

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Neurologischen Institut (Edinger Institut)
Direktor: Prof. Dr. Karl-Heinz Plate

**Klinische Bedeutung epigenetischer und genetischer
Signaturen diffuser Gliome auf Grundlage
globaler DNA-Methylierungsdaten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Tabea Isabelle Hartung

aus Viersen

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Patrick Nikolaus Harter
Korreferent:	Prof. Dr. Marcus Czabanka
Tag der mündlichen Prüfung:	24.04.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 6 -
1.1. Hirntumore	- 6 -
1.1.1. Epidemiologie	- 6 -
1.1.2. Therapie des Glioblastoms	- 7 -
1.1.3. Klassifikation	- 8 -
1.2. Charakterisierung der Diffusen Gliome (Morphologie und Molekularpathologie)	- 10 -
1.2.1. Astrozytom, IDH-mutiert	- 12 -
1.2.2. Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert	- 12 -
1.2.3. Glioblastom, IDH-Wildtyp	- 13 -
1.3. Die DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus und ihre biologische Funktion bei der Krebsentstehung	- 16 -
1.4. Die DNA-Methylierung und deren Bedeutung für die Klassifikation der Hirntumoren	- 17 -
1.4.1. Intratumorale Heterogenität der molekularen Subgruppen des Glioblastoms	- 20 -
1.5. Tumormikromilieu des Glioblastoms	- 21 -
1.5.1. Die Immunsynapse und epigenetische Regulation des Tumormikromilieus	- 23 -
1.5.2. Prognostische Relevanz des Tumormikromilieus des Glioblastoms	- 24 -
1.5.3. Assoziation von molekularen Subgruppen mit unterschiedlichen Immunezellinfiltraten	- 25 -
1.6. Fragestellung und Hypothesen	- 26 -
2. Material und Methoden	- 28 -
2.1. Zusammenstellung der Patientenkohorte	- 28 -
2.2. Erhebung der klinischen und neuropathologischen Daten	- 28 -
2.3. 850k-Methylierungsanalyse (Human Methylation EPIC Array)	- 29 -
2.4. DNA-methylierungsbasierte Klassifikation mittels Brain Tumor Classifier	- 30 -
2.5. Erhebung der Copy Number Variationen (CNV) bzw. Kopienzahlen	- 32 -
2.6. Prozessierung der DNA-Methylierungsdaten und die globalen DNA-Methylierungsanalysen mittels RnBeads	- 33 -
2.7. Der referenzbasierte LUMP-Algorithmus	- 34 -
2.8. Der referenzbasierte MethylCIBERSORT-Algorithmus	- 35 -
2.9. Paraffinpräparate und Tissue Micro Arrays (TMA)	- 36 -
2.10. Immunhistochemie (IHC)	- 37 -
2.10.1. Antikörper	- 37 -
2.10.2. Maschinelle Immunhistochemie	- 37 -
2.10.3. Lichtmikroskopische Auswertung	- 38 -
2.11. Statistik und Graphiken	- 38 -
3. Ergebnisse	- 40 -
3.1. Deskription der 850k-Kohorte	- 40 -
3.1.1. Charakterisierung der Kohorte nach klinischen und neuropathologischen Parametern	- 42 -
3.1.2. Überlebenszeitanalysen nach epigenetischen Subgruppen und klinischen Parametern	- 43 -
3.2. Deskription der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte	- 47 -
3.2.1. Charakterisierung der Kohorte nach epigenetischen Subgruppen, klinischen und neuropathologischen Parametern	- 49 -
3.2.2. Charakterisierung der EPIC-TMA-Kohorte	- 51 -
3.2.3. Überlebenszeitanalysen nach epigenetischen Subgruppen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)	- 52 -

3.2.4.	Überlebenszeitanalysen nach klinischen Parametern (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)	- 54 -
3.2.5.	Überlebenszeitanalysen nach MGMT Promotor-Methylierungsstatus (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)	- 57 -
3.2.6.	Deskription der Copy Number Variationen bei den etablierten epigenetischen Subgruppen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)	- 60 -
3.2.7.	Zelluläre Zusammensetzung des Tumorgewebes in den etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)	- 63 -
3.2.8.	Assoziation von Copy Number Variationen und der zellulären Zusammensetzung des Tumorgewebes	- 71 -
3.2.9.	Assoziation von Zellpopulationen mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben	- 76 -
3.2.10.	Bildung von hierarchischen Clustern basierend auf verschiedenen Zellpopulationen und deren Assoziation mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben	- 80 -
3.2.11.	Ergebnisse der RnBeads-Analyse bei Einteilung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte in drei etablierte Subgruppen	- 85 -
3.3.	Charakterisierung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte nach reinen und gemischten Subgruppen	- 88 -
3.3.1.	Analyse der „reinen“ Subgruppen	- 89 -
3.3.2.	Analyse der „gemischten“ Subgruppen	- 92 -
3.3.2.1.	Subgruppe mesenchymal	- 92 -
3.3.2.2.	Subgruppe <i>RTK 2</i>	- 101 -
3.3.3.	Gegenüberstellung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)	- 110 -
3.4.	Gegenüberstellung der Versionen 11b4 und 12.3 des Brain Tumor Classifiers (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)	- 115 -
3.5.	DNA-Methylierungsstatus von Immunsynapsengenen und Assoziation mit dem Gesamtüberleben	- 117 -
4.	Diskussion	- 119 -
4.1.	Epigenetische Subgruppen des Glioblastoms und ihre prognostische Bedeutung	- 119 -
4.2.	Die prognostische Bedeutung bekannter klinischer Parameter	- 121 -
4.3.	Copy Number Variationen und die zelluläre Zusammensetzung bei den etablierten epigenetischen Subgruppen	- 124 -
4.4.	Prognostische Relevanz des Tumormikromilieus	- 126 -
4.5.	„Reine“ und „gemischte“ epigenetische Subgruppen: Ihre prognostische Relevanz und Bedeutung für das Tumormikromilieu	- 128 -
4.6.	Ein Vergleich der Versionen v11b4 und v12.3 des Brain Tumor Classifiers	- 133 -
5.	Ausblick	- 135 -
6.	Zusammenfassung	- 137 -
7.	Abstract	- 139 -
8.	Verzeichnisse	- 141 -
8.1.	Abbildungsverzeichnis	- 141 -
8.2.	Tabellenverzeichnis	- 143 -

8.3.	Abkürzungsverzeichnis	- 144 -
8.4.	Literaturverzeichnis	- 146 -
9.	Anhang	- 158 -
9.1.	R-Codes und Sample Sheets	- 158 -
9.1.1.	R-Code: MethylCIBERSORT	- 158 -
9.1.2.	R-Code: RnBeads	- 159 -
9.1.3.	R-Code: LUMP-Algorithmus	- 159 -
9.1.4.	Sample Sheet für RnBeads-Analyse mit drei Gruppen	- 160 -
9.1.5.	Sample Sheet für RnBeads-Analyse mit neun Gruppen	- 162 -
10.	Lebenslauf	- 165 -
11.	Publikationen	- 167 -
12.	Danksagungen	- 168 -
	Schriftliche Erklärung	- 169 -

Im Folgenden ist bei der Verwendung des generischen Maskulinums auch die feminine Form im Sinne einer gendergerechten Sprache gemeint.

1. Einleitung

1.1. Hirntumore

1.1.1. Epidemiologie

Diffuse Gliome stellen die häufigsten malignen hirneigenen Tumoren bei Erwachsenen dar. Nach aktuellen Daten des Robert-Koch-Instituts erkrankten in Deutschland in dem Jahr 2018 circa 3.130 Frauen und 4.100 Männer an einem bösartigen Tumor des Zentralen Nervensystems (ZNS).¹ Es zeigen sich seit dem Jahr 1999 keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Erkrankungs- und Sterberaten.¹ Die durchschnittliche altersadjustierte Inzidenz der primären malignen Hirntumoren lag in den Vereinigten Staaten von Amerika (engl. United States of America, USA) zwischen 2013 und 2017 bei 7,08 pro 100.000 Einwohnern.² 29,7% der diagnostizierten primären Hirntumoren waren maligner Natur.² Die durchschnittliche jährliche Mortalitätsrate lag bei 4,42 pro 100.000 Einwohnern.² Den größten Anteil unter den primären Hirntumoren verzeichneten benigne hirneigene Tumoren, darunter waren überwiegend Meningeome. Das Glioblastom war im oben genannten Zeitraum mit 48,6% die häufigste Tumorentität unter den malignen hirneigenen Tumoren.² In den vergangenen Jahrzehnten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Inzidenz von Gliomen.²⁻⁴ Das mediane Alter bei der Erstdiagnose eines Glioblastoms lag bei 65 Jahren und das mittlere Überleben lag bei dieser malignen Tumorentität bei 8 Monaten nach der Erstdiagnose.² Außerdem zeigte sich die höchste Inzidenz in der Altersgruppe von 75-84 Jahren.² Die Inzidenz des Glioblastoms steigt dementsprechend mit dem Alter bei Erstdiagnose an.² Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 7,2%. 42% der Patienten, bei denen ein primärer Hirntumor diagnostiziert wurde, waren männlich.² Unter den malignen Tumoren waren 56% der Patienten männlich, wohingegen bei den benignen Tumoren der größere Anteil der Patienten, das heißt 64%, weiblich war.² Das Glioblastom kam bei Männern 1,59-mal häufiger vor als bei Frauen und war insgesamt deutlich häufiger bei Erwachsenen als bei Kindern.² Außerdem sind ein höheres Alter zu dem Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie das weibliche Geschlecht bei Patienten mit einem Glioblastom mit einem schlechteren Überleben assoziiert.²

Wenn nicht anders angegeben, bezieht sich der vorangehende Abschnitt auf eine aktuelle Metaanalyse von Ostrom et al. aus dem Jahr 2020, welche Daten der *Central Brain Tumor Registry of the United States (CBBTRUS)* in Zusammenarbeit mit dem *Centre for Disease Control (CDC)* auswertet. Sie bilden das größte Register, welches sich auf primäre Hirntumoren in den Vereinigten Staaten fokussiert und repräsentiert somit die US-amerikanische Bevölkerung.^{2,4}

Die meisten Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) treten ohne das Vorliegen eines hereditären Tumorsyndroms (Neurofibromatose Typ 1 und 2, tuberöse Sklerose, Lynch-, Li-Fraumeni-Syndrom) auf. Lediglich 5-10% der Fälle zeigen eine familiäre Häufung bezüglich des Vorkommens eines primären Hirntumors.⁵ Die ionisierende Strahlung zählt zu den Risikofaktoren für das Auftreten eines malignen Hirntumors. Insbesondere infolge einer therapeutische Ganzhirnbestrahlung im Kindesalter bei pädiatrischen Tumorerkrankungen treten vermehrt Hirntumore im Verlauf als Zweitmalignome auf.⁴ Weitere Risikofaktoren für die Erkrankung an einem Glioblastom sind bislang nicht etabliert, jedoch gewinnen insbesondere genetische Faktoren, sowohl bezüglich der Diagnostik als auch bezüglich des klinischen Verlaufs von malignen Hirntumoren, zunehmend an Bedeutung. Unter anderem konnten kürzlich 25 Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) als Risikofaktoren für das Auftreten eines Glioms identifiziert werden. Darunter zeigten sich 11 SNPs spezifisch für das Auftreten eines Glioblastoms.⁶ Die funktionalen und biologischen Zusammenhänge sind dahingehend überwiegend ungeklärt. Allerdings sind einige der untersuchten SNPs mit der Erhaltung und Verlängerung der Telomere assoziiert.⁷

1.1.2. Therapie des Glioblastoms

Wenn nicht anders vermerkt, beziehen sich die folgenden Ausführungen bezüglich der Therapie des Glioblastoms auf die aktuelle S2k-Leitlinie der *Deutschen Gesellschaft für Neurologie*, welche zuletzt am 01.02.2021 aktualisiert wurde.⁸

Die möglichst vollständige Resektion ist einer der Hauptbestandteile der Therapie des Glioblastoms. Ihre Planung sollte immer die Vermeidung von neuen neurologischen Defiziten implizieren.⁸ Sie ist allerdings durch die infiltrative Natur des Glioblastoms eingeschränkt, denn das Ausmaß der diffusen Infiltration des Hirngewebes ist makroskopisch nicht eindeutig erkennbar.⁹ Die kombinierte histologische und molekulare Klassifikation nach der WHO stellt den Goldstandard dar und das Heranziehen von molekularen Markern, wie dem MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, ist insbesondere für die Therapieplanung von Relevanz.¹⁰⁻¹²

Eine Komplettresektion sowie die Radiotherapie der erweiterten Tumorregion und eine zusätzliche Chemotherapie mit Temozolomid, gefolgt von weiteren sechs Zyklen der Temozolomid-Chemotherapie, stellen die Erstlinientherapie des Glioblastoms dar.⁸ Das Chemotherapeutikum Temozolomid ist aktuell die bedeutendste chemotherapeutische Option in der Therapie des Glioblastoms.⁸ Die kombinierte Radiochemotherapie als Standardtherapie findet hauptsächlich bei neu diagnostizierten und erwachsenen Patienten (jünger als 70 Jahre) Anwendung. Bei älteren Patienten sowie bei Patienten in einem schlechteren klinischen Zustand wird darüber hinaus eine hypofraktionierte Radiotherapie angewendet und die Temozolomid-Chemotherapie auf 12 Zyklen ausgeweitet.¹⁴

1.1.3. Klassifikation

Seit Ende des Jahres 2021 erfolgt die Klassifikation der Tumore des Zentralen Nervensystems nach der 5. Auflage der WHO- (engl. *World Health Organization*) Klassifikation.¹⁰ Diese baut auf den bisherigen WHO-Klassifikationen von 1979, 1993, 2000, 2007 sowie 2016 auf.¹⁵⁻¹⁹

Im Rahmen der Klassifikation der ZNS-Tumore gewinnen insbesondere molekulare Merkmale der einzelnen Entitäten zunehmend an Relevanz. So wurden nach Einführung der 4. Auflage der WHO-Klassifikation erstmals molekulare Marker in Ergänzung zu den histologischen Charakteristika im Rahmen der Diagnostik

miteinbezogen. Im Besonderen sind in diesem Zusammenhang die Einteilung der diffusen Gliome anhand von Mutationen in dem Gen, welches für die Isocitratdehydrogenase (IDH) kodiert, und die Einteilung nach 1p/19q-Kodeletion zu nennen. Diese haben neben der diagnostischen Relevanz auch eine klinische und prognostische Bedeutung für die Einteilung von Hirntumoren. Diese integrierte genetische und histomorphologische Betrachtung führte darüber hinaus zu einem höheren Maß an Objektivität bezüglich der Diagnostik.¹⁹

Für die Etablierung molekularer Marker in der gegenwärtigen WHO-Klassifikation sind die Empfehlungen des *Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Officially WHO (c-IMPACT-NOW)* zu berücksichtigen. Sie geben Empfehlungen hinsichtlich einer auf molekularen Markern basierenden Diagnosestellung von Glioblastomen des IDH-Wildtyp²⁰ und reformierten die Nomenklatur sowie die Kriterien für die Einteilung IDH-mutierter Astrozytome.²¹

Zwar bezieht die aktuelle Version der WHO-Klassifikationen vermehrt molekulare Marker bei der Klassifizierung von Tumoren des Zentralen Nervensystems mit ein, jedoch beruht ein wichtiger Teil der Diagnostik auf der Methodik der Histologie und Immunhistochemie.²² Des Weiteren konnte in der Vergangenheit bei verschiedenen malignen Hirntumoren gezeigt werden, dass genetische Veränderungen durch einen mehrstufigen Entartungsprozess – das heißt durch aufeinander folgende genetische Veränderungen – zu einer malignen Transformation führen²³, was die Wichtigkeit der molekularen Marker für die Diagnostik verschiedener Entitäten und Malignitätsgrade unterstreicht. Auch die Taxonomie der Tumorklassifikation berücksichtigt zunehmend molekulare Charakteristika der einzelnen Tumorentitäten, sodass molekulare Parameter auch neue Subtypen der bereits etablierten Tumorentitäten charakterisieren. In diesem Zuge wird aktuell von einer Hybrid-Taxonomie gesprochen. So werden molekulare Charakteristika teilweise als definierend (essentiell) und teilweise als zusätzlich (gewünscht) erachtet. Darüber

hinaus gibt es Entitäten, für die keine molekularen Merkmale charakterisierend sind, was zu einer Berufung auf früher etablierte Methoden wie die histologische Befundung führt.²²

Das Grading der Hirntumore unterscheidet sich maßgeblich von dem Grading der Nicht-ZNS-Tumoren. Bis zu der Einführung der aktuellen WHO-Klassifikation wurden römische Ziffern verwendet, um ZNS-Tumore in WHO-Grad I, II, III oder IV einzuteilen. Seit Ende des Jahres 2021 erfolgt die Bezeichnung mithilfe von arabischen Zahlen und die Unterteilung in unterschiedliche, jetzt „ZNS WHO-Grade“, ist innerhalb verschiedener Tumorentitäten möglich.

DNA- (engl. Deoxyribonucleic Acid) Methylierungsmuster gewinnen hauptsächlich für die molekulare Diagnostik von ZNS-Tumoren an Bedeutung.²⁴ Die Klassifizierung anhand des DNA-Methylierungsprofils ist bei einer Vielzahl an ZNS-Tumoren zuverlässig.²⁵ Darüber hinaus lassen sich anhand von DNA-Methylierungsdaten auch Kopienzahlen-Profile bzw. Copy Number Variationen (CNV) ableiten, die ebenfalls einen wichtigen Beitrag für die Klassifikation leisten. Diese müssen im Zusammenspiel mit histologischen und weiteren genetischen bzw. chromosomalen Aberrationen untersucht werden.

1.2. Charakterisierung der Diffusen Gliome (Morphologie und Molekularpathologie)

Nach der 5. Auflage der WHO-Klassifikation der Tumoren des Zentralen Nervensystems erfolgt die Unterteilung der diffusen Gliome in sogenannte *adult-type*-Gliome, die vorwiegend bei Erwachsenen auftreten, und in *pediatric-type*-Gliome, die demgegenüber vorwiegend bei Kindern auftreten. Diese Gruppen werden vor allem anhand ihrer verschiedenen prognostischen und biologischen Charakteristika unterschieden und haben klinische und therapeutische Implikationen.^{10,22,26} Die 4. Auflage der WHO-Klassifikation von 2016 unterscheidet noch insgesamt 15 verschiedenen Entitäten bei den diffusen Gliomen, was vor allem

darauf zurückzuführen ist, dass unterschiedliche WHO-Grade unterschiedliche Entitäten bedeuteten. Seit Einführung der aktuellen WHO-Klassifikation werden drei verschiedenen Subtypen der diffusen Gliome bei Erwachsenen unterschieden.²²

Ein entscheidender molekularer Marker für die Klassifikation der ZNS-Tumore ist die IDH-Mutation. Die IDH ist ein metabolisches Enzym, welches mit dem Citratzyklus assoziiert ist und in diesem Zusammenhang unter Entfernung einer Carboxylgruppe Isocitrat zu alpha-Ketoglutarat umwandelt. Die IDH-Mutation findet früh in dem Prozess der Gliomgenese statt und definiert eine klinische und genetische Subgruppe der Gliome. Im Jahr 2008 wurde mit Hilfe der DNA-Sequenzierung die Punktmutation p.R132H im Gen IDH1 als häufige Mutation in Glioblastomen entdeckt und überwiegend mit dem Auftreten bei jüngeren Patienten und einem besseren Gesamtüberleben assoziiert.²⁷ In der Folge wurden IDH1- und IDH2-Mutationen insbesondere bei niedriggradigen Gliomen beschrieben.²⁸⁻³⁰ 80% der IDH-Mutationen stellen IDH1-Mutationen der Art p.R132H dar. Die IDH-Mutationen führen zu einem hypermethylierten Genom, was durch den Metaboliten D-2-Hydroxyglutarat initiiert wird.^{31,32} Dieser hypermethylierte Phänotyp wird auch als *Glioma CpG-Island Methylator Phenotype (G-CIMP)*^{33,34} bezeichnet und ist mit einem besseren Gesamtüberleben verbunden.³⁵ Ein ebenfalls entscheidender Faktor für die Gliomgenese und vermehrte Zellteilung ist die Länge Telomere. Auf Grund dessen ist bei der Entstehung der Astrozytome die Inaktivierung des Gens entscheidend, welches für Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked (*ATRX*) kodiert, während bei Oligodendrogliomen TERT- (*Telomerase reverse transcriptase*) Promotormutationen von diagnostischer Bedeutung sind.^{36,37}

Die aktuelle Klassifikation der diffusen Gliome bei Erwachsenen unterscheidet IDH-mutierte Astrozytome, IDH-mutierte und 1p/19q-kodeletierte Oligodendrogliome sowie Glioblastome, IDH-Wildtyp, welche in den folgenden Abschnitten charakterisiert werden.¹⁰

Die nachfolgenden Angaben zu den histologischen Eigenschaften der dargestellten Entitäten beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf eine Veröffentlichung von Schniederjan et al. aus dem Jahr 2018.³⁸ Die molekularen Charakteristika wurden, wenn nicht anders angegeben, der 5. Auflage der WHO-Klassifikation entnommen.¹⁰

1.2.1. Astrozytom, IDH-mutiert

Namensgebend für die Astrozytome ist die Ursprungszelle dieser Neoplasie sowie die IDH-Mutation, welche für die Klassifikation obligatorisch ist. Folglich entstehen Astrozytome aus der astrozytären Zellreihe. Histologisch können Astrozytome in vier verschiedene Typen unterteilt werden: fibrillär, gemistozytisch, protoplasmatisch und gemischt. Der Malignitätsgrad der Astrozytome wird unter anderem anhand histologischer Kriterien ermittelt, wie der Mitosezahl, der Zellkernpleomorphie, pathologischen Gefäßproliferaten sowie Nekrosen mit Pseudopallisadenbildung. Diese histologischen Merkmale werden als Anaplasiezeichen bezeichnet. Immunhistochemisch lassen sich – neben der IDH-Mutation – bei einer Vielzahl der Astrozytome ein ATRX-Expressionsverlust sowie eine Mutation im TP53-Gen nachweisen.³⁸

Eine homozygote CDKN2A/B- (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B) Deletion führt – auch ohne histologische Korrelate bei dem entsprechenden Tumor – zu der Einteilung in den ZNS WHO-Grad 4.¹⁰ Insgesamt ist die Klassifikation der IDH-mutierten Astrozytome, je nach histologischen und genetischen Charakteristika, in ZNS WHO-Grad 2,3 oder 4 möglich.¹⁰

1.2.2. Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert

Oligodendrogliome werden im Besonderen durch ihre genetischen Eigenschaften – die IDH-Mutation und die 1p/19q-Kodeletion – definiert. Histologisch zeichnen sich Oligodendrogliome durch eine besondere, charakterisierende Zellkernmorphologie

aus. Ihr deutlich rundlicher Nukleus mit regulären Konturen ist von einem Halo, was einem spärlichen, klaren Zytoplasmasaum entspricht, umgeben. Er imponiert euchromatisch mit einem deutlich abgrenzbaren Nucleolus.³⁸ Ebenfalls charakteristisch sind Zytoplasmaausläufer, die ein netzartiges Bild ergeben sowie Kalzifizierungen, die die Tumorzellen umgeben. Oligodendrogliome zeichnen sich außerdem durch honigwabenartige Gefäßbildungen aus.^{39,40} Die wichtigsten immunhistochemischen Korrelate im Rahmen der Diagnostik des Oligodendroglioms sind Färbungen mit Antikörpern gegen mutierte IDH1 p.R132H, ATRX und p53. Histomorphologisch können Oligodendrogliome auch astrozytär anmuten. Die genannten molekularen Merkmale – IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion – führen zu der definitiven Diagnose eines Oligodendroglioms.¹⁰

1.2.3. Glioblastom, IDH-Wildtyp

Das Glioblastom, IDH-Wildtyp ist ein malignes, infiltrativ wachsendes Astrozytom mit sehr variabler Histomorphologie. Es ist grundsätzlich durch ein hohes Maß an Kernpleomorphie und weitgehenden Verlust der astrozytären Differenzierung gekennzeichnet. Glioblastome zeigen zumeist palisadenartige Nekrosezonen, die multifokal innerhalb des Tumors vorkommen. Außerdem sind mikrovaskuläre Prolifere, die ebenfalls ein Malignitätskriterium darstellen, charakterisierend. Diese pathognomonischen Gefäßproliferate kommen besonders im hypoxischen Mikromilieu des Glioblastoms vor und entstehen durch die vermehrte Sezernierung pro-angiogener Botenstoffe wie dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).⁴¹ Zu der Entität *Glioblastom, IDH-Wildtyp* gehören darüber hinaus weitere histologische Subtypen (Riesenzellglioblastoms, Gliosarkoms und epitheloides Glioblastom). Immunhistochemisch sind bei Glioblastomen unter anderem die ATRX-Expression, der IDH-Wildtyp und die GFAP- (Glial fibrillary acidic protein) Expression von diagnostischer Relevanz.⁴²

Das Glioblastom befindet sich meist subkortikal in der weißen Substanz oder in der tieferliegenden grauen Substanz der Großhirnhemisphären. Es kommt in allen

Lappen des Gehirns vor und ist von infiltrativer Natur, sodass es meist zu einer Infiltration sowohl in benachbarte Cortexareale als auch über das Corpus callosum in die kontralaterale Hemisphäre kommt, was als Schmetterlingsgliom bezeichnet wird.¹⁰ Die damit einhergehenden klinischen Symptome sind vorwiegend fokale neurologische Defizite und epileptische Anfälle. Außerdem kommt es durch die schnelle Größenprogredienz des Tumors zu einem erhöhten Hirndruck, was wiederum zu Übelkeit, Kopfschmerzen und Erbrechen führen kann. Darüber hinaus sind – je nach Lokalisation – Wesensveränderungen und neurokognitive Veränderungen typische Symptome des Glioblastoms. Diese neurologischen Symptome entwickeln sich entsprechend des aggressiven Tumorwachstums meistens progressiv.¹⁰

Typischerweise weisen Glioblastome die o.g. histologischen Anaplasiekriterien auf. Trifft dies nicht zu, müssen Glioblastome auf genetische Veränderungen untersucht werden. Dies impliziert insbesondere die Untersuchung auf eine Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptorgens (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR), auf Promotormutationen des TERT-Gens⁴³ und/oder einer chromosomalen Amplifikation auf Chromosom 7, kombiniert mit einem Verlust auf Chromosom 10 (+7/-10).^{21,44} Das Vorliegen bereits einer dieser drei genetischen Parameter führt zu der Vergabe eines ZNS WHO-Grades 4^{21,22,45} und werden in der gegenwärtigen Version der WHO-Klassifikation somit gleichwertig mit den histologischen Malignitätskriterien behandelt.

Die EGFR-Amplifikation tritt bei 40% aller Glioblastomen, IDH-Wildtyp auf und findet sich weniger häufig bei Riesenzellglioblastomen. Sie kommt ausschließlich bei primären Glioblastomen vor und besitzt vorwiegend eine diagnostische Relevanz.^{46,47} Bei sekundären Glioblastomen, die eine IDH-Mutation aufweisen und aus niedriggradigeren, IDH-mutierten Astrozytomen entstehen, sowie bei niedriggradigen, IDH-mutierten Astrozytomen, wird eine EGFR-Amplifikation nicht beobachtet. Die EGFRvIII-Mutation stellt eine besondere Splice-Variante dar, bei

welcher die Exone 2-7 fehlen und die zu einer Tyrosinkinaseaktivität führt. Die EGFR-Amplifikation scheint nicht mit dem Patientenüberleben assoziiert zu sein.⁴⁸

Die Deletion des Chromosom 10 ist die häufigste chromosomale Aberration beim Glioblastom. Sie liegt bei 80% der Glioblastome vor und impliziert zumeist eine distale Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 10. Die chromosomale Aberration beinhaltet darüber hinaus die Deletion des Tumorsuppressorgens PTEN (engl. Phosphatase and Tensin homolog) und kommt häufig in Kombination mit einem Zugewinn auf Chromosom 7 vor.⁴⁹

Die CDKN2A/B-Deletion wird bei circa der Hälfte der Glioblastome, IDH-Wildtyp beschrieben. Das entsprechende Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 und kommt im Falle des chromosomalen Verlustes zumeist in Form einer homozygoten Deletion vor. Der entsprechende Genlocus kodiert für den Tumorsuppressor p16.⁴⁹

Im Allgemeinen unterscheidet die 5. Auflage der WHO-Klassifikation einerseits zwischen Kriterien, die essenziell für die Klassifikation des Glioblastoms sind und andererseits zwischen Merkmalen, die in diesem Zusammenhang wünschenswert sind. Als essenziell gelten der IDH-Wildtyp, der H (Histon)3-Wildtyp und das Vorliegen eines diffusen astrozytären Gliomes in Verbindung mit einem oder mehreren der folgenden Kriterien: mikrovaskuläre Prolifere, Nekrosen, TERT-Promotor-Mutation, EGFR-Amplifikation, +7/-10. Ein wünschenswertes Kriterium ist laut WHO das Vorhandensein des DNA-Methylierungsprofil eines Glioblastoms, IDH-Wildtyp.¹⁰ Diese molekularen Kriterien lassen es zu, dass ein diffuser astrozytärer Tumor ohne histologische Anaplasiezeichen, aber mit molekularen Merkmalen, als Glioblastom, IDH-Wildtyp klassifiziert wird.

Zwar hat die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promotormethylierung keine entscheidende Bedeutung für die Gliomklassifikation,

jedoch ist die Bestimmung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus wichtig für Therapieentscheidungen und insbesondere hinsichtlich der Behandlung mittels Temozolomid als Chemotherapeutikum⁵⁰, welche derzeit die Erstlinienchemotherapie des Glioblastoms darstellt. Der DNA-Alkylierung durch Temozolomid gegenüber steht das DNA-Reparaturenzym MGMT, das eine entgegengesetzte Funktion besitzt.^{11,12} Die Sensitivität gegenüber Temozolomid ist dementsprechend bei niedrigerer Ausprägung des Enzyms MGMT höher, was über die Methylierung des MGMT-Promotors reguliert wird und die Transkription inhibiert. Daher ist eine MGMT-Promotormethylierung mit einem besseren klinischen Verlauf und einem besseren Ansprechen auf eine Temozolomid-Chemotherapie assoziiert. Die Bestimmung des MGMT-Promotormethylierungsstatus ist folglich fester Bestandteil der Diagnostik, hat aber bislang keine Relevanz bezüglich der Klassifikation von diffusen Gliomen.

1.3. Die DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus und ihre biologische Funktion bei der Krebsentstehung

Zwischen 1869 und 1928 wurden erste Meilensteine auf dem Gebiet der Epigenetik erreicht, indem die Begriffe und biologischen Korrelate der Nukleinsäuren, Histone und des Chromatins definiert wurden und die Unterscheidung zwischen Euchromatin und Heterochromatin entdeckt wurde.⁵¹ Conrad Waddington definierte 1942 den Begriff der Epigenetik als Veränderung des Phänotyps bei konstantem Genotyp.⁵² Epigenetische Mechanismen kontrollieren die Expression von Genen und die Funktionsanpassung von Zellen, ohne den Genotyp zu verändern, was zu einer Zelldifferenzierung führt⁵³ und sind zudem meist reversibel, was sie zu einem Anknüpfungspunkt für Therapien macht. Die DNA-Sequenz bleibt infolgedessen trotz einer Veränderung des Chromatins und der Zellfunktion unverändert.⁵⁴

Zu den wichtigsten epigenetischen Mechanismen gehören die Histonmodifikation, die RNA- (engl. Ribonucleic Acid) Interferenz mittels Micro-RNA und die DNA-Methylierung. Die DNA-Methylierung zeichnet sich durch die Methylierung des C5

der Base Cytosin aus und ist seit Mitte der 1970er Jahre bekannt.^{55,56} DNA-Methyltransferasen (DNMTs) regulieren die Methylierung der Cytosine – insbesondere solcher, die in CpG-Inseln lokalisiert sind,⁵⁷ welche sich wiederum überwiegend in den Promotorregionen von Genen befinden. Als CpG-Insel wird eine Region bezeichnet, die mehr als 500 Basenpaare lang ist und einen GC (Guanin–Cytosin)-Inhalt von mehr als 55% enthält.⁵⁴ Die Methylierung einer Promotorregion führt zu der Repression der Expression des damit verbundenen Gens.⁵³

Bei Krebserkrankungen spielt die DNA-Methylierung eine besondere Rolle, da sie während der frühen Karzinogenese stattfindet und im Besonderen auch Tumorsuppressorgene betrifft, deren Expression im Rahmen der DNA-Methylierung unterdrückt wird. Die Theorie des *Loss of Heterozygosity* (LOH) erklärt den Ursprung der Karzinogenese durch den Verlust beider Allele eines Tumorsuppressorgens. Dies kann durch Mutation oder DNA-Methylierung oder auch durch die Kombination beider erfolgen.⁵⁸ Die DNA-Methylierung stellt sowohl einen physiologischen Mechanismus als auch einen frühen Prozess bei der Krebsentstehung dar. Die epigenetische Reprogrammierung trägt darüber hinaus zu der Initiierung sowie zu der Progression von Krebserkrankungen bei.^{59,60}

1.4. Die DNA-Methylierung und deren Bedeutung für die Klassifikation der Hirntumoren

Das Methylom von Krebszellen impliziert sowohl erworbene DNA-Methylierungsmuster als auch solche epigenetische Charakteristika, durch die sich Rückschlüsse auf die Ursprungszelle der Neoplasie ziehen lassen.^{61,62} Die DNA-Methylierungsmuster sind stabil und reproduzierbar und können zumeist auch bei einem geringen DNA-Gehalt einer Tumorprobe oder einer geringeren Probenqualität ermittelt werden.⁶³ Sie werden zu der Klassifizierung der vielfältigen Entitäten der ZNS-Tumoren eingesetzt und dienen unter anderem der Diagnostik von Ependymomen⁶⁴, Meningeomen⁶⁵, Medulloblastomen⁶³, Nervenscheidentumoren⁶⁶, primitiven neuroektodermalen Tumoren⁶⁷ oder kleinen blauen rundzelligen

Tumoren.⁶⁸ Außerdem gewinnt die Klassifikation in Subgruppen des Glioblastoms mithilfe von DNA-Methylierungsanalysen an zunehmender Relevanz in der diagnostischen Praxis.⁶⁹

Vor der Klassifikation von Hirntumoren mittels DNA-Methylierungsmustern wurden Subgruppen des Glioblastoms auch auf der Ebene der DNA-Transkription definiert.⁷⁰ Diese Einteilung, welche im Jahr 2010 von Verhaak et al. beschrieben wurde, unterteilte die Glioblastome in die Subgruppen *classical*, *mesenchymal*, *neural* und *proneural*.⁷⁰ Diese genexpressionsbasierte Klassifikation fokussierte sich auf somatische Mutationen (PDGFRA (engl. platelet-derived growth factor receptor A)/ IDH1-, EGFR- und NF1- (Neurofibromatose Typ 1) Mutationen) und Copy Number Variationen, welche bei den genannten Subgruppen unterschiedlich häufig vorkamen.⁷⁰ Die Klassifikation auf epigenetischer Ebene stimmt nicht in ihrer Gänze mit der Klassifikation auf Transkriptionsebene überein.⁷¹

Die gegenwärtig herangezogene Klassifikation der ZNS-Tumoren auf der Grundlage globaler DNA-Methylierungsmuster beruht auf der Publikation von Capper et al. aus dem Jahr 2018.²⁴

In diesem Zuge etablierte sich der *Brain Tumor Classifier*, der als Online-Klassifikationstool unter www.molecularpathology.org⁷² zur freien Verfügung steht. Es wurden globale DNA-Methylierungsprofile von 2801 Tumoren generiert und für das entsprechende Referenzset verwendet. Dies geschah mittels *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k)*. Diese Daten wurden im Folgenden einem *unsupervised clustering* unterzogen. Sie ermöglichten es die verschiedenen DNA-Methylierungsklassen zu definieren und erlauben deren Korrespondenz zu bestehenden, histologisch definierten Tumorentitäten. Insgesamt wurden in diesem Zusammenhang 82 ZNS-Tumorklassen und -subklassen gebildet, die sich durch verschiedene DNA-Methylierungsprofile auszeichnen. Der durch Capper et al. etablierte Machine-Learning-Mechanismus stellt einen zunehmend wichtigen Aspekt der Diagnostik von ZNS-Tumoren dar und ermöglicht ein höheres Maß an

Standardisierung, als es durch reine histologische Befundung der Tumoren gewährleistet werden kann. Außerdem bietet die Klassifizierung mittels *Brain Tumor Classifier* die Möglichkeit der Erforschung bisher unbekannter, seltener Tumorentitäten, deren DNA-Methylierungsmuster und eventuelle Assoziation mit dem klinischen Verlauf einer Tumorentität. Für die Methylierungsklasse *Glioblastom, IDH-Wildtyp* wurden diesbezüglich die Subgruppen *RTK 1, RTK 2, RTK 3, MYCN, midline* und *mesenchymal* definiert. Die Tumorklassifikation anhand verschiedener DNA-Methylierungsklassen und -subklassen beinhaltet ebenfalls die Ermittlung eines *Calibrated Scores (CS)*, welcher die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der ein untersuchter Tumor einer DNA-Methylierungsklasse zugeordnet werden kann. In der Vergangenheit zeigte sich, dass ein $CS > 0,84$ eine hinreichend sichere Zuordnung zu einer Methylierungsklasse gewährleistet.²⁵

Darüber hinaus bestehen verschiedene Methylierungssubklassen des Glioblastoms, welche auf einer von Sturm et al. publizierten Studie beruhen. In diesem Zuge wurden neun verschiedene Subklassen definiert.⁶⁹ Dazu gehören die Subklassen *K27*, welche das diffuse Mittelliniengliom widerspiegelt, und *G34*, welche überwiegend bei pädiatrischen Tumoren vorkommt. Außerdem bezeichnet die Subklasse *IDH* IDH-mutierte Tumore, die grundsätzlich ein hypermethyliertes DNA-Methylierungsprofil aufweisen. Die weiteren Subklassen entsprechen im Wesentlichen den oben genannten Klassen.⁶⁹

80% der Glioblastome lassen sich den Subklassen *RTK 1, RTK 2* oder *mesenchymal* zuordnen.²⁴ Diese häufigeren und im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrachteten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms zeichnen sich neben einem charakteristischen DNA-Methylierungsprofil durch typische Copy Number Variationen aus. Bei der Subklasse *RTK 1* kommen insbesondere Amplifikationen in dem Gen vor, das für den *platelet-derived growth factor receptor A* (PDGFRA) kodiert. Die Subklasse *RTK 2* zeichnet sich durch häufiges Auftreten einer EGFR-

Amplifikation aus, während die Subklasse *mesenchymal* keine typischen Copy Number Variationen aufzeigt.^{69,71}

1.4.1. Intratumorale Heterogenität der molekularen Subgruppen des Glioblastoms

Die Einteilung von Glioblastomen in verschiedene molekulare Subgruppen spiegelt die intertumorale Heterogenität dieser Entität wider.⁶⁹ Entsprechend der Definition der molekularen Subgruppen wurde die intertumorale Heterogenität erstmals auf der Ebene der Transkription beschrieben.^{70,73–75} Auch das Bestreben, eine subgruppen-spezifische Therapie im Sinne einer personalisierten Medizin zu entwickeln, stützt sich auf der These der Existenz von verschiedenen Subklassen mit charakterisierenden biologischen Eigenschaften und im Besonderen auf die Stabilität der Subgruppenzugehörigkeit. Insbesondere bei der Subklassifikation von Rezidivtumoren im Vergleich zu deren entsprechenden Primärtumoren wurde die Heterogenität und zeitliche Plastizität im Sinne einer so genannten mesenchymalen Transformation der Glioblastome beschrieben, welche mit einer Therapieresistenz assoziiert wird.^{76–82} Dass mehrere Subgruppen innerhalb eines Tumors koexistieren können, konnte auch auf der Single-Cell-Ebene gezeigt werden.^{83,84} Insbesondere das gemeinsame Auftreten der Subgruppen *RTK 2* und *mesenchymal* wurde beschrieben und lässt eine ähnliche Tumorbilogie dieser Subgruppen vermuten.⁸³

Die DNA-Methylierung ist einer der entscheidenden epigenetischen Mechanismen, welcher die Gentranskription in Tumoren moduliert. Darüber hinaus tragen Variationen in der DNA-Methylierung in dem Genom der Krebszellen zu der Heterogenität von Tumoren bei.⁸⁵ Auf der Ebene der Epigenetik wurde die intertumorale molekulare Heterogenität erstmal durch die Erforschung der Existenz von verschiedenen DNA-methylierungsbasierten Subklassen mit distinkter Prognose beschrieben.⁸⁶ Der intertumoralen Heterogenität steht die intratumorale Heterogenität gegenüber, die die Konsistenz der Subgruppenspezifität innerhalb eines Tumors in Frage stellt.

