learning and memory. *Biological Chemistry*, 400(9), 1147–1156.
- Wood, M. D., Reis, G. F., Reuss, D. E., & Phillips, J. J. (2016). Protein Analysis of Glioblastoma Primary and Posttreatment Pairs Suggests a Mesenchymal Shift at Recurrence. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 75(10), 925–935.
- Wu, W., Wu, Y., Mayer, K., Rosenstiel, C. von, Schecker, J., Baur, S., . . . Schlegel, J. (2020). Lipid Peroxidation Plays an Important Role in Chemotherapeutic Effects of Temozolomide and the Development of Therapy Resistance in Human Glioblastoma. *Translational Oncology*, 13(3), 100748.
- Xu, S.-L., Liu, S. [Sha], Cui, W., Shi, Y. [Yu], Liu, Q., Duan, J.-J., . . . Bian, X.-W. (2015). Aldehyde dehydrogenase 1A1 circumscribes high invasive glioma cells and predicts poor prognosis. *American Journal of Cancer Research*, 5(4), 1471–1483.
- Zhang, C. [Cen], Liu, J., Xu, D., Zhang, T., Hu, W., & Feng, Z. (2020). Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *Journal of Molecular Cell Biology*, 12(9), 674–687.

- Zhang, W. [Wenlong], Liu, Y. [Yanwei], Hu, H., Huang, H. [Hua], Bao, Z., Yang, P., . . . Zhang, W. [Wei] (2015). Aldh1a3: A Marker of Mesenchymal Phenotype in Gliomas Associated with Cell Invasion. *PloS One*, 10(11).
- Zhao, Y., Carter, R., Natarajan, S., Varn, F. S., Compton, D. A., Gawad, C., . . . Godek, K. M. (2019). Single-cell RNA sequencing reveals the impact of chromosomal instability on glioblastoma cancer stem cells. *BMC Medical Genomics*, 12(1), 79.

9 APPENDIX

9.1 Materialien

9.1.1 Antikörper Immunhistochemie

Biomarker	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Hersteller
ALDH1A3	Kaninchen, polyklonal (pc)	1:600	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
p53	Maus, monoklonal (mc)	1:200	Dako (Glostrup, Denamrk)
p62	Maus, mc	1:300	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Olig2	Maus, mc	1:100	Cell Marque (Rocklin, USA)
YKL-40	Maus, mc	1:200	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
EGFR	Maus, mc	1:50	Dako (Glostrup, Denamrk)
GFAP	Maus, mc	1:100	Dako (Glostrup, Denamrk)
Iba1	Kaninchen, pc	1:500	Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)
Mib-1 / Ki-67	Maus, mc	1:500	ImmunoLogic (Duiven, Niederlande)

Tabelle 7: **Primärantikörper** Immunhistochemie

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Biotinylated anti-mouse IgG	Pferd	1:400	Vector Laboratories, Inc. (Burlinghame, USA)
Biotinylated anti-rabbit IgG	Ziege	1:400	Vector Laboratories, Inc. (Burlinghame, USA)

Tabelle 8: **Sekundärantikörper** Immunhistochemie

9.1.2 Antikörper Immunfluoreszenz

Biomarker	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Hersteller
ALDH1A3	Kaninchen, pc	1:800	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Iba1	Maus, mc	1:100	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)

Tabelle 9: **Primärantikörper** Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 568	Esel	1:2000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488	Esel	1:2000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 10: **Sekundärantikörper** Immunfluoreszenz

9.1.3 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Aqua-Poly/Mount	Polysciences Inc., (Warrington, USA)
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA)
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
DAPI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hämalunsäure nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxilin-Eosin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hydrogen Peroxid 30%	Sigma (Saint Louis, USA)
ImmPACT™ DAB Peroxidase Kit (Rabbit/Mouse)	Biozol (Eching, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
NHS (Normal Horse Serum)	Biozol (Eching, Deutschland)
Organo-Limonene Mount™	Sigma (Saint Louis, USA)
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Vectastain ABC Kit (4°C)	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA)
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 11: **Chemikalien & Reagenzien**

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Citratpuffer	2,1g C6H8O7, 1000ml H2O, NaOH pH 6	Selbsterstellung
PBS 1x	NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na2HPO4 10mM, KH2PO4 1,8mM, HCl pH 7,4	Selbsterstellung
Blocking Buffer	1xPBS, 1% BSA, 0,1% TX 100, 0,2% Gold Fish Gelatine, 0,02% NA Azid, 2,5% NHS	Selbsterstellung
TRIS Puffer 10x	60,5g Tris, 90g NaCl, 700ml H2O, HCl pH 7,6	Selbsterstellung

Tabelle 12: **Puffer**

9.1.4 Geräte und Hilfsmaterial

Geräte	Hersteller
Dampfgarer	Tefal (Offenbach, Deutschland)
Feinwaage	Kern&Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Kühlplatte	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Lichtmikroskop	Olympus (Tokio, Japan)
Magnetrührer	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Mikrotom	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mini-Vortexer	Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Mischplatte	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Scanner	Aperio AT2 Scanner (Leica Biosystems, Germany)

Tabelle 13: **Geräte**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Mikrotomklingen	Feather (Osaka, Japan)
Objektträger-Menzel-Gläser Superfrost Plus	Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG (Gudensburg, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipetten 10ml	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)

Tabelle 14: **Verbrauchsmaterial**

9.1.5 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop Elements 2019	Adobe Systems incorporated (San Jose, USA)
Aperio Image Scope, V.12.3.0.5056	Leica Biosystems (Mannheim, Deutschland)
Microsoft Office 2013	Microsoft (Redmond, USA)
R Version 3.3.2	R Foundation for Statistical Computing (Wien, Österreich)
SPSS Statistics 25	IBM (Armonk, USA)

Tabelle 15: **Software**

9.2 Publikation



Article

Immunohistochemically Characterized Intratumoral Heterogeneity Is a Prognostic Marker in Human Glioblastoma

Friederike Liesche-Starnecker ^{1,*}, Karoline Mayer ^{1,†}, Florian Kofler ², Sandra Baur ¹, Friederike Schmidt-Graf ³, Johanna Kempfer ³, Georg Prokop ¹, Nicole Pfarr ⁴, Wu Wei ¹, Jens Gempt ⁵, Stephanie E. Combs ⁶, Claus Zimmer ², Bernhard Meyer ⁵, Benedikt Wiestler ^{2,7,‡} and Jürgen Schlegel ^{1,‡}

¹ Department of Neuropathology, School of Medicine, Institute of Pathology, Technical University Munich, Trogerstraße 18, 81675 München, Germany; karoline.mayer@tum.de (K.M.); sandra.baur@tum.de (S.B.); georg.prokop@tum.de (G.P.); vvwu@stanford.edu (W.W.); schlegel@tum.de (J.S.)

² Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, School of Medicine, Technical University Munich, Ismaninger Str. 22, 81675 München, Germany; florian.kofler@tum.de (F.K.); claus.zimmer@tum.de (C.Z.); b.wiestler@tum.de (B.W.)

³ Department of Neurology, School of Medicine, Technical University Munich, Ismaninger Str. 22, 81675 München, Germany; f.schmidt-graf@tum.de (F.S.-G.); Johanna.Kempfer@gmx.de (J.K.)

⁴ Institute of Pathology, School of Medicine, Technical University Munich, Trogerstraße 18, 81675 München, Germany; nicole.pfarr@tum.de

⁵ Department of Neurosurgery, School of Medicine, Technical University Munich, Ismaninger Str. 22, 81675 München, Germany; jens.gempt@tum.de (J.G.); bernhard.meyer@tum.de (B.M.)

