

Aus der Klinik für Neurologie, Abteilung für experimentelle Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunhistochemische Charakterisierung von ZEB1 in humanen  
Glioblastomen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marc Sören Schmidt

aus Frankfurt (Oder)

Datum der Promotion: 17.09.2021



# Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: Euskirchen P, Radke J, Schmidt MS, Heuling ES, Kadikowski E, Maricos M, Knab F, Grittner U, Zerbe N, Czabanka M, Dieterich C, Miletic H, Mørk S, Koch A, Endres M, Harms C. Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. PLoS One. 2017;12(9):e0185376 / published 25.09.2017



# Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellen .....	7
Abbildungen .....	7
Diagramme .....	9
Abkürzungsverzeichnis.....	11
1 Abstract.....	13
2 Einleitung .....	15
2.1 Das humane Glioblastom .....	15
2.1.1 Definition und Epidemiologie.....	15
2.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie .....	17
2.1.3 Klinik und Diagnostik.....	23
2.1.4 Therapie und Prognose .....	26
2.2 Tumorsubtypenklassifikationen .....	32
2.2.1 Transkriptionale Subtypen .....	32
2.2.2 Subtypen basierend auf DNA-Methylierungsprofilen .....	34
2.3 ZEB1 im Kontext primärer Hirntumoren.....	35
2.3.1 ZEB1 als EMT-Induktor.....	35
2.3.2 ZEB1 in humanen Glioblastomen .....	36
2.3.3 Intertumorale Heterogenität der ZEB1-Expression .....	37
2.4 Automatisierte Analyse mikroskopischer Bilddatensätze.....	38
2.5 ZEB1-Charakterisierung mittels automatischem Auswertungsalgorithmus .	38
3 Material und Methoden .....	39
3.1 Tumorproben.....	39
3.2 Immunhistochemie .....	39
3.3 TMA – Prozessierung.....	40
3.3.1 Aufbereitung des Datensatzes.....	42
3.3.2 ROI-Definition .....	43
3.1 TMA – Analyse .....	44
3.1.1 Manuelle Quantifizierung von ZEB1.....	44
3.1.2 Automatische Quantifizierung von ZEB1 .....	44
3.1.3 Methodvalidierung.....	47

3.1.4	Automatische Bestimmung des EGFR und CD68 labeling index.....	48
3.1.5	Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus.....	48
3.1.6	Bestimmung des NF1-Expressionsstatus .....	48
3.1.7	Statistik .....	49
3.1.8	Reproduzierbarkeit und Datenverfügbarkeit.....	49
4	Ergebnisse .....	50
4.1	Methodenvalidierung: Überlegenheit der CellProfiler-Methode .....	50
4.2	Charakterisierung von ZEB1 in humanen Glioblastomen .....	57
4.2.1	Intertumorale Heterogenität der ZEB1-Expression in Glioblastomen....	58
4.2.2	Klinische Parameter.....	61
5	Diskussion.....	62
5.1	Güte des Rohdatensatzes .....	62
5.1.1	Selektionsbias bei der Probengewinnung .....	62
5.1.2	Mögliche Fehldiagnostik .....	63
5.2	Vorteile und Probleme der automatischen TMA-Prozessierung.....	63
5.2.1	Automatische Quantifizierung von ZEB1 mit Cellprofiler.....	65
5.2.2	Automatische Bestimmung des EGFR labeling index.....	68
5.3	Intertumorale Heterogenität der ZEB1-Expression in Glioblastomen .....	68
5.4	Der prognostische Wert von ZEB1 .....	71
6	Literaturverzeichnis .....	73
	Eidesstattliche Versicherung .....	89
	Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	91
	Lebenslauf.....	93
	Publikationsliste .....	95
	Danksagung .....	97

# Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

## Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Ergebnisse der ZEB1-Quantifizierung für die Tumoren der Zufallsstichprobe (Spot_ID: TumorID_Replikat). Anteil ZEB1+ Nuclei an der Gesamtzahl ausgezählter Nuclei in Prozent für die jeweilige Messmethode (manuelle Quantifizierung, automatische Quantifizierung: CellProfiler, ImmunoRatio) .....	56
<b>Tabelle 2:</b> Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) als Zusammenhangsmaß zwischen den verschiedenen Messmethoden .....	57
<b>Tabelle 3:</b> Bland-Altman-Statistik der manuell und mit CellProfiler erhobenen Daten aus Tabelle 1 .....	57
<b>Tabelle 4:</b> Bland-Altman-Statistik der manuell und mit ImmunoRatio erhobenen Daten aus Tabelle 1 .....	57
<b>Tabelle 5:</b> lineares gemischtes Modell des ZEB1 labeling index in Bezug auf molekulare und klinische Parameter (n = 192). Signifikante Zusammenhänge zeigen sich sowohl für den EGFR-Amplifikations- als auch den IDH1-Mutationsstatus. Kein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen ZEB1 labeling index und dem Geschlecht bzw. dem Alter bei Erstdiagnose. Signifikanzniveaus ( $\alpha$ ): 0: '****' 0,001: '***' 0,01: '**' 0,05: '.' .....	58

## Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Epidemiologische Daten zu den verschiedenen GBM-Varianten. Für das epitheloide GBM liegen laut WHO-Klassifikation von 2016 bisher keine validen Daten vor. Selbsterstellte Darstellung.....	17
<b>Abbildung 2:</b> Genetisches Profil der histologischen GBM-Varianten. Veränderte Darstellung aus Louis et al 2016 (1) .....	19
<b>Abbildung 3:</b> A: Glioblastom – MRT-Kopf, T1-Wichtung in koronarer Schnittführung mit Kontrastmittel. B: Makroskopische Pathologie des Glioblastoms mit ausgeprägten lokalen Hämorrhagien und zentraler, gelblicher Nekrose; koronarer Hirnschnitt .....	24
<b>Abbildung 4:</b> A: Umfangreiche vaskuläre bzw. mikrovaskuläre Proliferationen, Tumor 32 Probe 1, primäres GBM, HE-Färbung. B: palisadenartig, dicht von Tumorzellen umgebene Nekrose, Tumor 172 Probe 3, primäres GBM, HE-Färbung. C/D: kleinzelliges Glioblastom mit hochzellulärer, monomorpher Population kleiner Tumorzellen, geringgradigen nukleären Atypien und hohem Ki67-Labeling Index, Tumor 15 Probe 3, sekundäres GBM, HE-Färbung (C), Ki67-Immunostaining (D). E: hochgradig anaplastische Tumorzellen mit multinukleären Riesenzellen und ausgeprägter nukleärer Pleomorphie, Tumor 51 Probe 2, primäres GBM, HE-Färbung (E), ZEB1-Immunostaining (F).....	25

<b>Abbildung 5:</b> Mögliche subtypenspezifische, relative ZEB1-Expressionslevel. Surrogatparameter zur Identifizierung der Subtypen: IDH1-Mutationsstatus sowie EGFR-, CD68- und NF1-Expression. Für die klassischen und proneuralen Glioblastomsubtypen lassen sich entsprechend der Quellenlage erhöhte ZEB1-Expressionslevel vermuten. Für den mesenchymalen Subtyp liegen bisher keine Hinweise zur Abschätzung der ZEB1-Expression relativ zu den anderen Subtypen vor. ....	37
<b>Abbildung 6:</b> Fließschema der TMA-Prozessierung .....	41
<b>Abbildung 7:</b> Gridding. A: komprimiertes WSI mit 81 Tumorproben. B: korrigiertes Spotraster zur Koordinatenerfassung. C: resultierende Einzelspots nach Datenexport aus WSI; Tumor 52 Probe 2 beispielhaft markiert und fortan zur Illustration der weiteren Arbeitsschritte verwendet. ....	42
<b>Abbildung 8:</b> Exkludierte Gewebeprobenmerkmale, Beispiele. A: Falte. B: Zelltrümmer. C: Blase. D: großer Gefäßanschnitt.....	43
<b>Abbildung 9:</b> ROI-Definition. A: Automatisch erstellte ROI. B: manuell korrigierte ROI. C: binäre Maske als ROI-Referenz.....	43
<b>Abbildung 10:</b> Manuelle Quantifizierung von ZEB1, Ausschnitt, Tumor 186 Probe 1. A: Alle ausgezählten Nuclei. B: ausgezählte ZEB1 <sup>+</sup> Nuclei und zugehörige Koordinaten einiger dargestellter Nuclei .....	44
<b>Abbildung 11:</b> Fließschema der CellProfiler Pipeline, Tiling aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. 1: Trennung der Farbkanäle für DAB und Hämatoxylin. 2: Ausschluss von Leerbildpaaren. 3: Maskierung des Hämatoxylin-Grauskalenbildes. 4: automatische Objekterkennung. 5: Filterung der ZEB1 <sup>+</sup> Nuclei auf Basis eines Intensitätsgrenzwertes.....	45
<b>Abbildung 12:</b> Automatische Erkennung von Nuclei. A: Hämatoxylin, Grauskalenbild. B: DAB, Grauskalenbild. C: Objektgrenzen aller erkannten Nuclei (rot). D: Objektgrenzen ZEB1 <sup>+</sup> Nuclei (grün). E: Ergebnis der Objekterkennung im nativen Einzelspotbild .....	46
<b>Abbildung 13:</b> A: Spotmontage für Tumor 109, Probe 2 (von links nach rechts; Reihe 1: HE, Immunhistochemie für ZEB1, Ki67, p53; Reihe 2: Immunhistochemie für IDH1, GFAP, EGFR und CD44). Mehrschichtige epitheloide/adenoide Komponenten als mögliche histopathologische Indizien für Gliosarkome (nicht verifiziert). B: Spotmontage für Tumor 149, Proben 1-3, Alter bei Erstdiagnose: 32 Jahre, Überleben: 1940 Tage, Nestin-Immunostaining. Nahezu fehlende Expression des für Glioblastome als diagnostischer Marker verwendeten Nestins als Zeichen einer möglichen Fehldiagnose.(1) C: Kräftiges Nestin-Immunostaining eines primären GBM zum Vergleich (Tumor 17, Probe 3). ....	64
<b>Abbildung 14:</b> A: Density-Plot für ZEB1 <sup>+</sup> Nuclei (grün), ZEB1 <sup>-</sup> Nuclei (rot); Dichte ZEB1 <sup>+</sup> Zellen niedrig:hoch = gelb:blau. B: native Aufnahme des korrespondierenden Gewebeabschnitts. ....	66
<b>Abbildung 15:</b> A: ZEB1 <sup>+</sup> Endothelzellen und im Gefäßanschnitt verbliebene Erythrozyten. B: Resultat der Objekterkennung durch CellProfiler; kernförmige ZEB1 <sup>-</sup>	



Strukturen (Erythrozyten) und ZEB1<sup>+</sup> Zellen der Tumormikroumgebung (Endothelzellen) wirken verzerrend auf den ZEB1 labeling index..... 67

## Diagramme

**Diagramm 1:** Streuungsdiagramm der Ergebnisse der manuellen und der automatischen ZEB1-Quantifizierung mit CellProfiler. schwarz: *Line of Equality* ( $y = x$ ); gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = 0,8983x + 5,4598$ ;  $R^2 = 0,8647$ ).....51

**Diagramm 2:** Streuungsdiagramm der Ergebnisse der manuellen und der automatischen ZEB1-Quantifizierung mit ImmunoRatio. schwarz: *Line of Equality*; gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = 0,6341x + 46,653$ ;  $R^2 = 0,6223$ ).....51

**Diagramm 3:** Bland-Altman-Plot für die manuelle und die CellProfiler-Quantifizierung von ZEB1. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz; gepunktet: *Limits of Agreement* ( $d \pm 1,96$  SD), gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,0357x + 0,567$ ) ..... 54

**Diagramm 4:** Bland-Altman-Plot für die manuelle und die ImmunoRatio-Quantifizierung von ZEB1. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz; gepunktet: *Limits of Agreement* ( $d \pm 1,96$  SD), gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,2425x + 45,716$ ) ..... 54

**Diagramm 5:** Bland-Altman-Plot für die manuelle und die CellProfiler-Quantifizierung von ZEB1 in logarithmisch transformierter Form. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz ( $d$ ); gepunktet: *Limits of Agreement* ( $d \pm 1,96$  SD), gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,1636x + 0,293$ ) ..... 55

**Diagramm 6:** Bland-Altman-Plot für die manuelle und die ImmunoRatio-Quantifizierung von ZEB1 in logarithmisch transformierter Form. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz ( $d$ ); gepunktet: *Limits of Agreement* ( $d \pm 1,96$  SD); gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,9074x + 1,8612$ ) ..... 55

**Diagramm 7:** A: Boxplot des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des EGFR-Amplifikationsstatus (Subgruppe mit EGFR-Amplifizierung = 1). B: Streuungsdiagramm mit Regressionsgerade des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des EGFR labeling index (mean intensity) ( $n = 190$ ,  $y = 24.210x + 70.752$ , adjustiertes  $R^2 = 0.1286$  ). C: Boxplots des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des IDH1-Mutationsstatus (Subgruppe mit IDH1-Mutation = 1). D: Boxplot des ZEB1 labeling index in Bezug auf die nach Vorhandensein der EGFR-Amplifikation bzw. IDH1-Mutation stratifizierten Glioblastomsubgruppen, Mediane: EGFRamp ( $n = 78$ ): 89,3%, IDH1mut ( $n = 12$ ): 92,5%, other ( $n = 101$ ): 76,8%. ..... 59

**Diagramm 8:** A: Streuungsdiagramm mit Regressionsgerade des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des CD68 labeling index (%) ( $n = 170$ ,  $y = -0.5174x + 83.4969$ , adjustiertes  $R^2 = 0.03944$ ). B: Boxplot des ZEB1 labeling index in Bezug zu den Glioblastomsubgruppen unter Abspaltung einer Fraktion mit hohem CD68 labeling index ohne EGFR-Amplifikation und IDH1-Mutation (CD68high), Mediane: CD68high

(n = 49): 73,4%, EGFRamp (n = 36): 89,6%, IDH1mut (n = 6): 94,2%, other (n = 41): 82,1%. C: Boxplot des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit zum NF1-Score. D: Boxplot des ZEB1 labeling index in Bezug zu den Glioblastomsubgruppen unter Abspaltung einer Fraktion mit negativem NF1-Score ohne EGFR-Amplifikation und IDH1-Mutation (NF1neg), Mediane: EGFRamp (n = 14): 92,7%, IDH1mut (n = 4): 95,6%, NF1neg (n = 20): 74,5%, other (n = 12): 81,6% ..... 60

**Diagramm 9:** A: Boxplot des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit des Geschlechts (m: 83,1%, n = 116; w: 83,2%, n = 80). B: Streudiagramm mit Regressionsgerade des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit des Patientenalters bei Erstdiagnose (n = 196,  $y = 0.1219x + 71,1979$ , adjustiertes  $R^2 = 0.0007695$ ). C: Boxplot des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit des Progressionsstatus der Erkrankung (primary: Erstdiagnose, Median: 80,6%; recurrence: Rezidiv, Median: 82,3%). D: Kaplan-Meier-Plot für die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Gesamtüberlebens (Monate), ZEB1-Daten geteilt in Gruppen mit hohem (>49%) und niedrigem (<49%) ZEB1 labeling index, Mediane: >49%: 9,2 Monate; <49%: 7,5 Monate ..... 61

## Abkürzungsverzeichnis

CP.....	CellProfiler
DNA.....	Deoxyribonucleic acid
EMT.....	Epithelial-mesenchymale Transition
EGFR.....	Epidermal growth factor receptor
GBM.....	Glioblastoma multiforme
G-CIMP.....	Glioma-CpG island methylator phenotype
GSC.....	Glioblastoma stem-like cell
HE.....	Hematoxylin
IDH1.....	Isocitrate dehydrogenase 1
IR.....	ImmunoRatio
NF1.....	Neurofibromin-1
ROI.....	Region of interest
TMA.....	Tissue microarray
WHO.....	World Health Organization
ZEB1.....	Zinc finger E-box-binding homeobox 1



# 1 Abstract

**Deutsch:** Auf Grund seiner Einbindung in komplexe tumorbiologische Zusammenhänge wie der Vermittlung von Stammzeleigenschaften, der Invasionsfähigkeit und von tumorinduzierter Immunsuppression auch in primären Hirntumoren gelangte der EMT-Induktor ZEB1 in den Fokus der Glioblastomforschung. Die im Zusammenhang mit ZEB1 und glialen Tumoren aufgetretenen Widersprüche gerade in Bezug auf die Übertragung des EMT-Kontextes auf Glioblastome und den prognostischen Wert von ZEB1 verdeutlichen seine komplexe tumorbiologische Rolle. Die vorliegende Arbeit bietet eine Charakterisierung von ZEB1 auf Einzelzellebene für einen Datensatz aus 231 Glioblastomen mittels eines dafür entwickelten Workflows zur weitestgehend automatischen Auswertung großer histologischer Datensätze. Es konnte gezeigt werden, dass Glioblastome ubiquitär ZEB1 exprimieren und der Anteil an ZEB1<sup>+</sup> Zellen signifikante Unterschiede in Bezug auf Schlüsselalterationen der transkriptionalen Subtypen aufweist. Der ZEB1 labeling index ist höher in Glioblastomen mit EGFR-Amplifikation und IDH1-Mutation und geringer in Glioblastomen mit Verlust der NF1-Expression. Darüber hinaus wurde die Immuninfiltration als wahrscheinlicher Confounder bei der Beurteilung der subtypenspezifischen ZEB1-Expression identifiziert. Schlussendlich stellt die subtypenunabhängig hohe ZEB1-Expression mit Betonung der sich durch Surrogatparameter des klassischen und (G-CIMP<sup>+</sup>) proneuralen Subtypen auszeichnenden Glioblastompopulationen die Annahme eines EMT-ähnlichen Modells der Tumorprogression in Glioblastomen allerdings in Frage.

**English:** Due to its integration into complex tumor biological relationships such as the mediation of stem cell properties, invasion and tumor-induced immunosuppression even in primary brain tumors, the EMT inducer ZEB1 attracted attention in glioblastoma research. The contradictions that have arisen in connection with ZEB1 and glial tumors, particularly with regard to the transfer of the EMT context to glioblastomas and the prognostic value of ZEB1, illustrate its complex role in the biology of glioblastoma. The present work offers a characterization of ZEB1 on a single cell level for a data set of 231 glioblastomas using a customized workflow for the mostly automatic evaluation of large histological data sets. The analysis reveals that glioblastomas express ZEB1 ubiquitously and that the proportion of ZEB1<sup>+</sup> cells shows significant differences with

respect to key alterations of the transcriptional subtypes. The ZEB1 labeling index is higher in glioblastomas with EGFR amplification and IDH1 mutation and lower in glioblastomas with loss of NF1 expression. In addition, immunoinfiltration was identified as a likely confounder in the assessment of subtype-specific ZEB1 expression. Finally, the assumption of an EMT-like model of tumor progression in glioblastomas is challenged by consistently high ZEB1 expression irrespective of subtype with emphasis on glioblastoma populations characterized by surrogate parameters of the classical and (G-CIMP+) proneural subtypes.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das humane Glioblastom

#### 2.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Glioblastom (GBM) – früher auf Grund seiner morphologischen Vielfältigkeit als Glioblastoma multiforme bezeichnet - ist ein maligner Tumor des zentralen Nervensystems, der prinzipiell in jeder Altersklasse auftritt, Männer häufiger als Frauen befällt und mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist.(1) Hinter der Entität verbirgt sich eine Gruppe hochgradig maligner Gliome mit einer drastisch reduzierten 5-jahres-Überlebensrate von unter 5%, die somit Gegenstand intensiver Forschung auf dem Weg zur Entwicklung effektiver Therapien ist.(2) Auf Grund seiner histologischen Merkmale und der sehr schlechten Prognose erfolgte im histologischen Gradierungsschema der WHO<sup>1</sup>-Klassifikation 2007 die Eingruppierung in den höchsten Malignitätsgrad IV.(3) Trotz chirurgischer Resektion und kombinierter Radiochemotherapie beträgt das mediane Überleben der Patienten nach Erstdiagnose lediglich 12 – 15 Monate, wobei ein höheres Lebensalter bei Erstdiagnose einen deutlichen Risikofaktor für eine reduzierte relative Überlebenswahrscheinlichkeit darstellt.(4, 5) Mit einem Anteil von 80% an den primären Hirntumoren stellen die Glioblastome die häufigste Gruppe maligner Tumoren des zentralen Nervensystems beim Erwachsenen dar.(2, 6) Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 ordnet die Tumorentitäten neu und verwendet im Gegensatz zur WHO-Klassifikation von 2007 zum ersten Mal molekulare Parameter in Kombination mit histologischen Merkmalen zur Definition von Tumorentitäten, um aktuelle Erkenntnisse aus der molekularen Tumorbilogie in den Definitionsstandard von Hirntumoren zu integrieren. So sind, basierend auf dem Mutationsstatus der Gene für IDH1<sup>2</sup> und 2, im Wesentlichen zwei Glioblastomentitäten zu unterscheiden, die in ihren genetischen und epigenetischen Profilen sowie ihren klinisch-biologischen Charakteristika voneinander abweichen - das wesentlich häufigere Glioblastom vom IDH1-Wildtyp (Syn.: de-novo- oder primäres Glioblastom), welches vor allem bei Patienten jenseits des 55. Lebensjahres auftritt und 90% aller Glioblastome ausmacht, sowie das IDH1-mutierte Glioblastom (Syn.: sekundäres Glioblastom), das vorrangig

---

<sup>1</sup> World Health Organization

<sup>2</sup> Isocitrate dehydrogenase, fortan wird aus Gründen der Praktikabilität vereinfachend von IDH1 gesprochen

jüngere Patienten mit geringgradiger Vorläuferläsion befällt und bevorzugt im Frontallappen auftritt.(1) Histologisch sind primäre und sekundäre Glioblastome nicht unterscheidbar, sie differieren jedoch in ihren genetischen, transkriptionalen und epigenetischen Profilen.(7-9) Vor der Etablierung der IDH1-Mutationen als Marker für primäre oder sekundäre Glioblastome erfolgte die Unterscheidung der Subtypen auf alleiniger Grundlage des klinischen Bildes in Form eines radiologischen oder histologischen Nachweises einer malignen Vorläuferläsion, obgleich schon früh Hinweise für verschiedene zelluläre Ursprünge vorhanden waren, für deren Validierung aber noch keine immunhistochemischen Methoden zur Verfügung standen.(3, 10) Insbesondere in der Gruppe von Glioblastomen vom IDH1-Wildtyp finden sich allerdings weiterhin Glioblastom-Subtypen, die in ihren histologischen und klinischen Merkmalen zum Teil deutlich voneinander abweichen und auf bisher ungelöste Probleme im Verständnis der Tumorgenese und der taxonomischen Einordnung von Tumorentitäten hinweisen. Als seltene histologische Variante ist hier das Riesenzellglioblastom zu nennen, das weniger als 1% der Glioblastome ausmacht, im Gegensatz zu den anderen Glioblastomen vom IDH1-Wildtyp ein jüngeres Patientenkontinuum befällt und eine bessere Prognose aufweist.(11, 12) Weitere seltene Varianten vom IDH1-Wildtyp sind das epitheloide Glioblastom, das vorrangig bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt und in 50% der Fälle durch eine BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation<sup>3</sup> gekennzeichnet ist, sowie das Gliosarkom, das häufig in der posttherapeutischen Phase nach Erstdiagnose eines primären Glioblastoms auftritt und möglicherweise systemisch disseminieren kann.(1, 13, 14) In etwa 10% der Fälle dagegen weisen Glioblastome eine IDH1- oder IDH2-Mutation auf und sind in etwa der Hälfte das Ergebnis einer malignen Progression histopathologisch nachgewiesener geringgradigerer Vorläuferläsionen, v.a. diffuser oder anaplastischer Astrozytome.(7) Die IDH1<sup>R132H</sup>-Mutation (CGT → CAT) stellt dabei mit einem Anteil von über 80% die häufigste Variante dar.(15) Generell weisen Patienten mit sekundären Glioblastomen bei Erstdiagnose ein im Vergleich zum Glioblastom vom IDH1-Wildtyp deutlich geringeres mittleres Lebensalter von 45 versus 62 Jahren auf und sehen mit einem medianen Überleben von 7,8 versus 4,7 Monaten einer besseren Prognose entgegen.(16) Auch die Geschlechterverteilung variiert. (Abbildung 1) Nach Durchführung einer chirurgischen Resektion und kombinierter Radiochemotherapie

---

<sup>3</sup> Serine/threonine-protein kinase B-raf V600E mutation



beträgt das mittlere Gesamtüberleben für die IDH1-mutierten Glioblastome mit 27,1 Monaten zum Teil mehr als das Doppelte als das der Patienten mit Glioblastomen vom IDH1-Wildtyp.(17)

	primäres GBM	Gliosarkom	Riesenzell-GBM	sekundäres GBM
mittleres Alter bei Diagnose (a)	62 <sup>(16)</sup>	52 <sup>(1)</sup>	51 <sup>(12)</sup>	45 <sup>(16)</sup>
Sex-Ratio (m : w)	1,33 : 1 <sup>(16)</sup>	1,8 : 1 <sup>(1)</sup>	1,48 : 1 <sup>(12)</sup>	0,65 : 1 <sup>(16)</sup>
Häufigkeit	90% <sup>(1)</sup>	2,6% <sup>(11)</sup>	0,8% <sup>(11)</sup>	8,8% <sup>(17)</sup>

Abbildung 1: Epidemiologische Daten zu den verschiedenen GBM-Varianten. Für das epitheloide GBM liegen laut WHO-Klassifikation von 2016 bisher keine validen Daten vor. Selbsterstellte Darstellung.

Histologisch ist das Glioblastom vorwiegend durch eine astrozytische Differenzierung und ein charakteristisches, diffuses Wachstumsmuster gekennzeichnet.(1) Die aktuelle WHO-Klassifikation für Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 führt darüber hinaus eine Reihe weiterer histologischer Kennzeichen auf, die für die Krankheitsdefinition obligatorisch sind: nukleäre Atypien, zelluläre Pleomorphismen, hohe mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosezonen.(1)

Die Inzidenz der Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter und variiert geographisch. Für Nord-Amerika und Europa beträgt diese 3-4 Fälle auf 100 000 Einwohner und Jahr.(1)

### 2.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie des Glioblastoms ist weitestgehend unbekannt, obgleich einige, die Tumorentstehung fördernde Risikofaktoren identifiziert werden konnten. Die Exposition gegenüber hohen Dosen ionisierender Strahlung stellt den einzigen etablierten, nicht-genetischen Risikofaktor für die Entstehung von Glioblastomen dar, wobei genetische Faktoren wohl auch hier als Determinante für den Risikograd der Exposition fungieren.(18) Einige immunologische Faktoren scheinen allerdings die Wahrscheinlichkeit, an einem Glioblastom zu erkranken bzw. das Langzeitüberleben nach Diagnosestellung zu beeinflussen. So weisen Personen mit atopischer Veranlagung ein geringeres Erkrankungsrisiko und Glioblastom-Patienten mit erhöhten IgE<sup>4</sup>-Spiegeln ein längeres medianes Überleben auf.(19, 20) Genomweite Assoziationsstudien haben vererbare genetische Risikovarianten verschiedener Gene identifizieren können, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von

<sup>4</sup> Immunglobulin E

Glioblastomen einhergehen (u.a. EGFR<sup>5</sup>, TP53<sup>6</sup>, TERT<sup>7</sup>).<sup>(21)</sup> Ein geringer Anteil von Glioblastomen tritt hereditär im Rahmen seltener genetischer Syndrome wie der Neurofibromatose Typ 1 und 2, der Tuberösen Sklerose, dem Retinoblastom, Li-Fraumeni-Syndrom, Turcot-Syndrom und von Hämangiosaromen auf.<sup>(1)</sup>

## **Ursprungszellen und Genetik**

Trotz fortschreitender Aufklärung der genetischen Pfade der Tumorgenese und der involvierten Signalwege sind die zellulären Ursprünge des Glioblastoms weitestgehend unbekannt. Die anatomischen Prädilektionsstellen für die Entstehung von Glioblastomen im Bereich der periventriculären Zone und das gleichzeitige Vorhandensein sich teilender Zellen mit Stammzeleigenschaften in diesem Bereich unterstützen die Hypothese, dass die Initiation der Tumorentstehung von maligne transformierten glialen Tumorprogenitorzellen oder neuronalen Stammzellen ausgeht.<sup>(22, 23)</sup> Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften konnten darüber hinaus aus Glioblastomen isoliert und in-vitro reproduziert werden.<sup>(24)</sup> Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Gliomzellen mit Stammzeleigenschaften in Mäusen Tumoren mit Glioblastom-ähnlicher Morphologie induzieren können.<sup>(25, 26)</sup> Im Gegensatz zur Masse der sich schnell teilenden Tumorzellen, scheinen Glioblastomstammzellen (GSCs) proliferatorisch zu ruhen und unter anderem daher resistent gegenüber konventioneller Radio- und Chemotherapie zu sein.<sup>(27)</sup> Zunehmende Evidenz deutet zudem darauf hin, dass GSCs den Ausgangspunkt für regelhaft auftretende Tumorrezidive bilden.<sup>(28)</sup> GSCs sind außerdem in der Lage, einen aus mehreren klonalen Zelllinien bestehenden Tumor zu induzieren und tragen so zur intratumoralen zellulären Heterogenität und daher maßgeblich zur Therapieresistenz der Glioblastome bei.<sup>(29)</sup>

Obwohl histopathologisch nicht unterscheidbar, entwickeln sich primäre und sekundäre Glioblastome aus genetisch unterschiedlichen Vorläuferzellen. Die ersten detektierbaren genetischen Alterationen in den Vorläuferläsionen der sekundären Glioblastome sind TP53-Mutationen, denen daher auf dem tumorgenetischen Entwicklungspfad eine Schlüsselrolle in der malignen Transformation zukommt.<sup>(30)</sup>

---

<sup>5</sup> *Epidermal growth factor receptor*

<sup>6</sup> Gen des Tumorsuppressors p53

<sup>7</sup> *Telomerase reverse transcriptase*

Nur in seltenen Fällen zeigen Glioblastome sowohl TP53-Mutationen als auch eine EGFR-Überexpression, sodass entsprechende Alterationen sehr wahrscheinlich unterschiedliche genetische Pfade der Tumorgenese anzeigen.(7, 31) Den IDH1-Mutationen scheint eine wesentliche Rolle bei der Beeinträchtigung der Zelldifferenzierung zuzukommen, da diese das zur terminalen Differenzierung von Progenitorzellen notwendige Histonmodifikationsmuster stören.(32) Sie treten außerdem gehäuft in geringgradigeren Astrozytomen oder Oligodendrogliomen auf, die auch als Vorläuferläsionen der sekundären Glioblastome gelten.(33) Für primäre Glioblastome typische genetische Veränderungen sind EGFR-Amplifikation, PTEN<sup>8</sup>- und TERT-Mutationen sowie der Verlust von Chromosom 10. Hingegen sind neben den IDH1-Mutationen für sekundäre Glioblastome TP53-, ATRX<sup>9</sup>-Mutationen und 19q-Deletionen typisch (Abbildung 2).(1)

	primäres GBM	Gliosarkom	Riesenzell-GBM	sekundäres GBM
IDH1/2-Mutation	0%	0%	5%	100%
PTEN-Mutation	24%	41%	33%	5%
ATRX-Mutation	0%	0%	19%	100%
TERT-Mutation	72%	83%	25%	26%
TP53-Mutation	23%	25%	84%	74%
19q-Deletion	4%	18%	42%	32%
EGFR-Amplifikation	42%	5%	6%	4%