1.5. Tumormikromilieu des Glioblastoms

Die zelluläre Komposition des Glioblastoms besteht sowohl aus neoplastischen als auch aus nicht-neoplastischen Zellen, welche in ihrer Gesamtheit das Tumormikromilieu bilden. Letzteres stellt einen wichtigen Bestandteil der Pathogenese des Glioblastoms dar.^{87,88} Das Zentrale Nervensystem gehört zu den immunprivilegierten Organen des menschlichen Körpers, was mit einer geringeren Aktivierbarkeit des angeborenen und erworbenen Immunsystems einhergeht.^{89,90} Um die Funktionsfähigkeit des Zentralen Nervensystems gewährleisten zu können, werden Fremdartige in einem gewissen Maße toleriert.^{91,92}

Bis zu 45% des Tumormikromilieus stellen die tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) dar, welche sowohl die Mikrogliazellen als auch die infiltrierenden, aus dem Knochenmark eingewanderten Makrophagen implizieren. Diese beiden Zellarten scheinen mit den neoplastischen Zellen zu interagieren⁹³⁻⁹⁵ und können als antigenpräsentierende Zellen bei der Bildung von Immunsynapsen beteiligt sein.⁹⁶ TAMs exprimieren das ionisierte calciumbindende Adaptermolekül Iba1 (engl. ionized calcium-binding adapter molecule 1), welches sowohl mit der Zellmembranbildung assoziiert ist als auch mit der Phagozytose in Verbindung gebracht wird.^{97,98} Im Allgemeinen scheinen Glioblastome mehr Iba1-positive Zellen und T-Zellen zu enthalten als nicht-neoplastisches Hirngewebe.⁹⁹ Die eingewanderten Makrophagen des Gehirns stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab.^{125,126} Sie können in verschiedene Subtypen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation unterteilt werden. Es wird zwischen Makrophagen der Meningen, Makrophagen des Plexus choroideus, perivaskuläre Makrophagen und dendritische Zellen unterschieden.^{102,103} Die Einteilung der Makrophagen in die zwei Hauptgruppen *M1* und *M2*, welche verschiedene Polarisationsstadien repräsentieren, erfolgte erstmals durch Mills et al. im Jahr 2000.¹⁰⁴

Grundsätzlich zeichnet sich der proinflammatorische M1-Typ durch die Sezernierung von Interleukin- (IL-)1, IL-12, IL-6, IL-23 oder TNF- α aus, was zu der

Abwehr von Mikroorganismen oder auch malignen Zellen führt. Insbesondere der M1-Phänotyp zeigt die Eigenschaften einer antigenpräsentierenden Zelle auf. Der anti-inflammatorische M2-Phänotyp wird durch die Stimulation mittels IL-4, durch Glukokortikoide oder durch Immunkomplexe initiiert. Makrophagen dieses Phänotyps exprimieren Mannose- (CD206-), Scavenger- (SR-a, CD204-) und Galactose-Rezeptoren. Sie sind zu der Phagozytose befähigt und tragen zu der Angiogenese bei.^{105,106} In vivo zeigte sich jedoch ein vorwiegend fließender Übergang zwischen den beiden Polarisationszuständen von Makrophagen, weshalb die Einteilung in zwei verschiedene Phänotypen stark debattiert wird.^{107–109} So konnten in humanen TAMs sowohl Transkriptionsmuster des M1- als auch des M2-Phänotyps nachgewiesen werden, was sich ebenfalls bei aus Gliomen isolierten Mikrogliazellen zeigte und zudem vermuten lässt, dass TAMs Eigenschaften beider Polarisationszustände und deren Übergangsformen aufweisen können.^{108,109}

Mikrogliazellen sind die gewebespezifischen Makrophagen des Gehirns¹¹⁰ und haben einen großen Einfluss auf die Homöostase des neuronalen Umfeldes, die Entwicklung des Gehirns oder die Neurogenese.^{111–113} Sie stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Dottersack ab und entstehen in der frühen Embryogenese zwischen dem Tag E7.0 und E9.0.^{111,114,115} Immunhistochemische Marker, die für die Detektion von Mikroglia und Makrophagen verwendet werden, sind CD11b, CD163, CD200, CD204, CD68 oder Iba-1. Darüber hinaus können sie über den Myelozytenmarker CD14 nachgewiesen werden. Anhand dieser Marker kann allerdings keine Unterscheidung zwischen den residenten Mikrogliazellen und den eingewanderten Makrophagen getroffen werden.^{116–119}

Einen weiteren wichtigen Bestandteil des Immuninfiltrates des Glioblastoms stellen Leukozyten dar. Es finden sich sowohl CD4-positive T-Helferzellen, CD8-positive zytotoxische T-Zellen als auch regulatorische T-Zellen in dem Tumormikromilieu.^{120–}

1.5.1. Die Immunsynapse und epigenetische Regulation des Tumormikromilieus

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf eine von Berglund et al. im Jahr 2020 publizierte Studie über die Einflussnahme der Methylierung von Immunsynapsengenen auf die Karzinogenese und ihre prognostische Relevanz bei verschiedenen Tumorentitäten.⁹⁶ Die Immunsynapse wird sowohl zwischen antigenpräsentierenden Zellen und Effektor-T-Zellen als auch zwischen Tumorzellen und T-Zellen gebildet.^{96,125} Tumorzellen exprimieren Proteine, die mit der Immunsynapse assoziiert sind und die das Immunsystem unterdrücken, um der antitumoralen Antwort des Immunsystems zu entgehen. Folglich entsteht ein immunsuppressives Milieu. Die Expression der Immunsynapsen-Proteine wird unter anderem durch epigenetische Mechanismen moduliert. Tumorzellen nutzen die epigenetische Dysregulation, um Tumorsuppressoren zu unterdrücken und Onkogene zu aktivieren.¹²⁶ Dies geschieht durch eine Hypermethylierung von stimulierenden (auch: *costimulatory*) Genen und eine Hypomethylierung von Immuncheckpointgenen. Die Hypothese der Autoren war, dass es bei der Tumorprogression einer epigenetischen Umprogrammierung von Immunsynapsengenen bedarf, um das Immunsystem und deren antitumorale Antwort zu umgehen. In diesem Zusammenhang wurden 20 ausgewählte Gene in Immuncheckpointgene (ICG) und Co-Stimulierende Gene (CSG) unterteilt.

Gensymbol	Alternativer Genname	Funktion
CEACAM1	CEACAM1	Inhibitory/Hemmend
LGALS9	Galectin 9	Inhibitory/Hemmend
CD274	PDL1	Inhibitory/Hemmend
PDCD1LG2	PDL2	Inhibitory/Hemmend
C10orf54	VISTA	Inhibitory/Hemmend
CD276	B7-H3	Inhibitory/Hemmend
VTCN1	B7-H4	Inhibitory/Hemmend
CD86	B7-2	Inhibitory/Hemmend
CD80	B7-1	Inhibitory/Hemmend

HHLA2	HHLA2	Inhibitory/Hemmend
PVR	CD155	Inhibitory/Hemmend
LGALS3	Galectin 3	Inhibitory/Hemmend
CD40	CD40	Stimulatory/Stimulierend
CD70	CD70	Stimulatory/Stimulierend
TNFSF14	LIGHT	Stimulatory/Stimulierend
TNFSF4	OX40L	Stimulatory/Stimulierend
TNFSF9	CD137L	Stimulatory/Stimulierend
TNFSF18	GITRL	Stimulatory/Stimulierend
ICOSLG	B7RP1	Stimulatory/Stimulierend
HLA-A	HLA-A	Stimulatory/Stimulierend

Tabelle 1: Immunsynapsengene und ihre Funktionen nach Berglund et al.⁹⁶

Die Autoren konnten zeigen, dass verschiedene Tumorentitäten basierend auf dem Methylierungsstatus von Immunsynapsengenen identifizierbar sind, was darauf zurückzuführen sei, dass der Methylierungsstatus dieser Gene von dem Ursprungsgewebe der Neoplasie abhängt. Darüber hinaus konnte bei den analysierten Proben anhand der untersuchten Gene und ihrer Methylierung zwischen normalem Gewebe und Tumorgewebe unterschieden werden. Dies sei auf die epigenetische Evolution der Tumoren während der Karzinogenese zurückzuführen, was zu einem inversen Methylierungsmuster bei normalem Gewebe und Tumorgewebe führe. Darüber hinaus zeigte sich eine prognostische Aussagekraft der Methylierungsmuster der Immunsynapsengene in immunogenen Tumoren mit einer aktiven Anti-Tumor-Immunantwort und es konnten Aussagen über den klinischen Verlauf verschiedener Tumorentitäten getroffen werden.

1.5.2. Prognostische Relevanz des Tumormikromilieus des Glioblastoms

In höhergradigen Gliomen zeigten sich in den vergangenen Jahren kontroverse Daten bezüglich der prognostischen Relevanz des Tumormikromilieus. Der Einfluss der verschiedenen Immunzellpopulationen – insbesondere der tumorinfiltrierenden

Lymphozyten und der tumorassoziierten Makrophagen und Mikrogliazellen – für den klinischen Verlauf ist umstritten.^{121,127–130}

Bezüglich des prognostischen Einflusses von tumorassoziierten Mikrogliazellen und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass ein höherer Anteil an CD68-, CD163- und CD206-positiven TAMs im Tumor mit einem längeren Patientenüberleben assoziiert waren.^{131,132} Gleichermaßen konnte gezeigt werden, dass CD3- und CD8- positive Zellinfiltrate positiv mit dem Überleben assoziiert waren.^{122,127}

In mesenchymalen Glioblastomen zeigte eine Studie von Kaffes et al. aus dem Jahr 2019, dass eine erhöhte Iba1-Expression mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert war, wohingegen Iba1-Expression bei proneuralen Tumoren negativ mit dem Gesamtüberleben assoziiert war. Ebenso zeigte sich ein Überlebensvorteil für Patienten, deren Tumoren einen höheren Anteil an CD3-positiven Zellen aufwies.⁹⁹

Die zuletzt genannte Studie unterstreicht die Wichtigkeit der Untersuchung verschiedener Immunzellpopulationen und deren Einfluss auf das Gesamtüberleben im Kontext der verschiedenen molekularen Subgruppen und lässt sowohl eine differentielle Tumorbilogie als auch eine Assoziation von epigenetischen bzw. genetischen Mechanismen und dem Tumormikromilieu vermuten.

1.5.3. Assoziation von molekularen Subgruppen mit unterschiedlichen Immunzellinfiltraten

Die Einteilung des Glioblastoms in unterschiedliche molekulare Subgruppen anhand von Transkriptions- oder DNA-Methylierungsmustern legt eine differentielle Tumorbilogie nahe. Darüber hinaus verfügen die molekularen Subgruppen über ein unterschiedliches Tumormikromilieu.¹³²

Insbesondere Glioblastome der Subgruppe *mesenchymal* zeichnen sich durch ein spezielles Mikromilieu aus. Diese Subgruppe zeigte eine erhöhte Expression von

Genen, die mit der Immunantwort assoziiert waren^{70,133,134} und eine erhöhte Expression von Makrophagenmarkern.^{99,135} Diese Beobachtung konnte darüber hinaus auf DNA-Methylierungsebene bestätigt werden. Glioblastome der epigenetischen Subgruppe *mesenchymal* zeigten im Vergleich zu den Subgruppen *RTK 1* und *RTK 2* den höchsten Immunezellinhalt, welcher hauptsächlich durch Mikrogliazellen repräsentiert wurde.¹³⁶ In mesenchymalen Glioblastomen konnten des Weiteren höhere Anteile an CD3- und CD8-positiven Zellen beschrieben werden, wohingegen IDH-mutierte Gliome die geringsten Anteile dieser Zellpopulationen zeigten.¹³⁷

1.6. Fragestellung und Hypothesen

Ziel dieser Arbeit ist es klinisch bedeutsame Subgruppen diffuser Gliome mittels DNA-Methylierungsanalysen zu identifizieren. Es sollen epigenetische und genetische (Copy Number Variationen) Signaturen aus globalen DNA-Methylierungsdaten von Tumorgesamtmassen herausgearbeitet werden und deren klinische Relevanz analysiert werden. Mittels bioinformatischer Algorithmen soll das Tumormikromilieu charakterisiert und hinsichtlich der prognostischen Relevanz analysiert werden.

Folgende Hypothesen sollen aufgestellt werden:

Hypothese 1: Innerhalb der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte zeigen die unterschiedlichen DNA-Methylierungssubgruppen signifikante prognostische Unterschiede.

Hypothese 2: Die zur Untersuchung vorliegende GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte zeigt eine zu erwartende Überlebensverteilung hinsichtlich bekannter prognostischer Marker wie dem Resektionsausmaß, dem IDH-Status und der MGMT-Promotormethylierung.

Hypothese 3: Copy Number Variationen und die zelluläre Zusammensetzung zeigen charakteristische Unterschiede bei den etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp.

Hypothese 4: Die zelluläre Zusammensetzung der Tumoren hat eine prognostische Relevanz innerhalb der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte.

Hypothese 5: „Reine“ und „gemischte“ epigenetische Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp zeigen prognostische Unterschiede und eine differentielle zelluläre Zusammensetzung.

Hypothese 6: Die etablierte Version des Brain Tumor Classifiers v11b4 und die experimentelle Version v12.3 zeigen konstante Ergebnisse bezüglich der Tumorklassifikation.

2. Material und Methoden

2.1. Zusammenstellung der Patientenkohorte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Datenbank mit insgesamt n=1392 Tumorproben erstellt. Sie beinhaltet alle Tumorgewebeproben, die im Zeitraum von Anfang 2017 bis zum 15.07.2021 eine DNA-Methylierungsanalyse (im folgenden auch 850k-Analyse genannt) im Rahmen der neuropathologischen Diagnostik des Edinger Instituts erhalten hatten. Für jede Tumorprobe wurde eine Klassifikation mittels Brain Tumor Classifier durchgeführt und dokumentiert. Im Folgenden wurden alle in dieser Datenbank enthaltenden diffusen Gliome (n=500) weitergehend klinisch, neuropathologisch und molekularpathologisch charakterisiert.

2.2. Erhebung der klinischen und neuropathologischen Daten

Die neuropathologischen und klinischen Daten wurden in Zusammenarbeit mit der Tumordokumentation des UCT Frankfurt (Frau Sandra Verena Klein) aus der UCT Biobank extrahiert. Die vorliegende Studie wurde vom Scientific Board des UCT Frankfurt begutachtet und durch die Ethikkommission genehmigt (UCT-Projekt-Nr.: UCT-61-2020 (intern: SNO-19-2020)).

Folgende Daten wurden aus der Tumordokumentation extrahiert:

- Alter bei Resektion
- Geschlecht
- MGMT-Promotor-Methylierungsstatus
- Diagnose nach Integration der klinischen und neuropathologischen Daten (Enddiagnose)
- ZNS WHO-Grad
- Rezidiv- oder Primärtumor
- Resektionsausmaß (komplett, nahezu komplett bzw. >90%, inkomplett <90%, stereotaktische Biopsie)

- Tumorlokalisation
- Datum der Operation (Resektion oder stereotaktische Biopsie)
- Datum der histologischen Erstdiagnose
- Datum des letzten Kontaktes
- Datum des ersten bildmorphologisch bestätigten Progresses
- Erstlinientherapie (Resektion, Chemotherapie, Radiotherapie)
- Datum des Beginns der Erstlinientherapie
- Ort der Resektion

Das Gesamtüberleben (OS, engl. Overall Survival) wurde als Zeitraum beginnend an dem Datum der Resektion bis zu dem letzten Kontakt bzw. Sterbedatum berechnet. Das progressionsfreie Überleben (PFS, engl. Progression Free Survival) wurde als Zeitraum beginnend an dem Datum der Resektion bis zu dem Datum des ersten bildmorphologisch bestätigten Progresses berechnet.

Die verwendeten humanen Gewebeproben wurden im Rahmen der neuropathologischen Routinediagnostik der 850k-Methylierungsanalyse unterzogen. Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinpräparaten wurden an ausgewählten Tumorproben (n=44) durchgeführt.

2.3. 850k-Methylierungsanalyse (Human Methylation EPIC Array)

Die Gewebestanden der für die Analysen dieser Arbeit inkludierten Tumorproben wurden entsprechend des Herstellerprotokolls¹³⁸ (Illumina, San Diego, USA) im Rahmen der Routinediagnostik des Edinger Instituts (Neuropathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main) bearbeitet. Die Assays wurden von den medizinisch-technischen Assistentinnen des Edinger Instituts, Frau Tatjana Starzetz, Frau Maika Dunst und Frau Jana Engel durchgeführt.

Im Wesentlichen beruht die oben genannte und im Rahmen der Routinediagnostik des Edinger Instituts angewendete Methode zur Bestimmung der DNA-Methylierung auf der Methodik der Bisulfit-Sequenzierung. DNA-Methylierungen befinden sich vorwiegend an der C5-Position des Cytosins in CpG-Dinukleotiden. Unmethylierte Cytosine werden durch die Behandlung mit Bisulfit in Uracil umgewandelt, während 5-Methylcytosine nicht mit dem Sulfit reagieren und in ihrer ursprünglichen (methylierten) Form bleiben. Anschließend wird eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) mittels eines Microarray durchgeführt, welche Oligonukleotid-Hybridisierungssonden verwendet, um gezielte CpG-Sites darzustellen. Für die zu analysierenden CpG-Sites gibt es jeweils eine Sonde, welche komplementär zu der unveränderten methylierten Site ist und eine weitere Sonde, welche wiederum komplementär zu der Cytosin-zu-Uracil-konvertierten (unmethylierten) Site ist.

Nachfolgend wurden die EPIC BeadChips für die weitere Datenverarbeitung gescannt. Der Human Methylation EPIC Array (Illumina, San Diego, USA) repräsentiert über 850.000 DNA-Methylierungsstellen, die die Grundlage für die folgenden Analysen bilden und in Form von IDAT-Dateien zu der Weiterverarbeitung verwendet wurden.

2.4. DNA-methylierungsbasierte Klassifikation mittels Brain Tumor Classifier

Die Klassifikation der eingeschlossenen Tumorproben erfolgte mit Hilfe des DNA-methylierungsbasierten Klassifikationstools für Tumoren des Zentralen Nervensystems, welches auf der Online-Plattform www.molecularneuropathology.org⁷² abgerufen werden kann.

Die zu analysierenden IDAT-Dateien des EPIC BeadChip Arrays wurden auf der Online-Plattform hochgeladen. Die durch die 850k-Methylierungsanalyse generierten Daten wurden zu dem Zwecke der Klassifikation mit

korrespondierenden Daten von über 2800 Tumoren als Referenzkohorte verglichen. Die Klassifikation erfolgte durch einen Random-Forest-Algorithmus. Der zu Grunde liegende Brain Tumor Classifier basiert auf der von Capper et al. publizierten wissenschaftlichen Arbeit zu der Klassifizierung von Tumoren des zentralen Nervensystems im Jahr 2018.²⁴

Die Output-Daten des Klassifizierungstools sind verschiedene Tumorklassen und -subklassen, für die ein jeweiliger „Calibrated Score (CS)“ berechnet wird. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher eine Tumorprobe einer Methylierungsklasse bzw. -subklasse zugeordnet werden kann. Die CS haben einen theoretischen Wert zwischen 0 und 1. Es wurden jeweils die drei Methylierungsklassen mit den höchsten Calibrated Scores sowie der entsprechende Calibrated Score, erhoben. Wurde für eine Tumorprobe der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte nur eine Methylierungsklasse bzw. -subklasse angegeben, wurde dieser Tumor im Rahmen der Auswertungen als *rein* bzw. *pure* bezeichnet. Jegliche Tumore, für die mehrere Subklassen angegeben wurden, wurden als *gemischt* bzw. *mixed* definiert. Abbildung 1 zeigt exemplarisch den Output des Brain Tumor Classifiers für ein Glioblastom, IDH-Wildtyp der Subklasse 1 *RTK 2* und der Subklasse 2 *RTK 1*.⁷² Es handelt sich somit per oben genannter Definition im Rahmen dieser Arbeit um einen *gemischten* Tumor. Des weiteren werden im Folgenden die Begriffe Methylierungsgruppe und Methylierungsklasse sowie -subgruppe und -subklasse synonym verwendet.

Brain tumor methylation classifier results (v11b4)

Methylation classes (MCs with score >= 0.3)	Calibrated score	Interpretation	
methylation class family Glioblastoma, IDH wildtype	0.99	match	✓
MC family members with score >= 0.1			
methylation class glioblastoma, IDH wildtype, subclass RTK II	0.87	match	●
methylation class glioblastoma, IDH wildtype, subclass RTK I	0.1		

Legend: ✓ Match (score >= 0.9) ✗ No match (score < 0.9): possibly still relevant for low tumor content and low DNA quality cases. ● Match to MC family member (score >= 0.5)

Tabelle 2: Output des Brain Tumor Classifiers (exemplarisch für ein Glioblastom, IDH-Wildtyp)

Die eingeschlossenen Tumorproben wurden sowohl mithilfe der Version 11b4 als auch mithilfe der experimentellen Version 12.3 des Brain Tumor Classifiers klassifiziert. Für die weiteren Analysen wurden lediglich Proben mit einem CS $\geq 0,84$ eingeschlossen, da diese mit einer ausreichend hohen Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Methylierungsklasse zugeordnet werden konnten.²⁵

2.5. Erhebung der Copy Number Variationen (CNV) bzw. Kopienzahlen

Die Kopienzahlen, im Folgenden auch Copy Number Variationen (CNV) genannt, wurden für die GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte basierend auf den Output-Daten der DNA-methylierungsbasierten Klassifikation mittels Brain Tumor Classifier (siehe 2.5.) erhoben. Neben der beschriebenen Einteilung in verschiedene Methylierungsklassen und -subklassen, wurde durch den Brain Tumor Classifier mithilfe des R-Pakets „conumee“ ein Copy Number Variationen-Profil erstellt und als Output der Analyse bereitgestellt. Ein exemplarisches Copy Number Variationen-Profil eines Glioblastoms, IDH-Wildtyp zeigt Abbildung 1.⁷² Die x-Achse stellt die Chromosomen 1-22 dar, während die y-Achse die CNV angibt. Die Nulllinie entspricht einem diploiden Zustand. Zugewinne bzw. Amplifikationen werden in grüner Farbe im positiven Bereich, Verluste bzw. Deletionen in roter Farbe im negativen Bereich der y-Achse angegeben und wurden dementsprechend dokumentiert und ausgewertet. Für die Erhebung der Copy Number Variationen wurden die von Capper et al. beschriebenen Empfehlungen bezüglich der Auswertung des Profils angewendet und somit Abweichungen über \log_2 von 0,4 gewertet.²⁵

Folgende Chromosomenaberrationen wurden analysiert:

- Amplifikationen auf Chromosom 7 inklusive EGFR-Locus
- Deletionen auf Chromosom 10
- die homozygote CDKN2A/B-Deletion
- die PTEN-Deletion

- die EGFR-Amplifikation

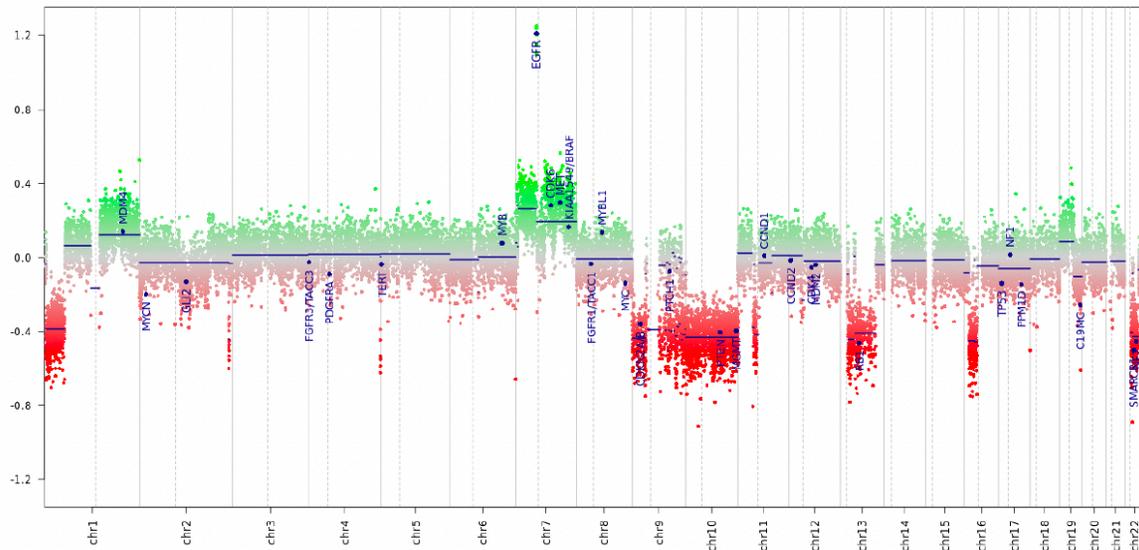


Abbildung 1: Copy Number Variationen-Profil eines Glioblastoms, IDH-Wildtyp ⁷²

2.6. Prozessierung der DNA-Methylierungsdaten und die globalen DNA-Methylierungsanalysen mittels RnBeads

Als Inputdaten für die folgenden globalen DNA-Methylierungsanalysen mittels RnBeads-Algorithmus dienten DNA-Methylierungsdaten in Form von IDAT-Dateien.

Der Begriff *RnBeads* bezeichnet ein Paket in R (R Core Team, 2019), welches zu der Analyse globaler DNA-Methylierungsdaten dient. Der in dem RnBeads integrierte Algorithmus zu der Sicherung einer hohen Probenqualität wurde zu der Qualitätskontrolle der eingeschlossenen Proben genutzt. Keine der untersuchten Tumorproben wurde im Rahmen der Qualitätskontrolle ausgeschlossen. Alle untersuchten Tumorproben zeigten dementsprechend eine hohe Datenqualität und konnten in die Analysen aufgenommen werden. Hinsichtlich der Datenprozessierung wurden CpG-Sites gefiltert, welche mit SNPs assoziiert waren. Außerdem wurden CpG-Sites auf Geschlechtschromosomen und potenziell kreuzreaktive Sites von den Analysen ausgeschlossen.¹³⁹ Die DNA-

Methylierungsdaten wurden mittels *dasen*-Methode, welche zu dem R-Paket *WateRmelon* gehört, normalisiert.¹³⁹

Es folgten globale DNA-Methylierungsanalysen mittels Hauptkomponentenanalyse und hierarchischer Clusteranalyse. Die Unterschiede bezüglich der DNA-Methylierung zwischen verschiedenen etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp sowie zwischen reinen und gemischten Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp wurden durch die RnBeads-Analyse untersucht und visualisiert.^{140,141} Der verwendete Code in R ist im Anhang aufgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte zunächst eine RnBeads-Analyse mit drei Gruppen durchgeführt, welche die epigenetischen Subgruppen *mesenchymal*, *RTK 1* und *RTK 2* darstellten. Außerdem wurde eine Analyse mit neun Gruppen durchgeführt, um sowohl reine als auch gemischte Subgruppen zu untersuchen. Die angefertigten Sample Sheets sind ebenfalls im Anhang dieser Arbeit einsehbar.

2.7. Der referenzbasierte LUMP-Algorithmus

Der referenzbasierte „Leukocyte Unmethylation For Purity“- (LUMP)- Algorithmus, welcher in RnBeads integriert ist, wurde zu der Kalkulation der Leukozytenanzahl herangezogen. Er basiert auf 44 CpG-Sites, die bei Leukozyten überwiegend hypomethyliert sind und berechnet auf Grundlage dieser Vergleichswerte und der Inputdaten die Leukozytenanzahl in den zu analysierenden Tumorproben.^{141,142}

Der verwendete Code in R ist im Anhang aufgeführt. Dieser wurde im Anschluss an eine RnBeads-Analyse angewendet. Als Output gibt der LUMP-Algorithmus für jede untersuchte Probe einen Vektor zwischen 0 und 1 an, welcher die berechnete Leukozytenanzahl impliziert.

2.8. Der referenzbasierte MethyICIBERSORT-Algorithmus

Die in silico-Dekonvolution der analysierten Tumorgewebebeurproben wurde mithilfe des referenzbasierten MethyICIBERSORT-Algorithmus durchgeführt. Im Rahmen dieser Dekonvolution wurde durch den Algorithmus ein Referenzdatensatz mit DNA-Methylierungsdaten von verschiedenen Zelltypen herangezogen.

Unterschiede bezüglich des zelltypspezifischen DNA-Methylierungsmusters erlauben eine Unterscheidung zwischen nachstehenden Zelltypen, deren aufgeführte Bezeichnungen im Folgenden gleichwertig verwendet werden:

- *Cancer Cells*
- Gliazellen bzw. *Glia*
- Neurone bzw. *Neurons*
- eosinophile Granulozyten bzw. *eos*
- Fibroblasten bzw. *fibroblasts*
- CD14- positive Zellen bzw. *CD14*
- CD19-positive Zellen bzw. *CD19*
- CD56-positive Zellen bzw. *CD56*
- CD4-positive Effektorzellen bzw. *CD4_Eff / CD4_Effector Cells*
- CD8-positive Zellen bzw. *CD8*
- regulatorische T-Zellen bzw. *Treg*
- Endothelzellen bzw. *endothelial cells*

Die Kalkulation der Endothelzellen erfolgte unter Verwendung eines zusätzlichen Referenzdatensatzes, da diese Zellpopulation von dem hauptsächlich verwendeten Datensatz nicht abgedeckt wurde.^{143,144} Der verwendete Code in R ist im Anhang aufgeführt.

Die IDAT-Dateien, welche im Rahmen der 850k-Methylierungsanalyse generiert wurden, wurden mithilfe des R-Paket *minfi* in R geladen. Es folgten eine Qualitätskontrolle der Datenpunkte, eine Noob-Normalisierung sowie die Erfassung

der β -Werte. Das R-Paket *MethylCIBERSORT* erstellte zunächst ein *Mixture File*, welches folglich die zu vergleichenden β -Werte enthielt. Letztlich wurden die jeweiligen Dateien auf dem CIBERSORT-Portal¹⁴⁵ hochgeladen, das *Mixture File* wurde mit dem Referenzdatensatz verrechnet und die Dekonvolution wurde durchgeführt.^{143,144}

Der Output lieferte für jede Tumorprobe und jeden Zelltyp einen Vektor zwischen 0 und 1, die unter Verwendung der beiden oben genannten Referenzdatensätze gebildet wurden. Dieser Vektor beschreibt den geschätzten Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den gesamten Zellen der analysierten Probe.

2.9. Paraffinpräparate und Tissue Micro Arrays (TMA)

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Paraffinpräparaten der UCT Biobank durchgeführt. Tissue Micro Arrays (TMA) wurden zu der immunhistochemischen Untersuchung verschiedener Mikroglia- und Makrophagenpopulationen und deren Verteilung in unterschiedlichen epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp verwendet. Es wurden lediglich TMAs verwendet, welche sich im Bestand der UCT Biobank befanden.

Bei der Herstellung der TMAs werden in Bohrlöcher von Paraffinblöcken Gewebestanzungen mit den zu untersuchenden Tumorproben eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglicht die Färbung und Untersuchung mehrerer Gewebeproben auf einem Paraffinschnitt und die standardisierte Analyse der Expression verschiedener immunhistochemischer Marker.

Der für diese Arbeit verwendete EPIC-TMA umfasst Gewebeproben verschiedener hirneigener Tumoren, zu welchen ebenfalls DNA-Methylierungsprofile, generiert durch den 850k EPIC Array, vorliegen. In dieser Arbeit wurden lediglich ausgewählte Gewebeproben von Glioblastomen des IDH-Wildtyps (n=44) immunhistochemisch analysiert. Hierbei handelt es sich um jene Proben, welche im Rahmen der DNA-

Methylierungsanalyse und Klassifikation einen Calibrated Score von $\geq 0,84$ aufwiesen, deren Methylierungsklasse dem Glioblastom, IDH-Wildtyp und deren Methylierungssubklasse dem Subtyp *mesenchymal*, *RTK 1* oder *RTK 2*, entsprach.

2.10. Immunhistochemie (IHC)

2.10.1. Antikörper

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Antikörper, welche für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurden:

Antigen	Hersteller	Verdünnung
CD68	DAKO (M0876)	1:200
CD163	Leica Biosystems (NB110-59935)	1:1000
Iba-1	Wako (019-19741)	1:1000
CD206	Novus Biologicals (H00004360-M02)	1:1000
CD11b	Novus Biologicals (NB110-89474)	1:200

Tabelle 3: Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen

2.10.2. Maschinelle Immunhistochemie

Im Rahmen der immunhistochemischen Markierung von CD68, Iba1, CD206, CD11b und CD163 wurde ein automatisiertes maschinelles Verfahren verwendet. Die IHC wurde mit einem standardisierten Protokoll für das automatisiertes Färbesystem Leica Bond-III (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Tatjana Starzetz, Frau Maika Dunst und Frau Jana Engel. Es wurden jeweils 3 μm Schnitte hergestellt. Diese wurden in den Leica Bond-III für die immunhistochemischen Färbungen überführt.

Das automatisierte Programm soll im Folgenden in seinen Grundzügen erklärt werden: Zunächst wurden die zu färbenden Präparate entparaffiniert und rehydriert,

wofür die Bond Dewax Solution verwendet wurde. Darauf folgten mehrere Waschschrirte. Für die Waschschrirte wurde die Bond Wash Solution verwendet. Auf die einzelnen Färbeschrirte mit den jeweiligen Antikörpern folgten wiederum Waschschrirte. Teil des Färbeprozess waren darüber hinaus eine hitzeinduzierte Epitoprückgewinnung, die Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität sowie die Bindung des Primärantikörpers mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), was zu einem braunen Präzipitat führte und die Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar machte. Außerdem erfolgte eine Gegenfärbung mittels Hämatoxylin. Abschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe dehydriert. Die gefärbten Schnitte konnten im Anschluss mit Deckgläsern (Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland) und Eindeckmittel (Eukitt, ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) eingedeckelt werden. Daraufhin folgte die lichtmikroskopische Auswertung.

2.10.3. Lichtmikroskopische Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden mittels Durchlichtmikroskop (Olympus, Shinjuku, Japan) untersucht. Durch einen Farbniederschlag des verwendeten Chromogens bei Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes wurden die Antigenbindungen sichtbar. Zu der quantitativen Auswertung wurde die Fläche des entsprechenden Farbniederschlages in Prozent angegeben, um somit auf die prozentuale Expression des jeweiligen Antigens schließen zu können. Es wurde lediglich jener Farbniederschlag berücksichtigt, welcher intrazellulär oder membranassoziiert war.

2.11. Statistik und Graphiken

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramme JMP 16.1.0 (SAS Institute, Cary, North Carolina, Vereinigte Staaten von Amerika) und Partek (Partek Inc., Chesterfield, USA) sowie in R (R Core Team, 2019). Die exportierten Graphiken wurden, wenn nicht anders angegeben, mit

dem Programm Affinity Designer (Version 1.8.6., Serif, Nottingham, Vereinigtes Königreich) bearbeitet.

Der nicht-parametrische Wilcoxon-Test wurde für die Vergleiche von Datenverteilungen zwischen zwei Gruppen verwendet. Die Dunn-Methode für multiples Testen wurden für multiple Vergleiche verwendet. Kaplan-Meier-Kurven wurden zum Zwecke der Lebenszeitanalyse durchgeführt und für Vergleiche zwischen zwei Vergleichsgruppen dienten Log-Rang- und Wilcoxon-Test.

Die hierarchischen Clusteranalysen wurden mit der Ward's Minimum-Varianz-Methode erstellt. In dieser Arbeit wurden mittels sowohl der oben genannten Statistikprogramme, JMP 16.1.0 und Partek, als auch der Outputdateien der RnBeads-Analyse erstellt. Die aufgeführten Sankey-Diagramme wurden mithilfe der Online-Plattform sankeymatic¹⁴⁶ erstellt. Die Hauptkomponenten-Analysen (engl. Principle Component Analysis, PCA) wurden durch sowohl JMP 16.1.0 als auch den RnBeads-Algorithmus generiert. Die t-SNE (t-distributed stochastic neighbour embedding plots) wurden mithilfe des JMP-add-in und des R-Pakets *Rtsne* generiert.

Insgesamt wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Deskription der 850k-Kohorte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden klinische und neuropathologische Daten korrespondierend zu zunächst n=500 Patienten zusammengetragen und generiert, bei deren Tumorgewebe im Zeitraum vom 01.01.2017 bis zum 15.07.2021 eine 850k-DNA-Methylierungsanalyse durchgeführt wurde. Alle Tumorproben wurden nach der epigenetischen Klassifikation als diffuse Gliome eingeordnet. Darunter waren n=415 Tumorproben, die nach der Klassifikation mittels *Brain Tumor Classifier* einen Calibrated Score von $\geq 0,84$ erhielten, darunter wiederum n=3 *Glioblastome, IDH-Wildtyp mit H3.3G34-Mutation*, n=6 *Diffuse Mittelliniengliome mit H3K27M-Mutation*, n=134 *Gliome, IDH-mutiert* und n=271 *Glioblastome, IDH-Wildtyp*. N=85 Tumore erhielten bei der Klassifikation einen Calibrated Score von $<0,84$.

Die Kohorte setzte sich aus n=55 *1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliomen*, n=64 *Astrozytomen*, n=15 *High Grade Astrozytomen*, n=96 *Glioblastomen, IDH-Wildtyp* der Subgruppe *mesenchymal*, n=69 *Glioblastomen, IDH-Wildtyp* der Subgruppe *RTK 1* und n=101 *Glioblastomen* der Subgruppe *RTK 2* zusammen. Bezeichnend für die jeweiligen Entitäten war in diesem Zusammenhang die Methylierungsklasse, welche durch den *Brain Tumor Classifiers* ausgegeben wurde, und nicht die Taxonomie der WHO-Klassifikation. Außerdem wurde die Nomenklatur der Methylierungssubgruppen *RTK 1* und *RTK I* sowie *RTK 2* und *RTK II* synonym verwendet. Für die nachfolgenden Überlebenszeitanalysen wurden von den n=415 Tumorproben mit einem Calibrated Score $\geq 0,84$ n=49 Tumorproben ausgeschlossen, da es sich um Rezidivtumore handelte und weitere n=40 Tumorproben ausgeschlossen, bei denen nur unzureichend Informationen vorlagen. Tumore, die als *Glioblastom, IDH-Wildtyp* der Subklasse *midline* (n=5) oder *MYCN* (n=1) klassifiziert wurden, wurden ebenfalls von den folgenden Analysen ausgeschlossen. N=311 Patienten wurden in die Überlebenszeitanalysen einbezogen.

