

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Jochen Herms

Die Rolle der Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) als
Markerenzym der astrozytären Differenzierung sowie als
prognostischer Biomarker im Glioblastoma multiforme

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Alexandra Adam
aus
München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Schüller

Mitberichterstatter: PD Dr. Niklas Thon; PD Dr. Nathalie Albert

Dekan: Prof. Dr. med.dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden publiziert als:

Adam, Susanne A, et al. „ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients.“ ***Brain Pathology*** 22.6 (2012): 788-797. (Adam *et al.*, 2012)

Diese Arbeit ist meinen Eltern
Gertraud und Dr. Reinhard Adam in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	5
1.1 Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS).....	5
1.2 Das Glioblastom: Epidemiologie, Biologie, Klinik.....	8
1.3 Die Aldehyddehydrogenase ALDH1A1.....	12
1.4 Die Aldehyddehydrogenase ALDH1A1 in malignen Tumoren	13
1.5 Ziel der Arbeit.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 Patientenpopulation und Tumorgewebeprobe.....	18
2.2 Datenerhebung.....	19
2.3 Antikörper und Immunhistochemie	20
2.4 Statistische Auswertung	21
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Expression von ALDH1A1 im gesunden menschlichen Gehirn	23
3.2 Expression von ALDH1A1 in humanen Glioblastomen.....	28
3.3 Nutzen von ALDH1A1 als prognostischer Biomarker	30
4 DISKUSSION	34
4.1 Expressionsmuster von ALDH1A1 im menschlichen Gehirn	34
4.2 Expression von ALDH1A1 in malignen astrozytären ZNS-Tumoren.....	36
4.3 Nutzen von ALDH1A1 als prognostischer Biomarker	39
4.4 Ausblick	41
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	43

6 LITERATURVERZEICHNIS.....	44
7 TABELLARISCHER ANHANG.....	2
8 LEBENSLAUF	10
9 DANKSAGUNG	10
10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	61

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Akt	murine thymoma viral oncogene homologue (syn. Proteinkinase B)
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ATRX	TP-dependent helicase, X-linked helicase II, X-linked nuclear protein
BEV	Bevacizumab
BRAF	v-raf 1 murine leukemia viral oncogene homologue 1
BS	Hirnstamm
CB	Zerebellum
CC	zerebraler Kortex
CD133	Prominin-1
CDK	cyclin-dependent kinase
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung/IL-13 convection enhanced delivery
CIL	Cilengitid
CSC	cancer stem cell
CTx	Chemotherapie
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGM	Deutsches Gliomnetzwerk
EBP	extracellular signal-related kinase/- binding protein
EGFR	epithelial growth factor receptor
EGL	äußere Körnerzellschicht
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FGF	fibroblast growth factor
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
FV	vierter Ventrikel
GDP	Guanindiphosphat

GFAP	saures Gliafaserprotein
GL	Körnerzellschicht
Grb 2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanintriphosphat
HDAC	Histondeacetylase
HGF/SF	hepatocyte growth factor/scatter factor
HU	hydroxyurea
ICD	International Classification of disease
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IGF	insulin-like growth factor
IMA	Imatinib
iPDT	interstitielle photodynamische Therapie
LTFU	lost to follow-up
LV	lateral Ventrikel
MGMT	O6-methylguanine DNA methyltransferase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
ML	Molekularzellschicht
MS	Multiple Sklerose
MUC	Muzin
mTOR	mammalian target of rapamycin
NCIC	National Cancer Institute of Canada
NF1	Neurofibromin 1
NIM	Nimotizumab
NOS	not otherwise specified
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor
P53	Tumorsuppressorprotein p53
PD-L1	programmed death ligand 1

PHH3	phospho-Histon H3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RA	Retinsäure
RAS	rat sarcoma viral oncogene homologue
RB	retinoblastoma oncogene
RCTx	Radiochemotherapie
RELA	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor
RTx	Radiotherapie
RXR	Retinsäurerezeptor
SBT	stereotaktische Brachytherapie
SBx	stereotaktische Biopsie
SHH	sonic hedgehog
SIRT	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1
SMAD	Sma/mothers against decaplegic
SOS	son of sevenless
SOX2	sex determining region Y-box 2
SPC	supportive und palliative Versorgung
Src	sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homologue
TDEC	Tumor-derived endothelial cell
TGF	transforming growth factor family
TMZ	Temozolomid
TR	Tumorresektion
TSC1/2	tuberous sclerosis gene 1/2
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

VZ	ventrikuläre Zone
Wnt	wingless/integrated-1
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WM	weiße Substanz
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS)

Die international anerkannte „Klassifikation der Tumoren des ZNS“ der Weltgesundheitsorganisation (WHO) liefert die Grundlagen für die Diagnostik hirneigener Tumoren und Metastasen anhand ihrer histologischen und molekulargenetischen Eigenschaften (Louis *et al.*, 2016). Dabei werden in der neuesten Auflage von 2016 folgende Hauptentitäten unterschieden: Unter den diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren werden diffuse und anaplastische Astrozytome, Oligodendrogliome und Glioblastome zusammengefasst. Davon abzugrenzen sind Tumoren des Ependyms sowie des Plexus choroideus, neuronale und gemischt neuronale Tumoren, Tumoren der Pinealisregion, embryonale, mesenchymale und melanozytäre Tumoren, Tumoren, die aus den Hirnhäuten (Meningen) hervorgehen, sowie Tumoren der Hirn- und Spinalnerven. Weiterhin sind Lymphome, histiozytäre Tumoren, Germinome sowie Hypophysentumoren und Metastasen hirnfremder Tumoren aufgeführt. Eine Übersicht über die wichtigsten Tumoren des Zentralnervensystems gemäß der aktuellen WHO-Einteilung zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht zu einigen wichtigen Tumoren des Zentralnervensystems nach der aktuellen WHO-Klassifikation 2016. ICD, international classification of diseases; NOS, not otherwise specified

Bezeichnung	ICD-0-Code
Diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren	
Diffuses Astrozytom, <i>IDH</i> -mutiert/- Wildtyp/- NOS	9400/3
Gemistozytisches Astrozytom, <i>IDH</i> -mutiert	9411/3
Anaplastisches Astrozytom, <i>IDH</i> -mutiert/- Wildtyp/- NOS	9401/3
Glioblastom, <i>IDH</i> -Wildtyp/NOS	9440/3
Glioblastom, <i>IDH</i> -mutiert	9445/3
Diffuses Mittelliniengliom, H3 K27M-mutiert	9385/3
Oligodendrogliom (<i>IDH</i> -mutiert und 1p19q-codeletiert/NOS)	9450/3
Anaplastisches Oligodendrogliom (<i>IDH</i> -mutiert und 1p19q-codeletiert/NOS)	9451/3

Oligoastrozytom, NOS und anaplastisches Oligoastrozytom, NOS	9382/3
Weitere astrozytäre Tumoren	
Pilozytisches Astrozytom	9421/1
Pilomyxoides Astrozytom	9425/3
Subependymales Riesenzellastrozytom	9384/1
Pleomorphes Xanthoastrozytom und anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom	9424/3
Ependymale Tumoren	
Subependymom	9383/1
Myxopapilläres Ependymom	9394/1
Ependymom (papillär)	9393/3
Ependymom (klarzellig)	9391/3
Ependymom mit <i>RELA</i> -Fusion	9396/3
anaplastisches Ependymom	9392/3
Weitere Gliome	
Angiozentrisches Gliom	9431/1
Astroblastom	9430/3
Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumoren	
Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor	9413/0
Gangliocytom	9492/0
Gangliogliom	9505/1
Anaplastisches Gangliogliom	9505/3
Desmoplastisches infantiles Astrozytom/Gangliogliom	9412/1
Papillärer/rosettenbildender glioneuraler Tumor	9509/1
Neurozytom (zentral/extraventrikulär/zerebellär)	9506/1
Paragangliom	8693/1

Eine grundlegende Neuerung der WHO-Klassifikation von 2016 gegenüber der vorhergehenden Auflage aus dem Jahre 2007 war, dass nun auch molekulare Tumoreigenschaften zur Klassifikation herangezogen werden, was die prognostische

Stratifizierung der Entitäten noch einmal deutlich verbesserte (Louis *et al.*, 2016). Dies führt dazu, dass die molekulare Tumoreigenschaft Teil der diagnostischen Bezeichnung wird, wie beispielsweise „Oligodendrogliom, *IDH*-mutiert und 1p/19q-deletiert“. In vergangenen Jahren und WHO-Klassifikationen wurden hingegen alleine histopathologische Ähnlichkeiten zum vermeintlichen oder tatsächlichen Ursprungsgewebe der Neoplasien zur Einteilung herangezogen. Der Hauptvorteil der neuen Klassifikation lässt sich gut am Beispiel des Oligoastrozytoms aufzeigen. Diese Entität wurde in verschiedenen Zentren unterschiedlich häufig diagnostiziert und die Diagnose zeigte eine hohe Interobserver-Variabilität und eine schlechte Reproduzierbarkeit (Giannini *et al.*, 2001; van den Bent, 2010). Mithilfe der molekularen Diagnostik (*ATRX/IDH*-Mutation und 1p/19q-Deletion) konnten die meisten dieser Fälle entweder uneindeutig Oligodendrogliomen oder Astrozytomen zugeordnet werden; eine echte Mischdifferenzierung war selten (Sahm *et al.*, 2014). Damit werden die Gruppen der Oligodendrogliome und Astrozytome zugleich größer und besser definiert (Louis *et al.*, 2016).

Tatsächlich ist es sogar so, dass die molekulare Klassifikation gegenüber der (licht)mikroskopischen Einteilung schwerer wiegt. Ein *IDH*-mutierter astrozytär imponierender Tumor mit 1p/19q-Codeletion ist demnach als Oligodendrogliom (*IDH*-mutiert, 1p/19q-codeletiert), ein als *IDH*-mutierter, als Oligodendrogliom imponierender Tumor mit intaktem 1p/19q als Astrozytom (*IDH*-mutiert) einzustufen (Louis *et al.*, 2016). Tabelle 1 zeigt, dass diese Tumoren je nach *IDH*-Mutationsstatus sogar eine neue ICD-O-Klassifikation bekommen, womit der biologischen Bedeutung dieser molekularen Alteration Rechnung getragen wird.

Neben der histogenetisch-morphologischen und nun auch molekularbiologischen Klassifikation werden die Tumoren des ZNS in vier Differenzierungsgrade (WHO-Grade) unterteilt. Dieses Klassifikationsschema unterscheidet sich von den in der allgemeinen Pathologie angewandten Schemata insofern, als die morphologisch und molekularbiologisch gesicherte Entität auch den Grad vorgibt. Während in der allgemeinen Pathologie, beispielsweise beim Adenokarzinom des Kolons oder der Mamma, ein Tumor noch innerhalb dieser Diagnosegruppe einen bestimmten Differenzierungsgrad aufweisen kann (G1-G4), ist bei der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren mit jeder Diagnose ein Malignitätsgrad (I-IV) verknüpft, der prognostische Aussagekraft hat und als Grundlage für Therapieentscheidungen

dienen kann (Louis *et al.*, 2016). Beispiele für Tumoren der WHO-Gruppe I sind das pilozytische Astrozytom, das klassische (nicht atypische) Meningeom und das Schwannom. In die Gruppe II gehören unter anderem das diffuse Astrozytom (*IDH*-mutiert) oder das pleomorphe Xanthoastrozytom. Das anaplastische Astrozytom (*IDH*-mutiert) ist der Gruppe III zuzuordnen, wohingegen das Glioblastom (*IDH*-mutiert oder *IDH*-wildtypisch) dem höchsten Malignitätsgrad (WHO IV) entspricht. Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit ist in erster Linie das Glioblastom.

1.2 Das Glioblastom: Epidemiologie, Biologie, Klinik

Der Terminus Glioblastom (ursprünglich: Spongioblastoma, später Glioblastoma multiforme) geht zurück auf F. B. Mallory, der sich bereits Anfang des 20. Jahrhunderts mit dieser Tumorentität beschäftigte. In den 20er-Jahren wurde er von Bailey und Cushing aufgegriffen und verbreitet (Bailey und Cushing, 1928; Mitchell *et al.*, 2005; Dmetrichuk *et al.*, 2011). Die erste Operation eines Glioms wurde 1904 in Wien vorgenommen.

Das Glioblastom ist der häufigste astrozytäre Hirntumor. Es entwickelt sich in 90% der Fälle primär, in 10 % der Fälle geht es aus einer niedrig gradigen Vorläuferläsion hervor (sekundäres Glioblastom, dann häufig aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen) (Tso *et al.*, 2006; Wen und Kesari, 2008). Morphologisch besteht kein Unterschied zwischen primären und sekundären Glioblastomen.

In Europa und Nordamerika erkranken jährlich ca. 3 von 100.000 Menschen am Glioblastom, bei Männern tritt der Tumor etwas häufiger auf (Thakkar *et al.*, 2014). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 64 Jahre, der Tumor kommt jedoch durchaus auch bei Kindern und Jugendlichen vor. Das Glioblastom tritt weiterhin etwas häufiger bei Kaukasiern auf und eine familiäre Vorbelastung erhöht das Erkrankungsrisiko; zudem scheinen traumatische Hirnschädigungen (Kontusionen) ebenfalls mit einem etwas erhöhten Risiko verknüpft zu sein. Genetisch bedingte Formen der Erkrankung sind bekannt, machen allerdings nur ca. 1% der Fälle aus (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Syndrome, die zu einer erhöhten Erkrankungsrate am Glioblastom führen können, sind beispielsweise die tuberöse Sklerose, das Turcot-Syndrom, die multiple endokrine Neoplasie (MEN) Typ IIa und die Neurofibromatose (Urbańska *et al.*, 2014).

Heute sind einige Eigenschaften jener Zelltypen definiert, die als Tumorstammzellen (cancer stem cells, CSC) des Glioblastoms gelten. Sie teilen einige Eigenschaften mit den späteren Tumoren, wie die Expression des neuronalen Stammzellmarkers Nestin oder CD133 (Calabrese *et al.*, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Olig2, der ebenfalls im Glioblastom exprimiert wird, den p53-abhängigen Zelltod in der Folge von DNA-Schädigung verhindert; eine Hemmung von p53 könnte somit die Empfindlichkeit von Glioblastomen gegenüber einer Strahlen- oder Chemotherapie erhöhen (Mehta *et al.*, 2011). Seit der Entschlüsselung des Genoms der Tumorzelllinie U87MG sind über 500 auftretende Mutationen im Glioblastom bekannt, darunter klassische *TP53*- oder *RB1*-Deletionen, aber auch speziell für GBMs charakteristische Veränderungen wie *PTEN*-Verlust oder *MGMT*-Methylierung (Clark *et al.*, 2010).

Abb. 1 zeigt die im Glioblastom aktivierten molekularen Signalwege sowie Möglichkeiten der pharmakologischen Hemmung derselben.

Eine besondere Rolle spielen die Rezeptortyrosinkinasesignalwege (*epithelial growth factor receptor*, EGFR und *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) sowie Rezeptoren für Stammzellfaktoren und die nachgeschalteten Signalwege in Form von Phosphorylierungskaskaden, die mit Antikörpern oder niedermolekularen Inhibitoren (sog. *small molecules*) blockiert werden können, was eine potenzielle therapeutische Strategie für die Behandlung des Glioblastoms darstellen könnte.