⁶ Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Technical University Munich, Ismaninger Str. 22, 81675 München, Germany; stephanie.combs@tum.de

⁷ TranslaTUM (Zentralinstitut für translationale Krebsforschung der Technischen Universität München), Einsteinstraße 25, 81675 München, Germany

* Correspondence: Friederike.liesche@tum.de; Tel.: +49-89-6145

† These authors contributed to this paper equally.

‡ These authors contributed to this paper equally.

Received: 7 September 2020; Accepted: 9 October 2020; Published: 13 October 2020



Simple Summary: Intratumoral heterogeneity is believed to contribute to the immense therapy resistance and recurrence rate of glioblastoma. The aim of this retrospective study was to analyze the heterogeneity of 36 human glioblastoma samples on a morphological level by immunohistochemistry. We confirmed that this method is valid for heterogeneity detection. 115 Areas of Interest were labelled. By cluster analysis, we defined two subtypes (“classical” and “mesenchymal”). The results of epigenomic analyses corroborated the findings. Interestingly, patients with tumors that consisted of both subtypes (“subtype-heterogeneous”) showed a shorter overall survival compared to patients with tumor that were dominated by one subtype (“subtype-dominant”). Furthermore, the analysis of 21 corresponding pairs of primary and recurrent glioblastoma demonstrated that, additionally to an intratumoral heterogeneity, there is also a chronological heterogeneity with dominance of the mesenchymal subtype in recurrent tumors. Our study confirms the prognostic impact of intratumoral heterogeneity in glioblastoma and makes this hallmark assessable by routine diagnostics.

Abstract: Tumor heterogeneity is considered to be a hallmark of glioblastoma (GBM). Only more recently, it has become apparent that GBM is not only heterogeneous between patients (intertumoral heterogeneity) but more importantly, also within individual patients (intratumoral heterogeneity). In this study, we focused on assessing intratumoral heterogeneity. For this purpose, the heterogeneity of 38 treatment-naïve GBM was characterized by immunohistochemistry. Perceptible areas were rated for ALDH1A3, EGFR, GFAP, Iba1, Olig2, p53, and Mib1. By clustering methods, two distinct groups

similar to subtypes described in literature were detected. The classical subtype featured a strong EGFR and Olig2 positivity, whereas the mesenchymal subtype displayed a strong ALDH1A3 expression and a high fraction of Iba1-positive microglia. 18 tumors exhibited both subtypes and were classified as “subtype-heterogeneous”, whereas the areas of the other tumors were all assigned to the same cluster and named “subtype-dominant”. Results of epigenomic analyses corroborated these findings. Strikingly, the subtype-heterogeneous tumors showed a clearly shorter overall survival compared to subtype-dominant tumors. Furthermore, 21 corresponding pairs of primary and recurrent GBM were compared, showing a dominance of the mesenchymal subtype in the recurrent tumors. Our study confirms the prognostic impact of intratumoral heterogeneity in GBM, and more importantly, makes this hallmark assessable by routine diagnostics.

Keywords: glioblastoma; glioma; molecular pathology; prognostic marker; immunohistochemistry; methylation assay; heterogeneity; relapse; therapy resistance

1. Introduction

Tumor heterogeneity is now considered as a hallmark of glioblastoma (GBM). It is believed to strongly contribute to therapy resistance and accordingly, to the poor prognosis of this tumor entity [1]. To understand the various pheno- and genotypical characteristics and their biology, numerous approaches to subclassify glioblastomas exist. Originally, they were developed to describe intertumoral heterogeneity. Subtypes, called “classical”, “mesenchymal”, “proneural”, and “neural” have been consistently discussed since Verhaak et al. stated that the subtypes show different clinical courses and biology [2]. However, it has become apparent that, even more importantly, heterogeneity within a single tumor exists: Several studies have demonstrated that one tumor can harbor multiple subclones, which are assigned to different subtypes by their molecular characteristics [3,4]. Similar to evolutionary processes, diversity leads to advantage. There are different hypotheses regarding the development of heterogeneity in tumors. Based on Charles Darwin’s theory of evolution [5], the hypothesis of clonal evolution sees heterogeneity as a result of natural selection [6]. Genetic instability of tumor cells results in accumulated mutations leading to genetic diversity and heterogeneous morphology. By selective stress, e.g., caused by chemo- or radiotherapy, only adequately adapted cell clones survive [7]. In contrast, the stem cell model acts on the assumption of a hierarchical organization of tumor cells [8]. By self-renewal of stem cell like neoplastic cells, genetically and phenotypically diverse daughter cells develop, from which different intratumoral subtypes arise [9,10]. Besides these two main hypotheses, it is assumed that tumor heterogeneity is a consequence of a multifactorial process, including epigenetic alterations [11], intercellular communication, and interaction with the surrounding microenvironment [10,12]. In addition to regional heterogeneity, a chronological heterogeneity can also be observed when comparing pairs of primary and recurrent GBM. The mesenchymal subtype seems to be most the therapy resistant, since its occurrence increases in recurrent tumors [13]. Most studies on heterogeneity of GBM are based on large-scale genomic characterization. This is a powerful tool for discovery and in-depth tumor analysis, but it has a limited availability. There have been previous attempts to capture heterogeneity in GBM by immunohistochemistry, but these studies focused mainly on intertumoral heterogeneity, though [14,15]. Just recently, we published our first study with a morphological approach by using immunohistochemistry. We defined different tumor regions including region of hypoxia and stem cell region [16]. In this current study, we, again, chose the broadly applicable technique immunohistochemistry, but focused on applying the established subtypes on human tumor tissue with the aim to prove that immunohistochemistry is a valid method for detecting these diverse subtypes in an individual tumor. Furthermore, we hypothesized that the detection of different subtypes within one tumor has impact on its biological and clinical behavior. For this study, markers were chosen that have already been proposed for the recognition of different

subtypes. Alterations of the epidermal growth factor receptor (EGFR) are very common in GBM [17,18]. The status of EGFR amplification correlates with the tumor's potential to migrate [19]. The upregulation of EGFR is a characteristic of the classical subtype, according to Verhaak et al. [2]. The glial fibrillary acidic protein (GFAP), an astrocytic intermediate filament, is associated with migration and motility of astrocytes [18]. The mouse models showed that GFAP-positive tumors act out a more aggressive growth [20]. Oligodendrocyte lineage factor 2 (Olig2) is a transcription factor regulating proliferation of stem cells in the central nervous system (CNS) [21]. In tumors, Olig2 abrogates the proliferation inhibition of tumor suppressor p21 [22]. Experimental Olig2 deletion led to a shift from a proneural to the mesenchymal GBM subtype with the abrogation of EGFR [23]. 25% of primary GBM exhibit alterations in the function of p53 [24]. Mutations of this transcription factor were considered to be characteristic for the proneural subtype of GBM by Verhaak et al. [2]. It has to be noted, though, that the proneural subtype was also defined by mutations of isocitrate dehydrogenase (IDH), which leads to the challenge of whether this assignment is still contemporary. Nevertheless, p53 is of high interest and it was included in this study. In addition, expression of the enzyme aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) was analyzed. By its catalytic activity, which leads to oxidation from all-trans retinal to retinoic acid [25], it influences cell proliferation, differentiation, and apoptosis [26]. Furthermore, enzymes of the ALDH family counteract oxidative stress and therefore, protect from cell damage by aldehyde oxidation [27]. As tumor marker, ALDH1A3 is associated with poor outcome in a diversity of malignant tumors, amongst others also in high-grade gliomas [28]. It was shown that the enzyme is associated with the mesenchymal subtype in GBM [26]. Because not only tumor cells constitute tumor tissue, we chose to include ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) as marker of microglial cells, which, on average, reach a fraction of 30 to 40% of all cells in the tumor area [29]. Besides immunosuppressive effects [29], microglial cells promote cell proliferation and migration by the secretion of growth factors [28]. Furthermore, a high amount of microglial cells is associated with the mesenchymal subtype of GBM [13]. Lastly, proliferation marker, molecular immunology borstel 1 (Mib1), was included in this study in order to examine whether proliferation activity was associated with certain GBM subtypes.