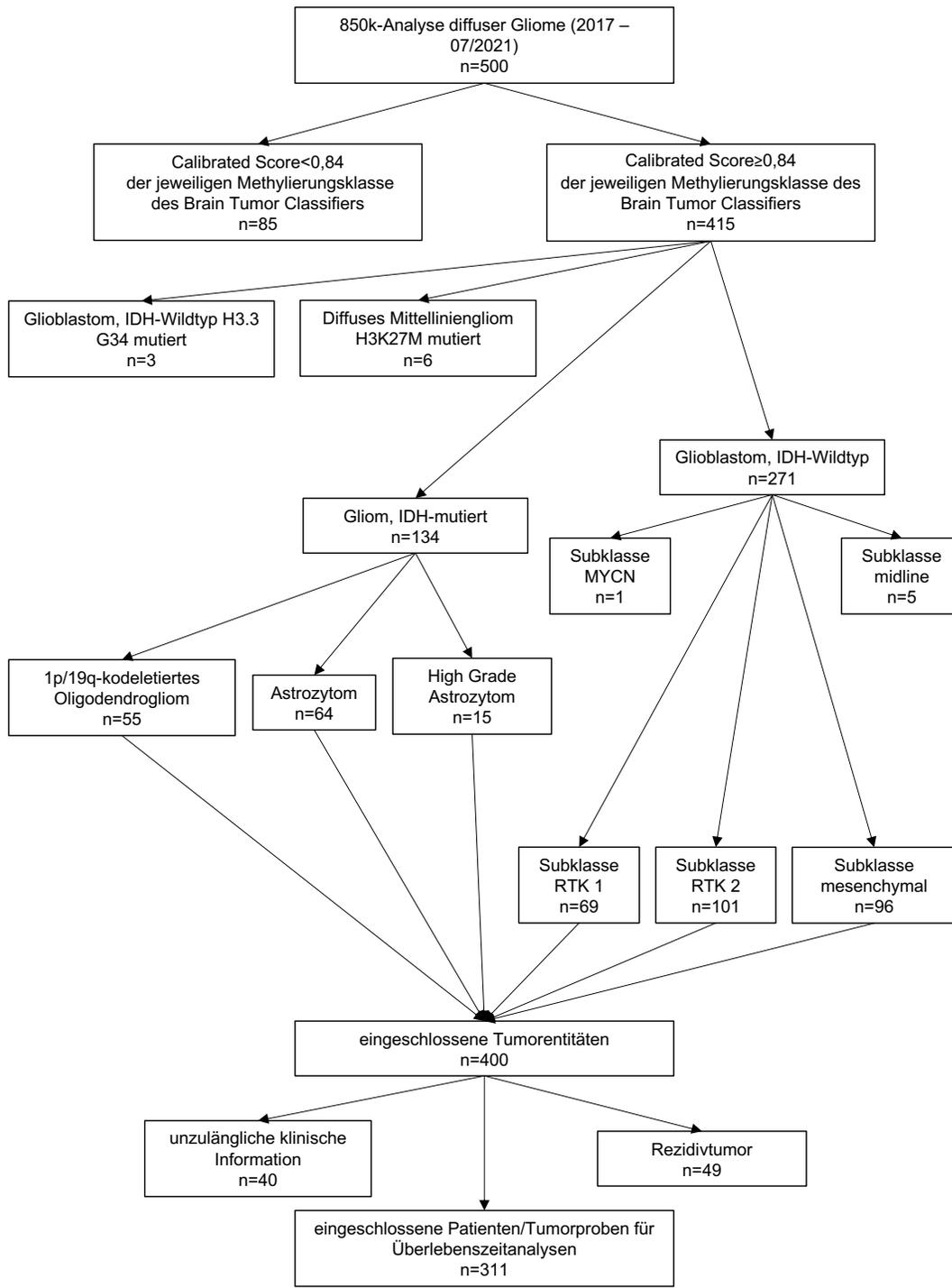


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der 850k-Kohorte sowie der Ein- und Ausschlusskriterien

3.1.1. Charakterisierung der Kohorte nach klinischen und neuropathologischen Parametern

Die folgende Charakterisierung der Kohorte bezieht sich auf n=311 Patienten, die für die Überlebenszeitanalysen eingeschlossen wurden. Eine Übersicht bezüglich der erhobenen klinischen und neuropathologischen Parameter bietet Tabelle 4.

Das mediane Lebensalter der Patienten zu dem Zeitpunkt der Resektion lag bei 59 Jahren. 61,74% der Patienten waren männlich. Die Mehrzahl der eingeschlossenen Tumoren entsprach einem ZNS WHO-Grad 4 (68,81%) bzw. einem *Glioblastom, IDH-Wildtyp* (69,77%). Für drei der eingeschlossenen Patienten, deren Methylierungskategorie das *Glioblastom, IDH-Wildtyp* darstellt, konnte kein ZNS WHO-Grad vergeben werden, da die Enddiagnose (nach Integration der klinischen und neuropathologischen Daten) von der Methylierungskategorie abwich. Die häufigste Methylierungssubklasse stellte die Subklasse *mesenchymal* (27,01%) dar. 45,98% der Tumorgewebeproben wurden im Rahmen einer stereotaktischen Biopsie entnommen. Einen präoperativen Karnofsky-Index von 100 erreichten 27% der Patienten, was einem klinisch normalen Zustand ohne Schmerzen entspricht. Der mediane Karnofsky-Index für die vorliegende Stichprobe lag bei 90. Die Mehrheit der Patienten hatte eine Chemotherapie (60,45%) und Radiotherapie (71,06%) als Erstlinientherapie erhalten. Der Anteil der Patienten, die eine Resektion erhalten hatten (54,02%), entspricht der Differenz zwischen den eingeschlossenen Patienten und denjenigen, die eine stereotaktische Biopsie erhalten haben.

Anzahl der eingeschlossenen Patienten	311
Alter	
Median	59
Spannweite	18 – 86
Standardabweichung	16,6
Geschlechter	
männlich/weiblich	192/119
% männlich	61,74
ZNS WHO Grad, n (%)	
Nicht näher bezeichnet	3 (0,96)

2	27 (8,68)
3	67 (21,54)
4	214 (68,81)
Methylierungsklasse, n (%)	
Glioblastom, IDH-Wildtyp	217 (69,77)
Glioblastom, IDH-mutiert	94 (30,23)
Methylierungssubklasse 1, n (%)	
1p/19q-kodeletiertes Oligodendrogliom	35 (11,25)
Astrozytom	51 (16,4)
High Grade Astrozytom	7 (2,25)
Mesenchymal	84 (27,01)
RTK 1	56 (18,01)
RTK 2	78 (25,08)
Resektionsausmaß, n (%)	
Komplett	51 (16,4)
Nahezu komplett (>90%)	52 (16,72)
Inkomplett (<90%)	46 (14,79)
Stereotaxie (STX)	143 (45,98)
Keine Angabe	19 (6,11)
Präoperativer Karnofsky-Index, n (%)	
20	1 (0,32)
30	0 (0)
40	7 (2,25)
50	9 (2,89)
60	21 (6,75)
70	43 (13,83)
80	41 (13,18)
90	78 (25,08)
100	84 (27,01)
Keine Angabe	27 (8,68)
Erstlinientherapie, n (%)	
Chemotherapie	188 (60,45)
Radiotherapie	221 (71,06)

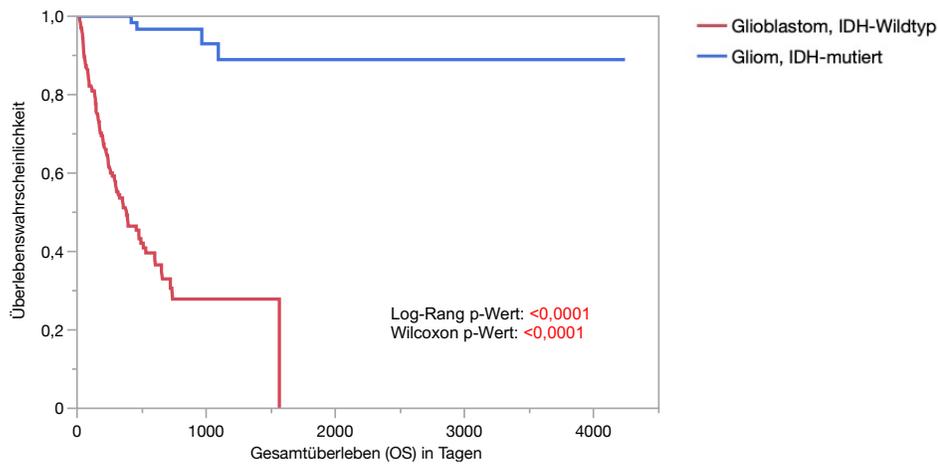
Tabelle 4: Charakterisierung der 850k-Kohorte nach klinischen und neuropathologischen Parametern

3.1.2. Überlebenszeitanalysen nach epigenetischen Subgruppen und klinischen Parametern

Die Überlebenszeitanalyse nach epigenetischen Subgruppen ist in Abbildung 3 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Überlebensnachteil für die Methylierungsgruppe *Glioblastom, IDH-Wildtyp*, welche ein mittleres Überleben von

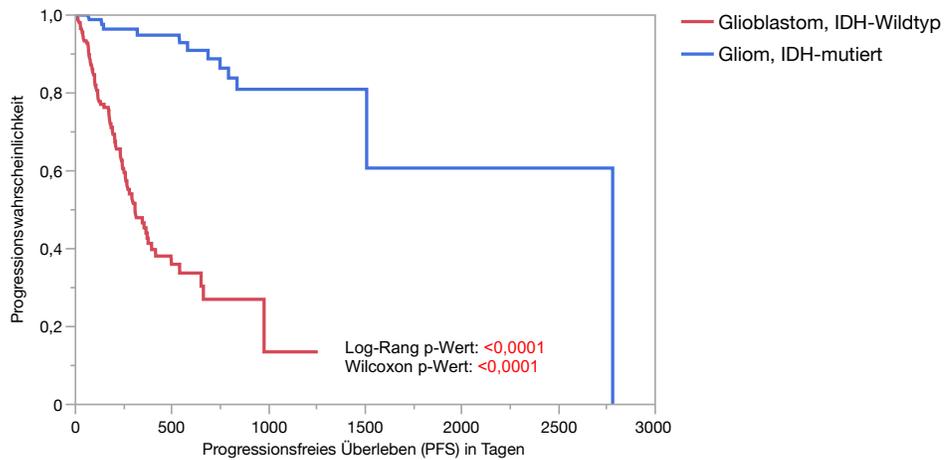
ca. 647 Tagen aufwies, im Vergleich zu der Gruppe *Gliom, IDH-mutiert* mit einem mittleren Überleben von ca. 1066 Tagen ($p < 0,0001$). Das progressionsfreie Überleben der Methylierungsgruppe *Glioblastom, IDH-Wildtyp* war signifikant kürzer ($p < 0,0001$) als das der Gruppe *Gliom, IDH-mutiert*.

A

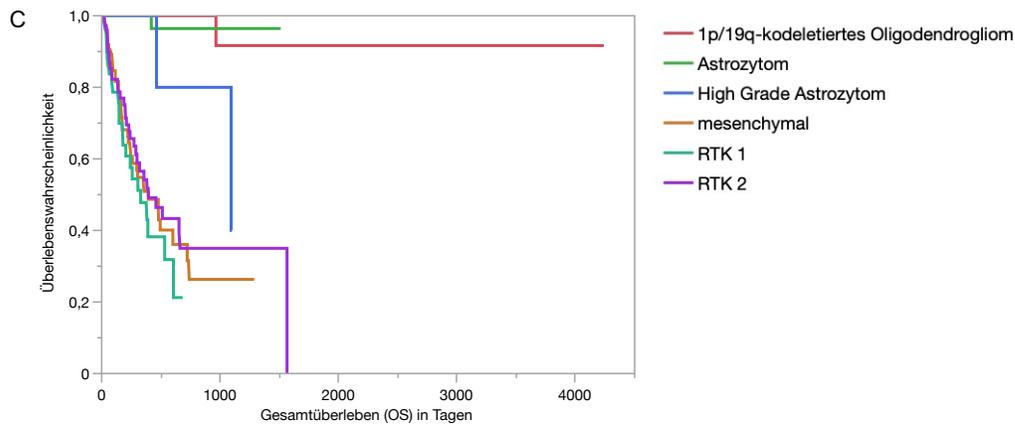


Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
Glioblastom, IDH-Wildtyp	94	122	647,2	383	296 – 513
Gliom, IDH-mutiert	4	90	1066,69	-	-

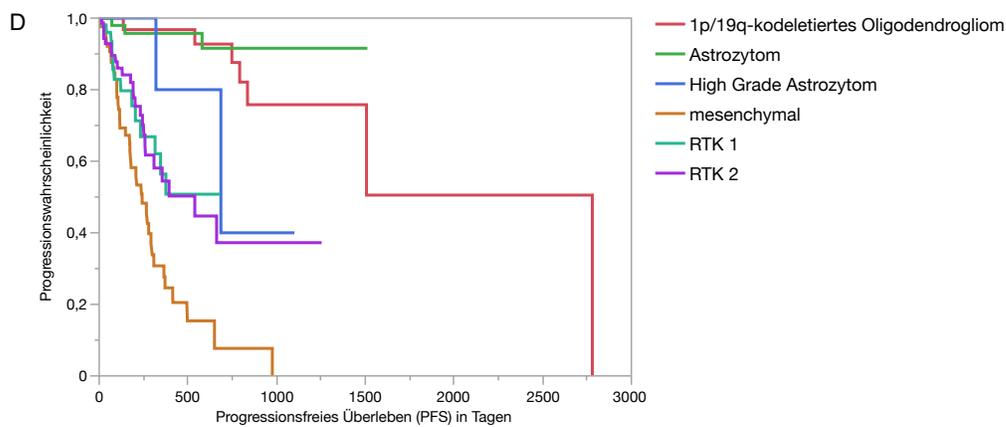
B



Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
Glioblastom, IDH-Wildtyp	79	137	453,72	309	258 – 394
Gliom, IDH-mutiert	12	82	2100,9	2780	1507 – 2780



Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
1p/19q-kodeletiertes Oligodendrogliom	1	34	965	-	-
Astrozytom	1	50	419	-	-
High Grade Astrozytom	2	5	967	1093	463 – 1093
Mesenchymal	37	47	422,81	394	242 – 722
RTK 1	24	32	342,14	329	177 – 606
RTK 2	33	44	727,43	395	273 – 1565



Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
1p/19q-kodeletiertes Oligodendrogliom	7	28	1946,39	2780	1507 – 2780
Astrozytom	3	48	559,93	-	-
High Grade Astrozytom	2	5	612,8	686	320 -
Mesenchymal	41	43	305,62	242	173 – 299
RTK 1	14	42	288,44	-	-
RTK 2	24	53	427,43	539	258 -

Abbildung 3: Überlebenszeitanalysen unter Darstellung der Kaplan-Meier-Kurven und der entsprechenden statistischen Daten nach epigenetischen Subgruppen und klinischen Parametern (A: OS nach Methylierungsgruppe, B: PFS nach Methylierungsgruppe C: OS nach Methylierungssubgruppe, D: PFS nach Methylierungssubgruppe)

3.2. Deskription der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte

Die weiteren Analysen bezüglich der epigenetischen Subgruppen des *Glioblastoms*, *IDH-Wildtyp* wurden an der im Folgenden beschriebenen Kohorte durchgeführt. Diese stellt eine Teilmenge der unter 3.1. beschriebenen 850k-Kohorte dar. Die Ausschlusskriterien entsprachen den Kriterien, die unter 3.1. genannt wurden. Darüber hinaus wurden Patienten von den weiteren Analysen ausgeschlossen, welche lediglich eine stereotaktische Biopsie erhielten (n=118). Patienten, deren Operation vor 2017 durchgeführt wurde (n=1), Patienten deren abschließende Diagnose, das heißt nach Integration der Ergebnisse der 850k-Analyse sowie der klinischen Kriterien, nicht einem *Glioblastom*, *IDH-Wildtyp* entsprach (n=5), wurden ausgeschlossen und in ihrer Gesamtheit als *exkludiert* (n=6) gekennzeichnet. Patienten, deren Tumorprobe durch den *Brain Tumor Classifier* als *Glioblastom*, *IDH-Wildtyp*, Subgruppe *midline* klassifiziert wurde (n=2), wurden aufgrund einer zu geringen Fallzahl nicht in die Analysen miteinbezogen.

Die GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte umfasste insgesamt n=100 *Glioblastome*, *IDH-Wildtyp*, darunter waren n=38 *Glioblastome*, *IDH-Wildtyp* der Subklasse *mesenchymal*, n=26 *Glioblastome*, *IDH-Wildtyp* der Subklasse *RTK 1* und n=36 *Glioblastome*, *IDH-Wildtyp* der Subklasse *RTK 2*. Die Zusammensetzung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte sowie die Ein- und Ausschlusskriterien sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

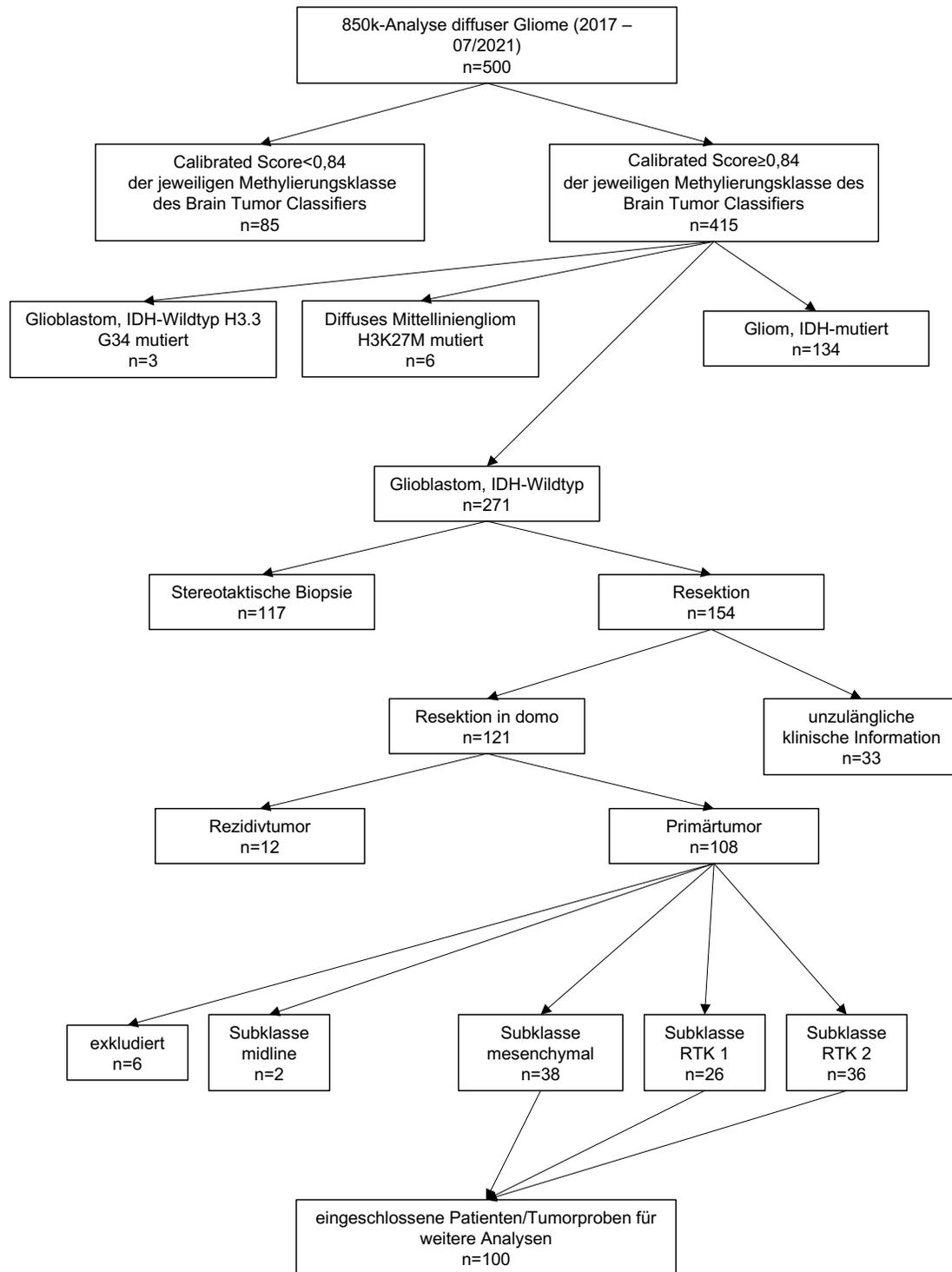


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte sowie der Ein- und Ausschlusskriterien

3.2.1. Charakterisierung der Kohorte nach epigenetischen Subgruppen, klinischen und neuropathologischen Parametern

Tabelle 5 beinhaltet die erhobenen klinischen und neuropathologischen Merkmale der *GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte*. Die Subgruppe *RTK 1* wies das höchste mediane Alter in Höhe von 66 Jahren und den höchsten Anteil an männlichen Patienten (73,08%) auf. Bei 50% der Patienten der Subgruppe *RTK 2* zeigte sich ein methylierter *MGMT*-Promotor. Das Resektionsausmaß der untersuchten epigenetischen Subgruppen war vergleichbar. Die Subgruppe *mesenchymal* wies den höchsten Anteil an Patienten auf, welche im Rahmen der Erstlinientherapie mit Chemotherapie (76,32%) und/oder Radiotherapie (89,47%) behandelt wurden.

	RTK 1	RTK 2	Mesenchymal
n	26	36	38
Alter			
Median	66	60,5	60,5
Spannweite	52-85	43-86	36-83
Geschlechter			
männlich/weiblich	19/7	22/14	20/18
% männlich	73,08	61,11	52,63
MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, n (%)			
Methyliert	10 (38,46)	18 (50)	17 (44,74)
Resektionsausmaß, n (%)			
Komplett	8 (30,77)	11 (30,56)	11 (28,95)
Nahezu komplett (>90%)	8 (30,77)	12 (33,33)	13 (34,21)
Inkomplett (<90%)	8 (30,77)	11 (30,56)	11 (28,95)
Keine Angabe	2 (7,69)	2 (5,55)	3 (7,89)
Präoperativer Karnofsky-Index, n (%)			
20		1 (2,78)	
40		1 (2,78)	
50	1 (3,85)		
60	1 (3,85)		1 (2,63)
70	5 (19,23)	7 (19,44)	6 (15,79)
80	6 (23,08)	5 (13,89)	6 (15,79)
90	6 (23,08)	12 (33,33)	10 (26,32)
100	2 (7,69)	8 (22,22)	11 (28,95)
Keine Angabe	5 (19,23)	2 (5,55)	4 (10,53)
Median-Zeit: Gesamtüberleben, Tage/Monate	606/20,2	653/21,77	601/20,03
Median-Zeit: Progressionsfreies Überleben, Tage/Monate	376/12,5		242/8,06
Erstlinientherapie, n (%)			
Chemotherapie	14 (53,85)	21 (58,33)	29 (76,32)
Radiotherapie	19 (73,08)	26 (72,22)	34 (89,47)

Tabelle 5: Deskriptive Charakterisierung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte nach epigenetischen Subgruppen, klinischen und neuropathologischen Parametern

3.2.2. Charakterisierung der EPIC-TMA-Kohorte

Die EPIC-TMA-Kohorte beinhaltete jegliche Patienten, deren Tumorgewebe mittels immunhistochemischer Färbungen auf oben genannte Mikroglia- und Makrophagenmarker untersucht wurde. Die EPIC-TMA-Kohorte bestand aus n=27 Patienten mit einem medianen Alter von 66 Jahren, wovon 62,96% Patienten männlich waren. Alle eingeschlossenen Tumorgewebeproben wurden mittels *Brain Tumor Classifier* als *Glioblastom, IDH-Wildtyp* klassifiziert und konnten den drei epigenetischen Subgruppen *mesenchymal* (n=14), *RTK 1* (n=6) und *RTK 2* (n=7) zugeordnet werden. Bei n=11 Patienten zeigte sich ein methylierter MGMT-Promotor. Die erhobenen klinischen und neuropathologischen Charakteristika der EPIC-TMA-Kohorte sind in Tabelle 6 dargestellt.

N	27
Alter	
Median	66
Spannweite	36 – 86
Geschlechter	
Männlich/weiblich	17/10
% männlich	62,96
Methylierungssubklasse 1, n (%)	
Mesenchymal	14 (51,85)
RTK 1	6 (22,22)
RTK 2	7 (25,93)
MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, n (%)	
Methyliert	11 (40,74)
Resektionsausmaß, n (%)	
Komplett	7 (25,93)
Nahezu komplett (>90%)	11 (40,74)
Inkomplett (<90%)	6 (22,22)
Keine Angabe	3 (11,11)
Präoperativer Karnofsky-Index, n (%)	
40	1 (3,7)
50	1 (3,7)
70	6 (22,22)
80	2 (7,4)
90	7 (25,93)
100	4 (14,81)

Keine Angabe	6 (22,22)
Erstlinientherapie, n (%)	
Chemotherapie	15 (55,56)
Radiotherapie	21 (77,78)

Tabelle 6: Deskriptive Charakterisierung der EPIC-TMA-Kohorte und Darstellung der erhobenen klinischen und neuropathologischen Parameter

Die folgende Analysen beziehen sich auf die GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte.

3.2.3. Überlebenszeitanalysen nach epigenetischen Subgruppen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)

Das Gesamtüberleben der drei untersuchten epigenetischen Subgruppen unterschied sich nicht signifikant (siehe Abbildung 5A). Die Subgruppe *mesenchymal* zeigte das kürzeste progressionsfreie Überleben, welches im Mittel 298 Tage betrug. Nach 242 Tagen zeigten 50% der Subgruppe *mesenchymal* einen bildmorphologisch gesicherten Progress (siehe Abbildung 5B). Diese epigenetische Subgruppe wies das kürzeste progressionsfreie Überleben im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Subgruppen auf.

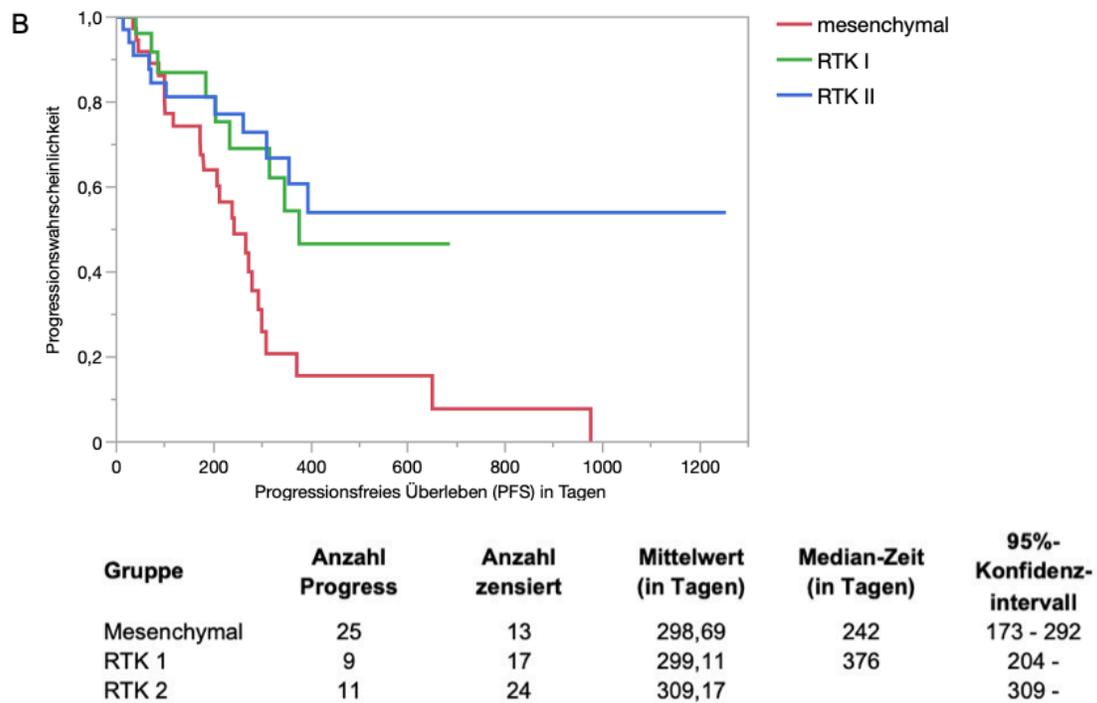
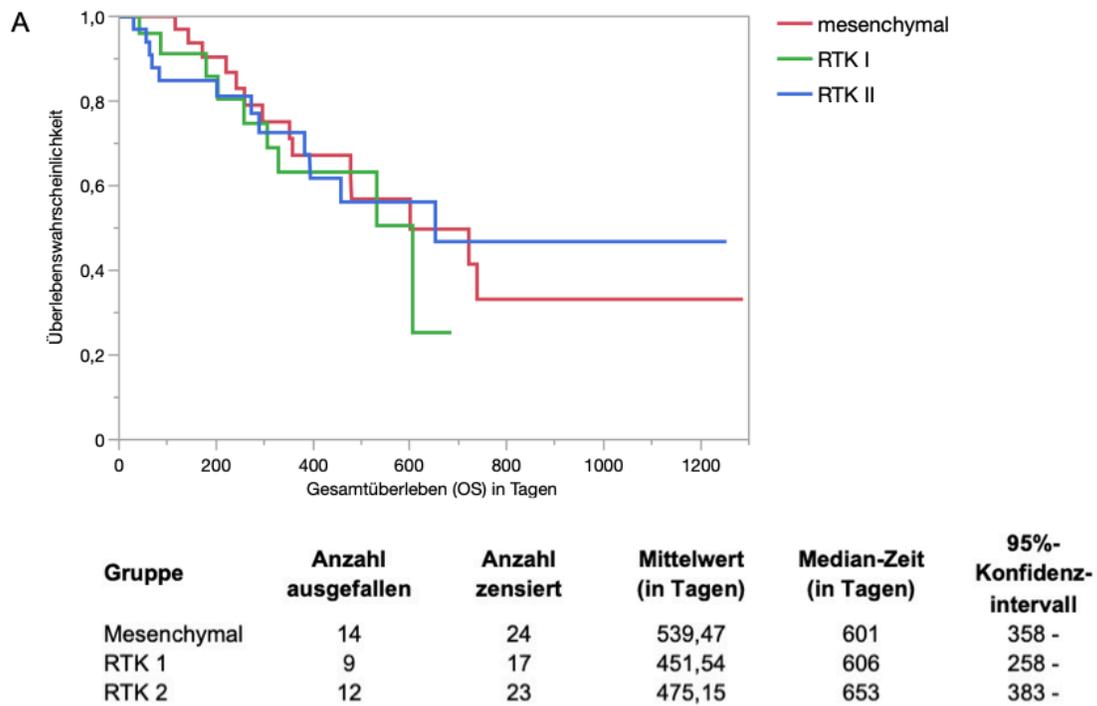


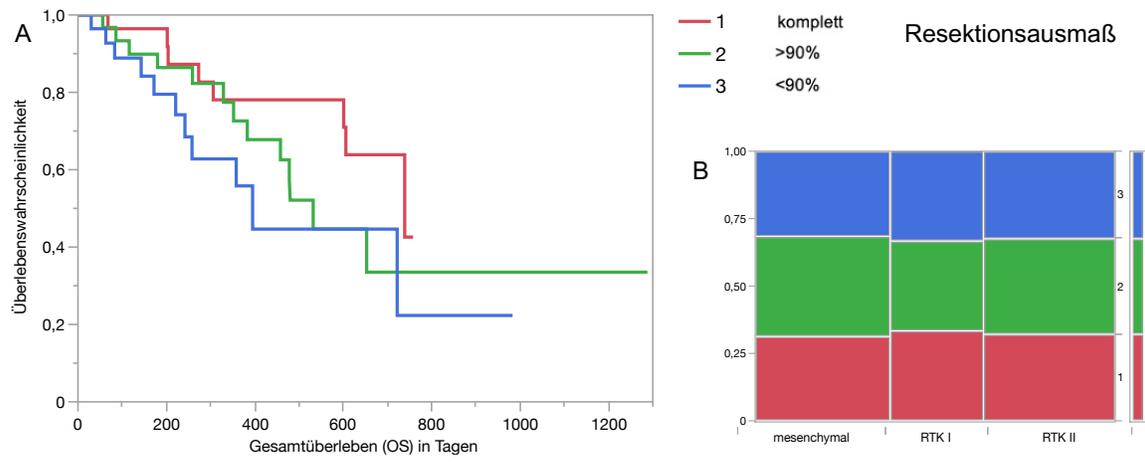
Abbildung 5: Überlebenszeitanalysen nach epigenetischer Subgruppe und entsprechende statistische Daten (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte) (A: OS nach epigenetischer Subgruppe, B: PFS nach epigenetischer Subgruppe)

3.2.4. Überlebenszeitanalysen nach klinischen Parametern (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)

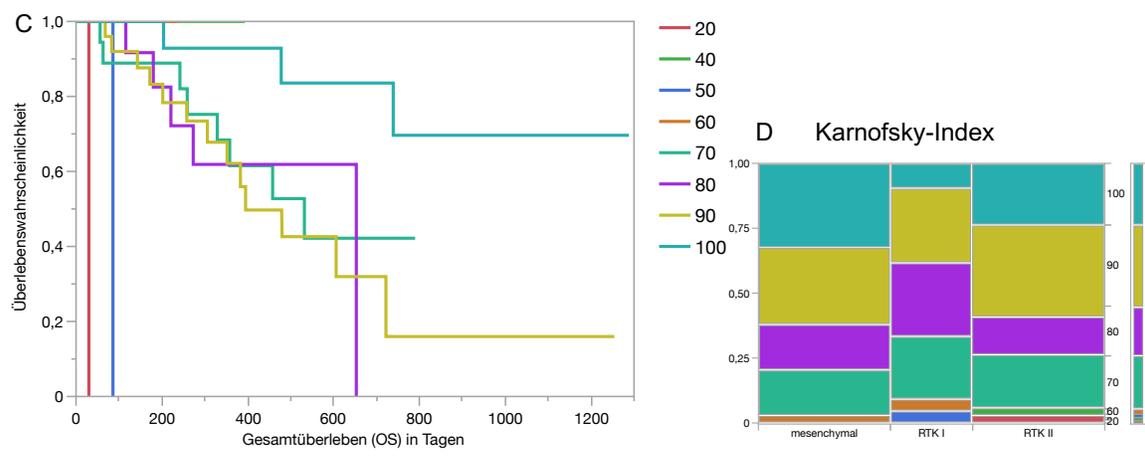
Jene Patienten, die einer Komplettresektion unterzogen werden konnten, wiesen das längste mittlere Überleben auf (Mittelwert: 605,3 Tage, Median: 739 Tage). Das kürzeste Gesamtüberleben zeigte sich bei dem geringsten untersuchten Resektionsausmaß (<90%) (siehe Abbildung 6A). Keine Unterschiede ergaben sich für die Verteilung der Resektionsausmaße innerhalb der drei untersuchten Gruppen (siehe Abbildung 6B).

Das längste mittlere Überleben zeigten Patienten mit einem präoperativen Karnofsky-Index von 100 (Mittelwert: 676 Tage) (siehe Abbildung 6C). Hinsichtlich der Verteilung des präoperativen Karnofsky-Index erwiesen sich die Subgruppen *mesenchymal* und *RTK 2* als vergleichbar. Die Subgruppe *RTK 1* wies einen deutlich geringeren Anteil an Patienten mit einem präoperativen Karnofsky-Index von 100 auf (siehe Abbildung 6D).

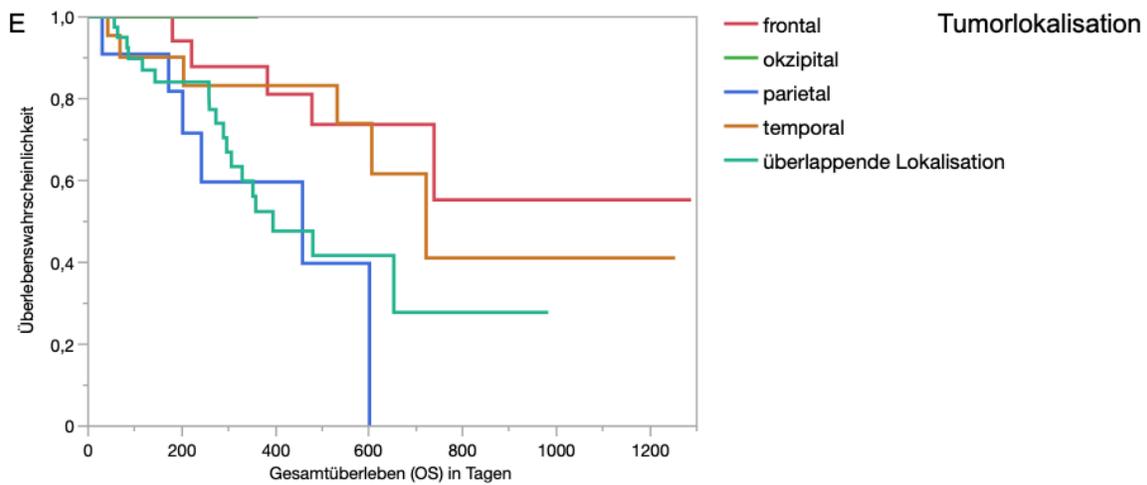
Es zeigten sich außerdem Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens bei Einteilung der Kohorte nach der Tumorlokalisation. Die Lokalisationen *frontal* und *temporal* waren bei einem Mittelwert von 630 bzw. 588 Tagen mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert. Das Gesamtüberleben der Gruppen *parietal* und *überlappende Lokalisation* war kürzer (Mittelwert: 398 bzw. 430 Tage). Für die Gruppe *okzipital* konnte aufgrund der Fallzahl von n=3 kein mittleres Überleben berechnet werden (siehe Abbildung 6E).



Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
1	8	22	605,3	739	601 -
2	13	19	482,29	532	383 -
3	11	19	453,03	395	242 -



Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
20	1	0	30	30	
40	0	1			
50	1	0	86	86	
60	0	2			
70	8	10	408,72	532	259 -
80	5	12	481,15	653	180 - 653
90	13	15	457,3	395	258 - 722
100	3	17	676,55		478 -



Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
Frontal	5	14	630,3		478 -
Okzipital	0	3			
Parietal	6	5	398,01	458	172 – 601
Temporal	18	23	588,2	722	532 -
Überlappende Lokalisation	18	23	430,58	395	296 -

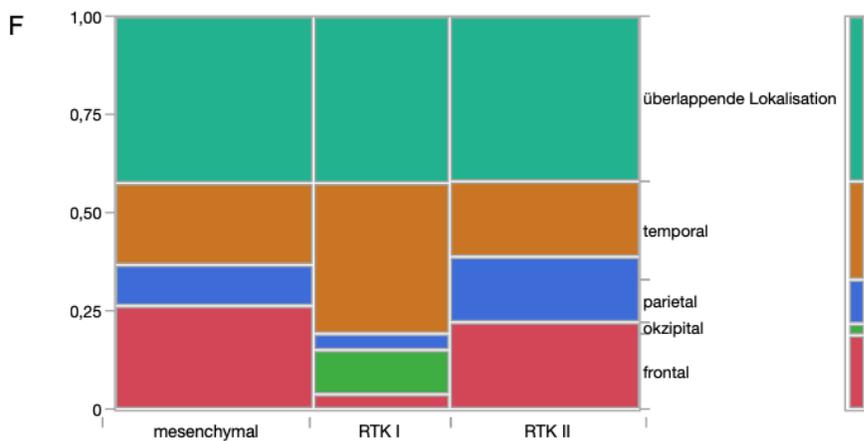


Abbildung 6: Überlebenszeitanalysen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte) nach klinischen Parametern und entsprechende statistische Daten (A: OS nach Resektionsausmaß, B: Darstellung der Verteilung des Resektionsausmaß nach epigenetischer Subgruppe, C: OS nach präoperativem Karnofsky-Index, D: Darstellung der Verteilung des präoperativen Karnofsky-Index nach epigenetischer Subgruppe, E: OS nach Tumorlokalisation, F: Verteilung der Tumorlokalisation nach epigenetischer Subgruppe)

3.2.5. Überlebenszeitanalysen nach MGMT Promotor-Methylierungsstatus (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)

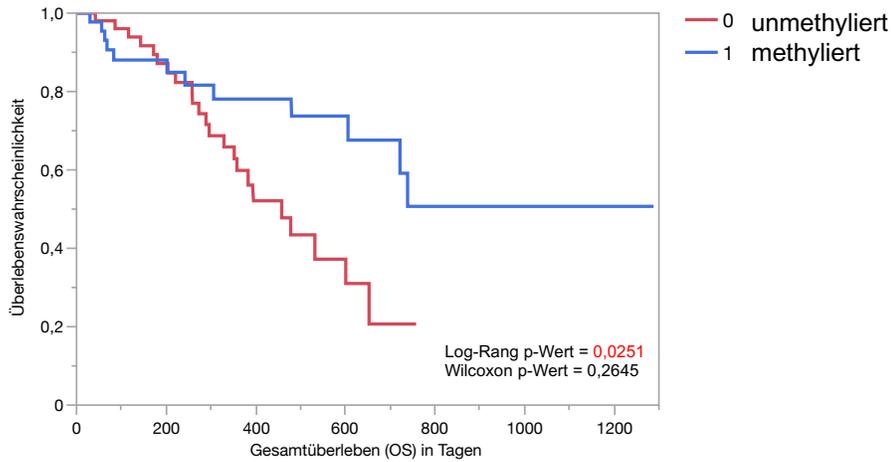
Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors und dem Gesamtüberleben zeigte ein längeres Gesamtüberleben derjenigen Patienten, deren Tumoren einen methylierten MGMT-Promotor aufwiesen (siehe Abbildung 7A). Dieses Ergebnis erreichte im Log-Rang-Test Signifikanz ($p=0,0251$).