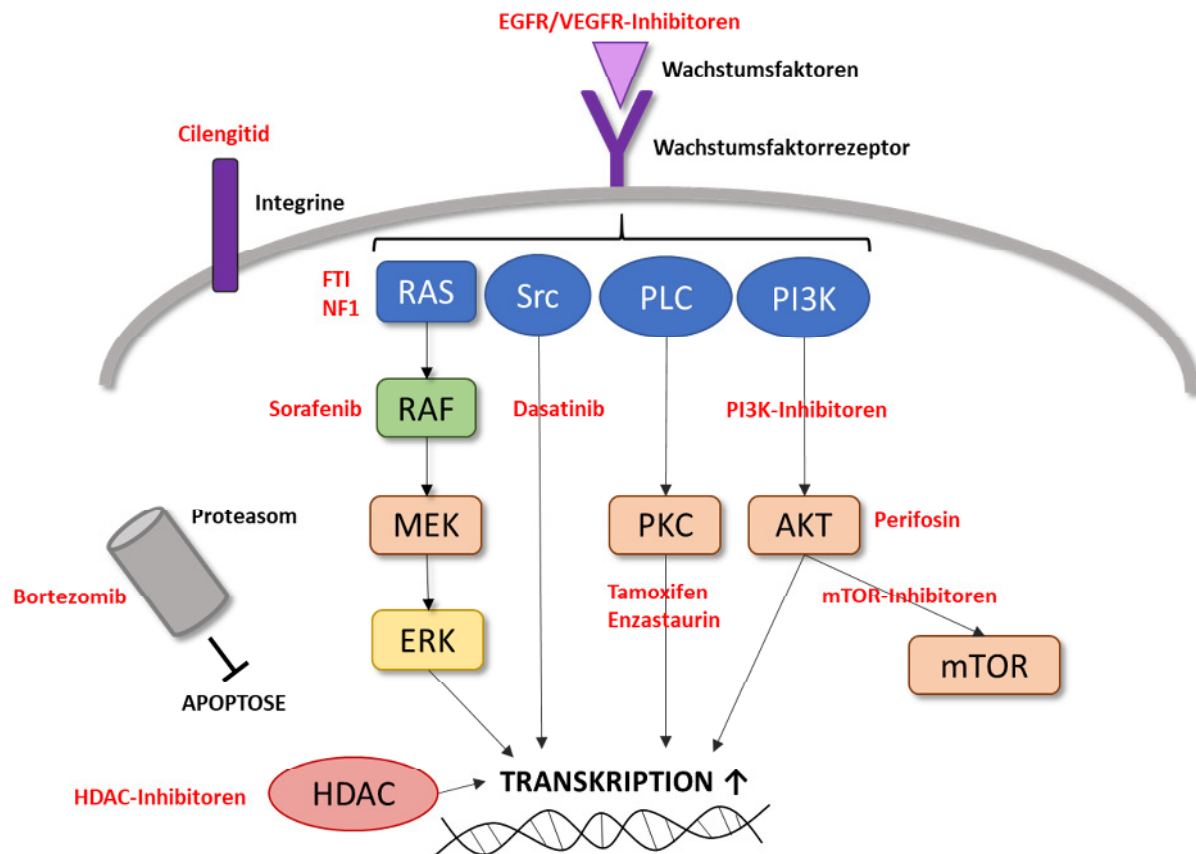


Abbildung 1: Im Glioblastom aktivierte Signalwege und Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung

Akt, murine thymoma viral oncogene homologue (syn. Proteinkinase B); ERK, extracellular signal-regulated kinase; FTI, Farnesyltransferase-Inhibitor; HDAC, Histondeacetylase; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; NF1, Neurofibromin 1; PI3K, Phosphatidylinositol-3-kinase; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; RAF, v-raf 1 murine leukemia viral oncogene homologue 1; RAS, rat sarcoma viral oncogene homologue; Src, sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homologue. Eigene Abbildung, modifiziert nach (Kesari, 2011).

Neben den Tumorstammzellen besitzt auch die Tumorumgebung (sog. *microenvironment*) wesentliche Bedeutung für die Entstehung und die Ausbreitung des Glioblastoms. Die rasche Ausbreitung des Tumors als inhomogene, diffus das gesunde Nachbargewebe infiltrierende Tumormasse führt dazu, dass einzelne Tumorzellen immer weiter entfernt von den versorgenden Blutgefäßstrukturen zum Liegen kommen, was zum Absterben der Zellen führen könnte, da diese einen hohen Energiebedarf besitzen (Reeves und Marks, 1979). Häufig finden sich daher Einblutungen, oder zystische Veränderungen sowie (obligatorisch und diagnostisch wegweisend) strichförmige Nekrosen. Ein typisches Merkmal von Glioblastomen ist

allerdings eine unkontrollierte Gefäßneubildung innerhalb des Tumors. Es konnte dargestellt werden, dass diese aberranten vaskulären Neubildungen durch die Freisetzung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) durch die Tumorzellen angeregt werden (Plate *et al.*, 1992). Tatsächlich scheinen Tumorzellen dazu in der Lage zu sein, sich selbst in Gefäßendothelien (sog. tumor-derived endothelial cells, TDEC) umzuwandeln, die unempfindlich gegen Angiogeneseinhibitoren sind (Soda *et al.*, 2011; Borovski *et al.*, 2013). Hier ist noch anzumerken, dass die ausgeprägte intratumorale Heterogenität von Glioblastomen ein zusätzliches Therapiehindernis darstellt; Therapien, die gegen einen bestimmten Zellklon wirken, können gegen einen weiteren Klon bereits wieder unwirksam sein (Bonavia *et al.*, 2011).

Über die Anregung der (Neo-)Angiogenese hinaus sind Glioblastomzellen auch in der Lage, über die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege und die Freisetzung autokriner und parokriner Botenstoffe besser auf Hypoxiebedingungen zu reagieren (Tafani *et al.*, 2011; Hubert *et al.*, 2016).

Schließlich setzen Glioblastomzellen Botenstoffe frei, welche die Immunantwort auf die Tumoren inhibieren und so verhindern, dass Tumorzellen von zytotoxischen T-Lymphozyten angegriffen werden (Rolle *et al.*, 2010). So exprimieren bis zu 88 % der Glioblastome das immunmodulatorische Checkpoint-Molekül PD-L1, während dies nur in 30 % der malignen Melanome und in bis zu 36 % der nicht kleinzelligen Lungenkarzinome der Fall ist; für beide Entitäten sind allerdings Checkpoint-Inhibitoren (z. B. Nivolumab) zugelassen (Preusser *et al.*, 2015). Erste Daten zur Verwendung dieser Medikamente, insbesondere in Kombinationstherapien, bei Glioblastompatienten waren zumindest vielversprechend. Dies legen Studienergebnisse beim Melanom nahe (Larkin *et al.*, 2015).

Ein weiterer wichtiger Marker für das Therapieansprechen auf Chemotherapie (sog. prädiktiver Biomarker) ist der Methylierungsstatus des Promotors für die O⁶-methylguanine–DNA-Methyltransferase (MGMT). Diese Transferase ist auf 10q26 codiert und entfernt Alkylgruppen aus der O⁶-Position von Guanin, wodurch die DNA vor Schädigung geschützt wird (Hegi *et al.*, 2005). Was normalerweise einen Schutzmechanismus darstellt, ist im Falle der Chemotherapie des Glioblastoms mit Alkylantien kontraproduktiv, da die DNA der Tumorzelle ja gerade geschädigt werden soll, um diese Zelle im Anschluss in den Zelltod zu treiben. Ist der Promotor methyliert, wird weniger MGMT exprimiert (epigenetisches *silencing*), was das

Glioblastom anfälliger gegenüber Chemotherapie macht; Patienten mit MGMT-Promotermethylierung zeigen somit unter Chemotherapie mit Temozolomid ein signifikant längeres Überleben (Hegi *et al.*, 2005; Brandes *et al.*, 2008; Kesari *et al.*, 2008). Die Prognose für Patienten mit Glioblastom ist allerdings im Allgemeinen noch immer äußerst schlecht. So liegt die 2-Jahres-Überlebensrate für über 65-Jährige bei 2%, bei Patienten, welche zum Zeitpunkt der Diagnose unter 45 Jahre alt sind, selbst bei optimaler Therapie bei unter 30% (Omuro und DeAngelis, 2013).

1.3 Die Aldehyddehydrogenase ALDH1A1

Bei der Gruppe der Aldehyddehydrogenasen (ALDH) handelt es sich um eine Familie von evolutionär hochkonservierten Enzymen mit bislang 19 bekannten Isoformen. Diese finden sich – je nach Isoform – ubiquitär im Zytoplasma, in den Mitochondrien oder im Zellkern von Zellen nahezu jeden menschlichen Gewebetyps (Ma und Allan, 2011; Rodriguez-Torres und Allan, 2016). Allerdings sind die Expressionsmuster sowie die relative Abundanz der einzelnen Isoformen von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Katalyse der Oxidation von Aldehyden in ihre entsprechende Carbonsäure, womit sie einen entscheidenden Beitrag beim Abbau der hochgiftigen Aldehyde leisten. Hierfür sind insbesondere die Dehydrogenasen ALDH1, ALDH3 und ALDH8 von zentraler Bedeutung (Singh *et al.*, 2013). Das in dieser Arbeit untersuchte Isoenzym ALDH1A1 ist ein cytosolisches Homotetramer, das in einer Vielzahl von Geweben vorkommt, u. a. im Gehirn, in der Cornea, der Augenlinse, der Retina, der Leber und dem Gastrointestinaltrakt (Koppaka *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2015).

ALDH1A1 ist ebenfalls ein weiteres wichtiges Enzym der Alkoholverstoffwechslung. Als solches katalysiert es die Oxidation von Acetaldehyd ungiftigen Metaboliten. Ein Mangel an ALDH1A1, bedingt beispielsweise durch genetische Polymorphismen oder etwa gewollt herbeigeführt durch Disulfiram im Zuge einer medikamentösen Alkoholentwöhnung, führt zu einer Anhäufung von Acetaldehyd im Gewebe (Lind *et al.*, 2008). Dieses wiederum bedingt die typischen Zeichen einer Alkoholunverträglichkeit, wie Flush oder Übelkeit. In der Hornhaut und Linse des menschlichen Auges scheint ALDH1A1 u. a. an der Aufrechterhaltung der Gewebetransparenz beteiligt zu sein.

ALDH1A1 sowie weitere ALDH-Isoenzyme (ALDH1A2, ALDH1A3) spielen zudem im Retinsäurestoffwechsel eine Rolle, wo sie die Katalyse von Retinaldehyd zu Retinsäure unterstützen (Coyle *et al.*, 2013). Retinsäure (RA) ist ein wichtiger Botenstoff bei der Stammzellexpansion sowie der Ausdifferenzierung von Stammzellen, indem es in den Zellkern transloziert und dort an den Retinsäurerezeptor (RAR), den Retin-X-Rezeptor (RXR) und den *peroxisome proliferator activated receptor* beta/delta (PPAR β/δ) bindet. Dies hat je nach Zelltyp unterschiedliche Folgen. Die Aktivierung von RAR und RXR führt zumeist zum Zellzyklusarrest und zum Ausdifferenzieren der Zelle, wohingegen eine Aktivierung von PPAR die Transkription von Onkogenen und die Progression des Zellzyklus vermittelt. Zusätzlich scheinen einige ALDH-Isoenzyme (ALDH1A1 und ALDH1A3) über RA die Expression von Tumorsuppressoren über epigenetisches Silencing verhindern zu können (Rodriguez-Torres und Allan, 2016).

ALDH1A1 und ALDH3A1 spielen zudem bei der Resistenz gegenüber Cyclophosphamid und dessen Derivate eine Rolle, zudem werden oftmals Enzyme zum Abbau von oxidativem Stress sowie von toxischen Stoffwechselprodukten gleichzeitig mit ALDH-Isoenzymen co-exprimiert (Januchowski *et al.*, 2013). Schließlich existieren belastbare Hinweise darauf, dass die ALDH-Isoenzyme bei der Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps von Tumorstammzellen beteiligt sind (Ma und Allan, 2011).

1.4 Die Aldehyddehydrogenase ALDH1A1 in malignen Tumoren

Wie bereits beschrieben, wird ALDH1A1 auch mit der Resistenz von Tumorgewebe gegen Chemotherapeutika (Cyclophosphamide und Cisplatin-Verbindungen) in Verbindung gebracht, da es in der Lage ist, diese zumindest partiell zu metabolisieren (Januchowski *et al.*, 2013). Zudem ist ALDH1A1 eine jener ALDH-Isoformen, die in der Lage sind, das wichtige Signalmolekül Retinsäure bereitzustellen.

Vor diesem Hintergrund ist es nicht überraschend, dass eine Expression von ALDH1A1 in multiplen hämatologischen und soliden Neoplasien nachgewiesen wurde, so zum Beispiel bei der Promyelozytenleukämie, im Harnblasenkarzinom, im

Prostatakarzinom, im Mammakarzinom, in Lungenkarzinomen und im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Russo *et al.*, 2002; Sládek *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010; Kahlert *et al.*, 2011).

In diesen Entitäten verdichteten sich die Hinweise darauf, dass insbesondere die Bedeutung der ALDH1A1 für den Retinsäurestoffwechsel bedeutsam ist. Die Aktivierung des RA-Signalweges, der durch ALDH1A1 über die Bereitstellung von RA aus Retinaldehyd angeregt wird, führt zur Aufrechterhaltung des Tumorstammzellphänotyps mit hoher biologischer Aggressivität und Therapieresistenz (Rodriguez-Torres und Allan, 2016). Daher ist die Expression von ALDH1A1 insbesondere im Mammakarzinom mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet.

Eine weitere Funktion der ALDH-Isoenzyme in Tumorzellen scheint mit deren Fähigkeit zur Migration, Invasion und Metastasierung in Zusammenhang zu stehen. So ist eine hohe Enzymaktivität der ALDHs mit einer höheren Invasionskapazität von Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Osteosarkomen, Ösophagus- und Prostatakarzinomen vergesellschaftet. Bei einigen dieser Tumorentitäten korreliert die ALDH-Expression zudem mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Mu *et al.*, 2013; Reeves *et al.*, 2013; Ajani *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Im speziellen ALDH1A1 scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige und prognostisch ungünstige Rolle zu spielen. Im Einzelnen ist allerdings noch nicht genau verstanden, wie die ALDH1A1-Expression mechanistisch zu einer verstärkten Invasion und Metastasierung führen kann. In einem kombinierten In-vitro- und Mausmodell für die Metastasierung des malignen Melanoms führte eine Unterdrückung der ALDH1A1-Expression zu einer verminderten Metastasierungsfähigkeit durch den Tumor (Yue *et al.*, 2015). Dies bedeutet, dass ALDH1A1 nicht nur einen gewebebasierten Biomarker für einen aggressiven Phänotyp des malignen Melanoms darstellt, sondern auch ganz konkrete funktionelle Bedeutung für Metastasierungsprozesse besitzt.

Einen Hinweis auf den zugrunde liegenden biologischen Prozess könnten Erkenntnisse aus dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas bieten. Hier zeigten Feldmann *et al.* bereits im Jahre 2007, dass in Zellen mit einer hohen ALDH-Expression die Signalaktivität entlang des sonic hedgehog- (SHH-)Signalweges heraufreguliert ist (Feldmann *et al.*, 2007). Weitere Arbeiten zeigen in dieser

Zellpopulation eine erhöhte Aktivität von Phosphorylierungskaskaden, die mit der Selbsterneuerung von Tumorstammzellen, der epithelial-mesenchymalen Transition, dem Retinsäuresignalweg, der zellulären Antwort auf Hypoxie und freie Radikale, der Zytokinausschüttung sowie der Zellmigration assoziiert sind; diese Arbeiten wurden von Rodriguez-Torres und Allan zusammengefasst und verbildlicht (Rodriguez-Torres und Allan, 2016) (Abb. 2).

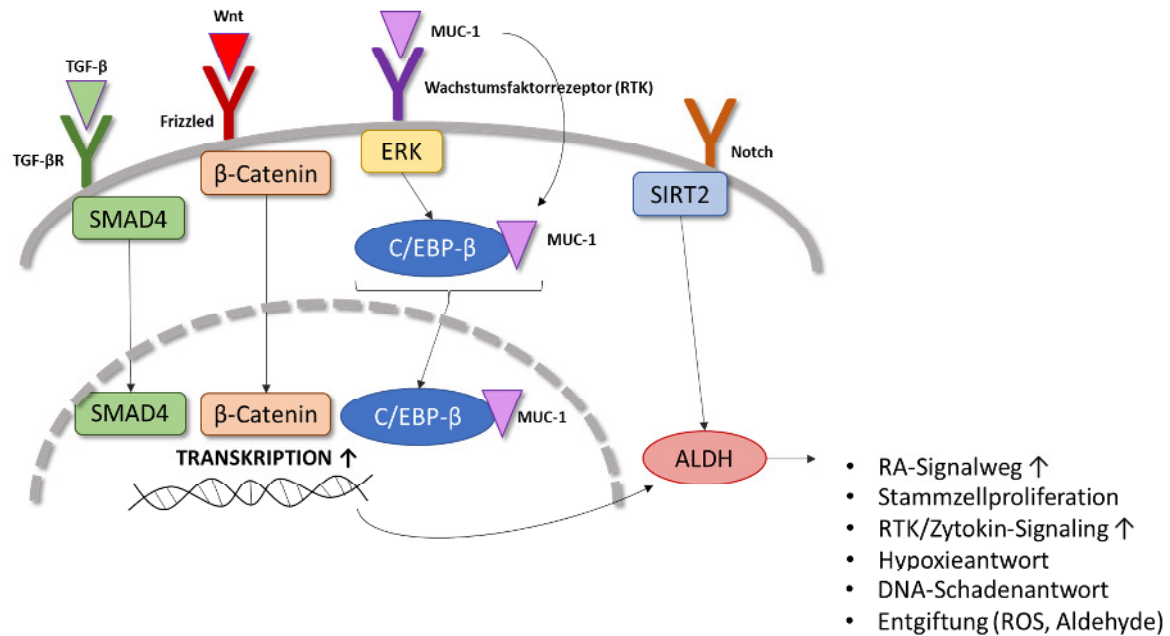


Abbildung 2: Übersicht über ALDH-abhängige, malignitätsfördernde Signalwege in einer Tumorzelle

MUC, Muzin; RTK, Rezeptortyrosinkinase; ERK/EBP, *extracellular signal-related kinase/-binding protein*; Wnt, *wingless/integrated-1*; TGF, *transforming growth factor*; SMAD, *Sma/mothers against decaplegic*; SIRT, *NAD-dependent deacetylase sirtuin-1*; RA, Retinsäure; ROS, freie Sauerstoffradikale. Eigene Abbildung modifiziert nach (Rodriguez-Torres und Allan, 2016)