By staining the mentioned markers immunohistochemically, this study demonstrates the intratumoral heterogeneity in human glioblastoma samples on a regional level and by also comparing pairs of primary and recurrent GBM on a chronological level.

2. Results

2.1. Areas of Interest (AoI)

For the primary glioblastomas, a total of 115 AoI were defined, ranging from 1 to 8 AoI per tumor. A total of 80 AoI were determined in the recurrent tumors, also ranging from 1 to 8 per tumor. The sample size of primary tumors varied between 12.5 mm² and 658.0 mm² (mean: 376.0 mm²); in the recurrent tumors, the range was from 17.8 mm² to 658.1 mm² (mean: 372.8 mm²).

2.2. Correlation Analysis

Spearman-rho correlation analysis showed a significant positive correlation between ALDH1A3 expression and GFAP ($r = 0.228$; $p = 0.014$) and Iba1 positivity ($r = 0.468$; $p = 0.000$). GFAP showed strong negative correlations with EGFR ($r = -0.291$; $p = 0.002$), Olig2 ($r = -0.345$; $p = 0.000$), and proliferation marker Mib1 ($r = -0.413$; $p = 0.000$). Furthermore, Mib1 showed a positive correlation with Olig2 ($r = 0.415$; $p = 0.000$). Table 1 shows all of the values. For the actual values of immunohistochemistry, also see Table S1.

Table 1. Spearman-Rho correlation analysis.

		ALDH1A3	GFAP	Iba1	EGFR	p53	Olig2	Mib1
ALDH1A3	r_s		0.228 *	0.468 **	-0.064	0.111	-0.048	-0.121
	p		0.014	0.000	0.495	0.240	0.612	0.199
GFAP	r_s	0.228 *		0.085	-0.291 **	-0.115	-0.345 **	-0.413 **
	p	0.014		0.369	0.002	0.220	0.000	0.000
Iba1	r_s	0.468 **	0.085		-0.090	0.176	-0.131	0.018
	p	0.000	0.369		0.338	0.059	0.162	0.848
EGFR	r_s	-0.064	-0.291 **	-0.090		-0.105	0.326 **	0.282 **
	p	0.495	0.002	0.338		0.263	0.000	0.002
p53	r_s	0.111	-0.115	0.176	-0.105		0.026	0.298 **
	p	0.240	0.220	0.059	0.263		0.783	0.001
Olig2	r_s	-0.048	-0.345 **	-0.131	0.326 **	0.026		0.415 **
	p	0.612	0.000	0.162	0.000	0.783		0.000
Mib1	r_s	-0.121	-0.413 **	0.018	0.282 **	0.298 **	0.415 **	
	p	0.199	0.000	0.848	0.002	0.001	0.000	

One star indicates significant level on a basis of $p < 0.05$, two stars on a basis of $p < 0.01$.

2.3. Tumor Cells Express ALDH1A3

Correlation analysis showed a strong correlation between Iba1 positivity and ALDH1A3 expression. We performed an immunofluorescence co-staining for Iba1 and ALDH1A3 to exclude that only Iba1-positive microglial cells express ALDH1A3. It can be nicely shown that many ALDH1A3-positive cells do not express Iba1 (Figure 1) and, hence, are not microglial, but assumingly tumor cells.

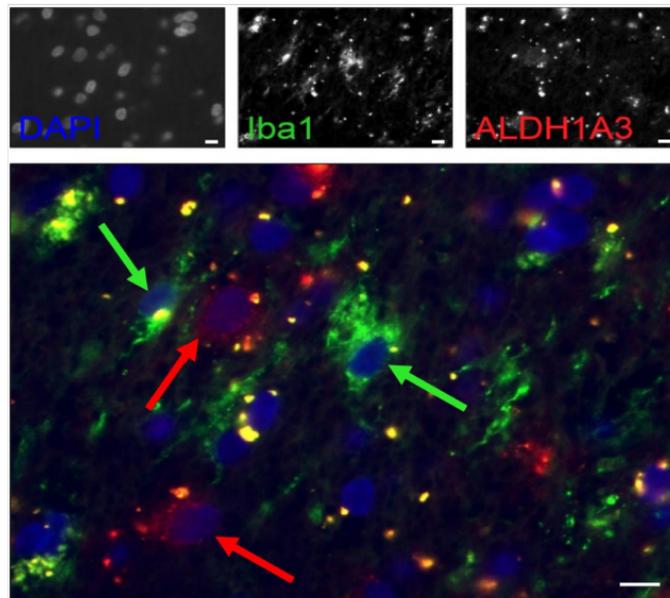


Figure 1. Iba1 and ALDH1A3 immunofluorescence double staining. The picture shows that most cells do not exhibit a co-expression of Iba1 and ALDH1A3. Green arrows mark Iba1-positive microglial cells that lack red signal for ALDH1A3. Red arrows point to ALDH1A3-positive cells without green signal for Iba1. Scale bars: 10 μ m.

2.4. Cluster Analysis Defines Two Immunohistochemical Subtypes

Two clustering methods—hierarchical clustering and partitioning around medoids clustering (PAM)—were used. For both methods, best division was observed for a number of two clusters. Figure 2 shows the hierarchical clustering with the mean scores of all AoI, which were assigned to the two clusters.

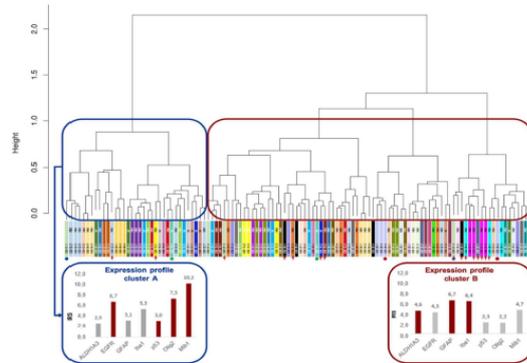


Figure 2. Hierarchical clustering divides the tumor areas into two subtypes. The blue frame is used for cluster A, which is comparable to the classical subtype by Verhaak et al. [2], the red frame marks cluster B with characteristics of the mesenchymal subtype. In the lower section of the figure, the characteristic immunohistochemical profiles of both clusters are pictured as bar charts. Red bars are used for markers that exceed the average immune reactive score (IRS). The stripes directly below the hierarchical tree with the same color represent the different AoI of the same tumor. In these stripes, information about O-6-methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) promoter status can be found (M = methylated, NM = non-methylated). The dots under the different colored AoIs samples, which consist of pairs of three colors, mark the AoIs that were analyzed epigenetically (the same colors were used in Figure 5b). The red crosses mark the AoIs, whose cluster assignment differs in partitioning around medoids (PAM).

The results were corroborated with PAM analysis (Figure 3). This method also detects a medoid for each cluster, i.e., the sample with the most characteristic immunohistochemical profile of each cluster. These profiles were very similar to those of the mean scores of the two clusters that were achieved by hierarchical clustering. We chose the PAM results for further analysis as (a) calculating the medoids gives an intuitive insight into the “most typical” member of each group and (b) through distance calculation, assigning new samples to one of the two clusters is very straightforward.