Abbildung 2: Genetisches Profil der histologischen GBM-Varianten. Veränderte Darstellung aus Louis et al 2016 (1)

Glioblastome weisen eine Vielzahl genetischer Veränderungen auf, die die Schlüsselsignalwege der Regulation des Zellwachstums, des Zellzyklus, der DNA<sup>10</sup>-Reparatur und der Apoptose, der Invasionsfähigkeit, der Angiogenese und der antitumoralen Immunantwort, sowie die Kontrolle der epigenetischen Regulation betreffen. (1, 34, 35) Die häufigsten genetischen Variationen betreffen Amplifikationen auf Chromosom 7 (EGFR, MET<sup>11</sup>, CDK6<sup>12</sup>), 12 (CDK4, MDM2<sup>13</sup>) und 4 (PDGFRA<sup>14</sup>),

<sup>8</sup> Phosphatase and tensin homolog

<sup>9</sup> alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

<sup>10</sup> Deoxyribonucleic acid

<sup>11</sup> MET proto-oncogene

<sup>12</sup> Cyclin-dependent kinase 6

<sup>13</sup> E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2

<sup>14</sup> Platelet-derived growth factor receptor alpha

sowie Deletionen auf Chromosom 9 (CDKN2A/B<sup>15</sup>) und 10 (PTEN). Ebenfalls häufig von genetischen Veränderungen betroffen sind PI3K<sup>16</sup>, NF1<sup>17</sup> und RB1<sup>18</sup>.(35)

## Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

In mehr als 60% der Glioblastome kommt es in Folge der genannten genetischen Veränderungen zur Disruption und abnormen Aktivierung der Signalwege von Wachstumsfaktoren.(35) Da sich bei circa 40% der Glioblastome eine EGFR-Amplifikation nachweisen lässt und 60% der Glioblastome diesen überexprimieren, ist EGFR eines der prominentesten involvierten Onkogene, die in IDH1-mutierten Glioblastomen nur selten vorkommt.(1) Die genannten genetischen EGFR-Alterationen sowie eine dauerhafte Aktivierung durch eine mutierte Form des Rezeptors – EGFRvIII<sup>19</sup> mit konstitutiv aktiver Kinasedomäne in ca. 20% der Glioblastome - scheinen daher bedeutende Elemente in der Pathogenese von Glioblastomen zu sein.(36-38) So konnte gezeigt werden, dass eine EGFR - Amplifikation und - Überexpression die diffuse Infiltration von Tumorzellen in physiologisches Hirngewebe begünstigt und die Inhibition der EGFR-Aktivität den invasiven Phänotyp und das Tumorstadium unterdrückt.(39) Die für Tumorzellen mit aktivierenden EGFR-Alterationen nachgewiesenen Stammzeleigenschaften deuten auf eine entscheidende Rolle von EGFR in der frühen Tumorgenese hin.(40) Auch die PDGFRA-Überexpression ist eine weitverbreitete genetische Alteration in Glioblastomen, welche eine angiogenesefördernde Wirkung an benachbarten Endothelzellen entfaltet.(1, 41) In ca. 3% der Glioblastome findet sich das FGFR-TACC-Fusionsgen, dessen Genprodukt ebenfalls eine konstitutiv aktivierte Kinase-Domäne aufweist und in der Folge mitotische Defekte induziert.(42) Eine weitere Rezeptor-Tyrosin-Kinase, der eine Rolle bei der Entstehung von Glioblastomzellen mit Stammzeleigenschaften zukommt, ist der HGF-Rezeptor<sup>20</sup> und das für ihn kodierende Gen MET, das in pädiatrischen Glioblastomen in Form von Fusionsgenen häufig überexprimiert wird.(43, 44)

---

<sup>15</sup> *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B*

<sup>16</sup> *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*

<sup>17</sup> *Neurofibromin-1*

<sup>18</sup> *Retinoblastoma-associated protein*

<sup>19</sup> *EGFR variant III*

<sup>20</sup> *Hepatocyte growth factor receptor*

Die Überexpression der angesprochenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen führt zu einer zur Aktivierung von Systemen intrazellulärer Sekundärbotenstoffe wie der PI3K/AKT/mTOR- und RAS/RAF/MAPK-Signalwege und zum anderen ist die endogene Inhibition dieser Signalwege durch in Glioblastomen häufig vorkommenden PTEN-Verlust oder eine verminderte NF1-Aktivität gestört. Die in beiden Fällen resultierende inadäquat hohe PI3K- und RAS-Aktivität führt zu einem Wachstumsvorteil der betreffenden Zellpopulation, gesteigerter Proliferation und trägt zusammen mit verlängertem Zellüberleben über eine Hemmung der Apoptose und eine Förderung der Angiogenese entscheidend zur Tumorentstehung bei.(7, 45) Der in bis zu 40% der Glioblastome vorkommende PTEN-Verlust führt darüber hinaus zu einer Deregulation der Zellmigration und -invasion.(46) Auch die bereits erwähnte, aktivierend wirkende BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation, die in Riesenzell- oder epitheloiden Glioblastomen gehäuft vorkommt und als pharmakologischer Ansatzpunkt in anderen Malignomen Gegenstand der Forschung ist, ist in dieses System integriert.(47, 48) Über BRAF, als Teil der RAF-Kinasen-Familie, besteht eine Verbindung zum MAPK - Signaltransduktionsweg, der mitogene Signale vermittelt und in Folge der Mutation abnorm aktiviert wird.

## **Angiogenese**

Als Resultat der genetischen Veränderungen in den angesprochenen Signalwegen sowie in Folge der IDH1-Mutationen wird VEGF<sup>21</sup>, ein entscheidender Mediator der Angiogenese, vor allem in primären Glioblastomen häufig überexprimiert und trägt so wesentlich zur hohen Vaskularisierung des Glioblastoms bei.(49-51) Des Weiteren scheinen Tumorstammzellen sich auf diesem Wege eine vaskuläre Nische in der Tumormikroumgebung zu schaffen.(52) In Glioblastomen werden außerdem spezifische Subtypen von Integrinen exprimiert, die im Allgemeinen durch die Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten in die Zelladhäsion und TGF- $\beta$ <sup>22</sup>-vermittelte Invasionsfähigkeit, Stammzeleigenschaften und Immunsuppression sowie die Angiogenese involviert sind.(53)

---

<sup>21</sup> *Vascular endothelial growth factor*

<sup>22</sup> *Transforming growth factor- $\beta$*

## **Zellzykluskontrolle und DNA-Reparaturmechanismen**

In ca. 80% der Glioblastome kommt es zu einer Disruption der p53- und RB1/E2F-Tumorsuppressorsignalwege durch Mutationen, Deletionen oder p53-Inaktivierung in Folge von MDM2-Amplifikationen.(35) Da die genannten Tumorsuppressoren einen Zellzyklusarrest bzw. die Induktion der Apoptose in Folge genotoxischen Stresses bewirken, kommt es bei deren Funktionsverlust zu einem Wachstumsvorteil der betreffenden Zellpopulation und somit zur klonalen Expansion von Tumorzellen sowie einer Beeinträchtigung der DNA-Reparaturmechanismen mit Zunahme der genetischen Instabilität.(54, 55) Die bereits genannten, häufig vorkommenden homozygoten CDKN2A/B-Deletionen und die CDK4/6-Amplifikation tragen darüber hinaus zur Beeinträchtigung des RB1-Signalwegs und somit zur Deregulation der Zellzykluskontrolle und Apoptose bei.(7)

## **Immunsuppression**

Glioblastomzellen erzeugen lokal eine immunsuppressive Umgebung, die die Entstehung maligner Eigenschaften und das Wachstum entsprechender Tumorzellsubpopulationen begünstigt. Molekulare Mechanismen, die zu einer lokalen Immunsuppression führen, und damit potentiell die antitumorale Immunantwort beeinträchtigen, umfassen unter anderem die Expression von PD-L1<sup>23</sup> und CTLA4<sup>24</sup> auf der Oberfläche von Glioblastomzellen, die eine Hemmung der T-Zellproliferation und Zytokin-Synthese bzw. der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen bewirkt.(1) Beeinflusst wird die lokale Immunantwort außerdem durch die Akkumulation von immunsuppressiven Substanzen in der Tumormikroumgebung.(56)

## **Epigenetik und Tumormetabolismus**

Mutationen in für die epigenetische Regulation relevanten Genen beeinflussen in Glioblastomzellen die Histonmodifikation, die DNA-Methylierung und das Chromatin-Remodelling.(1) Die IDH1-Mutationen bewirken über eine Inhibition der DNA- und Histon-Demethylierung eine Verstärkung des Gen-Silencings und tragen so zu einer Inaktivierung von Schlüsselfaktoren der epigenetischen Regulation bei.(57) Des Weiteren handelt es sich dabei um *gain of function*-Mutationen, die zur Bildung von 2-

---

<sup>23</sup> *Programmed death ligand 1*

<sup>24</sup> *Cytotoxic T-lymphocyte protein 4*

HG<sup>25</sup> führen. Die durch dieses induzierten Defekte in der Kollagenreifung und die allgemein erhöhten 2-HG-Konzentrationen in Gliomen legen die Vermutung nahe, dass diesem Effekt eine Rolle bei der Tumorprogression zukommt.(51, 58) Auch die Inaktivierung von Genen mit tumorsuppressiver Funktion durch DNA-Methylierung ist ein verbreiteter Mechanismus in Glioblastomen: in bis zu 50% der Glioblastome liegt der Promotor des MGMT<sup>26</sup>-Gens in methylierter Form vor und gewinnt durch den daraus folgenden Verlust der MGMT-Expression klinische Relevanz (vgl. 2.1.4 Therapie und Prognose).(35) Das DNA-Reparaturprotein MGMT demethyliert die Purinbase Guanin und reduziert daher die Zytotoxizität von alkylierenden Substanzen, weshalb sein Funktionsverlust durch Promotormethylierung zu einer erhöhten Toxizität für Alkylanzien führt.(59) Auch die Kontrolle der Telomerlänge ist durch TERT- oder ATRX-Mutationen gestört, durch die es zu einer Reaktivierung der Telomerase bzw. zur Aktivierung von alternativen Mechanismen der Telomerverlängerung kommt. (35, 60)

### 2.1.3 Klinik und Diagnostik

Das Glioblastom tritt vorrangig supratentoriell auf.(1) Glioblastome der Basalganglien und der Thalami sind häufig bei Kindern anzutreffen, ein Befall des Hirnstamms oder des Rückenmarks ist extrem selten.(61) Je nach befallenen Hirnareal können die Patienten unter einer Reihe verschiedener Symptome leiden. Dazu zählen Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen als Zeichen steigenden Hirndrucks und eine Vielfalt fokal-neurologischer Defizite, zum Teil Persönlichkeitsveränderungen und epileptische Anfälle.(1) Das Auftreten und die Schwere der Hirndrucksymptomatik hängen dabei stark von der Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors und dem Ausmaß des tumorassoziierten Ödems ab. Anlass zur Erstdiagnostik bildet häufig ein einleitender Krampfanfall.(62) Die klinische Vorgeschichte der Patienten mit IDH1-mutierten Glioblastomen ist darüber hinaus fast immer durch das Auftreten einer geringgradigeren Vorläuferläsion in Form diffuser (WHO-Grad II)<sup>27</sup> oder anaplastischer Astrozytome (WHO-Grad III) gekennzeichnet.(1) Während das primäre Glioblastom eine weite anatomische Streuung aufweist und in der weißen subkortikalen Substanz aller 4 Großhirnlappen nahezu gleichermaßen anzutreffen ist, weisen die sekundären Glioblastome eine deutliche Prädispositionsstelle für den Frontallappen auf.(63, 64) Das

---

<sup>25</sup> 2-Hydroxyglutarate

<sup>26</sup> O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

<sup>27</sup> nach WHO-Klassifikation von 2007

Glioblastom tritt weit überwiegend unilateral auf, wobei bilaterales Auftreten bereits das Resultat einer allgemeinen Tumordinfiltration der kontralateralen Hemisphäre entlang myelinisierter Strukturen wie den Commissurae und dem Corpus callosum sein kann. Obwohl im Blut zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, treten extrakranielle Manifestationen vermutlich ausschließlich nach chirurgischen Eingriffen auf.(65)

Die Magnetresonanztomographie des Kopfes - als Goldstandard zur Diagnostik vor einer Biopsie - zeigt typischerweise eine irreguläre Läsion mit girlandenförmiger Kontrastmittelanreicherung um eine zentrale, in T1-Wichtung hypointense Nekrosezone und ein ausgeprägtes perifokales Ödem (Abbildung 3A)<sup>28</sup>. Das Ausmaß von Ödemen, intratumoralen Hämorrhagien und Nekrosen ist typischerweise beim sekundären Glioblastom weniger ausgeprägt, jedoch deren Vorhandensein für beide Entitäten gleichsam charakteristisch (Abbildung 3B)<sup>29</sup>.(17)

Das histologische Erscheinungsbild des Glioblastoms ist von ausgeprägten vaskulären Proliferationen und Nekrosen geprägt (Abbildung 4A und 4B) und reicht vom hochzellulären, kleinzelligen Glioblastom mit zellulärer Monomorphie und hoher mitotischer Aktivität (Abbildung 4C und 4D) bis hin zu multinukleären Riesenzellen und starker nukleärer Pleomorphie (Abbildung 4E und 4F). Abrupte Wechsel in der Zellmorphologie innerhalb desselben Tumors können dabei das Auftreten einer neuen

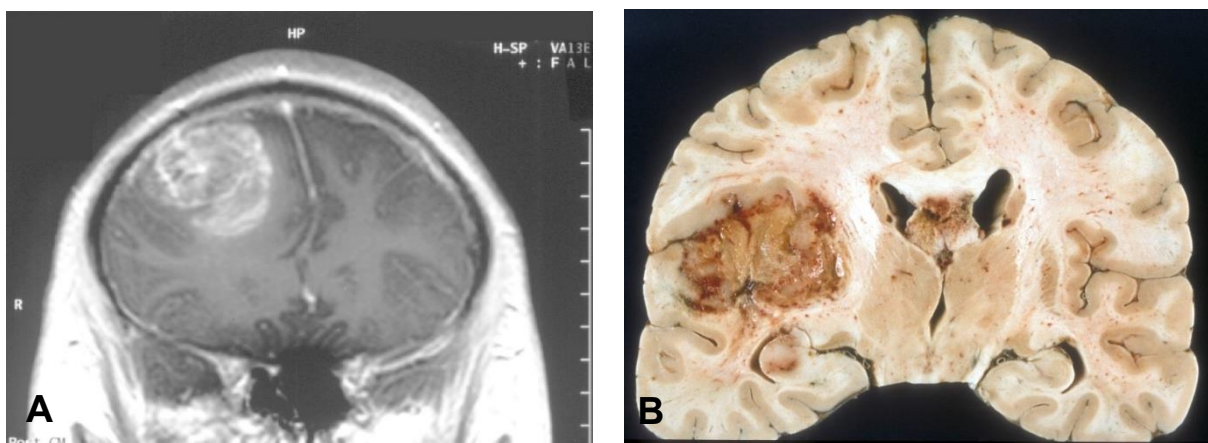


Abbildung 3: A: Glioblastom – MRT-Kopf, T1-Wichtung in koronarer Schnittrichtung mit Kontrastmittel. B: Makroskopische Pathologie des Glioblastoms mit ausgeprägten lokalen Hämorrhagien und zentraler, gelblicher Nekrose; koronarer Hirschnitt

<sup>28</sup> Abbildung 3A: Image: Christaras A; Lizenz: GNU Free Documentation License, Source: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glioblastoma\\_-\\_MR\\_coronal\\_with\\_contrast.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glioblastoma_-_MR_coronal_with_contrast.jpg)

<sup>29</sup> Abbildung 1B: Image: Sbrandner; Lizenz: GNU Free Documentation License; Source: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glioblastoma\\_macro.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glioblastoma_macro.jpg)



klonalen Tumorzellsubpopulation in Folge des Erwerbs einer zusätzlichen genetischen Veränderung widerspiegeln. Anhand der in der histologischen Übersicht überwiegenden Zellmorphologie lassen sich verschiedene histopathologische Muster und Komponenten abgrenzen, die sich in ihrer Genetik unterscheiden. Neben den genannten, überwiegend kleinzelligen oder Riesenzellglioblastomen lassen sich

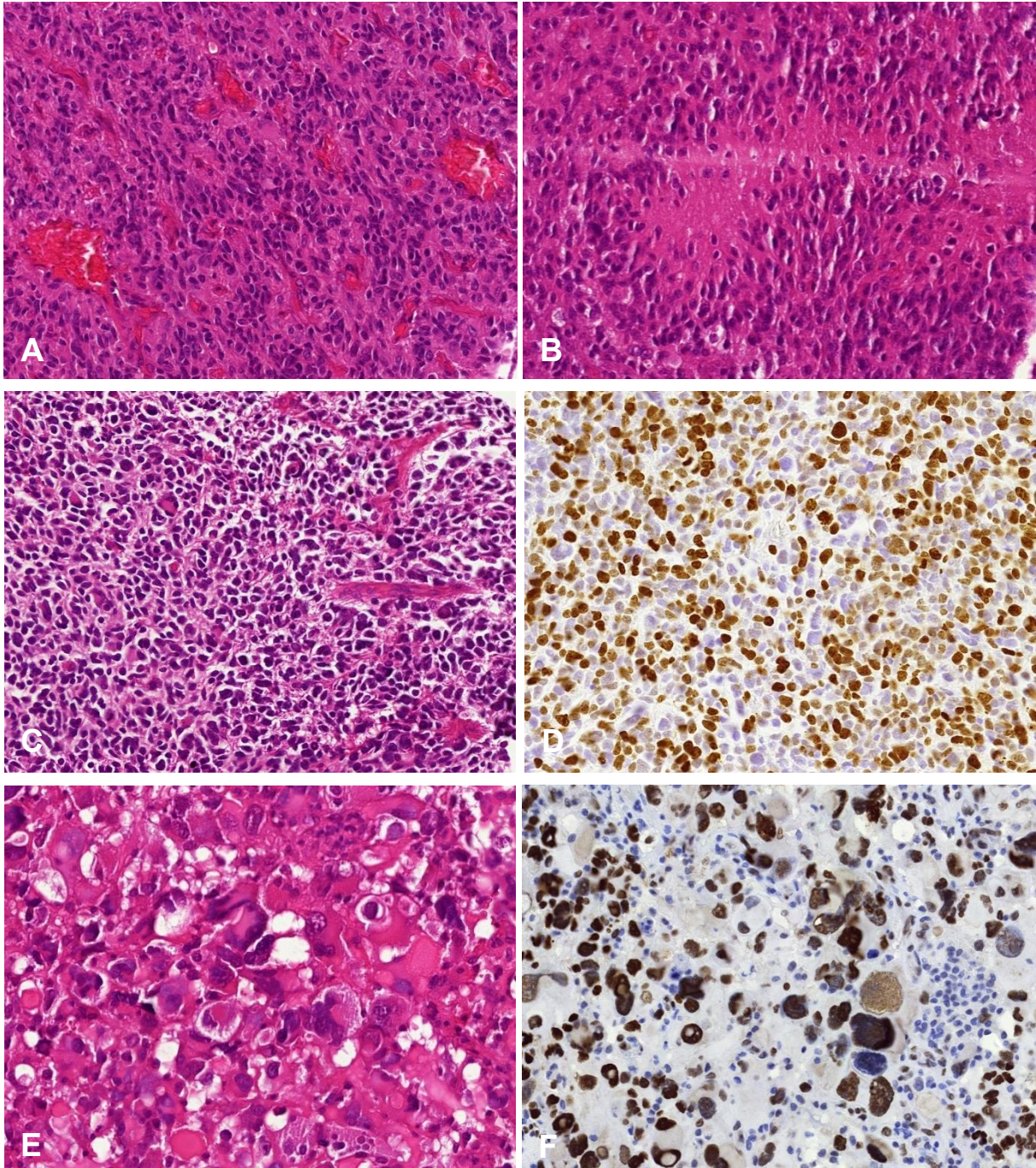


Abbildung 4: A: Umfangreiche vaskuläre bzw. mikrovaskuläre Proliferationen, Tumor 32 Probe 1, primäres GBM, HE-Färbung. B: palisadenartig, dicht von Tumorzellen umgebene Nekrose, Tumor 172 Probe 3, primäres GBM, HE-Färbung. C/D: kleinzelliges Glioblastom mit hochzellulärer, monomorpher Population kleiner Tumorzellen, geringgradigen nukleären Atypien und hohem Ki67 labeling Index, Tumor 15 Probe 3, sekundäres GBM, HE-Färbung (C), Ki67-Immunostaining (D). E: hochgradig anaplastische Tumorzellen mit multinukleären Riesenzellen und ausgeprägter nukleärer Pleomorphie, Tumor 51 Probe 2, primäres GBM, HE-Färbung (E), ZEB1-Immunostaining (F)

Glioblastome mit primitiver neuronaler, Oligodendrogliom- oder Komponenten von astrozytischen Vorläuferläsionen nachweisen.(1) Oligodendrogliomale Komponenten sind bei sekundären Glioblastomen wesentlich häufiger anzutreffen, wodurch, neben ausgeprägteren Nekrosezonen beim primären Glioblastom, nur wenige histopathologische Indizien für eine Unterscheidung gegeben sind.(66)

## 2.1.4 Therapie und Prognose

### **Standardtherapie**

Die etablierte Standardtherapie des Glioblastoms besteht aus einer maximalen Tumorsektion unter Schonung gesunden Hirngewebes, gefolgt von simultaner Radiatio der Resektionshöhle und Chemotherapie mit Temozolomid sowie einer adjuvanten Chemotherapie mit Temozolomid.(4) Die etablierten Behandlungsalgorithmen basieren entweder auf der Progressionsgeschwindigkeit der Erkrankung oder auf dem Alter in Kombination mit der klinischen Performance des Patienten bei Erstdiagnose.(67, 68) Im Allgemeinen soll durch die kombinierte Radiochemotherapie die Induktion der Apoptose von Tumorzellen durch die alkylierende Wirkung von Temozolomid und die Erzeugung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen vor allem in proliferierenden Zellen in Folge der Radiatio erreicht werden. Die chirurgische Resektion verfolgt dabei das Ziel, die mittels MRT identifizierte, kontrastmittelanreichernde Läsion möglichst ohne Beeinträchtigungen der neurologischen Funktionen zu entfernen und das gewonnene Gewebematerial zur Diagnosesicherung einer histologischen Untersuchung zuzuführen. Ferner dient die chirurgische Reduktion der Tumormasse nicht nur in palliativen Situationen der Reduzierung intrakranieller Verdrängungsprozesse und der Hirndrucksymptomatik und kann so zu einer Erholung bzw. zum Erhalt neurologischer Funktionen beitragen. Intraoperativ können vielfältige diagnostische Mittel zur verbesserten Tumorabgrenzung - wie intraoperatives MRT, fluoreszenzgestützte Resektion, Wachkraniotomie und kortikales Mapping – eingesetzt werden.(69-71) Die kombinierte Radiochemotherapie besteht aus einer externen Radiatio der Resektionshöhle mit 2 cm Sicherheitsabstand und 60 Gy in Fraktionen von 2 Gy über 6 Wochen sowie simultaner Chemotherapie mit 75mg/m<sup>2</sup>/d Temozolomid.(4, 72, 73) Adjuvant stellt die Gabe von 150 mg/m<sup>2</sup>/d Temozolomid für 5 Tage alle 28 Tage in 6 Zyklen ein gängiges Therapieschema dar.(4) Auf Grund der Vielzahl an möglichen Komplikationen ist meist

eine intensive medizinische Betreuung und Behandlung der Patienten notwendig, die unter anderem die Therapie des peritumoralen Ödems, von venösen Thrombosen, Fatigue und anderen kognitiven Dysfunktionen einschließt. Bei Rezidiven sind die (chemo-)therapeutischen Möglichkeiten weitestgehend auf Nitrosoharnstoffe und Bevacizumab begrenzt.(74, 75) Umfangreiche Fortschritte im Verständnis der Tumorbilogie des Glioblastoms haben in jüngerer Vergangenheit eine Reihe alterierter Signalwege und mutierte Gene enthüllt, denen eine Bedeutung für die Pathogenese und maligne Transformation in Glioblastomen zukommt, und so zur Entwicklung einer Vielzahl neuer Therapieansätze beigetragen, die gezielte molekulare, Immun- und Gentherapien umfassen.(76) Aus Gründen der Übersicht sei im Folgenden nur allgemein auf die einzelnen neueren therapeutischen Ansätze eingegangen, die sich in den letzten Jahren entsprechend der neugewonnenen Erkenntnisse massiv diversifiziert haben und in ihrer Breite nicht Gegenstand dieser Arbeit sein können.

### **Beeinflussung der Signalwege von Wachstumsfaktoren**

Da die Signalwege der Wachstumsfaktoren und die involvierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in Glioblastomen in Folge genetischer Veränderungen häufig abnorm aktiviert sind, ist deren Beeinflussung durch Inhibitoren oder monoklonale Antikörper eines der Hauptziele gezielter Therapien. Die pharmakologische Beeinflussung von EGFR, PDGFR, FGFR und MET durch Inhibitoren oder Antikörper konnte allerdings in klinischen Studien nur minimale oder keine Verbesserung des klinischen Outcomes bewirken.(76, 77) Auch die intrazelluläre Inhibition der Downstream-Effektoren durch PI3K-, AKT- und mTOR-Inhibitoren oder die Hemmung des RAS/RAF/MAPK-Signalweges konnten bisher keine ausreichende therapeutische Wirksamkeit nachweisen (77). Die in einer Subgruppe der Glioblastome vorkommende BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation liefert einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt für BRAF-Inhibitoren, die in anderen Gliomen einen Therapieerfolg zeigten.(78) Wesentlich erschwert wird der Fortschritt bei der Entwicklung gezielter Therapien im Bereich der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen dadurch, dass genetische Veränderungen für verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in unterschiedlichen Zellen innerhalb desselben Tumors vorkommen.(79) Der Einsatz von Pan-Kinase-Hemmern oder die Kombination multipler Inhibitoren führt darüber hinaus zu nicht tolerierbaren Nebenwirkungsprofilen

bei gleichzeitig mangelnder Penetrationsfähigkeit der eingesetzten Substanzen an der Blut-Hirn-Schranke.

Auf Grund der bereits thematisierten, in Glioblastomen weitverbreiteten Überexpression von VEGF sind auch antiangiogene Therapieansätze Gegenstand einer Vielzahl von Studien gewesen.(77). Ziel antiangiogener Therapieansätze ist eine Disruption des mikrovaskulären Gewebes mit resultierender Gewebehypoxie und gesteigerter Sensitivität der Tumorzellen für Strahlung.(52) Einzig für den humanisierten monoklonalen VEGF-Antikörper Bevacizumab konnte in klinischen Studien eine signifikante radiographisch nachweisbare Therapieantwort gezeigt werden, sodass dieser als Monotherapie bei der Behandlung von rezidivierenden Glioblastomen seit 2009 in den USA zugelassen ist.(75) Eine antiangiogene Therapie mit Bevacizumab könnte allerdings auch in primären Glioblastomen vom proneuralen Subtyp einen Überlebensvorteil bieten.(80)

Ein weiterer Forschungsgegenstand antiangiogener Therapieformen sind Inhibitoren gegen bereits erwähnte Glioblastom-spezifische Integrine, die sowohl im mikrovaskulären Gewebe und den Tumorzellen selbst überexprimiert werden.(81) Eine simultan gegen entsprechende Integrine und FGFR gerichtete Therapie könnte aktuellen Untersuchungen zufolge einen neuen, gegen GSCs gerichteten therapeutischen Ansatz darstellen.(82)

### **Beeinflussung der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparaturmechanismen**

Ansätze zur Reaktivierung der Zellzykluskontrolle zielen auf den negativen p53-Regulator MDM2 und die Zyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 durch entsprechende Inhibitoren.(83, 84) Auch die Inhibition von DNA-Reparaturenzymen und zellulären Schlüsselfaktoren für die Verhinderung mitotischer Alterationen, die zu einer Sensibilisierung von Tumorzellen für DNA-schädigende Substanzen und Radiatio führt, sind Gegenstand der Forschung.(76)

### **Immun- und Gentherapie**

Das Ziel immuntherapeutischer Therapieansätze ist die passive oder aktive Nutzung des Immunsystems zur Zerstörung von Tumorzellen.(85) Passive Immuntherapien umfassen monoklonale Antikörper gegen tumorspezifische Proteine, Zytokin-

vermittelte Therapien oder *Adoptive cell transfer* – autologe, ex vivo aktivierte und reinjezierte *Lymphocyte-activated killer cells* oder zytotoxische T-Lymphozyten. Aktive Immuntherapien hingegen verfolgen mit peptid- oder zellbasierten sog. „Krebsimpfstoffen“ („*cancer vaccines*“) das Ziel, die patienteneigene antitumorale Immunantwort durch Antigen-Exposition in Form von intakten Tumorzellen oder Tumorbestandteilen zu stimulieren.(77) Ein mögliches Therapieziel passiver Immuntherapien im Rahmen der sog. Immuncheckpoint-Inhibition ist hier der *programmed death ligand 1* (PD-L1), der als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung die antitumorale Immunantwort hemmen kann und auch in einigen Glioblastomen exprimiert wird.(86, 87) Aktive immuntherapeutische Ansätze richten sich zum Beispiel mit Peptidimpfstoffen spezifisch gegen EGFRvIII-positive oder IDH1-mutierte Tumorzellen.(88, 89) Durch die kürzliche Entdeckung eines lymphatischen Systems im ZNS könnten sich für immuntherapeutische Therapieformen neue Perspektiven ergeben.(90)

Gentherapeutische Ansätze fußen auf der Freisetzung von in Vektoren verpacktem genetischen Material – wie Transgenen, Toxinen oder Viren – in Tumorzellen.(91) Die Bandbreite dieser Therapieformen umfasst die Freisetzung von für konditionell oder direkt zytotoxische Enzyme kodierenden Transgenen in Tumorzellen, genetischem Material von Zytokinen, Lymphozyten oder anderen Immunmodulatoren und tumorspezifischen, mit Radionukliden, Inhibitoren oder Toxinen beladenen Antikörpern – sowie die onkolytische Therapie unter Nutzung direkter viraler Toxizität durch sich konditionell replizierende, Tumorzellen spezifisch infizierende Viren.