1.5 Ziel der Arbeit

Das Glioblastom gehört zu den tödlichsten Tumorerkrankungen und trotz eines besseren Verständnisses der zugrundeliegenden Biologie und molekularen Mechanismen sowie Weiterentwicklungen der Therapie konnten in den letzten Jahren keine wesentlichen Verbesserungen in der Prognose von Patienten mit Glioblastom erreicht werden. Die Aldehyddehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) ist in zahlreichen soliden und hämatologischen Neoplasien überexprimiert und spielt eine zentrale Rolle im tumorfördernden Retinsäuresignalweg sowie bei der Aktivierung von Signalkaskaden, welche Tumorstammzeleigenschaften fördern und zur Invasion und Metastasierung beitragen. Über die Rolle der ALDH1A1 im Glioblastom ist bislang noch wenig bekannt.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es daher, das Expressionsmuster der ALDH1A1 im Glioblastom sowie in weiteren astrozytären Malignomen des ZNS zu untersuchen und mögliche Korrelationen mit klinisch-pathologischen Daten sowie mit möglichen

Stammzeleigenschaften der Tumorzellen zu beleuchten. Weiterhin soll untersucht werden, inwiefern sich die Expression von ALDH1A1 als möglicher prognostischer Biomarker bei Patienten mit Glioblastom eignet. Die Ergebnisse der Arbeit sollen zum einen dazu beitragen, die Biologie des Glioblastoms besser zu verstehen, und zum anderen einen möglichen prognostischen Biomarker identifizieren, der zur besseren Stratifizierung von Patienten mit Glioblastom beiträgt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenpopulation und Tumorgewebeproben

Die Proben aus gesundem menschlichen Gehirn stammen von 3 Feten im Alter von jeweils 10, 14 und 20 Wochen (ganze Hirnschnitte) sowie von zwei Erwachsenen im Alter von 50, 55 und 60 Jahren (rechter frontaler medianer Gyrus sowie rechte Kleinhirnhemisphäre)

In die vorliegende Studie wurden 93 Patienten eingeschlossen, welche die Diagnose „primäres Glioblastom“ zwischen 2005 und 2010 erhielten. Alle Patienten hatten, entsprechend den Vorgaben der zuständigen Ethikkommission, der Verwendung ihrer Daten zugestimmt. Für den initialen Vergleich der Expression mit anderen astrozytären Tumoren wurde noch eine Vergleichskohorte mit pilozytischem Astrozytom WHO Grad I (n = 9), diffusem Astrozytom WHO Grad II (n = 13) und anaplastischem Astrozytom WHO Grad III (n = 24) herangezogen.

Die Diagnosen wurden in allen Fällen von zwei unabhängigen Neuropathologen durch lichtmikroskopische Evaluation von Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Schnitten der entsprechenden Neoplasie gestellt. Die Diagnosekriterien basierten auf den jeweils gültigen Klassifikationen der WHO. In Bezug auf die Glioblastome wurden in 56 Fällen neurochirurgische Resektate sowie in 37 Fällen das Material stereotaktischer Biopsien ausgewertet. Alle Patienten wurden am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität (München, Deutschland) diagnostiziert und behandelt. Durch die Anbindung der Klinik an das deutsche Gliomnetzwerk (DGM) erfolgte eine Aufnahme der Patienten in die zentrale Datenbank des DGM sowie eine Einbindung in verschiedene klinische Studien.

Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten mit Glioblastom betrug 61 Jahre, das mediane Alter 62 Jahre, die Patienten waren zum Zeitpunkt der Tumordiagnose zwischen 33 und 86 Jahre alt. 33 der Patienten waren weiblich, 60 Patienten männlich, dies entspricht einem Geschlechterverhältnis (m:w) von 1,8:1. Die Zeit der klinischen Nachsorge reichte von null bis 61 Monaten (Tod des Patienten bzw. der Endpunkt der Studie wurden als Ende der klinischen Nachsorge festgelegt). Im Durchschnitt ergab sich ein Follow-up von 16 Monaten bei einem Median von 12 Monaten. 80 Patienten erlagen ihrer Krankheit im Laufe der Studie, zum Studienendpunkt waren 13 der 93 Patienten am Leben. Die Methylierung von *MGMT*

(O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) wurde bei 77 der ausgewählten Patienten untersucht, von denen 33 einen methylierten Promotor aufwiesen. 71 Patienten wurden gemäß dem EORTC/NCIC-Schema mit Temozolomid behandelt; 17 Patienten (insbesondere vor 2005 diagnostizierte Fälle) wurden mit isolierter Radiotherapie behandelt. Fünf Patienten erhielten aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes (Karnofsky-Index <70) keine spezifische Therapie (*best supportive care*).

2.2 Datenerhebung

Anhand von histopathologischen Befunden, Arztbriefen, Bildgebungsbefunden und Chemotherapieprotokollen sowie vor allem mithilfe der Datenbank des deutschen Gliomnetzwerks wurden Patienten ausgewählt, welche die folgenden Voraussetzungen erfüllten (Einschlusskriterien):

- Histologisch gesicherte Diagnose des zu untersuchenden Tumors (primäre Glioblastome, aber auch pilozytische, diffuse, anaplastische Astrozytome sowie Oligodendrogliome)
- ausreichend Gewebematerial für weitergehende histologische Analysen vorhanden

Folgende Daten wurden erhoben:

- Alter und Geschlecht der Patienten
- Zeitpunkt der Primärdiagnose
- Gesamtüberlebenszeit
- progressionsfreie Überlebenszeit
- Anzahl der chirurgischen Interventionen
- MGMT Status
- Karnofsky-Index
- Bestrahlungszyklen (RCTX) und Dosis
- Temozolomidtherapie bei RCTX
- Temozolomidtherapie adjuvant (isoliert)

Bei Unklarheiten über den Todeszeitpunkt eines Patienten wurde dieser schriftlich oder telefonisch durch den Hausarzt oder die weitertherapierenden Zentren übermittelt.

2.3 Antikörper und Immunhistochemie

Als primäre Antikörper wurden benutzt:

- Anti-ALDH1 (monoklonal, Maus, BD Biosciences; 1:100),
- Anti-nestin (Chemicon, 1:2000),
- Anti-SOX2 (Chemicon 1:2000) und
- Anti-Phospho-Histon H3 (PHH3, cell signalling, 1:1000).

Als sekundäre Antikörper zur Fluoreszenzmarkierung wurden verwendet:

- Alexa 488 goat anti rabbit und
- Alexa 546, goat anti mouse (beide Invitrogen, 1:300).

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Schnitten nach der DAB-Methode beziehungsweise nach dem untenstehenden Protokoll für die Doppelfärbungen durchgeführt, dabei erfolgten die Färbungen sowohl manuell als auch am automatisierten System (Ventana Benchmark, Ventana, Tucson, USA). Für die Kerngegenfärbungen wurde Hämatoxylin benutzt. Für die Färbungen nach der DAB Methode wurden die Schnitte zunächst in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Hierbei werden auf jeder Stufe zwei Bäder von jeweils 5 Minuten (Ausnahme: erstes Xylolbad 10 Minuten) in folgender Reihe durchgeführt: Xylol, Ethanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%, destilliertes Wasser. Anschließend wurden die Schnitte in 1x TBS-Puffer überführt. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte 5 Minuten bei einem pH-Wert von 6,1 in Zitratpuffer gekocht. Um falsch positive Signale durch endogene Peroxidase-Aktivität des Gewebes zu verhindern, wurden die Schnitte in 3% H₂O₂ in Methanol bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert. Als Detektionsmethode wurde die indirekte *Labeled Streptavidin-Biotin* (LSAB) Methode gekoppelt an eine Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) benutzt. Die primären Antikörper wurden entsprechend der o. a. Daten verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach Bindung des Primärantikörpers an das jeweils darzustellende Epitop wurde der biotinylierte Link für 15 Minuten aufgetragen. Der verwendete Brückenantikörper bindet universell an die Primärantikörper jeglicher Spezies und kann daher bei allen Färbungen verwendet werden. Der HRP-Streptavidin Komplex wurde im dritten Schritt ebenfalls für 15 Minuten inkubiert. Zur Darstellung der Epitope mittels einer Farbreaktion wurde nun das Chromogen hinzugegeben. Die chemische Farbreaktion geschieht hier durch DAB (3`3-Diaminobenzidin) und ergibt eine bräunliche Färbung. Die Farbreaktion lief bei allen Färbungen für 10 Minuten ab und wurde dann mit Leitungswasser beendet. Als Gegenfärbung wurden die Schnitte für 3 Minuten in ein Hämatoxylin-Bad gestellt, um als Kontrast zur spezifisch-immunhistochemischen Färbung die Kerne aller Zellen darzustellen. Abschließend bläuten die Schnitte in heißem Leitungswasser, um überschüssiges Hämatoxylin abzuwaschen.

Für die Doppelfärbungen wurde das Gewebe in Citratpuffer (pH 6) gekocht, um die Antigen-Epitope zu demaskieren. Nachdem die Schnitte mit Wasser gewaschen wurden, wurde die endogene Peroxidase geblockt. Dies erfolgte durch Einwirken von 3% H₂O₂ in Methanol bei Raumtemperatur für 45 Minuten.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde Blockierlösung (5% fötales Kälberserum in PBS) verwendet (fünf Minuten bei RT).

Sämtliche primären Antikörper wurden entsprechend der o. a. Daten verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt und 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei der Fluoreszenzfärbung wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht.

2.3 Statistische Auswertung

Die quantitative ALDH1A1-Expression wurde durch manuelles Zählen der mit dem Antikörper anti-ALDH1A1 markierten Zellen ermittelt, wobei die Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA) verwendet wurde.

Mindestens 1.000 ALDH1A1-markierte Zellen wurden pro Gewebeprobe gezählt, eine Ausnahme stellen die bei 35 Patienten stereotaktisch entnommenen Biopsien dar, bei denen aus Mangel an Material nur mindestens jeweils 200 Zellen pro Probe gezählt werden konnten. Bei der Ermittlung der Expression sämtlicher anderer Marker wurde ebenso verfahren.

Zur grafischen Darstellung wurden Punkt- und Balkendiagramme verwendet.

Anschließend wurden zwei gleich große Gruppen mit hoher bzw. niedriger ALDH1A1-Expression gebildet, wobei eine Expression von 7.0% als Cut-off gewählt wurde. Die Ergebnisse wurden in eine Datenbank eingegeben und mithilfe der Statistik-Software SigmaStat (Systat software GmbH, Erkrath, Deutschland) ausgewertet. Die Gesamtüberlebenszeit und die progressionsfreie Überlebenszeit wurden mithilfe der Methode von Kaplan und Meier grafisch dargestellt und analysiert. Die Multivariatanalyse wurde als *cox proportional hazard model* durchgeführt.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Überlebenszeitdifferenzen zwischen den Untergruppen wurde der Log-Rank-Test gewählt, hier wurde den wissenschaftlichen Standards entsprechend ein p-Wert von kleiner 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

Für den Vergleich mit einer unabhängigen Datenbank wurde auf die **Repository of Molecular Brain Neoplasia Data** (ReMBraNDt) -Datenbank zugegriffen (<http://caintegrator-info.nci.nih.gov/rembrandt>). Hier wurde RNA verarbeitet unter der Verwendung von U1332 plus mRNA Expressions-Chips (Affymetrix), welche über 54000 Proben enthielten und wobei das Expressionslevel von über 47000 Transkripten analysiert wurde.

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression von ALDH1A1 im gesunden menschlichen Gehirn

Um die Expression von ALDH1A1 während der Entwicklung des menschlichen Gehirns zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen ALDH1A1 an Gewebeproben des menschlichen ZNS in verschiedenen pränatalen Stadien durchgeführt.

Das Enzym konnte in keiner Gewebeprobe des Cerebrums oder Cerebellums von 10 bzw. 14 Wochen alten Feten nachgewiesen werden.

Erst in einem 20 Wochen alten menschlichen Gehirn konnte das Vorhandensein von ALDH1A1 nachgewiesen werden, dabei handelte es sich um einige ALDH1A1-positive Zellen in der intermediären Zone der cerebralen weißen Substanz (Abb. 3A und B) sowie einige wenige, gleichmäßig verteilte Zellen im Zerebellum mit multiplen Zellfortsätzen (Abb. 3A und D).

Letztere fanden sich ausschließlich im Kleinhirnwurm, in den Kleinhirnhemisphären hingegen konnte keine Expression nachgewiesen werden. (Abb. 3A). Keine Expression von ALDH1A1 zeigten auch die Zellen der germinativen Matrix des Zerebrums (Abb. 3A und C), die ventrikuläre Zone (Abb. 3A und E) sowie die äußere Körnerzellschicht des Zerebellums (Abb. 3F) als wichtigste Vertreter der Stammzellnischen des embryonalen Gehirns.

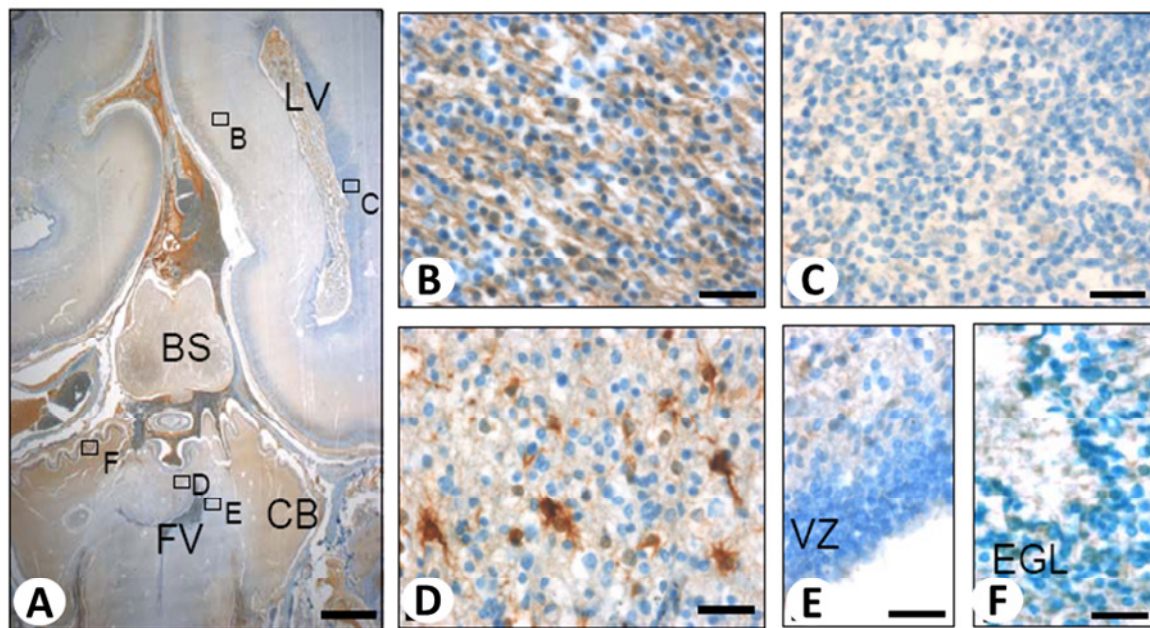


Abbildung 3: Expression von ALDH1A1 während der Gehirnentwicklung (20. SSW)

Leichte ALDH1A1-Expression ist in der fetalen weißen Substanz (intermediäre Zone A, B) aber nicht in der germinativen Matrix des Cerebrums (A, C) nachweisbar. Im Cerebellum ALDH1A1-Expression im Wurm mit kräftiger Färbung von fortsatzreichen Zellen der weißen Substanz (A, D). Keine nachweisbare ALDH1A1-Expression in den Stammzellnischen (A, E, F). LV, lateraler Ventrikel; BS, brain stem (Hirnstamm); FV, fourth ventricle (vierter Ventrikel); VZ, ventrikuläre Zone; EGL, external granular cell layer (äußere Körnerzellschicht); CB, Cerebellum. Maßstab in A: 2,5 mm; in B-F: 20 μ m. (Adam et al., 2012)

Im adulten Gewebe war ALDH1A1 in sämtlichen Schichten der grauen und weißen Substanz nachweisbar (Abb. 4G-N). Alle ALDH1A1-positiven Zellen zeigen hier astrozytäre Fortsätze, wohingegen die kortikalen Neurone sowohl im Zerebrum als auch im Zerebellum gänzlich ALDH1A1-negativ erscheinen (Abb. 4H, K-M).