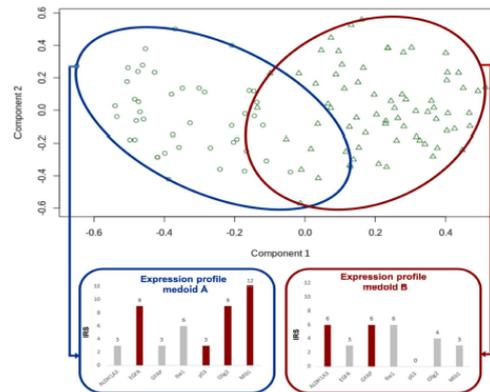


Figure 3. PAM divides the tumor areas into two subtypes. Similar to Figure 2, the blue frame is used for the classical subtype, the red for the mesenchymal subtype.

The bar charts show the immunohistochemical expression profiles of the medoids, the samples with the most characteristic immunohistochemical profile of each cluster. Red bars are used for markers that exceed the average (immune reactive score) IRS.

The two clustering methods assigned 100 of the 115 (87.0%) defined to the concordant cluster, whereas, for 15 (13.0%) areas, the attribution deviated. Figure 2 marks the divergent AoI.

Through this cluster analysis, two immunohistochemical clusters or subtypes can be described:

2.4.1. Cluster A = Classical/Proliferating Subtype

Forty-six AoI of 23 tumors were assigned to cluster A by PAM clustering. The areas of this cluster show a high proliferation index (mean Mib1 value 38.8%, range 20–90% compared to mean Mib1 value of Cluster B of 15.7%, range 5–90%), which justifies the additional name proliferating subtype in our sample collective. The cluster is further characterized by high expression of EGFR, p53, and Olig2. The positive correlation of these three markers collaborate the profile observation (see also Table 1). EGFR is a well-known marker of the classical subtype of the TCGA classification by Verhaak et al. [2]. In cluster A, the mean immune reactive score (IRS) adds up to 7.0 as compared to an average of 5.0, taken all AoI together. The strong EGFR positivity of the classical/proliferating subtype suggests a close relation to the classical subtype described by Verhaak et al. [2]. Furthermore, Olig2 shows a higher IRS in this cluster (IRS 5.9 compared to an average of 3.8). For the expression profile of the classical/proliferating subtype, see also Figure 4.

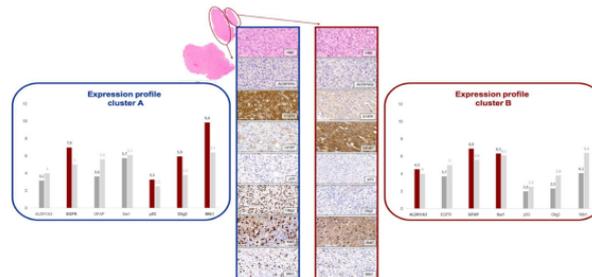


Figure 4. Characteristic immunohistochemical profile of both subtypes. The blue frame marks the classical subtype, the red the mesenchymal subtype. For each, the average IRS of all markers are pictured in the bar charts. Basis is the cluster assignment of PAM. Red bars are used for markers that exceed the average IRS. The light grey bars depict the average IRS for all AoIs.

2.4.2. Cluster B = Mesenchymal/Microglial-Dominant Subtype

PAM clustering assigned 69 AoI originating from 33 tumors to cluster B, which is defined by the high expression of biomarkers ALDH1A3 (mean IRS of 4.5 as compared to an average of 4.0) and GFAP (mean IRS of 6.9 compared to an average of 5.6). The high amount of Iba1-positive microglial cells (mean IRS of 6.3 as compared to an average of 6.1) led to the additional name microglial-dominant subtype. While in cluster A, proliferation processes seem to prevail, cluster B shows microenvironmental changes. Because ALDH1A3 is a mesenchymal marker, this cluster bears the name mesenchymal subtype, as known from *Verhaak's* TCGA classification [2]. For the expression profile of the microglial-dominant/mesenchymal subtype, also see Figure 4.

2.5. Cluster Analysis Shows Intratumoral Heterogeneity

With cluster analysis, we could confirm the existence of intratumoral heterogeneity, as of the 38 primary GBM, 18 (47.4%) contained AoI, which were assigned to different clusters by PAM. These tumors were named subtype-heterogeneous (ST-het). Of 15 (39.5%) GBM, all intratumoral defined AoI were assigned to the microglial-dominant/mesenchymal subtype. Five (13.2%) tumors consisted of only AoI of the classical/proliferating subtype. Tumors, whose AoI were all assigned to one cluster, were summarized to a subtype-dominant (ST-dom) group.

The mean area of *ST-het* tumors was not significantly larger than the mean area of *ST-dom* tumors (433.84 mm² compared to 323.85 mm², $p = 0.096$).

2.6. Patients with Subtype-Heterogeneous Tumors May Have a Poorer Survival Than Patients with Subtype-Dominant Tumors

The clinical relevance of the two immunohistochemical subtypes and their coexistence in one tumor is shown by the results regarding correlation with clinical data. For survival analysis, only glioblastomas with non-methylated promotor of the O-6-methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) were taken into account to allow for a comparable precondition. The tumor samples tested for their MGMT promotor status are marked in Figure 2. Including only tumors with non-methylated MGMT promotor status led to an analysis of 20 tumors, whereof 10 were assigned to *ST-het* and 10 to *ST-dom*. Figure 5a shows the result of the Kaplan–Meier method. Even if it did not reach level of significance ($p = 0.166$), a difference of the two groups can be seen. Patients with *ST-het* tumors show a shorter overall survival (OS) with a mean OS of 18.6 months (95 % CI 13.9 and 23.2 months) when compared to patients with *ST-dom* tumors with a mean OS of 25.3 months (95 % CI 16.7 and 33.8).

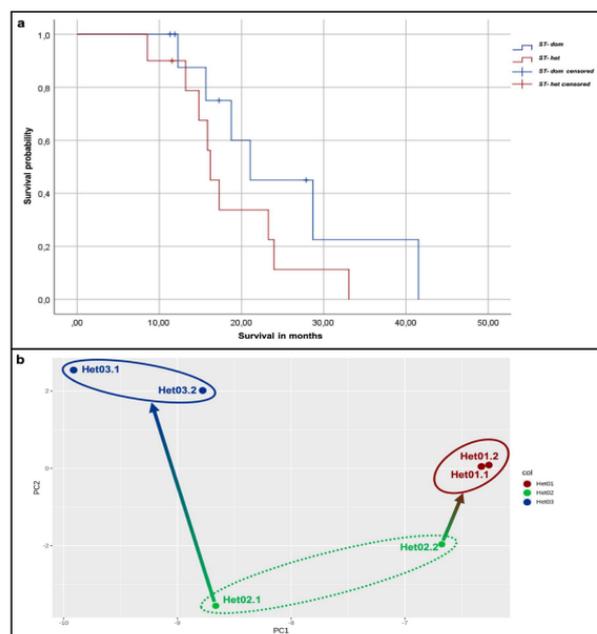


Figure 5. Survival analysis and principal component analysis (PCA) of epigenetic examination. (a): By Kaplan–Meier method, a shorter survival of patients with ST-dom tumors compared to patients with ST-het tumors can be observed ($p = 0.166$). (b): The methylation profile of each two different AoI of three tumors was examined. PCA revealed a proximity of the both samples of tumors Het01 and Het03. Interestingly, the methylation profiling confirms the allocation of the samples of tumor Het02 to the two different clusters by PAM, as one AoI shows a distinct nearer proximity to the samples of Het01 as to the other AoI of the same tumor sample.