Innerhalb der epigenetischen Subgruppe *mesenchymal* zeigte sich ebenfalls ein Überlebensvorteil für die Gruppe der Tumoren mit methyliertem MGMT-Promotor. Der Effekt wies innerhalb der Subgruppe ein höheres Signifikanzniveau auf (Log-Rang p -Wert = 0,0113, Wilcoxon p -Wert = 0,0199) als in der Gesamtkohorte (siehe Abbildung 7B). N=6 der untersuchten Patienten innerhalb der Subgruppe *mesenchymal* hatten keine Chemotherapie erhalten; darunter waren n=5 Tumore mit dem MGMT-Promotor-Status *unmethyliert*.

Der oben beschriebene Effekt zeigte sich außerdem innerhalb der Subgruppe *RTK 1* (siehe Abbildung 7C). Ein methylierter MGMT-Promotor war mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert. Der Effekt erreichte jedoch keine Signifikanz (Log-Rang p -Wert = 0,2787, Wilcoxon p -Wert = 0,17).

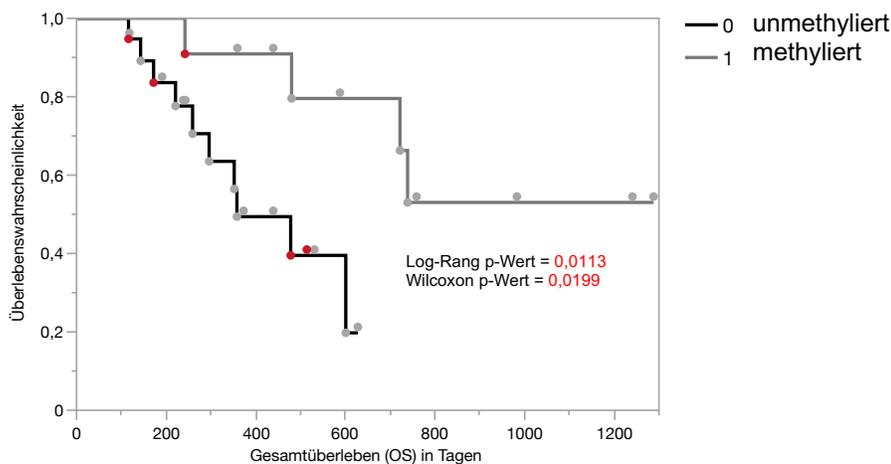
Die Dichotomisierung der Subgruppe *RTK 2* nach MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und die Untersuchung von Zusammenhängen mit dem Gesamtüberleben zeigte gegenteilige Ergebnisse zu den bereits beschriebenen Effekten. Ein kürzeres Gesamtüberleben zeigte die Gruppe *methyliert* (Mittelwert: 160 Tage) im Vergleich zu der Gruppe *unmethyliert* (Mittelwert: 487 Tage). Es wurde keine Signifikanz erreicht. Innerhalb der Gruppe *methyliert* waren n=5 Patienten enthalten, die sowohl das kürzeste Gesamtüberleben aufzeigten als auch keine Chemotherapie erhalten hatten (siehe Abbildung 7D).

A: alle epigenetischen Subgruppen



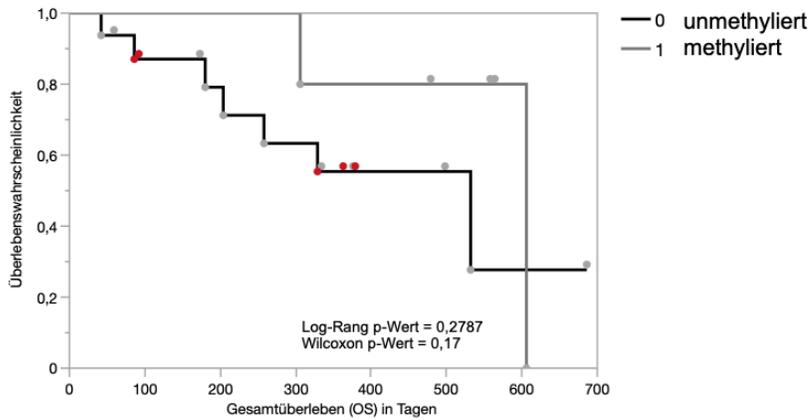
Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	23	31	436,24	458	329 – 653
1	12	33	588,52		606 -

B: mesenchymal



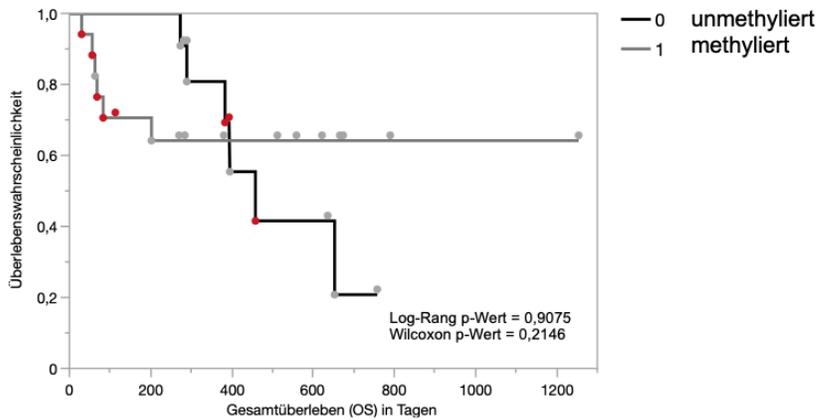
Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	10	11	410,83	358	259 -
1	4	13	662,13		480 -

C: RTK 1



Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	7	9	379,94	532	180 -
1	2	8	546	606	306 - 606

D: RTK 2



Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	6	11	487,77	458	289 -
1	6	12	160,24	68	68 -

Abbildung 7: Überlebenszeitanalysen nach MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und entsprechende statistische Daten (A: alle epigenetischen Subgruppen inbegriffen, B: Subgruppe mesenchymal, C: RTK 1, D: RTK 2; jegliche Patienten, die keine Chemotherapie erhalten hatten, sind im Diagramm rot hervorgehoben)

3.2.6. Deskription der Copy Number Variationen bei den etablierten epigenetischen Subgruppen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)

Hinsichtlich der drei untersuchten epigenetischen Subgruppen des *Glioblastoms*, *IDH-Wildtyp* zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich des Vorhandenseins einer Amplifikation auf Chromosom 7 und einer Deletion auf Chromosom 10. Innerhalb der Gruppe *RTK 2* wiesen signifikant mehr Tumore eine homozygote *CDKN2A/B*-Deletion als innerhalb der Gruppe *mesenchymal* ($p=0,0062$) und der Gruppe *RTK 1* ($p=0,0087$) auf. Ebenfalls wies die Gruppe *RTK 2* häufiger eine *EGFR*-Amplifikation auf als die Gruppe *mesenchymal* ($p<0,0001$) und die Gruppe *RTK 1* ($p<0,0001$). Tumoren der Gruppe *mesenchymal* zeigten seltener eine *PTEN*-Deletion als Tumoren der Gruppen *RTK 1* ($p=0,0149$) und *RTK 2* ($p=0,0005$). Das Vorkommen der Copy Number Variationen bei den epigenetischen Subgruppen in ganzen Zahlen zeigt Tabelle 7 (für die prozentualen Anteile siehe Abbildung 8A-E), während Tabelle 8 die Gruppenunterschiede darstellt.

CNV	Kategorie	0 (nein)	1 (ja)
Amplifikation auf Chromosom 7	Mesenchymal	4	34
	RTK 1	5	19
	RTK 2	4	30
Deletion auf Chromosom 10	Mesenchymal	1	37
	RTK 1	1	23
	RTK 2	0	34
Homozygote CDKN2A/B-Deletion	Mesenchymal	15	23
	RTK 1	10	14
	RTK 2	4	30
EGFR-Amplifikation	Mesenchymal	24	14
	RTK 1	19	5
	RTK 2	3	31
PTEN-Deletion	Mesenchymal	23	15
	RTK 1	7	17
	RTK 2	7	27

Tabelle 7: Vorkommen der Copy Number Variationen bei den epigenetischen Subgruppen in absoluten Zahlen

CNV	Kategorie	- Kategorie	p-Wert
Amplifikation auf Chromosom 7	Mesenchymal	RTK 1	0,2681
	Mesenchymal	RTK 2	0,6875
	RTK 1	RTK 2	0,3512
Deletion auf Chromosom 10	Mesenchymal	RTK 1	0,7421
	Mesenchymal	RTK 2	0,2559
	RTK 1	RTK 2	0,181
Homozygote CDKN2A/B-Deletion	Mesenchymal	RTK 1	0,8639
	Mesenchymal	RTK 2	0,0062
	RTK 1	RTK 2	0,0087
EGFR-Amplifikation	Mesenchymal	RTK 1	0,1758
	Mesenchymal	RTK 2	<0,0001
	RTK 1	RTK 2	<0,0001
PTEN-Deletion	Mesenchymal	RTK 1	0,0149
	Mesenchymal	RTK 2	0,0005
	RTK 1	RTK 2	0,4542

Tabelle 8: tabellarische Darstellung der Unterschiede zwischen den epigenetischen Subgruppen bezüglich des Vorkommens von Copy Number Variationen

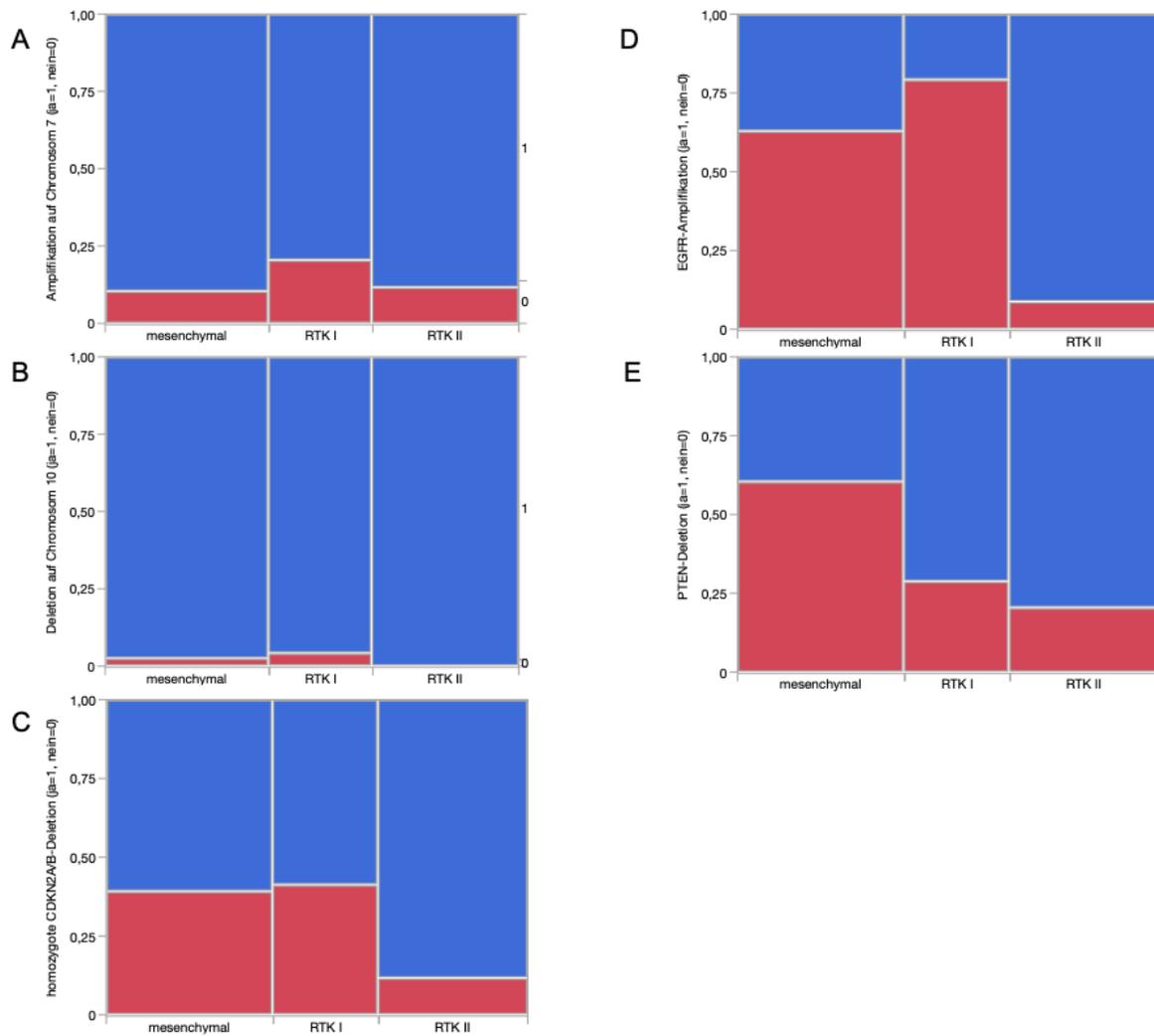


Abbildung 8: Darstellung der prozentualen Anteile der jeweiligen Copy Number Variationen bei den epigenetischen Subgruppen (A: Amplifikation auf Chromosom 7, B: Deletion auf Chromosom 10, C: homozygote CDKN2A/B-Deletion, D: EGFR-Amplifikation, E: PTEN-Deletion)

3.2.7. Zelluläre Zusammensetzung des Tumorgewebes in den etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)

Es zeigten sich Unterschiede bezüglich der zellulären Zusammensetzung der etablierten epigenetischen Subgruppen des *Glioblastoms, IDH-Wildtyp*. Die Anteile der untersuchten Zellpopulationen an der Gesamtzellzahl wurden *in silico* mithilfe des LUMP-Algorithmus sowie des MethylCIBERSORT-Algorithmus ermittelt. Die Bezeichnungen der verschiedenen Zellpopulationen wurden entsprechend der verwendeten Referenzsheets eingesetzt.

Die Analyse der Zellanteile der Nicht-Immunzellen (siehe Abbildung 9A, Tabelle 9 und Tabelle 10) zeigte einen signifikant höheren Anteil an *Cancer Cells* bei den Subklassen *RTK 1* (Median: 0,4076) und *RTK 2* (Median: 0,4364) jeweils im Vergleich zu der Subklasse *mesenchymal* (Median: 0,2429) ($p < 0,0001$). Ein signifikant höherer Anteil an *Fibroblasts* zeigte sich bei den Subklassen *mesenchymal* (Median: 0,0302) und *RTK 2* (Median: 0,0444) jeweils im Vergleich zu der Subklasse *RTK 1* (Median: 0,0102) ($p < 0,0001$). Es befanden sich signifikant mehr *Glia* in der Subklasse *RTK 1* (Median: 0,3735) im Vergleich zu den Subklassen *mesenchymal* (Median: 0,2851, $p = 0,0022$) und *RTK 2* (Median: 0,2597, $p < 0,0001$). Bezüglich des Zelltyps *Neurons* zeigte die Subklasse *RTK 1* (Median: 0) einen signifikant geringeren Anteil dieser Zellpopulation im Vergleich zu den Subklassen *mesenchymal* (Median: 0,0076, $p < 0,0001$) und *RTK 2* (Median: 0,0104, $p < 0,0001$). Die Subklasse *mesenchymal* zeigte einen signifikant höheren Anteil an Endothelzellen (Median: 0,0176) im Vergleich zu den Subtypen *RTK 1* (Median: 0, $p = 0,0069$) und *RTK 2* (Median: 0, $p = 0,014$).

Bezüglich der Immunzellzusammensetzung der untersuchten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp (siehe Abbildung 9B, Tabelle 9 und Tabelle 10), zeigte die Analyse der Verteilung der *LUMPs*, dass die Subklasse *mesenchymal* mit einem signifikant höheren Anteil an Immunzellen (Median: 0,3902)

einhergeht als die Subklassen *RTK 1* (Median: 0,264, $p=0,0024$) und *RTK 2* (Median: 0,2213, $p<0,0001$). Die *in silico*-Dekonvolution mittels MethylCIBERSORT-Algorithmus zeigte darüber hinaus Unterschiede bezüglich der verschiedenen Immunzelltypen. Die Subklasse *mesenchymal* wies mit einem Median von 0,1386 signifikant mehr *CD14*-positive Zellen auf als die beiden Subklassen *RTK 1* (Median: 0,0047, $p=0,0141$) und *RTK 2* (Median: 0,0456, $p<0,0001$). Im Vergleich zu der Subklasse *mesenchymal* (Median: 0,0604) zeigte die Subklasse *RTK 1* (Median: 0,0854) einen signifikant höheren Anteil an *CD8*-positiven Zellen ($p=0,0023$). Die Unterschiede bezüglich der weiteren untersuchten Zellpopulationen erreichten keine statistische Signifikanz.

Die Auswertung der untersuchten immunhistochemischen Mikroglia- und Makrophagenmarker (siehe Abbildung 10, Tabelle 11 und Tabelle 12) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den epigenetischen Subgruppen. Im Vergleich präsentierte sich die Subgruppe *mesenchymal* mit jeweils dem höchsten Anteil an *CD68*-, *CD11b*- und *CD163*-positiven Zellen, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen.

Der jeweilige Anteil der mittels Immunhistochemie untersuchten Zellpopulationen wurde mit dem entsprechenden Anteil an *LUMPs* und *CD14*-positiven Zellen in Beziehung gesetzt und deren linearer Zusammenhang mittels Regressionsanalyse untersucht (siehe Abbildung 11A-J). Es zeigte sich ein signifikanter positiver linearer Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *LUMPs* und den *Iba-1*-positiven Zellen ($p=0,0287$, lineare Anpassung: Immune Cell Content (LUMP) = $0,2213721 + 0,0038075 \cdot Iba1$ in %) sowie den *CD163*-positiven Zellen ($p=0,002$, lineare Anpassung: Immune Cell Content (LUMP) = $0,2427083 + 0,0036788 \cdot CD163$ in %). Der Anteil an *CD14*-positiven Zellen korrelierte darüber hinaus positiv mit dem entsprechenden Anteil an *Iba-1*-positiven Zellen ($p=0,0133$, lineare Anpassung: $CD14 = 0,0215898 + 0,0034673 \cdot Iba1$ in %).

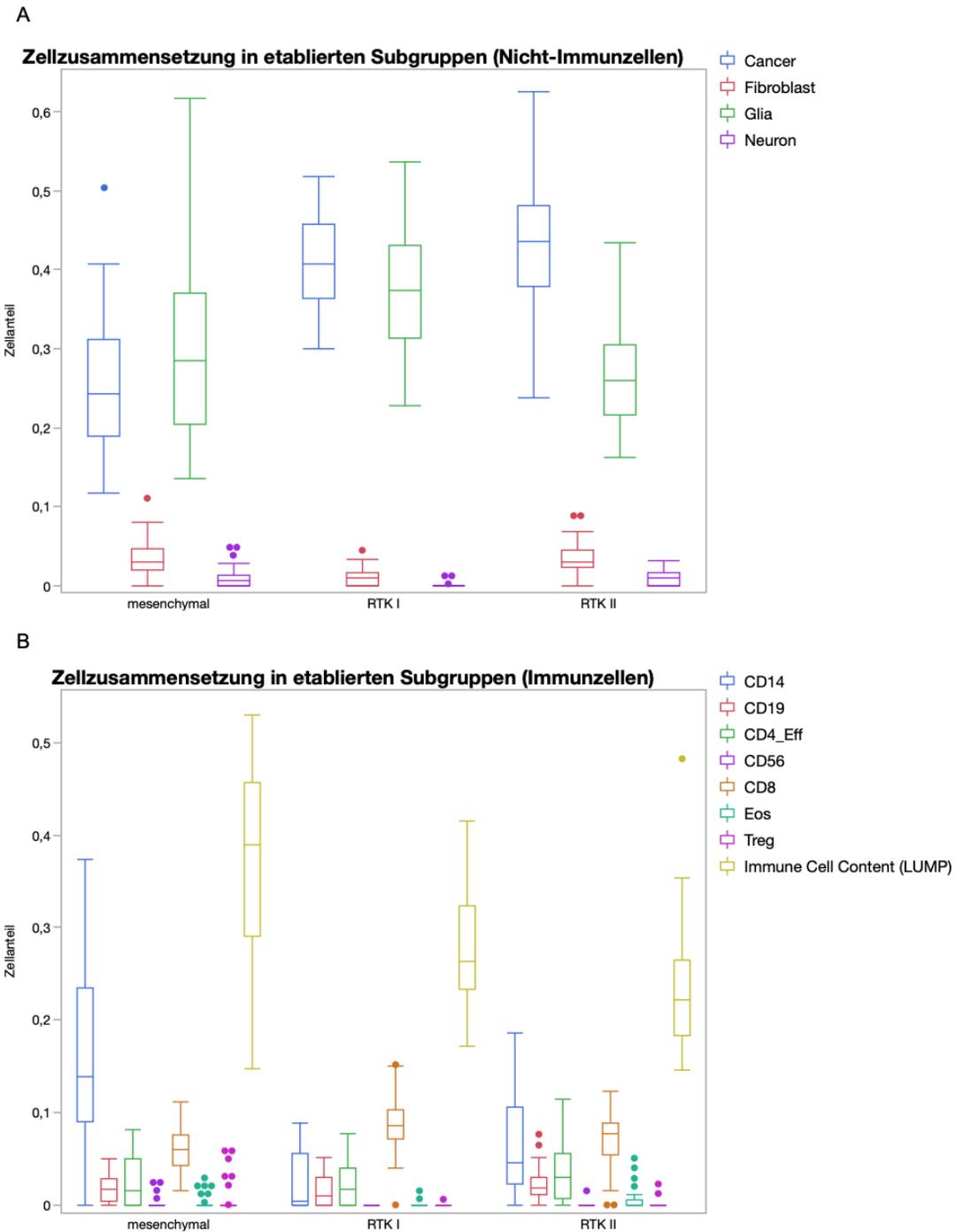


Abbildung 9: Zelluläre Zusammensetzung der etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp (A: Darstellung des Anteils der Nicht-Immunezellen mittels Boxplots, B: Darstellung des Anteils der Immunezellen (erhoben durch LUMP- und MethyCIBERSORT-Algorithmus) mittels Boxplots)

Zelltyp	Kategorie	- Kategorie	p-Wert
Cancer	RTK 2	Mesenchymal	<0,0001
	RTK 1	Mesenchymal	<0,0001
	RTK 2	RTK 1	0,8997
Fibroblasts	RTK 2	RTK 1	<0,0001
	RTK 2	Mesenchymal	1
	RTK 1	mesenchymal	<0,0001
Glia	RTK 1	Mesenchymal	0,0022
	RTK 2	Mesenchymal	0,86
	RTK 2	RTK 1	<0,0001
Neuron	RTK 2	RTK 1	<0,0001
	RTK 2	Mesenchymal	1
	RTK 1	Mesenchymal	<0,0001
Endothelial	RTK 2	RTK 1	1
	RTK 2	Mesenchymal	0,014
	RTK 1	Mesenchymal	0,0069
CD14	RTK 2	RTK 1	0,0141
	RTK 2	Mesenchymal	<0,0001
	RTK 1	Mesenchymal	<0,0001
CD19	RTK 2	RTK 1	0,0942
	RTK 2	Mesenchymal	0,7107
	RTK 1	Mesenchymal	0,8249
CD4_Eff	RTK 2	RTK 1	0,3554
	RTK 2	Mesenchymal	0,6243
	RTK 1	Mesenchymal	1
CD56	RTK 2	RTK 1	1
	RTK 2	Mesenchymal	0,3934
	RTK 1	Mesenchymal	0,1821
CD8	RTK 1	Mesenchymal	0,0023
	RTK 2	Mesenchymal	0,3324
	RTK 2	RTK 1	0,1811
Eos	RTK 2	RTK 1	0,0877
	RTK 2	Mesenchymal	0,7087
	RTK 1	Mesenchymal	0,7919
Treg	RTK 2	RTK 1	1
	RTK 2	Mesenchymal	0,1739
	RTK 1	Mesenchymal	0,1476
LUMPs	RTK 2	RTK 1	0,0882
	RTK 1	Mesenchymal	0,0024
	RTK 2	Mesenchymal	<0,0001

Tabelle 9: Darstellung statistischer Unterschiede bzgl. der Zellzusammensetzung

Zelltyp	Epigenetische Subgruppe	Median
Cancer	Mesenchymal	0,2429
	RTK 1	0,4076
	RTK 2	0,4364
Fibroblasts	Mesenchymal	0,0302
	RTK 1	0,0102
	RTK 2	0,0444
Glia	Mesenchymal	0,2851
	RTK 1	0,3735
	RTK 2	0,2597
Neuron	Mesenchymal	0,0076
	RTK 1	0
	RTK 2	0,0104
Endothelial	Mesenchymal	0,0176
	RTK 1	0
	RTK 2	0
CD14	Mesenchymal	0,1386
	RTK 1	0,0047
	RTK 2	0,0456
CD19	Mesenchymal	0,0172
	RTK 1	0,0101
	RTK 2	0,0178
CD4_Eff	Mesenchymal	0,0158
	RTK 1	0,0169
	RTK 2	0,0296
CD56	Mesenchymal	0
	RTK 1	0
	RTK 2	0
CD8	Mesenchymal	0,0604
	RTK 1	0,0854
	RTK 2	0,0776
Eos	Mesenchymal	0
	RTK 1	0
	RTK 2	0
Treg	Mesenchymal	0
	RTK 1	0
	RTK 2	0
LUMPs	Mesenchymal	0,3902
	RTK 1	0,264
	RTK 2	0,2213

Tabelle 10: Übersicht des Medians der Zellpopulationen in den epigenetischen Subgruppe

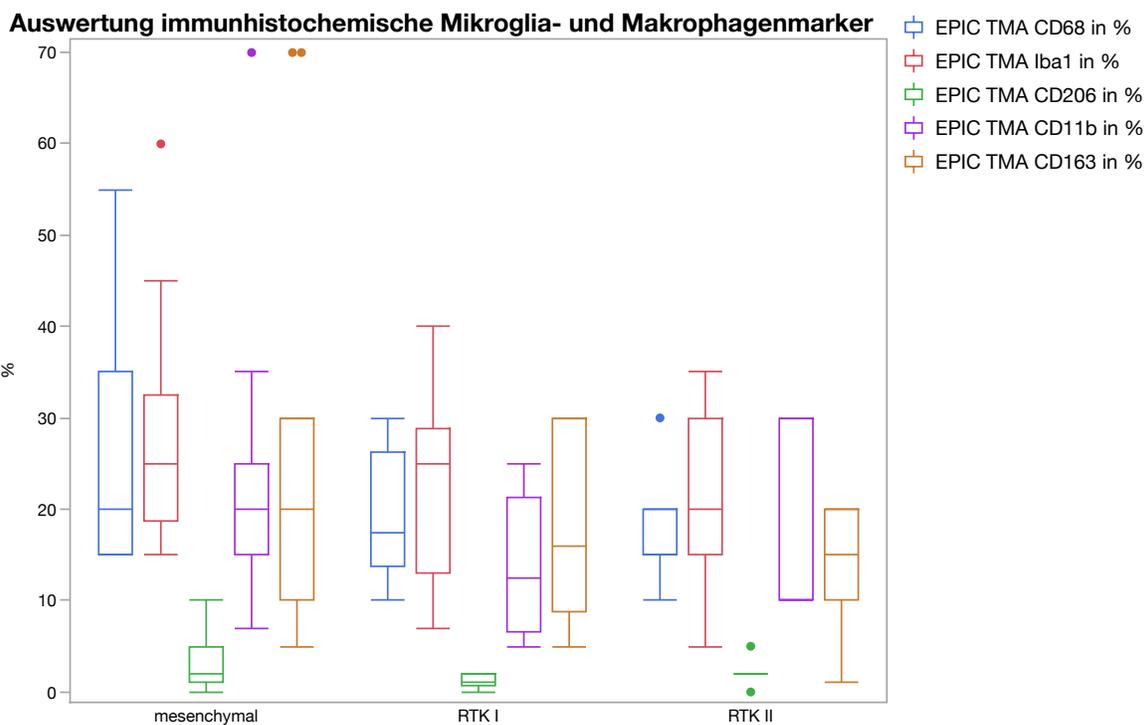


Abbildung 10: Darstellung des Zellanteils der Immunzellen (erhoben durch immunohistochemische Untersuchungen) mittels Boxplots

Zelltyp	Kategorie	-Kategorie	p-Wert
CD68	RTK 2	RTK 1	1
	RTK 1	Mesenchymal	1
	RTK 2	Mesenchymal	0,7661
Iba1	RTK 2	RTK 1	1
	RTK 1	Mesenchymal	1
	RTK 2	Mesenchymal	1
CD206	RTK 2	RTK 1	0,5448
	RTK 2	Mesenchymal	1
	RTK 1	Mesenchymal	0,3179
CD11b	RTK 2	RTK 1	1
	RTK 2	Mesenchymal	1
	RTK 1	Mesenchymal	0,3588
CD163	RTK 2	RTK 1	1
	RTK 1	Mesenchymal	1
	RTK 2	Mesenchymal	0,9066

Tabelle 11: statistische Unterschiede bzgl. der Zellzusammensetzung zwischen den epigenetischen Subgruppen

Zelltyp	Epigenetische Subgruppe	Median
CD68	Mesenchymal	20
	RTK 1	17,5
	RTK 2	15
Iba1	Mesenchymal	25
	RTK 1	25
	RTK 2	20
CD206	Mesenchymal	2
	RTK 1	1
	RTK 2	2
CD11b	Mesenchymal	20
	RTK 1	12,5
	RTK 2	10
CD163	Mesenchymal	20
	RTK 1	16
	RTK 2	15

Tabelle 12: Median der untersuchten Zellpopulationen in den Subgruppen

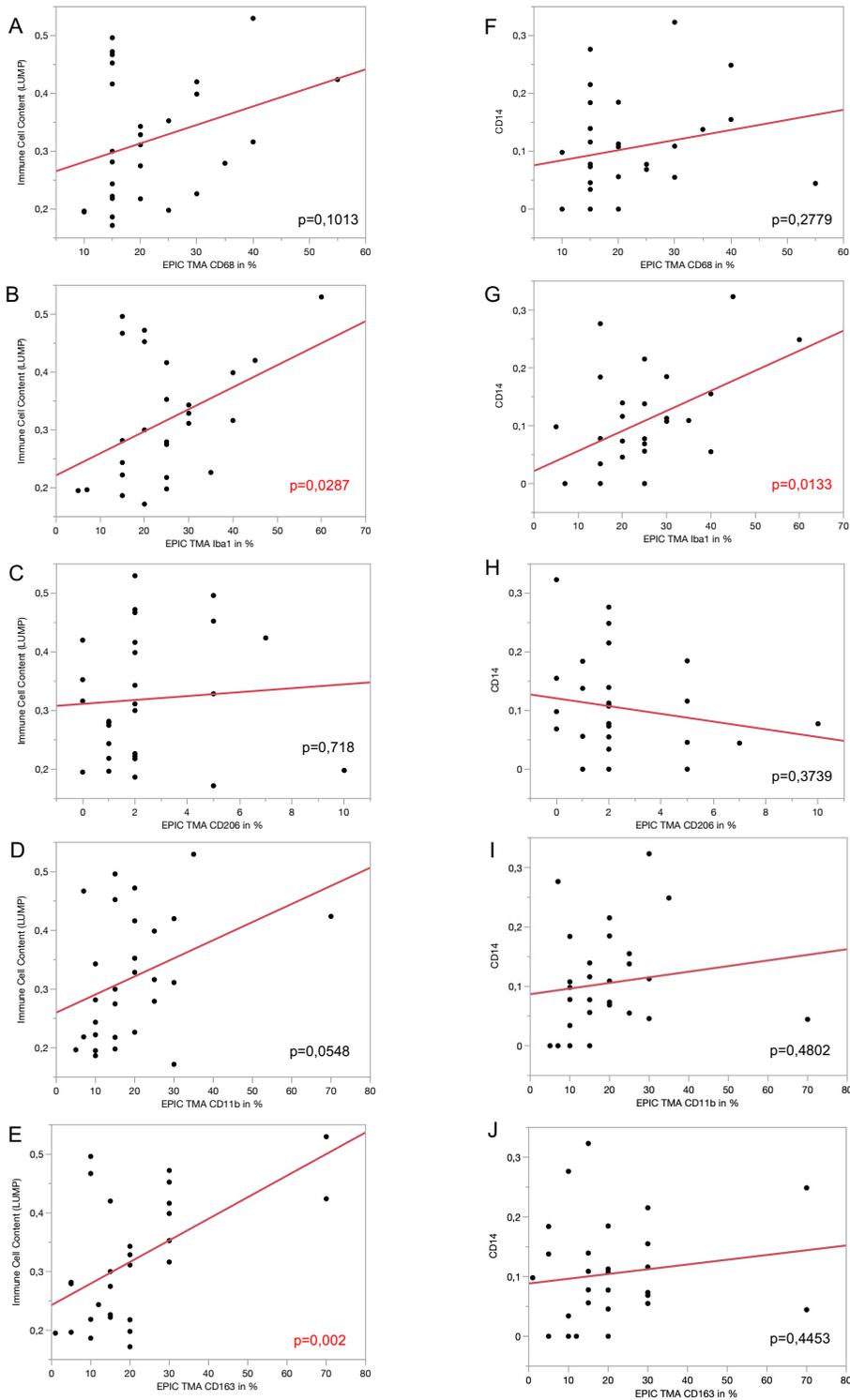


Abbildung 11: Darstellung der (linearen) Zusammenhänge zwischen LUMPs und immunhistochemisch untersuchten Mikroglia- und Makrophagenmarkern (A-E) sowie zwischen CD14-positiven Zellen und immunhistochemisch untersuchten Mikroglia- und Makrophagenmarkern (F-J)

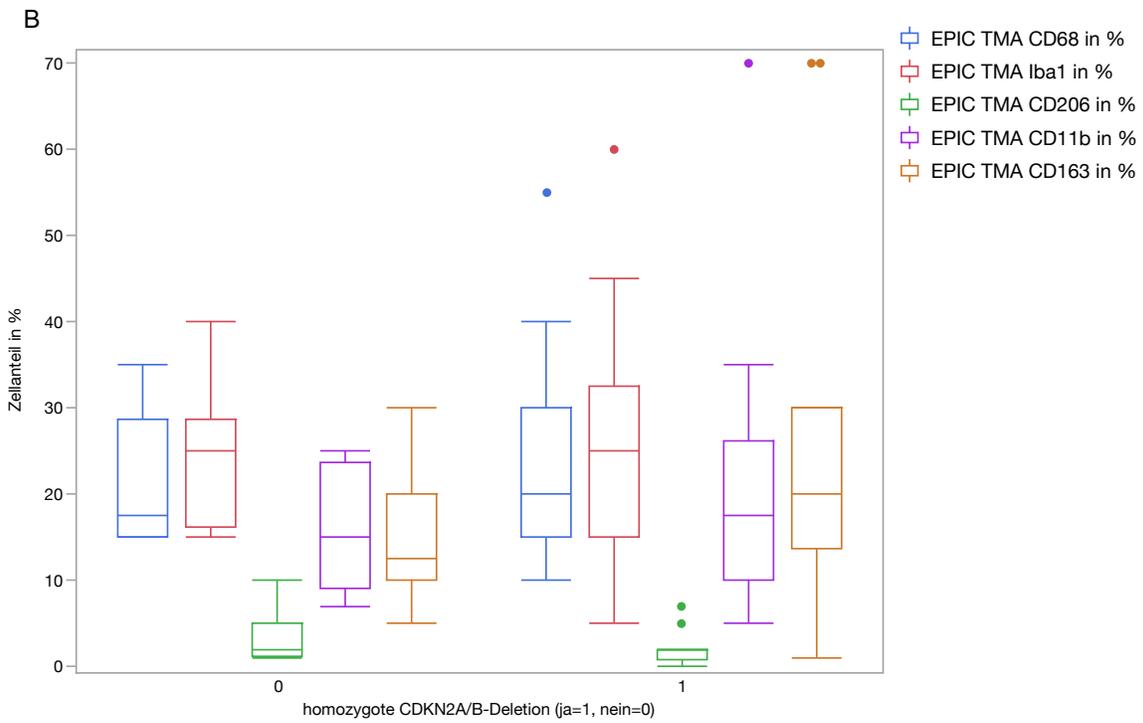
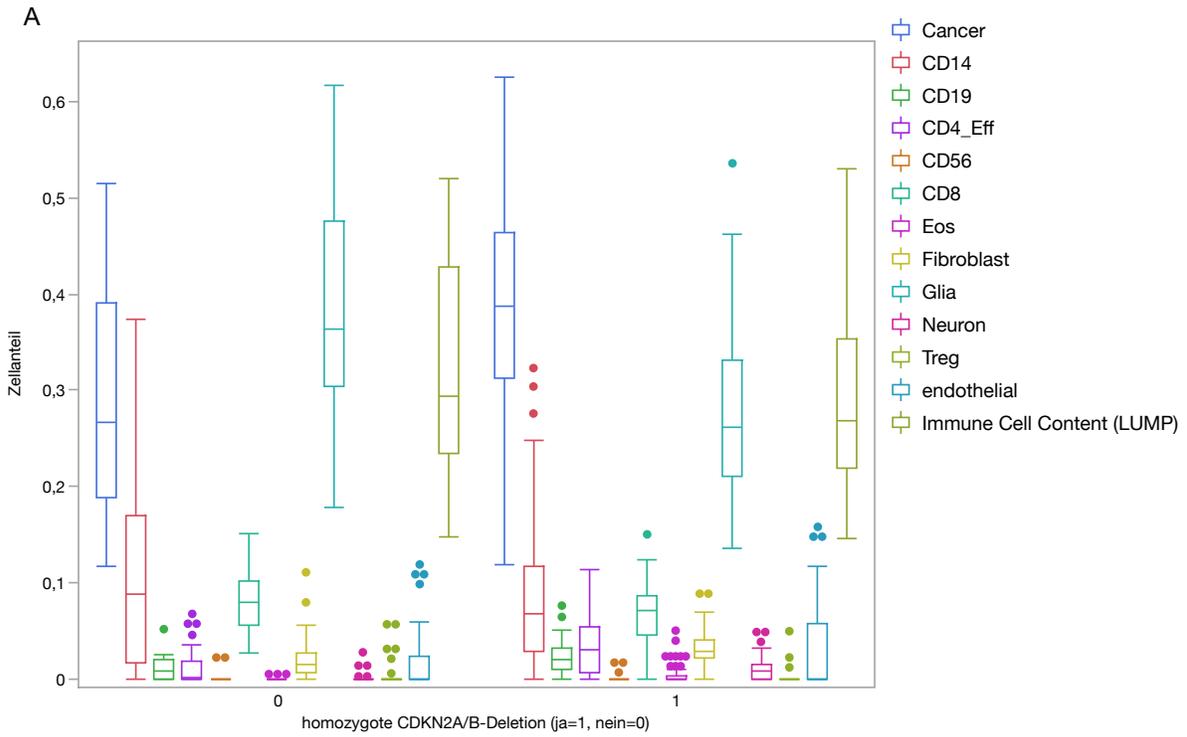
3.2.8. Assoziation von Copy Number Variationen und der zellulären Zusammensetzung des Tumorgewebes