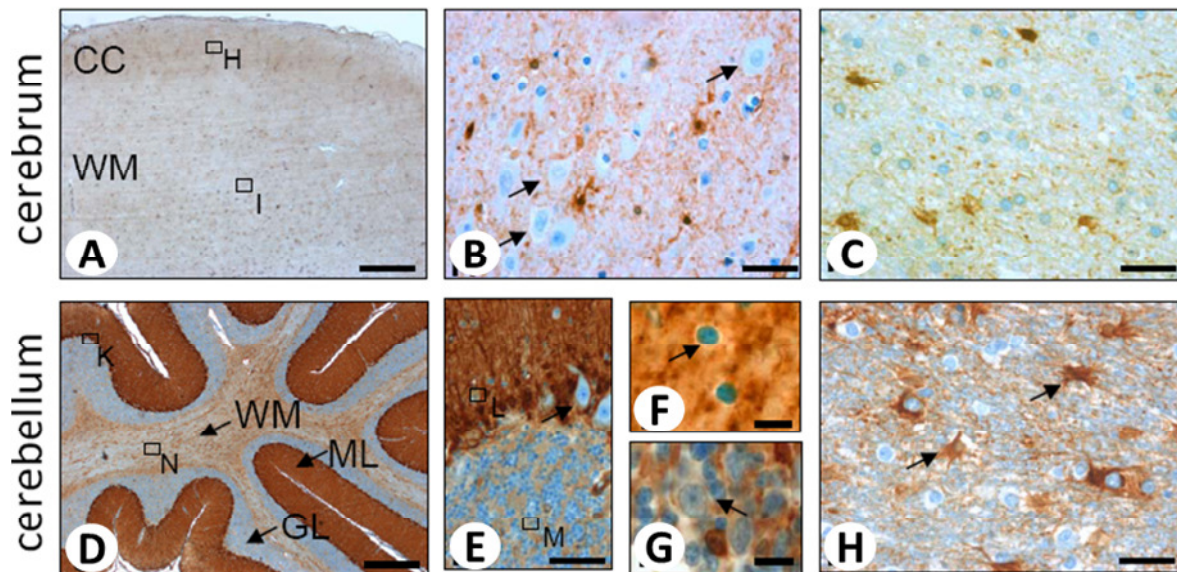


Abbildung 4: Expression von ALDH1A1 im adulten menschlichen Cerebrum (G-I) und Cerebellum (J-N)

ALDH1A1-Expression findet sich in Zellen von astrozytärer Morphologie (A-C), während Neurone negativ für ALDH1A1 bleiben (Pfeil in B). Immunhistologische Färbung des adulten Cerebellums auf ALDH1A1 zeigt eine starke Färbung der Bergmann-Glia (D, E). Purkinje-Zellen (Pfeile in E), Korbzellen (Pfeile in F) sowie Golgi-Zellen (Pfeile in G) zeichnen sich durch einen schmalen zytoplasmatischen Saum ab und exprimieren kein ALDH1A1. In der zerebellären weißen Substanz exprimieren Astrozyten ALDH1A1 (Pfeile in H). CC, cerebraler Cortex; WM, white matter (weiße Substanz); ML, molecular layer (Molekularzellschicht); GL, granular cell layer (Körnerzellschicht). Maßstab in G und J: 100 μ m, in H, I, K, N: 20 μ m, in L, M: 10 μ m.

Um die ALDH1A1-exprimierenden Zellen besser charakterisieren und mögliche Rückschlüsse auf die Zellentität ziehen zu können, wurden Doppelfärbungen an menschlichem Kleinhirngewebe durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die ALDH1A1-positiven Zellen auch saures Gliafaserprotein (GFAP) und S100 exprimieren, die als Marker astroglialer Differenzierung gelten (Abb. 5A und B). Im Gegensatz dazu war keine Co-Expression von ALDH1A1 und OLIG2, einem Marker für Oligodendrozyten, nachweisbar. Dies lässt darauf schließen, dass letztere kein ALDH1A1 exprimieren (Abb. 5C).

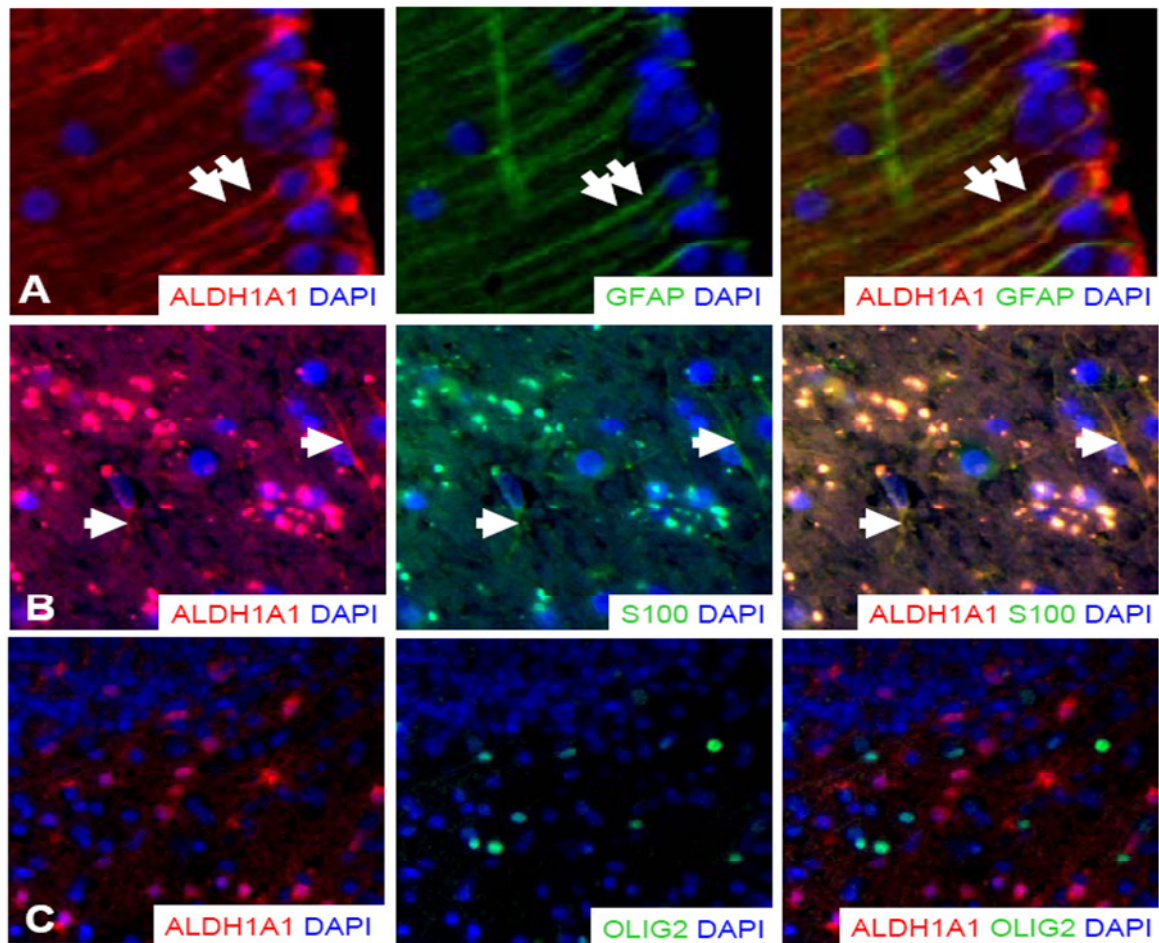


Abbildung 5: Doppelfärbungen zur genaueren Differenzierung der ALDH1A1-positiven Zellpopulation im zerebellären Kortex.

A und B, ALDH1A1-positive Zellen der reifen Bergmann-Glia zeigen Co-expression von GFAP und S100. C, die Doppelfärbung auf ALDH1A1 und OLIG2 färbt zwei distinkte Zellpopulationen.

In einer anschließend analysierten Reihe von Oligodendrogliomen (n = 8) zeigte sich, dass die ALDH1A1 Färbung zum Großteil auf einige wenige, hoch verzweigte Zellen beschränkt ist, deren Ursprung eher astrozytär erscheint (Abb. 6).

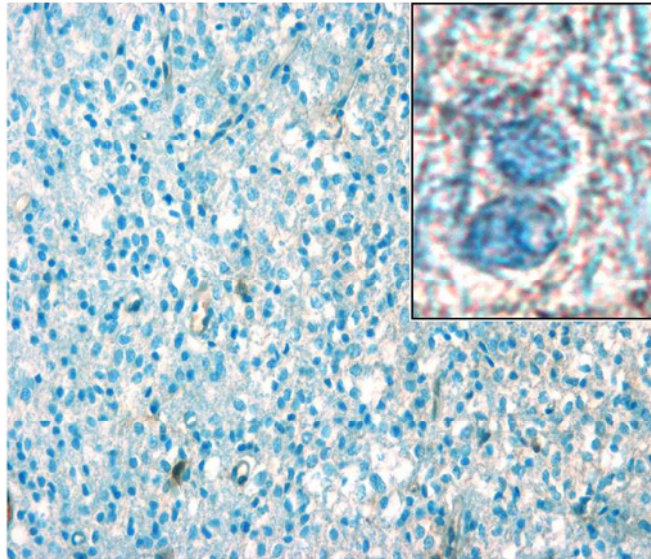


Abbildung 6: Expression von ALDH1A1 in Oligodendrogliomen.

Färbereaktivität nur in einzelnen, astrozytär imponierenden Zellen.

Ebenso wurde ein Fall von multipler Sklerose mit großen, reaktiven Astrozyten untersucht, hier konnte praktisch kein ALDH1A1 nachgewiesen werden (Abb. 7).

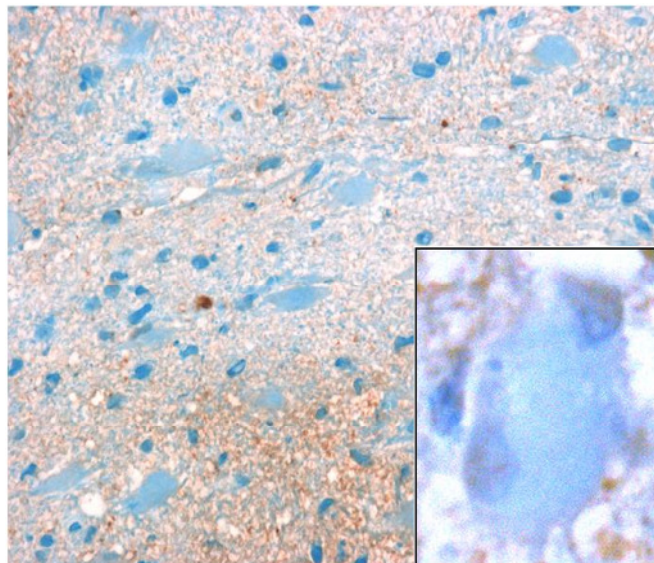


Abbildung 7: Expression von ALDH1A1 bei einem Patienten mit Multipler Sklerose (MS)

Keine wesentliche Färbereaktivität in den großen, astrozytär imponierenden Zellen.

3.2 Expression von ALDH1A1 in humanen Glioblastomen

Im nächsten Schritt wurde das Vorhandensein von ALDH1A1 in verschiedenen menschlichen Gliom-Proben mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden untersucht (Abb. 8). Folgende Tumoren wurden in die Analyse eingeschlossen:

- pilozytisches Astrozytom WHO Grad I (n = 9)
- diffuses Astrozytom WHO Grad II (n = 13)
- anaplastisches Astrozytom WHO Grad III (n = 24)
- Glioblastoma multiforme WHO Grad IV (n = 93)

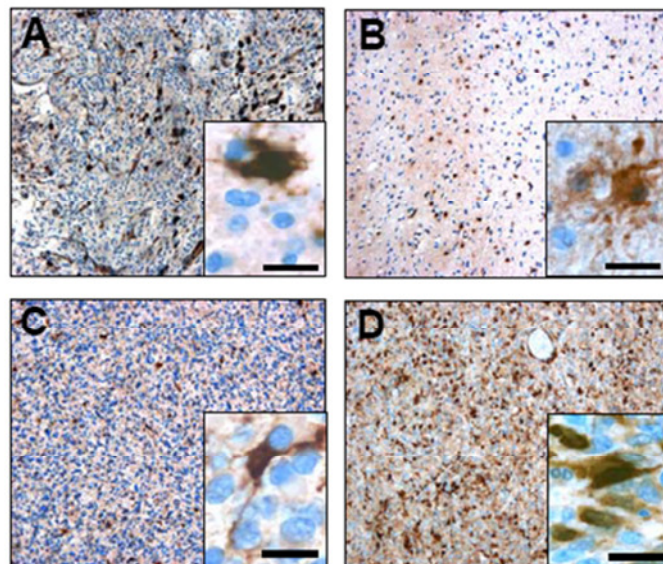


Abbildung 8: Expression von ALDH1A1 in verschiedenen astrozytären Tumoren

In Astrozytomen verschiedener Malignitätsstufen konnte ALDH1A1 Expression nachgewiesen werden. pilozytisches Astrozytom WHO Grad I (A), diffuses Astrozytom WHO Grad II (B), anaplastisches Astrozytom WHO Grad III (C) Glioblastoma multiforme WHO Grad IV(D).

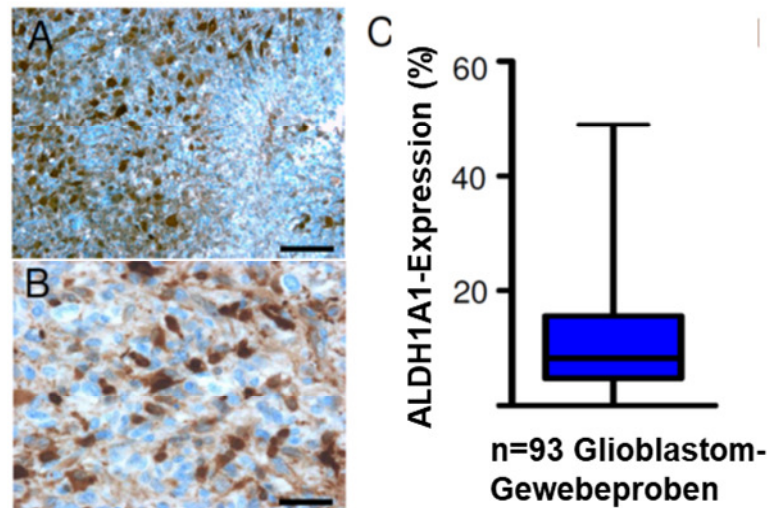


Abbildung 9: ALDH1A1-Expression in der Gruppe der Glioblastome (n = 93)

A und B, repräsentative immunhistochemische Färbungen; C, Verteilung der relativen Häufigkeit positiver Zellen in (%) in der 93 Fälle umfassenden Kohorte.

99% der Glioblastome WHO Grad IV (92/93) zeigten eine Anfärbbarkeit mit dem Antikörper gegen ALDH1A1 (0-49% positive Zellen, mittlere ALDH1A1 Expression 11,1%, mediane Expression von 8,3%). Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Färbeintensitäten in der Glioblastomgruppe noch einmal detailliert aufgeschlüsselt.

Eine relative Zunahme der ALDH1A1 Expression in den verschiedenen Tumorentitäten in Bezug auf die Gesamtzellmenge konnte in dieser Kohorte nicht festgestellt werden. (Daten nicht gezeigt).

Um die ALDH1A1-positiven Zellen in der Tumormasse besser abgrenzen zu können, wurden an drei Patientenschnitten wiederum Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen saures Gliafaserprotein (GFAP) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass insgesamt 103/125 (82 %) der ALDH1A1-positiven Zellen zudem GFAP exprimierten, was auf eine astrozytäre Differenzierung der markierten Tumorzellen hinwies.

Ebenso wurden bei drei Schnitten Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 (PHH3) eingesetzt. PHH3 gilt als Marker für Zellen, die sich in der M-Phase des Zellzyklus befinden. Ziel des Versuchs war also herauszufinden, ob ALDH1A1-positive Zellen auch mitotische Aktivität zeigen. Nachdem sich in Summe nur 14/732 (1,9%) aller ALDH1A1-exprimierenden Tumorzellen auch positiv für PHH3 zeigten,

kann von einer eher niedrigen Mitoserate der ALDH1A1-positiven Zellen ausgegangen werden. Schließlich wurden Co-expressionsstudien an jeweils drei Patientenschnitten mit Markern durchgeführt, die zur Identifizierung von Gliom-Stammzellen geeignet sind: Nestin, Olig2 und SOX2. Dabei stellte sich heraus, dass nur eine Minderheit der ALDH1A1-positiven Zellen eine Co-expression der genannten Marker zeigte. So exprimierten 21/157 (13%) der ALDH1A1-positiven Zellen auch Olig2, 42/381 (11%) SOX2 und 34/178 Zellen (19%) co-exprimierten Nestin (Abb. 10).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Mehrheit der ALDH1A1-positiven Zellen keine Stammzeleigenschaften zeigt.