2.7. Epigenetic Profiles Confirm Existence of Intratumoral Heterogeneity

Immunohistochemistry demonstrated intratumoral heterogeneity on protein level. Subsequently, analyses of methylation profiles of tumor samples were conducted in order to confirm this observation. For that, DNA from each two different AoI of three tumors was extracted and examined for their methylation profile using an epigenome-wide EPIC array. For one tumor, the AoI were assigned to the different clusters defined by PAM clustering (sample Het02), whereas, for the other two, both AoI were assigned to the same cluster (Het01 to mesenchymal/microglial-dominant subtype; Het03 to classical/proliferating subtype). The included samples are also marked in Figure 2. There, it can be noted that, by hierarchical clustering, the chosen AoI of Het03 were assigned to different clusters. Despite that, this particular tumor had been chosen for epigenetic profiling due to the appropriate size of AoI for sufficient DNA extraction. Principal component analysis (PCA) of the six samples revealed an expected proximity of the both samples of tumors Het01 and Het03. Interestingly, the methylation profiling confirms the allocation of the samples of tumor Het02 to the two different clusters, as one AoI shows a distinct nearer proximity to the samples of Het01 as to the other AoI of the same tumor sample (Figure 5b).

2.8. Dominance of Mesenchymal/Microglial-Dominant Subtype in Case of Recurrence

Intratumoral heterogeneity is a local phenomenon, but it has also a temporal component. This can be demonstrated by comparing primary tumor and its relapse. Twenty-one corresponding pairs of primary and relapse were analyzed and compared regarding their cluster assignment. For the recurrent tumors, a clear dominance of the mesenchymal/microglial-dominant subtype was observed.

Seventy-four (92.5%) of the 80 AoI were assigned to this subtype by PAM clustering, whereas only six (7.5%) were grouped into the classical/proliferating subtype. When only taking in account the recurrent tumors with corresponding primary, 69 of 72 AoI (95.8%) were clustered into the mesenchymal/microglial-dominant subtype, whereas only three (4.2%) were assigned to the classical/proliferating subtype. This led to an assignment of 19 of 21 (90%) recurrent tumors to ST-dom, whereof all were mesenchymal/microglial-dominant. The remaining two (10%) tumors belonged to the *ST-het* group. Figure 6 demonstrates the expression levels of ALDH1A3 (a), EGFR (b), Iba1 (c), and Mib1 (d) in AoI of primary tumors when compared to recurrent tumors. Mean IRS for ALDH1A3 and Iba1, both markers for the mesenchymal/microglial-dominant subtype were much higher in the recurrent tumors compared to the primary tumors (mean IRS for ALDH1A3: 7.19 vs. 3.48; mean IRS for Iba1: 7.46 vs. 6.12). In contrast, EGFR and Mib1, both markers for the classical/proliferating subtype, decreased between primary and recurrent tumors (mean IRS for EGFR: 4.82 vs. 3.08; mean score for Mib1: 5.77 vs. 3.75). T-test analyses showed a significant increase of ALDH1A3 and Iba1 in the progression ($p = 0.000$ and $p = 0.001$) and significant decrease of EGFR and amount of proliferating cells ($p = 0.005$ and $p = 0.000$).

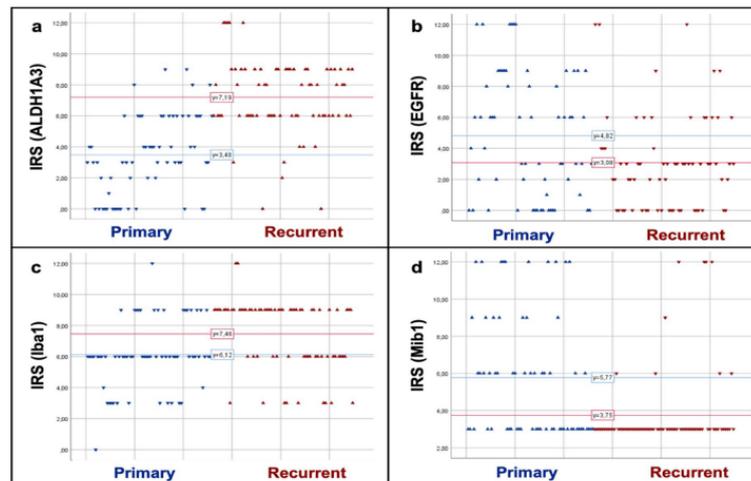


Figure 6. Comparison of marker expression in primary and recurrent GBM. The charts show a strong increase of ALDH1A3 (a) and Iba1 (c) positivity between primary and recurrent tumors. In contrast, EGFR (b) and proliferation (Mib1; d) decrease.

3. Discussion

This study confirms the existence of intratumoral heterogeneity in GBM and its influence on the clinical outcome. So far, mostly single cell analyses identified intratumoral heterogeneity on genomic level [4], but, as this study shows, morphological examination, including immunohistochemical protein labeling, also serves as valid heterogeneity detection system. Therefore, our results make assessing this central oncogenetic property of GBM broadly clinically available. Most previous immunohistochemical

studies focused on intertumoral heterogeneity. Conroy et al. [14] for instance, defined three subtypes with high expression of EGFR defining the classical subtype. Popova et al. [15] also defined a mesenchymal and a classical subtype. With immunohistochemical analyses of EGFR, PDGFRA, and p53, Le Mercier et al. [30] succeeded with a division in a proneural, characterized by PDGFRA and p53 positivity and a classical subtype with high EGFR expression, as well as “others”, which do not express any of the markers. All of these results are in accordance with our findings, which go beyond that by showing that these subtypes can not only be found in different GBM, but also coexist in one tumor. A third subtype, the proneural subtype, which was proposed by several groups, was mostly defined by IDH mutation [14,15,31] and it should not be compared to IDH wildtype GBM according to the current state of knowledge. In early heterogeneity studies, a neural subtype was named [2]. Newer studies propose the influence of contamination with surrounding normal brain tissue, since this subtype was mostly found at the tumor border [13]. In a recent study, we began to apply the concept of intratumoral heterogeneity by immunohistochemistry and defined different tumor regions, e.g., region of hypoxia, proliferative region and stem cell region [16]. Although, the current study focused on applying the established subtypes on human tumor tissue. By cluster analysis, two subgroups were defined. The first subtype is comparable to the classical subtype by Verhaak et al. [2]. Our results show that it is immunohistochemically characterized by a strong positivity for EGFR and Olig2, as well as a high proliferation activity. High EGFR expression leads to angiogenesis and invasion [9,32]. A heterogenous protein expression has already been described for GBM [33], and it may influence the tumor cells’ potential to migrate [19]. Stem cell marker Olig2, which is also associated with the classical subtype in this study, is integrated in regulating stem cell proliferation [22] and driving tumor growth [34]. Contrary to our results, the transcription factor was shown to be associated with the proneural subtype [30,35], but, as mentioned before, it is questionable if this subtype exists. This might explain why an association between EGFR and Olig2 and their belonging to the same subtype have not been described before. Similar applies for p53 that was also mentioned as characteristic for a proneural subtype before [2,14], and that belongs to the classical subtype in our sample collective. The other subtype, which was defined in this study, is comparable to the mesenchymal subtype by Verhaak et al. [2]. Here, a strong positivity for ALDH1A3 and GFAP was observed. Furthermore, there was an above-average amount of microglial cells in this subtype. An association of ALDH1A3 to this subtype has been described before [26,36]. The enzyme’s influence on cell adhesion and tumor invasion and its capability to reduce oxidative stress could contribute to the poorer outcome of this subtype [26,37]. GFAP is also associated with a more aggressive tumor growth and it was mentioned as a characteristic of the mesenchymal subtype before [35]. The high amount of microglial cells in this subtype has a strong influence on the tumor’s microenvironment. Because their number exceed the amount of tumor cells in some tumors or tumor regions, their effect on therapy resistance must be considered. The observed strong negative correlation of EGFR and GFAP in our sample group is notable. Both of the markers have been mentioned as characteristics for miscellaneous subtypes, EGFR for the classical subtype [2] and GFAP for the mesenchymal subtype [35]. We hypothesize that the strong negative correlation could be due to different “strategical focuses” of the tumor cells with strong expression of EGFR in areas of cell proliferation and the strong expression of GFAP in areas of tumor invasion, as proposed before [38].