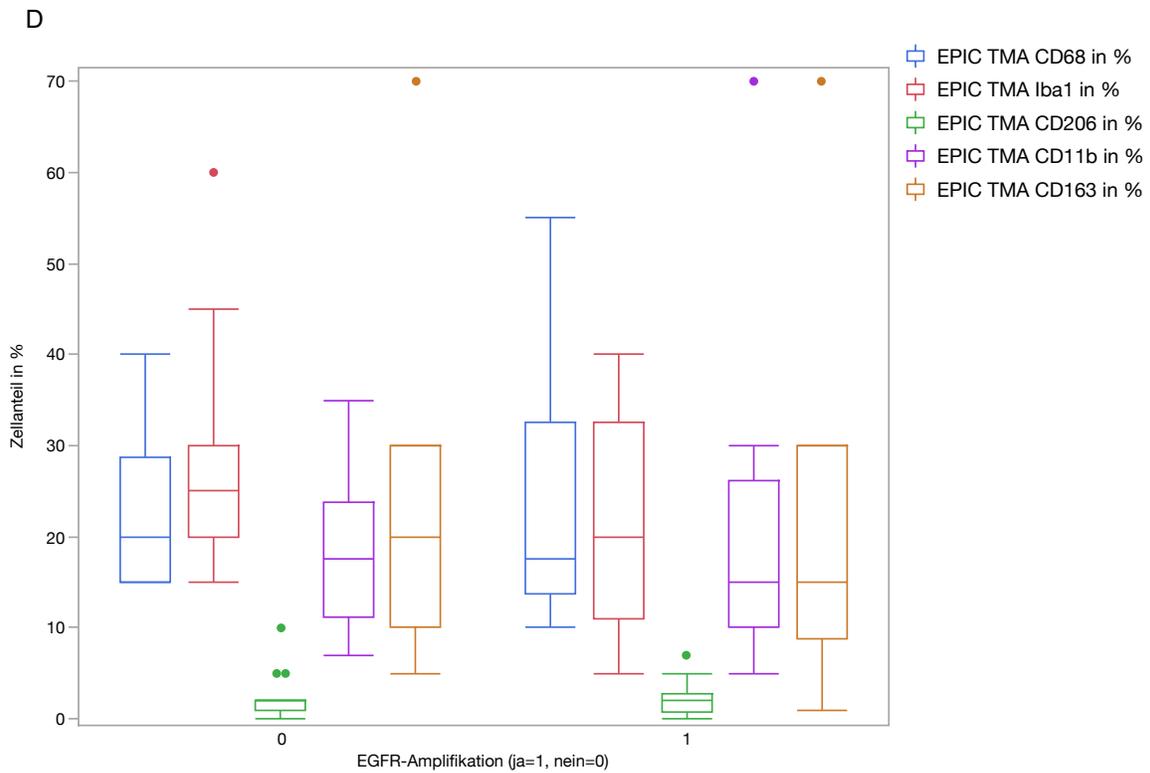
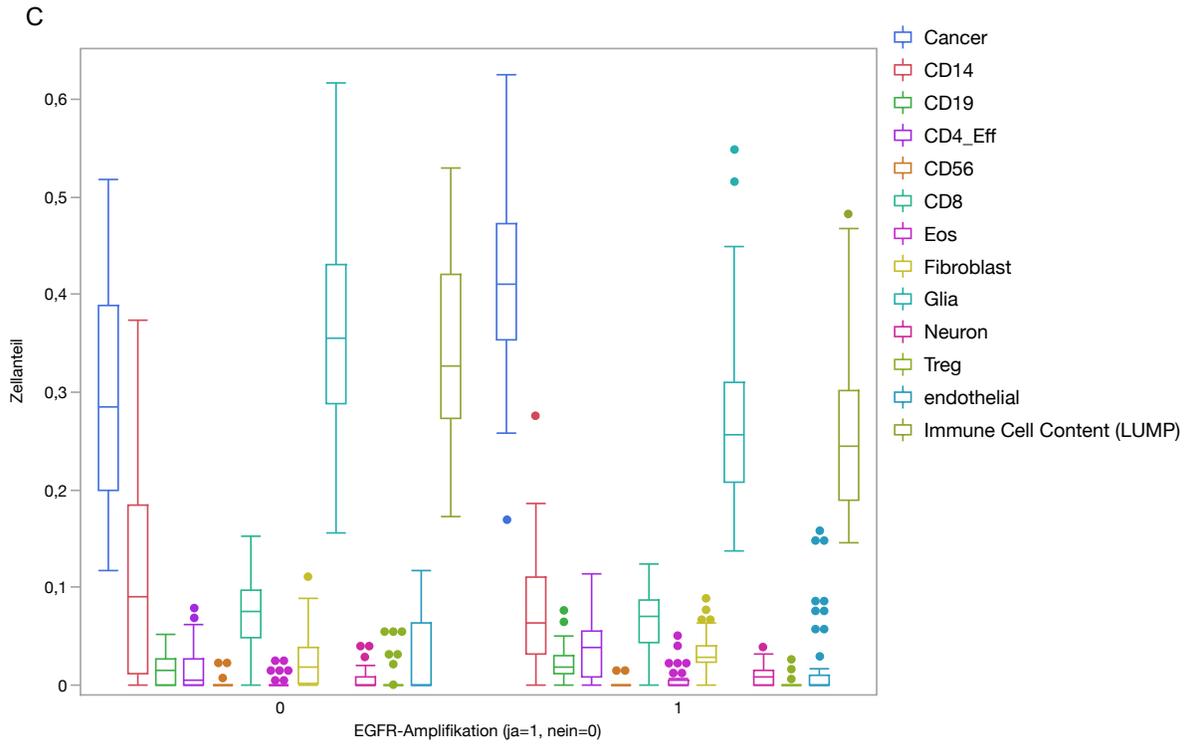
Im Folgenden wurden Unterschiede bezüglich der zellulären Zusammensetzung mit dem Auftreten von untersuchten Copy Number Variationen in Beziehung gesetzt (siehe Abbildung 12A-F sowie Tabelle 13).

Das Vorhandensein einer homozygoten CDKN2A/B-Deletion ging mit einem signifikant höheren Anteil an *Cancer Cells* ($p=0,0006$), *CD19*-positiven Zellen ($p=0,0006$), *CD4_Effector Cells* ($p=0,0002$), *Fibroblasts* ($p=0,0044$) und *Neurons* ($p<0,0001$) einher. Außerdem war der Anteil an *Glia* signifikant geringer ($p<0,0001$), wenn eine homozygote CDKN2A/B-Deletion vorhanden war.

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer EGFR-Amplifikation und der Anzahl an *Cancer Cells*, *CD19*-positiven Zellen, *CD4_Effector Cells*, *Fibroblasts*, *Glia*, *Neurons* und *LUMPs*. Im Falle der entsprechenden Amplifikation war der Anteil an *Cancer Cells* ($p<0,0001$), *CD19*-positiver Zellen ($p=0,0408$), *CD4_Effector Cells* ($p=0,001$), *Fibroblasts* ($p=0,0211$) und *Neurons* ($p=0,0108$) signifikant erhöht. Gegenteiliges zeigte sich für die Anzahl an *Glia* ($p=0,0002$) und *LUMPs* ($p<0,0001$). Diese Zellpopulationen wiesen bei Vorhandensein der Amplifikation einen signifikant geringeren Anteil auf.

Eine PTEN-Deletion ging mit einem signifikant höheren Anteil an *Cancer Cells* einher ($p=0,0217$). Der Anteil an *CD14*-positiven Zellen ($p=0,0162$), *CD68*-positiven Zellen ($p=0,0497$) und *LUMPs* ($p=0,0124$) war signifikant geringer bei dem Vorliegen einer entsprechenden Deletion.





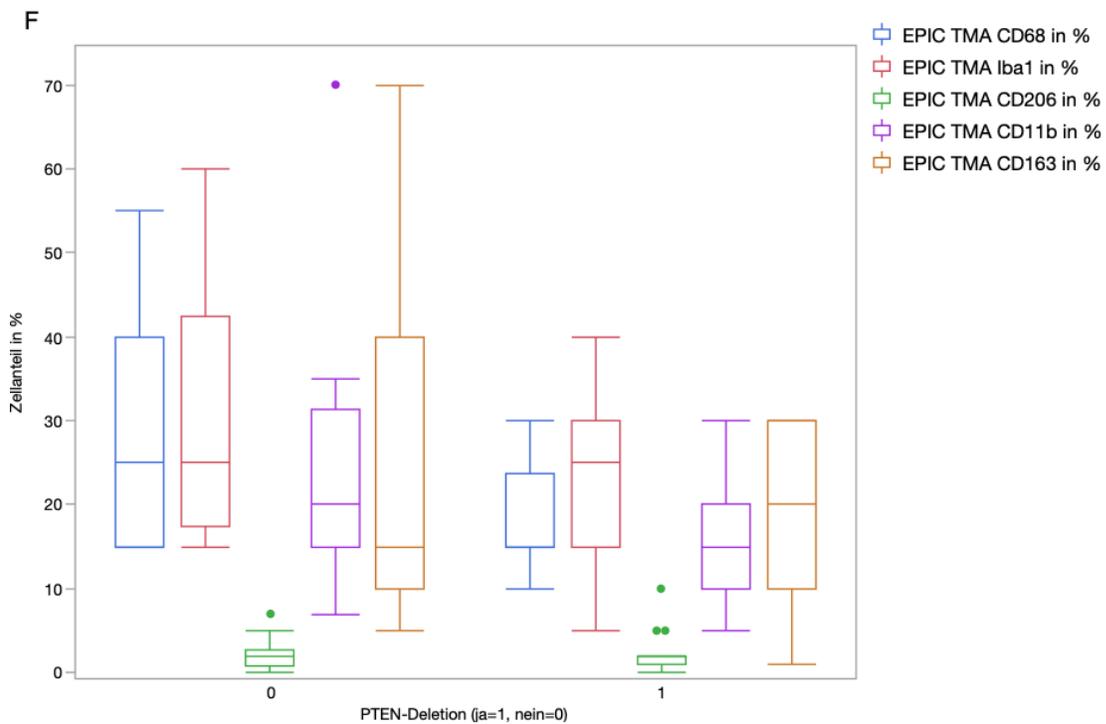
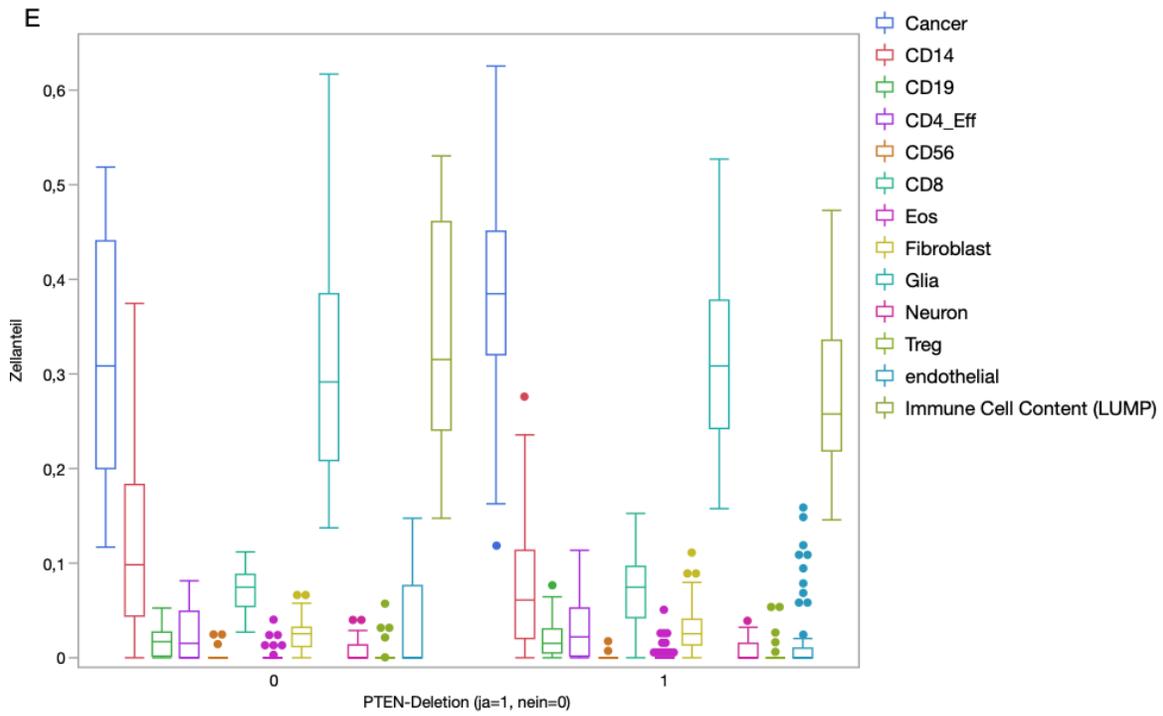


Abbildung 12: Darstellung der Zusammenhänge zwischen untersuchten Copy Number Variationen und der zellulären Zusammensetzung mittels Boxplots (A+B: homozygote CDKN2A/B-Deletion, C+D: EGFR-Amplifikation, E+F: PTEN-Deletion)

Zelltyp	Homozygote CDKN2A/B-Deletion		EGFR-Amplifikation		PTEN-Deletion	
	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	ja
Häufigkeit	29	67	46	50	37	59
Cancer						
Median	0,267	0,388	0,2848	0,4114	0,3089	0,3841
p-Wert	0,0006		<0,0001		0,0217	
CD14						
Median	0,0886	0,0686	0,0906	0,0638	0,0981	0,0612
p-Wert	0,4527		0,1975		0,0162	
CD19						
Median	0,0093	0,0207	0,0153	0,0178	0,017	0,016
p-Wert	0,0006		0,0408		0,6778	
CD4_Eff						
Median	0,001	0,0309	0,0049	0,0381	0,0142	0,0227
p-Wert	0,0002		0,001		0,4268	
CD56						
Median	0	0	0	0	0	0
p-Wert	0,59		0,57		0,3	
CD8						
Median	0,0791	0,0711	0,0754	0,0707	0,0742	0,0751
p-Wert	0,1255		0,2892		0,97	
Eos						
Median	0	0	0	0	0	0
p-Wert	0,0703		0,1965		0,8238	
Fibroblasts						
Median	0,0153	0,029	0,0182	0,0275	0,0256	0,0258
p-Wert	0,0044		0,0211		0,5167	
Glia						
Median	0,3637	0,2622	0,3553	0,2566	0,2908	0,3083
p-Wert	<0,0001		0,0002		0,5223	
Neuron						
Median	0	0,0078	0	0,0077	0	0
p-Wert	<0,0001		0,0108		0,6966	
Treg						
Median	0	0	0	0	0	0
p-Wert	0,004		0,1213		0,4432	
endothelial						
Median	0	0	0	0	0	0
p-Wert	0,850		0,239		0,0527	
CD68						
Median	17,5	20	20	17,5	25	15
p-Wert	1		0,6826		0,0497	
Iba1						
Median	25	25	25	20	25	25
p-Wert	0,9528		0,3		0,3879	
CD206						
Median	2	2	2	2	2	2
p-Wert	0,1577		0,7587		0,7587	
CD11b						

Median	15	17,5	17,5	15	20	15
p-Wert	0,6121		0,7893		0,1148	
CD163						
Median	12,5	20	20	15	15	20
p-Wert	0,2473		0,7279		0,9147	
LUMPs						
Median	0,2931	0,2681	0,3273	0,2452	0,3156	0,2575
p-Wert	0,2761		<0,0001		0,0124	

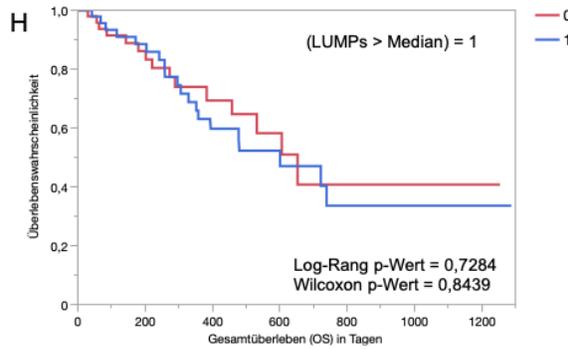
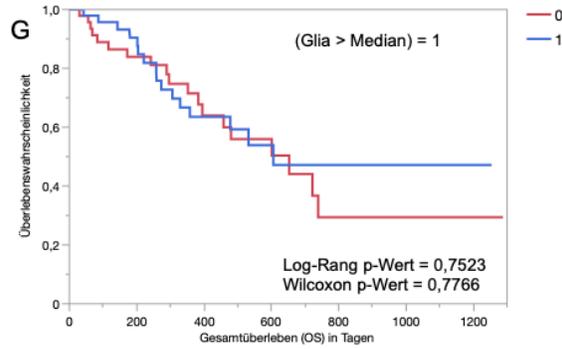
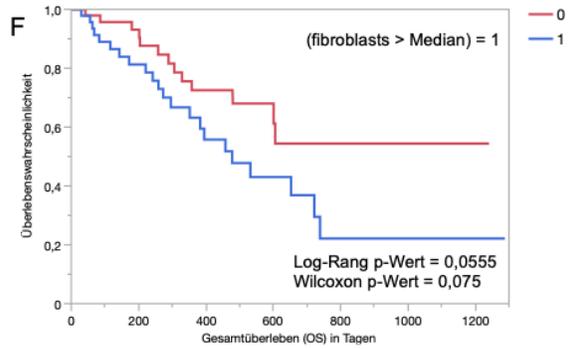
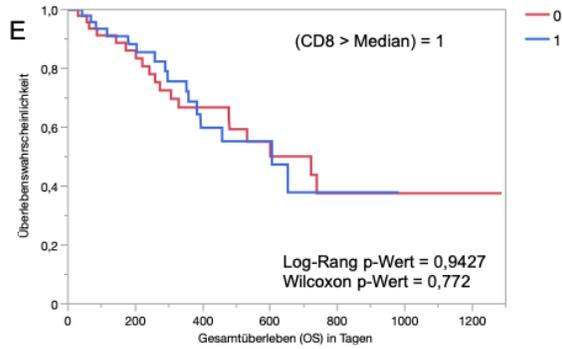
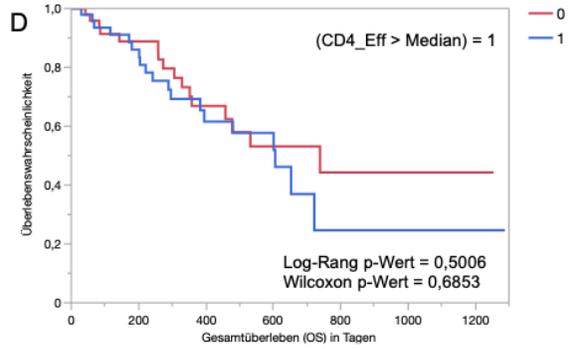
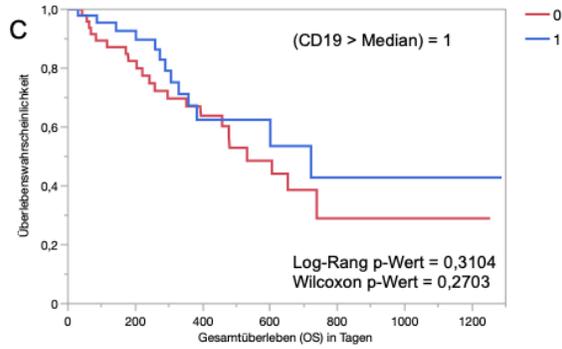
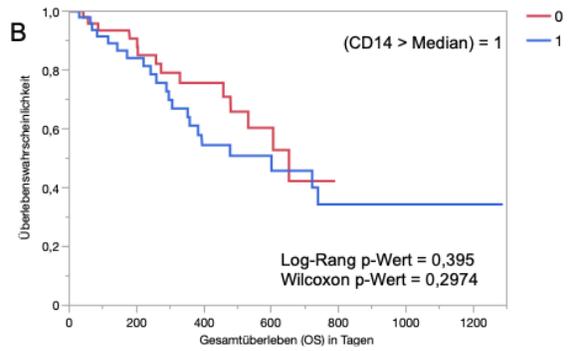
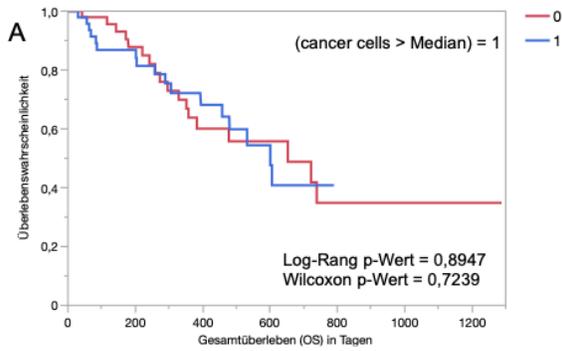
Tabelle 13: Darstellung der jeweiligen Zellanteile (Median) in Abhängigkeit von den untersuchten Copy Number Variationen sowie Darstellung von Gruppenunterschieden bzw. der entsprechenden p-Werte

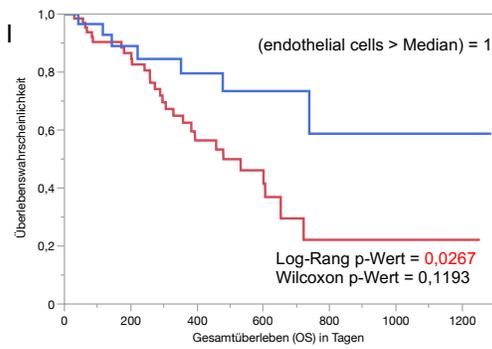
3.2.9. Assoziation von Zellpopulationen mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben

Um den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von verschiedenen Zellpopulationen mit dem Gesamtüberleben (OS) und dem progressionsfreien Überleben (PFS) zu untersuchen, wurde die Kohorte für jedes Merkmal (bzw. für jede Zellpopulation) dichotomisiert. Für jede im Folgenden analysierte Zellpopulation wurde ein Median berechnet und die eingeschlossenen Patienten wurden – entsprechend dem Anteil des jeweils untersuchten Zelltyps – in zwei Gruppen aufgeteilt (<Median der jeweiligen Zellpopulation und >Median der jeweiligen Zellpopulation). Die Abbildung 13 A-I zeigt den Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben, während die Abbildung 13 J-R den Zusammenhang mit dem progressionsfreien Überleben darstellt.

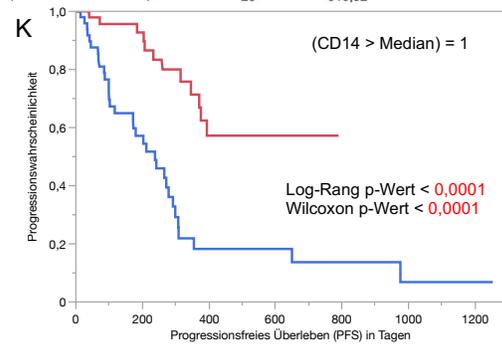
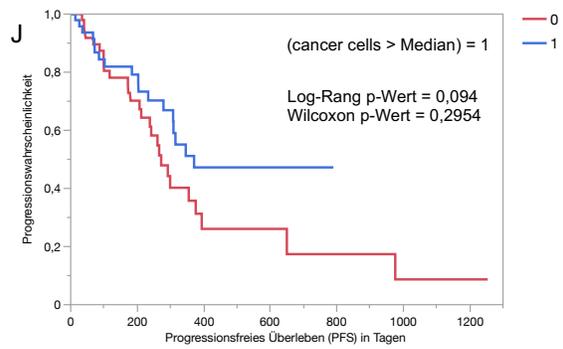
Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigte sich, dass ein Anteil an *Endothelial Cells*, welcher größer als der Median der Referenzgruppe war, mit einem signifikant längeren OS assoziiert war (Log-Rang: $p=0,0267$). Im Wilcoxon-Test erreichte dieser Effekt keine Signifikanz ($p=0,1193$).

Patienten, deren Tumorgewebe mehr *CD14*- positive Zellen aufwies als der Median der Referenzgruppe, zeigten ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben ($p < 0,0001$). Ebenso verhielt sich die Assoziation des Anteils an *CD4_Effector Cells* (Log Rang: $p = 0,0071$, Wilcoxon: $p = 0,0129$), *Fibroblasts* (Log Rang: $p = 0,0007$, Wilcoxon: $p = 0,0001$) und *LUMPs* (Log Rang: $p = 0,0103$, Wilcoxon: $p = 0,0164$) mit dem progressionsfreien Überleben. Ein Anteil der jeweiligen Zellpopulation, welcher größer war als der Median der Referenzgruppe, war ebenfalls mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert.

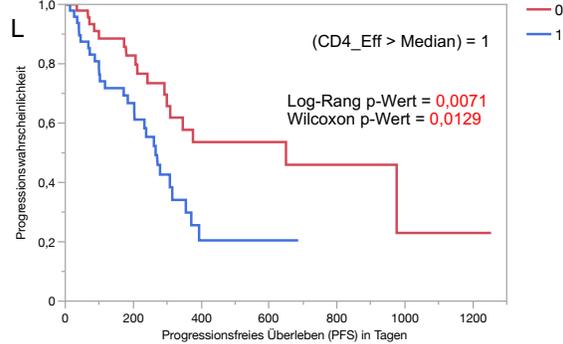




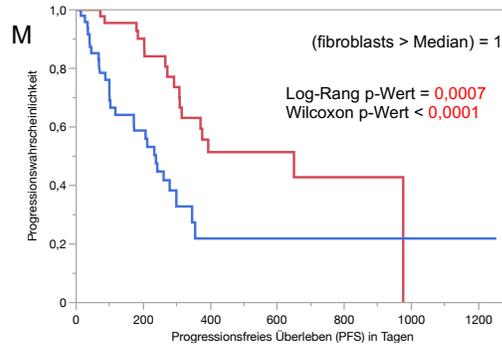
Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	28	39	471,02	480	329 - 653
1	7	25	610,52		478 -



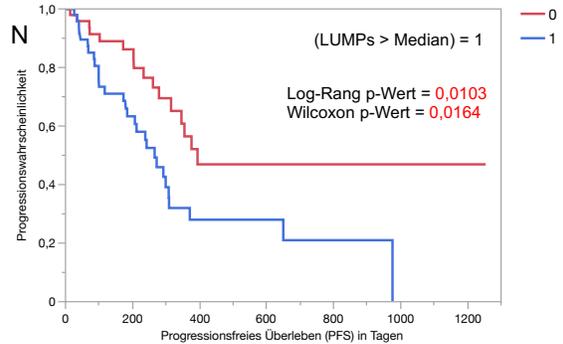
Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	12	37	344,66		371 -
1	33	17	309,11	238	117 - 292



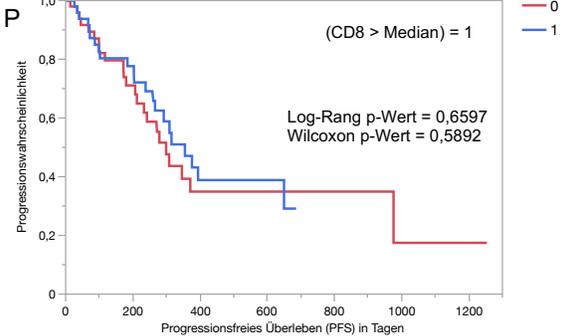
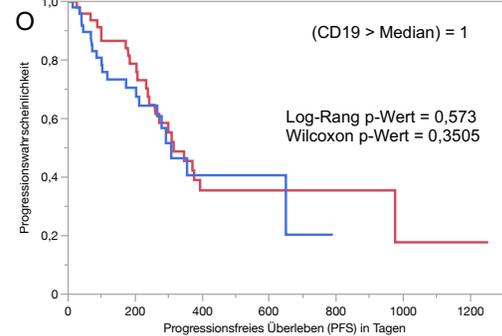
Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	17	33	601,83	650	299 -
1	28	21	245,32	266	203 - 355



Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	17	32	605,46	650	309 - 976
1	28	22	214,89	238	117 - 299



Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	16	33	316,88	394	315 -
1	29	21	383,96	266	180 - 309



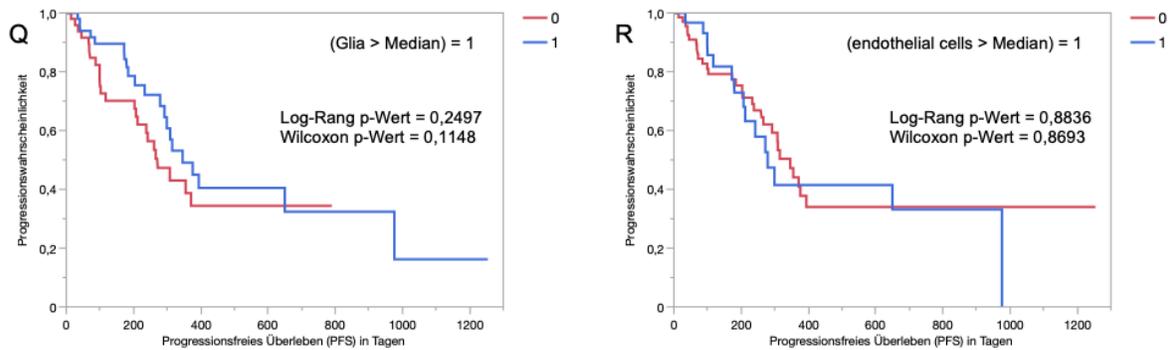


Abbildung 13: Darstellung der Assoziation der Zellpopulationen mit dem Gesamtüberleben (A-I) und dem progressionsfreien Überleben (J-R) mittels Kaplan-Meier-Kurven sowie entsprechende statistische Daten bei statistischer Signifikanz

3.2.10. Bildung von hierarchischen Clustern basierend auf verschiedenen Zellpopulationen und deren Assoziation mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben

Die Abbildung 14A zeigt eine hierarchische Clusteranalyse unter Einbeziehung aller mittels MethylCIBERSORT-Algorithmus untersuchten Zellpopulationen. Auf Ebene 2 der Clusterbildung zeigten sich n=4 verschiedene Cluster, welche farblich unterschiedlich dargestellt sind. Links in der Abbildung 14A ist die Zuordnung des jeweiligen Tumors zu einer bzw. zwei Methylierungsklassen zu sehen. Die Angabe einer Methylierungsklasse entsprach einem reinen Tumor, während bei Vorhandensein von zwei verschiedenen Subklassen ein gemischter Tumor vorlag. Anhand der Legende (Abbildung 14A) kann der Anteil der jeweiligen Zellpopulation abgelesen werden. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen den vier untersuchten Clustern (siehe Abbildung 14B).

Diejenigen Zellpopulationen, welche mit Unterschieden bezüglich des Gesamtüberlebens bzw. des progressionsfreien Überlebens assoziiert waren (siehe 3.2.9.) wurden daraufhin in eine weitere hierarchische Clusteranalyse einbezogen,

die Abbildung 15A zeigt. Auf der Ebene 1 der Clusterbildung zeigten sich zunächst $n=2$ verschiedenen Cluster. Eines dieser Cluster, welches 87% der eingeschlossenen Tumoren enthielt, wurde auf Ebene 2 in weitere $n=4$ Cluster aufgeteilt. Folglich zeigt Abbildung 15B die Kaplan-Meier-Kurven unter Einbeziehung der $n=5$ definierten Cluster. Patienten, die dem Cluster 1 angehörten, wiesen im Vergleich zu den Patienten, die dem Cluster 4 angehörten, ein signifikant besseres Gesamtüberleben auf (Wilcoxon: $p=0,0455$). Im Log-Rang-Test erreichte dieser Effekt keine Signifikanz (siehe Abbildung 15C). Ebenso wiesen Patienten, die dem Cluster 1 angehörten, ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben auf als solche, die dem Cluster 4 angehörten (Log Rang: $p=0,0052$, Wilcoxon: $p=0,0007$) (siehe Abbildung 15D). Weitere signifikante Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens oder des progressionsfreien Überlebens zwischen den verschiedenen betrachteten Clustern zeigten sich nicht.

Die näher untersuchten Cluster 1 und 4 unterschieden sich signifikant hinsichtlich des Anteils an *CD14*-positiven Zellen ($p<0,0001$) sowie des Anteils an *Fibroblasts* ($p=0,0193$) (siehe Abbildung 15G und Tabelle 14). Die Hauptkomponentenanalyse, basierend auf den Anteilen an *CD4_Eff*, *Fibroblasts*, *CD14* und *endothelial cells*, stellt die Cluster 1 und 4 in Abhängigkeit der genannten Zellpopulationen und die dazugehörigen Hauptvektoren dar (siehe Abbildung 15 E und F).

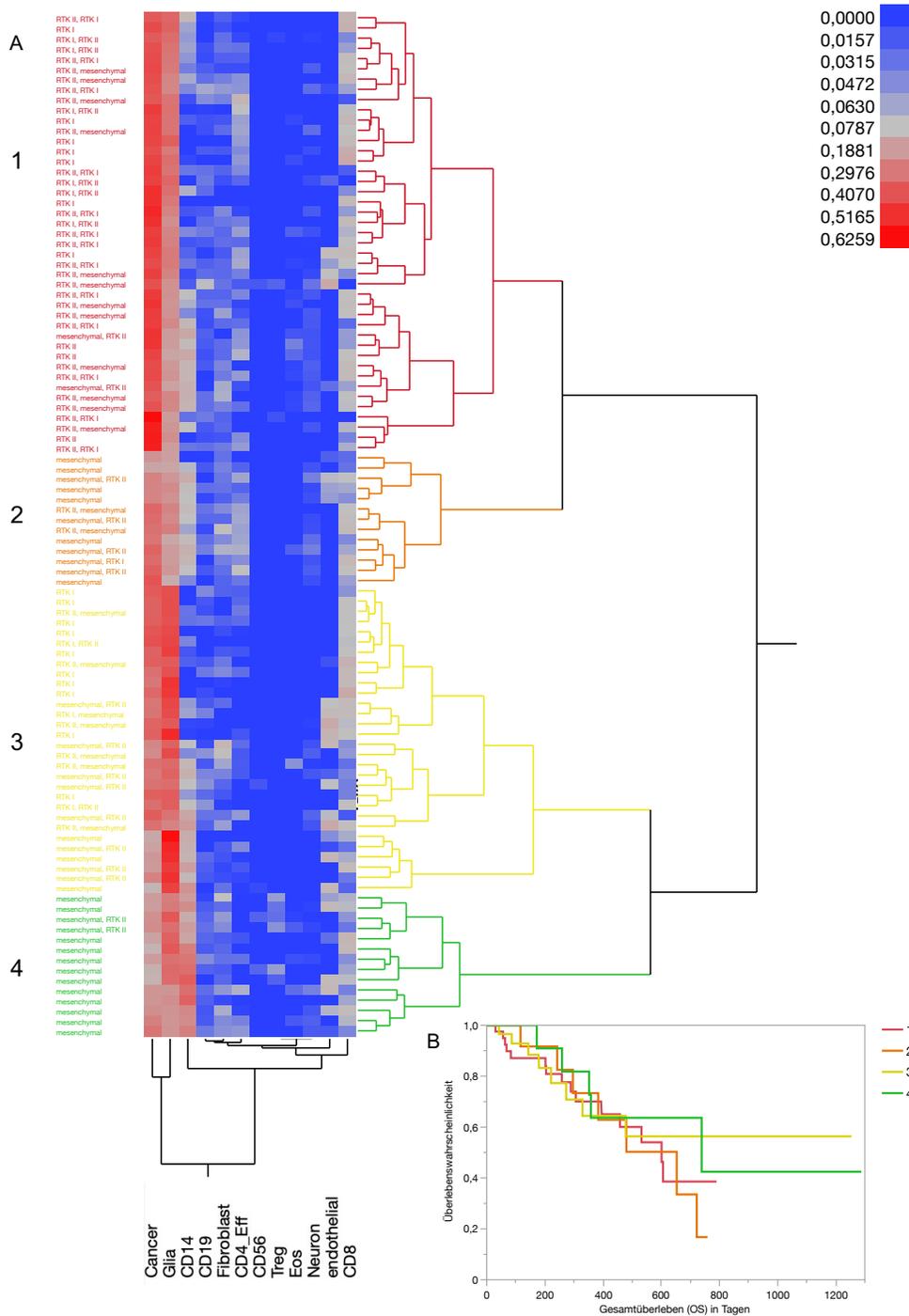
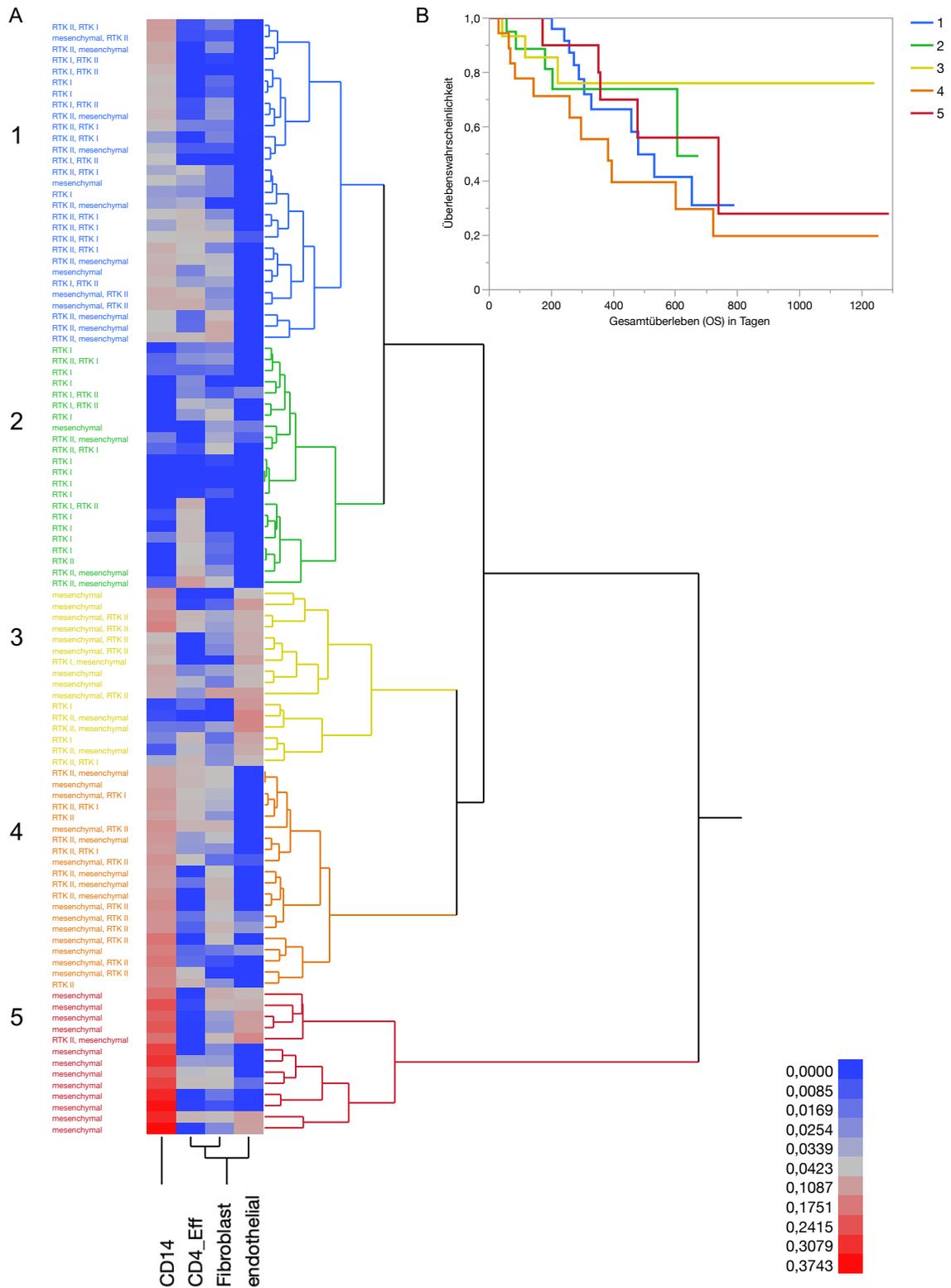