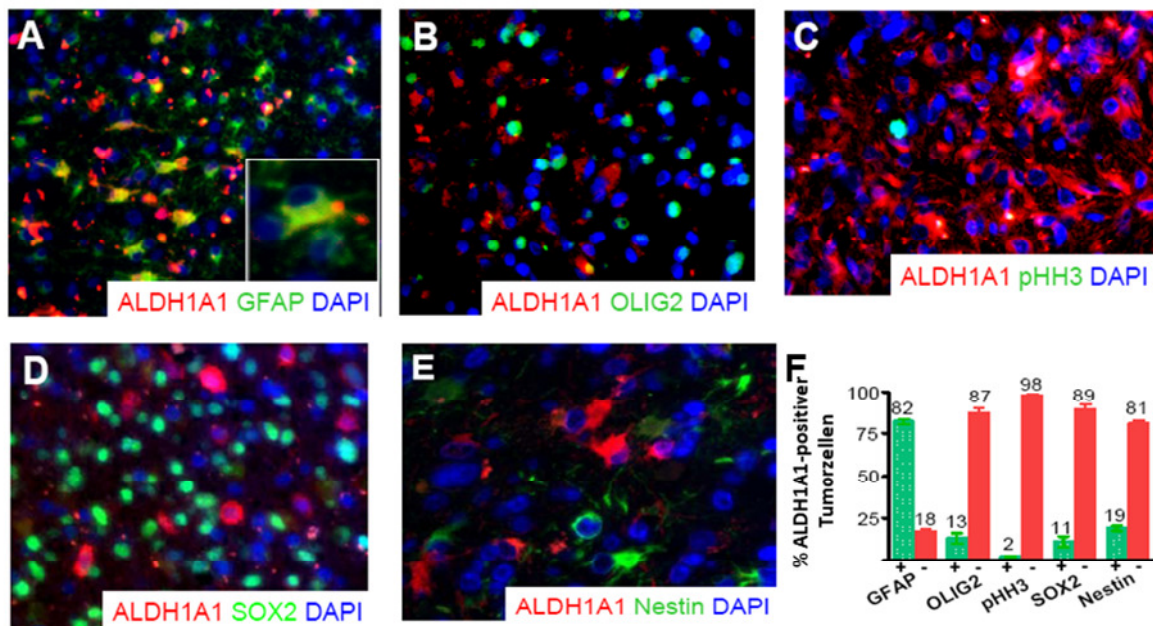


Abbildung 10: Koexpressionsstudien durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.

A, 82% der Zellen zeigen ALDH1A1/GFAP-Co-expression. B-E, eine Co-expression von ALDH1A1 mit Olig2, PHH3, SOX2 oder Nestin ist nur in einem kleinen Anteil der Zellen (2-19%) zu beobachten. F, Übersicht über die relative Häufigkeit ALDH1A1-positiver bzw. -negativer Zellen bei Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen die auf der x-Achse aufgetragenen Marker.

3.3 Nutzen von ALDH1A1 als prognostischer Biomarker

Um herauszufinden, ob die ALDH1A1-Expression mit einem besseren oder schlechteren klinischen Ergebnis der Patienten assoziiert ist, wurden zwei gleich

große Patientengruppen erstellt, die sich in der Expression von ALDH1A1 unterschieden. 54 Patienten wiesen Tumoren mit einer hohen ALDH1A1-Expression auf, während 39 Patienten eine schwache bis ausbleibende Färbereaktivität auf den Antikörper gegen ALDH1A1 zeigten. Die unterschiedlichen Expressionslevel wurden mittels log-rank-Test durchgerechnet, wobei ein cut-off von 7% ALDH1A1-positiver Zellen die höchste prognostische Aussagekraft besaß. Die klinisch-pathologischen Daten sowie der klinische Verlauf aller Patienten sind im tabellarischen Anhang (7.) zusammengefasst.

Für beide Gruppen wurde Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellt. Hier zeigte sich, dass Patienten mit einer höheren ALDH1A1-Expression ($>7\%$) ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben zeigten als Patienten mit nur schwach ALDH1A1-positiven Glioblastomen ($<7\%$) ($p<0,01$) (Abb. 11).

Die Zwei-Jahres-Überlebensrate betrug 31% bei Patienten mit hoher Expression, aber nur 11% bei den anderen Patienten.

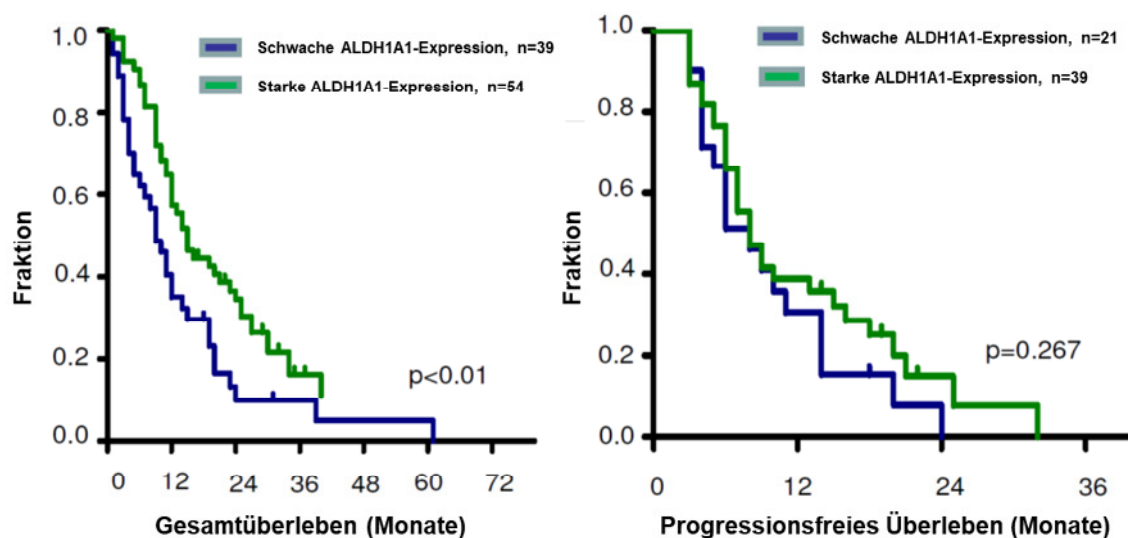


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse (links) sowie progressionsfreies Überleben (rechts) für Patienten mit hoher ($> 7\%$ positive Zellen) und niedriger ($< 7\%$ positive Zellen) Expression von ALDH1A1. Es zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten mit hoher ALDH1A1-Expression ($p<0,01$). Für das progressionsfreie Überleben zeigte sich kein signifikanter Effekt.

Um diese Daten an einem unabhängigen Patientenkollektiv zu überprüfen, wurde auf die **Repository of Molecular Brain Neoplasia Data (ReMBraNDt)** -Datenbank zugegriffen (<http://caintegrator-info.nci.nih.gov/rembrandt>) und die Aussagekraft der ALDH1A1-Genexpression als prognostischer Biomarker untersucht. Erneut zeigte

sich bei den Patienten mit hoher ALDH1A1-mRNA-Expression ein Trend zu besserem Überleben ($p=0,071$) (Abb. 12). Die Zwei-Jahres-Überlebensrate betrug hier 30% bei Patienten mit hoher Expression, aber nur 18% bei den anderen Patienten.

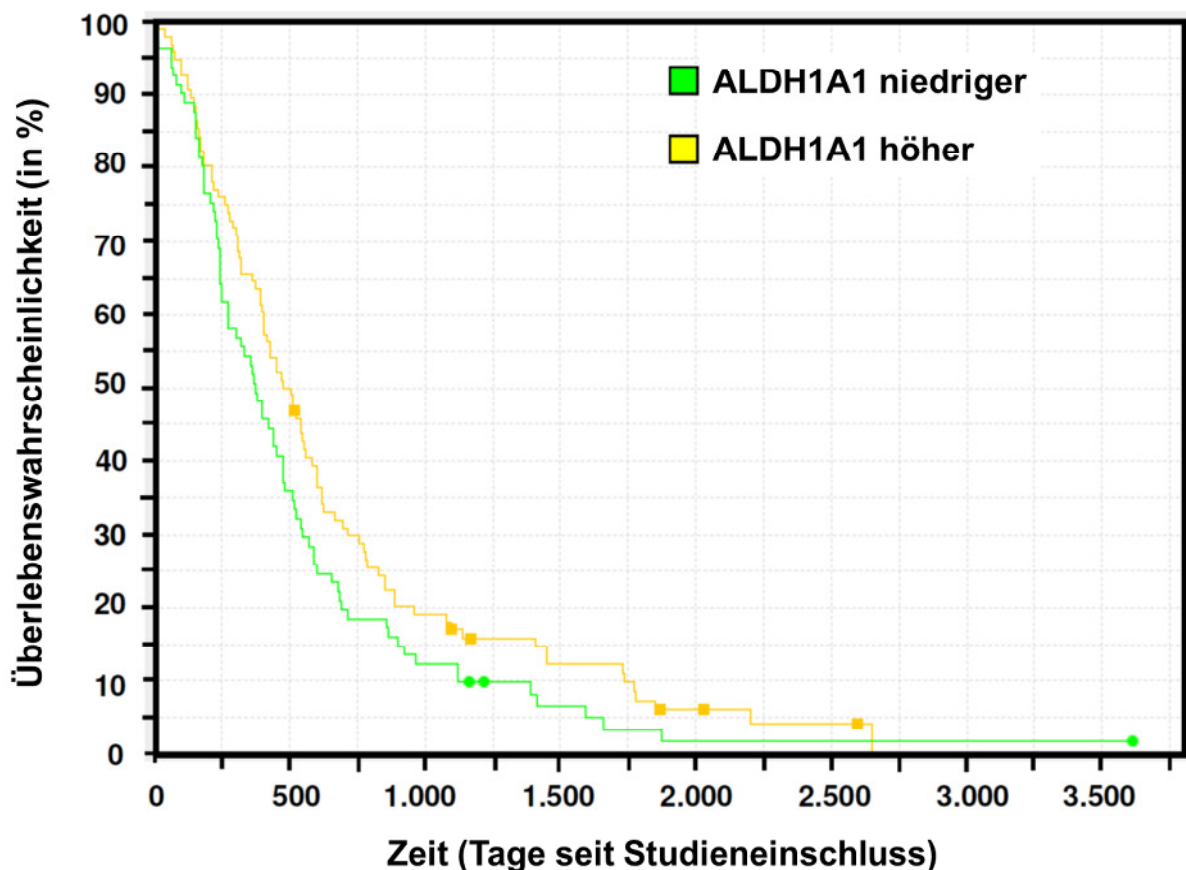


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse für Patienten mit hoher und niedriger Genexpression von ALDH1A1. ReMBraNDt kategorisiert Patienten in heraufregulierte, mittlere und herunterregulierte Genexpression (Affymetrix Reporter: 212224_at; Lowest Geometric Mean Intensity). Heraufregulierte Expression (>2 fach) wurde nur in vier Patienten beobachtet und nicht in die statistische Analyse mit einbezogen. Mittlere Expression wurde als das höhere und herunterregulierte Expression als das niedrigere Expressionsniveau festgelegt. Die Patienten mit höherer Expression zeigten einen Trend zu günstigerem Überleben ($p=0,071$).

Neben dem Patientenalter stellt der MGMT-Methylierungsstatus einen wichtigen Prädiktor für das Outcome von Patienten mit Glioblastom dar. Um zu untersuchen, ob die Expression von ALDH1A1 einen prognostischen Biomarker unabhängig vom MGMT-Methylierungsstatus oder vom Patientenalter darstellt, wurde eine multivariate

Analyse unter Einbeziehung dieser Kriterien mithilfe eines *cox proportional hazard model* durchgeführt. In diese erste Analyse wurden alle Patienten eingeschlossen. Es zeigte sich, dass eine hohe Expression von ALDH1A1 einen prognostischen Biomarker unabhängig vom Patientenalter sowie vom MGMT-Methylierungsstatus darstellt ($p < 0,01$). Die Werte für den MGMT-Methylierungsstatus sowie für das Patientenalter betrugen jeweils 0,024 (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnisse der Cox'schen Multivariatanalyse in Bezug auf das Gesamtüberleben

Variable	Hazard ratio	p-Wert
MGMT-Promotormethylierung	0,311 (0,174 – 0,555)	<0,001
ALDH1A1	0,483 (0,288-0,808)	<0,001
Alter des Patienten	1,805 (1,080-3,015)	0,024

Die Multivariatanalyse wurde unter denselben Annahmen auch noch für jene Patientensubgruppe isoliert durchgeführt, welche eine Therapie nach den EORTC-Leitlinien erhalten hatten (Radiotherapie und Temozolomid) ($n=71$). Erneut zeigte sich ein signifikant günstigeres Gesamtüberleben für die Patienten mit hoher ALDH1A1-Expression ($n=42$) im Vergleich zu jenen Patienten mit niedriger ALDH1A1-Expression ($n=29$) ($p < 0,001$). Eine erneut durchgeführte Multivariatanalyse bestätigte die Ergebnisse aus der Gesamtkohorte, wonach die ALDH1A1-Expression einen unabhängigen prognostischen Biomarker darstellt ($p=0,041$).

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Expressionsmuster der ALDH1A1 im gesunden menschlichen Gehirn sowie in semimaligen und malignen Tumoren des Gehirns zu untersuchen, um weitere Einblicke in die Zusammensetzung und Biologie sowie Informationen über die funktionelle Rolle des Enzyms zu erhalten. Weiterhin sollte die immunhistochemisch nachgewiesene Expression von ALDH1A1 im Hinblick auf ihre mögliche Bedeutung als prognostischer Biomarker untersucht werden.

4.1 Expressionsmuster von ALDH1A1 im menschlichen Gehirn

Um in einem ersten Schritt die Expression von ALDH1A1 während der Entwicklung des menschlichen Gehirns zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen ALDH1A1 an Gewebeproben des menschlichen ZNS in verschiedenen pränatalen Stadien durchgeführt.

Zunächst wurden dazu Schnitte aus dem Zerebrum sowie Zerebellum von 10 bzw. 14 Wochen alten Feten verwendet, wobei das Enzym in keiner der Gewebeproben nachgewiesen werden konnte. Dieses Resultat weist darauf hin, dass zu frühen Entwicklungsstadien das Enzym noch keine wesentliche Rolle zu spielen scheint, was vor dem Hintergrund der beschriebenen Entgiftungs- und Abbaufunktion der ALDH1A1 plausibel ist (Lind *et al.*, 2008). Erst in einem 20 Wochen alten menschlichen Gehirn konnte dann eine Expression von ALDH1A1 in einigen Zellen der intermediären Zone der weißen Substanz sowie in einigen wenigen Zellen des Kleinhirnwurms nachgewiesen. Die germinative Matrix des Großhirns, die Ventrikulärzone sowie die äußere Körnerzellschicht des Kleinhirns zeigten hingegen keine Reaktivität mit dem Antikörper gegen ALDH1A1. Dies ist von besonderem Interesse, da diese Regionen Stammzellnischen im sich entwickelnden Gehirn darstellen und die vorliegende Literatur zeigt, dass die ALDH1A1 als ein möglicher Marker für Tumorstammzellen infrage kommt (Calabrese *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Allerdings ist hervorzuheben, dass sich das biologische Profil von physiologischen Stammzellen und neuroepithelialen Tumorstammzellen unterscheidet; den weitgehend entdifferenzierten Malignomen ist es nur möglich, einige Stammzeleigenschaften anzunehmen (unter anderem die Fähigkeit zur Selbsterneuerung), nicht aber, sich komplett zu neuronalen oder

neuroepithelialen Stammzellen umzuwandeln. Dies könnte mögliche Expressionsunterschiede der untersuchten Proteine zwischen dem Tumorstammzellphänotyp und den hier untersuchten Stammzellnischen erklären.

Im Gegensatz zum sich entwickelnden Gehirn war ALDH1A1 im Gehirn des Erwachsenen in sämtlichen Schichten der grauen und weißen Substanz nachweisbar. Rein morphologisch erschienen die ALDH1A1-positiven Zellen astrozytär differenziert, wohingegen die standardmorphologisch eindeutig neuronal differenzierten Zellen ALDH1A1-negativ erschienen. Im Zerebellum färbten sich ebenfalls glial differenzierte Zellen an, die neuronale Zellpopulation (Purkinje-Zellen, Korb- und Golgizellen) zeigte erneut kein Färbesignal für ALDH1A1. Interessanterweise wurde mittlerweile belegt, dass ALDH1A1 in dopaminergen Neuronen des ventralen Mesencephalons nachgewiesen werden kann, wo es eine zentrale Rolle bei Entgiftungsprozessen spielt; ein Verlust der ALDH1A1 in diesen Neuronen kann zu Dysfunktionen des DA-Stoffwechsels und damit zu neurologischen Erkrankungen aus dem Parkinson-Formenkreis beitragen (Anderson *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015).

Um nähere Hinweise darauf zu erhalten, welcher Zellpopulation die ALDH1A1-exprimierenden Zellen entsprechen, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen an Kleinhirngewebe vorgenommen. Hierbei zeigte sich, dass die ALDH1A1-positiven Zellen auch saures Gliafaserprotein (GFAP) und S100 co-exprimierten. Diese Proteine gelten als Marker astroglialer bzw. astrozytärer Differenzierung (Rickmann und Wolff, 1995; Takizawa *et al.*, 2008). Eine Co-expression von ALDH1A1 und OLIG2 war hingegen nicht nachweisbar; OLIG2 gilt als Marker für oligodendrogliale Differenzierung (Ligon *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2011).