After defining a mesenchymal and classical subtype by cluster analysis, we could show that in some cases both subtypes can be found in the same tumor. Epigenetic examination confirmed these observations in one specimen. Additionally, survival analysis suggested that tumors that consist of both subtypes, defined as subtype-heterogeneous tumors, have a poorer outcome when compared to subtype-dominant tumors. This underlines the clinical importance of our study. The regional occurrence also has an impact on biopsy planning for therapeutic decision making, as a biopsy only reflects a small part of the tumor and it may not display the whole tumor’s morphology.

Furthermore, this study dealt with tumor development between primary and recurrent GBM. A chronological heterogeneity was also observed. The mesenchymal subtype dominated in the relapses,

which suggests that cells of this subtype may have a higher therapy resistance and, hence, are responsible for relapse occurrence. Previous immunohistochemical studies used the term “mesenchymal transition” for this phenomenon [39,40]. However, as shown in our study, the mesenchymal subtype is also found in areas of the primary GBM, which leads to the preference of using the term “mesenchymal dominance” instead.

Even if our results give a clear picture of intratumoral and temporal heterogeneity in GBM, the results demand confirmatory studies with a larger of samples size, especially to substantiate the clinical impact. Broader examination of the epigenetic heterogeneity on a regional level is needed. The advantage of the use of immunohistochemistry is its broad availability and capacity to reflect the tumor’s morphology. This might clear the way to implementation of regional heterogeneity analyses into standard diagnostics. For this purpose, a standardized evaluation, e.g., by means of a defined heterogeneity index, should be developed.

4. Materials and Methods

4.1. Material

Tumor samples from 38 treatment-naïve IDH wildtype GBM patients (median age at diagnosis: 60 years; 29 male) plus material of 21 corresponding recurrent tumors were included in this retrospective study. According to Bayerisches Krankenhausgesetz, Artikel 27 it is allowed to use patient data for research given that they are anonymous. In the approval of the ethics committee (Bayerisches Krankenhausgesetz) for our study, it is stated that we do not need the patients’ consent for this retrospective study. Additionally, the material of two recurrent glioblastomas alone (median age at diagnosis: 60 years; two male) were analyzed. For patient data, also see Table 2.

Table 2. Patient data.

Parameter	Number of Patients	Data	
Age (in years)	<i>n</i> = 38	mean	59
		median	60
		range	27–84
Sex	<i>n</i> = 38	male	29
		female	9
MGMT promotor status	<i>n</i> = 26	methylated	6
		non-methylated	20
Overall survival (in months)	<i>n</i> = 20	mean (95% CI)	22 (17–26)
		median (95% CI)	19 (13–25)

The tissue samples, all formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE), derived from the Department of Neuropathology of the Institute of Pathology, Technical University Munich with a period of surgical resection at the Clinic and Polyclinic of Neurosurgery at Klinikum rechts der Isar from 2011 to 2017. Histopathological diagnosis was performed by neuropathologists and it was re-evaluated for this study according to WHO classification of tumors of the central nervous system, 2016 [41]. The study was performed according to the standards of the Helsinki Declaration of 1975 (as revised in 1983) and approved by the local ethics committee (reference number 164/19 S). Tumor samples of 38 patients were analyzed. Of 26 patients, the MGMT promotor status was known. The overall survival was only calculated for patients with non-methylated MGMT promotor.

4.2. Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, 2 µm thick slides were cut with a standard microtome and dried at 76 °C for 30 min. EGFR, GFAP, Iba1, Olig2, p53, and Mib1 immunostaining was performed using a fully-automated staining system (Ventana BenchMark ULTRA; Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA). In brief, the slides were exposed to heat-induced epitope uncovering in pH 8.4 buffer at 95 °C for 32 min. The tissue was incubated with H₂O₂ as an inhibitor of endogenous peroxidase in order

to prevent unspecific bindings of the primary antibody. Afterwards, the slides were charged with anti-EGFR (monoclonal, mouse, dilution 1:50; Clone E30; DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark), anti-GFAP (monoclonal, mouse, dilution 1:100; Clone 6F2; DakoCytomation Denmark A/S, Denmark), anti-Iba1 (polyclonal, rabbit, dilution 1:500; Wako Pure Chemical Industries, Japan), anti-Olig2 (monoclonal, mouse, dilution 1:100; Clone 211F1.1; Cell Marque, Rocklin, CALIF, USA), anti-p53 (monoclonal, mouse, dilution 1:200; Clone DO-7; DakoCytomation Denmark A/S, Denmark), or anti-Mib1 (monoclonal, mouse, dilution 1:500; Clone MIB-1; VWR, Radnor, PA, USA) antibodies. For antibody detection, 3,3'-diaminobenzidine- (DAB-) based OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems) was used subsequently.

ALDH1A3 immunohistochemistry was manually performed, starting with epitope uncovering in pH 6.0 citrate buffer at 95 °C for 30 min., followed by H₂O₂ incubation. Anti-ALDH1A3 antibody (polyclonal, rabbit, dilution 1:600; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was incubated overnight at 4 °C. Biotinylated secondary anti-rabbit IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in a dilution of 1:400 and subsequently, ABC-reagents (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) were incubated for 30 min each., followed by DAB-reagent (Agilent, Santa Clara, CA USA).

For all immunostainings, counterstaining with haematoxylin was conducted and positive controls used as quality assurance.

4.3. Staining Evaluation

After slide digitalization with Aperio AT2 scanner (Leica biosystems, Wetzlar, Germany), evaluation of immunohistochemistry was performed by neuropathologists using Aperio ImageScope (version 12.3.0.5056, Leica biosystems, Germany). For every immunohistochemical marker, the areas of interest (AoI) were defined for each slide. For that, perceptible either particularly high or low protein expression was labeled for every marker. Afterwards, marked sectors were matched among all stainings of one tumor sample and overlapping zones were defined as AoI. Subsequently, scores for each marker in every AoI were given. Regarding Iba1, EGFR, GFAP, and Olig2, a variant of the established semiquantitative IRS by Remmele and Stegner was used, which consists of a product of scores of staining intensity (0 = no staining, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong positivity) and percentage of positive cells (0 = 0%, 1 = 1–4%, 2 = 5–50%, 3 = 51–75%, 4 = 76–100%) [35,42]. For ALDH1A3, the score was slightly modified, since the maximum of stained cells only rarely exceeded 50 % (0 = 0%, 1 = 1–10%, 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–100%). For Mib1, only the percentage of positive cells was counted and translated into a score from 0–12 (0 = 0%, 3 = 1–19%, 6 = 20–29%, 9 = 30–39%, 12 = ≥ 40%). For p53, only strong positive cells were counted and scored while taking into account ranges that were suggested by Takami et al. [43] (0 = 0%, 1 = 1–10%, 2 = 11–89%, 3 = 90–100%).