Trotz vielversprechender Ergebnisse in einer Vielzahl von präklinischen Studien konnte den meisten der genannten immun- und gentherapeutischen Therapieansätze nur ein geringer oder überhaupt kein therapeutischer Nutzen in klinischen Studien nachgewiesen werden.(77) Auf Grund technischer Implikationen und der potentiellen Kosten scheinen entsprechende Therapieansätze darüber hinaus auf absehbare Zeit in ihrer breiten Anwendung limitiert zu sein.

### **Beeinflussung der epigenetischen Regulation**

Zur Beeinflussung der durch IDH1-Mutationen ausgelösten, epigenetischen und metabolischen Veränderungen sind unter anderem Inhibitoren für IDH1-mutierte

Enzyme oder IDH1-Peptidimpfstoffe Gegenstand von Studien.(89, 92) Einige Studien deuten darüber hinaus an, dass Patienten mit IDH1/2-Mutationen von PARP<sup>30</sup>-Inhibitoren profitieren könnten.(93, 94) Weitere therapeutische Ansätze auf der Ebene der Epigenetik sind die Beeinflussung der Histonmodifikation durch Inhibitoren für Histon-Deacetylasen oder - Methylasen und BET-Bromodomain-Proteine.(95-97) Ferner existieren alternative Therapieansätze in Form alternierender elektrischer Felder und thermaler Laser sowie der Versuch einer aktiven temporären Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke durch Ultraschall zur Verbesserung der Schrankengängigkeit der eingesetzten Substanzen.(98-100) Außerdem konnte der Kombination von Cannabinoiden mit Temozolomid in präklinischen Modellen eine Verstärkung der antitumoralen Zytotoxizität nachgewiesen werden.(101, 102)

## **Prognose**

Trotz aggressiver - chirurgische Resektion, Radio- und Chemotherapie umfassender - Therapie beträgt die 2-Jahres-Überlebensrate für mit dem Standardschema therapierte Patienten lediglich 26,5 %.(4) Eine vollständige chirurgische Resektion ist auf Grund der raschen Invasion benachbarter Gehirnstrukturen entlang der Bahnen der weißen Substanz und der weiten Streuung von Tumorzellen, selbst in vom Tumorzentrum weit entferntem Gewebe der kontralateralen Hemisphäre, nicht möglich. Da distal vom Primärtumor in physiologischem Hirngewebe gelegene, vereinzelte Tumorzellen auch schwerlich das Ziel einer umschriebenen Radio- sowie - auf Grund einer in diesen Bereichen intakten Blut-Hirn-Schranke - Chemotherapie werden können, führen diese zwangsläufig zur lokalen Progression der Erkrankung und letztlich ausnahmslos zu massiven neurologischen Defiziten und zum Tod.(103, 104) Durch Etablierung des Standardtherapieschemas nach 2005 konnte das mediane Überleben der Patienten mit Glioblastomen von 12,1 auf 14,6 Monate im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie gesteigert werden. Trotz dieser Fortschritte beträgt das mediane progressionsfreie Überleben nach Therapie weiterhin lediglich 6,9 Monate und die Prognose verharrt seitdem insgesamt auf sehr schlechtem Niveau.(4)

Unter den prognostisch günstigen Faktoren ist neben einem Alter von unter 50 Jahren, einer kompletten R1-Resektion und IDH1-Mutationen vor allem auch die MGMT-

---

<sup>30</sup> *Poly-ADP-ribosyltransferase*, Schlüsselenzym der DNA-Reparatur

Promotormethylierung zu nennen.(1) Bis zu 75% der Patienten mit sekundären Glioblastomen weisen eine erhöhte Methylierungsrate des MGMT-Promotors auf, die in einer verringerten MGMT-Expression resultiert und daher zu einer erhöhten Temozolomid-Sensitivität führt.(7, 105) Dem Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion kommt daher klinische Bedeutung zu.(59) Dem gegenüber stellen ein hohes Lebensalter, ein Karnofsky-Index < 70, Inoperabilität zum Beispiel in Folge eines ausgedehnten bihemisphärischen Befalls und ein hohes Ausmaß an Gewebnekrosen ungünstige prognostische Faktoren dar.(5, 106) Darüber hinaus tragen die Aktivierung von DNA-Reparatur-Mechanismen und die Hochregulation von *Multiple drug resistance*-Genen in Tumorstammzellen einen bedeutenden Teil zur Resistenz gegenüber einer Radiochemotherapie bei.(27, 107, 108) Außerdem liegt Evidenz dafür vor, dass Defekte der DNA-Reparaturmechanismen und andere, sekundäre onkogene Veränderungen erst in Folge der Tumorprogression nach Anwendung von Alkylanzien wie Temozolomid eintreten und eine Therapieresistenz erzeugen.(109)

Die große Vielfalt der das Tumorwachstum fördernden Mutationen ohne einen einzelnen dominanten onkogenen Faktor und die Redundanz von Kompensationsmechanismen in den Signalwegen, zum Beispiel der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, tragen, in Kombination mit der für Glioblastome typischen räumlich-zeitlichen inter- und intratumoralen genetischen Heterogenität, maßgeblich zum bisher beobachteten Therapieversagen bei.(110-112) Daher kommt sowohl der Entwicklung gezielter Therapeutika mit guter Penetration der Blut-Hirn-Schranke als auch der Erforschung kombinierter gezielter Therapien zur Verhinderung des Auftretens resistenter Tumorzellsubpopulationen besondere Bedeutung zu.

Allgemein gilt, dass die fortschreitende, auf detailliertem Verständnis der molekularen Pathogenese basierende Diversifizierung der Forschung an und Entwicklung von therapeutischen Optionen die begründete Hoffnung auf eine mittelfristige Prognoseverbesserung - möglicherweise durch die Kombination verschiedener therapeutischer Ansätze - für Patienten mit Glioblastomen nahelegt. Entscheidend bleibt dabei die Identifizierung von molekularen Prädiktoren für die Effektivität gezielter Therapien, die eine Diagnostik der individuellen Tumore auf molekularer Ebene erlaubt und eine auf den daraus resultierenden Erkenntnissen beruhende, individualisierte Therapie ermöglicht.

## 2.2 Tumorsubtypenklassifikationen

Dass Glioblastome mit identischer histopathologischer Klassifikation in Bezug auf das klinische Outcome und die Wirksamkeit bestimmter Therapieformen unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, machte die Suche nach Klassifizierungsmethoden notwendig, die diese von der Histopathologie unabhängigen Eigenschaften der Tumoren berücksichtigen. Entsprechende Klassifizierungsmethoden nutzen die Erkenntnisse aus der Tumorgenese und -progression, um klinisch relevante diagnostische und prognostische Parameter zur Verfügung zu stellen. So konnte gezeigt werden, dass morphologisch definierte Entitäten einen Mix molekularer, genetischer Subtypen enthalten, die unabhängig von der Histologie prognostischen Wert besitzen.(113, 114) Entsprechend der damit einsetzenden, zunehmenden Aufklärung der intra- und intertumoralen Heterogenität gewann die Erforschung der molekularen Tumorsubtypen auch für das Glioblastom im Hinblick auf das Fernziel der Entwicklung individualisierter, subtypenspezifischer Therapien zunehmende Bedeutung. Im Verlauf lieferte die Forschung eine Bandbreite von molekularen Eigenschaften, die für die Erstellung von Tumorklassifikationen anhand von Schlüsselfaktoren der Tumorgenese in Glioblastomen genutzt werden.(8, 9, 45) Mit dem *The Cancer Genome Atlas* – Pilotprojekt stand seit 2008 ein umfassender Katalog der die Tumorgenese in Glioblastomen maßgeblich beeinflussenden genetischen Alterationen zur Verfügung.(115) Auf dieser multidimensionalen Datengrundlage, die genetische, epigenetische, transkriptionale und klinische Daten umfasst, konnte das gehäufte Auftreten bestimmter Kombinationen von Alterationen verschiedenen molekularen Subtypen zugeordnet werden, welche durch Unterschiede im klinischen Outcome bzw. der Sensitivität von Tumoren für bestimmte Therapieformen gekennzeichnet sind.

### 2.2.1 Transkriptionale Subtypen

Es entstanden anschließend an frühere Studien transkriptionale Klassifikationen molekularer Glioblastomsubtypen, die mit bestimmten Expressionsmustern und Profilen genetischer Alterationen assoziiert sind.(9, 45) Anhand genetischer Aberrationen für PDGFRA, IDH1, EGFR und NF1 werden die proneuralen, neuralen, klassischen und mesenchymalen Subtypen unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Tumoren des klassischen und mesenchymalen Subtyps stärker von



einer aggressiven Therapie profitieren als diejenigen mit Tumoren vom proneuralen Subtyp.(8) Der klassische Subtyp zeigt eine signifikante Häufung von EGFR-Alterationen wie EGFR-Amplifikation (97%) und EGFRvIII-Mutationen (55%), wohingegen IDH1- und NF1-Alterationen hier nicht anzutreffen sind. NF1-Deletionen und -Mutationen mit resultierender geringerer NF1-Expression sind dagegen typisch für Tumoren des mesenchymalen Subtyps, die darüber hinaus relativ höhere Expressionsniveaus für mesenchymale (CD44) und Mikroglia-Marker (CD68) aufweisen. Kennzeichnende Merkmale der Tumoren vom proneuralen Subtyp sind IDH1-, PDGFRA- und TP53-Mutationen sowie ein geringeres Lebensalter bei Erstdiagnose. Die überwiegende Mehrheit (92%) der sekundären Glioblastome weisen den proneuralen Subtyp auf, unter den primären Glioblastomen dagegen ist keiner der transkriptionalen Subtypen gehäuft zu finden.(8) Der neurale Subtyp hingegen ist geprägt durch die Expression von Markern physiologischen Hirngewebes und neuere tumorintrinsic Untersuchungen auf Einzelzellebene legen den Schluss nahe, dass dieser Subtyp möglicherweise in einer früheren Studie durch den Beitrag physiologischer neuronaler Zellen zustande gekommen ist.(116)

Auf Grund der durch GSCs vermittelten Radio- und Chemoresistenz liegt der Schluss nahe, die Entwicklung prognostisch und therapeutisch relevanter Subtypenklassifikationen stärker zu spezialisieren und auf diese zu fokussieren. Einer auf transkriptionalen Profilen von GSCs (BUB1B<sup>S/R</sup>-Subtypen) beruhenden Klassifikation konnte ein prognostischer Wert und eine Aussagekraft über die Therapiewirksamkeit nachgewiesen werden.(117) Ähnlich dem G-CIMP-Status (s. 2.2.2) bleibt der auf GSCs beruhende Subtyp in rezidivierenden Tumoren in der Mehrzahl der Fälle erhalten, während sich dagegen bei 2/3 der Tumoren der transkriptionale Subtyp beim Rezidiv hin zum mesenchymalen Subtyp verändert, diese also eine höhere Plastizität aufweisen.(9, 118) Das höhere Lebensalter der Patienten mit Tumoren des mesenchymalen Subtyps und die Unidirektionalität der Subtypenwechsel deuten an, dass die Akkumulation von epigenetischen und genetischen Veränderungen die Gründe für den Subtypenwechsel bei der Tumorprogression sind.(45) Als Erklärung der Subtypenplastizität zwischen primären und rezidivierenden Tumoren existieren Modelle der Tumorzellevolution, wobei klonale Verschiebungen durch die positive Selektion von Tumorzellsubpopulationen in Folge therapeutischer Interventionen entstehen.(110, 111) Ein Wechsel vom proneuralen

zum mesenchymalen Subtyp ist außerdem durch eine Repression des Neurotrophins BDNF<sup>31</sup> möglich.(45) RNA-Sequenzierungen auf Einzelzellebene weisen allerdings darauf hin, dass innerhalb desselben Tumors Zellen vorkommen, die jeweils unterschiedliche transkriptionale Subtypen aufweisen.(119)

### 2.2.2 Subtypen basierend auf DNA-Methylierungsprofilen

Darüber hinaus zeigten epigenetische Untersuchungen bezüglich der DNA-Promotormethylierung, dass ca. 30% der proneuralen Tumoren einen *glioma-CpG Island Methylator Phenotype* (G-CIMP) aufweisen, der mit IDH1-Mutationen, einem geringeren Alter bei Erstdiagnose und einem verlängerten Überleben im Vergleich zu G-CIMP-negativen Tumoren assoziiert ist. Die übergroße Mehrheit (87,5%) der G-CIMP-positiven Glioblastome lässt sich dem proneuralen Subtypen zuordnen.(9) Die ausgeprägte DNA-Hypermethylierung scheint unter anderem eine Folge der IDH1-Mutationen zu sein, die in 78% der G-CIMP-positiven Tumoren anzutreffen sind.(9, 120) Die G-CIMP-spezifischen Veränderungen im Methylom führen zum Silencing der betroffenen Gene, deren Produkte häufig in die Invasionsfähigkeit und das EZM-Remodelling involviert sind bzw. als Mesenchymmarker gelten.(121) Auch die Methylierung des MGMT-Promotors wird in diesem Zusammenhang genannt.(35, 118) Es zeigt sich dabei eine Parallele zu den bereits zuvor beschriebenen transkriptionalen mesenchymalen Subtypen mit im Vergleich schlechterer Prognose.(8, 9, 45) Neuere Untersuchungen gruppieren darüber hinaus Glioblastome anhand von DNA-Methylierungsprofilen, die eine Anreicherung für die jeweiligen transkriptionalen Subtypen aufweisen.(35)

Trotz der umfangreichen Charakterisierung von Tumorsubtypen ist der klinische Gebrauchswert der identifizierten Marker bisher gering, da die Untersuchung der beschriebenen transkriptionalen Subtypen auf äußerst aufwendigen Genexpressionsanalysen basiert, für die bisher kein klinisch brauchbarer diagnostischer Test existiert.(8) Eine neue Generation von Biomarker-Essays für Glioblastome mit Surrogatparametern zur Subtypendetektion wäre daher wünschenswert.

---

<sup>31</sup> *Brain-derived neurotrophic factor*

## 2.3 ZEB1 im Kontext primärer Hirntumoren

### 2.3.1 ZEB1 als EMT-Induktor

Ungeachtet der zugrundeliegenden Mechanismen ist der Wechsel zum mesenchymalen Subtyp allgemein ein verbreitetes Muster der Tumorprogression in hochgradigen Gliomen und erinnert an den Phänotypwechsel im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), die physiologisch im Rahmen der Wundheilung sowie im Verlauf der Embryonalentwicklung, zum Beispiel bei der Formation der Neuralleiste und der Entwicklung des Herzens, oder unter pathologischen Bedingungen in Karzinomen beobachtet werden kann.(45, 122) Bei der EMT handelt es sich um ein komplexes zelluläres Differenzierungsprogramm, das den Verlust der Zellpolarität, ein umfangreiches Remodelling der Extrazellulärmatrix und den Erwerb der zellulären Migrationsfähigkeit umfasst.(122) In Tumoren außerhalb des zentralen Nervensystems erzeugt der Prozess der EMT in Tumorzellen Stammzelleigenschaften, Invasionsfähigkeit, und Therapieresistenz.(122, 123) Auf molekularer Ebene wird dieser Transitionsprozess unter anderem durch den Transkriptionsfaktor ZEB1<sup>32</sup> induziert.(124) Bei ZEB1 handelt es sich um einen multifunktionalen Transkriptionsfaktor, der Zinkfinger-Domänen, eine zentrale Homöodomäne und multiple Proteinbindungsstellen aufweist und daher sowohl Bindungen mit Proteinen als auch mit Nukleinsäuren eingehen kann.(125) Über die genannten Bindungsstellen wechselwirkt ZEB1 sowohl mit Ko-Repressoren als auch mit Ko-Aktivatoren, die dann im Komplex eine Repression oder erhöhte Expression der Zielgene bewirken.(126) Wie andere EMT-Induktoren ist ZEB1 in die Regulation von Zelladhäsionsproteinen involviert und spielt daher in epithelialen Tumoren eine wesentliche Rolle beim Verlust der Zellpolarität und bei der Metastasierung.(127) In Kombination mit anderen Ko-Repressoren bewirkt ZEB1 über die Bindung an den Promotor des für das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin kodierenden CDH1-Gens dessen transkriptionale Repression.(128) Die im Rahmen der EMT ablaufenden Prozesse unterliegen dabei einer komplexen Vielfalt von Wechselwirkungen. Neben dem offenbar für die ZEB1-Aktivierung bedeutsamen TGF $\beta$ -Signaling ist der Transkriptionsfaktor über microRNAs der miR-200-Familie in einen negativen Feedbackloop der EMT-Kontrolle involviert.(129, 130) Über seine Funktionen im

---

<sup>32</sup> *Zinc finger E-box-binding homeobox 1, Syn.: TCF8/DeltaEF1*

Kontext der EMT hinaus gilt ZEB1 als Regulator von Stammzeleigenschaften, der DNA-Reparatur und ist in die Modulation der tumorinduzierten Immunsuppression eingebunden.(131-133)

### 2.3.2 ZEB1 in humanen Glioblastomen

Da dem Hirnparenchym kritische Gewebekomponenten wie Epithel oder Mesenchym fehlen, wurde der Rolle der EMT und der mit ihr verbundenen molekularen Prozesse in Bezug auf Glioblastome allerdings erst spät Aufmerksamkeit zuteil.(134-136) Aktuelle Studien beobachteten, dass ZEB1 gerade durch seine duale Rolle in Wechselwirkung entweder mit Ko-Aktivatoren oder -Repressoren auch in Glioblastomen ein genetisches Programm steuert, das viele Gemeinsamkeiten mit der EMT außerhalb des zentralen Nervensystems aufweist.(137) Auch das Schlüsselonkogen primärer Glioblastome EGFR ist in derartige Vorgänge in Glioblastomen eingebunden, da ein Verlust der EGFR-Aktivität zu einer Umkehr EMT-ähnlicher Prozesse und einer Hemmung des invasiven Tumorstadiumsverhaltens in Glioblastomen führt.(39) Neben den umfangreichen Arbeiten zu ZEB1 in Karzinomen, deuten neuere Untersuchungen auch auf eine Einbindung von ZEB1 in die zelluläre Antwort auf Hypoxie, die Tumorentstehung und Invasion in primären Hirntumoren hin.(130, 138-140) In glialen Tumoren wird die ZEB1-Expression durch die Tumormikroumgebung induziert und führt wie auch außerhalb des zentralen Nervensystems zu einer Repression der E-Cadherin-Expression, wodurch die Gliomzellen Invasionsfähigkeit erlangen.(141) Eingebunden in den Feedbackloop der miR-200-Familie erhöht ZEB1 die ROBO1<sup>33</sup>-Expression und fördert somit die Zellmotilität über eine Unterbrechung der zytoskelettalen Verankerung in Glioblastomen.(139, 142) Es liegen außerdem Hinweise dafür vor, dass Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren wie ZEB1 vermehrt in überexprimierten Genen (G-CIMP<sup>+</sup>) proneuraler (IDH1<sup>mut</sup>) Glioblastomen vorkommen.(9) Im Rahmen seiner Funktion als molekularer Marker der Tumorentstehung wird ein möglicher prognostischer Wert von ZEB1 in humanen Glioblastomen diskutiert. So konnte eine Arbeit zeigen, dass eine hohe ZEB1-Expression in Glioblastomen mit signifikant verringertem Gesamtüberleben assoziiert ist.(139) Über den miR-200c/c-MYB/MGMT-Signalweg bewirkt ZEB1 eine Steigerung der Chemoresistenz von Glioblastomzellen gegenüber

---

<sup>33</sup> *Roundabout homolog 1*

Temozolomid durch Erhöhung der MGMT-Expression. Ebenfalls in den ZEB1/miR-200-Feedbackloop eingebunden ist die Regulation von Stammzeleigenschaften über die Transkriptionsfaktoren SOX2 und OLIG2.(131, 139) Die Regulation der Proliferation und der Erhalt der Stammzeleigenschaften von GSCs erfolgt außerdem durch ein Zusammenspiel von in Glioblastomen häufig vorkommenden  $\alpha 6$ -Integrinen, FGFR1 und dem ZEB1/YAP1-Transkriptionskomplex.(82)

### 2.3.3 Intertumorale Heterogenität der ZEB1-Expression

Auf Grund der Assoziation von EGFR mit EMT-ähnlichen Prozessen und einem invasiven Wachstumsverhalten in Glioblastomen lässt sich vermuten, dass in Glioblastomen mit erhöhter EGFR-Expression, also im klassischen Subtyp, die ZEB1-Expression erhöht ist.(39) Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen IDH1-Mutationen in humanen Gliomen und der ZEB1-Expression nachgewiesen werden, was zu der Annahme veranlasst, dass auch Glioblastome des proneuralen Subtyps eine hohe ZEB1-Expression aufweisen.(143) Für eine subtypenspezifische Expression von ZEB1 im Allgemeinen und das Verhalten von ZEB1 in Glioblastomen des mesenchymalen Subtyps im Speziellen liegen bisher allerdings keine Indizien vor (Abbildung 5). Da der mesenchymale Subtyp in Folge von genetischen NF1-Alterationen durch eine verringerte NF1-Expression sowie durch eine verstärkte Immuninfiltration und eine relativ zu den anderen Subtypen erhöhte Expression von CD68 gekennzeichnet ist, könnte deren Ermittlung zur Abgrenzung von den Tumoren des proneuralen und klassischen Subtyps und zur abschätzenden Beurteilung des ZEB1-Expressionslevels im mesenchymalen Subtyp dienlich sein. Angesichts dessen, dass der Wechsel zum mesenchymalen Subtyp als Zeichen der Tumorprogression

	classical	mesenchymal	proneural
EGFR-Expression	↑		
IDH1-Mutationsstatus	Wildtyp		mutiert
NF1-Expression		↓	
CD68-Expression		↑	
ZEB1-Expression	(↑)	(?)	(↑)

Abbildung 5: Mögliche subtypenspezifische, relative ZEB1-Expressionslevel. Surrogatparameter zur Identifizierung der Subtypen: IDH1-Mutationsstatus sowie EGFR-, CD68- und NF1-Expression. Für die klassischen und proneuralen Glioblastomsubtypen lassen sich entsprechend der Quellenlage erhöhte ZEB1-Expressionslevel vermuten. Für den mesenchymalen Subtyp liegen bisher keine Hinweise zur Abschätzung der ZEB1-Expression relativ zu den anderen Subtypen vor.

und ZEB1 außerhalb des zentralen Nervensystems als Marker der EMT gilt, ließe sich für den mesenchymalen Subtyp eine im Vergleich zu den anderen Subtypen höhere ZEB1-Expression vermuten (Abbildung 5).(45)

## 2.4 Automatisierte Analyse mikroskopischer Bilddatensätze

Die automatische Analyse hochauflösender Scans von Objektträgern gewinnt in der digitalen Pathologie auf Grund von Zeitersparnissen und methodischen Vorteilen eine immer größere Bedeutung. So sind händische Auswertungen bei wachsender Datensatzgröße eine mühsam-repetitive und zeitraubende Aufgabe, die darüber hinaus durch hohe inter- und intraindividuelle Variabilität in der Beobachtung gekennzeichnet sind bzw. durch situationsabhängige Subjektivität keinem einheitlichen Analysemaßstab unterliegen und in ihrer Reproduzierbarkeit begrenzt sind. Auf Grund der Menge der zu verarbeitenden Daten sind die technischen Voraussetzungen dazu allerdings komplex und verlangen zur individuellen Anpassung der Datenverarbeitungsalgorithmen darüber hinaus von den ausführenden Personen mindestens vertiefende Kenntnisse im Bereich der verwendeten Software, wenn nicht gar der Programmierung. Die Automatisierung von zuvor mit massivem Zeit- und Personalaufwand manuell durchgeführten Analysen histologischer Datensätze ist daher weiterhin eine große Herausforderung.

## 2.5 ZEB1-Charakterisierung mittels automatischem Auswertungsalgorithmus

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Workflow zur Auswertung großer histologischer Datensätze etabliert werden, der sich durch Wiederverwendbarkeit auszeichnet und leicht an die Erfordernisse zukünftiger Analysen angepasst werden kann. Der dabei zu entwickelnde automatische Auswertungsalgorithmus wird mit einem manuellen Goldstandard und einem bereits etablierten Auswertungsverfahren verglichen.

Die Datenbasis, an der dies demonstriert werden soll, bildet ein umfangreicher histologischer Datensatz bestehend aus 231 Proben humaner Glioblastome, die für ZEB1, IDH1, EGFR, CD68 und NF1 immunhistochemisch aufbereitet wurden. Mittels des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Workflows soll der relative Anteil ZEB1<sup>+</sup> Zellen (ZEB1 labeling index) für jeden Tumor bestimmt und zum IDH1-Mutationsstatus, zum

NF1-Score, zu den ebenfalls zu bestimmenden EGFR- und CD68 labeling indices sowie zu den verfügbaren klinischen Daten in Beziehung gesetzt werden, um die ZEB1-Expression in humanen Glioblastomen mit Bezug zu Surrogatparametern der transkriptionalen Glioblastomsubtypen zu charakterisieren und einen Beitrag zur Aufklärung der intertumoralen Heterogenität der ZEB1-Expression zu leisten.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Tumorproben**

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet ein bereits zuvor beschriebener Tissue Microarray (TMA) bestehend aus 243 zwischen 1998 und 2008 gesammelten Patientenproben humaner Gliome WHO-Grad II bis IV.(39, 144) Die durch zertifizierte Neuropathologen der Klinik für Pathologie des Haukeland Universitätsklinikums (Bergen, Norwegen) durchgeführte Diagnostik der verschiedenen Tumorentitäten lieferte 231 GBM und 12 weitere Gliome verschiedener Entität (1 Oligodendrogliom, 4 Gliosarkome und 7 anaplastische Astrozytome). Klassifiziert wurden diese Tumoren nach der nun nicht mehr aktuellen WHO-Klassifikation für Tumoren des zentralen Nervensystems von 2007. Alle nicht GBM-Entitäten wurden auf Grund der kleinen Stichprobengröße und einer - in Folge der Veröffentlichung einer aktualisierten Fassung der WHO-Klassifikation von 2016 - möglicherweise notwendig werdenden Neudiagnostik aus der Analyse ausgeschlossen. Pro Tumor wurden in den TMA jeweils 3 Paraffinschnitte miteinbezogen und für immunhistochemische Färbungen aufbereitet. Dabei repräsentieren die einzelnen Paraffinschnitte jeweils Teilproben aus dem Tumorkern. Das mittlere Lebensalter der Patienten bei Erstdiagnose für GBM betrug 61 Jahre, die mediane Überlebensdauer 8,4 Monate. Die Durchführung der Studie erfolgte mit Zustimmung von Datatilsynet, der nationalen Datenschutzbehörde Norwegens, des Regionalen Forschungsethikkomitees und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki.(39)

#### **3.2 Immunhistochemie**

Die immunhistochemischen Färbungen der Gewebeproben des TMA für ZEB1, EGFR und IDH1<sup>R132H</sup> sowie der EGFR-Amplifikation mittels FISH wurden wie bereits in einer zuvor veröffentlichten Publikation beschrieben durchgeführt.(144)

Die Immunhistochemie für CD68 wurde von Kooperationspartnern im Labor von Prof. Hrvoje Miletic, Abteilung für Biomedizin der Universität Bergen (Norwegen), durchgeführt. Für die CD68-Färbung wurde das VENTANA Benchmark XT – System verwendet. Der primäre CD68 – Antikörper (DAKO, Katalog-Nr.: M0814) kam mit einer Verdünnung von 1:5000 zum Einsatz.

Die Immunhistochemie für NF1 wurde von Prof. Dr. David Capper, Institut für Neuropathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt.(145)

### 3.3 TMA – Prozessierung

Um einen Datensatz zu generieren, der einer automatisierten Auswertung zugänglich ist, erfolgte ein *Whole Slide Scan* der aus dem Tumorprobensatz resultierenden 45 Objektträger (9 pro Färbung für ZEB1, IDH1 EGFR, CD68 und NF1) mittels Panoramic 250 Flash Scanner (3DHistech). Die Digitalisierung erfolgte dabei mit einer erweiterten Fokustiefe von 5 Ebenen mit jeweils 6 µm Abstand wie bereits zuvor publiziert.(144) In Folge dessen entstand ein Datensatz aus 45 *Whole Slide Images* (WSI) im MIRAX Format, die aus Gründen der Praktikabilität mittels eines zu diesem Zweck von Kooperationspartnern der Digitalen Pathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigten Skripts in das JPEG2000 Format konvertiert wurden. Der Zugriff auf den Datensatz für die zur automatisierten Analyse notwendige Datenaufbereitung erfolgte im Anschluss mittels ImageJ Microscope Plugin<sup>34</sup>. Die resultierende Größe der 45 WSI jeweils im zweistelligen Gigabyte-Bereich stellte auf dem Weg zu einem analysierbaren Datenformat eine erste, nicht geringe Herausforderung dar. Da die Leistungsfähigkeit gängiger Desktop-PCs nicht ausreichte, um zum Zwecke der weiteren Datenbearbeitung auf die WSI im JPEG2000 Format zuzugreifen, wurden weitere Prozessschritte nötig, die der Selektion der für die Analyse relevanten Bildausschnitte (*region of interest* (ROI)) vorangestellt werden mussten. Zum einen beinhaltete dies eine Kompression der ursprünglichen WSI, um den Zugriff mit eigens dazu erstellten ImageJ Plugins zu ermöglichen und die Prozessgeschwindigkeit zu erhöhen. Zum anderen war es als Vorbereitung zur automatisierten Analyse der immunhistochemischen Färbungen nötig, Bilder einzelner Schnitte (im Folgenden „Spots“ genannt) aus den 81 Tumorproben enthaltenden WSI

---

<sup>34</sup> <https://fiji.sc/>



zu exportieren (*Gridding*). Diesem Schritt schloss sich eine automatische ROI-Definition mittels ImageJ – Skript an, welche zur Elimination etwaiger histologischer Artefakte und Ungenauigkeiten des zur ROI-Definition erstellten Algorithmus händisch korrigiert wurde. Aus Gründen der Begrenztheit der uns zur Verfügung stehenden Rechenleistung wurde eine Teilung der im vorhergehenden Schritt entstandenen Einzelspot – Bilder nötig (*Tiling*), bevor der so entstandene, aus mehreren zehntausend Bildern bestehende Datensatz den verschiedenen Messmethoden zur ZEB1-Quantifizierung zugeführt werden konnte. Eine manuelle Quantifizierung diente dabei als Goldstandard zur Validierung bzw. Beurteilung zweier automatischer Messmethoden. Die hier grob umrissenen Arbeitsschritte (Abbildung 6) sollen nun in den folgenden Unterkapiteln beispielhaft für ZEB1 näher erläutert werden. Bis einschließlich zur ROI-Definition waren die im Folgenden genannten Arbeitsschritte für alle 5 genannten immunhistochemischen Färbungen durchzuführen. Darüber hinaus erfolgte eine Aufbereitung von Bilddatensätzen immunhistochemischer Färbungen für CD44, Ki67, p53, GFAP, Nestin sowie HE.