Zusammen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die ALDH1A1-exprimierenden Zellen im zentralen Nervensystem astrozytärer Differenzierung sind bzw. Astrozyten entsprechen. Die ALDH1A1-Expression blieb dabei auf differenzierte Astroglia beschränkt, in Neuronen, neuronalen oder anderen Vorläuferzellen war keine ALDH1A1-Expression nachweisbar.

Um zu untersuchen, ob dies auch für Tumoren des jeweiligen Ursprungsgewebes gilt, führten wir immunhistochemische Färbungen auch an Oligodendrogliomen durch, bei denen wir dann kein positives Färbesignal erwarteten. Im Einklang mit

unserer Hypothese färbten sich in diesen Fällen auch jeweils nur die vereinzelt eingestreuten, astrozytär differenzierten Zellen mit dem Antikörper gegen ALDH1A1 an. Dies bestätigt die Annahme, dass sich die Expression der ALDH1A1 auf Astrozyten und astrozytär differenzierte Neoplasien beschränkt.

Die Restriktion der ALDH1A1-Expression auf die astrozytäre Differenzierungslinie wurde nahezu zeitgleich zur Publikation unserer Ergebnisse auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Campos *et al.*, 2011).

Schließlich untersuchten wir, ob auch in entzündlich verändertem ZNS-Gewebe eine Expression von ALDH1A1 nachweisbar ist. Hierzu färbten wir histologische Schnitte von Hirngewebe eines Patienten mit multipler Sklerose mit einem Antikörper gegen ALDH1A1, konnten jedoch in reaktiv-entzündlich imponierenden, großen Astrozyten oder astrozytenähnlichen Zellen kaum ALDH1A1 nachweisen. Es ist unklar, ob der in diesem Fall zugrundeliegende Entzündungsprozess die Expression von ALDH1A1 herunter regulierte oder ob die großen astrozytenähnlichen Zellen eine andere Differenzierungsrichtung einschlagen, in deren Verlauf die Expression von ALDH1A1 verloren geht. Eine tierexperimentelle Studie an Lebergewebe zeigte, dass in der Leber eine Entzündungsreaktion zu einer Herabregulation der ALDH1A1-Expression auf mRNA-Ebene führt (Ito *et al.*, 2014). Im Gegensatz hierzu scheint es bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zu einem Expressionsanstieg der ALDH1A1 in intestinalen Makrophagen zu kommen (Sanders *et al.*, 2014).

In jedem Fall erschien es uns – bei nachgewiesener stabiler Expression von ALDH1A1 entlang der astrozytären Differenzierungslinie – sinnvoll, unsere Untersuchungen zur Expression und funktionellen Rolle von ALDH1A1 auf maligne astrozytäre Tumoren des Zentralnervensystems auszuweiten.

4.2 Expression von ALDH1A1 in malignen astrozytären ZNS-Tumoren

Im nächsten Schritt wurde das Vorhandensein von ALDH1A1 in Gewebeproben von astrozytären Hirntumoren untersucht. In die Untersuchung eingeschlossen wurden pilozytische Astrozytome, diffuse Astrozytome, anaplastische Astrozytome und Glioblastome. Somit waren alle WHO-Grade (I-IV) in der Untersuchung vertreten. Als Ergebnis zeigte sich, dass in den Tumoren der WHO-Gruppen I-III eine heterogene Expression der ALDH1A1 zu beobachten war. Im Glioblastom färbten sich zwischen

0 und 49% der Tumorzellen an. Das mittlere/mediane Expressionsniveau pendelte sich bei ca. 10% angefärbten Zellen ein. Eine relative Zunahme der ALDH1A1 Expression in den verschiedenen Tumorentitäten in Bezug auf die Gesamtzellmenge konnte in dieser Kohorte nicht festgestellt werden.

Dies steht im Widerspruch zu Daten aus anderen Tumorentitäten, in denen eine starke Expression der ALDH1A1 mit einem aggressiveren Tumorphänotyp und kürzeren Überleben der Patienten vergesellschaftet war (Russo *et al.*, 2002; Sládek *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010; Kahlert *et al.*, 2011; Rodriguez-Torres und Allan, 2016).

Im nächsten Schritt wurde innerhalb der 93 Fälle umfassenden Gruppe von Glioblastomen mit starker Expression von ALDH1A1 untersucht, welche Zellpopulation innerhalb des Tumors für dieses hohe Expressionsniveau verantwortlich ist. Um dies herauszufinden, wurden erneut Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass es eine hohe Co-expression von ALDH1A1 und saurem Gliafaserprotein (GFAP) gab, was die astrozytäre Differenzierung der ALDH1A1-positiven Glioblastomzellen unterstreicht (Takizawa *et al.*, 2008).

Anschließend wurde eine Doppelfärbung gegen ALDH1A1 und PHH3 durchgeführt, um herauszufinden, ob die ALDH1A1-positiven Zellen auch Proliferationsaktivität zeigen. PHH3 färbt die Zellkerne von in Zellteilung befindlichen Zellen ausschließlich in der M-Phase an und zeigt daher eine spezifischere Markierung der Proliferationskinetik als beispielsweise Ki-67 (Nasr und El-Zammar, 2008).

Es ergab sich, dass lediglich knapp 2% der Zellen eine Doppelmarkierung für ALDH1A1 und PHH3 zeigten, was gegen die Hypothese spricht, dass diese Zellen eine hohe Proliferationskinetik aufweisen. Diese Entdeckung würde allerdings gegen die Annahme sprechen, dass ALDH1A1 insbesondere in neuroepithelialen bzw. astrozytären Tumorstammzellen exprimiert werden, da diese eine hohe Proliferationsaktivität zeigen müssten, da sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen (Singh *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2012).

Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurden weitere Co-expressionsstudien mit Markern durchgeführt, die zur Identifizierung von Stammzellen der neuralen bzw. glialen Differenzierung geeignet sind: Nestin, Olig2 und SOX2. Nestin ist ein durch

Vorarbeiten anderer Autoren definierter Marker neuraler Stammzellen (Yuan *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2006). Olig2 markiert hingegen Zellen der oligodendroglialen Differenzierungslinie im ZNS (Ligon *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2011); SOX2 schließlich markiert Gliomstammzellen (Gangemi *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2011).

Es stellte sich heraus, dass nur eine Minderheit der ALDH1A1-positiven Zellen eine Co-expression der genannten Marker zeigte; es war keine wesentliche Co-expression von ALDH1A1 mit Nestin, Olig2 und SOX2 nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Mehrheit der ALDH1A1-positiven Zellen keine Stammzeleigenschaften zeigt. Als Einschränkung der hier durchgeführten Studie ist allerdings anzumerken, dass eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung von ALDH1A1 und CD133 (Prominin-1) nicht vorgenommen wurde, obwohl auch CD133 als zuverlässiger Marker von Tumorstammzellen im Glioblastom beschrieben wurde (Zeppernick *et al.*, 2008). Bei der Vielzahl der untersuchten Marker und der nachgewiesenen niedrigen Proliferationsaktivität scheint es allerdings unwahrscheinlich, dass die ALDH1A1-exprimierende Zellpopulation Stammzeleigenschaften aufweist.

Dieses Resultat widerspricht Ergebnissen aus anderen Tumorentitäten. So wurde beispielsweise im Prostatakarzinom, im Ovarialkarzinom und auch im Mammakarzinom eine starke Expression der ALDH1A1 in den jeweiligen Tumorstammzellen beschrieben (Li *et al.*, 2010; Ma und Allan, 2011; Liao *et al.*, 2014). Es ist allerdings anzumerken, dass sich die Definition einer Tumorstammzelle in den unterschiedlichen Organen und auch in der jeweils angewendeten Definition stark unterscheiden kann. Während einige Autoren experimentell die Fähigkeit einer putativen Tumorstammzellpopulation zur Tumorentstehung, beispielsweise im Tiermodell, untersuchen, wurde in anderen Arbeiten lediglich ein Oberflächenmarker untersucht, der laut älteren vorangegangenen Arbeiten kennzeichnend für die jeweilige Tumorstammzellpopulation sei. Hieraus resultiert eine nur bedingte Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den verschiedenen Arbeiten und auch zwischen den jeweiligen Organsystemen; manchmal können auch widersprüchliche Resultate auftreten. Dieses Problem ist in der Tumorbilogie hinlänglich bekannt und wurde in vorliegenden Übersichtsarbeiten bereits eingehend diskutiert (Tan *et al.*, 2006; Shipitsin und Polyak, 2008; Kreso und Dick, 2014). In jedem Fall ist es möglich und scheint aufgrund der von uns erhobenen Befunde auch wahrscheinlich, dass ein

Großteil der malignen Zellen im Glioblastom ALDH1A1 exprimiert, es sich bei diesen Zellen aber nicht um die Tumorstammzellen handelt. Vielmehr ist im Glioblastom eine viel breitere Expression des Enzyms zu beobachten, wobei es sich bei den exprimierenden Zellen vermutlich um weiter ausdifferenzierte Tumorzellen handelt. Dies stellt infrage, ob grundlegende ALDH1A1-vermittelte Signalwege, wie beispielsweise der Retinsäuresignalweg, von wesentlicher Bedeutung für die Tumorgenese des Glioblastoms sind (Rodriguez-Torres und Allan, 2016). Unsere Daten sprechen dagegen, auch wenn funktionelle (In-Vitro-)Untersuchungen zur Aktivität des Retinsäuresignalweges im Glioblastom von uns im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurden. Allerdings zeigen erste klinische Studien auch ein allenfalls limitiertes Ansprechen von Glioblastomen auf Therapien, die auf den Retinsäurestoffwechsel abzielen (See *et al.*, 2004; Butowski *et al.*, 2005).

Unsere Ergebnisse sowie die Ergebnisse dieser Studien sprechen eher dafür, dass die relevante Funktion der ALDH1A1 im Glioblastom in der Entgiftung liegen könnte und dass die breite Expression der ALDH1A1 dann ein Schutzmechanismus der Tumorzellen gegen schädliche äußere Einflüsse wäre.

4.3 Nutzen von ALDH1A1 als prognostischer Biomarker

Um die prognostische Bedeutung der ALDH1A1-Expression im Glioblastom näher zu beleuchten, wurden daher Überlebensanalysen durchgeführt, bei denen die Patienten nach ALDH1A1-Expression stratifiziert wurden. Es ist allerdings hervorzuheben, dass der Median des Expressionsniveaus mit 8,3 % positiv angefärbter Tumorzellen relativ niedrig lag, was bedeutet, dass auch in der Gruppe der Patienten mit hoher Expression immer noch zahlreiche Tumoren eingeschlossen waren, bei denen deutlich weniger als die Hälfte der Tumorzellen das Enzym exprimierte.

Es zeigte sich ein schwacher, doch signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit höherer ALDH1A1-Expression; die Zwei-Jahres-Überlebensrate betrug 25 % bei Patienten mit hoher Expression, aber nur 18 % bei den Patienten mit niedriger Expression. Diese Ergebnisse widersprechen den bereits erwähnten Daten von Campos *et al.*, deren Ergebnisse eine ungünstigere Prognose von Glioblastompatienten mit hoher ALDH1A1-Expression nahelegten (Campos *et al.*,

2011). Hier ist allerdings kritisch anzumerken, dass der von uns in der vorliegenden Studie verwendete Antikörper von uns und anderen eingehend im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität ausgetestet wurde (Kahlert *et al.*, 2011; Vogler *et al.*, 2012), wohingegen dies bei Campos *et al.* unklar ist. Mögliche Kreuzreaktivitäten, insbesondere im Hinblick auf andere ALDH-Isoenzyme, könnten eine mögliche Fehlerquelle bei der Stratifizierung der Patienten darstellen. Als weiterer Kritikpunkt muss gelten, dass Campos *et al.* den Cut-off für hohe und niedrige ALDH1A1-Expression nicht eindeutig definierten (Campos *et al.*, 2011). Diese möglichen Limitationen machen eine eindeutige Vergleichbarkeit beider Studien schwierig.

Der MGMT-Methylierungsstatus ist, wie einleitend erwähnt, ein wichtiger Prädiktor für das klinische Ansprechen der Patienten auf temozolomidhaltige Chemotherapieregime (Hegi *et al.*, 2005; Brandes *et al.*, 2008). Die günstige prognostische Bedeutung einer hohen ALDH1A1-Expression blieb allerdings auch in einer Multivariatanalyse unter Einschluss des MGMT-Methylierungsstatus sowie des Patientenalters bestehen, was bedeutet, dass die ALDH1A1-Expression einen unabhängigen prognostischen Biomarker darstellt.

Im Hinblick auf eine mögliche Schutzfunktion der ALDH1A1 für die Tumorzellen bei oxidativem Stress und DNA-Schädigung wurde abschließend auch untersucht, inwieweit sich die ALDH1A1-Expression auf das Überleben unter temozolomidhaltiger Chemotherapie auswirkt. Hierfür wurde die Multivariatanalyse unter all jenen 71 Patienten wiederholt, die nach den gültigen EORTC-Richtlinien mit Temozolomid behandelt wurden. Wenn die ALDH1A1-Expression tatsächlich protektive Bedeutung für die Tumorzelle besäße, wäre zu erwarten, dass der günstige prognostische Effekt des Enzyms bei diesen Patienten zumindest aufgehoben, wenn nicht sogar ins Gegenteil verkehrt sein müsste, da die Tumorzellen eine höhere Entgiftungskapazität besitzen müssten. Es zeigte sich aber im Gegenteil, dass auch unter Chemotherapie mit Temozolomid eine hohe ALDH1A1-Expression mit einer signifikant besseren Prognose verknüpft war. Daraus schließen wir, dass der immunhistochemische Nachweis einer höheren Anzahl von ALDH1A1-positiven Tumorzellen im Glioblastom einen prognostischen Biomarker für einen günstigeren Outcome darstellt, unabhängig vom Vorliegen einer MGMT-Promotormethylierung oder der Durchführung einer Chemotherapie. Auch die postulierte Schutzfunktion für die Tumorzellen scheint also die starke Expression der

ALDH1A1 im Glioblastom nicht zu erklären. Es ist daher auch im Hinblick auf die eingangs dargestellten Daten aus den Hirnschnitten der Entwicklungsreihe am wahrscheinlichsten, dass die Heraufregulation des Enzyms einen Marker für die astrozytäre Differenzierung darstellt. In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant, dass gezeigt werden konnte, dass der mit der ALDH1A1 co-exprimierte Astrozytenmarker GFAP sogar im Serum einen verlässlichen Biomarker für das Glioblastom darstellt (ein Wert $>0,05 \mu\text{g/l}$ ist 76 % sensitiv und 100 % spezifisch) (Jung *et al.*, 2007); allerdings zeigt die immunhistochemisch nachweisbare Expression von GFAP im Tumorgewebe keine prognostische Relevanz (Schmidt *et al.*, 2002). ALDH1A1 könnte also ein besser geeigneter Marker für eine höhere (astrozytäre) Differenzierungsstufe der Tumorzellen sein, die sich – wie von uns gezeigt – durch eine niedrigere Proliferationsaktivität und keine Expression von Tumorstammzellmarkern auszeichnen. Ein hoher Anteil dieser Zellen am Gesamttumormasse wäre eine mögliche Erklärung für den beobachteten, günstigen prognostischen Effekt, der unabhängig von der Therapie erhalten bleibt.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ALDH1A1 im Laufe der Gehirnentwicklung zunehmend exprimiert wird und einen Marker für eine astrogliale Differenzierung darstellt. Das Glioblastom zeigt von allen astrozytären Tumoren die kräftigste Expression von ALDH1A1, wobei hier eine Zellpopulation markiert wird, die kaum proliferationsaktiv ist und über keine Stammzeleigenschaften verfügt. Eine starke Expression der ALDH1A1 ist prognostisch günstig, dies gilt unabhängig vom Status der MGMT-Methylierung oder von einer Chemotherapie.