Abbildung 14: A: hierarchische Clusteranalyse der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte basierend auf allen mittels MethyCIBERSORT-Algorithmus erhobenen Zellpopulationen und Darstellung vier verschiedener Cluster in repräsentativen Farben, B: Kaplan-Meier-Überlebenskurven basierend auf dargestellten Clustern



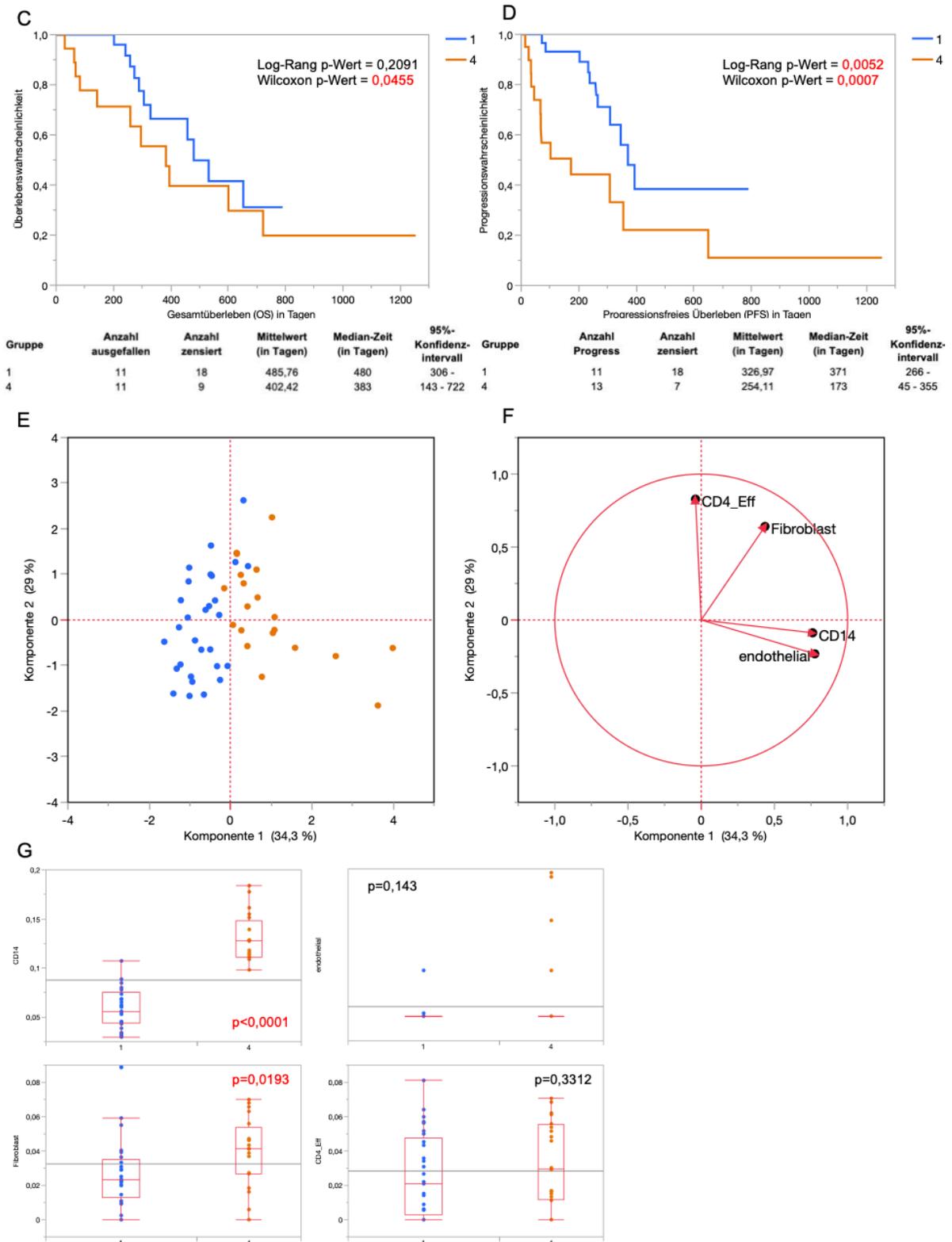


Abbildung 15: A: hierarchische Clusteranalyse der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte basierend auf ausgewählten Zellpopulationen und farbliche Darstellung fünf verschiedener Cluster, B: Kaplan-

Meier-Überlebenskurven der dargestellten Cluster, C: Kaplan-Meier-Kurven (Cluster 1 und 4, OS), Kaplan-Meier-Kurven (Cluster 1 und 4, PFS), E: Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf den Anteilen an CD4_Eff, Fibroblast, CD14 und endothelial, farbliche Darstellung der Cluster, F: Hauptvektoren der PCA, G: Darstellung der Gruppenunterschiede (Cluster 1 und 4) bzgl. der einbegriffenen Zellpopulationen mittels Boxplots,

Zelltyp	Gruppe	Median
CD14	1	0,0559
	4	0,1278
Fibroblasts	1	0,0234
	4	0,0413
Endothelial cells	1	0
	4	0
CD4_Eff	1	0,0209
	4	0,0296

Tabelle 14: Median des jeweiligen Zellanteils bei den Clustern 1 und 4

3.2.11. Ergebnisse der RnBeads-Analyse bei Einteilung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte in drei etablierte Subgruppen

Mittels RnBeads-Analyse wurden n=100 Samples, entsprechend der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte, untersucht. Eingeteilt wurde die Kohorte anhand der Methylierungssubklasse 1 in drei epigenetische Subgruppen – *mesenchymal*, *RTK 1* und *RTK 2*. Insgesamt wurden n=866.895 Proben bzw. CpG-Sites analysiert. Im Zuge der Filterprozedur des RnBeads-Algorithmus wurden n=17.371 CpG-Sites entfernt, welche mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) assoziiert waren und weitere n=18.644 CpGs, welche sich auf Geschlechtschromosomen befanden. Keines der eingeschlossenen Samples wurde im Rahmen des *Quality checks* des RnBeads-Algorithmus ausgeschlossen. Die Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 16A) ließ n=3 verschiedene Cluster erkennen. Diese stimmten im Wesentlichen mit den drei etablierten Subgruppen überein. Es zeigten sich sowohl in der

Hauptkomponentenanalyse als auch in der hierarchischen Clusternanalyse (Abbildung 16B) Überschneidungen bezüglich der epigenetischen Subgruppen. Diese Methoden ermöglichten keine eindeutige Zuordnung der etablierten Subgruppen zu jeweils einem Cluster. Insbesondere bildeten sich in der hierarchischen Clusteranalyse Cluster, welche sowohl durch die Subgruppe *mesenchymal* als auch durch die Subgruppe *RTK 2* charakterisiert waren.

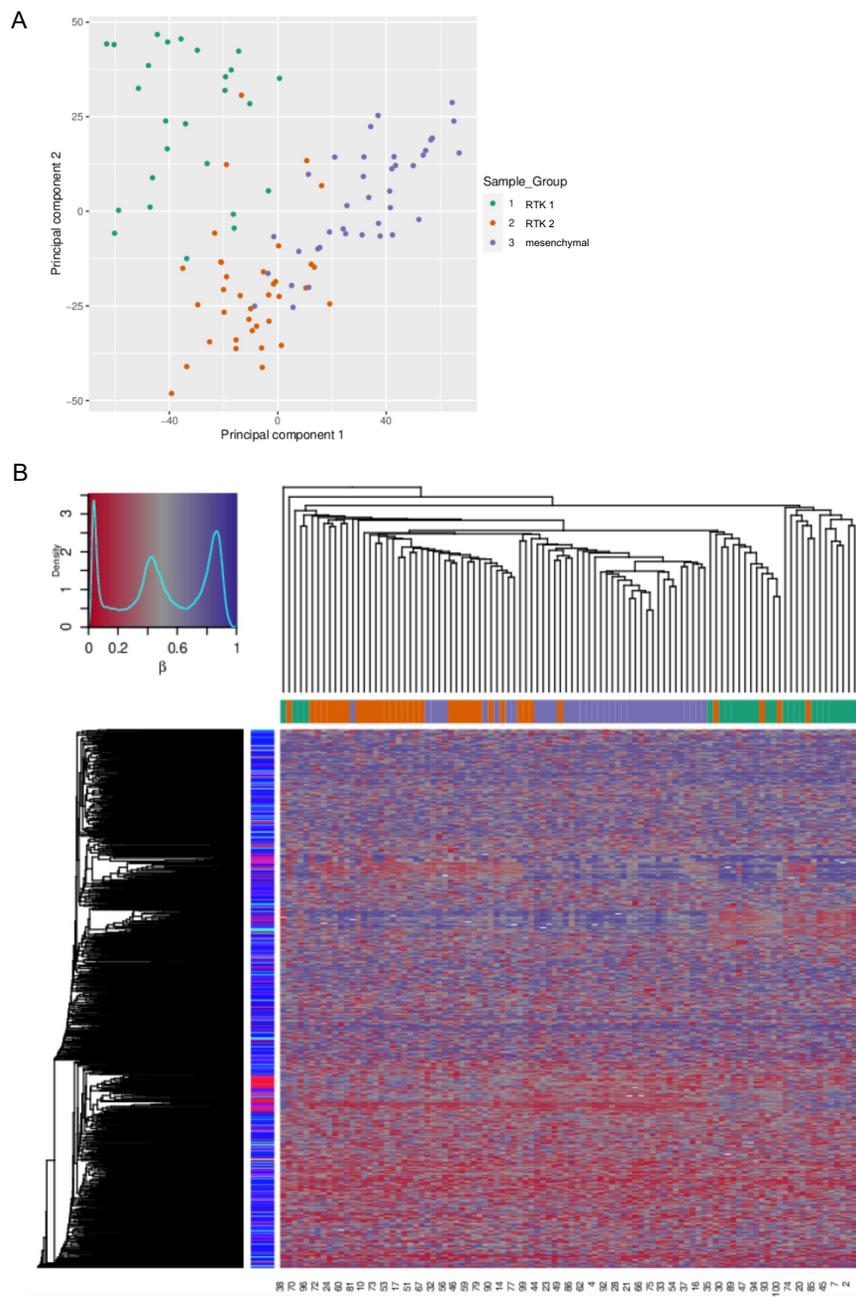


Abbildung 16: Ergebnisse der RnBeads-Analyse (A: Hauptkomponenten-Analyse basierend auf allen untersuchten CpG Sites unter Darstellung der epigenetischen Subgruppen, B: hierarchische Clusteranalyse basierend auf der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte und allen untersuchten CpG-Sites unter Darstellung der epigenetischen Subgruppen sowie graphische Darstellung der Verteilung der β -Werte)

3.3. Charakterisierung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte nach reinen und gemischten Subgruppen

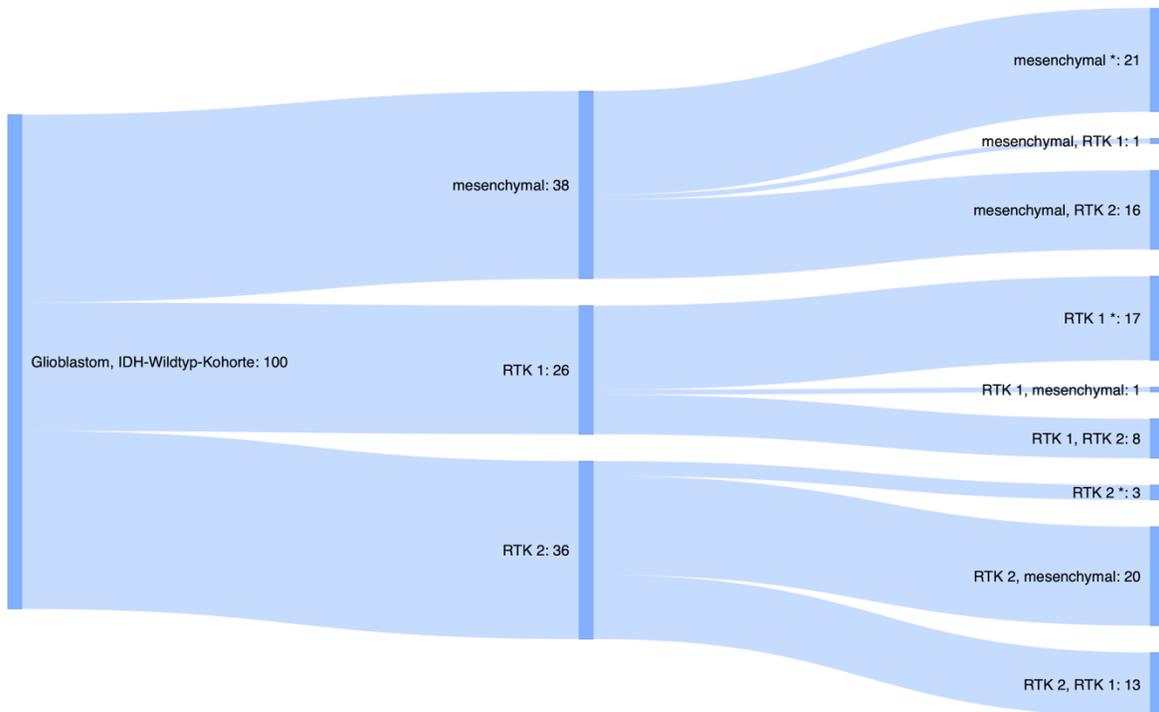


Abbildung 17: Übersichtsdarstellung der Zusammensetzung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte nach reinen (markiert durch *) und gemischten Subgruppen mittels Sankey-Diagramms

Die *GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte* bestand einerseits aus Samples, welche einer *reinen* epigenetischen Subklasse zugeordnet werden konnten. Diese wurden mithilfe des *Brain Tumor Classifiers* jeweils einer Methylierungssubklasse eindeutig – d.h. mit einem Calibrated Score > 0,84 – zugeordnet. Andererseits gab es gemischte Samples, die zwei verschiedenen epigenetischen Subgruppen zugeordnet wurden.

Insgesamt bestand diese Kohorte aus n=21 reinen GBMs der Subgruppe *mesenchymal*, n=17 reinen GBMs der Subgruppe *RTK 1* und n=3 reinen GBMs der Subgruppe *RTK 2*. Des Weiteren waren n=17 gemischte GBMs der Subgruppe *mesenchymal* (davon n=1 gemischt mit dem Subtyp *RTK 1* und n=16 gemischt mit dem Subtyp *RTK 2*), n=9 gemischte GBMs der Subgruppe *RTK 1* (davon n=1

gemischt mit dem Subtyp *mesenchymal* und n=8 gemischt mit dem Subtyp *RTK 2*) und n=33 gemischte GBMs des Subtyps *RTK 2* (davon n=20 gemischt mit dem Subtyp *mesenchymal* und n=13 gemischt mit dem Subtyp *RTK 1*) der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte zugehörig (siehe Abbildung 17).

3.3.1. Analyse der „reinen“ Subgruppen

Die klinischen Charakteristika der reinen epigenetischen Subgruppen zeigt die Tabelle 15.

Die reine Subgruppe *mesenchymal* wies mit im Mittel 598 Tagen das längste Gesamtüberleben der reinen epigenetischen Subgruppen auf. Die reine Subgruppe *RTK 1* zeigte ein mittleres Überleben von 420 Tagen, während die reine Subgruppe *RTK 2* ein mittleres Überleben von 55 Tagen aufwies. Es zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil für die Subgruppe *mesenchymal* im Vergleich zu der Subgruppe *RTK 2* (Wilcoxon: $p=0,0111$). Im Log-Rang-Test erwies sich dieser Effekt nicht als signifikant. Im Mittel war das Gesamtüberleben der Subgruppe *mesenchymal* im Vergleich zu der Subgruppe *RTK 1* länger. Dieser Effekt erreichte keine statistische Signifikanz.

Bezüglich des progressionsfreien Überlebens zeigte sich ein Vorteil für die Gruppe *RTK 1* im Vergleich zu der Gruppe *RTK 2* (Wilcoxon: $p=0,0209$). Im Log-Rang-Test wurde keine Signifikanz für den beschriebenen Gruppenunterschied erreicht. Die Ergebnisse der Untersuchung bezüglich des Zusammenhangs von reiner epigenetischer Subgruppe und dem Gesamtüberleben bzw. dem progressionsfreien Überleben sind in Abbildung 18 sowie in den Tabellen 16 und 17 dargestellt.

In der Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 18C) ließen sich die reinen Subgruppen *mesenchymal* und *RTK 2*, welche ein Cluster bilden, von der Subgruppe *RTK 1* abgrenzen.

Klinische Parameter	Mesenchymal (rein) n=21	RTK 1 (rein) n=17	RTK 2 (rein) n=3
Präoperativer Karnofsky-Index			
20	0	0	1
50	0	1	0
60	0	1	0
70	4	3	1
80	1	5	0
90	7	4	1
100	7	1	0
Keine Angabe	2	2	0
Resektionsausmaß			
Komplett	8	6	2
>90%	6	4	0
<90%	6	5	1
Keine Angabe	1	2	0
Tumorlokalisation			
Frontal	8	1	0
Okzipital	0	2	0
Parietal	2	1	1
Temporal	5	7	1
Multifokal	6	6	1
Keine Angabe	0	0	0
Strahlentherapie			
Ja	20	13	1
Chemotherapie			
Ja	17	9	1

Tabelle 15: Charakterisierung der reinen epigenetischen Subgruppen nach klinischen und neuropathologischen Parametern

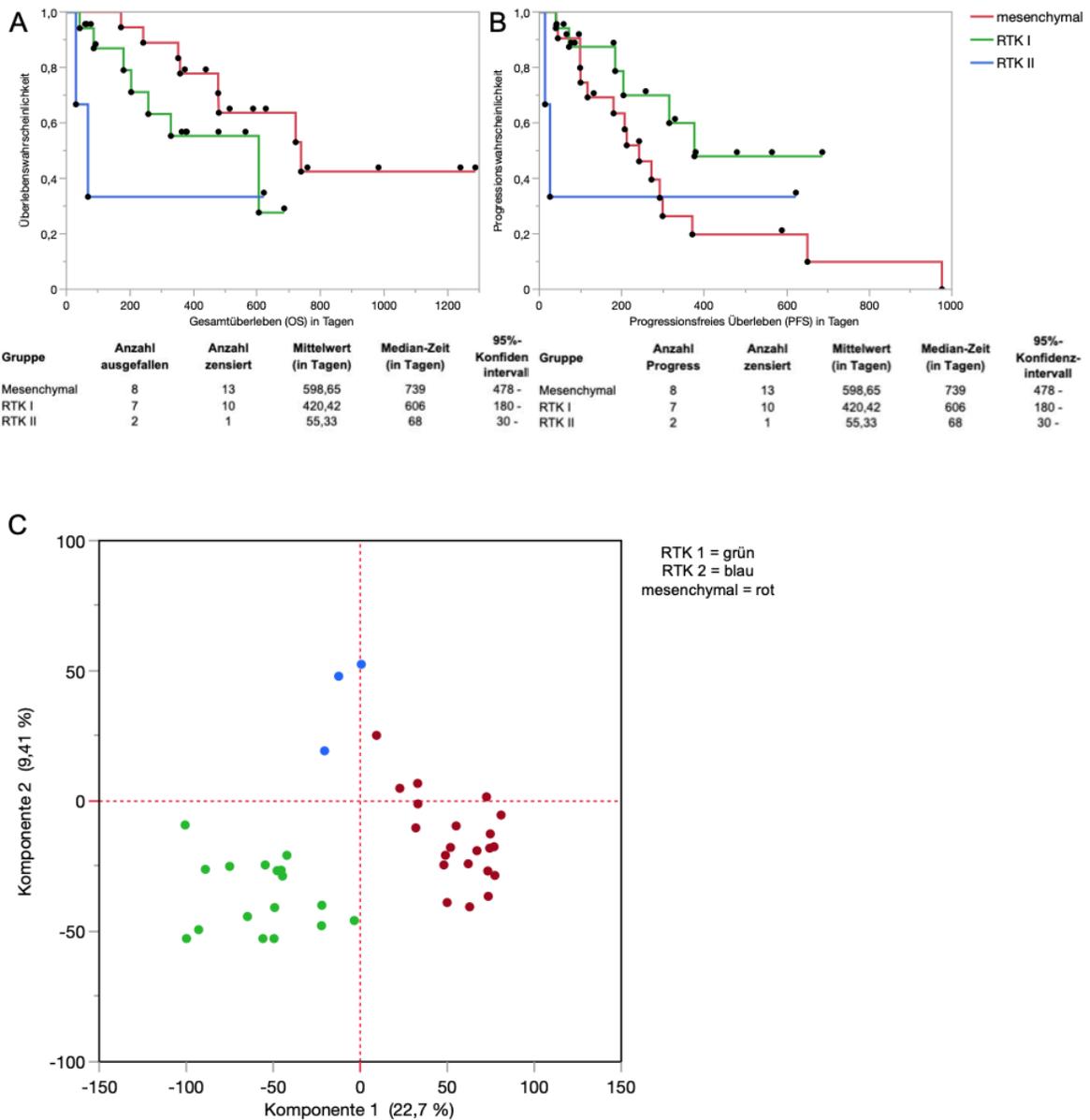


Abbildung 18: A: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem Gesamtüberleben der reinen epigenetischen Subgruppen, B: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem progressionsfreien Überleben der reinen epigenetischen Subgruppen, C: PCA basierend auf den 10.000 most variable CpG Sites

Gruppen	Test	p-Wert
RTK 1 (rein) – RTK 2 (rein)	Log-Rang	0,399
	Wilcoxon	0,0742
RTK 1 (rein) – mesenchymal (rein)	Log-Rang	0,1184
	Wilcoxon	0,0942
RTK 2 (rein) – mesenchymal (rein)	Log-Rang	0,0699
	Wilcoxon	0,0111

Tabelle 16: Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens der reinen Subgruppen

Gruppen	Test	p-Wert
RTK 1 (rein) – RTK 2 (rein)	Log-Rang	0,1902
	Wilcoxon	0,0209
RTK 1 (rein) – mesenchymal (rein)	Log-Rang	0,0835
	Wilcoxon	0,1839
RTK 2 (rein) – mesenchymal (rein)	Log-Rang	0,6882
	Wilcoxon	0,089

Tabelle 17: Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich des progressionsfreien Überlebens der reinen Subgruppen

3.3.2. Analyse der „gemischten“ Subgruppen

3.3.2.1. Subgruppe mesenchymal

Im Folgenden wurde die reine Subgruppe *mesenchymal* im Vergleich zu der gemischten Subgruppe *mesenchymal, RTK 2* betrachtet. Die gemischte Subgruppe *mesenchymal, RTK 1* wurde wegen der Stichprobenanzahl von n=1 nicht miteinbezogen.

Die klinischen Charakteristika (Alter, präoperativer Karnofsky-Index und Resektionsausmaß) zeigt die Tabelle 18. Die reine Subgruppe *mesenchymal* wies ein längeres mittleres Überleben als die gemischte Subgruppe *mesenchymal, RTK 2* (Mittelwert = 418 Tage) auf. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz für diesen Effekt. Ebenfalls zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des progressionsfreien Überlebens zwischen der reinen und der gemischten Subgruppe (siehe Abbildung 19A und B).

Die beiden Gruppen zeigten keinen Unterschied hinsichtlich des Vorkommens einer PTEN-Deletion ($p=0,5175$) und einer homozygoten CDKN2A/B-Deletion ($p=0,315$). Die reine Subgruppe *mesenchymal* wies signifikant seltener eine EGFR-Amplifikation auf (12,29% der Samples) als die gemischte Subgruppe (62,5% der Samples) ($p=0,0023$) (siehe Abbildung 19C, D, E und Tabelle 19).

Die reine Subgruppe *mesenchymal* wies im Vergleich zu der gemischten Subgruppe *mesenchymal, RTK 2* signifikant weniger *Cancer Cells* ($p=0,0017$) sowie signifikant mehr *CD14*-positive Zellen ($p=0,0331$) und *LUMPs* ($p<0,0001$) auf (siehe Abbildung 20 und Tabelle 20.)

Ebenso wurde die Kohorte der *mesenchymalen* GBMs bezüglich ihres Anteils an den entsprechenden Zellpopulation dichotomisiert und mit dem Gesamtüberleben bzw. mit dem progressionsfreien Überleben in Beziehung gesetzt. Außerdem wurde die Assoziation des Vorkommens von CNV mit den Outcome-Parametern (OS und PFS) in dieser Subkohorte untersucht.

Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt. Patienten der Subgruppe *mesenchymal*, bei deren Tumorgewebe eine homozygote CDKN2A/B-Deletion nachgewiesen werden konnte, zeigten ein kürzeres progressionsfreies Überleben (192 Tage im Mittel) im Vergleich zu Patienten, bei deren Tumorgewebe keine Deletion nachgewiesen wurde (mittleres Überleben =

448 Tage) (Log-Rang: $p=0,0292$, Wilcoxon: $p=0,0284$) (siehe Abbildung 21M). Ein Anteil an *Fibroblasts*, welcher geringer als der Median der Referenzgruppe war, war ebenso mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert (Log-Rang: $p=0,0001$, Wilcoxon: $p=0,0004$, Abbildung 21U) wie ein größerer Anteil an *Glia* (Log-Rang: $p=0,00374$, Abbildung 21V). Der zuletzt genannte Effekt wies im Wilcoxon-Test keine statistische Signifikanz auf.

	Mesenchymal (rein)	mesenchymal, RTK 2
N	21	16
Alter (Median)	62	60,5
Präoperativer Karnofsky-Index		
60	0	1
70	4	2
80	1	5
90	7	3
100	7	4
Keine Angabe	2	1
Resektionsausmaß		
Komplett	8	3
>90%	6	7
<90%	6	5
Keine Angabe	1	1

Tabelle 18: Charakterisierung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (mesenchymal) nach klinischen Parametern

CNV	Kategorie	0 (nein)	1 (ja)
Homozygote CDKN2A/B-Deletion	Mesenchymal (rein)	10	11
	Mesenchymal – RTK 2	5	11
EGFR-Amplifikation	Mesenchymal (rein)	18	3
	Mesenchymal – RTK 2	6	10
PTEN-Deletion	Mesenchymal (rein)	14	7
	Mesenchymal – RTK 2	9	7

Tabelle 19: Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich der CNV

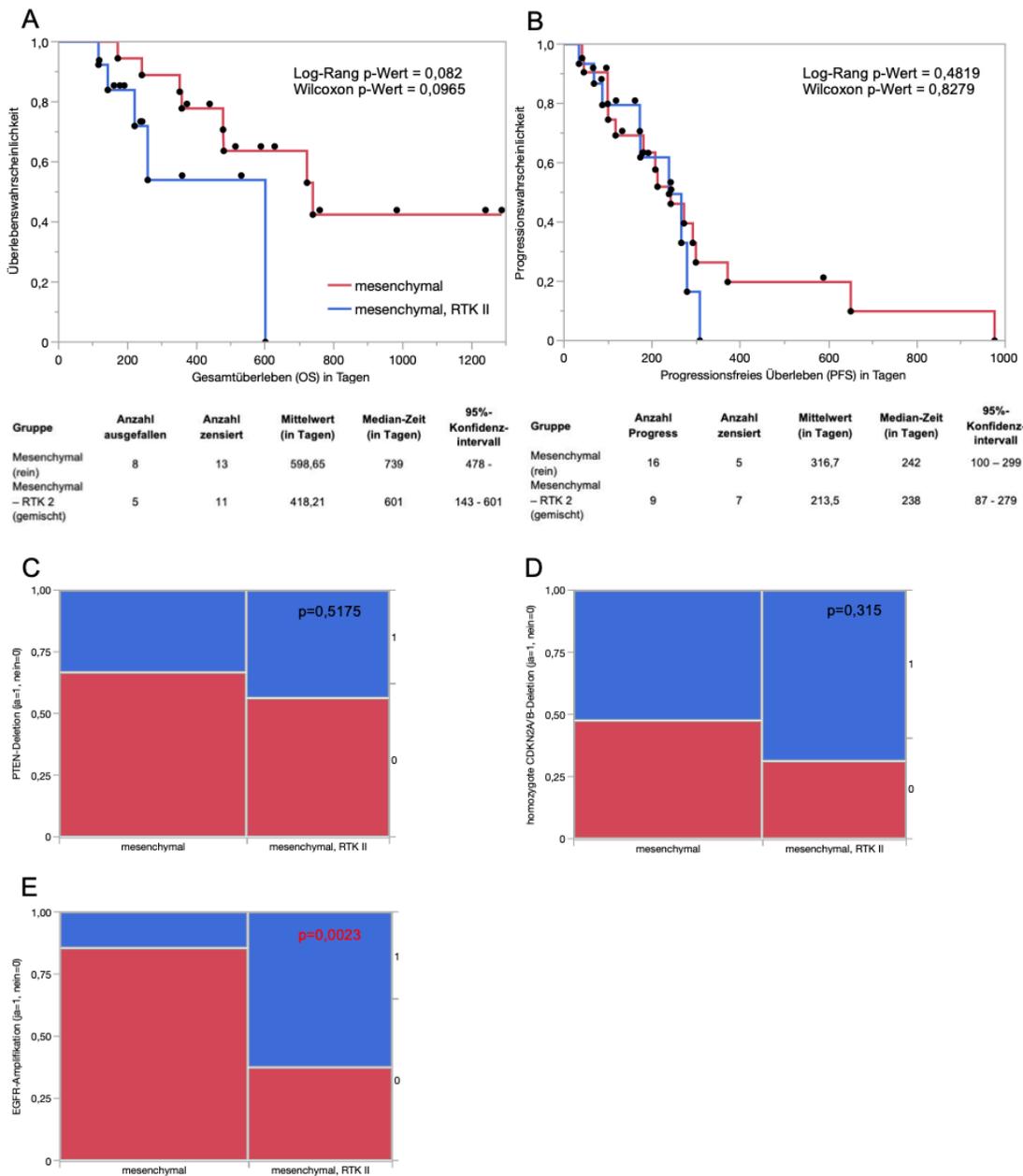


Abbildung 19: Subgruppe mesenchymal (reine und gemischten Samples) (A: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem Gesamtüberleben, B: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem progressionsfreien Überleben, C: Verteilung der Copy Number Variationen, D: tabellarische Übersicht der klinischen Parameter, E: tabellarische Darstellung absoluter Häufigkeiten der Copy Number Variationen)

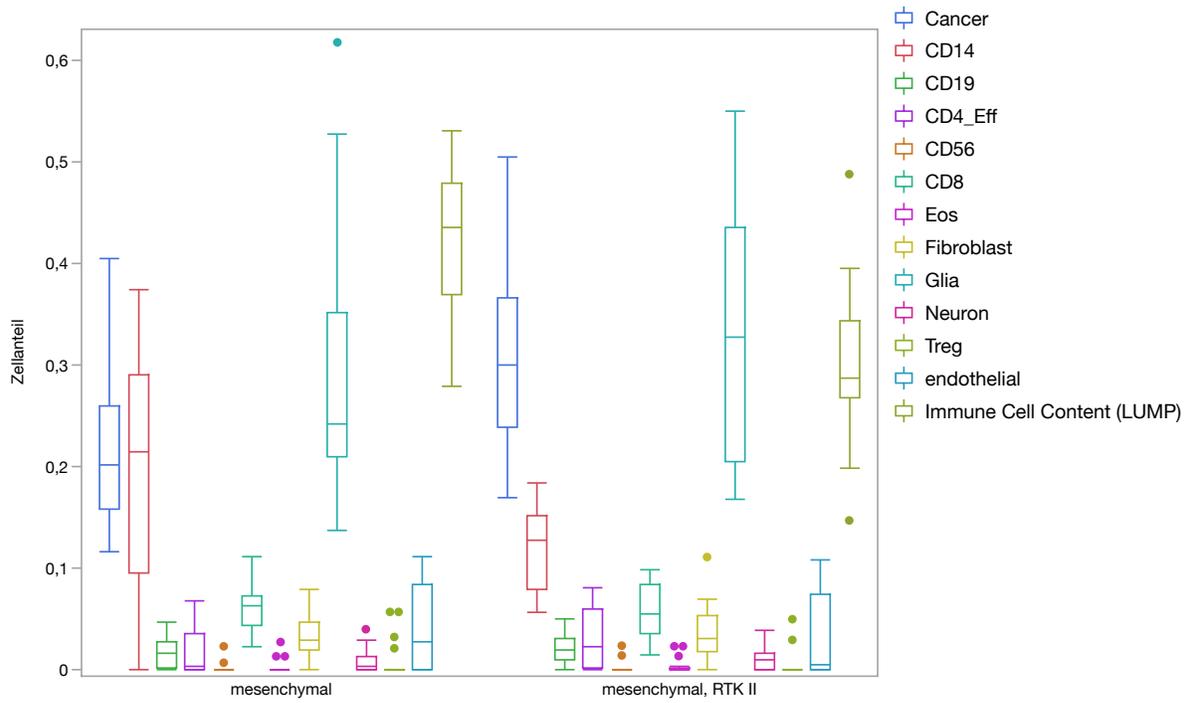
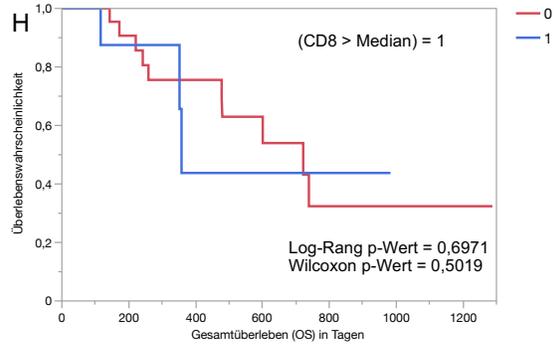
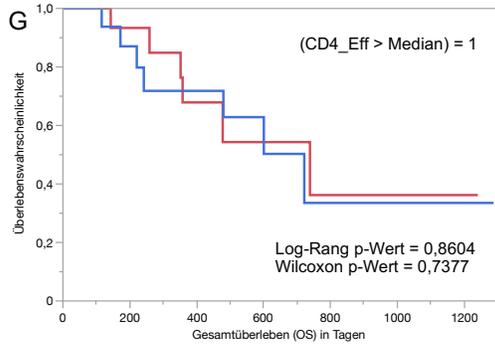
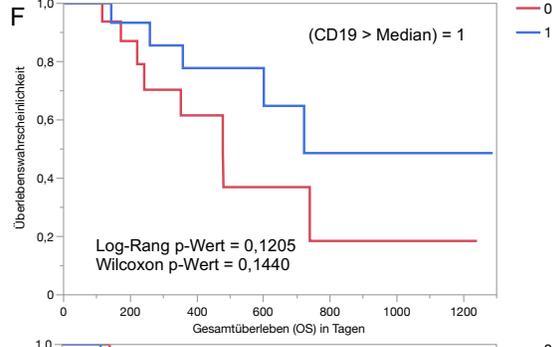
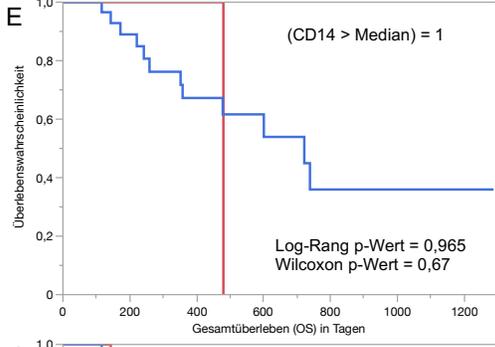
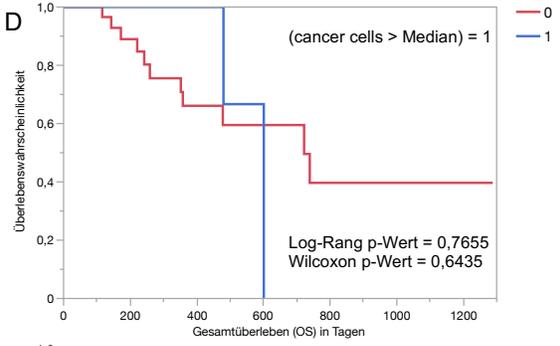
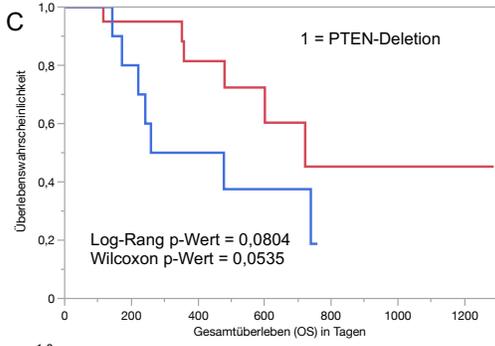
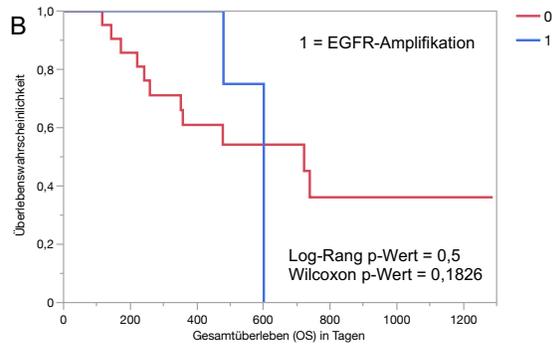
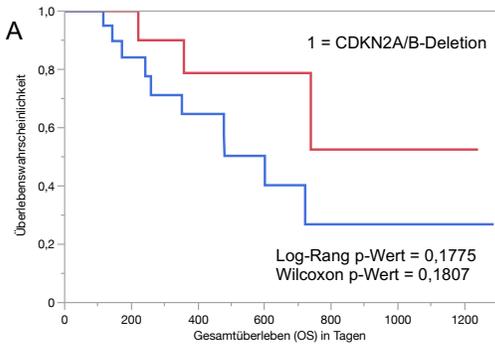
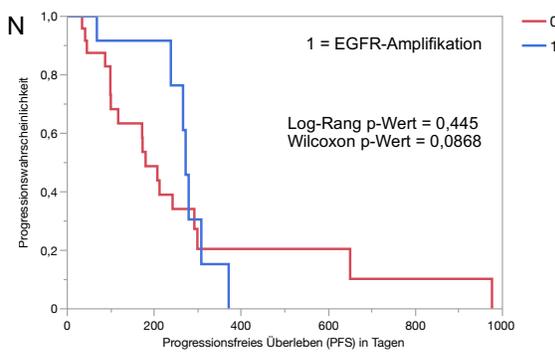
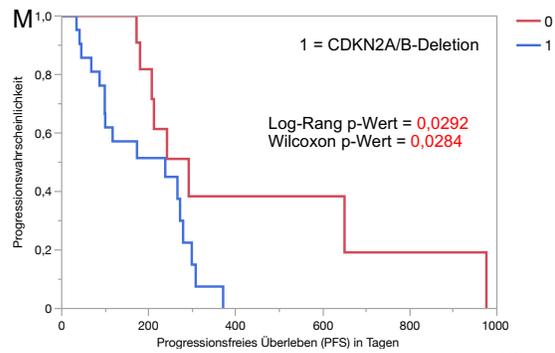
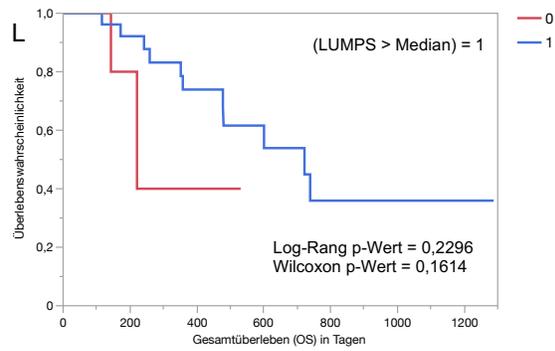
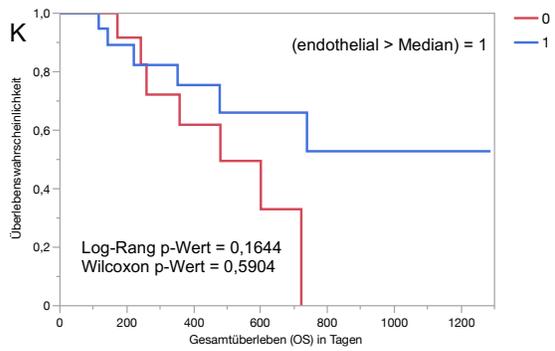
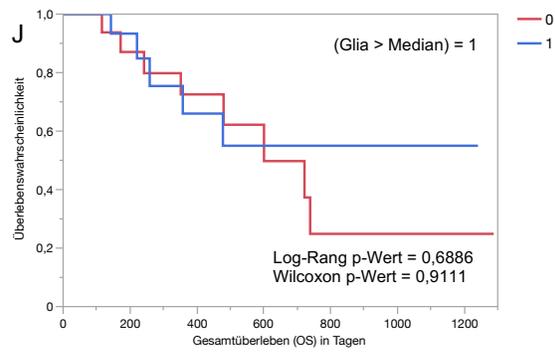
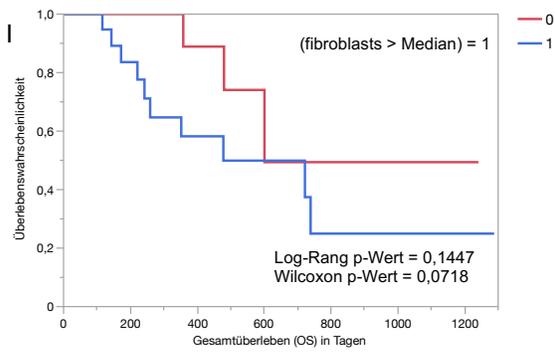