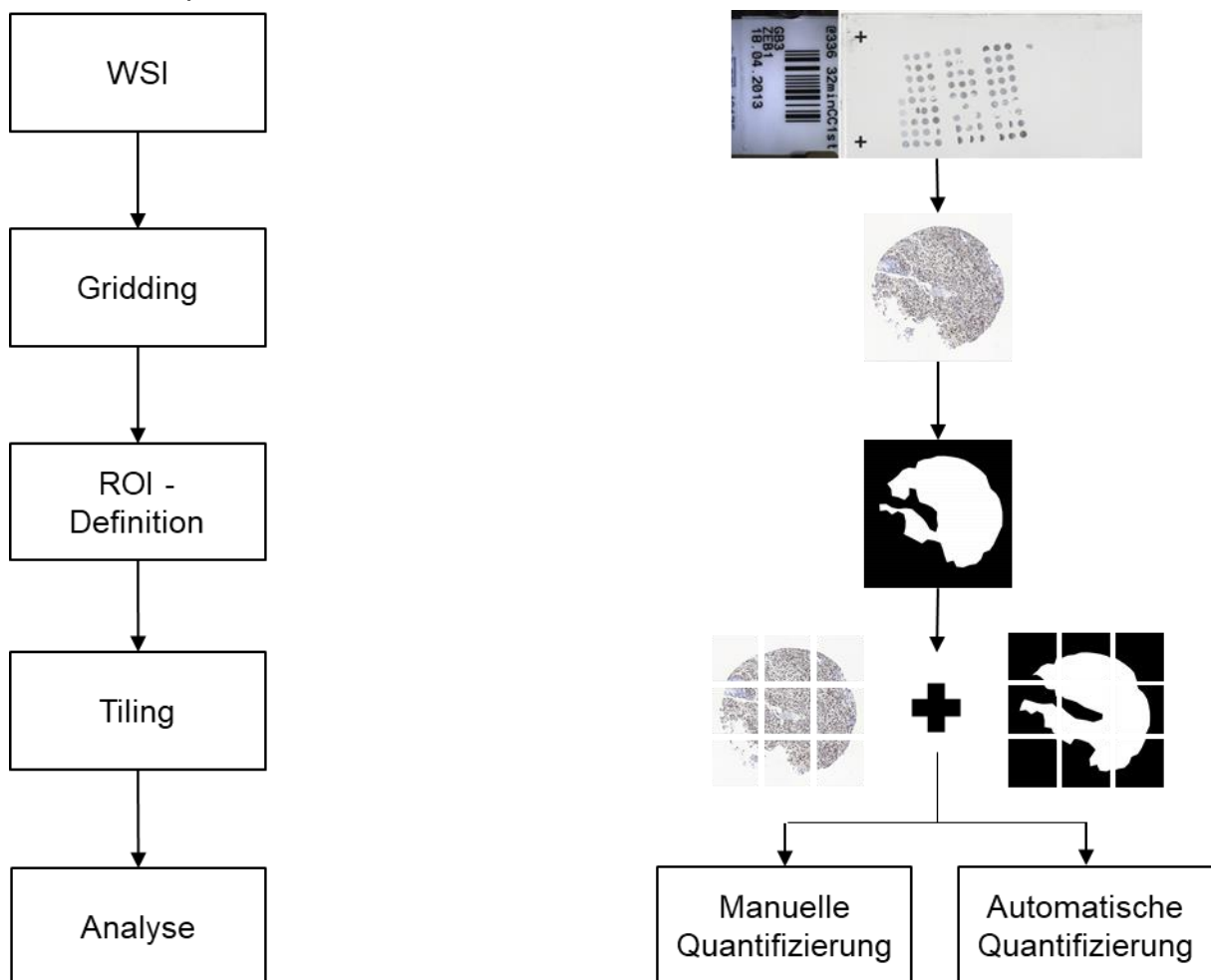


Abbildung 6: Fließschema der TMA-Prozessierung

### 3.3.1 Aufbereitung des Datensatzes

Um eine prozessfähige Dateigröße sowie ein der manuellen und automatisierten Analyse zugängliches Datenformat zu generieren, wurde ein zu diesem Zweck erstelltes ImageJ Gridding Plugin für den Export von Bildern einzelner Spots aus den WSI verwendet.<sup>(144)</sup> Eine über das Plugin manuell korrigierte Selektion der Koordinaten der zu extrahierenden Einzelschnitte in Verbindung mit Kakadu Software<sup>35</sup>, einem Toolkit für das JPEG2000 Format, ermöglichte letztlich den erforderlichen Datenexport. Es resultierte ein Datensatz bestehend aus 3645 Bilddateien von Einzelspots im TIFF Format mit einer jeweiligen Dateigröße im mittleren zweistelligen Megabyte-Bereich, der für eine anschließende ROI-Definition praktikabel war (Abbildung 7). Auf Grund technischer Limitationen wurde des Weiteren eine Teilung der Einzelspotbilder notwendig, um die Größe der zu analysierenden Dateien zu verringern. Zur Durchführung wurde ein benutzerdefiniertes Skript für ImageMagick<sup>36</sup>, einer Open Source – Software für die Modifikation und Bearbeitung von Bilddateien, verwendet, das sowohl für die Teilung der Einzelspotbilder als auch der jeweiligen binären Masken erstellt wurde. Aus jeder Ursprungsdatei wurden so 9 korrespondierende Bilddateien, die den verschiedenen Analyseinstrumenten zugeführt werden konnten (Abbildung 6, S. 41).

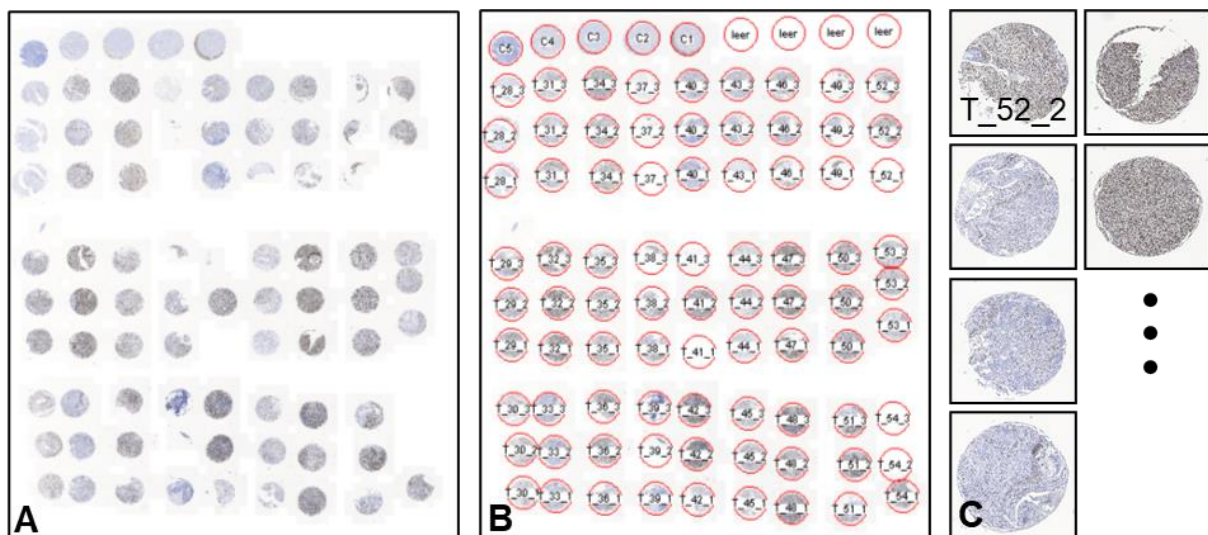


Abbildung 7: Gridding. A: komprimiertes WSI mit 81 Tumorproben. B: korrigiertes Spotraster zur Koordinatenerfassung. C: resultierende Einzelspots nach Datenexport aus WSI; Tumor 52 Probe 2 beispielhaft markiert und fortan zur Illustration der weiteren Arbeitsschritte verwendet.

<sup>35</sup> <http://kakadusoftware.com/>

<sup>36</sup> <https://www.imagemagick.org/>

### 3.3.2 ROI-Definition

Die Definition der in die Analyse miteinzubeziehenden Bildkomponenten erfolgte über ein die größte zusammenhängende weiße Fläche definierendes ImageJ – Skript auf den Einzelspotbildern. Zur exakteren Abgrenzung der ROI wurde eine manuelle Revision der automatisch generierten ROIs für jeden Spot durchgeführt.(144)

Aus Gründen der Praktikabilität erfolgte dabei eine Negativselektion auszuschließender Gewebeabschnitte (Artefakte wie Falten, Blasen sowie Zelltrümmer und große Gefäßanschnitte, Abbildung 8) mittels eines für diesen Zweck erstellten ROI Review Plugins. Die gewonnenen Koordinaten der ROIs dienten in einem weiteren Arbeitsschritt zur Erstellung einer binären Maske zur Maskierung der aus der Analyse zu exkludierenden Gewebeareale im Rahmen der automatischen Quantifizierungen (Abbildung 9).

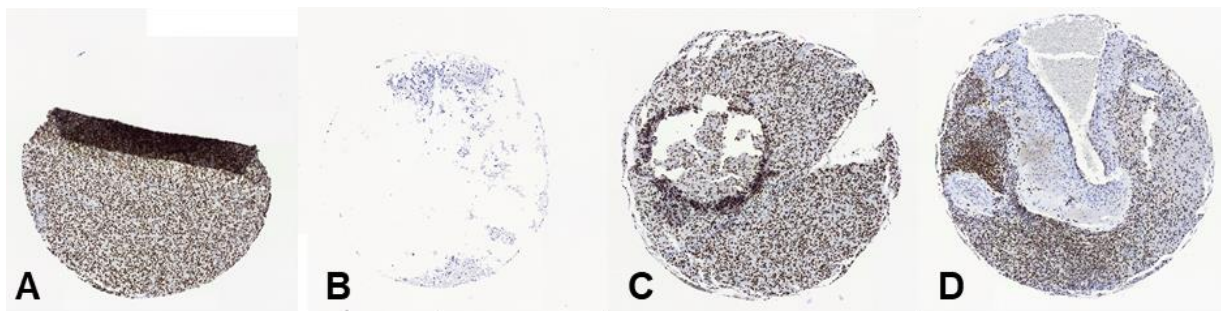


Abbildung 8: Exkludierte Gewebeprobeigenschaften, Beispiele. A: Falte. B: Zelltrümmer. C: Blase. D: großer Gefäßanschnitt.

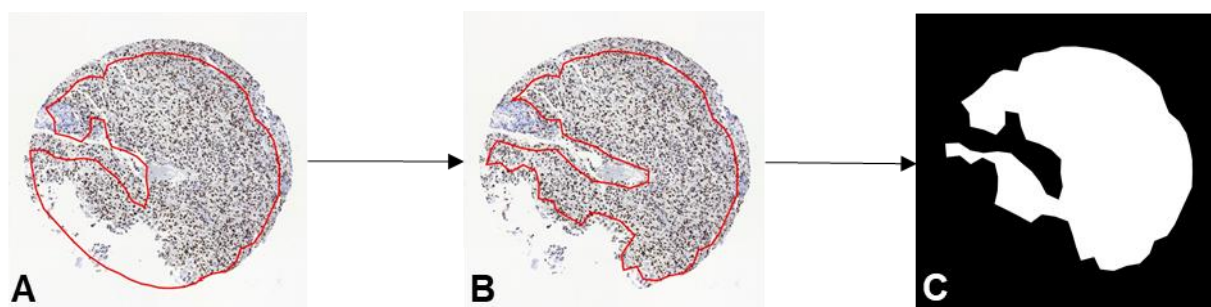


Abbildung 9: ROI-Definition. A: Automatisch erstellte ROI. B: manuell korrigierte ROI. C: binäre Maske als ROI-Referenz.

### 3.1 TMA – Analyse

#### 3.1.1 Manuelle Quantifizierung von ZEB1

Als Goldstandard zur Quantifizierung des relativen Anteils ZEB1<sup>+</sup> Nuclei pro Tumor diente die händische Auszählung der mit DAB gefärbten ZEB1<sup>+</sup> sowie der lediglich mit Hämatoxylin gegengefärbten ZEB1<sup>-</sup> Nuclei. Durchgeführt wurde diese Auszählung mit ImageJ in 75%iger Vergrößerung an den aus dem Gridding resultierenden Einzelspotbildern im TIFF Format. Als Stichprobe dienten dabei 20 nach einem Zufallsverfahren ausgewählte Einzelspots. In Vorbereitung der Auszählung erfolgte die Maskierung der Einzelspotbilder mit ihren jeweiligen, aus der ROI-Definition resultierenden binären Masken. Die Ergebnisse der Auszählung wurden grafisch und in Form von Koordinaten punktförmiger ROIs der jeweiligen, in die Auszählung miteinbezogenen Nuclei dokumentiert (Abbildung 10). Aus der Anzahl jeweils aller gezählten und der ZEB1<sup>+</sup> Nuclei wurde der relative Anteil ZEB1<sup>+</sup> Nuclei (ZEB1 labeling index) pro Einzelspot ermittelt.

#### 3.1.2 Automatische Quantifizierung von ZEB1

Zur automatischen Quantifizierung von ZEB1 für den gesamten Bilddatensatz wurde mit CellProfiler (Version 2.2.0, Windows (64-bit))<sup>37</sup>, einer open-source Software für die quantitative Analyse biologischer Bilder, ein modularischer Workflow (im Folgenden

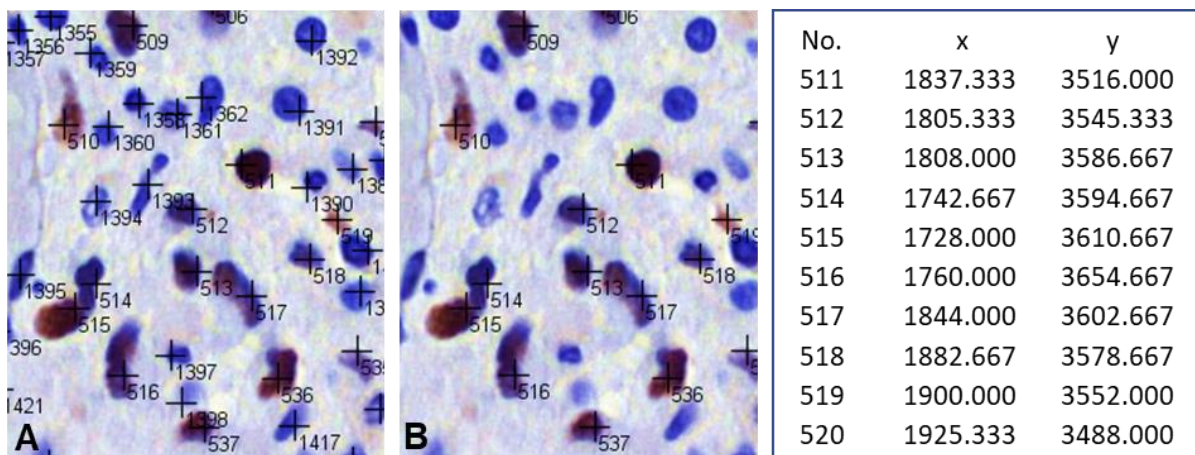


Abbildung 10: Manuelle Quantifizierung von ZEB1, Ausschnitt, Tumor 186 Probe 1. A: Alle ausgezählten Nuclei. B: ausgezählte ZEB1<sup>+</sup> Nuclei und zugehörige Koordinaten einiger dargestellter Nuclei

<sup>37</sup> <https://cellprofiler.org/>

„Pipeline“ genannt) erstellt.(146) Die ROIs in Form der binären Masken sowie die jeweiligen Einzelspotbilder im TIFF Format wurden dabei, wie bereits zuvor beschrieben, für eine automatische Objekterkennung einzelner Nuclei in Kombination mit einer Objektklassifikation auf Grundlage von Intensitätsgrenzwerten genutzt (Abbildung 11). (144) Im ersten Schritt erfolgte dabei die Trennung des RGB-Einzelspotbildes in die Farbkanäle für DAB und Hämatoxylin in Form grauskalierter Bilder. Zur signifikanten Verringerung der Analysedauer wurde ein Ausschluss von Leerbildpaaren auf Grundlage einer Intensitätsmessung durchgeführt.

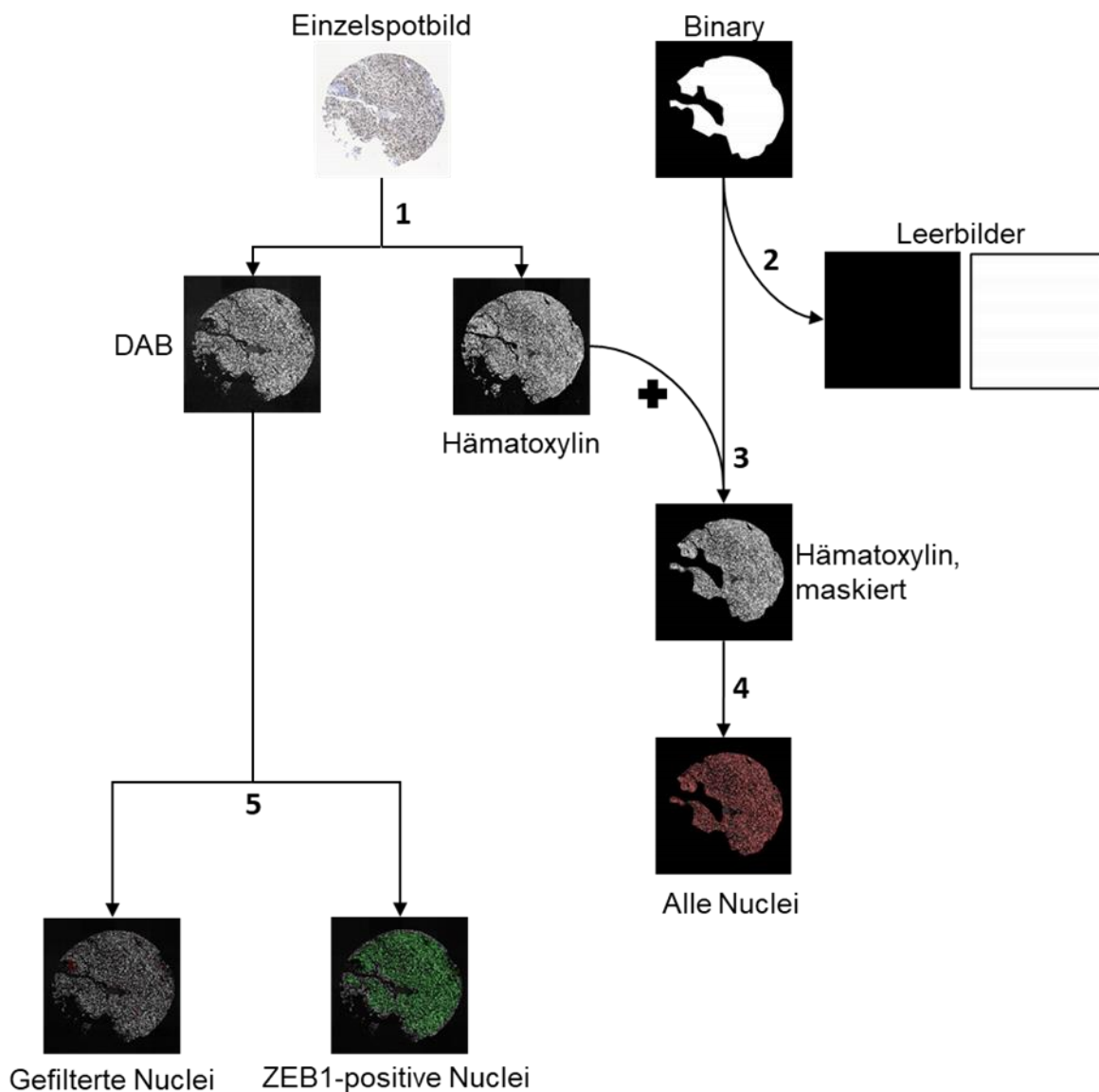


Abbildung 11: Fließschema der CellProfiler Pipeline, Tiling aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. 1: Trennung der Farbkanäle für DAB und Hämatoxylin. 2: Ausschluss von Leerbildpaaren. 3: Maskierung des Hämatoxylin-Grauskalenbildes. 4: automatische Objekterkennung. 5: Filterung der ZEB1<sup>+</sup> Nuclei auf Basis eines Intensitätsgrenzwertes.

Eine mittlere globale Intensität von  $\leq 0,001$  auf dem Binary führte zur Markierung und zum Ausschluss des aus Binary und zugehörigem Einzelspotbild bestehenden Bildpaares aus der weiteren Analyse. Diesem Schritt in der Pipeline folgte die Einspeisung der ROI durch die Maskierung des Hämatoxylin-Bildes mit dem dazugehörigen Binary, auf dessen Grundlage im nächsten Schritt die automatische Objekterkennung durchgeführt werden konnte. Genutzt wurde dabei ein Modul zur Erkennung von zellulären Subkompartimenten auf Grauskalenbildern unter benutzerdefinierter Anpassung unter anderem der Größe der zu erkennenden Objekte und der Art der Methoden zur Schwellenwertbildung auf der Basis von Intensitätswerten. Mit den auf diese Weise ermittelten Objektgrenzen der einzelnen Nuclei erfolgte in einem weiteren Schritt die Filterung der ZEB1<sup>+</sup> Nuclei durch Intensitätsmessung innerhalb dieser Grenzen auf dem DAB-Grauskalenbild (Abbildung 12). Nuclei mit einer mittleren Intensität innerhalb der Objektgrenzen auf dem DAB-Bild von  $\geq 0,1$  wurden als ZEB1<sup>+</sup> Nuclei klassifiziert, Objekte mit einer mittleren Intensität  $\leq 0,1$  als unspezifische oder artifizielle DAB-Hintergrundfärbung exkludiert. Die so gewonnene Gesamtanzahl der Nuclei und die Anzahl ZEB1<sup>+</sup> Nuclei mit ihren zugehörigen Koordinaten wurden in Form einer Textdatei ausgegeben. Im Anschluss wurde der Mittelwert über die jeweils pro Tumor vorhandenen Replikate gebildet.

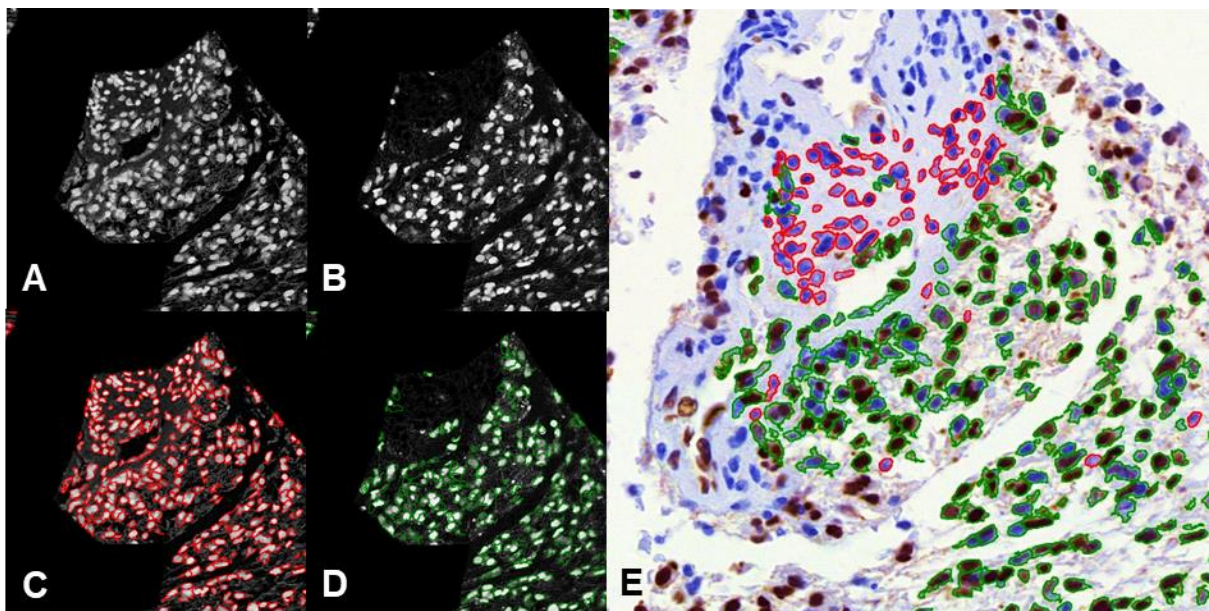


Abbildung 12: Automatische Erkennung von Nuclei. A: Hämatoxylin, Grauskalenbild. B: DAB, Grauskalenbild. C: Objektgrenzen aller erkannten Nuclei (rot). D: Objektgrenzen ZEB1<sup>+</sup> Nuclei (grün). E: Ergebnis der Objekterkennung im nativen Einzelspotbild.

Um neben dem manuellen Scoring einen weiteren Vergleichswert für die Güte der mit CellProfiler durchgeführten automatischen Quantifizierung zu erhalten, wurde ZEB1 ebenfalls mit dem Open Source ImageJ Plugin ImmunoRatio<sup>38</sup> quantifiziert. Auch hier erfolgt eine Segmentierung der nativen Einzelspotbilder in ihre DAB- und Hämatoxylin-Komponente. Im Unterschied zur CellProfiler-Pipeline schließt ImmunoRatio keine Objekterkennung auf Einzellzellniveau, sondern eine Bestimmung des relativen Anteils der mit DAB gefärbten nukleären Fläche an der totalen nukleären Fläche an das Entmischen der Farbkanäle an.

### 3.1.3 Methodvalidierung

Zur Einschätzung der Güte der neuen Messmethode - der automatisierten ZEB1-Quantifizierung mit CellProfiler - wurden 3 Messwerte mit den unterschiedlichen Methoden an derselben Zufallsstichprobe erhoben (n = 20; gleichverteilte Zufallsstichprobe aus 729 Tumorproben). Die manuelle Quantifizierung diente dabei als Goldstandard. Zur ausdifferenzierteren Bewertung der neuen Messmethode erfolgte darüber hinaus eine weitere Messung mit einem bereits etablierten automatischen Messverfahren für DAB- und Hämatoxylin-Färbungen, dem ImmunoRatio-Plugin für ImageJ. Alle automatisierten Quantifizierungen (CellProfiler, ImmunoRatio) wurden unter folgender Systemkonfiguration vorgenommen: Intel® Core™ i7-7700HQ CPU @ 2,8GHz (8 CPUs), 16 GB RAM.

Zum Vergleich und zur Beurteilung des Übereinstimmungsgrades der Messmethoden wurden mit den gewonnenen Daten Bland-Altman-Diagramme, ein etablierter Standard zum statistischen Vergleich zweier Messmethoden bei klinischen Messungen, erstellt und ausgewertet. (147) Um zu ermitteln, ob ausreichende Übereinstimmung zwischen den Messwerten des Goldstandards und denen einer Testmethode besteht, wird dazu ein Streudiagramm der Differenzen der einzelnen Messwiederholungen in Abhängigkeit der Mittelwerte der jeweiligen Messwertepaare (Bland-Altman-Plot) erstellt. Um Aussagen über eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Größe und der Differenz der Messwerte der jeweiligen Messmethoden zu ermöglichen, wird außerdem eine Regressionsanalyse durchgeführt. Mit jeder Messmethode wurde einmalig die genannte Stichprobe analysiert; auf eine Wiederholung der manuellen

---

<sup>38</sup> <http://jvsmicroscope.uta.fi/sites/default/files/software/immunoratio-plugin/index.html>

Auszählung durch einen weiteren Untersucher wurde verzichtet. Die Erstellung der Graphiken und die erforderlichen Kalkulationen wurden mit R<sup>39</sup>, einer open-source Software für statistische Datenverarbeitung, durchgeführt.

### 3.1.4 Automatische Bestimmung des EGFR und CD68 labeling index

Die Prozessierung des TMAs für die zytoplasmatische EGFR-Färbung erfolgte nach dem zuvor für ZEB1 beschriebenen Schema (Abbildungen 6 und 11). Eine zur automatischen Auswertung des resultierenden EGFR-Datensatzes erstellte CellProfiler-Pipeline wurde zur Bestimmung der mittleren Intensität der gesamten ROI (EGFR labeling index) im DAB-Kanal verwendet. Aus den Messwerten der pro Tumor verfügbaren Replikate wurde der Mittelwert gebildet.

Die Prozessierung des für CD68 gefärbten TMAs erfolgte ebenfalls nach dem zuvor beschriebenen Schema. Mit kleineren Anpassungen an andere Gegebenheiten zum Beispiel bezüglich eines sich unterscheidenden Ausmaßes unspezifischer Hintergrundfärbung kam hier die gleiche CellProfiler-Pipeline wie bei der Auswertung des EGFR-Datensatzes zum Einsatz. Der relative Anteil der DAB<sup>+</sup> Fläche an der gesamten Fläche der ROI bildet die Grundlage für den resultierenden CD68 labeling index.

### 3.1.5 Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus

Die Bestimmung des Mutationsstatus erfolgte manuell auf Grundlage einer spezifischen Antikörperfärbung für IDH1<sup>R132H</sup>. Der Median aller 3 Replikate des jeweiligen Tumors wurde verwendet. Dabei konnte auf eine von Felix Knab, Abteilung für experimentelle Neurologie, AG Harms, Charité - Universitätsmedizin Berlin bereits erstellte IDH1<sup>R132H</sup> - Annotation zurückgegriffen werden.

### 3.1.6 Bestimmung des NF1-Expressionsstatus

Die Bestimmung des NF1-Expressionsstatus erfolgte im Rahmen dieser Arbeit manuell mit Hilfe eines zu diesem Zweck von Dr. med. Philipp Euskirchen, Klinik für Neurologie, Abteilung für experimentelle Neurologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin erstellten Scoring-Plugins für ImageJ<sup>40</sup>. Ausschließlich Tumorproben mit

---

<sup>39</sup> <https://cran.r-project.org/>

<sup>40</sup> <https://fiji.sc/>



eindeutig positiver oder negativer NF1-Immunhistochemie über alle vorhandenen Replikate jedes Tumors hinweg wurden in die Erstellung eines binären NF1-Scores miteinbezogen. Proben mit intermediärer oder über die Replikate variierender Färbungsintensität wurden exkludiert.