Wir konnten in dieser Arbeit nicht restlos klären, welche biologischen Mechanismen für die starke ALDH1A1-Expression im Glioblastom verantwortlich sind. In weiterführenden Studien sollten daher *in vitro* oder am Tiermodell die Signalwege untersucht werden, die für die Heraufregulation des Enzyms verantwortlich sind. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die aggressivere Tumorzellpopulation (ALDH1A1-negativ, Nestin/CD133-positiv, hoch proliferationsaktiv) über eine pharmakologisch oder molekularbiologisch induzierte Expression der ALDH1A1 möglicherweise ein biologisch weniger aggressives Verhalten zeigt. Eine solche

Induktion der ALDH1A1 könnte eines Tages von therapeutischem Nutzen für Patienten mit Glioblastom sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastom stellt den häufigsten bösartigen Hirntumor dar und ist mit einem raschen Krankheitsfortschreiten und infauster Prognose innerhalb kurzer Zeit vergesellschaftet. Die Aldehyddehydrogenase A1 (ALDH1A1) ist in zahlreichen soliden Neoplasien als Marker für Tumorstammzellen beschrieben. Dabei korreliert die Expression des Enzyms häufig mit einer ungünstigen Prognose. Über die Expression der ALDH1A1 im sich entwickelnden Gehirn ist wenig bekannt. Wir untersuchten daher in der hier vorliegenden Arbeit die Expression der ALDH1A1 in Gewebeproben aus gesunden menschlichen Gehirnen verschiedener Entwicklungsstufen sowie in verschiedenen Hirntumoren, darunter 93 Glioblastome. Wir zeigen, dass ALDH1A1 in reifen Astrozyten exprimiert wird, in den Stammzellnischen des sich entwickelnden Gehirns jedoch keine ALDH1A1-Expression nachweisbar ist. Fast alle untersuchten Glioblastome zeigten eine kräftige Expression des Enzyms, wobei die ALDH1A1-positiven Zellen keine Expression von Nestin, Olig2 oder SOX2 und kaum proliferative Aktivität zeigten. Eine starke Expression von ALDH1A1 korrelierte mit einem längeren Überleben von Glioblastompatienten unabhängig von der Gabe einer Chemotherapie oder dem *MGMT*-Methylierungsstatus, was auf eine mögliche Bedeutung der ALDH1A1-Immunhistochemie als prognostischen Biomarker für das Glioblastom hindeutet. Wir zeigen daher, dass die ALDH1A1 ein Marker für die astrogliale Differenzierung bei der Hirnentwicklung ist und dass eine starke Expression des Enzyms ein günstiger prognostischer Biomarker für ein längeres Überleben von Glioblastompatienten ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, S. A., Schnell, O., Pöschl, J., Eigenbrod, S., Kretzschmar, H. A., Tonn, J. C. und Schüller, U. (2012). **ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients.** *Brain Pathology* 22, 788-797.
- Ajani, J., Wang, X., Song, S., Suzuki, A., Taketa, T., Sudo, K., Wadhwa, R., Hofstetter, W., Komaki, R. und Maru, D. (2014). **ALDH-1 expression levels predict response or resistance to preoperative chemoradiation in resectable esophageal cancer patients.** *Molecular oncology* 8, 142-149.
- Anderson, D. W., Schray, R. C., Duester, G. und Schneider, J. S. (2011). **Functional significance of aldehyde dehydrogenase ALDH1A1 to the nigrostriatal dopamine system.** *Brain research* 1408, 81-87.
- Bailey, P. und Cushing, H. (1928). **A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis.**
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D. und Rich, J. N. (2006). **Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.** *nature* 444, 756-760.
- Bonavia, R., Cavenee, W. K. und Furnari, F. B. (2011). **Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network.** *Cancer research* 71, 4055-4060.
- Borovski, T., Beke, P., van Tellingen, O., Rodermond, H. M., Verhoeff, J. J., Lascano, V., Daalhuisen, J. B., Medema, J. P. und Sprick, M. R. (2013). **Therapy-resistant tumor microvascular endothelial cells contribute to treatment failure in glioblastoma multiforme.** *Oncogene* 32, 1539-1548.
- Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Blatt, V., Pession, A., Tallini, G., Bertorelle, R., Bartolini, S., Calbucci, F. und Andreoli, A. (2008). **MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients.** *Journal of Clinical Oncology* 26, 2192-2197.
- Butowski, N., Prados, M. D., Lamborn, K. R., Larson, D. A., Sneed, P. K., Wara, W. M., Malec, M., Rabbitt, J., Page, M. und Chang, S. M. (2005). **A phase II study of concurrent temozolomide and cis-retinoic acid with radiation for adult patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma.** *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 61, 1454-1459.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D. und Allen, M. (2007). **A perivascular niche for brain tumor stem cells.** *Cancer cell* 11, 69-82.
- Campos, B., Centner, F.-S., Bermejo, J. L., Ali, R., Dorsch, K., Wan, F., Felsberg, J., Ahmadi, R., Grabe, N. und Reifenberger, G. (2011). **Aberrant expression of**

- retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas.** *The American journal of pathology* 178, 1953-1964.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G. und Parada, L. F. (2012). **A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy.** *Nature* 488, 522-526.
- Clark, M. J., Homer, N., O'Connor, B. D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., Merriman, B. und Nelson, S. F. (2010). **U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line.** *PLoS Genet* 6, e1000832.
- Coyle, K., Sultan, M., Thomas, M., Vaghar-Kashani, A. und Marcato, P. (2013). **Retinoid signaling in cancer and its promise for therapy.** *J Carcinog Mutagen S* 7, 16-18.
- Dmetrichuk, J. M., Pendleton, C., Jallo, G. I. und Quinones-Hinojosa, A. (2011). **Father of neurosurgery: Harvey Cushing's early experience with a pediatric brainstem glioma at the Johns Hopkins Hospital.** *J Neurosurg Pediatr* 8, 337-341, doi: 10.3171/2011.7.peds11101.
- Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C. und Jimeno, A. (2007). **Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers.** *Cancer research* 67, 2187-2196.
- Gangemi, R. M. R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., Ravetti, G. L., Zona, G. L., Daga, A. und Corte, G. (2009). **SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity.** *Stem cells* 27, 40-48.
- Giannini, C., Scheithauer, B., Weaver, A., Burger, P., Kros, J., Mork, S., Graeber, M., Bauserman, S., Buckner, J. C. und Burton, J. (2001). **Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading.** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60, 248-262.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W. und Mariani, L. (2005). **MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.** *New England Journal of Medicine* 352, 997-1003.
- Hubert, C. G., Rivera, M., Spangler, L. C., Wu, Q., Mack, S. C., Prager, B. C., Couce, M., McLendon, R. E., Sloan, A. E. und Rich, J. N. (2016). **A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo.** *Cancer research* 76, 2465-2477.
- Ito, K., Zolfaghari, R., Hao, L. und Ross, A. C. (2014). **Inflammation rapidly modulates the expression of ALDH1A1 (RALDH1) and vimentin in the liver and hepatic macrophages of rats in vivo.** *Nutrition & metabolism* 11, 54.

- Januchowski, R., Wojtowicz, K. und Zabel, M. (2013). **The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67, 669-680.
- Jeon, H.-M., Sohn, Y.-W., Oh, S.-Y., Kim, S.-H., Beck, S., Kim, S. und Kim, H. (2011). **ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2.** *Cancer research* 71, 3410-3421.
- Jung, C., Foerch, C., Schänzer, A., Heck, A., Plate, K., Seifert, V., Steinmetz, H., Raabe, A. und Sitzler, M. (2007). **Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme.** *Brain* 130, 3336-3341.
- Kahlert, C., Bergmann, F., Beck, J., Welsch, T., Mogler, C., Herpel, E., Dutta, S., Niemietz, T., Koch, M. und Weitz, J. (2011). **Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer.** *BMC cancer* 11, 275.
- Kesari, S. (2011). **Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments.** Beitrag präsentiert bei: Seminars in oncology (Elsevier).
- Kesari, S., Schiff, D., Henson, J. W., Muzikansky, A., Gigas, D. C., Doherty, L., Batchelor, T. T., Longtine, J. A., Ligon, K. L. und Weaver, S. (2008). **Phase II study of temozolomide, thalidomide, and celecoxib for newly diagnosed glioblastoma in adults.** *Neuro-oncology* 10, 300-308.
- Kim, J.-I., Ganesan, S., Luo, S. X., Wu, Y.-W., Park, E., Huang, E. J., Chen, L. und Ding, J. B. (2015). **Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons.** *Science* 350, 102-106.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., Petersen, D., Deitrich, R. A., Hurley, T. D. und Vasiliou, V. (2012). **Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application.** *Pharmacological reviews* 64, 520-539.
- Kreso, A. und Dick, J. E. (2014). **Evolution of the cancer stem cell model.** *Cell stem cell* 14, 275-291.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M. und Rutkowski, P. (2015). **Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma.** *N Engl J Med* 2015, 23-34.
- Li, T., Su, Y., Mei, Y., Leng, Q., Leng, B., Liu, Z., Stass, S. A. und Jiang, F. (2010). **ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome.** *Laboratory investigation* 90, 234-244.

- Liao, J., Qian, F., Tchabo, N., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Qian, Z., Wang, X., Huss, W. J., Lele, S. B. und Morrison, C. D. (2014). **Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism.** PloS one 9, e84941.
- Ligon, K. L., Alberta, J. A., Kho, A. T., Weiss, J., Kwaan, M. R., Nutt, C. L., Louis, D. N., Stiles, C. D. und Rowitch, D. H. (2004). **The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 63, 499-509.
- Lind, P. A., Eriksson, C. P. und Wilhelmsen, K. C. (2008). **The role of aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1A1) polymorphisms in harmful alcohol consumption in a Finnish population.** Human genomics 3, 24.
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S. P. und Landis, M. D. (2014). **Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts.** Stem cell reports 2, 78-91.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. und Ellison, D. W. (2016). **The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary.** Acta neuropathologica 131, 803-820.
- Ma, I. und Allan, A. L. (2011). **The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells.** Stem Cell Reviews and Reports 7, 292-306.
- Mehta, S., Huillard, E., Kesari, S., Maire, C. L., Golebiowski, D., Harrington, E. P., Alberta, J. A., Kane, M. F., Theisen, M. und Ligon, K. L. (2011). **The central nervous system-restricted transcription factor Olig2 opposes p53 responses to genotoxic damage in neural progenitors and malignant glioma.** Cancer cell 19, 359-371.
- Mitchell, P., Ellison, D. W. und Mendelow, A. D. (2005). **Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics.** The Lancet Neurology 4, 413-422.
- Mu, X., Isaac, C., Greco, N., Huard, J. und Weiss, K. (2013). **Notch signaling is associated with ALDH activity and an aggressive metastatic phenotype in murine osteosarcoma cells.** Frontiers in oncology 3, 143.
- Nasr, M. R. und El-Zammar, O. (2008). **Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions.** The American Journal of dermatopathology 30, 117-122.
- Omuro, A. und DeAngelis, L. M. (2013). **Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review.** Jama 310, 1842-1850.

- Patel, M., Lu, L., Zander, D. S., Sreerama, L., Coco, D. und Moreb, J. S. (2008). **ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors.** *Lung cancer* 59, 340-349.
- Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A. und Risau, W. (1992). **Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo.** *Nature* 359, 845.
- Preusser, M., Lim, M., Hafler, D. A., Reardon, D. A. und Sampson, J. H. (2015). **Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma.** *Nature Reviews Neurology* 11, 504-514.
- Reeves, G. I. und Marks, J. E. (1979). **Prognostic significance of lesion size for glioblastoma multiforme.** *Radiology* 132, 469-472.
- Reeves, K., van der Pluijm, G., Cecchini, M., Eaton, C., Hamdy, F. und Brown, N. (2013). **The influence of tumour aldehyde dehydrogenase activity on prostate cancer cell metastatic potential and interaction with the bone endothelium in vivo.** Beitrag präsentiert bei: Proceedings of the physiological society (The Physiological Society).
- Rickmann, M. und Wolff, J. (1995). **S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain.** *Neuroscience* 67, 977-991.
- Rodriguez-Torres, M. und Allan, A. L. (2016). **Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors.** *Clinical & experimental metastasis* 33, 97-113.
- Rolle, C. E., Sengupta, S. und Lesniak, M. S. (2010). **Challenges in clinical design of immunotherapy trials for malignant glioma.** *Neurosurgery Clinics of North America* 21, 201-214.
- Russo, J., Barnes, A., Berger, K., Desgrosellier, J., Henderson, J., Kanters, A. und Merkov, L. (2002). **4-(N, N-dipropylamino) benzaldehyde inhibits the oxidation of all-trans retinal to all-trans retinoic acid by ALDH1A1, but not the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells exposed to all-trans retinal.** *BMC pharmacology* 2, 4.
- Sahm, F., Reuss, D., Koelsche, C., Capper, D., Schittenhelm, J., Heim, S., Jones, D. T., Pfister, S. M., Herold-Mende, C. und Wick, W. (2014). **Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma.** *Acta neuropathologica* 128, 551-559.
- Sanders, T. J., McCarthy, N. E., Giles, E. M., Davidson, K. L., Haltalli, M. L., Hazell, S., Lindsay, J. O. und Stagg, A. J. (2014). **Increased production of retinoic acid by intestinal macrophages contributes to their inflammatory phenotype in patients with Crohn's disease.** *Gastroenterology* 146, 1278-1288. e1272.

- Schmidt, M. C., Antweiler, S., Urban, N., Mueller, W., Kuklik, A., Meyer-Puttlitz, B., Wiestler, O. D., Louis, D. N., Fimmers, R. und Von Deimling, A. (2002). **Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma.** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61, 321-328.
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D. und Wrensch, M. (2006). **Epidemiology and molecular pathology of glioma.** *Nat Clin Pract Neurol* 2, 494-503; quiz 491 p following 516, doi: 10.1038/ncpneuro0289.
- See, S.-J., Levin, V. A., Yung, W.-K. A., Hess, K. R. und Groves, M. D. (2004). **13-cis-retinoic acid in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme.** *Neuro-oncology* 6, 253-258.
- Shipitsin, M. und Polyak, K. (2008). **The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance.** *Laboratory Investigation* 88, 459-463.
- Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B. C., Matsumoto, A., Thompson, D. C. und Vasiliou, V. (2013). **Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress.** *Free Radical Biology and Medicine* 56, 89-101.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. und Dirks, P. B. (2003). **Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.** *Cancer research* 63, 5821-5828.
- Sládek, N. E., Kollander, R., Sreerama, L. und Kiang, D. T. (2002). **Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study.** *Cancer chemotherapy and pharmacology* 49, 309-321.
- Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., Pastorino, S., Yang, M., Hoffman, R. M. und Kesari, S. (2011). **Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4274-4280.
- Su, Y., Qiu, Q., Zhang, X., Jiang, Z., Leng, Q., Liu, Z., Stass, S. A. und Jiang, F. (2010). **Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer.** *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 19, 327-337.
- Tafari, M., Di Vito, M., Frati, A., Pellegrini, L., De Santis, E., Sette, G., Eramo, A., Sale, P., Mari, E. und Santoro, A. (2011). **Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma.** *Journal of Neuroinflammation* 8, 32.
- Takizawa, T., Gudla, P. R., Guo, L., Lockett, S. und Misteli, T. (2008). **Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP.** *Genes & development* 22, 489-498.

- Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E. und Weissman, I. L. (2006). **The cancer stem cell hypothesis: a work in progress**. *Laboratory investigation* 86, 1203-1207.
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S. und Villano, J. L. (2014). **Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma**. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 23, 1985-1996.
- Tso, C. L., Freije, W. A., Day, A., Chen, Z., Merriman, B., Perlina, A., Lee, Y., Dia, E. Q., Yoshimoto, K., Mischel, P. S., Liao, L. M., Cloughesy, T. F. und Nelson, S. F. (2006). **Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups**. *Cancer Res* 66, 159-167, doi: 10.1158/0008-5472.can-05-0077.
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M. und Sysa, P. (2014). **Glioblastoma multiforme—an overview**. *Contemporary Oncology* 18, 307.
- van den Bent, M. J. (2010). **Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective**. *Acta neuropathologica* 120, 297-304.
- Vogler, T., Kriegel, L., Horst, D., Engel, J., Sagebiel, S., Schäffauer, A. J., Kirchner, T. und Jung, A. (2012). **The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors**. *Experimental and molecular pathology* 92, 111-117.
- Wen, P. Y. und Kesari, S. (2008). **Malignant gliomas in adults**. *New England Journal of Medicine* 359, 492-507.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., Black, K. L. und John, S. Y. (2004). **Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme**. *Oncogene* 23, 9392-9400.
- Yue, L., Huang, Z.-M., Fong, S., Leong, S., Jakowatz, J. G., Charruyer-Reinwald, A., Wei, M. und Ghadially, R. (2015). **Targeting ALDH1 to decrease tumorigenicity, growth and metastasis of human melanoma**. *Melanoma research* 25, 138-148.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. und Herold-Mende, C. C. (2008). **Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients**. *Clinical Cancer Research* 14, 123-129.
- Zhou, Y., Wang, Y., Ju, X., Lan, J., Zou, H., Li, S., Qi, Y., Jia, W., Hu, J. und Liang, W. (2015). **Clinicopathological significance of ALDH1A1 in lung, colorectal, and breast cancers: a meta-analysis**. *Biomarkers* 9, 777-790.