Abbildung 20: Darstellung der zellulären Zusammensetzung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (mesenchymal) mittels Boxplots

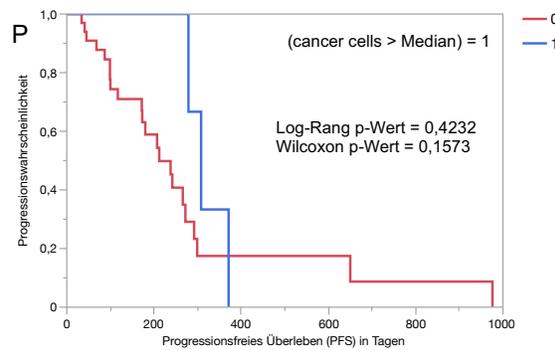
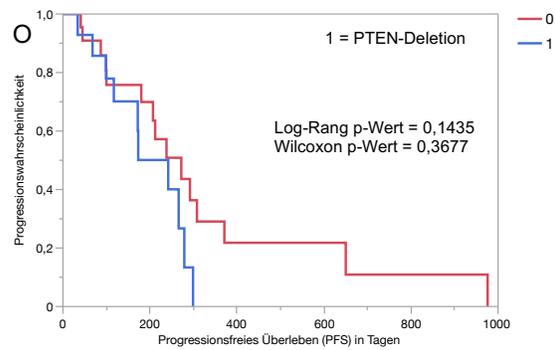
Zelltyp	Epigenetische Subgruppe	
	Mesenchymal (rein)	Mesenchymal – RTK 2 (gemischt)
Cancer cells		
Median	0,2023	0,3
p-Wert		0,0017
CD14		
Median	0,2152	0,1281
p-Wert		0,0331
CD19		
Median	0,017	0,0195
p-Wert		0,4328
CD4_Eff		
Median	0,0037	0,0221
p-Wert		0,2083
CD56		
Median	0	0
p-Wert		0,798
CD8		
Median	0,0626	0,0545
p-Wert		0,5916
Eos		
Median	0	0
p-Wert		0,4593
Fibroblasts		
Median	0,0299	0,0301
p-Wert		0,7359
Glia		
Median	0,2416	0,3275
p-Wert		0,3658
Neuron		
Median	0,0033	0,0099
p-Wert		0,4334
Treg		
Median	0	0
p-Wert		0,4067
Endothelial		
Median	0,0284	0,0047
p-Wert		0,4719
LUMPs		
Median	0,4347	0,2875
p-Wert		<0,0001

Tabelle 20: Statistische Unterschiede bzgl. der Zellzusammensetzung zwischen den Subgruppen





Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	8	7	448,74	292	180 - 976
1	17	5	192,67	238	99 - 279



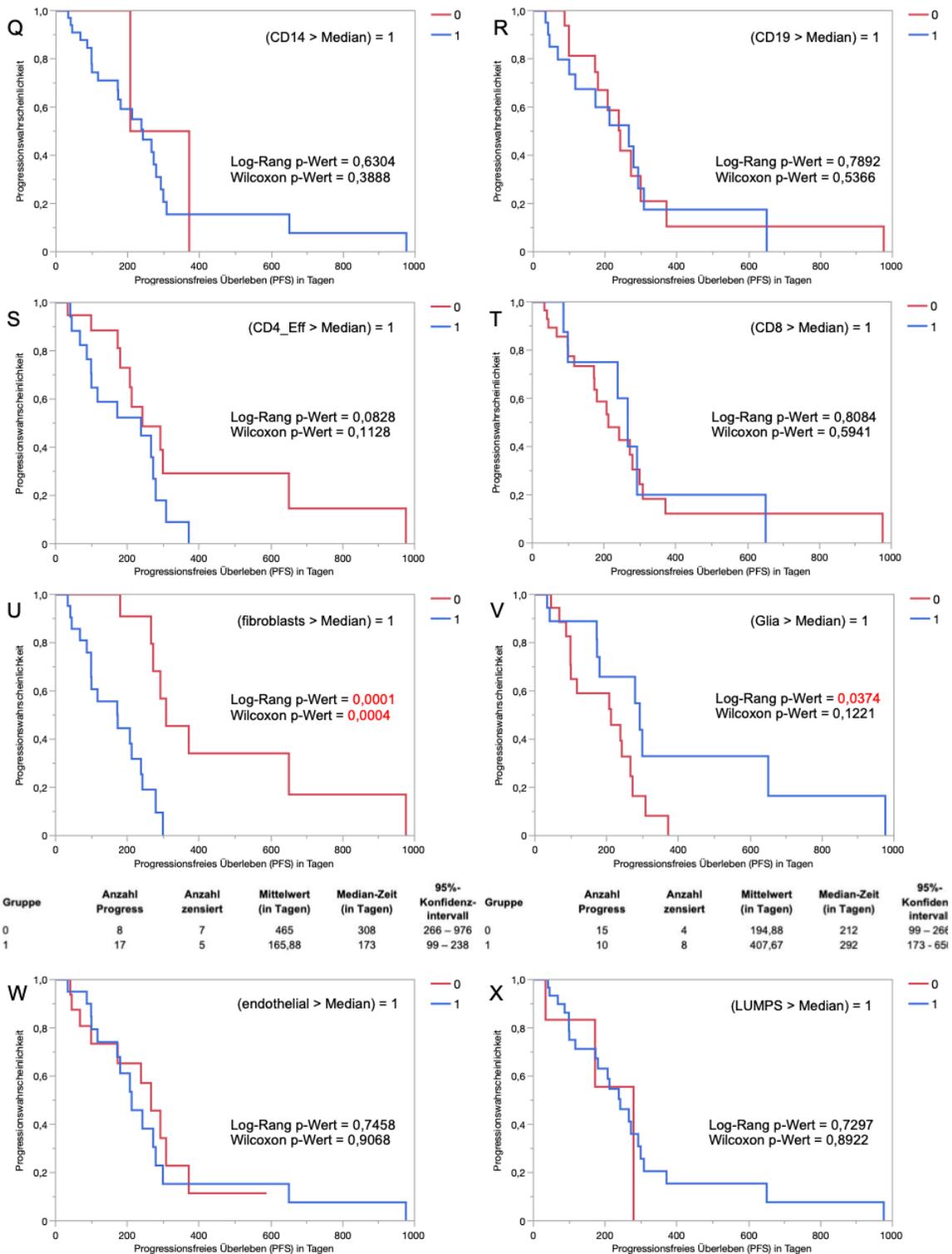


Abbildung 21: Darstellung der Assoziation der Copy Number Variationen und der Zellpopulationen mit dem OS (A-L) und dem PFS (M-X) mittels Kaplan-Meier-Kurven und der entsprechenden statistischen Daten

3.3.2.2. Subgruppe *RTK 2*

Im Folgenden wurden die reine epigenetische Subgruppe *RTK 2* und die beiden gemischten Subgruppen *RTK 2, mesenchymal* und *RTK 2, RTK 1* im Gruppenvergleich hinsichtlich klinischer und neuropathologischer Charakteristika, der zellulären Zusammensetzung sowie der Copy Number Variationen untersucht.

Die reine epigenetische Subgruppe *RTK 2* wies ein kürzeres Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben auf als die gemischten epigenetischen Subgruppen. Mit einem mittleren Gesamtüberleben von 55 Tagen überlebten Patienten, die der reinen Subgruppe angehörten, signifikant kürzer als Patienten, die der gemischten Subgruppe *RTK 2, mesenchymal* angehörten ($p=0,0058$). Die reine Subgruppe *RTK 2* war mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert als die gemischte Subgruppe *RTK 2, mesenchymal* ($p=0,0219$) und die Subgruppe *RTK 2, RTK 1* ($p=0,0153$). Die entsprechenden Kaplan-Meier-Überlebenskurven sind in Abbildungen 22A und B dargestellt, die Gruppenunterschiede zeigen die Tabellen 22 und 23.

Hinsichtlich der klinischen Charakteristika (siehe Tabelle 21) wurde ersichtlich, dass die Subgruppe *RTK 2, mesenchymal* das geringste mittlere Alter (60 Jahre) zum Zeitpunkt der Resektion aufwies.

Die Analyse der betrachteten Copy Number Variationen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der reinen und den beiden gemischten epigenetischen Subgruppen (siehe Abbildung 23 sowie Tabellen 24 und 25).

Aufgrund der geringen Stichprobengröße von $n=3$ wurde die reine Subgruppe *RTK 2* für die folgenden Ausführungen bezüglich der zellulären Zusammensetzung und deren Assoziation mit dem Gesamtüberleben ausgeschlossen. Folglich veranschaulichen die Abbildung 24 und die Tabelle 26 eine Gegenüberstellung der zellulären Zusammensetzung der gemischten Subgruppen *RTK 2, mesenchymal*

und *RTK 2*, *RTK 1*. Letztere Subgruppe wies einen signifikant größeren Anteil an *Cancer Cells* auf ($p=0,0048$). Hinsichtlich der weiteren Zellpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten gemischten epigenetischen Subgruppen.

Die Dichotomisierung der Kohorte nach Anteil einer jeweiligen Zellpopulation (Abbildung 25) zeigte einen Überlebensnachteil für Patienten, deren Tumorgewebeprobe einen Anteil an *CD14*-positiven Zellen enthielt, welcher höher als der Median der Stichprobe war (Wilcoxon: $p=0,0445$). Im Log-Rang-Test wies dieser Effekt keine Signifikanz auf. Gleichermäßen zeigte diese Subkohorte ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben (Log-Rang: $p<0,0001$, Wilcoxon: $p<0,0001$). Ein höherer Anteil ($>$ Median der Stichprobe) an *CD8*-positiven Zellen und *LUMPs* war ebenfalls mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert (*CD8*: Log-Rang: $p=0,0145$, Wilcoxon: $p=0,0606$) (*LUMPs*: Log-Rang: $0,0989$, Wilcoxon: $0,0352$).

	RTK 2 (rein)	RTK 2, mesenchymal	RTK 2, RTK 1
N	3	20	13
Alter (Median)	64	60	66
Präoperativer Karnofsky-Index			
20	1	0	0
40	0	0	1
70	1	2	4
80	0	4	1
90	1	7	4
100	0	7	1
Keine Angabe	0	0	2
Resektionsausmaß			
Komplett	2	5	4
>90%	0	9	3
<90%	1	5	5
Keine Angabe	0	1	1

Tabelle 21: Charakterisierung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (RTK 2) nach klinischen Parametern

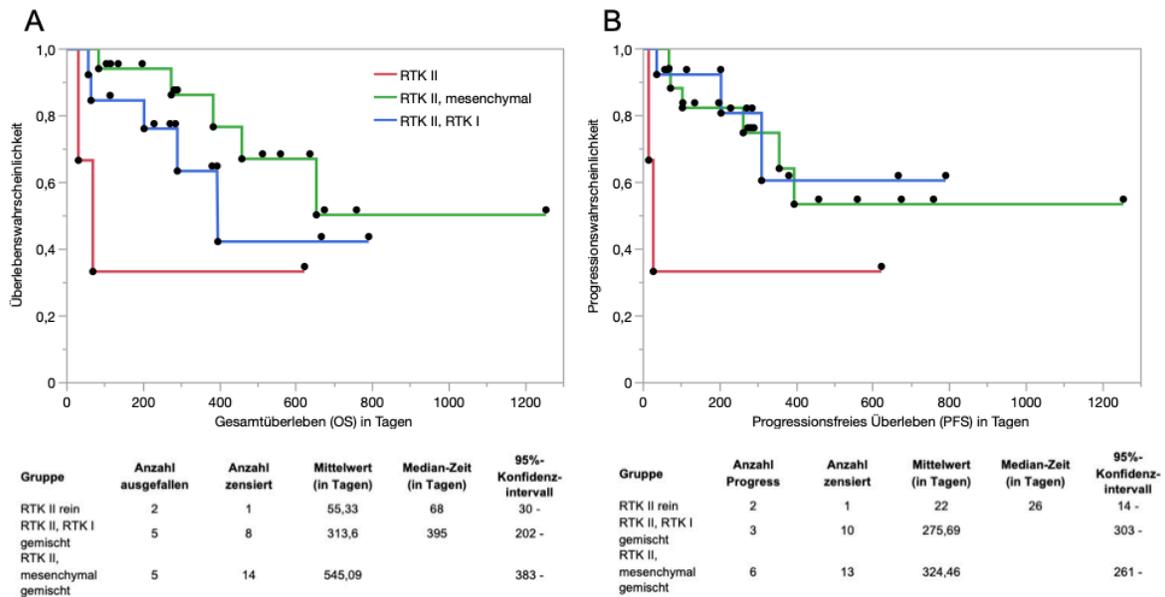


Abbildung 22: Subgruppe RTK 2 aufgeteilt nach reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (RTK 2): A: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem Gesamtüberleben sowie statistische Parameter, B: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem progressionsfreien Überleben sowie statistische Parameter

Gruppen	Test	p-Wert
RTK 2 rein - RTK 2, RTK 1 gemischt	Log-Rang Wilcoxon	0,347 0,136
RTK 2 rein - RTK 2,mesenchymal gemischt	Log-Rang Wilcoxon	0,0552 0,0088
RTK 2, RTK 1 gemischt – RTK 2 mesenchymal gemischt	Log-Rang Wilcoxon	0,3327 0,22

Tabelle 22: tabellarische Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens der reinen und gemischten Subgruppen (RTK 2)

Gruppen	Test	p-Wert
RTK 2 rein – RTK 2, RTK 1 gemischt	Log-Rang Wilcoxon	0,0922 0,0153
RTK 2 rein – RTK 2,mesenchymal gemischt	Log-Rang Wilcoxon	0,141 0,0219
RTK 2, RTK 1 gemischt – RTK 2,mesenchymal gemischt	Log-Rang Wilcoxon	0,9474 0,8429

Tabelle 23: Gruppenunterschiede bezüglich des progressionsfreien Überlebens der reinen und gemischten Subgruppen (RTK 2)

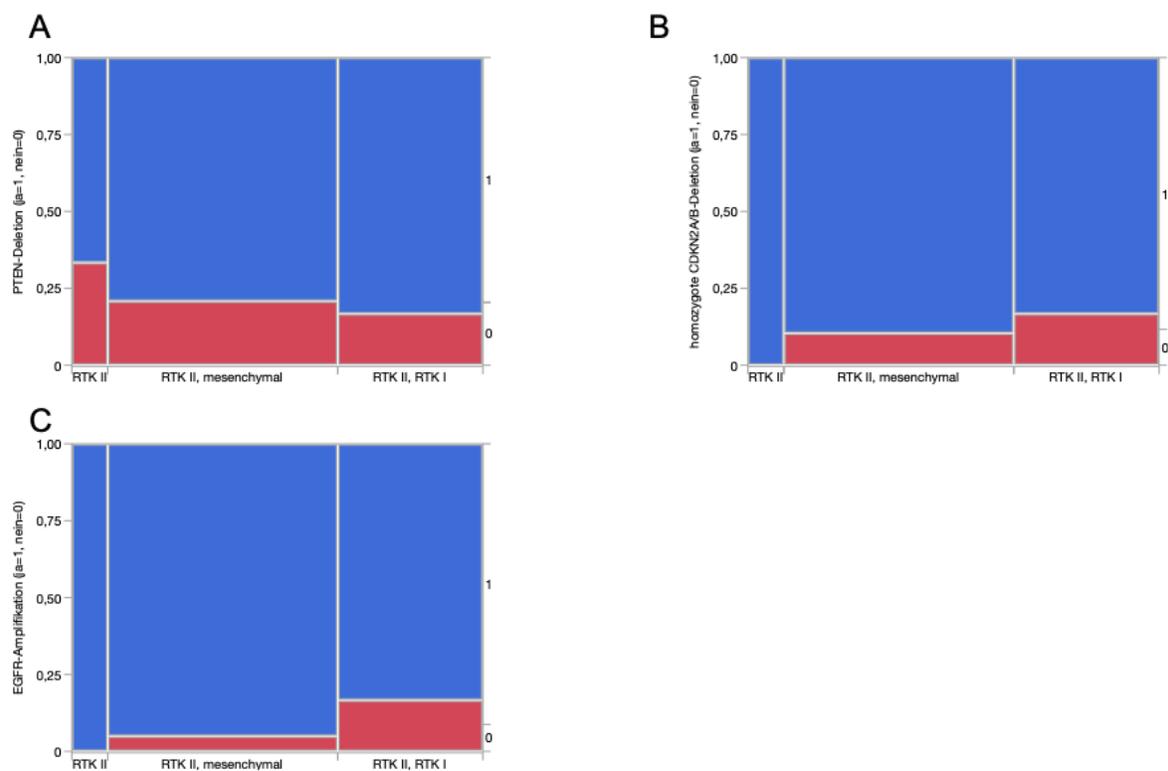


Abbildung 23: Verteilung der Copy Number Variationen nach reiner und gemischten Subgruppen (RTK 2)

CNV	Kategorie	0 (nein)	1 (ja)
Homozygote CDKN2A/B-Deletion	RTK 2 (rein)	0	3
	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	2	17
	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	2	10
EGFR-Amplifikation	RTK 2 (rein)	0	3
	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	1	18
	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	2	10
PTEN-Deletion	RTK 2 (rein)	1	2
	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	4	15
	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	2	10

Tabelle 24: absolute Häufigkeiten der Copy Number Variationen

CNV	Kategorie	- Kategorie	p-Wert
PTEN-Deletion	RTK 2 (rein)	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	0,5379
	RTK 2 (rein)	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	0,6497
	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	0,7616
Homozygote CDKN2A/B-Deletion	RTK 2 (rein)	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	0,3255
	RTK 2 (rein)	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	0,4321
	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	0,6232
EGFR-Amplifikation	RTK 2 (rein)	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	0,3255
	RTK 2 (rein)	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	0,5835
	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	0,3025

Tabelle 25: Gruppenunterschiede bzgl. des Auftretens von Copy Number Variationen

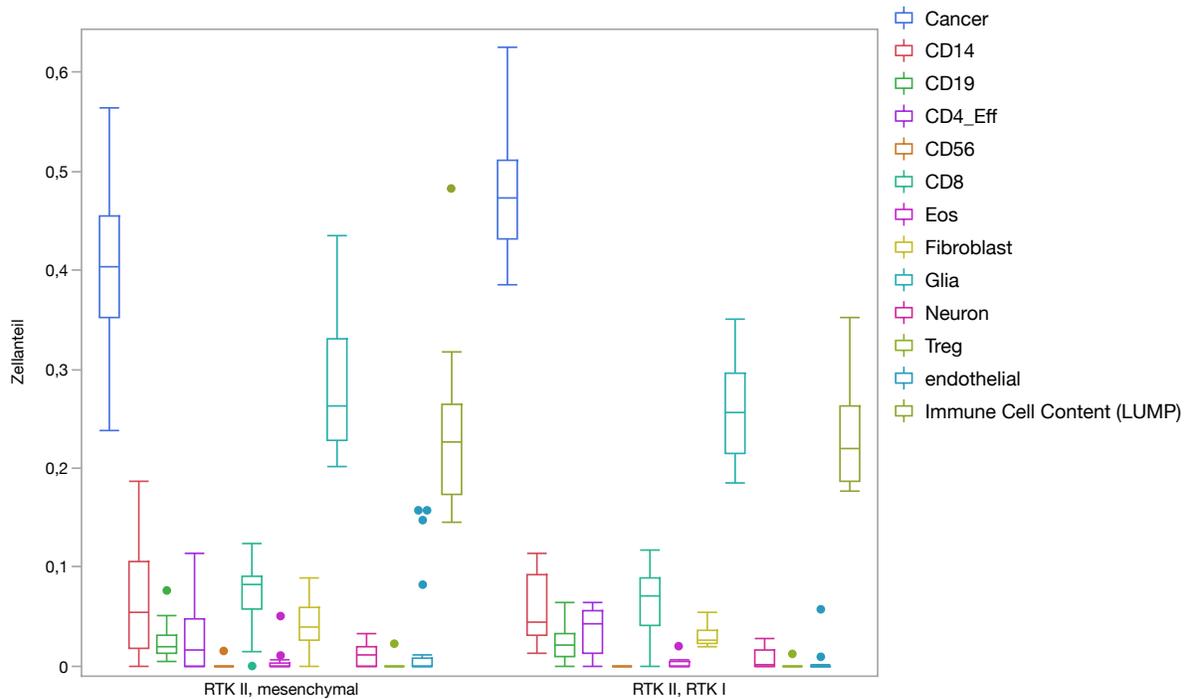
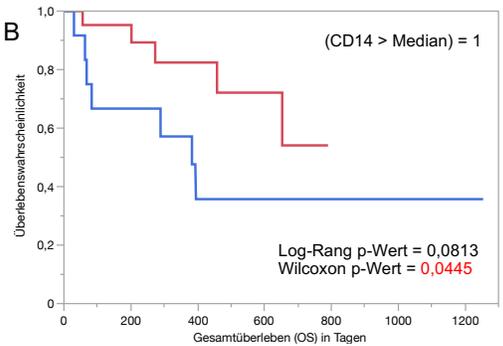
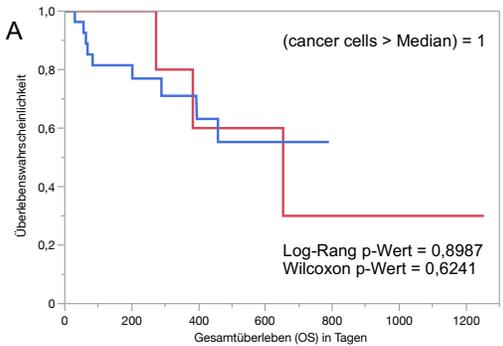


Abbildung 24: Darstellung der Zellanteile mittels Boxplots,

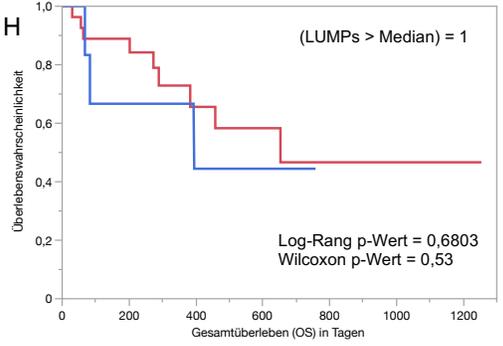
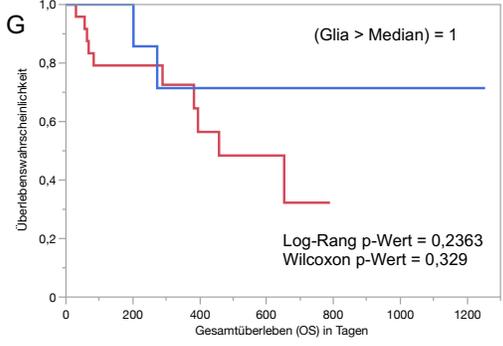
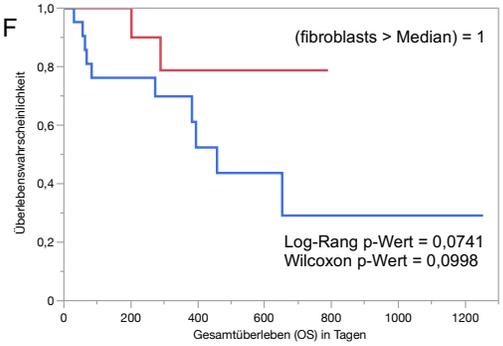
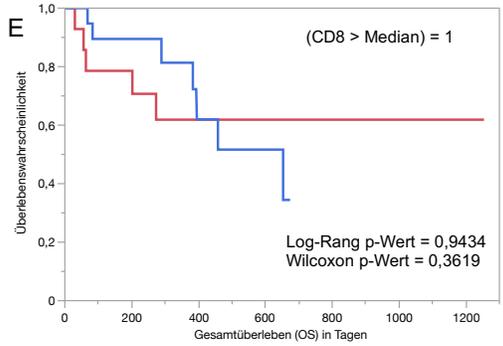
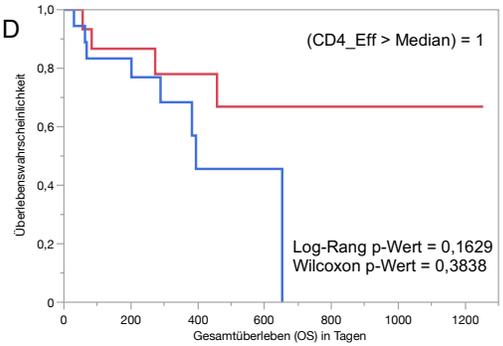
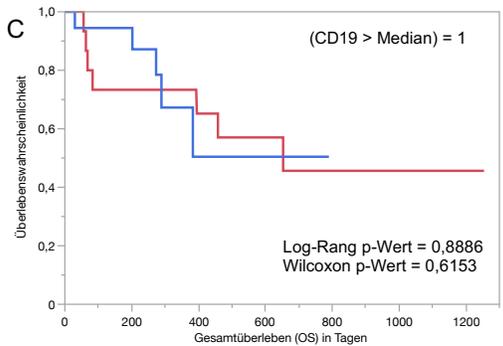
Zelltyp	Epigenetische Subgruppe	
	RTK 2 – mesenchymal (gemischt)	RTK 2 – RTK 1 (gemischt)
Cancer cells		
Median	0,4035	0,4728
p-Wert		0,0048
CD14		
Median	0,054	0,044
p-Wert		0,7823
CD19		
Median	0,0199	0,0207
p-Wert		0,8974
CD4_Eff		
Median	0,016	0,0434
p-Wert		0,1959
CD56		
Median	0	0
p-Wert		0,4568
CD8		
Median	0,0824	0,0703
p-Wert		0,3967
Eos		
Median	0	0
p-Wert		0,7781
Fibroblasts		

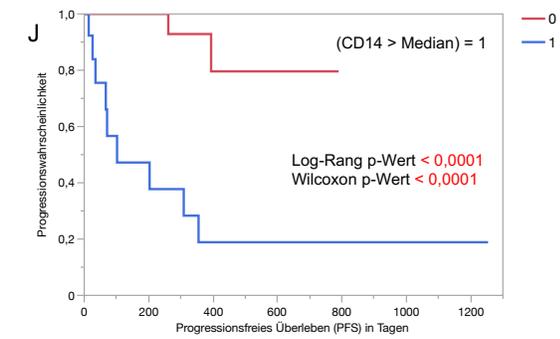
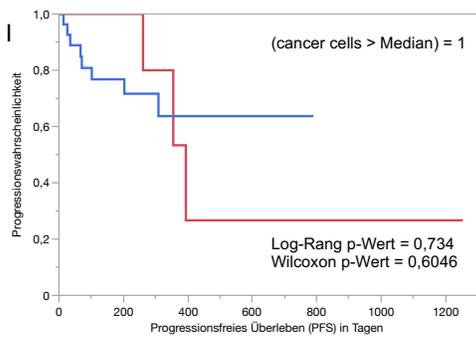
	Median	0,04	0,0258
	p-Wert		0,0682
Glia			
	Median	0,2633	0,2561
	p-Wert		0,311
Neuron			
	Median	0,0113	0,0018
	p-Wert		0,3777
Treg			
	Median	0	0
	p-Wert		0,8238
Endothelial			
	Median	0	0
	p-Wert		0,6771
LUMPs			
	Median	0,227	0,2204
	p-Wert		0,7402

Tabelle 26: Statistische Unterschiede bzgl. der Zellanteile zwischen den Subgruppen

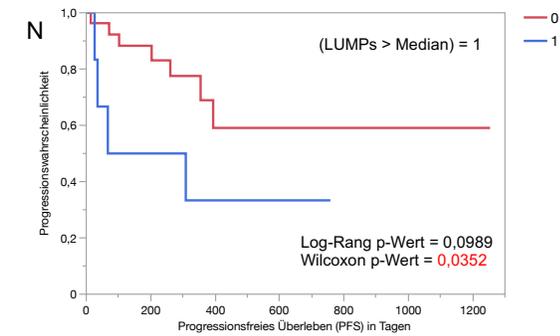
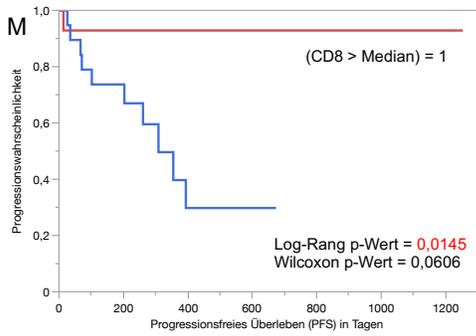
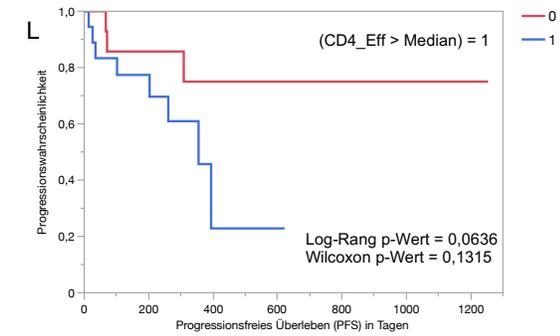
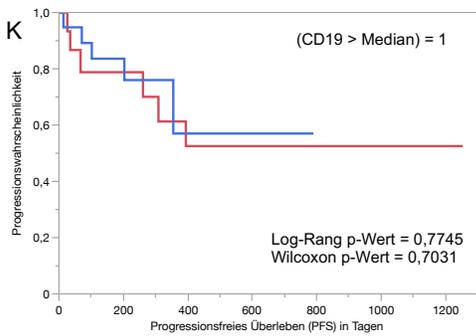


Gruppe	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	5	17	551,54		
1	7	6	272,43	383	458 - 63





Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	2	20	384,5	394	394 - 394
1	9	4	177,73	102	26 - 355



Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	1	13	14	309	102 - 102
1	10	11	271,16	309	102 - 102

Gruppe	Anzahl Progress	Anzahl zensiert	Mittelwert (in Tagen)	Median-Zeit (in Tagen)	95%-Konfidenzintervall
0	7	21	334,61	355	355 - 355
1	4	3	175,83	188	26 - 26

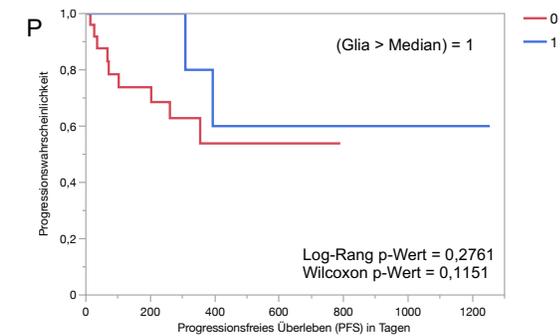
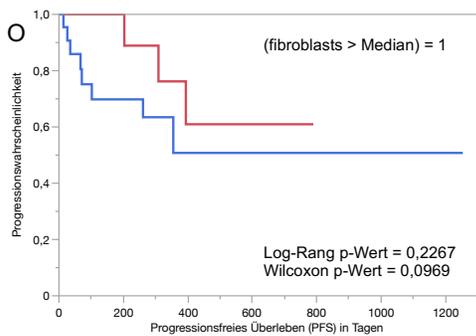


Abbildung 25: Darstellung der Assoziation der Zellpopulationen mit dem OS (A-H) und dem PFS (I-P) mittels Kaplan-Meier-Kurven

3.3.3. Gegenüberstellung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)

Ergänzend zu der unter 3.2.11. beschriebenen RnBeads-Analyse wurde eine weitere Analyse unter Einbeziehung der oben genannten Samples durchgeführt. Insgesamt wurden n=866.895 Proben bzw. CpG-Sites analysiert. Im Zuge der Filterprozedur des RnBeads-Algorithmus wurden n=17.371 CpG-Sites entfernt, welche mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) assoziiert waren und weitere n=18.644 CpGs, welche sich auf Geschlechtschromosomen befanden. Wie oben beschrieben wurde keines der eingeschlossenen Samples im Rahmen des *Quality checks* des RnBeads-Algorithmus ausgeschlossen.

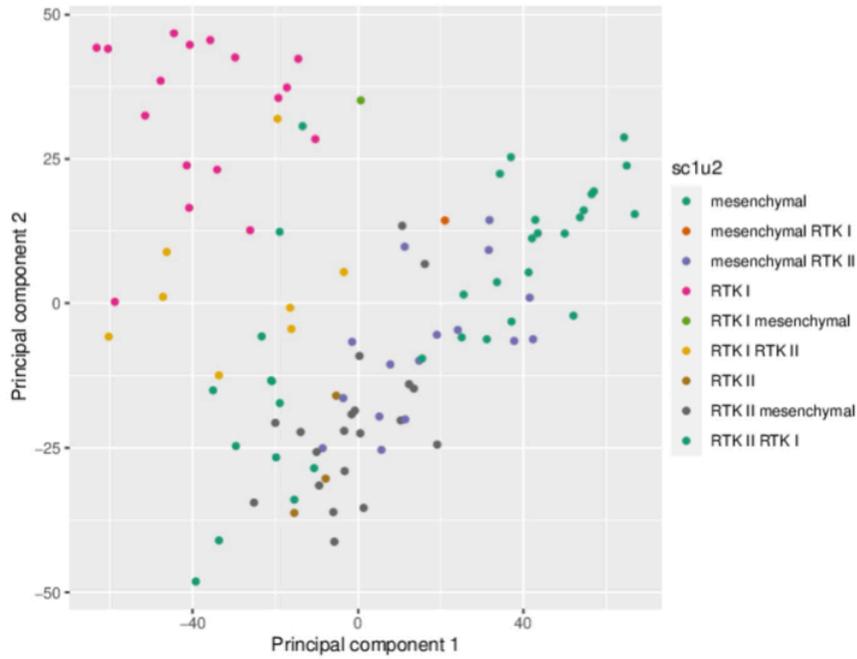
Die Einteilung der Kohorte erfolgte sowohl anhand des Vorhandenseins einer oder mehrerer epigenetischer Subgruppen in zwei Gruppen (pure = rein und mixed = gemischt) als auch anhand entsprechender reiner und gemischter Subgruppen in n=9 verschiedene Gruppen, die den unter 3.3. beschriebenen Gruppen entsprechen.

In der Hauptkomponentenanalyse wurde ersichtlich, dass sich insbesondere die reinen Subgruppen *mesenchymal* und *RTK 1* abgrenzen lassen. Bezüglich der gemischten Subgruppen und insbesondere der Subgruppe *RTK 2* gab es weitreichende Überschneidungen mit den beiden anderen Subgruppen. Jedoch zeigten sich Ähnlichkeiten der gemischten Subgruppe *RTK 1*, *RTK 2* und der reinen Subgruppe *RTK 1* sowie auch der gemischten Subgruppe *RTK 2*, *mesenchymal* und *mesenchymal*, *RTK 2* mit der Subgruppe *mesenchymal*.

Die Abbildung 27 zeigt t-SNE-plots basierend auf den 10.000 most variable CpG-Sites (diese Angabe bezieht sich auf alle hier untersuchten Samples der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte: n=100). Korrespondierend zu den bereits beschriebenen Hauptkomponentenanalysen waren am ehesten die reinen von den gemischten Samples abzugrenzen (siehe Abbildung 27A und B). Ergänzend zu den oben

beschriebenen Unterschieden zwischen den (reinen und gemischten) epigenetischen Subgruppen bezüglich der zellulären Zusammensetzung wurde in dieser Darstellung insbesondere das reine *mesenchymale* Cluster als *CD14*-reich und *LUMP*-reich sowie *Cancer Cell*-arm charakterisiert (siehe Abbildung 27C-E).