### 3.1.7 Statistik

Zur Untersuchung der Beziehung des ZEB1 labeling index zu molekularen und klinischen Parametern unter Berücksichtigung der hierarchischen Datenstruktur wurde ein lineares gemischtes Modell verwendet (3 Replikate pro Tumor als Einheiten der Ebene 1 und Patienten als Einheiten der Ebene 2). In die statistische Analyse einbezogen wurde eine um rezidivierende Glioblastome und Nicht-GBM-Entitäten bereinigte Teilmenge des Gesamtdatensatzes unter Berücksichtigung des EGFR-Amplifikations- und IDH1-Mutationsstatus sowie des Geschlechts und des Alters. Die statistische Analyse wurde mit R unter Verwendung der *lme4*<sup>41</sup> – und *lmerTest*<sup>42</sup>-Pakete durchgeführt.(148)

Für eine Überlebenszeitanalyse wurde das Kaplan-Meier-Verfahren unter Verwendung der R-Pakete *survminer*<sup>43</sup> und *survival*<sup>44</sup> sowie zur Beurteilung der Gruppenunterschiede der Log Rank – Test genutzt. Nach Bonferroni-Korrektur wurden p-Werte  $< 0,05/5 = 0,01$  als signifikant gewertet.

### 3.1.8 Reproduzierbarkeit und Datenverfügbarkeit

Die verwendeten ImageJ – Plugins zur Prozessierung des Bilddatensatzes sowie die CellProfiler-Pipelines zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen sind über einen Filehost zugänglich<sup>45</sup>. Ein Teil des Bild- und Rohdatensatzes ist einsehbar über eine von Dr. med. Philipp Euskirchen, Klinik für Neurologie, Abteilung für experimentelle Neurologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin erstellte Shiny-App<sup>46,47</sup>.

---

<sup>41</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/lme4.pdf>

<sup>42</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/lmerTest/lmerTest.pdf>

<sup>43</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/survminer/survminer.pdf>

<sup>44</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/survival.pdf>

<sup>45</sup> [https://www.dropbox.com/sh/60to0h6jgk3oiaq/AAAfYUWkyGZVpOxDH\\_dWctRZa?dl=0](https://www.dropbox.com/sh/60to0h6jgk3oiaq/AAAfYUWkyGZVpOxDH_dWctRZa?dl=0)

<sup>46</sup> <https://shiny.rstudio.com/>

<sup>47</sup> erreichbar mit einem Charité-internen Zugang über: <https://gbm-atlas.shinyapps.io/gbm-atlas/>

## 4 Ergebnisse

Nach Aufbereitung des Rohdatensatzes verblieben 231 Glioblastome, 12 Nicht-GBM-Entitäten wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Der Datensatz enthält 16 (6,9%) IDH1-mutierte Glioblastome, sowie 213 Glioblastome vom IDH1-Wildtyp. Das mittlere Alter der Patienten bei Erstdiagnose beträgt für primäre Glioblastome 62 und für sekundäre Glioblastome 45 Jahre. EGFR-Amplifikationen finden sich ausschließlich unter den primären Glioblastomen mit einem Anteil von 43,7%. Das mediane Überleben beträgt für primäre Glioblastome 7,6 Monate und für sekundäre Glioblastome 14,6 Monate. Es zeigen sich außerdem nur leichte Unterschiede im Geschlechterverhältnis (m : w) von 1,51 : 1 für primäre und 1,67 : 1 für sekundäre Glioblastome, wobei Männer charakteristisch häufiger betroffen sind.

### 4.1 Methodvalidierung: Überlegenheit der CellProfiler-Methode

Zur Beurteilung der Güte des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Workflows zur automatischen Auswertung des Datensatzes erfolgte zunächst ein Vergleich einer manuellen Auszählung ZEB1<sup>+</sup> Zellen mit den Ergebnissen des CellProfiler-Algorithmus und der ImmunoRatio-Methode. Die manuelle ZEB1-Quantifizierung der Zufallsstichprobe bestehend aus 20 Einzelspots erforderte die händische Auszählung von ca. 70 000 Nuclei, im Mittel 3500 Nuclei pro Einzelspotbild. Die Bearbeitungszeit pro Einzelspot nahm dabei in Abhängigkeit der Größe der Fläche der jeweiligen Gewebeprobe im Mittel 30 Minuten in Anspruch. Für die Auswertung der genannten Stichprobe von 20 Einzelspots fielen somit ca. 10 Stunden reine Auszählungszeit an. Der Durchlauf der automatischen ZEB1-Quantifizierung mit der eigens zu diesem Zweck erstellten CellProfiler-Pipeline beanspruchte für die genannte Stichprobe 11 Minuten. Die Ergebnisse der verschiedenen Quantifizierungsmethoden sind in Tabelle 1 (S. 56f) zusammengefasst dargestellt. Die Paarung der Messwerte erfolgte entsprechend der Tumor-ID. Bereits hier werden Unterschiede in den Ergebnissen mit größeren Abweichungen vom Goldstandard bei der Quantifizierung mit ImmunoRatio deutlich. Mit Korrelationskoeffizienten ( $r$ )  $> 0,78$  weisen die Ergebnisse der automatischen Quantifizierungen eine starke positive lineare Abhängigkeit zu den Ergebnissen des Goldstandards auf (Tabelle 2, S. 57). Dabei korrelieren die Ergebnisse der Quantifizierung mit CellProfiler am stärksten mit dem Goldstandard ( $r = 0,93$ ). Die Streudiagramme der Ergebnisse der manuellen in Abhängigkeit der

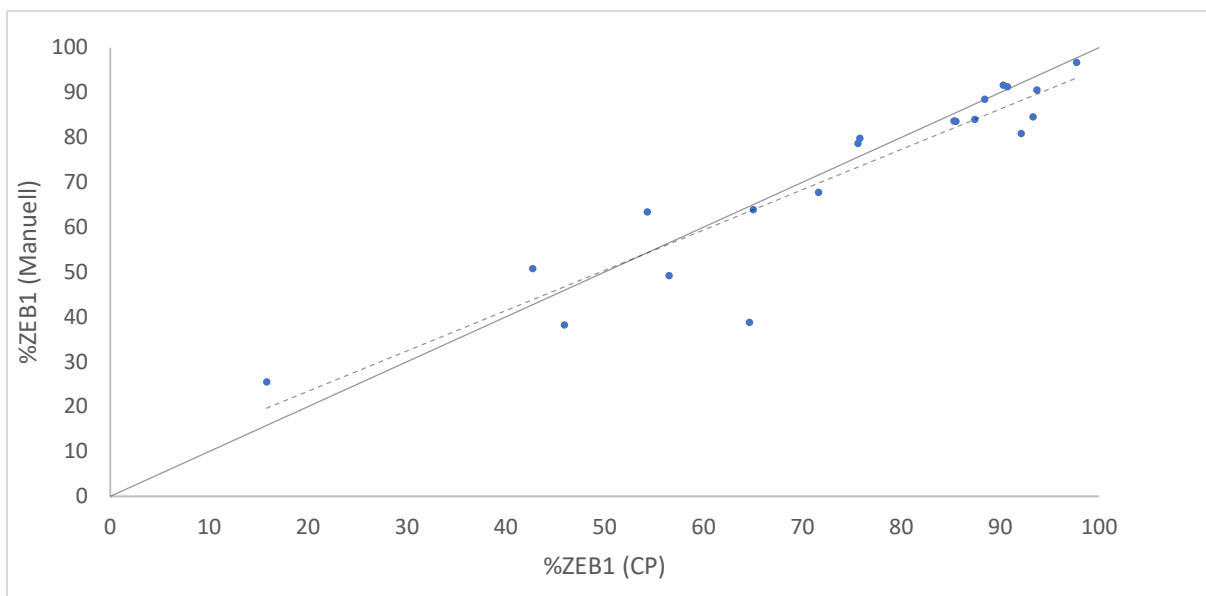


Diagramm 1: Streudiagramm der Ergebnisse der manuellen und der automatischen ZEB1-Quantifizierung mit CellProfiler. schwarz: Line of Equality ( $y = x$ ); gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = 0,8983x + 5,4598$ ;  $R^2 = 0,8647$ )

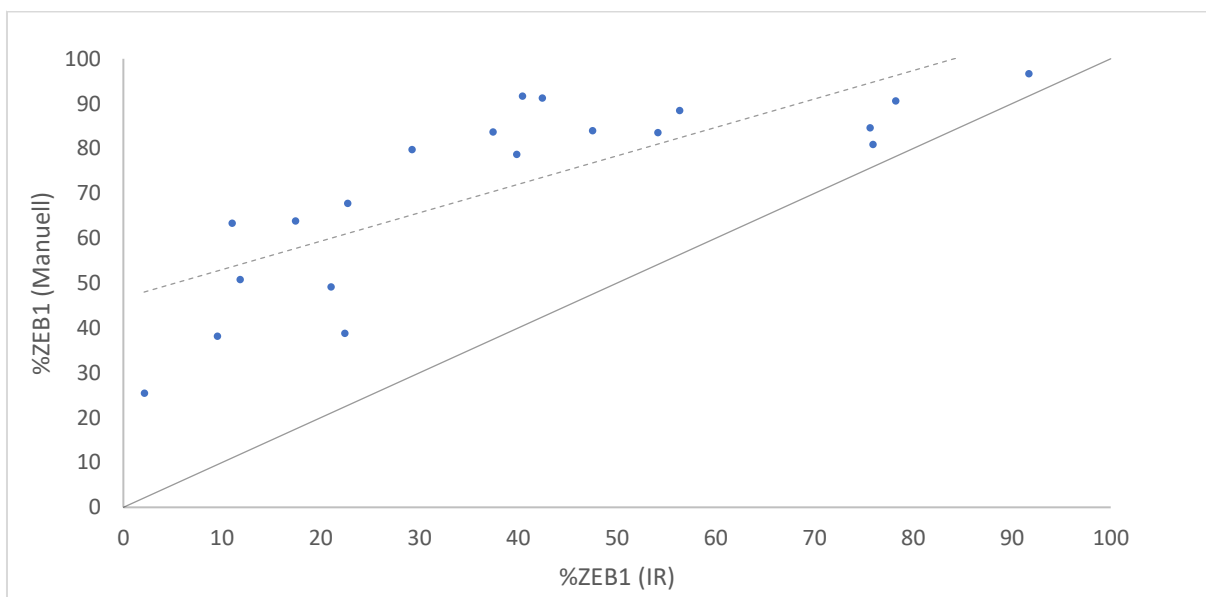


Diagramm 2: Streudiagramm der Ergebnisse der manuellen und der automatischen ZEB1-Quantifizierung mit ImmunoRatio. schwarz: Line of Equality; gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = 0,6341x + 46,653$ ;  $R^2 = 0,6223$ )

automatischen Quantifizierungen zeigen in beiden Fällen größere Abweichungen von der *Line of Equality* ( $y = x$ , Diagramm 1 und 2). Dabei liefert die Quantifizierung mit ImmunoRatio tendenziell höhere Ergebnisse als der Goldstandard; die entsprechende Regressionsgerade schneidet die y-Achse weit oberhalb des Nullpunktes.

Da Korrelation und Regressionsanalyse allein keine Rückschlüsse auf die Güte der verwendeten Messmethoden zulassen, wurde zur Überprüfung des Übereinstimmungsgrades der Messmethoden ein Messmethodenvergleich nach Bland-Altman durchgeführt, der im Folgenden besprochen wird.(147) Die Tabellen 3 und 4 (S. 57) geben einen Überblick über die erhobenen Daten der Bland-Altman-

Statistik für beide Messmethodenvergleiche mit 95%-Konfidenzintervallen. Der Vergleich von manueller und automatischer Quantifizierung mit CellProfiler zeigt Differenzen zwischen den Messwerten mit einem einzelnen Ausreißer von bis zu 25% bei einer mittleren Differenz ( $\bar{d}$ ) von -2,025% und einer Standardabweichung (s) der Differenzen von 7,99% (Diagramm 3, S. 54). Demnach weicht die CellProfiler-Methode im Durchschnitt um 2,025% nach unten vom Goldstandard ab. Die Differenzen zwischen den manuell und mit CellProfiler ermittelten Werten zeigen eine Normalverteilung nach Testung mit dem Shapiro-Wilk-Test ( $W > W_\alpha$ :  $W = 0,90938$ ;  $W_\alpha = 0,905$  mit  $p = 0.06202$  für  $\alpha = 0,05$ ;  $n = 20$ ), so dass angenommen werden kann, dass 95% der Differenzen zwischen den *Limits of Agreement* liegen ( $\bar{d} \pm 1,96s$ ):

Obere Übereinstimmungsgrenze:  $\bar{d} + 1,96s = -2,025 + 1,96 * 7,99 = 13,63\%$

Untere Übereinstimmungsgrenze:  $\bar{d} - 1,96s = -2,025 - 1,96 * 7,99 = -17,68\%$

Die CellProfiler-Pipeline liefert bei der ZEB1-Quantifizierung demnach Werte, die bis zu 17,68% unterhalb bzw. 13,63% oberhalb der manuell ermittelten Werte liegen (Diagramm 3, S. 54). Die *Limits of Agreement* geben dabei eine Schätzung der auf die Grundgesamtheit zutreffenden Werte ab. Eine Beurteilung der Präzision der auf diesem Weg geschätzten mittleren Differenz und der Übereinstimmungsgrenzen wird durch die Ermittlung von 95%-Konfidenzintervallen möglich. Das 95%-Konfidenzintervall der systematischen Messabweichung ergibt sich dabei aus dem Standardfehler der mittleren Differenz ( $\sqrt{(s^2/n)} = \sqrt{(7,99^2/20)} = 1,79\%$ ) und dem entsprechenden t-Wert auf der t-Verteilung ( $t = 2,093$  für  $df = n - 1 = 19$ ;  $\alpha = 0,05$ ):  $\bar{d} \pm (t_{n-1;\alpha=0,05} * 1,79)$ . (147) Es reicht demnach von -5,76 bis 1,71% und schließt die Nulllinie des Bland-Altman-Diagrammes (*Line of Equality* für Messwert (Manuell) = Messwert (CellProfiler)) ein (Tabelle 3, S. 57). Ein signifikanter systematischer Messfehler ist folglich nicht anzunehmen. Mit dem Standardfehler der Übereinstimmungsgrenzen ( $\sqrt{(3s^2/n)} = \sqrt{(3 * 7,99^2/20)} = 3,09\%$ ) lassen sich auch für diese 95%-Konfidenzintervalle berechnen. Es ergeben sich für das 95%-Konfidenzintervall der oberen Übereinstimmungsgrenze ( $13,63 \pm t_{n-1;\alpha=0,05} * 3,09$ ) 7,15 bis 20,1% und für dasjenige der unteren ( $-17,68 \pm t_{n-1;\alpha=0,05} * 3,09$ ) -24,15 bis -11,2%.

Im Vergleich dazu weisen die Ergebnisse der Quantifizierung mit ImmunoRatio weit höhere Differenzen zu denen des Goldstandards auf (Diagramm 4). Die sich in Diagramm 2 (S. 51) abzeichnende Tendenz der ImmunoRatio-Quantifizierung, höhere Werte als der Goldstandard zu liefern, wird hier bestätigt. Es zeigen sich mehrfach Differenzen von >50% bei einer mittleren Differenz zwischen ImmunoRatio-Methode und Goldstandard von 32,27% und einer Standardabweichung der Differenzen von 15,97%. Auch die Differenzen zwischen den manuell und mit ImmunoRatio ermittelten Ergebnissen zeigen eine Normalverteilung nach Testung mit dem Shapiro-Wilk-Test ( $W > W_{\alpha}$ :  $W = 0.91646$ ;  $W_{\alpha} = 0,905$  mit  $p = 0.0847$  für  $\alpha = 0,05$ ;  $n = 20$ ). Somit kann auch hier angenommen werden, dass die *Limits of Agreement* 95% der Differenzen einschließen und somit der zu erwartende Abstand der Messwerte zwischen manueller und ImmunoRatio-Quantifizierung suffizient abgebildet wird. Es ergeben sich für den Vergleich dieser beiden Methoden folgende *Limits of Agreement*:

obere Übereinstimmungsgrenze:  $\bar{d} + 1,96s = 32,27 + 1,96 * 15,97 = 63,55\%$

untere Übereinstimmungsgrenze:  $\bar{d} - 1,96s = 32,27 - 1,96 * 15,97 = 0,98\%$

Die ZEB1-Quantifizierung mit ImmunoRatio liefert demnach Werte, die im Bereich zwischen 0,98% und 63,55% oberhalb derjenigen des Goldstandards zu erwarten sind (Tabelle 4, S. 58). Dementsprechend ergeben sich auch breite 95%-Konfidenzintervalle für die mittlere Differenz (24,79 – 39,74%) und die obere (50,61 – 76,5%) bzw. untere Übereinstimmungsgrenze (-11,97 – 13,92%). Das 95%-Konfidenzintervall der mittleren Differenz schließt hierbei nicht die Nulllinie mit ein, die systematische Abweichung der ImmunoRatio-Methode hat daher als signifikant zu gelten. Eine Abhängigkeit der Differenzen der Messwerte von der Größenordnung ihrer Mittelwerte, die hier als beste Schätzung des wahren Wertes fungieren, lässt sich unter Berücksichtigung der natürlichen Bland-Altman-Diagramme (Diagramm 3 und 4) für beide Messmethodenvergleiche vermuten. Die Streuung der Differenzen zwischen den Ergebnissen der automatischen Quantifizierungen und denen des Goldstandards scheint graphisch mit sinkender Größenordnung der Mittelwerte zuzunehmen. Dementsprechend ließe sich vermuten, dass die bestimmten *Limits of Agreement* für kleine Messwerte zu schmal und für große weiter gefasst sind als sie es für eine Betrachtung über die gesamte Breite des Messbereichs sein sollten. Ausdruck findet diese Einschätzung in den Regressionskoeffizienten der Regressionsgeraden in den Bland-Altman-Diagrammen (Diagramm 3 und 4). Dabei weisen die

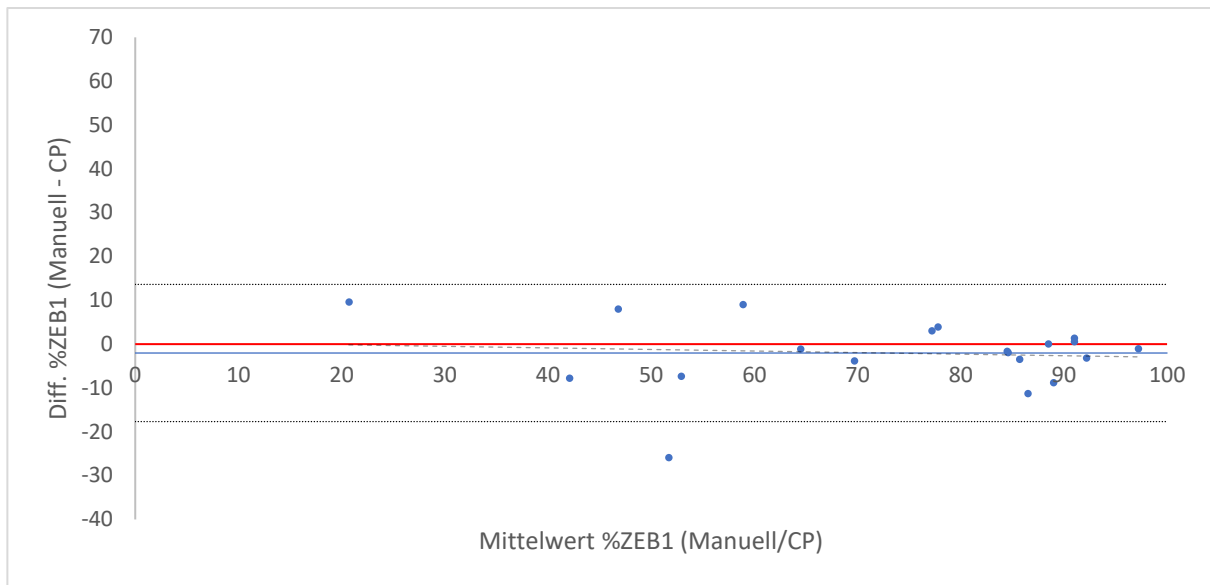


Diagramm 3: Bland-Altman-Plot für die manuelle und die CellProfiler-Quantifizierung von ZEB1. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz; gepunktet: Limits of Agreement ( $\bar{d} \pm 1,96$  SD), gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,0357x + 0,567$ )

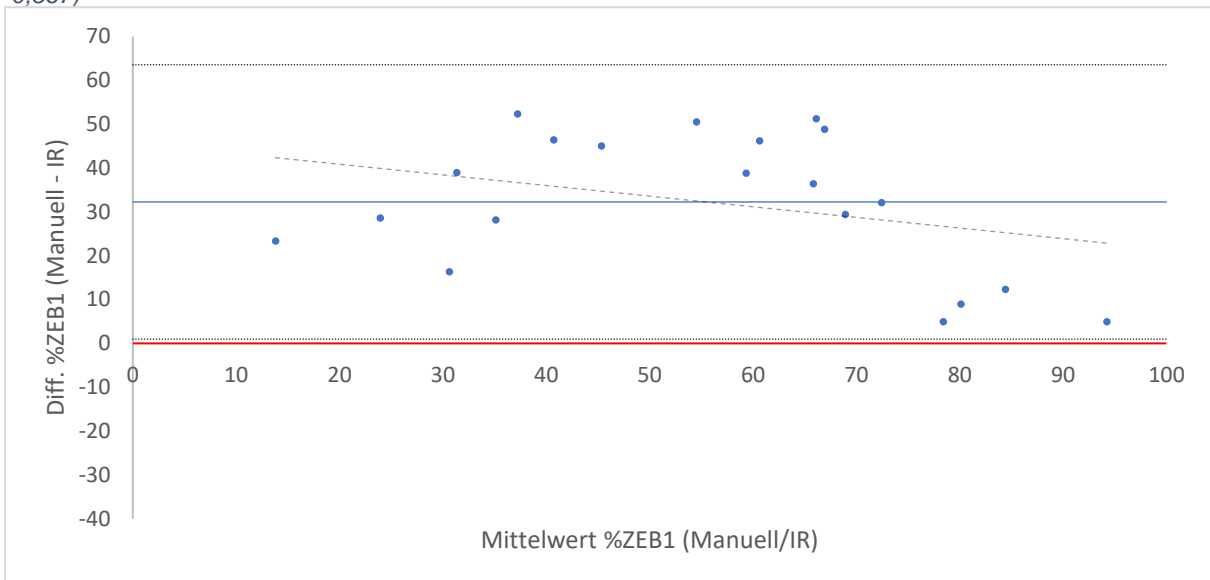


Diagramm 4: Bland-Altman-Plot für die manuelle und die ImmunoRatio-Quantifizierung von ZEB1. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz; gepunktet: Limits of Agreement ( $\bar{d} \pm 1,96$  SD), gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,2425x + 45,716$ )

Messwertdifferenzen beim Vergleich von manueller und ImmunoRatio-Methode mit einem Regressionskoeffizienten von -0,24 den stärkeren negativen Zusammenhang mit den Mittelwerten der Messwerte auf. Die bisherige Betrachtung der Messmethodenvergleiche ging jedoch davon aus, dass die Differenzen über den gesamten Messbereich nicht systematisch variieren, also eine konstante Varianz der Differenzen über den gesamten Messbereich und keine proportionale Verzerrung vorliegt. Zur Elimination unterschiedlicher Varianzen der Differenzen über die Breite des Messbereichs und zur suffizienteren Beurteilung eines möglichen, sich bereits andeutenden Zusammenhanges zwischen Messwertdifferenz und Messwertgröße bei

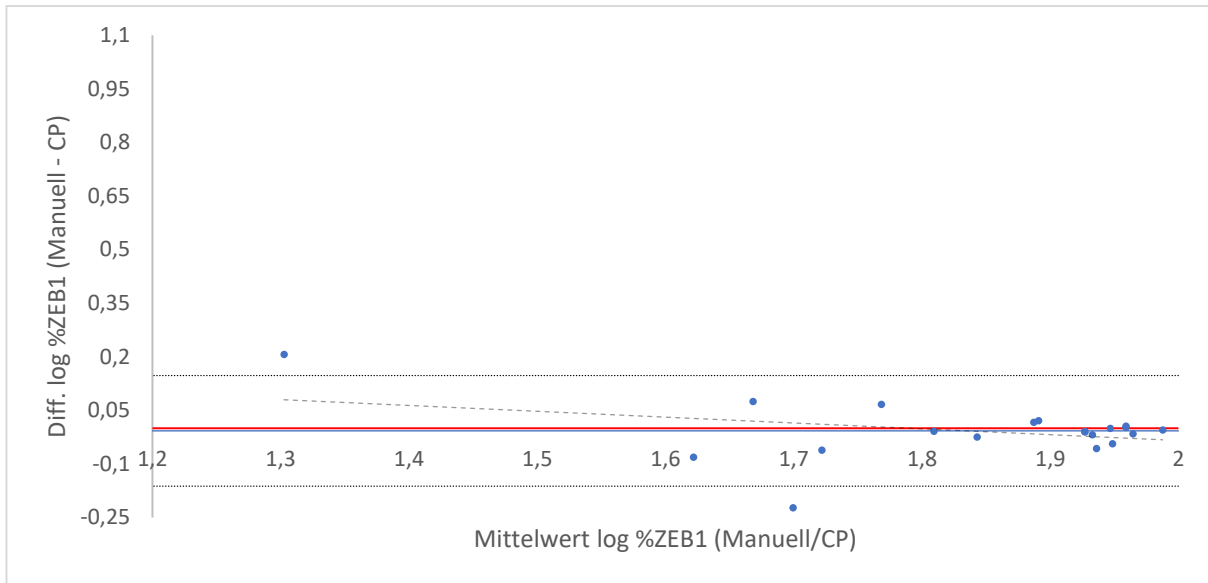


Diagramm 5: Bland-Altman-Plot für die manuelle und die CellProfiler-Quantifizierung von ZEB1 in logarithmisch transformierter Form. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz ( $\bar{d}$ ); gepunktet: Limits of Agreement ( $\bar{d} \pm 1,96 \text{ SD}$ ), gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,1636x + 0,293$ )

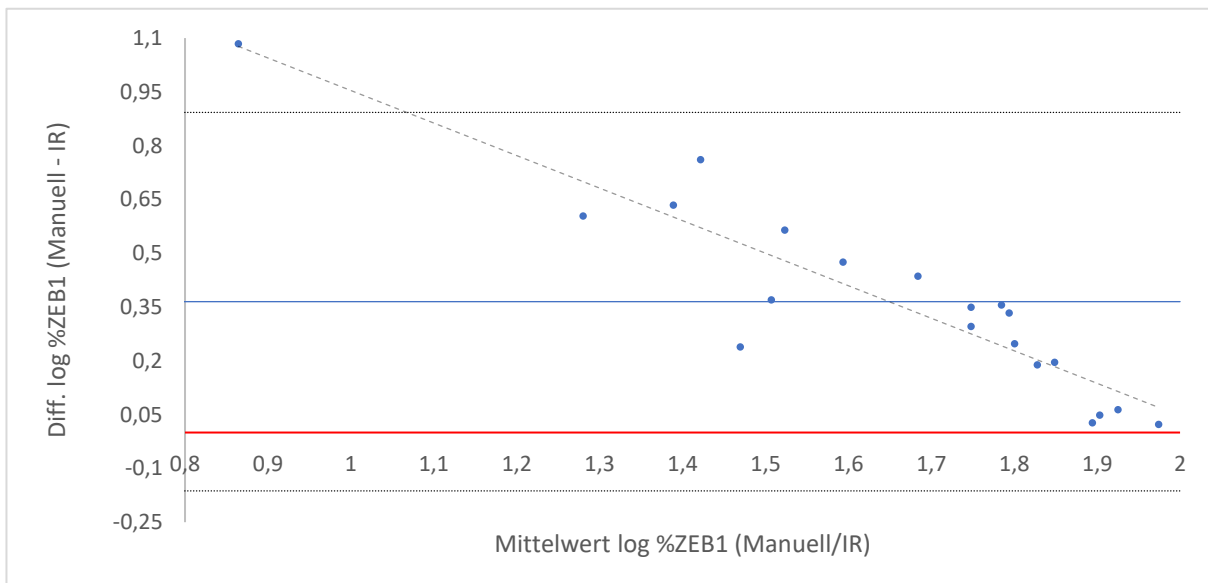


Diagramm 6: Bland-Altman-Plot für die manuelle und die ImmunoRatio-Quantifizierung von ZEB1 in logarithmisch transformierter Form. rot: Nulllinie; blau: mittlere Differenz ( $\bar{d}$ ); gepunktet: Limits of Agreement ( $\bar{d} \pm 1,96 \text{ SD}$ ); gestrichelt: Regressionsgerade ( $y = -0,9074x + 1,8612$ )

beiden Messmethodenvergleichen erfolgte eine logarithmische Transformation der Daten (Diagramm 5 und 6). Für die logarithmisch transformierten Daten ergeben sich für den Vergleich der manuellen Quantifizierung mit der CellProfiler-Methode *Limits of Agreement* von -0,162 – 0,148, für den Vergleich mit ImmunoRatio -0,162 – 0,893.

Durch die Exponenzierung dieser Limits zur Basis 10 entstehen dimensionslose Verhältnisse, die anzeigen, um ein Wievielfaches Ergebnisse der automatischen Quantifizierungen in 95% der Fälle vom Goldstandard abweichen. Für die CellProfiler-Methode ergeben sich für 95% der Fälle Ergebnisse zwischen dem 0,69 und 1,4fachen

des Goldstandards. Für die CellProfiler-Quantifizierung bedeutet dies, dass die durch diese gelieferten Werte 31% unter- bzw. 40% oberhalb des Goldstandards abweichen können. Demgegenüber liegen die Ergebnisse der ImmunoRatio-Methode für 95% der Fälle zwischen dem 0,69 und 7,8fachen derjenigen des Goldstandards. Es sind bei der ZEB1-Quantifizierung mit ImmunoRatio somit Abweichungen von 31% unterhalb und 680% oberhalb des Goldstandards möglich. Darüber hinaus verdeutlicht sich graphisch die bezüglich der natürlichen Bland-Altman-Diagramme geäußerte Einschätzung, dass die Differenzen der Messergebnisse in beiden Fällen eine indirekt proportionale Abhängigkeit zu ihren Mittelwerten aufweisen. Die Streuung der Differenzen scheint mit steigender Messwertgröße abzunehmen, die Regressionsgeraden weisen auf einen negativen Zusammenhang bezüglich der genannten Größen hin (Diagramm 5 und 6).

Im Resultat zeigt sich die automatisierte Objekterkennung und Quantifizierung mittels CellProfiler der flächenintensitätsbasierten Quantifizierung mittels ImmunoRatio im Vergleich zum manuellen Goldstandard überlegen. Für die folgende Charakterisierung von ZEB1 in Bezug zu den bestimmten immunhistochemischen und vorliegenden klinischen Parametern wurde daher der CellProfiler-Algorithmus als geeignetes Surrogat der manuellen Auszählung als Messverfahren verwendet.