7 TABELLARISCHER ANHANG

Patienten, klinisch-pathologische Diagnosen und Therapie

#	Alter [Jahre] ¹	RT	TMZ bei RCTx	Adj. TMZ	PF-UEL [Monate]	G-UEL [Monate]	letzter Status	ALDH1 A1 [%]	MGMT ^{met}	Verlauf der Behandlung
1	57	Ja	Ja	Nein	n.v.	3	Verstorben	0.0	Ja	SBx + RCTx - > SPC
2	62	Ja	Nein	Ja	14	20	Verstorben	0.6	Ja	TR + RT -> TMZ 5/28 -> LTFU
3	44	Ja	Ja	Nein	10	39	Verstorben	0.8	n.v.	TR + RCTx -> LTFU
4	77	Ja	Nein	Nein	n.v.	1	Verstorben	2.1	Nein	SBx + SPC
5	34	Ja	Ja	Ja	18	18	Am Leben	2.1	Nein	SBx + RCTx + TMZ 5/28 -> LTFU
6	65	Ja	Ja	Ja	6	9	Verstorben	2.3	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> SBT -> SPC
7	62	Ja	Ja	Nein	n.v.	3	Verstorben	2.6	Nein	SBx + RCTx - > SPC
8	64	Ja	Ja	Ja	4	9	Verstorben	3.0	Nein	SBx + RCTx TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> SPC
9	62	Ja	Ja	Ja	14	20	Verstorben	3.1	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (9 Zyklen) -> ReRT (+BEV) -> SPC
10	65	Ja	Nein	Nein	n.v.	2	Verstorben	3.2	Nein	SBx + RTx -> SPC
11	78	Ja	Ja	Ja	9	15	Verstorben	3.2	Nein	TR + RCTx -> ReRT (+TMZ) + TMZ 5/28 (2 Zyklen) -> TMZ 7/7 (1 Zyklus) -> SPC
12	75	Nein	Nein	Nein	n.v.	1	Verstorben	3.9	n.v.	SBx -> SPC
13	81	Ja	Nein	Nein	n.v.	3	Verstorben	3.9	n.v.	SBx + RT -> SPC
14	73	Ja	Ja	Nein	n.v.	4	Verstorben	3.9	Ja	TR + RCTx -> SPC
15	72	Ja	Ja	Ja	n.v.	10	Verstorben	3.9	Nein	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> SPC
16	67	Ja	Ja	Nein	4	4	Verstorben	4.2	Nein	TR + RCTx + CIL -> SPC

17	70	Ja	Ja	Ja	11	19	Verstorben	4.3	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) + NIM -> ReTR + BCNU-wafer + TMZ 7/7 (2 Zyklen) -> SPC
18	69	Ja	Ja	Nein	4	5	Verstorben	4.4	Ja	TR + RCTx -> SPC
19	61	Ja	Ja	Ja	4	12	Verstorben	4.4	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (2 Zyklen) -> TMZ 7/7 (3 Zyklen) -> ReRT (+TMZ) -> SPC
20	56	Ja	Ja	Ja	6	8	Verstorben	4.4	Ja	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> TMZ 7/7 (1 Zyklus) -> SPC
21	74	Ja	Ja	Ja	5	18	Am Leben	4.4	Ja	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> iPDT (2 Zyklen) + TMZ 5/28 (14 Zyklen)
22	58	Ja	Ja	Ja	3	11	Verstorben	4.7	Nein	TR + RCTx -> TMZ 7/7 -> SPC
23	74	Ja	Ja	Ja	n.v.	31	Am Leben	4.8	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (12 Zyklen) -> LTFU
24	70	Nein	Nein	Nein	n.v.	0	Verstorben	4.9	Ja	TR
25	75	Ja	Ja	Nein	n.v.	2	Verstorben	4.9	Ja	SBx + RCTx -> SPC
26	56	Ja	Ja	Ja	3	9	Verstorben	5.2	Nein	TR + RCTx + TMZ (1 Zyklus) -> SBT + PCV (2 Zyklen) -> SPC
27	85	Ja	Nein	Nein	n.v.	4	Verstorben	5.3	n.v.	SBx + RTx -> SPC
28	70	Nein	Nein	Nein	n.v.	0	Verstorben	5.4	Ja	SBx
29	61	Ja	Nein	Nein	n.v.	3	Verstorben	5.6	n.v.	SBx + RT -> SPC
30	54	Ja	Ja	Ja	24	19	Verstorben	5.8	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (12 Zyklen) -> TMZ 7/7 (4 Zyklen) -> SPC
31	78	Ja	Ja	Nein	n.v.	7	Verstorben	5.9	Ja	SBx + RCTx -> SPC

32	52	Ja	Ja	Ja	14	24	Verstorben	6.0	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (9 Zyklen) -> ReRT (+BEV) + BEV -> SPC
33	65	Ja	Ja	Nein	n.v.	11	Verstorben	6.0	Ja	SBx + RCTx - > SPC
34	73	Ja	Ja	Ja	8	12	Verstorben	6.1	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> SPC
35	39	Ja	Ja	Ja	20	23	Verstorben	6.1	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (20 Zyklen) -> SPC
36	63	Ja	Ja	Nein	n.v.	5	Verstorben	6.2	n.v.	SBx + RCTx - > SPC
37	64	Ja	Ja	Ja	n.v.	6	Verstorben	6.6	n.v.	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (4 Zyklen) -> SPC
38	60	Ja	Ja	Ja	6	61	Verstorben	6.8	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (5 Zyklen) -> iPDT + PCV (6 Zyklen) -> TB-> ReTR + TMZ 7/7 (8 Zyklen) -> SPC
39	33	Ja	Ja	Ja	5	14	Verstorben	6.8	Nein	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> TMZ 7/7 (2 Zyklen) -> LTFU
40	61	Nein	Nein	Nein	n.v.	6	Verstorben	7.2	n.v.	SBx -> SPC
41	38	Ja	Nein	Ja	15	30	Verstorben	7.3	n.v.	TR + RT + RIT (2 Zyklen) -> TMZ 5/28 (9 Zyklen) -> PCV (4 Zyklen) -> SPC
42	72	Ja	Nein	Ja	10	27	Verstorben	7.5	Nein	TR + RT -> TMZ 5/28 (8 Zyklen) -> SPC
43	54	Ja	Ja	Ja	n.v.	14	Verstorben	8.0	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (11 Zyklen) -> SPC
44	65	Ja	Nein	Ja	25	34	Verstorben	8.0	Ja	TR + RT + TMZ 5/28 (7 Zyklen) -> TB -> TMZ 5/28 (9 Zyklen) -> SPC
45	70	Ja	Ja	Nein	n.v.	3	Verstorben	8.1	n.v.	SBx + RCTx -

										> SPC
46	69	Ja	Ja	Ja	n.v.	6	Verstorben	8.3	n.v.	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (2 Zyklen) -> SPC
47	44	Ja	Ja	Ja	13	17	Am Leben	8.3	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (11 Zyklen) -> ReTR + TMZ 7/7 (4 Zyklen)
48	55	Ja	Nein	Nein	5	7	Verstorben	8.4	n.v.	SBx + RT -> SPC
49	57	Ja	Ja	Ja	13	25	Verstorben	8.4	n.v.	TR + RCTx + TMZ 5/28 (10 Zyklen) -> ReTR + SBT + PCV -> SPC
50	47	Ja	Ja	Ja	8	15	Verstorben	8.6	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (7 cycles) -> BEV + PC (11 Zyklen) -> PC (1 Zyklus) -> SPC
51	74	Ja	Nein	Nein	n.v.	5	Verstorben	8.8	Nein	SBx + RT -> SPC
52	43	Ja	Ja	Ja	3	34	Verstorben	9.0	Ja	TR + RCTx + NIM -> TMZ 7/7 (5 Zyklen) -> PCV -> BEV -> SPC
53	67	Ja	Ja	Ja	6	15	Verstorben	9.1	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> SBT + TMZ 7/7 (6 Zyklen) -> ReRT -> SPC
54	76	Ja	Nein	Nein	3	7	Verstorben	9.6	Ja	TR + RT -> SPC
55	47	Ja	Ja	Ja	32	40	Verstorben	9.7	Ja	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (27 Zyklen) -> SPC
56	57	Ja	Ja	Ja	19	32	Am Leben	10.3	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (1 Zyklus) -> TB -> ReTR + TMZ 5/28 (2 Zyklen/RD) -> ReTR + PC (1 Zyklus) -> ReRT
57	47	Ja	Ja	Nein	n.v.	3	Verstorben	10.6	Nein	SBx + RCTx -> SPC
58	74	Ja	Ja	Ja	16	23	Verstorben	10.8	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (12 Zyklen) -> ACNU (2

										Zyklen) -> PCV -> SPC
59	39	Ja	Ja	n.v.	n.v.	9	Verstorben	11.0	Nein	SBx + RCTx -> LTFU
60	58	Ja	Ja	Ja	n.v.	40	Am Leben	11.1	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (12 Zyklen) -> TB
61	43	Ja	Ja	n.v.	4	9	Verstorben	11.7	Nein	TR + RCTx -> LTFU
62	46	Ja	Ja	Ja	18	30	Verstorben	12.5	Ja	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (14 Zyklen) -> TR -> TMZ 7/7 (3 Zyklen) -> BEV + IRI (6 Zyklen) -> SPC
63	46	Ja	Ja	Nein	3	15	Verstorben	12.8	n.v.	TR + RCTx -> ReTR + PCV (7 Zyklen) -> SPC
64	54	Ja	Ja	Ja	9	12	Verstorben	12.8	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> ReTR + TMZ 7/7 (1 Zyklus) -> SPC
65	41	Ja	Ja	Nein	n.v.	3	Verstorben	13.3	Nein	TR + RCTx -> SPC
66	62	Ja	Ja	Ja	7	13	Verstorben	13.5	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> iPDT (2 Zyklen) + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> SPC
67	74	Ja	Ja	Ja	n.v.	7	Verstorben	13.8	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (4 Zyklen) -> SPC
68	63	Ja	Ja	Ja	20	25	Verstorben	14.1	Ja	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (13 Zyklen) -> SPC
69	63	Ja	Ja	Ja	19	40	Am Leben	15.0	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (16 Zyklen) -> SBT
70	67	Ja	Ja	Nein	6	9	Verstorben	15.5	Nein	TR + RCTx -> SPC
71	70	Ja	Ja	Ja	7	12	Verstorben	15.6	Nein	TR + RCTx -> ReTR + TMZ 5/28 (1 Zyklus) -> TMZ 7/7 (1 Zyklus) -> SPC
72	62	Ja	Ja	Ja	22	27	Am Leben	15.6	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) ->

										LTFU
73	86	Ja	Nein	Ja	3	24	Verstorben	15.8	Nein	TR + RT -> iPDT + TMZ 5/28 (8 Zyklen/RD) -> SPC
74	75	Ja	Nein	Nein	7	9	Verstorben	16.2	Nein	TR + RT -> LTFU
75	55	Ja	Ja	Ja	7	16	Verstorben	16.4	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (1 Zyklus) -> ReTR + RIT (3 Zyklen) + TMZ 7/7 -> ReTR + PCV (1 Zyklus) -> SPC
76	68	Ja	Nein	Ja	9	20	Verstorben	16.5	n.v.	TR + RT + RIT (2 Zyklen) ->ReTR + IL- 13 CED -> TMZ 5/28 (4 Zyklen) -> SPC
77	45	Ja	Ja	Ja	4	21	Verstorben	18.1	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (1 Zyklus) -> ReTR + RIT (4 Zyklen) + TMZ 7/7 -> BEV + PC -> EGFR-Inhib. + mTOR- Inhib. -> SPC
78	69	Ja	Nein	Nein	n.v.	1	Verstorben	18.9	n.v.	SBx + RT + SPC
79	74	Ja	Ja	Ja	n.v.	10	Verstorben	19.7	Nein	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (2 Zyklen) -> LTFU
80	71	Ja	Nein	Ja	3	29	Am Leben	21.8	Ja	TR + RT -> ReTR + TMZ 5/28 (9 Zyklen) -> LTFU
81	39	Ja	Ja	Ja	14	35	Am Leben	22.2		TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> SBT (+TMZ) + TMZ 5/28 (10 Zyklen) -> ReRT (+BEV) + BEV + PC (1 Zyklus) -> ReSBT (+BEV) + BEV + PC (2 Zyklen)
82	40	Ja	Ja	Ja	n.v.	22	Am Leben	22.3	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (12 Zyklen) -> TB

83	63	Ja	Ja	Ja	8	12	Verstorben	23.0	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> ReRT (+TMZ) + TMZ 7/7 (2 Zyklen) -> SPC
84	57	Ja	Ja	Nein	6	14	Verstorben	23.8	Ja	TR + RT -> IL-13 CED -> LTFU
85	68	Ja	Ja	Ja	7	37	Am Leben	24.3	Ja	SBx + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> ReTR + BCNU-wafer + TMZ 5/28 (12 Zyklen)
86	70	Ja	Ja	Ja	3	10	Verstorben	24.3	Nein	TR + RCTx -> TMZ 7/7 (2 Zyklen) -> SPC
87	58	Ja	Ja	Ja	21	27	Verstorben	25.9	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (9 Zyklen) -> ReTR + ReRT + TMZ 5/28 (3 Zyklen) -> SPC
88	56	Ja	Ja	Ja	8	19	Verstorben	28.1	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) + CIL -> ReTR + RIT (1 Zyklus) -> TMZ 5/28 (1 Zyklus) -> SPC
89	59	Ja	Ja	Ja	5	12	Verstorben	28.7	Nein	TR + RCTx + TMZ 5/28 (1 Zyklus) + NIM -> ReTR + RIT (1 Zyklus) + TMZ 7/7 (2 Zyklen) -> BEV + PCV (3 Zyklen) -> SPC
90	57	Ja	Ja	n.v.	n.v.	11	Verstorben	30.1	Nein	SBx + RCTx - > LTFU
91	68	Ne in	n.v.	n.v.	n.v.	9	Verstorben	32.7	Nein	SBx -> LTFU
92	33	Ja	Ja	Ja	10	34	Am Leben	35.8	Ja	TR + RCTx + TMZ 5/28 (6 Zyklen) -> SBT -> TMZ 7/7 (8 Zyklen)
93	60	Ja	Ja	Ja	6	11	Verstorben	49.0	Nein	TR + RCTx + TMZ (2 Zyklen) -> ReTR -> IMA + HU -> SPC

Legende: ¹bei Diagnosestellung; PF-UEL, progressionsfreies Überleben; G-UEL, Gesamtüberleben, MGMT^{met}, MGMT-Promotormethylierungsstatus; TR, Tumorresektion; SBx, stereotaktische Biopsie; RT, Radiotherapie; RCTx, Radio- und Chemotherapie; Re-, Therapiewiederholung; TMZ, Temozolomid; BEV, Bevacizumab; iPDT, interstitielle photodynamische Therapie; SBT, stereotaktische Brachytherapie; CED, IL-13 convection enhanced delivery; CIL, Cilengitid; NIM, Nimotizumab; IMA, Imatinib; HU, hydroxyurea; SPC, supportive und palliative Versorgung; LTFU, lost to follow-up. Therapiewechsel: ->

8 LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Adam Susanne Alexandra

Geburtsdatum: 25.11.1983

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

Vater: Dr. Reinhard Adam

Mutter: Gertraud Adam

SCHULBILDUNG

09/ 1989 - 07/1993: GRUNDSCHULE, ROHRBACH

09/ 1993 - 06/2002: GYMNASIUM WOLNZACH, ABITUR

Stipendium 10/ 2002 - 08/2004: „Stipendium des Freistaates Bayern für besonders Begabte“

STUDIEN

10/ 2002 - 12/2004: STUDIUM DER PHARMAZIE, LMU MUNICH

10/ 2006 - 08/2008: STUDIUM DER MEDIZIN, LMU MÜNCHEN

10/2008 – 10/2012 STUDIUM DER MEDIZIN, TU MÜNCHEN

PRAKTIKA:

03/2003: HOFMARK - APOTHEKE, ROHRBACH

07/2003: SCHUETZEN - APOTHEKE, MÜNCHEN

03/2007:	KLINIKUM GROSSHADERN, MÜNCHEN
08/2007:	DRK -NORDSEE-KLINIK ST.PETER-ORDING
09/2007:	ILMTAL KLINIK PFAFFENHOFEN
03/2009:	NEUROLOGISCHES KRANKENHAUS MÜNCHEN
08/2009:	ZENTRUM F. NEUROPATHOLOGIE, LMU M.
02/2011	BARMHERZIGE BRUEDER MÜNCHEN
02/2011	ZENTRUM FÜR RADIOLOGIE, PFAFFENHOFEN
08/2011 MÜNCHEN	1. TERTIAL PJ BARMHERZIGE BRUEDER
12/2011	2. TERTIAL PJ KANTONSPITAL LUZERN
04/2012	3. TERTIAL PJ KLINIKUM RECHTS DER ISAR

APPROBATIONEN

03/2008:	APPROBATION ZUR APOTHEKERIN
10/2012:	APPROBATION ZUR ÄRZTIN

ARBEIT

seit 2012 als Apothekerin in der Hofmark- Apotheke Rohrbach

KINDER:

2014: Geburt des Sohnes Sebastian Adam
2016: Geburt der Tochter Antonia Adam

SPRACHEN

deutsch, englisch, französisch

9 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Ulrich Schüller danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die umfassende Unterstützung und Hilfe beim Erstellen und Auswerten der Ergebnisse und die lückenlose, gewissenhafte und geduldige Betreuung.

Frau Henn, Frau Kraft und Herrn Schmidt danke ich für die hervorragende technische Unterstützung. Frau Deschner und Herrn PD Dr. Schnell danke ich für die großartige Hilfe bei der langwierigen Recherche der klinischen Daten.

10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

ADAM SUSANNE ALEXANDRA

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle der Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) als Markerenzym der astrozytären Differenzierung sowie als prognostischer Biomarker im Glioblastoma multiforme

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 12.10.17

Susanne Alexandra Adam