4.4. Immunofluorescence Double Staining

Because the AoI mostly showed similar values for Iba1 and ALDH1A3, double staining with immunofluorescence was conducted in order to evaluate whether tumor cells of Iba1-positive microglial cells are ALDH1A3-positive. The pretreatment was conducted analogous to the above described ALDH1A3 immunohistochemistry. Afterwards, a mixture of the primary antibodies (anti-Iba1: monoclonal, mouse, dilution 1:100; Wako Pure Chemical Industries, Japan; anti-ALDH1A3: polyclonal, rabbit, dilution 1:800; Abcam, UK) was incubated over night at 4 °C followed by the secondary antibody (for Iba1: anti-mouse IgG Alexa Fluor 568, donkey, dilution 1:2000; Thermo Fischer Scientific, USA; for ALDH1A3: anti-mouse IgG Alexa Fluor 488, donkey, dilution 1:2000; Thermo Fischer Scientific, USA) for 45 min. Lastly, counterstaining with DAPI (Roche Diagnostics GmbH, Germany) was conducted, followed by covering with Aqua poly Maunt (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Positive controls served as quality for evaluation, fluorescence microscope Axio Imager.Z2 (Zeiss, Oberkochen, Germany), and software AxioVision (version 4.8, Zeiss, Germany) were used.

4.5. 850k Methylation Array

DNA from marked tumor areas were extracted from FFPE material, followed by measuring the DNA concentration using Quibits dsDNA High sensitivity Assay kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) on a QuBit 4 system. DNA was then applied to Illumina EPIC BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) for methylation analysis, as previously described [44].

For subsequent analysis of the 850k arrays, the BioConductor package “minfi” [45] was used. After initial quality control, standard processing (SWAN normalization, filtering probes with a detection $p > 0.05$) was applied. A set of glioma-specific CpG sites from Ceccarelli et al. [46] was selected for further analysis in order to visualize spatial proximity of samples. Principal Component Analysis of the filtered methylation data was performed, and samples were plotted by the two largest eigenvectors.

4.6. Statistical Analysis

Data were analyzed using R (version 3.3.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and IBM SPSS Statistics (version 22.0 IBM, Armonk, NY, USA). Marker correlation was tested by Spearman–Rho correlation analysis. Welch’s t-test and scatterplots served for comparison of primary and recurrent tumors. The connection of tissue size and number of AoI was analyzed by t-test. The Kaplan–Meier method was used for survival probability analysis. Hierarchical and PAM cluster analyses were conducted for the results of immunohistochemistry. Given the non-continuous nature of this data, Gower’s distance was chosen in order to calculate the underlying dissimilarity matrix (using R function “daisy”). Agglomerative hierarchical clustering with Ward’s method for clustering was performed using R function “agnes”. In parallel, PAM was performed for two groups ($k = 2$) while using R function “pam”. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

5. Conclusions

Our results indicate that the immunohistochemical detection of regional and temporal heterogeneity in GBM is feasible and it potentially provides information important for prognosis and therapy resistance. Consideration should be given to implementing immunohistochemical evaluation of tumor heterogeneity into standard neuropathological diagnostics.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2964/s1>, Table S1: Results of immunohistochemistry.

Author Contributions: Conceptualization, F.L.-S., K.M., B.W. and J.S.; Data curation, F.S.-G., J.K., J.G., S.E.C., C.Z. and B.M.; Formal analysis, J.G., C.Z., B.M., B.V. and J.S.; Funding acquisition, B.W.; Investigation, F.L.-S., K.M., B.W. and J.S.; Methodology, F.L.-S., K.M., S.B., G.P., N.P. and W.W.; Project administration, F.L.-S.; Software, K.M., F.K., G.P. and B.W.; Supervision, B.W. and J.S.; Validation, F.L.-S., F.K., F.S.-G., W.W., J.G. and J.S.; Visualization, F.L.-S. and K.M.; Writing—original draft, F.L.-S. and K.M.; Writing—review & editing, S.B., F.S.-G., J.K., G.P., N.P., W.W., J.G., S.E.C., C.Z., B.M., B.W. and J.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the DFG, SFB-824, subproject B12 (grant to B.W.).

Acknowledgments: The authors would like to thank Ch. Schustetter and P. Meyer for their excellent technical assistance. This work was supported through the DFG, SFB-824, TPB12 (grant to B.W.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lee, J.-K.; Wang, J.; Sa, J.K.; Ladewig, E.; Lee, H.-O.; Lee, I.-H.; Kang, H.J.; Rosenbloom, D.S.; Camara, P.G.; Liu, Z.; et al. Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 594–599. [CrossRef] [PubMed]
2. 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. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110. [CrossRef] [PubMed]

3. Parker, N.R.; Hudson, A.L.; Khong, P.; Parkinson, J.F.; Dwight, T.; Ikin, R.J.; Zhu, Y.; Cheng, Z.J.; Vafae, F.; Chen, J.; et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22477. [[CrossRef](#)]
4. 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. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **2014**, *344*, 1396–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Darwin, C. *The Origin of Species: By Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*; John Murray: London, UK, 1859.
6. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **1976**, *194*, 23–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Merlo, L.M.; Pepper, J.W.; Reid, B.J.; Maley, C.C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 924–935. [[CrossRef](#)]
8. Shackleton, M.; Quintana, E.; Fearon, E.R.; Morrison, S.J. Heterogeneity in cancer: Cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* **2009**, *138*, 822–829. [[CrossRef](#)]
9. Bonavia, R.; Inda, M.D.M.; Cavenee, W.K.; Fumari, F.B. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: A social network. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 4055–4060. [[CrossRef](#)]
10. Ho, I.A.W.; Shim, W.S.N. Contribution of the microenvironmental niche to glioblastoma heterogeneity. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 1–13. [[CrossRef](#)]
11. Wenger, A.; Vega, S.F.; Kling, T.; Bontell, T.O.; Jakola, A.S.; Carén, H. Intratumor DNA methylation heterogeneity in glioblastoma: Implications for DNA methylation-based classification. *Neuro-Oncology* **2019**, *21*, 616–627. [[CrossRef](#)]
12. Dirkse, A.; Golebiewska, A.; Buder, T.; Nazarov, P.V.; Muller, A.; Poovathingal, S.; Brons, N.H.C.; Leite, S.; Sauvageot, N.; Sarkisjan, D.; et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wang, Q.; Hu, B.; Hu, X.; Kim, H.; Squatrito, M.; Scarpace, L.; Decarvalho, A.C.; Lyu, S.; Li, P.; Li, Y.; et al. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Conroy, S.; Kruyt, F.A.E.; Joseph, J.V.; Balasubramanian, V.; Bhat, K.P.; Wagemakers, M.; Enting, R.H.; Walenkamp, A.M.E.; Dunnen, W.F.A.D. Subclassification of newly diagnosed glioblastomas through an immunohistochemical approach. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Popova, S.N.; Bergqvist, M.; Dimberg, A.; Edqvist, P.-H.; Ekman, S.; Hesselager, G.; Pontén, E.; Smits, A.; Soodan, L.; Alafuzoff, I. Subtyping of gliomas of various WHO grades by the application of immunohistochemistry. *Histopathology* **2013**, *64*, 365–379. [[CrossRef](#)]
16. Bergmann, N.; Delbridge, C.; Gempt, J.; Feuchtinger, A.; Walch, A.; Schirmer, L.; Bunk, W.; Aschenbrenner, T.; Liesche, F.; Schlegel, J. The intratumoral heterogeneity reflects the intertumoral subtypes of glioblastoma multiforme: A regional immunohistochemistry analysis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 494. [[CrossRef](#)]
17. Gan, H.K.; Kaye, A.H.; Luwor, R. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* **2009**, *16*, 748–754. [[CrossRef](#)]
18. Miconi, G.; Palumbo, P.; Dehcordi, S.R.; La Torre, C.; Lombardi, F.; Evtoski, Z.; Cimini, A.M.; Galzio, R.; Cifone, M.G.; Cinque, B. Immunophenotypic characterization of human glioblastoma stem cells: Correlation with clinical outcome. *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 864–876. [[CrossRef](#)]
19. Parker, J.J.; Canoll, P.; Niswander, L.; Kleinschmidt-DeMasters, B.K.; Foshay, K.; Waziri, A. Intratumoral heterogeneity of endogenous tumor cell invasive behavior in human glioblastoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 18002. [[CrossRef](#)]
20. Irvin, D.M.; McNeill, R.S.; Bash, R.E.; Miller, C.R. Intrinsic astrocyte heterogeneity influences tumor growth in glioma mouse models. *Brain Pathol.* **2016**, *27*, 36–50. [[CrossRef](#)]
21. Trépan, A.L.; Bouchart, C.; Rorive, S.; Sauvage, S.; Decaestecker, C.; Demetter, P.; Salmon, I. Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms. *Tumor Biol.* **2014**, *36*, 1943–1953. [[CrossRef](#)]
22. Tsigelny, I.F.; Kouznetsova, V.L.; Lian, N.; Kesari, S. Molecular mechanisms of OLIG2 transcription factor in brain cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 53074–53101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kupp, R.; Shtayer, L.; Tien, A.C.; Szeto, E.; Sanai, N.; Rowitch, D.H.; Mehta, S. Lineage-restricted OLIG2-RTK signaling governs the molecular subtype of glioma stem-like cells. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 2838–2845. [[CrossRef](#)]