*Tabelle 1: Ergebnisse der ZEB1-Quantifizierung für die Tumoren der Zufallsstichprobe (Spot\_ID: TumorID\_Replikat). Anteil ZEB1+ Nuclei an der Gesamtzahl ausgezählter Nuclei in Prozent für die jeweilige Messmethode (manuelle Quantifizierung, automatische Quantifizierung: CellProfiler, ImmunoRatio)*

Spot_ID	Manuell	CellProfiler	ImmunoRatio
11_1	96,7	97,7	91,7
16_2	88,5	88,4	56,3
22_3	38,8	64,6	22,4
59_3	91,7	90,3	40,4
73_3	84,0	87,4	47,5
91_3	50,8	42,7	11,8
93_1	63,9	65	17,4
95_1	78,7	75,6	39,8
104_1	83,6	85,5	54,1
104_3	83,7	85,3	37,4
113_3	38,2	45,9	9,5
114_2	67,8	71,6	22,7
155_3	91,3	90,7	42,4
161_3	63,4	54,3	11
184_3	80,9	92,1	75,9
186_1	49,2	56,5	21



194_1	25,5	15,8	2,1
199_1	79,8	75,8	29,2
213_3	84,6	93,3	75,6
216_2	90,6	93,7	78,2

Tabelle 2: Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ) als Zusammenhangsmaß zwischen den verschiedenen Messmethoden

$r$	Manuell	CellProfiler	ImmunoRatio
Manuell	1	0,929889	0,788672
CellProfiler	0,929889	1	0,8502115
ImmunoRatio	0,7889716	0,8502115	1

Tabelle 3: Bland-Altman-Statistik der manuell und mit CellProfiler erhobenen Daten aus Tabelle 1

Parameter	Unit	Standardfehler	t-Wert	95%-Konfidenzintervalle	
				von	bis
Stichprobengröße (n)	20				
Freiheitsgrade (df = n - 1)	19				
mittlere Differenz ( $\bar{d}$ )	-2,025	1,79	2,093	-5,76	1,71
Standardabweichung (s)	7,99				
$\bar{d} - 1,96s$	-17,68	3,09	2,093	-24,15	-11,2
$\bar{d} + 1,96s$	13,63	3,09	2,093	7,15	20,1

Tabelle 4: Bland-Altman-Statistik der manuell und mit ImmunoRatio erhobenen Daten aus Tabelle 1.

Parameter	Unit	Standardfehler	t-Wert	95%-Konfidenzintervalle	
				von	bis
Stichprobengröße (n)	20				
Freiheitsgrade (df = n - 1)	19				
mittlere Differenz ( $\bar{d}$ )	32,265	3,57	2,093	24,79	39,73
Standardabweichung (s)	15,96				
$\bar{d} - 1,96s$	0,98	6,18	2,093	-11,97	13,92
$\bar{d} + 1,96s$	63,55	6,18	2,093	50,61	76,49

## 4.2 Charakterisierung von ZEB1 in humanen Glioblastomen

Die Quantifizierung von ZEB1 wurde mittels standardisierter automatischer Auswertung auf Einzelzellebene anhand von immunhistochemischen Färbungen als relative Anteile ZEB1<sup>+</sup> Zellen (ZEB1 labeling index) an der gesamten gemessenen Zellpopulation bestimmt. Über die pro Tumor vorhandenen bis zu 3 Replikate mit im Durchschnitt jeweils 3762 Nuclei (Min: 130, Max: 10077) wurde der Durchschnitt gebildet. Der so entstandene, 231 Glioblastome umfassende ZEB1-Datensatz wurde dann in Kombination mit den bereits vorhandenen Scores molekularer Marker (IDH1 – Mutations- und EGFR-Amplifikationsstatus), den im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls

erstellten immunhistochemischen Quantifizierungen (EGFR und CD68 labeling index, NF1-Score) und den klinischen Parametern analysiert.

#### 4.2.1 Intertumorale Heterogenität der ZEB1-Expression in Glioblastomen

ZEB1<sup>+</sup> Zellen sind in den untersuchten Glioblastomen weit, jedoch auch in deutlich variierenden Fraktionen verbreitet. ZEB1<sup>-</sup> Zellen finden sich in allen Tumoren. Die Mehrzahl der untersuchten Glioblastome weist einen hohen Anteil ZEB1<sup>+</sup> Zellen auf (mit ZEB1 labeling index >49%: 178/85,2%). Im Median liegt der ZEB1 labeling index bei 83,1% (n = 196, Min: 15,8%, Max: 99,3%, Mittelwert: 78,8%). Für die Beurteilung des subtypenspezifischen Anteils ZEB1<sup>+</sup> Zellen wurden die Tumoren anhand der für diese typischen genetischen Eigenschaften gruppiert. Zur Identifizierung von Glioblastomen der klassischen und (G-CIMP<sup>+</sup>) proneuralen Subtypen diente der EGFR-Amplifikations- sowie der IDH1<sup>R132H</sup>-Mutationsstatus.(8) Als Surrogatparameter des mesenchymalen Subtyps dienten der NF1-Score und der CD68 labeling index. Der Anteil ZEB1<sup>+</sup> Zellen wies in Bezug auf die Tumorsubtypen deutliche Unterschiede auf, wenngleich alle durch hohe ZEB1 labeling indices (>49%) gekennzeichnet sind (Diagramm 7D, S. 59). Die statistische Analyse zeigte, dass sowohl die EGFR-Amplifikation (p = 4,41e-05) als auch die IDH1<sup>R132H</sup>-Mutation (p = 0,00978) unabhängig voneinander signifikante Prädiktoren für einen erhöhten ZEB1 labeling index darstellen (Tabelle 5). Graphische Gruppenvergleiche geben diesen Zusammenhang ebenfalls wieder. Für die nicht-amplifizierte Gruppe ergibt sich ein Median für den Anteil an ZEB1<sup>+</sup> Zellen von 78,4% (n = 113), für die EGFR-amplifizierte Gruppe von 89,3% (n = 78) (Diagramm 7A).

*Tabelle 5: lineares gemischtes Modell des ZEB1 labeling index in Bezug auf molekulare und klinische Parameter (n = 192). Signifikante Zusammenhänge zeigen sich sowohl für den EGFR-Amplifikations- als auch den IDH1-Mutationsstatus. Kein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen ZEB1 labeling index und dem Geschlecht bzw. dem Alter bei Erstdiagnose. Signifikanzniveaus (α): 0: \*\*\*\* 0,001: \*\*\* 0,01: \*\* 0,05: \**

Faktor	r	SD	t	p
EGFR-Amplifikationsstatus	0,1080	0,02582	4,186	4,41e-05***
IDH1-Mutationsstatus	0,1428	0,05470	2,611	0,00978**
Geschlecht (männlich)	0,1424	0,02532	0,562	0,57458
Alter bei Erstdiagnose	0,1819	0,00147	1,586	0,11453

Der ZEB1 labeling index beträgt für Glioblastome vom IDH1-Wildtyp im Median 82,4% (n = 184) und für IDH1-mutierte Tumoren 92,5% (n = 12) (Diagramm 7C). Für alle anderen Tumoren, die weder eine EGFR-Amplifikation noch eine IDH1<sup>R132H</sup>-Mutation aufweisen, ergibt sich im Median ein Anteil ZEB1<sup>+</sup> Zellen von 76,8% (n = 101) (Diagramm 7D). Wie entsprechend der bekannten Kollinearität zwischen EGFR-Amplifikation und EGFR-Expression zu erwarten, spiegelt sich der Zusammenhang zwischen EGFR-Amplifikation und dem ZEB1 labeling index auch in Bezug auf den semiquantitativen EGFR labeling index wider, der signifikant mit dem Anteil an ZEB1<sup>+</sup> Zellen korreliert (n = 190, Pearson's r = 0.3649822, p = 2.249e-07) (Diagramm 7B). (39) Für die ZEB1 und CD68 labeling indices ergibt sich ein signifikanter negativer Zusammenhang (n = 170, Pearson's r = -0.2124213, p = 0.00542) (Diagramm 8A). Die Abspaltung einer vierten Subgruppe von Tumoren mit einem hohen CD68 labeling index oberhalb von dessen Median von 7,36% von der Gruppe der Tumoren ohne EGFR-Amplifikation und IDH1-Mutation offenbart, dass diese Tumorphosphorpopulation einen

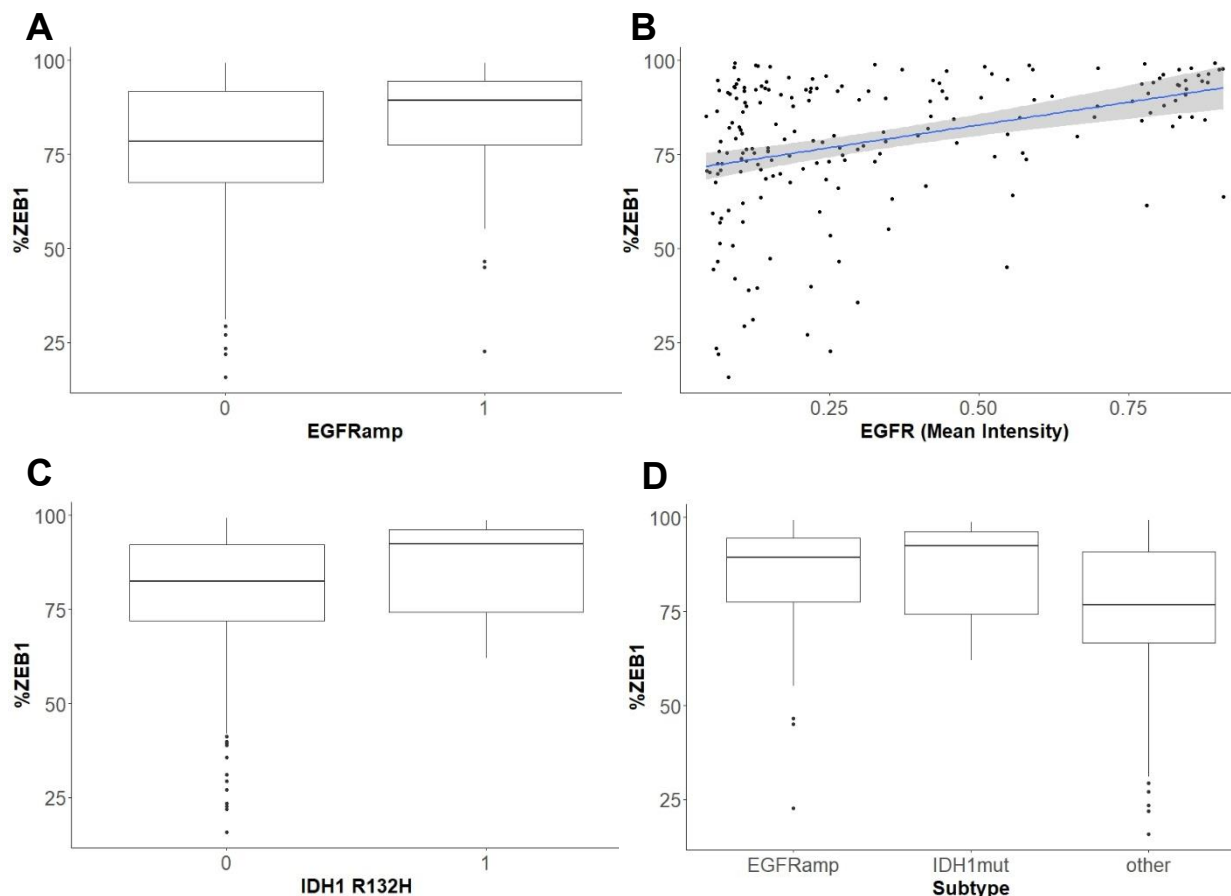


Diagramm 7: A: Boxplot des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des EGFR-Amplifikationsstatus (Subgruppe mit EGFR-Amplifizierung = 1). B: Streudiagramm mit Regressionsgerade des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des EGFR labeling index (mean intensity) (n = 190,  $y = 24.210x + 70.752$ , adjustiertes  $R^2 = 0.1286$ ). C: Boxplots des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des IDH1-Mutationsstatus (Subgruppe mit IDH1-Mutation = 1). D: Boxplots des ZEB1 labeling index (%) in Bezug auf die nach Vorhandensein der EGFR-Amplifikation bzw. IDH1-Mutation stratifizierten Glioblastomsubgruppen, Mediane: EGFRamp (n = 78): 89,3%, IDH1mut (n = 12): 92,5%, other (n = 101): 76,8%.

im Vergleich deutlich niedrigeren Anteil ZEB1<sup>+</sup> Zellen mit einem Median des ZEB1 labeling index von 73,4% aufweist (Diagramm 8B). Der Median des ZEB1 labeling index für Tumoren sowohl ohne EGFR-Amplifikation als auch IDH1-Mutation und niedrigem CD68 labeling index erhöht sich dadurch von 76,8% auf 82,1%. Darüber hinaus unterscheiden sich die zentralen Tendenzen zwischen NF1<sup>+</sup> und NF1<sup>-</sup> Tumoren signifikant in Bezug auf den ZEB1 labeling index (Diagramm 8C, Mann-Whitney-U-Test: n = 60, W = 211, p = 0.0001665). NF1<sup>+</sup> Glioblastome (n = 30) weisen mit 91,8% ZEB1<sup>+</sup> Zellen im Median einen höheren Anteil auf als NF1<sup>-</sup> Tumoren (75, 5%, n = 30). Die Subgruppe mit negativem NF1-Score als Surrogatparameter zur Identifizierung des mesenchymalen Subtyps sind im Vergleich zu den anderen Subgruppen mit 74,5% (n = 20) durch den niedrigsten ZEB1 labeling index im Subgruppenvergleich gekennzeichnet (Diagramm 8D).

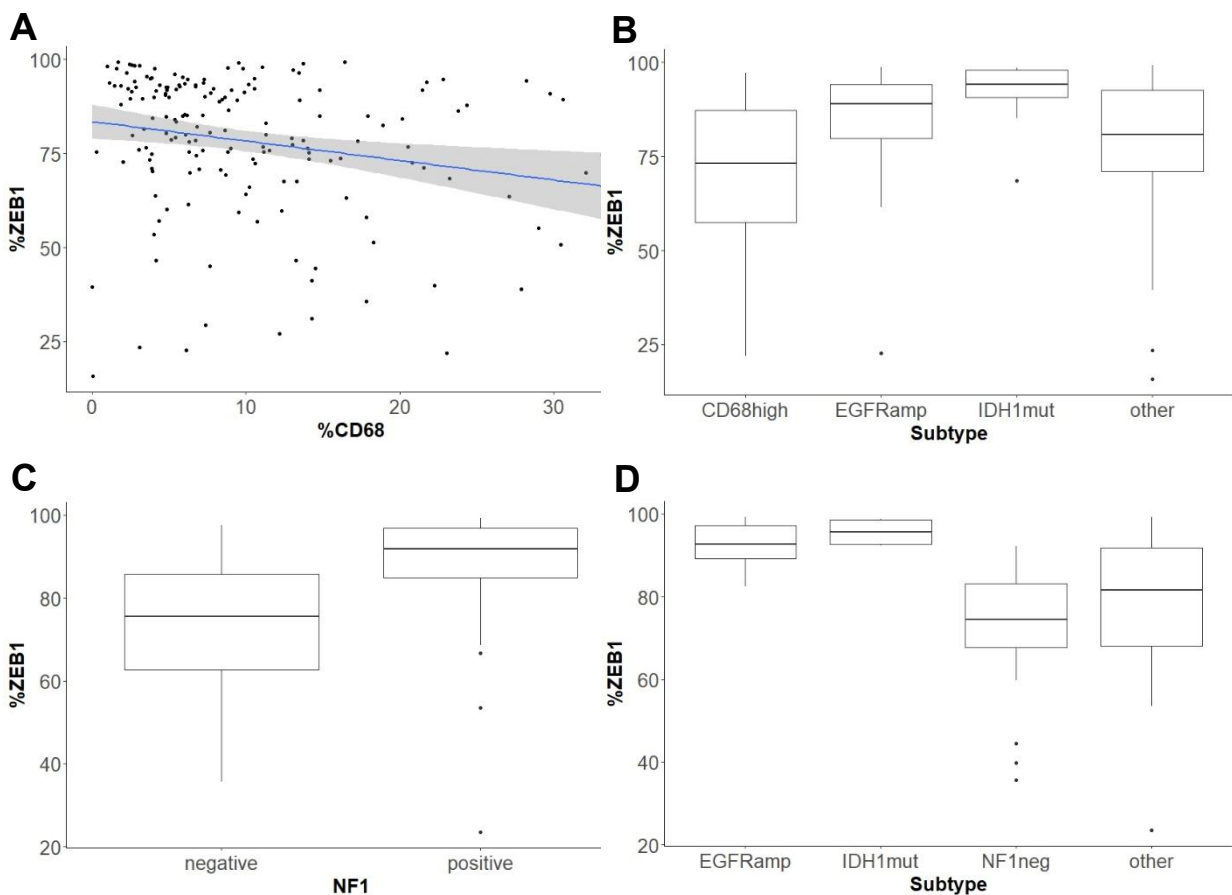


Diagramm 8: A: Streudiagramm mit Regressionsgerade des ZEB1 labeling index (%) in Abhängigkeit des CD68 labeling index (%) (n = 170,  $y = -0.5174x + 83.4969$ , adjustiertes  $R^2 = 0.03944$ ). B: Boxplot des ZEB1 labeling index in Bezug zu den Glioblastomsubgruppen unter Abspaltung einer Fraktion mit hohem CD68 labeling index ohne EGFR-Amplifikation und IDH1-Mutation (CD68high), Mediane: CD68high (n = 49): 73,4%, EGFRamp (n = 36): 89,6%, IDH1mut (n = 6): 94,2%, other (n = 41): 82,1%. C: Boxplot des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit zum NF1-Score. D: Boxplot des ZEB1 labeling index in Bezug zu den Glioblastomsubgruppen unter Abspaltung einer Fraktion mit negativem NF1-Score ohne EGFR-Amplifikation und IDH1-Mutation (NF1neg), Mediane: EGFRamp (n = 14): 92,7%, IDH1mut (n = 4): 95,6%, NF1neg (n = 20): 74,5%, other (n = 12): 81,6%

## 4.2.2 Klinische Parameter

Die multivariate Analyse liefert für das Geschlecht und das Alter keine signifikanten Assoziationen mit dem ZEB1 labeling index, der Anteil an ZEB1+ Zellen ist im Vergleich der Geschlechter im Median nahezu identisch (Diagramm 9A). Allenfalls zeigt sich ein Trend hin zu einem höheren ZEB1 labeling index mit steigendem Alter bei Erstdiagnose (Diagramm 9B). Auch zwischen der Gruppe erstdiagnostizierter Glioblastome und derjenigen mit Rezidiven zeigten sich nur äußerst geringe Unterschiede im ZEB1 labeling index (Diagramm 9C). Die Überlebenszeitanalyse im Kaplan-Meier-Verfahren lieferte keinen signifikanten Unterschied des Gesamtüberlebens (Log Rank - Test,  $p = 0.4$ ) in Abhängigkeit des ZEB1 labeling index zwischen der Gruppe mit hohem (>49%) und niedrigem (<49%) Anteil ZEB1+ Zellen (Diagramm 9D). Allenfalls lässt sich ein Trend zu einem höherem Gesamtüberleben mit höherem ZEB1 labeling index beobachten.

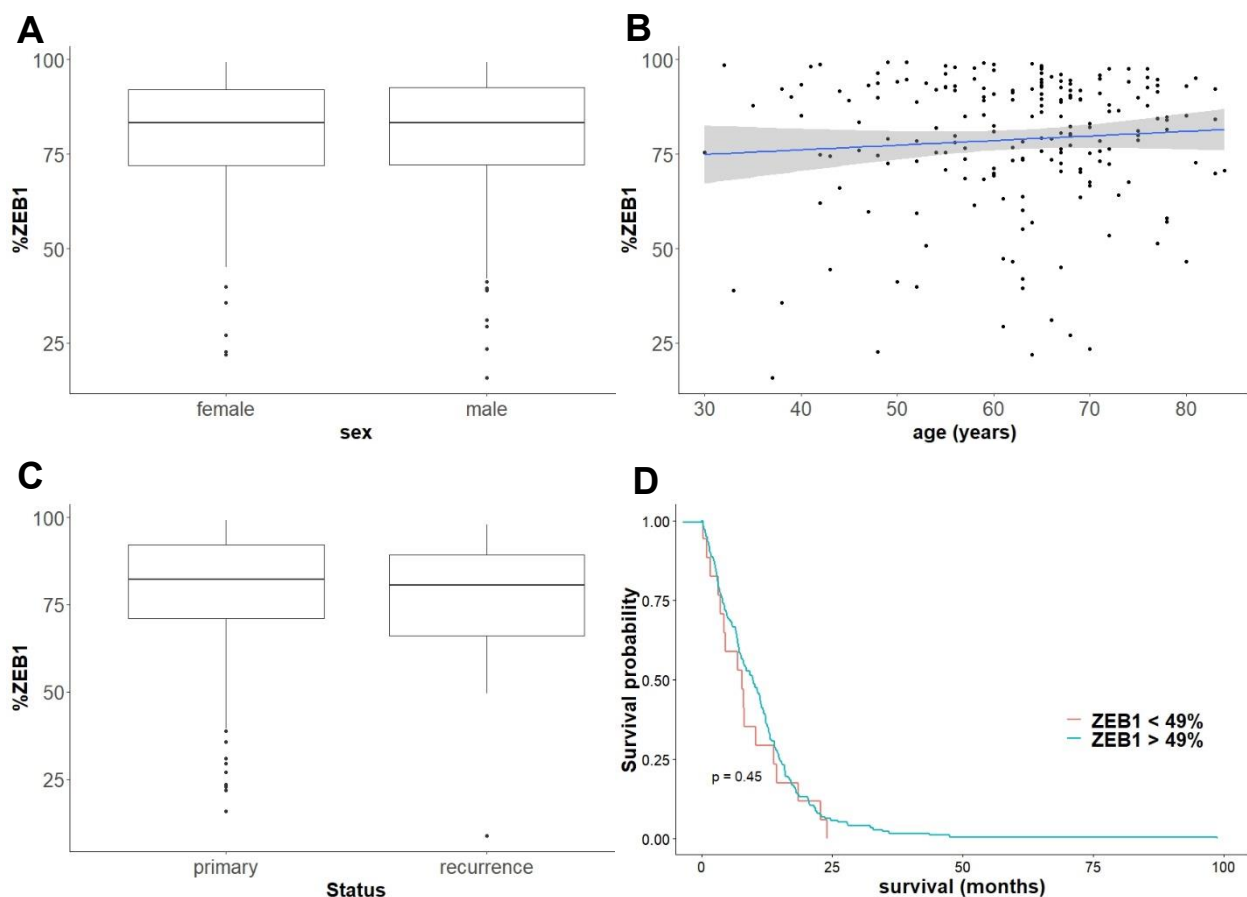


Diagramm 9: A: Boxplot des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit des Geschlechts (m: 83,1% ( $n = 116$ ); w: 83,2% ( $n = 80$ )). B: Streudiagramm mit Regressionsgerade des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit des Patientenalters bei Erstdiagnose ( $n = 196$ ,  $y = 0.1219x + 71,1979$ , adjustiertes  $R^2 = 0.0007695$ ). C: Boxplot des ZEB1 labeling index in Abhängigkeit des Progressionsstatus der Erkrankung (primary: Erstdiagnose, Median: 80,6%; recurrence: Rezidiv, Median: 82,3%). D: Kaplan-Meier-Plot für die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Gesamtüberlebens (Monate), ZEB1-Daten geteilt in Gruppen mit hohem (>49%) und niedrigem (<49%) ZEB1 labeling index, Mediane: >49%: 9,2 Monate; <49%: 7,5 Monate

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert die Grundlage für eine umfassende in situ-Charakterisierung von ZEB1 auf Einzelzellebene in einer großen Serie von humanen Glioblastomen in Bezug auf klinische und molekulare Eigenschaften mittels automatischer Quantifizierungsmethoden. Im Folgenden wird auf mögliche Fehlerquellen bei der Gewinnung des Probenmaterials und der Rohdaten eingegangen sowie eine methodische Beurteilung der Auswertungsalgorithmen vorgenommen, bevor am Schluss die tumorbiologischen Implikationen der Ergebnisse besprochen werden

### 5.1 Güte des Rohdatensatzes

#### 5.1.1 Selektionsbias bei der Probengewinnung

Die intratumorale Heterogenität der in die automatischen immunhistochemischen Quantifizierungen einbezogenen molekularen Parameter trifft auf eine Limitation im Prozess der Gewinnung von Gewebeproben. So siedeln ZEB1-exprimierende Tumorzellen einigen Studien zufolge vorrangig an der invasiven Tumorfront, die verwendeten Proben allerdings wurden gezielt aus dem Tumorkern entnommen.(139, 149) Aufgrund des im Rahmen der vorliegenden Arbeit nahezu ubiquitären Nachweises ZEB1-exprimierender Zellen auch im Tumorkern erscheint diese Einschränkung jedoch von nachrangiger Relevanz zu sein. Neuere Untersuchungen legen übereinstimmend den Schluss nah, dass ZEB1 exprimierende Zellen sowohl in der Tumorperipherie als auch im Tumorkern zu finden, also nicht auf die invasive Tumorfront beschränkt sind.(137) Diese Beobachtung passt zu der Feststellung, dass das durch die Bildung migratorischer Zellen begleitete Tumorstadium in Glioblastomen in verschiedenen Tumorregionen zugleich stattfindet und die ZEB1-Expression unter hypoxischen Bedingungen, die mit höherer Wahrscheinlichkeit im Tumorkern auftreten, gefördert wird.(140)

Ob darüber hinaus bei der Probenentnahme das Zielgebiet in adäquater Weise getroffen wurde, bleibt fraglich. Außerdem wurde die Verwendbarkeit einzelner Replikate dadurch beeinträchtigt, dass zum Beispiel hauptsächlich Nekrosen oder große Gefäßanschnitte den Großteil der Gewebemasse bestimmten. Die starke intratumorale Heterogenität der Glioblastome begrenzt die Aussagekraft von aus

Nadelbiopsien gewonnen Gewebeproben also im Allgemeinen und macht die angeschlossene immunhistochemische Analyse schwierig.

### 5.1.2 Mögliche Fehldiagnostik

Die histopathologische Diagnostik des vorliegenden Datensatzes erfolgte nach der WHO-Klassifikation von 2007.(3) Insofern sind 5 klinisch als primäre Glioblastome diagnostizierte Tumoren mit IDH1-Mutationen im Datensatz enthalten, die möglicherweise das Ergebnis schnell progredienter, unerkannter Vorläuferläsionen sind und daher als primäre Glioblastome fehlklassifiziert wurden. Gerade auch in Bezug auf die nach der neuen WHO-Klassifikation von 2016 eingeführten histopathologischen Glioblastomsubtypen wie Riesenzell- und epitheloide Glioblastome sowie die den Glioblastomen zugeordneten Gliosarkome wäre für eine weitere Untersuchung des Datensatzes seine Aktualisierung um neuere Erkenntnisse der Tumorbiologie durch eine Neudiagnostik erforderlich (Abbildung 13A). Des Weiteren enthält der Datensatz 3 sekundäre Glioblastome ohne IDH1-Mutationen, die zum einen aus als anaplastische Astrozytome fehldiagnostizierten primären Glioblastomen resultieren könnten oder durch andere IDH1-Mutationen (wie R132C, R132S, R132G, R132L) gekennzeichnet sind, die mit der immunhistochemischen, IDH1<sup>R132H</sup>-spezifischen Färbung nicht erfasst wurden.(1, 150) Neben einigen Tumoren, die durch sehr geringe oder fehlende Expression des Glioblastommarkers Nestin und ein im Vergleich sehr geringes Alter bei Erstdiagnose gekennzeichnet sind (Abbildung 13B und 13C), findet sich im Datensatz außerdem ein Tumor mit außergewöhnlich geringer ZEB1-Expression ohne EGFR-Amplifikation und IDH1-Mutation eines im Vergleich ebenfalls charakteristisch jüngeren Erwachsenen (Alter: 37 Jahre, Tumor 138), bei denen es sich möglicherweise um ein fehldiagnostizierte, pleomorphe Xanthoastrozytome handeln könnte, die bis zu 5% der Glioblastome ausmachen könnten. In der Fachliteratur tauchen Hinweise auf derartige mögliche Fehldiagnosen auf.(1, 151, 152)

## 5.2 Vorteile und Probleme der automatischen TMA-Prozessierung

Die Erstellung der vorliegenden Werkzeuge hat die Prozesszeit bereits massiv verringert und realisiert daher eine massive Beschleunigung des gesamten Arbeitsprozesses durch Beseitigung eines limitierenden Flaschenhalses in Form manueller Auswertungsverfahren zwischen Immunhistochemie und statistischer

Auswertung. Allein für die händische Auswertung der 20 Replikate umfassenden Zufallsstichprobe fiel eine Arbeitszeit von ca. 10 Stunden an, wohingegen die automatische Auswertung mit Hilfe der CellProfiler-Pipeline eine um den Faktor 55 geringere Arbeitszeit von 11 min beanspruchte. Darüber hinaus liefert diese Arbeit eine wiederverwendbare, anpassungsfähige und objektivierbare Methode zur Auswertung großer histo- oder zytologischer Bilddatensätze. Möglich wird dadurch ein effizienterer, qualifikationsgerechterer Personaleinsatz bei gleichzeitiger Kosteneffektivität, da entsprechende Analyseprozesse mit einigen Modifikationen auch an Standard-PCs durchführbar sind und eine Erweiterung der bestehenden Funktionalitäten jederzeit möglich ist. Zur weiteren Beschleunigung der automatischen Analysevorgänge sowie zur Entlastung der dazu verwendeten Hardware im Sinne einer Verhinderung von Beeinträchtigungen der regulären Arbeit könnten die bestehenden Tools um Funktionalitäten zur parallelen Prozessierung an mehreren Computern durch Batchprocessing erweitert werden. Limitierende Faktoren für die Skalierbarkeit

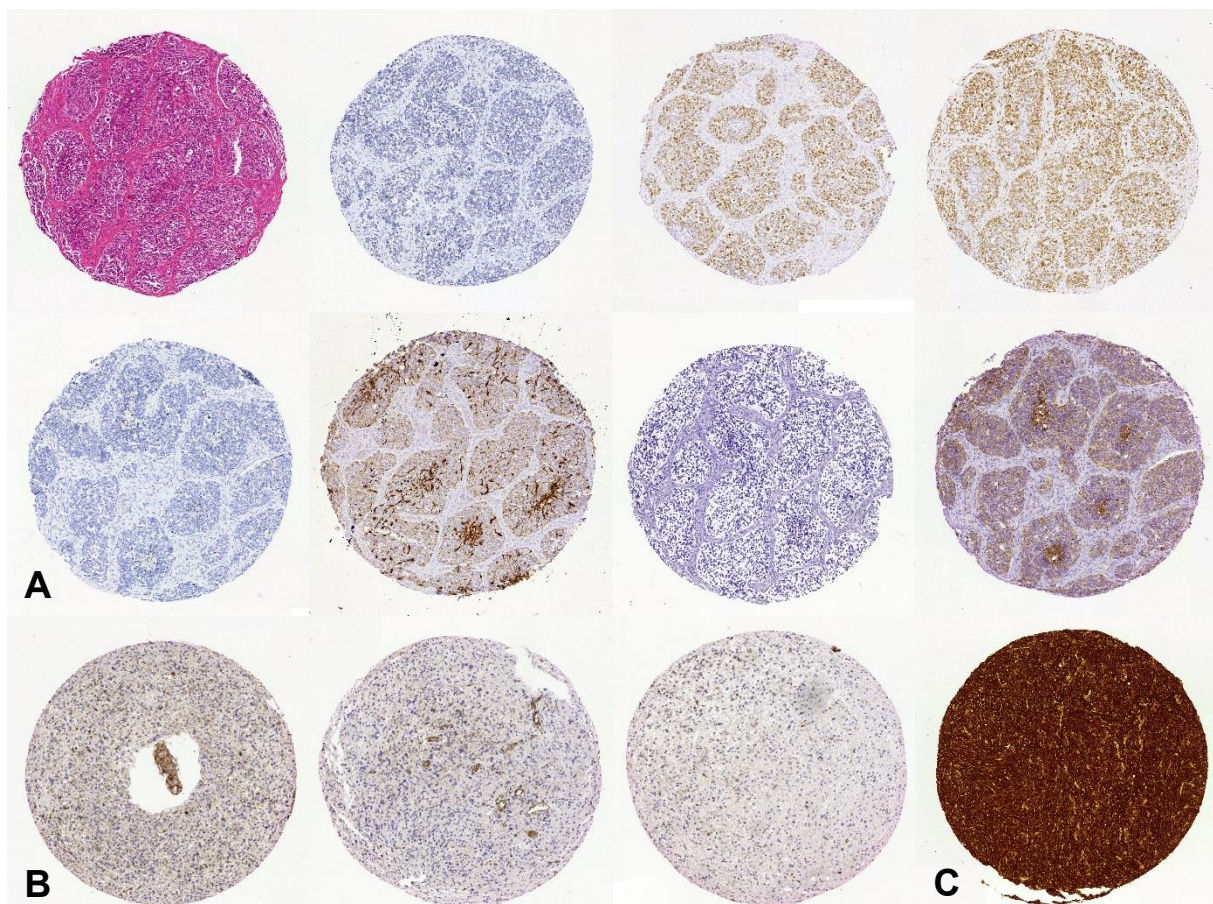


Abbildung 13: A: Spotmontage für Tumor 109, Probe 2 (von links nach rechts; Reihe 1: HE, Immunhistochemie für ZEB1, Ki67, p53; Reihe 2: Immunhistochemie für IDH1, GFAP, EGFR und CD44). Mehrschichtige epitheloide/adenoide Komponenten als mögliche histopathologische Indizien für Gliosarkome (nicht verifiziert). B: Spotmontage für Tumor 149, Proben 1-3, Alter bei Erstdiagnose: 32 Jahre, Überleben: 1940 Tage, Nestin-Immunostaining. Nahezu fehlende Expression des für Glioblastome als diagnostischer Marker verwendeten Nestins als Zeichen einer möglichen Fehldiagnose.(1) C: Kräftiges Nestin-Immunostaining eines primären GBM zum Vergleich (Tumor 17, Probe 3).



derartiger Prozesse sind dann der für die Bereitstellung von Rohdatensätzen notwendige Zeitaufwand bzgl. des Scanprozesses und der Datenkonvertierung sowie der Umfang der vor der Einspeisung der aufbereiteten Daten in CellProfiler notwendigen Präprozessierung wie ROI-Definition und ROI-Export. Zu diesem Zwecke wäre eine Integration der bestehenden ImageJ-Plugins und Skripte in ein Gesamtplugin und die Erstellung eines benutzerfreundlicheren Frontends sinnvoll.