24. Viotti, J.; Duplan, E.; Caillava, C.; Condat, J.; Goiran, T.; Giordano, C.; Marie, Y.; Idbaih, A.; Delattre, J.-Y.; Honnorat, J.; et al. Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity. *Oncogene* **2013**, *33*, 1764–1775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Duan, J.J.; Cai, J.; Guo, Y.F.; Bian, X.W.; Yu, S.C. ALDH1A3, a metabolic target for cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 965–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Li, G.; Li, Y.; Liu, X.; Wang, Z.; Zhang, C.; Wu, F.; Jiang, H.; Zhang, W.; Bao, Z.; Wang, Y.; et al. ALDH1A3 induces mesenchymal differentiation and serves as a predictor for survival in glioblastoma. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Marchitti, S.A.; Brocker, C.; Stagos, D.; Vasiliou, V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: The aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 697–720. [[CrossRef](#)]
28. Sarkar, S.; Döring, A.; Zemp, F.J.; Silva, C.; Lun, X.; Wang, X.; Kelly, J.; Hader, W.; Hamilton, M.; Mercier, P.; et al. Therapeutic activation of macrophages and microglia to suppress brain tumor-initiating cells. *Nat. Neurosci.* **2013**, *17*, 46–55. [[CrossRef](#)]
29. Chen, Z.; Hambarzumyan, D. Immune microenvironment in glioblastoma subtypes. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1004. [[CrossRef](#)]
30. Le Mercier, M.; Hastir, D.; Lopez, X.M.; De Neve, N.; Maris, C.; Trépant, A.L.; Rorive, S.; Decaestecker, C.; Salmon, I. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e45475. [[CrossRef](#)]
31. Nagy, A.; Garzuly, F.; Padányi, G.; Szűcs, I.; Feldmann, Á.; Murnyák, B.; Hortobágyi, T.; Kálmán, B. Molecular subgroups of glioblastoma—An assessment by immunohistochemical markers. *Pathol. Oncol. Res.* **2017**, *25*, 21–31. [[CrossRef](#)]
32. Keller, S.; Schmidt, M.H.H. EGFR and EGFRvIII promote angiogenesis and cell invasion in glioblastoma: Combination therapies for an effective treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Furnari, F.B.; Cloughesy, T.F.; Cavenee, W.K.; Mischel, P.S. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 302–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lu, F.; Chen, Y.; Zhao, C.; Wang, H.; He, D.; Xu, L.; Wang, J.; He, X.; Deng, Y.; Lu, E.E.; et al. Olig2-dependent reciprocal shift in PDGF and EGF receptor signaling regulates tumor phenotype and mitotic growth in malignant glioma. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 669–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Motomura, K.; Natsume, A.; Watanabe, R.; Ito, I.; Kato, Y.; Momota, H.; Nishikawa, R.; Mishima, K.; Nakasu, Y.; Abe, T.; et al. Immunohistochemical analysis-based proteomic subclassification of newly diagnosed glioblastomas. *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 1871–1879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zhang, W.; Liu, Y.; Hu, H.; Huang, H.; Bao, Z.; Yang, P.; Wang, Y.; You, G.; Yan, W.; Jiang, T.; et al. ALDH1A3: A marker of mesenchymal phenotype in gliomas associated with cell invasion. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chang, P.M.-H.; Chen, C.-H.; Yeh, C.-C.; Lu, H.-J.; Liu, T.-T.; Chen, M.-H.; Liu, C.-Y.; Wu, A.T.H.; Yang, M.-H.; Tai, S.-K.; et al. Transcriptome analysis and prognosis of ALDH isoforms in human cancer. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Herpers, M.J.H.M.; Budka, H.; McCormick, D. Production of glial fibrillary acidic protein (GFAP) by neoplastic cells: Adaptation to the microenvironment. *Acta Neuropathol.* **1984**, *64*, 333–338. [[CrossRef](#)]
39. Schäfer, N.; Gielen, G.H.; Rauschenbach, L.; Kebir, S.; Till, A.; Reinartz, R.; Simon, M.; Niehusmann, P.; Kleinschnitz, C.; Herrlinger, U.; et al. Longitudinal heterogeneity in glioblastoma: Moving targets in recurrent versus primary tumors. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 96. [[CrossRef](#)]
40. Wood, M.D.; Reis, G.F.; Reuss, D.E.; Phillips, J.J. Protein analysis of glioblastoma primary and posttreatment pairs suggests a mesenchymal shift at recurrence. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2016**, *75*, 925–935. [[CrossRef](#)]
41. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
42. Remmele, W.; Stegner, H.E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathol.* **1987**, *8*, 138–140.

43. Takami, H.; Yoshida, A.; Fukushima, S.; Arita, H.; Matsushita, Y.; Nakamura, T.; Ohno, M.; Miyakita, Y.; Shibui, S.; Narita, Y.; et al. Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry—A comparative study in 157 diffuse gliomas. *Brain Pathol.* **2014**, *25*, 256–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Reinhardt, A.; Stichel, D.; Schrimpf, D.; Sahm, F.; Korshunov, A.; Reuss, D.E.; Koelsche, C.; Huang, K.; Wefers, A.K.; Hovestadt, V.; et al. Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations. *Acta Neuropathol.* **2018**, *136*, 273–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Aryee, M.J.; Jaffe, A.E.; Corrada-Bravo, H.; Ladd-Acosta, C.; Feinberg, A.P.; Hansen, K.D.; Irizarry, R.A. Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1363–1369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ceccarelli, M.; Barthel, F.P.; Malta, T.M.; Sabedot, T.S.; Salama, S.R.; Murray, B.A.; Morozova, O.; Newton, Y.; Radenbaugh, A.; Pagnotta, S.M.; et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* **2016**, *164*, 550–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).