### 5.2.1 Automatische Quantifizierung von ZEB1 mit CellProfiler

Mit Hilfe der Bland-Altman-Statistik konnte gezeigt werden, dass die CellProfiler-Methode eine für den praktischen Gebrauch gute Übereinstimmung mit dem Goldstandard in Form der manuellen Quantifizierung aufweist. Sie zeigte eine weitaus größere Übereinstimmung mit diesem als die bereits verfügbare ImmunoRatio-Methode für immunhistochemische Färbungen und kann sie daher suffizient ersetzen.

Die Zusammensetzung der Zufallsstichprobe kann die Beurteilung der Abhängigkeit der Messwertdifferenzen von der Messwertgröße beeinträchtigt haben, da die Variabilität der Stichprobe nicht der beobachteten Variabilität des Gesamtdatensatzes entspricht und überproportional viele niedrigpositive Tumoren enthielt. Womöglich liegt hierin eine Erklärung für die Zunahme der Messwertdifferenzen in kleinen Messbereichen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Stichprobengröße außerdem im Rahmen von Praktikabilitätserwägungen gewählt. Die vollständige händische Auswertung eines Replikats pro Tumor diente als Goldstandard. Zwangsläufig würde eine manuelle Auswertung des gesamten vorliegenden Datensatzes auf eine Schätzung des ZEB1 labeling index über die Auszählung repräsentativer Unterabschnitte eines jeden Replikats hinauslaufen, da eine Ausweitung der manuellen Quantifizierung auf die gesamte ROI aus Gründen des Zeit- und Arbeitsaufwandes unpraktikabel ist. Auch die CellProfiler-Methode liefert auf Grund des Selektionsbias in der Probengewinnung natürlich nur einen Schätzwert für jeden Tumor, bezieht aber jede als Zellkern identifizierte Struktur innerhalb der ROI eines Replikats mit ein. Außerdem gibt die CellProfiler-Methode zusätzliche Informationen auf Einzelzellebene in Form der Zellkernlokalisierung aus, die bei zukünftigen Messungen zur Untersuchung der intratumoralen Heterogenität nicht nur der ZEB1-Expression in Bezug auf Ko-Lokalisationen mit anderen Tumoreigenschaften von

Nutzen sein kann. Die vorliegende Arbeit demonstriert den Übereinstimmungsgrad der untersuchten Methoden und liefert zugleich eine Machbarkeitsstudie bezüglich der Transformation der Quantifizierung auf die Einzelzellebene (CellProfiler) bei gleichzeitig größerer Übereinstimmung mit einem manuellen Goldstandard als bereits etablierte automatische Auswertungsalgorithmen (ImmunoRatio). Für einen suffizienten Messmethodenvergleich, der nicht auf die Beurteilung der Überlegenheit einer Methode bezüglich der Übereinstimmung zweier Messmethoden mit einem Goldstandard beschränkt ist, wäre in einer weiterführenden Arbeit jedoch anzustreben, akzeptable Übereinstimmungsgrenzen und die gewünschte Power der statistischen Prozedur im Vorhinein zu definieren sowie die zur Erreichung dieser vordefinierten statistischen Power notwendige Stichprobengröße zu kalkulieren.(153) Zur Reduzierung subjektiver Beobachtungsunterschiede und zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit sollten für den manuellen Goldstandard des weiteren zwei Erhebungen durch unterschiedliche Untersucher durchgeführt werden.(147) Die Aussagekraft des erfolgten Methodenvergleichs erfährt insofern eine Einschränkung, als dass die CellProfiler-Methode als ein überlegeneres Surrogat der manuellen Quantifizierung im Vergleich zu ImmunoRatio gelten kann und gleichzeitig aber zusätzliche Rauminformationen liefert, die für weitere Untersuchungen nützlich sein können (Abbildung 14A und 14B). Methodische Herausforderungen entstanden durch

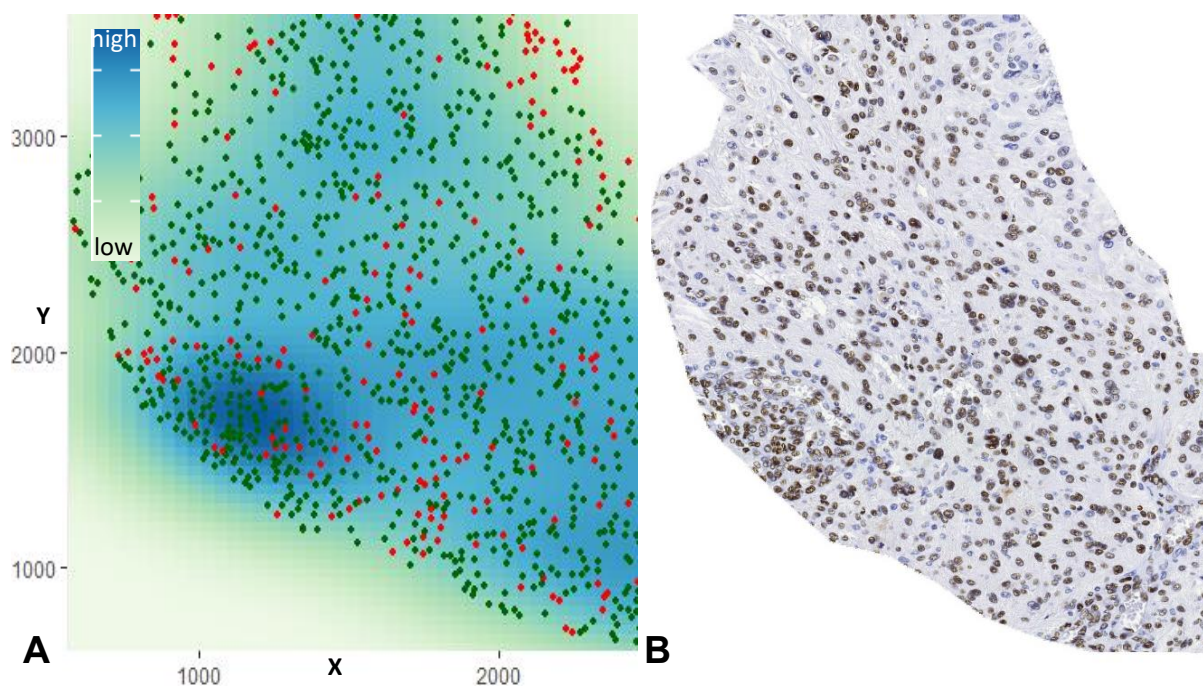


Abbildung 14: A: Density-Plot für ZEB1+ Nuclei (grün), ZEB1- Nuclei (rot); Dichte ZEB1+ Zellen niedrig:hoch = gelb:blau. B: native Aufnahme des korrespondierenden Gewebeabschnitts.

die Variation der Intensität der immunhistochemischen Färbungen zwischen den verschiedenen TMAs und die ausgeprägte nukleäre Pleomorphie der Tumorzellen. Die gewählten morphologischen und Thresholdingparameter sind zwangsläufig ein Kompromiss, der die angesprochenen Unterschiede in Färbungsintensität und Zellkernmorphologie nur beschränkt berücksichtigt und so zu Lasten der exakten Erkennung von Nuclei im Allgemeinen und ZEB1<sup>+</sup> Nuclei im Speziellen ausfällt. Infolgedessen blieben einige ZEB1<sup>+</sup> Nuclei in TMAs mit schwächerer DAB-Färbung tendenziell unerkant bzw. wurden Fusionskerne in Riesenzelltumoren fälschlicherweise in Einzelobjekte fragmentiert. Beides bewirkt eine Verzerrung des ZEB1 labeling index. Eine Unterteilung großer Datensätze in kleinere Analyseeinheiten, zum Beispiel nach TMAs oder Tumorentität, mit jeweiliger Anpassung des Analyseinstruments an die variierende Beschaffenheit der Präparate könnte hilfreich bei der Präzisierung zukünftiger Messungen sein. Denkbar wäre zum Beispiel eine Kalibrierung der Kanaltrennung für jeden TMA mittels einfach gefärbter DAB- und Hämatoxylinkontrollen oder die Anpassung der auf die nukleäre Morphologie bezogenen Parameter für jede Tumorentität. Dies setzt eine Diagnostik der histopathologischen Glioblastomsubtypen voraus. Im vorliegenden Datensatz fand diesbezüglich keine Unterscheidung statt. Darüber hinaus misst die CellProfiler-Pipeline alle DAB<sup>+</sup> Nuclei und kann nicht zwischen positiven Tumorzellen und positiven Zellen der Tumormikroumgebung (vornehmlich Endothelzellen, Mikroglia/Gewebsmakrophagen), sowie zwischen kernförmigen, ZEB1<sup>-</sup> Strukturen (vor allem residuelle Erythrozyten in Gefäßanschnitten) und echten Nuclei unterscheiden (Abbildung 15A und 15B).

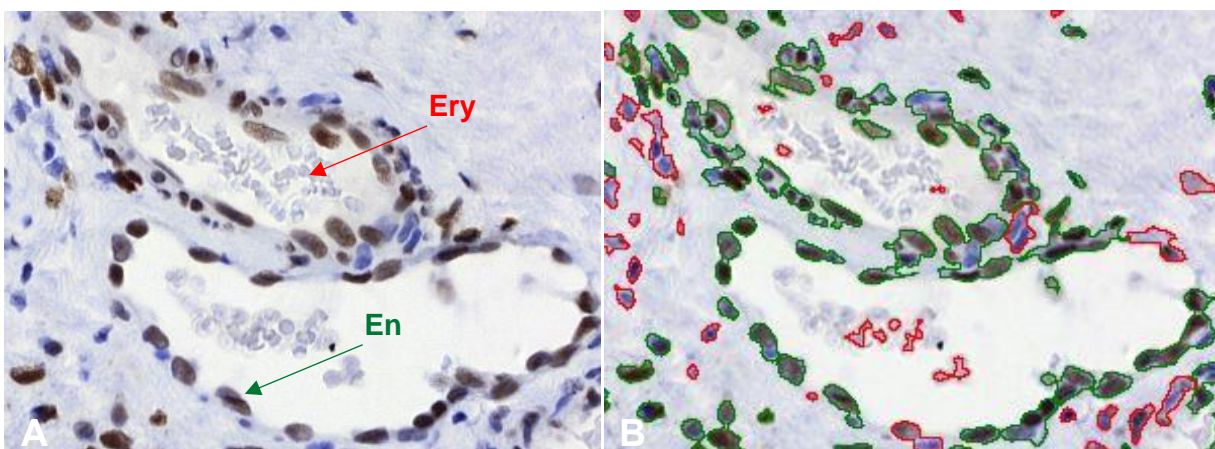


Abbildung 15: A: ZEB1<sup>+</sup> Endothelzellen und im Gefäßanschnitt verbliebene Erythrozyten. B: Resultat der Objekterkennung durch CellProfiler; kernförmige ZEB1<sup>-</sup> Strukturen (Erythrozyten) und ZEB1<sup>+</sup> Zellen der Tumormikroumgebung (Endothelzellen) wirken verzerrend auf den ZEB1 labeling index.

Zusätzlich wiesen die einzelnen Replikate eine große Variationsbreite bezüglich ihrer Gesamtfläche auf. Bei in Folge des Präparations- und Färbungsprozesses artifiziell besonders kleinen Gewebeabschnitten steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die resultierende ROI keinen repräsentativen Tumorausschnitt enthält. Eine Gewichtung der Ergebnisse entsprechend der ROI-Fläche oder eine im Vorhinein zu definierende Mindestfläche könnte zur Minimierung der aus den Flächenunterschieden resultierenden Verzerrung beitragen.

### 5.2.2 Automatische Bestimmung des EGFR labeling index

Die DAB-Färbung leidet gerade bei hohen Färbungsintensitäten unter einer nicht-linearen Veränderung seiner ohnehin recht unspezifischen spektralen Eigenschaften. Da die Beziehung zwischen der DAB-Konzentration und seinem Absorptionsverhalten nicht dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt, kann der erstellte EGFR labeling index bestenfalls als semiquantitative Messung gelten, die gerade bei hohen Färbungsintensitäten in Tumoren mit hoher EGFR-Expression verzerrte Daten liefert.(154) Für automatische Quantifizierungen der Proteinexpression sind DAB-Färbungen daher nur eingeschränkt brauchbar und bevorzugt durch ein Chromogen mit geeigneteren optischen Eigenschaften oder quantitative Genexpressionsanalysen oder Protein-Microarrays zu ersetzen.

## 5.3 Intertumorale Heterogenität der ZEB1-Expression in Glioblastomen

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich eine robuste ZEB1-Expression in den untersuchten Glioblastomen über alle anhand von Schlüsselalterationen identifizierten transkriptionalen Subtypen hinweg. Es konnte allerdings eine signifikante Korrelation des ZEB1 labeling index mit den genetischen Merkmalen des klassischen und (G-CIMP<sup>+</sup>) proneuralen Subtypen - des EGFR-Amplifikations- und IDH1-Mutationsstatus - nachgewiesen werden, die jeweils mit einem höheren ZEB1 labeling index assoziiert sind. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen, die eine Korrelation zwischen der ZEB1-Expression und der EGFR-Aktivierung bzw. eine Induktion der ZEB1-Expression durch EGF-Signaling zeigten.(139, 155) Der hier beobachtete Zusammenhang zwischen IDH1-Mutationsstatus und ZEB1-Expression wurde ebenfalls bereits für IDH1-mutierte niedriggradige Gliome beschrieben.(143) In älteren Publikationen wird eine ZEB1-Expressionsrate in Glioblastomen von 40-45%

angegeben.(139) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten allerdings darauf hin, dass Glioblastome im Allgemeinen ZEB1<sup>+</sup> Zellen enthalten. Wie hoch der Anteil an ZEB1<sup>+</sup> Tumorzellen allerdings ist, lässt sich am vorliegenden Datensatz nicht exakt beurteilen, da ZEB1<sup>+</sup> Zellen der Tumormikroumgebung wie reaktive Astrozyten und Endothelzellen zu dieser Fraktion beitragen.(144) Die Ermittlung und Verwendung einer Baseline für den Anteil an ZEB1<sup>+</sup> Zellen in physiologischem Hirngewebe wäre hier für zukünftige Untersuchungen wünschenswert. Darüber hinaus scheint die Immuninfiltration in Anbetracht der negativen Korrelation zwischen dem CD68 und ZEB1 labeling index einen Beitrag zur intertumoralen Heterogenität der ZEB1-Expression zu leisten und für einen Teil der Unterschiede zwischen den Tumorsubgruppen verantwortlich zu sein. Eine sich wechselseitig ausschließende Expression des Immunzellmarkers CD68 und ZEB1 sowie eine robuste ZEB1-Expression in Glioblastomzellen über alle Subtypen hinweg wurde bereits an anderer Stelle beschrieben.(144) CD68<sup>+</sup> Zellen wie Mikroglia und Makrophagen stellen außerdem die häufigste Immunzellpopulation in Glioblastomen und können bis zu 30% der Zellpopulation in Gliomen ausmachen, so dass das Ausmaß der Immuninfiltration sich durch ihren Beitrag zur ZEB1<sup>-</sup> Zellpopulation möglicherweise auch durchgehend auf den ZEB1 labeling index in Glioblastomen auswirkt.(144, 156)

Die Abhängigkeit des ZEB1 labeling index vom Ausmaß der Immuninfiltration hat möglicherweise auch Auswirkungen auf die Interpretation des Zusammenhangs zwischen IDH1-Mutationsstatus und dem Anteil an ZEB1<sup>+</sup> Zellen: IDH1-Mutationen erzeugen einen immunsuppressiven Phänotyp mit verringerter Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen.(157-159) Insofern ist der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte höhere ZEB1 labeling index in IDH1-mutierten Glioblastomen im Speziellen und IDH1-mutierten Gliomen im Allgemeinen durch fehlende Berücksichtigung der Immuninfiltration als Störfaktor bei der Beurteilung des Anteils ZEB1<sup>+</sup> Zellen möglicherweise infrage zu stellen.(143) Glioblastome des mesenchymalen Subtyps weisen dagegen eine ausgeprägtere Immuninfiltration als die anderen transkriptionalen Subtypen und eine Assoziation zu einer erhöhten CD68-Expression auf.(8, 160) Insofern dürfte der Einfluss der Immuninfiltration auf den ZEB1 labeling index in diesem Subtyp am größten sein. Die mit Hilfe des NF1-Scores als Surrogatparameter des mesenchymalen Subtyps identifizierte Gruppe von Glioblastomen spiegelte dies mit dem im Median geringsten ZEB1 labeling index im

Vergleich der Tumorsubgruppen wider. Ob der NF1-Score unabhängig vom EGFR-Amplifikations- und IDH1-Mutationsstatus ein Prädiktor für einen niedrigeren ZEB1 labeling index ist, kann anhand des vorliegenden Datensatzes allerdings nicht beurteilt werden. Der NF1-Datensatz ist durch eine geringe Stichprobengröße gekennzeichnet und es fanden sich darin NF1<sup>-</sup> Tumoren bei gleichzeitiger EGFR-Amplifikation. Hier zeigen sich aus der Verwendung von Surrogatparametern zur Identifizierung der transkriptionalen Subtypen resultierende Probleme, die eine suffiziente Subgruppentrennung beeinträchtigen. Unter Einbeziehung des NF1-Scores in das verwendete lineare gemischte Modell zeigten sich keine der genannten Korrelationen mehr. Auf Grund der geringen Stichprobengröße des NF1-Datensatzes und den methodischen Problemen bei der Subtypenidentifizierung wurde auf eine Interpretation dieser Daten verzichtet. Der hier dokumentierte negative Zusammenhang zwischen NF1-Expression und ZEB1 labeling index deckt sich allerdings mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen, die ZEB1<sup>-</sup> Tumoren gehäuft in der durch NF1-Deletionen gekennzeichneten Tumorphilung fanden, die für Glioblastome des mesenchymalen Subtyps typisch sind und mit einer verringerten NF1-Expression einhergehen.(139)

In Übertragung von Modellen der Tumorprogression außerhalb des zentralen Nervensystems auf gliale Tumoren wäre allerdings ein erhöhter ZEB1 labeling index für den mesenchymalen Subtyp zu erwarten gewesen, da eine Plastizität hin zu diesem transkriptionalen Subtyp im Allgemeinen mit einer Progression der Erkrankung assoziiert wird und ZEB1 außerhalb des zentralen Nervensystems als Marker der EMT im Rahmen der Tumorprogression gilt.(45, 124) Die ubiquitäre Expression von ZEB1 in humanen Glioblastomen stellt allerdings das Konzept von ZEB1 als Marker EMT-ähnlicher Prozesse im Rahmen der Tumorprogression in glialen Tumoren infrage und lässt eine umfassendere Rolle von ZEB1 in ihrer Tumorbilogie vermuten, die nicht auf einen EMT-ähnlichen Kontext beschränkt ist. Die vorliegenden Ergebnisse werden unterstützt durch neuere Untersuchungen, die ZEB1 eine universelle Rolle im Netzwerk mit OLIG2 und SOX2 bei der Tumorentstehung, der Vermittlung von Stammzelleigenschaften und der Proliferation von Tumorzellen in Glioblastomen - unabhängig von ihren genetischen Schlüsselalterationen - zuweisen.(161) Im Allgemeinen deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass ZEB1 in der Tumorbilogie eine über die Einbindung in EMT-ähnliche Prozesse hinausgehende, komplexere Funktion zukommt. Im Gegensatz zu der verbreiteten Vorstellung, dass EMT-

Induktoren wie ZEB1 als transkriptionale Repressoren fungieren, konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass ZEB1 eine duale Rolle sowohl bei der Aktivierung als auch der Repression der Genexpression zukommt, die aus verschiedenen Rekrutierungsmodalitäten resultiert.(125, 137) Auch die in der Vergangenheit vermutete Betonung der ZEB1-Expression auf die invasive Region der Tumorperipherie lässt sich in Anbetracht der Auswertung des vorliegenden Datensatzes, der auf Tumorproben mit Fokus auf den Tumorkern besteht, nicht weiter halten.(137, 139) Viel mehr passen die Beobachtungen zu der Annahme, dass das Tumorwachstum in GBM in Begleitung von Zellmigration in verschiedenen Tumorregionen zugleich, im Speziellen um hypoxische oder nekrotische Areale, stattfindet und ZEB1 dabei generell, unabhängig vom transkriptionalen Subtyp eine konstitutive Rolle spielt.(140, 149) Es ist allerdings möglich, dass die ZEB1-Expression in Folge seiner Einbindung in eine Vielzahl hochkomplexer molekularer Kontexte wie das EGF-, Wnt-, TGF- $\beta$ - oder NF- $\kappa$ B-Signaling in den verschiedenen Subtypen durch unterschiedliche Signalwege aktiviert wird. (130, 136, 141, 155) Das Konzept eines EMT-ähnlichen Modells der Tumorprogression in Glioblastomen scheint somit allerdings grundsätzlich in Frage gestellt.

#### 5.4 Der prognostische Wert von ZEB1

In Bezug auf den prognostischen Wert von ZEB1 in glialen Tumoren ist die Evidenz weiterhin widersprüchlich. Eine in früheren Untersuchungen gezeigte negative Korrelation zwischen Gesamtüberleben und ZEB1-Expression konnte anhand des vorliegenden Datensatzes nicht reproduziert werden.(139) Neuere Untersuchungen zeigen sowohl einen Überlebensnachteil für Patienten mit ZEB1-Deletionen, deuten aber auch einen Überlebensvorteil durch verminderte ZEB1-Expression in Folge verringerter Invasion und gehemmten Tumorwachstums in Gliomen an.(162-164) Vereinzelt Hinweise auf höhere Anteile ZEB1<sup>+</sup> Zellen in rezidivierenden Gliomen konnten im Rahmen dieser Arbeit für Glioblastome ebenfalls nicht bestätigt werden.(165) Ob ZEB1 als Prädiktor für das Gesamtüberleben dienen kann, erscheint daher fraglich. Nichtsdestotrotz könnte ZEB1 als Markermolekül für invasive Tumorzellen und daher als potenzielles therapeutisches Ziel interessant sein. Angesichts der gegensätzlichen Datenlage gerade in Bezug auf gliale Tumoren sind allerdings weiterführende Studien zu ZEB1 notwendig, die die Rolle von ZEB1 in der Tumorbiologie primärer Hirntumore mechanistisch spezifizieren.





## 6 Literaturverzeichnis

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, International Agency for Research on Cancer, Deutsches Krebsforschungszentrum. World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. 1st ed. Lyon, International Agency For Research on Cancer. 2016.
2. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-Oncol.* 2012;14.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
5. Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med.* 2008;359(5):492-507.
6. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2(9):494-503.
7. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1445-53.
8. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriele S, Winckler W, Jakkula L, Gupta S, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, The Cancer Genome Atlas Research Network. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17(1):98-110.
9. Nounshmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RGW, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K, The Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype That Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell.* 2010;17(5):510-22.
10. Scherer HJ. Cerebral Astrocytomas and Their Derivatives. *Am J Cancer.* 1940;11(2):159-98.
11. Ortega A, Nuño M, Walia S, Mukherjee D, Black KL, Patil CG. Treatment and survival of patients harboring histological variants of glioblastoma. *J Clin Neurosci.* 2014;21(10):1709–13.
12. Kozak KR, Moody JS. Giant cell glioblastoma: A glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro Oncol.* 2009;11(6):833-41.

13. Kleinschmidt-DeMasters BK, Aisner DL, Birks DK, Foreman NK. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(5):685-98.
14. Beaumont TL, Kupsy WJ, Barger GR, Sloan AE. Gliosarcoma with multiple extracranial metastases: case report and review of the literature. *J Neurooncol*. 2007;83(1):39-46.
15. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*. 2008;116(6):597-602.
16. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(6):479-89.
17. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6002-7.
18. Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Felix CA, Kun LE, Walter AW, Evans WE, Pui CH. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet*. 1999;354(9172):34-9.
19. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(20):1544-50.
20. Wrensch M, Wiencke JK, Wiemels J, Miike R, Patoka J, Moghadassi M, McMillan A, Kelsey KT, Aldape K, Lamborn KR, Parsa AT, Sison JD, Prados MD. Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival. *Cancer Res*. 2006;66(8):4531-41.
21. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-Oncol*. 2014;16(7):896-913.
22. Noble M, Wren D, Wolswijk G. The O-2A(adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system. *Semin Cell Biol*. 1992;3(6):413-22.
23. Mayer-Proschel M, Kalyani A, Mujtaba T, Rao M. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron*. 1997;19(4):773-85.
24. Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, Patel AP, Wakimoto H, Rabkin SD, Riggi N, Chi AS, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Rivera MN, Rossetti N, Kasif S, Beik S, Kadri S, Tirosh I, Wortman I, Shalek AK, Rozenblatt-Rosen O, Regev A, Louis DN, Bernstein BE. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*. 2014;157(3):580-94.
25. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64(19):7011-21.
26. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401.

27. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.
28. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth following chemotherapy. *Nature*. 2012;488(7412):522-6.
29. Lan X, Jörg DJ, Cavalli FMG, Richards LM, Nguyen LV, Vanner RJ, Guilhamon P, Lee L, Kushida MM, Pellacani D, Park NI, Coutinho FJ, Whetstone H, Selvadurai HJ, Che C, Luu B, Carles A, Moksa M, Rastegar N, Head R, Dolma S, Prinos P, Cusimano MD, Das S, Bernstein M, Arrowsmith CH, Mungall AJ, Moore RA, Ma Y, Gallo M, Lupien M, Pugh TJ, Taylor MD, Hirst M, Eaves CJ, Simons BD, Dirks PB. Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature*. 2017;549(7671):227-32.
30. Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*. 1997;3(4):523-30.
31. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF Receptor and p53 Mutations Are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas. *Brain Pathology*. 1996;6(3):217-23.
32. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB. IDH Mutation Impairs Histone Demethylation and Results in a Block to Cell Differentiation. *Nature*. 2012;483(7390):474-8.
33. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-73.
34. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz Jr. LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12.
35. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhir R, Bernard B, Wu C-J, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L, TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77.

36. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):2965-9.
37. Guillamo J-S, de Boüard S, Valable S, Marteau L, Leuraud P, Marie Y, Poupon M-F, Parienti J-J, Raymond E, Peschanski M. Molecular mechanisms underlying effects of epidermal growth factor receptor inhibition on invasion, proliferation, and angiogenesis in experimental glioma. *Clinical Cancer Res*. 2009;15(11):3697-704.
38. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. A Mutant Epidermal Growth Factor Receptor Common in Human Glioma Confers Enhanced Tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(16):7727-31.
39. Talasila KM, Soentgerath A, Euskirchen P, Rosland GV, Wang J, Huszthy PC, Prestegarden L, Skaftnesmo KO, Sakariassen PØ, Eskilsson E, Stieber D, Keunen O, Brekka N, Moen I, Nigro JM, Vintermyr OK, Lund-Johansen M, Niclou S, Mørk SJ, Enger PO, Bjerkvig R, Miletic H. EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathol*. 2013;125(5):683–98.
40. Sakariassen PØ, Prestegarden L, Wang J, Skaftnesmo K-O, Mahesparan R, Molthoff C, Sminia P, Sundlisaeter E, Misra A, Tysnes BB, Chekenya M, Peters H, Lende G, Kalland KH, Øyan AM, Petersen K, Jonassen I, van der Kogel A, Feuerstein BG, Terzis AJA, Bjerkvig R, Enger PØ. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16466-71.
41. Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):275-86.
42. Singh D, Chan JM, Zoppoli P, Niola F, Sullivan R, Castano A, Liu EM, Reichel J, Porrati P, Pellegatta S, Qiu K, Gao Z, Ceccarelli M, Riccardi R, Brat DJ, Guha A, Aldape K, Golfinos JG, Zagzag D, Mikkelsen T, Finocchiaro G, Lasorella A, Rabadan R, Iavarone A. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*. 2012;337(6099):1231-5.
43. Li Y, Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y, Xia S, Trageser D, Guerrero-Cázares H, Eberhart CG, Quiñones-Hinojosa A, Scheffler B, Laterra J. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(24):9951-6.
44. Project ICGCPT. Recurrent MET fusion genes represent a drug target in pediatric glioblastoma. *Nat med*. 2016;22(11):1314-20.
45. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157-73.
46. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998;280(5369):1614-7.
47. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay J-Y, Wolf J, Raje NS, Diamond EL, Hollebecque A, Gervais R, Elez-Fernandez ME, Italiano A, Hofheinz R-D, Hidalgo M, Chan E, Schuler M, Lasserre SF, Makrutzki M, Sirzen F, Veronese ML,

Tabernero J, Baselga J. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers With BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med*. 2015;373(8):726-36.

48. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Sileni VC, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I, Gogas H, Mandalá M, Haanen JBAG, Lebbé C, Mackiewicz A, Rutkowski P, Nathan PD, Ribas A, Davies MA, Flaherty KT, Burgess P, Tan M, Gasal E, Voi M, Schadendorf D, Long GV. Five-Year Outcomes With Dabrafenib Plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(7):626-36.

49. Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang H-JS, Cavenee WK, Cheng S-Y. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol*. 2003;162(4):1083-93.

50. Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, Reid H, Roberts IS. Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. *Histopathology*. 2001;39(4):409-15.

51. Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, Chio IIC, Cairns RA, McCracken S, Wakeham A, Haight J, Ten AY, Snow B, Ueda T, Inoue S, Yamamoto K, Ko M, Rao A, Yen KE, Su SM, Mak TW. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes Dev*. 2012;26(18):2038-49.

52. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 2007;11(1):69-82.

53. Roth P, Silginer M, Goodman SL, Hasenbach K, Thies S, Maurer G, Schraml P, Tabatabai G, Moch H, Tritschler I, Weller M. Integrin control of the transforming growth factor- $\beta$  pathway in glioblastoma. *Brain*. 2013;136(Pt 2):564-75.

54. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavenee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature*. 1992;355(6363):846-7.

55. Böglér O, Huang HJ, Cavenee WK. Loss of wild-type p53 bestows a growth advantage on primary cortical astrocytes and facilitates their in vitro transformation. *Cancer Res*. 1995;55(13):2746-51.

56. Adams S, Teo C, McDonald KL, Zinger A, Bustamante S, Lim CK, Sundaram G, Braid N, Brew BJ, Guillemin GJ. Involvement of the kynurenine pathway in human glioma pathophysiology. *PLoS One*. 2014;9(11):e112945.

57. Sturm D, Bender S, Jones DTW, Lichter P, Grill J, Becher O, Hawkins C, Majewski J, Jones C, Costello JF, Iavarone A, Aldape K, Brennan CW, Jabado N, Pfister SM. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):92-107.

58. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 Mutations Produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274).

59. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO,

- Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003.
60. Lovejoy CA, Li W, Reisenweber S, Thongthip S, Bruno J, de Lange T, De S, Petrini JHJ, Sung PA, Jasin M, Rosenbluh J, Zwang Y, Weir BA, Hatton C, Ivanova E, Macconnaill L, Hanna M, Hahn WC, Lue NF, Reddel RR, Jiao Y, Kinzler K, Vogelstein B, Papadopoulos N, Meeker AK, ALT Starr Cancer Consortium. Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS Genet*. 2012;8(7):e1002772.
61. Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg*. 1976;44(4):442-8.
62. Vecht CJ, Kerkhof M, Duran-Pena A. Seizure prognosis in brain tumors: new insights and evidence-based management. *Oncologist*. 2014;19(7):751-9.
63. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol*. 2014;16(Suppl 4): iv1–iv63.
64. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liau LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD, Prados MD, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol*. 2011;29(34):4482-90.
65. Sullivan JP, Nahed BV, Madden MW, Oliveira SM, Springer S, Bhore D, Chi AS, Wakimoto H, Rothenberg SM, Sequist LV, Kapur R, Shah K, Iafrate AJ, Curry WT, Loeffler JS, Batchelor TT, Louis DN, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov*. 2014;4(11):1299-309.
66. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Patre PLD, Franceschi S, Ohgaki H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(9):846-54.
67. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn J-C, Pentheroudakis G, ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii93-101.
68. Nabors LB, Portnow J, Ammirati M, Baehring J, Brem H, Brown P, Butowski N, Chamberlain MC, Fenstermaker RA, Friedman A, Gilbert MR, Hattangadi-Gluth J, Holdhoff M, Junck L, Kaley T, Lawson R, Loeffler JS, Lovely MP, Moots PL, Mrugala MM, Newton HB, Parney I, Raizer JJ, Recht L, Shonka N, Shrieve DC, Sills Jr AK, Swinnen LJ, Tran D, Tran N, Vrionis FD, Weiss S, Wen PY, McMillian N, Engh AM. Central Nervous System Cancers, Version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(10):1191-202.
69. Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):997-1003.
70. Eljamel S. 5-ALA Fluorescence Image Guided Resection of Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis of the Literature. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):10443-56.

71. Esquenazi Y, Friedman E, Liu Z, Zhu J-J, Hsu S, Tandon N. The Survival Advantage of "Supratotal" Resection of Glioblastoma Using Selective Cortical Mapping and the Subpial Technique. *Neurosurgery*. 2017;81(2):275-88.
72. Leibel SA, Sheline GE. Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg*. 1987;66(1):1-22.
73. Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley Jr MS, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey Jr J, Strike TA. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *J Neurosurg*. 1989;1(1):1-9.
74. Jakobsen JN, Urup T, Grunnet K, Toft A, Johansen MD, Poulsen SH, Christensen IJ, Muhic A, Poulsen HS. Toxicity and efficacy of lomustine and bevacizumab in recurrent glioblastoma patients. *J Neurooncol*. 2018;137(2):439-46.
75. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WKA, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(28):4733-40.
76. Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1457-72.
77. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*. 2014;5(64).
78. Dias-Santagata D, Lam Q, Vernovsky K, Vena N, Lennerz JK, Borger DR, Batchelor TT, Ligon KL, Iafrate AJ, Ligon AH, Louis DN, Santagata S. BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One*. 2011;6(3):e17948.
79. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA, Louis DN, Iafrate AJ. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2011;20(6):810-7.
80. Sandmann T, Bourgon R, Garcia J, Li C, Cloughesy T, Chinot OL, Wick W, Nishikawa R, Mason W, Henriksson R, Saran F, Lai A, Moore N, Kharbanda S, Peale F, Hegde P, Abrey LE, Phillips HS, Bais C. Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(25):2735-44.
81. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong Y-K, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujcic D, Steinbach JP, Wick W, Tarnawski R, Nam D-H, Hau P, Weyerbrock A, Taphoorn MJB, Shen C-C, Rao N, Thurzo L, Herrlinger U, Gupta T, Kortmann R-D, Adamska K, McBain C, Brandes AA, Tonn JC, Schnell O, Wiegel T, Kim C-Y, Nabors LB, Reardon DA, van den Bent MJ, Hicking C, Markivskyy A, Picard M, Weller M, European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Canadian Brain Tumor Consortium, CENTRIC study team. 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. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1100-8.

82. Kowalski-Chauvel A, Gouaze-Andersson V, Baricault L, Martin E, Delmas C, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E, Seva C. Alpha6-Integrin Regulates FGFR1 Expression through the ZEB1/YAP1 Transcription Complex in Glioblastoma Stem Cells Resulting in Enhanced Proliferation and Stemness. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):406.
83. Costa B, Bendinelli S, Gabelloni P, Da Pozzo E, Daniele S, Scatena F, Vanacore R, Campiglia P, Bertamino A, Gomez-Monterrey I, Sorriento D, Del Giudice C, Iaccarino G, Novellino E, Martini C. Human glioblastoma multiforme: p53 reactivation by a novel MDM2 inhibitor. *PLoS One*. 2013;8(8):e72281.
84. Michaud K, Solomon DA, Oermann E, Kim J-S, Zhong W-Z, Prados MD, Ozawa T, James CD, Waldman T. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res*. 2010;70(8):3228-38.
85. Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:689171.
86. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A, Dieckmann K, Filipits M, Brandstetter A, Weller M, Kurscheid S, Hegi ME, Zielinski CC, Marosi C, Hainfellner JA, Preusser M, Wick W. Programmed Death Ligand 1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2015;17(8):1064-75.
87. Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, Huang N, Kong L-Y, Gabrusiewicz K, Ling X, Zhou S, Ivan C, Chen JQ, Burks JK, Fuller GN, Calin GA, Conrad CA, Creasy C, Ritthipichai K, Radvanyi L, Heimberger AB. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2016;18(2):195-205.
88. Babu R, Adamson DC. Rindopepimut: an evidence-based review of its therapeutic potential in the treatment of EGFRvIII-positive glioblastoma. *Core Evid*. 2012;7:93-103.
89. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, Menn O, Osswald M, Oezen I, Ott M, Keil M, Balß J, Rauschenbach K, Grabowska AK, Vogler I, Diekmann J, Trautwein N, Eichmüller SB, Okun J, Stevanović S, Riemer AB, Sahin U, Friese MA, Beckhove P, von Deimling A, Wick W, Platten M. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*. 2014;512(7514):324-7.
90. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and Functional Features of Central Nervous System Lymphatic Vessels. *Nature*. 2015;523(7560):337-41.
91. Mohyeldin A, Chiocca EA. Gene and viral therapy for glioblastoma: a review of clinical trials and future directions. *Cancer J*. 2012;18(1):82-8.
92. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, Tsoi J, Clark O, Oldrini B, Komisopoulou E, Kunii K, Pedraza A, Schalm S, Silverman L, Miller A, Wang F, Yang H, Chen Y, Kernysky A, Rosenblum MK, Liu W, Biller SA, Su SM, Brennan CW, Chan TA, Graeber TG, Yen KE, Mellinghoff IK. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. 2013;340(6132):626-30.
93. Lu Y, Kwintkiewicz J, Liu Y, Tech K, Frady LN, Su Y-T, Bautista W, Moon SI, MacDonald J, Ewend MG, Gilbert MR, Yang C, Wu J. Chemosensitivity of IDH1-



Mutated Gliomas Due to an Impairment in PARP1-Mediated DNA Repair. *Cancer Res.* 2017;77(7):1709-18.

94. Sulkowski PL, Corso CD, Robinson ND, Scanlon SE, Purshouse KR, Bai H, Liu Y, Sundaram RK, Hegan DC, Fons NR, Breuer GA, Song Y, Mishra-Gorur K, De Feyter HM, de Graaf RA, Surovtseva YV, Kachman M, Halene S, Günel M, Glazer PM, Bindra RS. 2-Hydroxyglutarate produced by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. *Sci Transl Med.* 2017;9(375):eaal2463.

95. Lee EQ, Reardon DA, Schiff D, Drappatz J, Muzikansky A, Grimm SA, Norden AD, Nayak L, Beroukhi R, Rinne ML, Chi AS, Batchelor TT, Hempfling K, McCluskey C, Smith KH, Gaffey SC, Wrigley B, Ligon KL, Raizer JJ, Wen PY. Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro Oncol.* 2015;17(6):862-7.

96. de Vries NA, Hulsman D, Akhtar W, de Jong J, Miles DC, Blom M, van Tellingen O, Jonkers J, van Lohuizen M. Prolonged Ezh2 Depletion in Glioblastoma Causes a Robust Switch in Cell Fate Resulting in Tumor Progression. *Cell Rep.* 2015;10(3):383-97.

97. Cheng Z, Gong Y, Ma Y, Lu K, Lu X, Pierce LA, Thompson RC, Muller S, Knapp S, Wang J. Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(7):1748-59.

98. Kirson ED, Dbalý V, Tovarys F, Vymazal J, Soustie IF, Itzhaki A, Mordechovich D, Steinberg-Shapira S, Gurvich Z, Schneiderman R, Wasserman Y, Salzberg M, Ryffel B, Goldsher D, Dekel E, Palti Y. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(24):10152-7.

99. Hawasli AH, Bagade S, Shimony JS, Miller-Thomas M, Leuthardt EC. Magnetic resonance imaging-guided focused laser interstitial thermal therapy for intracranial lesions: single-institution series. *Neurosurgery.* 2013;73(6):1007-17.

100. Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, Karachi C, Leclercq D, Lafon C, Chapelon J-Y, Capelle L, Cornu P, Sanson M, Hoang-Xuan K, Delattre J-Y, Idbaih A. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med.* 2016;8(343):343re2.

101. Torres S, Lorente M, Rodríguez-Fornés F, Hernández-Tiedra S, Salazar M, García-Taboada E, Barcia J, Guzmán M, Velasco G. A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(1):90-103.

102. Nabissi M, Morelli MB, Santoni M, Santoni G. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis.* 2013;34(1):48-57.

103. Glas M, Rath BH, Simon M, Reinartz R, Schramme A, Trageser D, Eisenreich R, Leinhaas A, Keller M, Schildhaus H-U, Garbe S, Steinfarz B, Pietsch T, Steindler DA, Schramm J, Herrlinger U, Brüstle O, Scheffler B. Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma. *Ann Neurol.* 2010;68(2):264-9.

104. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol.* 2003;21(8):1624-36.

105. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(8):1079-99.
106. Barker 2nd FG, Davis RL, Chang SM, Prados MD. Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. *Cancer*. 1996;77(6):1161-6.
107. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2006;5:67.
108. Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatozzolo C, Ciusani E, Sciacca FL, Ottolina A, Parati EA, La Porta C, Alessandri G, Marras C, Croci D, De Rossi M. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia*. 2006;54(8):850-60.
109. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, Batchelor TT, Futreal PA, Stratton MR, Curry WT, Iafrate AJ, Louis DN. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2038-45.
110. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):4009-14.
111. Johnson BE, Mazar T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJM, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*. 2014;343(6167):189-93.
112. Kim J, Lee I-H, Cho HJ, Park C-K, Jung Y-S, Kim Y, Nam SH, Kim BS, Johnson MD, Kong D-S, Seol HJ, Lee J-I, Joo KM, Yoon Y, Park W-Y, Lee J, Park PJ, Nam D-H. Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer Cell*. 2015;28(3):318-28.
113. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res*. 2003;63(7):1602-7.
114. Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liao LM, Mischel PS, Nelson SF. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res*. 2004;64(18):6503-10.
115. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8.
116. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, Lin Y-H, Satani N, Martinez-Ledesma E, Zheng S, Chang E, Sauv e C-EG, Olar A, Lan ZD, Finocchiaro G, Phillips JJ, Berger MS, Gabrusiewicz KR, Wang G, Eskilsson E, Hu J, Mikkelsen T, DePinho RA, Muller F, Heimberger AB,

- Sulman EP, Nam D-H, Verhaak RGW. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates With Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017;32(1):42-56.e6.
117. Lee E, Pain M, Wang H, Herman JA, Toledo CM, DeLuca JG, Yong RL, Paddison P, Zhu J. Sensitivity to BUB1B Inhibition Defines an Alternative Classification of Glioblastoma. *Cancer Res*. 2017;77(20):5518-29.
118. Lee E, Yong RL, Paddison P, Zhu J. Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods. *Semin Cancer Biol*. 2018;53:201-11.
119. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396-401.
120. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AWM, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LGT, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012;483(7390):479-83.
121. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-92.
122. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
123. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010;29(34):4741-51.
124. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-96.
125. Madany M, Thomas T, Edwards LA. The Curious Case of ZEB1. *Discoveries (Craiova)*. 2018;6(4):e86.
126. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J*. 2003;22(10):2453-62.
127. Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res*. 2008;68(2):537-44.
128. Postigo AA, Dean DC. ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(12):6683-8.
129. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep*. 2008;9(6):582-9.
130. Joseph JV, Conroy S, Tomar T, Eggens-Meijer E, Bhat K, Copray S, Walenkamp AME, Boddeke E, Balasubramanyian V, Wagemakers M, den Dunnen WFA, Kruijt FAE. TGF- $\beta$  is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis*. 2014;5(10):e1443.
131. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, Waldvogel B, Vannier C, Darling D, zur Hausen A, Brunton VG, Morton J, Sansom O, Schüler J,

Stemmler MP, Herzberger C, Hopt U, Keck T, Brabletz S, Brabletz T. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009;11(12):1487-95.

132. Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, Yuan J, Wang M, Chen D, Sun Y, Woodward WA, Liu Y, Dean DC, Liang H, Hu Y, Ang KK, Hung M-C, Chen J, Ma L. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat Cell Biol.* 2014;16(9):864-75.

133. Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn Y-H, Byers LA, Zhang X, Yi X, Dwyer D, Lin W, Diao L, Wang J, Roybal J, Patel M, Ungewiss C, Peng D, Antonia S, Mediavilla-Varela M, Robertson G, Suraokar M, Welsh JW, Erez B, Wistuba II, Chen L, Peng D, Wang S, Ullrich SE, Heymach JV, Kurie JM, Qin FX-F. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun.* 2014;5:5241.

134. Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, Maxwell J-P, Glackin CA, Wakimoto H, González-Herrero I, Sánchez-García I, Silber JR, Horner PJ, Rostomily RC. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer.* 2010;9:194.

135. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D, Isachenko N, Fouse SD, Phillips JJ, Cheresch DA, Park M, Bergers G. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell.* 2012;22(1):21-35.

136. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr BA, Simons B, Bogiel T, Reithmeier T, Prinz M, Schubert J, Niedermann G, Brabletz T, Eberhart CG, Nikkhah G, Maciaczyk J. Activation of canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 2012;325(1):42-53.

137. Rosmaninho P, Mükusch S, Piscopo V, Teixeira V, Raposo AA, Warta R, Bennewitz R, Tang Y, Herold-Mende C, Stifani S, Momma S, Castro DS. Zeb1 potentiates genome-wide gene transcription with Lef1 to promote glioblastoma cell invasion. *EMBO J.* 2018;37(15):e97115.

138. Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramaniyan V, Wagemakers M, den Dunnen WFA, Kruijff FAE. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 $\alpha$ -ZEB1 axis. *Cancer Lett.* 2015;359(1):107-16.

139. Siebzehnruhl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnruhl D, Sarkisian MR, Devers KG, Yachnis AT, Kupper MD, Neal D, Nabils NH, Klädde MP, Suslov O, Brabletz S, Brabletz T, Reynolds BA, Steindler DA. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Mol Med.* 2013;5(8):1196-212.

140. Kahlert UD, Suwala AK, Raabe EH, Siebzehnruhl FA, Suarez MJ, Orr BA, Bar EE, Maciaczyk J, Eberhart CG. ZEB1 Promotes Invasion in Human Fetal Neural Stem Cells and Hypoxic Glioma Neurospheres. *Brain Pathol.* 2015;25(6):724-32.

141. Edwards LA, Woolard K, Son MJ, Li A, Lee J, Ene C, Mantey SA, Maric D, Song H, Belova G, Jensen RT, Zhang W, Fine HA. Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(15):1162-78.

142. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 2010;11(9):670-7.
143. Nesvick CL, Zhang C, Edwards NA, Montgomery BK, Lee M, Yang C, Wang H, Zhu D, Heiss JD, Merrill MJ, Ray-Chaudhury A, Zhuang Z. ZEB1 expression is increased in IDH1-mutant lower-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2016;130(1):111-22.
144. Euskirchen P, Radke J, Schmidt MS, Heuling ES, Kadikowski E, Maricos M, Knab F, Grittner U, Zerbe N, Czabanka M, Dieterich C, Miletic H, Mørk S, Koch A, Endres M, Harms C. Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185376.
145. David ER, Habel A, Hagenlocher C, Mucha J, Ackermann U, Tessmer C, Meyer J, Capper D, Moldenhauer G, Mautner V, Frappart P-O, Schittenhelm J, Hartmann C, Hagel C, Katenkamp K, Petersen I, Mechttersheimer G, von Deimling A. Neurofibromin specific antibody differentiates malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) from other spindle cell neoplasms. *Acta Neuropathol.* 2014;127(4):565-72.
146. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 2006;7(10):R100.
147. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1(8476):307-10.
148. Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software.* 2015;67(1):1-48.
149. Zhang L, Zhang W, Li Y, Alvarez A, Li Z, Wang Y, Song L, Lv D, Nakano I, Hu B, Cheng S-Y, Feng H. SHP-2-upregulated ZEB1 is important for PDGFR $\alpha$ -driven glioma epithelial-mesenchymal transition and invasion in mice and humans. *Oncogene.* 2016;35(43):5641-52.
150. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer res.* 2013;19(4):764-72.
151. Alexandrescu S, Korshunov A, Lai SH, Dabiri S, Patil S, Li R, Shih C-S, Bonnin JM, Baker JA, Du E, Scharnhorst DW, Samuel D, Ellison DW, Perry A. Epithelioid Glioblastomas and Anaplastic Epithelioid Pleomorphic Xanthoastrocytomas—Same Entity or First Cousins? *Brain Pathol.* 2016;26(2):215-23.
152. Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, Koelsche C, Sahm F, Chavez L, Reuss DE, Kratz A, Wefers AK, Huang K, Pajtler KW, Schweizer L, Stichel D, Olar A, Engel NW, Lindenberg K, Harter PN, Braczynski AK, Plate KH, Dohmen H, Garvalov BK, Coras R, Hölsken A, Hewer E, Bewerunge-Hudler M, Schick M, Fischer R, Beschorner R, Schittenhelm J, Staszewski O, Wani K, Varlet P, Pages M, Temming P, Lohmann D, Selt F, Witt H, Milde T, Witt O, Aronica E, Giangaspero F, Rushing E, Scheurlen W, Geisenberger C, Rodriguez FJ, Becker A, Preusser M, Haberler C, Bjerkvig R, Cryan J, Farrell M, Deckert M, Hench J, Frank S, Serrano J, Kannan K, Tzirigos A, Brück W, Hofer S, Brehmer S, Seiz-Rosenhagen M, Hänggi D, Hans V, Rozsnoki S, Hansford JR, Kohlhof P, Kristensen BW, Lechner M, Lopes B, Mawrin C, Ketter R, Kulozik A, Khatib Z, Heppner F, Koch A, Jouvret A, Keohane C, Mühleisen H, Mueller W, Pohl U, Prinz M, Benner A, Zapatka M, Gottardo NG, Driever PH, Kramm CM, Müller HL, Rutkowski S, von Hoff K, Frühwald MC, Gnekow A, Fleischhack G, Tippelt S, Calaminus G, Monoranu C-M, Perry A, Jones C, Jacques

TS, Radlwimmer B, Gessi M, Pietsch T, Schramm J, Schackert G, Westphal M, Reifenberger G, Wesseling P, Weller M, Collins VP, Blümcke I, Bendszus M, Debus J, Huang A, Jabado N, Northcott PA, Paulus W, Gajjar A, Robinson GW, Taylor MD, Jaunmuktane Z, Ryzhova M, Platten M, Unterberg A, Wick W, Karajannis MA, Mittelbronn M, Acker T, Hartmann C, Aldape K, Schüller U, Buslei R, Lichter P, Kool M, Herold-Mende C, Ellison DW, Hasselblatt M, Snuderl M, Brandner S, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 2018;555(7697):469-74.

153. Lu M-J, Zhong W-H, Liu Y-X, Miao H-Z, Li Y-C, Ji M-H. Sample Size for Assessing Agreement between Two Methods of Measurement by Bland-Altman Method. *Int J Biostat*. 2016;12(2):/j/ijb.2016.12.issue-2/ijb-5-0039/ijb-2015-0039.xm.

154. van der Loos CM. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(4):313-28.

155. Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, Stairs DB, Kalabis J, Vega ME, Kalman RA, Nakagawa M, Klein-Szanto AJ, Herlyn M, Diehl JA, Rustgi AK, Nakagawa H. EGFR and mutant p53 expand esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res*. 2010;70(10):4174-84.

156. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 2011;59(8):1169-80.

157. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Wilhelm D, Rajky O, Kurscheid S, Kresl P, Wöhrer A, Marosi C, Hegi ME, Preusser M. Correlation of immune phenotype with IDH mutation in diffuse glioma. *Neuro Oncol*. 2017;19(11):1460-8.

158. Amankulor NM, Kim Y, Arora S, Kargl J, Szulzewsky F, Hanke M, Margineantu DH, Rao A, Bolouri H, Delrow J, Hockenbery D, Houghton AM, Holland EC. Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. *Genes Dev*. 2017;31(8):774-86.

159. Kohanbash G, Carrera DA, Shrivastav S, Ahn BJ, Jahan N, Mazor T, Chheda ZS, Downey KM, Watchmaker PB, Beppler C, Warta R, Amankulor NA, Herold-Mende C, Costello JF, Okada H. Isocitrate dehydrogenase mutations suppress STAT1 and CD8+ T cell accumulation in gliomas. *J Clin Invest*. 2017;127(4):1425-37.

160. Engler JR, Robinson AE, Smirnov I, Hodgson JG, Berger MS, Gupta N, James CD, Molinaro A, Phillips JJ. Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS One*. 2012;7(8):e43339.

161. Singh DK, Kollipara RK, Vemireddy V, Yang X-L, Sun Y, Regmi N, Klingler S, Hatanpaa KJ, Raisanen J, Cho SK, Sirasanagandla S, Nannepaga S, Piccirillo S, Mashimo T, Wang S, Humphries CG, Mickey B, Maher EA, Zheng H, Kim RS, Kittler R, Bachoo RM. Oncogenes Activate an Autonomous Transcriptional Regulatory Circuit That Drives Glioblastoma. *Cell Rep*. 2017;18(4):961-76.

162. Edwards LA, Kim S, Madany M, Nuno M, Thomas T, Li A, Berel D, Lee B-S, Liu M, Black KL, Fan X, Zhang W, Yu JS. ZEB1 Is a Transcription Factor That Is Prognostic and Predictive in Diffuse Gliomas. *Front Neurol*. 2019;9:1199.

163. Dai B, Huang H, Guan F, Zhu G, Xiao Z, Mao B, Su H, Hu Z. Histone demethylase KDM5A inhibits glioma cells migration and invasion by down regulating ZEB1. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:72-80.

164. Guo E, Wang Z, Wang S. MiR-200c and miR-141 inhibit ZEB1 synergistically and suppress glioma cell growth and migration. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(16):3385-91.

165. Suzuki K, Kawataki T, Endo K, Miyazawa K, Kinouchi H, Saitoh M. Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade. *Oncol Lett.* 2018;16(2):1758-64.





## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marc Sören Schmidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Immunhistochemische Charakterisierung von ZEB1 in humanen Glioblastomen/Immunohistochemical characterization of ZEB1 in human glioblastoma‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift



## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Marc Sören Schmidt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Euskirchen P, Radke J, Schmidt MS, Heuling ES, Kadikowski E, Maricos M, Knab F, Grittner U, Zerbe N, Czabanka M, Dieterich C, Miletic H, Mørk S, Koch A, Endres M, Harms C. Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. PLoS One. 2017;12(9):e0185376

Beitrag im Einzelnen: Mein Anteil an der Publikation umfasst die Aufbereitung der Whole Slide Images einschließlich Gridding und ROI-Definition für die immunhistochemischen Färbungen von ZEB1, EGFR, Ki67 und p53 sowie die Erstellung der automatischen Auswertungsalgorithmen für CellProfiler zur Bestimmung des ZEB1 und EGFR labeling index. Die so generierten Daten lieferten die Grundlage für die Abbildungen 1B, 2A – 2D und 3B.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



## **Lebenslauf**

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



## Publikationsliste

Euskirchen P, Radke J, Schmidt MS, Heuling ES, Kadikowski E, Maricos M, Knab F, Grittner U, Zerbe N, Czabanka M, Dieterich C, Miletic H, Mørk S, Koch A, Endres M, Harms C. Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. PLoS One. 2017;12(9):e0185376





## Danksagung

Nach mehr oder weniger konsequenter, aber letztendlich erfolgreicher Arbeit an meiner Promotion möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Betreuern, Prof. Dr. Christoph Harms, Charité, Zentrum für Schlaganfallforschung und Dr. med. Philipp Euskirchen, Charité, Abteilung für experimentelle Neurologie, AG Molekulare Neuroonkologie für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Besonderer Dank gilt dabei Philipp Euskirchen, der mir mit anspornenden und manchmal deutlichen Worten über motivationelle Durststrecken half, mir beständig Aufgaben übertrug, die mich dazu anhielten, über mich hinauszuwachsen und, wenn nötig, immer mit fachlicher Unterstützung zur Seite stand. Ich habe mich im Rahmen dieser Promotion in ein komplexes, medizinisches Spezialthema vertiefen können, habe neue Fertigkeiten erworben und durfte an internationalem wissenschaftlichen Austausch teilnehmen. Diese Erfahrungen haben mich bereichert und mein Verständnis wissenschaftlichen Arbeitens nachhaltig geprägt.

Unserem Kooperationspartner Norman Zerbe, Charité, Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Pathologie, Abteilung für digitale Pathologie danke ich für die vertrauensvolle Einarbeitung am Whole Slide Scanner und für die Bereitstellung der notwendigen Gerätschaften und Software. Dank gilt außerdem dem Labor von Prof. Hrvoje Miletic, Universität Bergen (Norwegen), Abteilung für Biomedizin sowie Prof. Dr. David Capper, Charité, Institut für Neuropathologie für die Bereitstellung der histologischen Proben und immunhistochemischen Färbungen.

Sehr dankbar bin ich auch meiner Freundin, Lucie Elsweiler, die als meine persönliche Promotionsbeauftragte (pPb) dafür sorgte, dass ich nach Stunden der Arbeit auch noch an die Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme erinnert wurde und mir letztlich den nötigen Antrieb und das Durchhaltevermögen gab, neben Zweitstudium und beruflicher Tätigkeit diese Arbeit fertigzustellen.

Ganz besonders danke ich auch meinen Eltern für Ihre Fürsorge und die durch sie auch unter schwierigen Vorzeichen ermöglichte, schöne Kindheit und ausgezeichnete Schulbildung, ohne die ich niemals zu diesem Punkt in meinem Leben vorgedrungen

wäre. Meine Mutter, Margit Schmidt, stand mir immer mit Tat und Rat zur Seite und war mir ein liebevoller Fels in der Brandung in allen Lebenssituationen. Mein Vater, Silvio Schmidt, verstand es, mich mit stolzer Begeisterung für jeden meiner Erfolge anzuspornen. Gleiches gilt für meine Großeltern, Erna und Günther Nissel, die die letzten Jahre zwar nicht mehr erleben konnten, deren Anteil an der Sicherheit und fürsorglichen Zuwendung, die ich im Laufe meines Lebens erleben durfte, für mich aber auch weiterhin große Bedeutung hat.