A



B

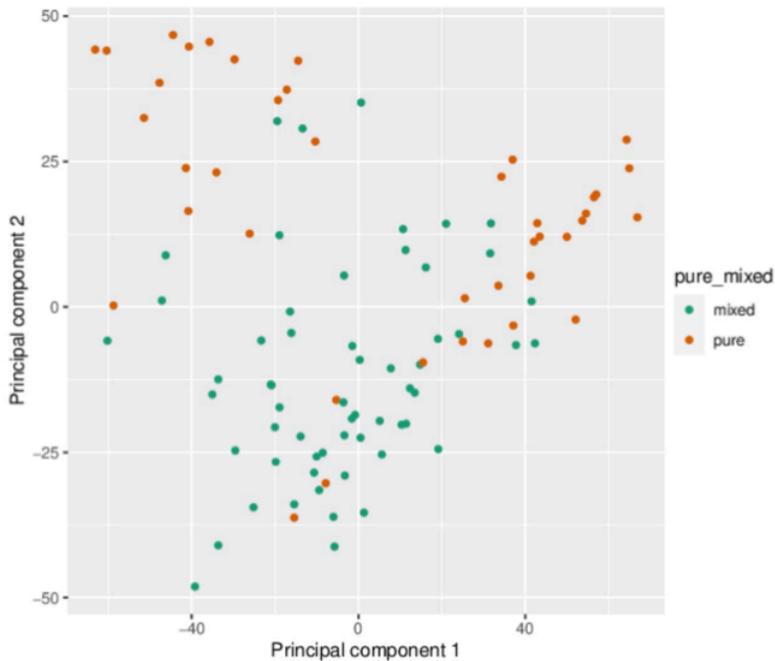
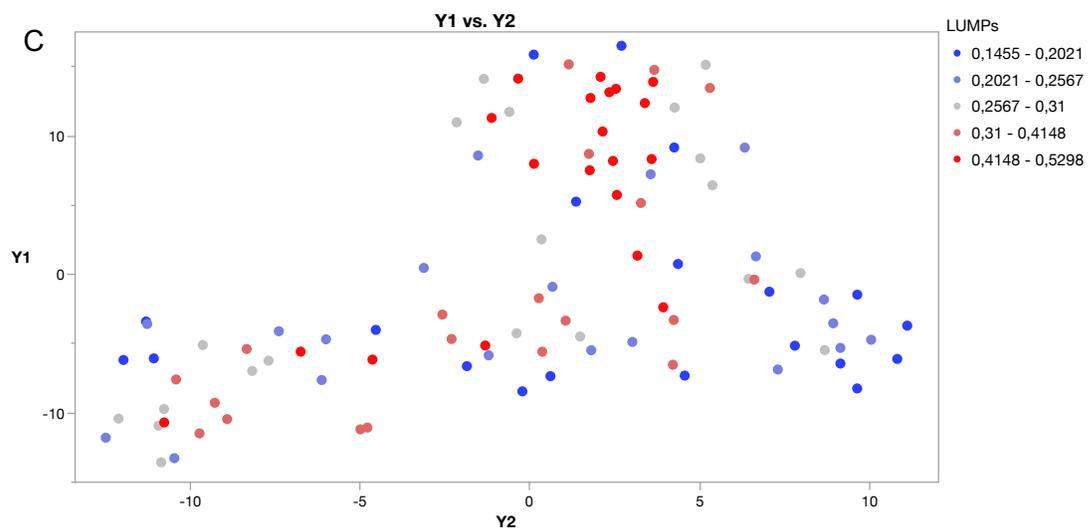
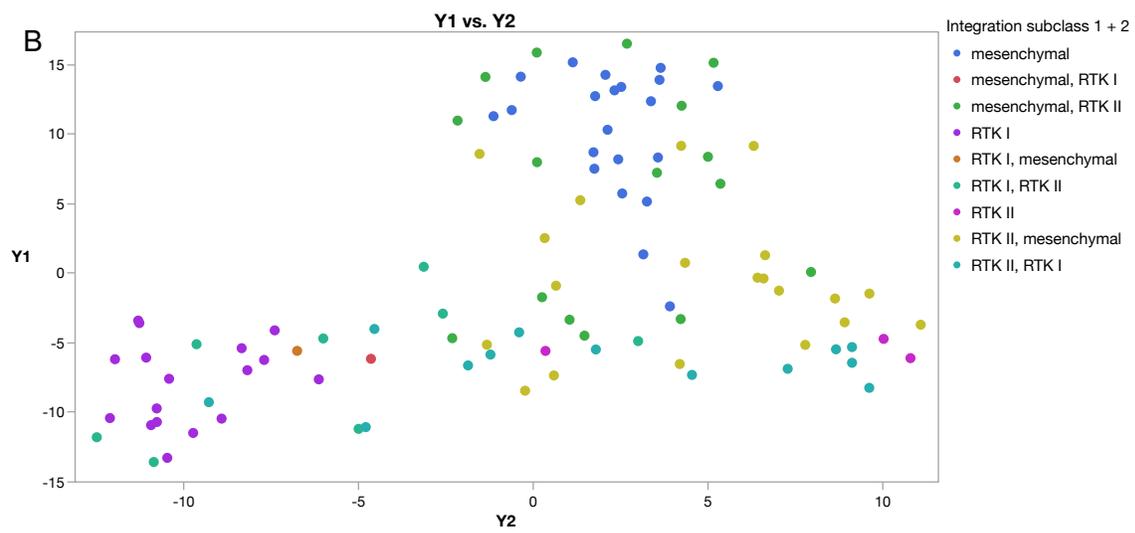
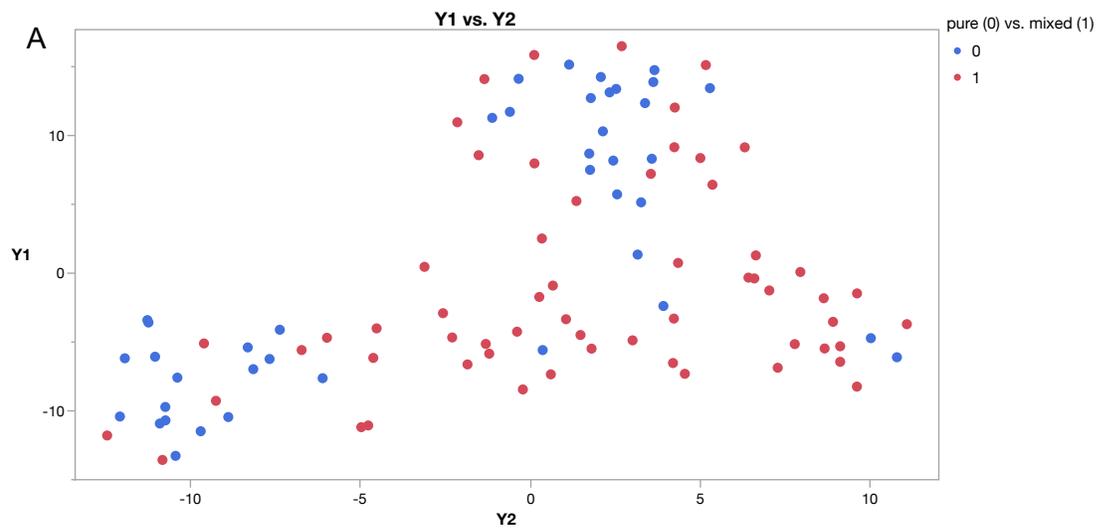


Abbildung 26: Hauptkomponenten-Analyse basierend auf allen untersuchten CpG-Sites unter Darstellung der verschiedenen reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (A) sowie unter Darstellung der Gesamtheit der reinen und gemischten Samples (unabhängig von ihrer epigenetischen Subgruppe) (B)



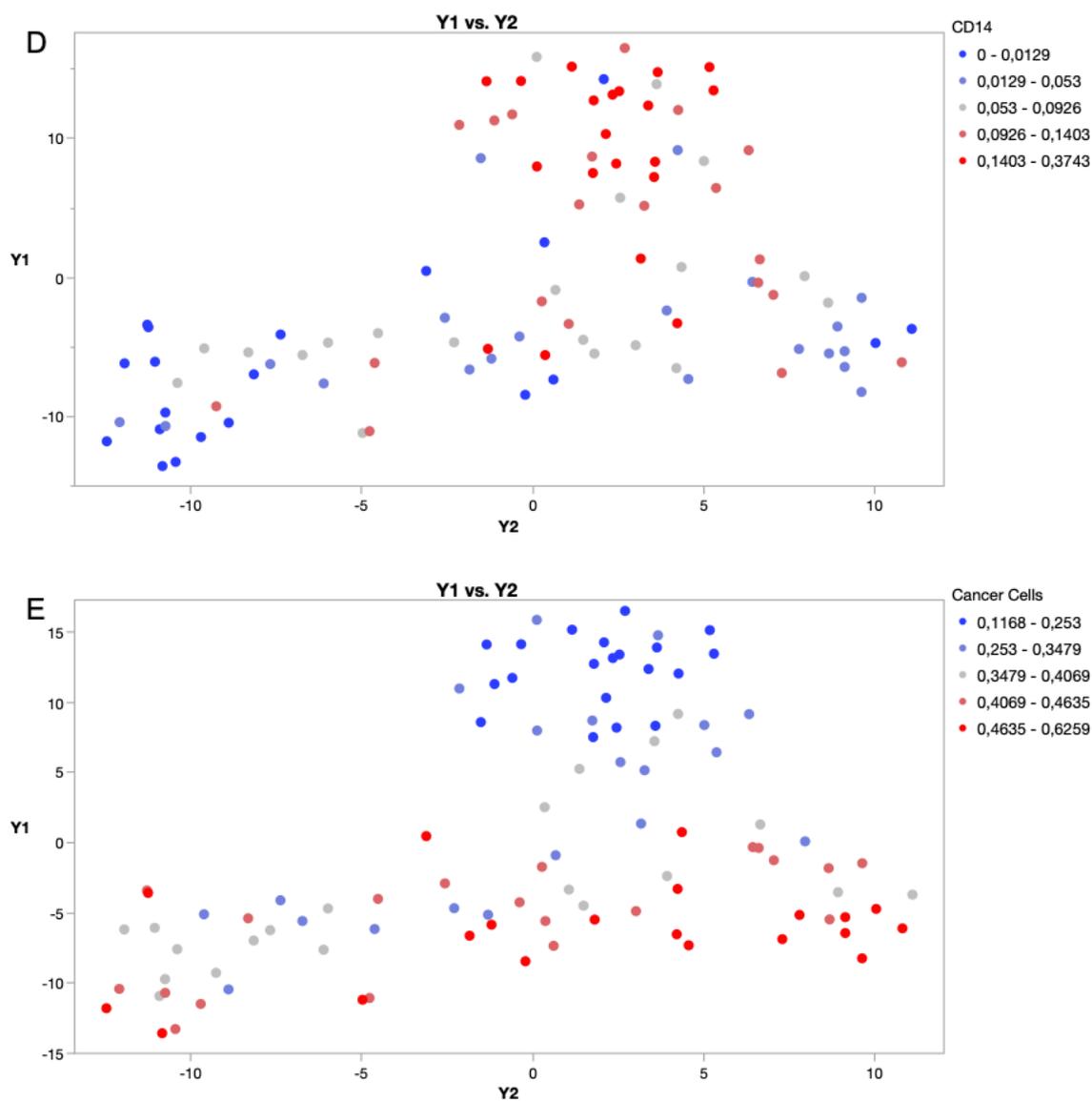


Abbildung 27: t-SNE Plots basierend auf den 10.000 most variable CpG-Sites unter Darstellung (A) der reinen und gemischten Samples, (B) der untersuchten reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen, (C) des Anteils an LUMPs, (D) des Anteils an CD14-positiven Zellen und (E) des Anteils an Cancer Cells

3.4. Gegenüberstellung der Versionen 11b4 und 12.3 des Brain Tumor Classifiers (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)

Die oben beschriebenen Ergebnisse und Darstellungen der (reinen und gemischten) epigenetischen Subgruppen basierten auf der Version 11b4 des *Brain Tumor Classifiers*, welche zum Zeitpunkt der initialen Datenerhebung die einzige verfügbare Version darstellte. Dementsprechend erfolgte die Klassifikation der Samples nach Methylierungsklassen korrespondierend zu den Klassen der Version 11b4 und den dazugehörigen Calibrated Scores. Darüber hinaus wurden alle Samples mithilfe der Version 12.3 des *Brain Tumor Classifiers* klassifiziert, die im Oktober 2021 veröffentlicht wurde.

Die Abbildung 28 zeigt eine schematische Gegenüberstellung der Klassifikation der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte mithilfe der Versionen 11b4 und 12.3 des *Brain Tumor Classifiers* unter Berücksichtigung des jeweiligen Calibrated Scores (< und > 0,84).

Alle Samples, welche in der Version 11b4 einen Calibrated Score von >0,84 bezüglich der Methylierungssubklasse 1 (*mesenchymal*, *RTK 1* oder *RTK 2*) erhielten, wurden durch die Version 12.3 der gleichen Methylierungssubklasse zugeordnet. Diejenigen Samples, welche in der Version 11b4 einen Calibrated Score <0,84 erhielten, erhielten auch durch die Version 12.3 einen niedrigeren Calibrated Score. Außerdem zeigten sich Unterschiede bezüglich der Klassifizierung bei diesen Samples: Der größte Anteil an abweichender Zuordnung zeigte sich bei jenen Samples, welche in der Version 11b4 mit einem CS<0,84 der Subgruppe *mesenchymal* zugeteilt wurden. Ein Großteil dieser Samples wurde in der Version 12.3 zu der Subgruppe *RTK 2* zugeteilt. Darüber hinaus gab es abweichende Klassifikationen bei den Methylierungsklassen, die die Version 11b4 des *Brain Tumor Classifiers* nicht berücksichtigte (siehe Abbildung 28).

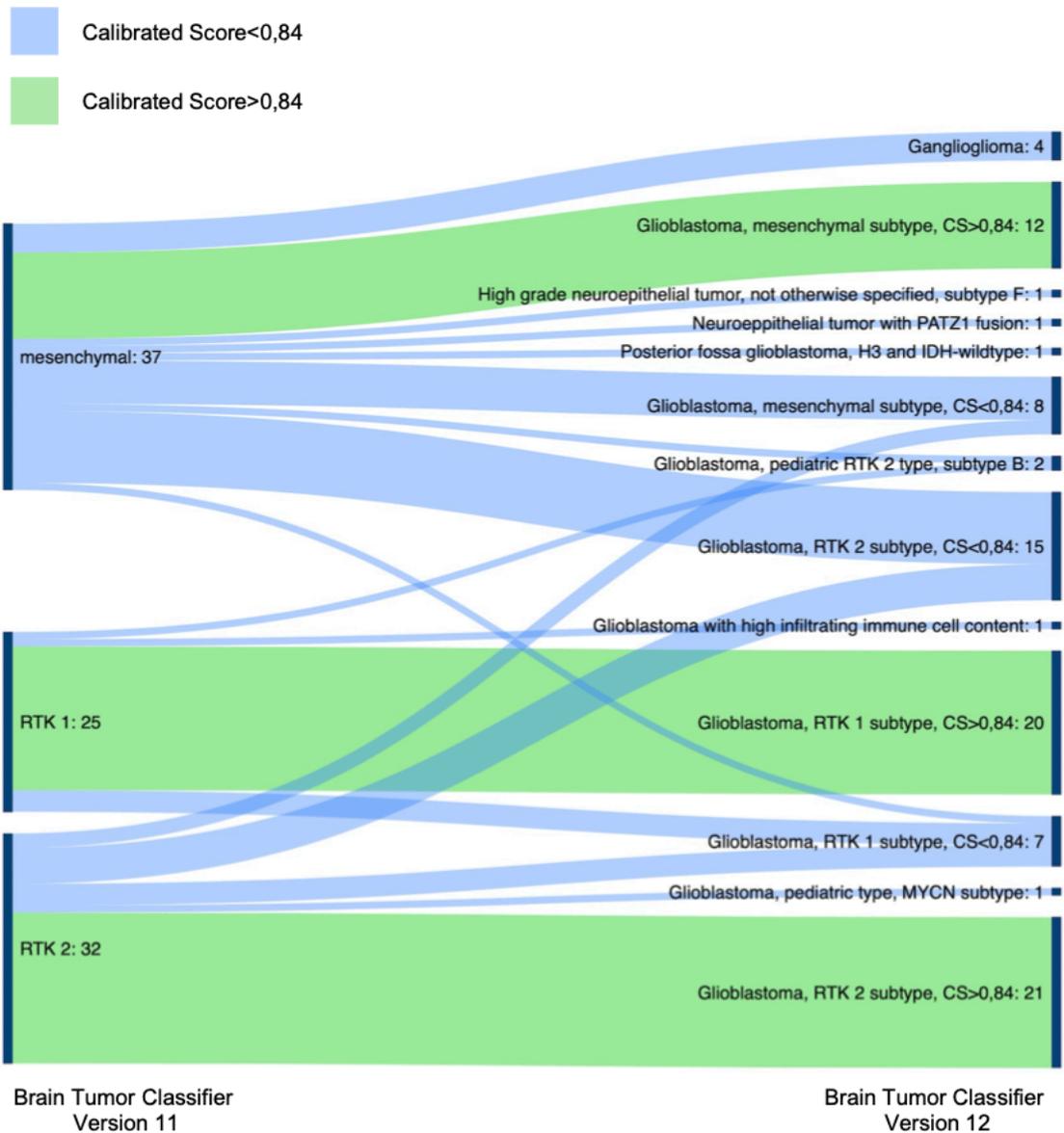


Abbildung 28: Schematische Gegenüberstellung der Zuordnung der Samples zu einer Methylierungsklasse basierend auf den Versionen 11 und 12 des Brain Tumor Classifiers

3.5. DNA-Methylierungsstatus von Immunsynapsengenen und Assoziation mit dem Gesamtüberleben

Wie einleitend beschrieben wird die Expression von Immunsynapsen-Proteinen durch epigenetische Mechanismen moduliert. Dies geschieht durch eine Hypermethylierung von stimulierenden (auch: *costimulatory*) Genen und eine Hypomethylierung von Immuncheckpointgenen. In diesem Zusammenhang wurden 20 ausgewählte Gene (siehe Tabelle 1) in Immuncheckpointgene (ICG) und co-stimulierende Gene (CSG) unterteilt⁹⁶ und auf Grundlage der den Genen entsprechenden CpG-Sites eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt (siehe Abbildung 29B). Alle eingeschlossenen Samples entsprachen den Einschlusskriterien der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte und die Zuordnung zu der jeweiligen epigenetischen Subgruppe wurde dargestellt. N=3 Cluster wurden bezüglich ihrer Assoziation mit dem Gesamtüberleben untersucht. Es zeigte sich kein Überlebensvorteil für eines der gebildeten Cluster (siehe Abbildung 29A). Cluster 1 zeichnete sich – mit Ausnahme eines Samples – durch die Rezeptor-Tyrosinkinase-Subtypen aus, während Cluster 2 gänzlich durch die Subgruppe *mesenchymal* repräsentiert wurde. Das Cluster 3 setzte sich aus allen drei epigenetischen Subgruppen zusammen.

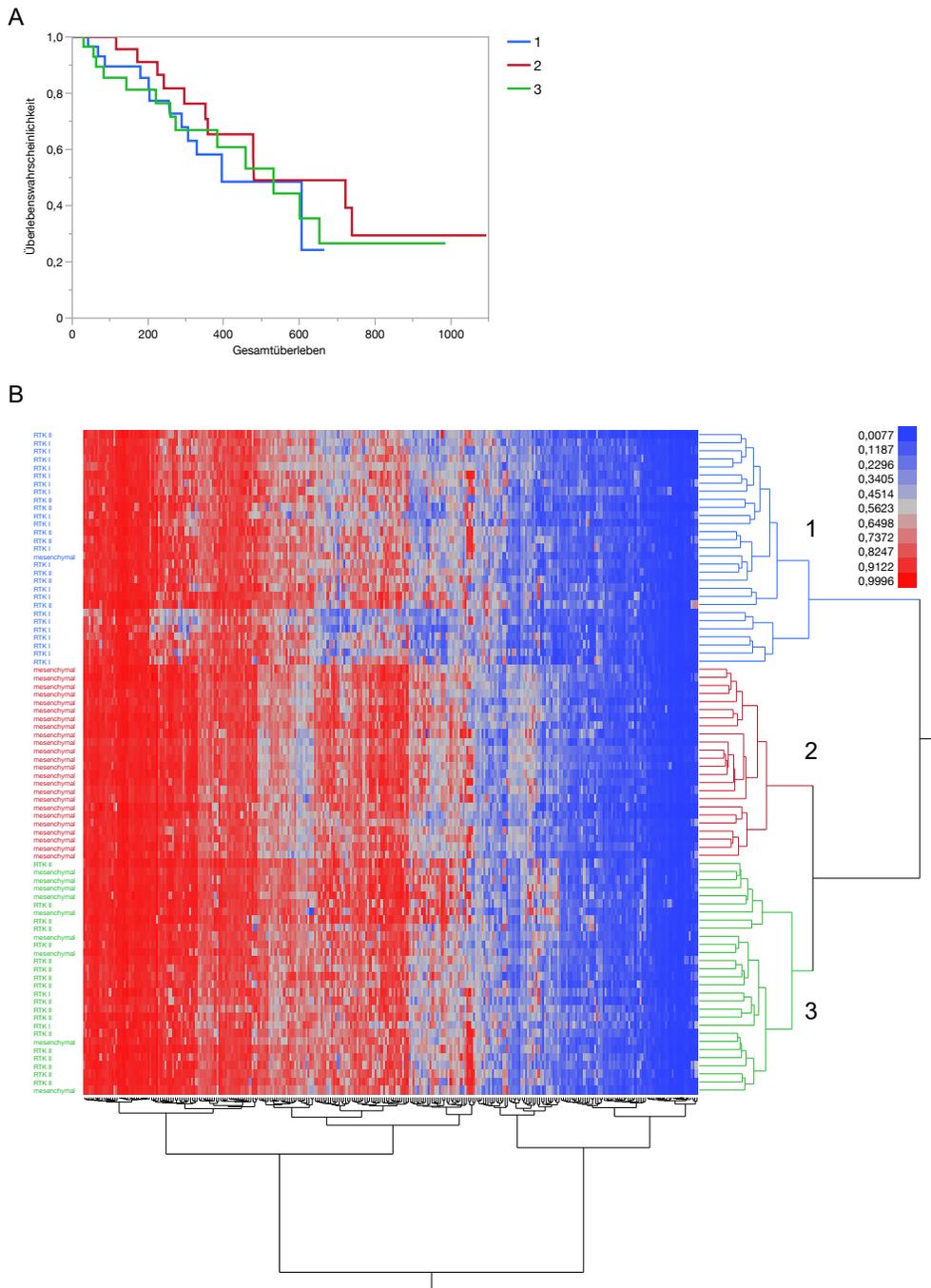


Abbildung 29: DNA-Methylierungsstatus von Immunsynapsengenen (A: Kaplan-Meier-Kurven zu der Darstellung des OS der gebildeten Cluster, B: hierarchische Clusteranalyse basierend auf denen zu den Immunsynapsengenen gehörigen CpG-Sites mit epigenetischen Subgruppen in Zeilen und CpG-Sites in Spalten; Bildung dreier Cluster und Legende bezüglich der β -Werte)

4. Diskussion

Epigenetische und genetische Signaturen diffuser Gliome, welche die häufigsten malignen, hirneigenen Tumoren bei Erwachsenen darstellen, gewinnen zunehmende diagnostische und klinische Bedeutung. Aktuell stellt die kombinierte histologische und molekulare Klassifikation nach WHO den Goldstandard für die Diagnostik dar. Das Heranziehen von molekularen Markern, wie dem MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, ist insbesondere für die Therapieplanung von hoher Relevanz und hat somit eine prognostische Bedeutung.

Insgesamt hat sich die Prognose des Glioblastoms seit Einführung der Radiochemotherapie in den letzten Jahren nur unwesentlich verändert. Dennoch stellt sich zunehmend die Frage nach der klinischen und prognostischen Bedeutung der etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms. Darüber hinaus zeigen diese Subgruppen unterschiedliche genetische Charakteristika und eine differentielle zelluläre Zusammensetzung, was eine unterschiedliche Tumorbilogie vermuten lässt und Anknüpfungspunkte für zukünftige, zielgerichtete Therapien sein könnten. Vor diesem Hintergrund wächst ebenso die Bedeutung der intratumoralen Heterogenität des Glioblastoms und die Frage nach weiteren, klinisch bedeutsamen Subgruppen dieser malignen Tumorentitäten.

Im Folgenden sollen die aufgestellten Hypothesen 1-6 diskutiert werden.

4.1. Epigenetische Subgruppen des Glioblastoms und ihre prognostische Bedeutung

Hypothese 1: Innerhalb der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte zeigen die unterschiedlichen DNA-Methylierungssubgruppen signifikante prognostische Unterschiede.

Insbesondere das steigende Interesse an personalisierter Medizin in der Krebstherapie steigert die Wichtigkeit der Erforschung des molekularen

Hintergrundes des Glioblastoms und seiner Implikationen für die klinische Diagnostik, die Therapie und die prognostische Relevanz molekularer Marker. Die Klassifikation mittels *Brain Tumor Classifier* erlaubt die Unterteilung der Glioblastome in diverse epigenetische Subgruppen. Insbesondere die Erforschung der Unterteilung diffuser Gliome in IDH-mutante und IDH-Wildtyp Tumore, welche einen signifikanten prognostischen Faktor darstellt,^{31,44,69} stellte die Frage nach differentiellen klinischen Verläufen bei den epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms in den Vordergrund und macht sie zum Gegenstand aktueller Forschungsbestrebungen.^{86,137} Wie bereits beschrieben sind bei den IDH-Wildtyp-Glioblastomen die drei bei erwachsenen Patienten am häufigsten vorkommenden Subgruppen *RTK 1*, *RTK 2* und *mesenchymal*.^{24,72}

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Gesamtüberleben der drei untersuchten epigenetischen Subgruppen (*mesenchymal*, *RTK 1* und *RTK 2*) nicht signifikant unterschied (siehe Abbildung 5A). Die Subgruppe *mesenchymal* zeigte das kürzeste progressionsfreie Überleben, welches im Mittel 298 Tage betrug (siehe Abbildung 5B). Diese Subgruppe war darüber hinaus durch eine vermehrte Anzahl an Endothelzellen verbunden, was ein erhöhtes Maß an Gefäßneubildungen widerspiegeln könnte. Ein früherer bildmorphologisch gesicherter Progress bei dieser Subgruppe könnte Folge dieser, mittels MRT nachweisbaren, Gefäßproliferationen sein.

Die Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens stehen im Einklang mit einer Studie von Wick et al. aus dem Jahr 2020, welche ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens bei den drei genannten Subgruppen sahen.¹⁴⁷ Es zeigen sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der prognostischen Funktion der epigenetischen Subgruppen. Kessler et al. zeigten im Jahr 2020 eine Assoziation der *mesenchymalen* Subgruppe mit einer geringeren Tumorreinheit im Vergleich zu den Subgruppen *RTK 1* und *RTK 2* und konnten bei den beiden zuletzt genannten Subgruppen ein schlechteres Gesamtüberleben

feststellen, was auf vermehrte lymphozytäre Infiltrate zurückzuführen sein könne.^{148,149}

Darüber hinaus wurde in einer Studie von Dejaegher et al. aus dem Jahr 2021 ein Überlebensvorteil für die Subgruppe *RTK 2* beobachtet, was im Widerspruch zu den zuletzt genannten Beobachtungen steht. Diese Subgruppe zeigte ein signifikant längeres Gesamtüberleben von 27 Monaten im Vergleich zu den *mesenchymalen* Tumoren (15,5 Monate) und den Tumoren der Subklasse *RTK 1* (16 Monate). Allerdings beziehen sich die Ausführungen von Dejaegher et al. auf ein besonderes Patientenkollektiv, denn die einbezogenen Probanden erhielten sowohl eine Radiochemotherapie als auch eine Therapie mittels Vakzinierung von dendritischen Zellen. Es ist nicht abschließend zu beurteilen, inwieweit diese Vakzinierung mit einem Überlebensvorteil für die Subgruppe *RTK 2* in Verbindung steht.

Insgesamt ist die prognostische und klinische Bedeutung der epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms weitgehend unerforscht und vorliegende Daten zeigen sich zudem wie oben beschrieben widersprüchlich. Bislang wurde überwiegend der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus als ein molekularer Marker für die klinische Entscheidungs- und Therapiefindung herangezogen. Allerdings findet die Beachtung der molekularen Profile und der epigenetischen Subgruppen zunehmend Bedeutung.¹⁵⁰

4.2. Die prognostische Bedeutung bekannter klinischer Parameter

Hypothese 2: Die zur Untersuchung vorliegende GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte zeigt eine zu erwartende Überlebensverteilung hinsichtlich bekannter prognostischer Marker wie dem Resektionsausmaß, dem IDH-Status und der MGMT-Promotormethylierung.

Das Resektionsausmaß ist ein entscheidender prognostischer Faktor bei der Therapie des Glioblastoms. Obwohl diese Tumorentität ein infiltratives Wachstum in angrenzende Abschnitte des Gehirns aufweist, ist das Resektionsausmaß von höchster prognostischer Relevanz und es wird im Zuge der Therapie die Vollresektion, in Abwägung mit neu entstehenden neurologischen Defiziten, angestrebt.^{151–153} Ebenso konnte das Resektionsausmaß als unabhängig von dem MGMT-Promotorstatus und dem IDH-Mutationsstatus prognostischer Faktor identifiziert werden.¹⁵³ Eine aktuelle Studie von Drexler et al. aus dem Jahr 2022 zeigte zudem, dass von einer Komplettresektion insbesondere die epigenetischen Subgruppen RKT 1 und RKT 2 profitieren.¹⁵⁴

Jene Patienten, die einer Komplettresektion unterzogen werden konnten, wiesen das längste mittlere Überleben auf. Das kürzeste Gesamtüberleben zeigte sich bei dem geringsten untersuchten Resektionsausmaß (<90%) (siehe Abbildung 6A). Die stereotaktische Biopsie ist insbesondere von diagnostischer Relevanz, da sie die histologische und molekularpathologische Diagnostik ermöglicht. Patienten, die in Folge eines geringen präoperativen Karnofsky-Index oder durch eine ungünstige Tumorlokalisierung keiner Resektion unterzogen werden konnten und infolgedessen lediglich eine stereotaktische Biopsie erhielten, zeigten das kürzeste Gesamtüberleben, was die Bedeutung des Resektionsausmaßes als prognostischen Faktor unterstreicht.

Die aktuelle Erstlinienchemotherapie zur Behandlung des Glioblastoms, IDH-Wildtyp stellt die Therapie mit dem DNA-Alkylans Temozolomid dar.^{8,12} Im Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass insbesondere Patienten, deren Tumorgewebe einen methylierten MGMT-Promotorstatus aufwies, von dieser Therapie profitieren.¹¹ Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte gezeigt werden (siehe Abbildung 7A). Der MGMT-Promotormethylierungsstatus ist fester Bestandteil der Diagnostik diffuser Gliome und ein etablierter prognostischer

Faktor.^{11,155,156} Auch die aktuelle WHO-Klassifikation empfiehlt die Bestimmung der MGMT-Promotormethylierung aus therapeutischen Gründen.¹⁰

Kürzlich wurde in klinischen Studien gezeigt, dass nicht alle Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor von einer Therapie mit Temozolomid gleichwertig profitieren. Wick et al. zeigten im Jahr 2020 einen signifikanten Überlebensvorteil für die epigenetische Subgruppe *RTK 2* in Verbindung mit dem DNA-Alkylans. Für die Subgruppen *RTK 1* und *mesenchymal* wurde ein kürzeres Gesamtüberleben und keine prognostische Relevanz des MGMT-Promotorstatus beobachtet.¹⁴⁷ Der Zusammenhang zwischen der prognostischen Relevanz des MGMT-Promotorstatus und den epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Der deutlichste positive prognostische Effekt zeigte sich für die Subgruppe *mesenchymal*. Der Effekt wies bei dieser Subgruppe ein höheres Signifikanzniveau auf als bei Betrachtung der Gesamtkohorte (siehe Abbildung 7A und B). Bei der Subgruppe *RTK 2* wiesen n=5 Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor das kürzeste Gesamtüberleben auf. Es ist anzumerken, dass insbesondere diese Patienten aufgrund eines schlechten neurologischen Zustandes in Form eines geringeren Karnofsky-Index keine Chemotherapie erhalten hatten (siehe Abbildung 7D). Die Tatsache, dass sich für die Subgruppe *RTK 2* bei der vorliegenden Kohorte kein positiver prognostischer Zusammenhang zeigte, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die genannte therapeutische Konstellation zurückzuführen. Dennoch ist zu beschreiben, dass diese Beobachtungen – insbesondere bezüglich der Subgruppe *mesenchymal* – dem bisher beschriebenen Zusammenhang zwischen der prognostischen Relevanz des MGMT-Promotorstatus und der epigenetischen Subgruppe widersprechen.^{147,157} Die weitere Untersuchung in einer größeren und therapeutisch homogenen Kohorte stellt einen Anknüpfungspunkt für die beschriebenen Beobachtungen dar.

4.3. Copy Number Variationen und die zelluläre Zusammensetzung bei den etablierten epigenetischen Subgruppen

Hypothese 3: Copy Number Variationen und die zelluläre Zusammensetzung zeigen charakteristische Unterschiede bei den etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp.

Das charakteristische Vorkommen von Copy Number Variationen bei den methylierungsbasierten Subgruppen des Glioblastoms wurde bereits beschrieben.^{69,71,158} Im Einklang mit bislang beschriebenen Beobachtungen stand, dass innerhalb der Gruppe *RTK 2* signifikant mehr Tumore eine homozygote *CDKN2A/B*-Deletion und eine *EGFR*-Amplifikation aufwiesen als Tumoren der Gruppen *mesenchymal* und *RTK 1*. Die Subgruppe *mesenchymal* zeigten seltener eine *PTEN*-Amplifikation als Tumoren der Gruppen *RTK 1* und *RTK 2* und war grundsätzlich weniger mit CNV assoziiert als die Rezeptor-Tyrosinkinase-Phänotypen.

Darüber hinaus waren die beiden *RTK*-Subgruppen durch einen höheren Anteil an *Cancer Cells* charakterisiert als die Subgruppe *mesenchymal*, während letztere sich durch signifikant mehr Endothelzellen, *CD14*-, *CD68*-, *CD11b*- und *CD163*-positive Zellen auszeichnete und somit sowohl Makrophagen des beschriebenen *M1*- als auch des *M2*-Phänotyps vorkamen. Dass die Subgruppe *mesenchymal* einen höheren Anteil an Immunzellen aufweist, konnte bereits auf Transkriptionsebene und epigenetischer Ebene gezeigt werden.^{77,99,136,137} Auch die Subgruppe *RTK 1* zeichnete sich durch ein distinktes Tumormikromileu aus. Es fanden sich vermehrt *Glia*, *CD8-positive Zellen* und vermindert *Neurons* jeweils im Vergleich zu den anderen beiden Subgruppen.

Die beschriebenen Copy Number Variationen wurden im Folgenden mit der zellulären Zusammensetzung in Verbindung gebracht. So ging das Vorhandensein

einer homozygoten CDKN2A/B-Deletion mit einem signifikant höheren Anteil an *Cancer Cells*, *CD19*- und *CD4*-positiven Zellen sowie *Fibroblasts* und *Neurons* einher. Außerdem war der Anteil an *Glia* signifikant geringer, wenn eine homozygote CDKN2A/B-Deletion vorhanden war, was unter anderem durch einen vermehrten Anteil der Subgruppe *RTK 2* unter den Tumoren mit CDKN2A/B-Deletion zu erklären sein könnte.

Wie bereits beschrieben stellt das Glioblastom grundsätzlich einen geringgradig immunogenen Tumor dar und ist – auch wegen der immunprivilegierten Lage im ZNS – durch ein immunsuppressives Milieu geprägt. Dennoch können Subgruppen mit einem höheren oder geringeren Anteil an Immunzellen unterschieden werden und das Tumormikromilieu zeigte sich je nach epigenetischer Subgruppe charakteristisch. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in der vorliegenden Kohorte eine EGFR-Amplifikation oder eine PTEN-Deletion häufiger bei Tumoren mit geringeren Immunzellinfiltraten vorkamen. Im Falle einer EGFR-Amplifikation war der Anteil an *Cancer*, *CD19*-positiver Zellen, *CD4_Effector Cells*, *Fibroblasts* und *Neurons* signifikant erhöht. Gegenteiliges zeigte sich für die Anzahl an *Glia* und *LUMPs*. Diese Zellpopulationen wiesen bei Vorhandensein der Amplifikation einen signifikant geringeren Anteil auf. Darüber hinaus überstieg der Anteil an *LUMPs* den Anteil an *CD19*- und *CD4*-positiven Zellen im Allgemeinen. Somit konnte das Auftreten einer EGFR-Amplifikation mit weniger immunogenen Tumoren in Zusammenhang gebracht werden. Eine PTEN-Deletion ging mit einem signifikant höheren Anteil an *Cancer Cells* einher. Der Anteil an *CD14*-positiven Zellen, *CD68*-positiven Zellen und *LUMPs* war signifikant geringer, wenn eine entsprechende Deletion vorlag, was ebenfalls für immunzellärmere Tumoren sprach. Die beschriebene Assoziation zwischen EGFR-Amplifikation und PTEN-Deletion mit der Immunogenität von Tumoren konnte bereits bei weiteren Tumorentitäten, wie beispielsweise bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches, beschrieben werden. Eine Arbeit von Chakravarthy et al. aus dem Jahr 2018 zeigte

den genannten Effekt im Rahmen einer „pan-cancer“-Dekonvolution der Tumorkomposition mittels MethylCIBERSORT.¹⁴⁴

4.4. Prognostische Relevanz des Tumormikromilieus

Hypothese 4: Die zelluläre Zusammensetzung der Tumoren hat eine prognostische Relevanz innerhalb der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte.

Die prognostische Relevanz des Tumormikromilieus des Glioblastoms wird kontrovers diskutiert.^{137,159–161} Insbesondere konnte bezüglich des prognostischen Einflusses von tumorassoziierten Mikrogliazellen und Makrophagen gezeigt werden, dass ein höherer Anteil an CD68-, CD163- und CD206-positiven TAMs im Tumor mit einem längeren Patientenüberleben assoziiert war.^{131,132} Gleichmaßen wurde eine positive Assoziation von CD3- und CD8-positiven Zellinfiltraten mit dem Überleben beschrieben.^{122,127} Dies spricht für eine prognostisch positive Auswirkungen sowohl tumorassoziiertes Lymphozyten als auch tumorassoziiertes Makrophagen unterschiedlicher Polarisierungen auf das Gesamtüberleben. Im Kontrast dazu steht die Beobachtung, dass die Subgruppe *mesenchymal*, welche mit dem Tumormikromilieu in Verbindung gebracht wurde, in Studien ein kürzeres Überleben aufwies, was wiederum verdeutlicht, dass die prognostische Rolle des Tumormikromilieus nicht abschließend geklärt ist.^{99,137,150}

In der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte zeigte sich bezüglich des Gesamtüberlebens, dass ein Anteil an *Endothelial Cells*, welcher größer als der Median der Referenzgruppe war, mit einem signifikant längeren OS assoziiert war. Außerdem hatte das Tumormikromilieu prognostische Relevanz hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens. Patienten, deren Tumorgewebe mehr *CD14*-positive Zellen aufwies als der Median der Referenzgruppe, zeigten ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben. Ebenso verhielt sich die Assoziation des Anteils an *CD4_Effector* und mit dem progressionsfreien Überleben. Ebenso konnte im Rahmen einer hierarchischen Clusteranalyse ein Cluster identifiziert werden,

welches sich durch einen besonders geringen Anteil der oben genannten Immunzelltypen auszeichnete und ein längeres Gesamtüberleben aufwies. Wie oben beschrieben bleibt fraglich, inwieweit ein höherer Anteil an Immunzellen mit einem früheren bildmorphologischen Progress einhergeht bzw. diesen demaskiert.

Darüber hinaus wurde die Fragestellung untersucht, ob ein distinktes Tumormikromilieu prognostisch relevante Subgruppen innerhalb der einzelnen epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms definiert. Innerhalb der epigenetischen Subgruppe *mesenchymal* konnten Effekte auf das progressionsfreie Überleben beschrieben werden. Ein Anteil an *Fibroblasts*, welcher geringer als der Median der Referenzgruppe war, war mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert (siehe Abbildung 21U). *Glia* schienen einen positiven Effekt auf das progressionsfreie Überleben zu haben (siehe Abbildung 21V). Innerhalb der Subgruppe *RTK 2* war ein höherer Anteil an *CD14*-positiven Zellen negativ mit dem Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben assoziiert. Außerdem zeigte sich ein kürzeres progressionsfreies Überleben bei einem höheren Anteil an *CD8*-positiven Zellen und *LUMPs*.

Interessanterweise konnten, ebenfalls auf der Grundlage einer *in silico*-Dekonvolution mittels *MethylCIBERSORT*, bei pädiatrischen Hirntumoren verschiedene Immuncluster mit einer distinkten Prognose beschrieben werden. Grabovska et al. publizierten im Jahr 2020 eine Studie, die prognostisch relevante Subgruppen auf Grundlage des Tumormikromilieus bei Medulloblastomen, malignen rhabdoiden Tumoren und pädiatrischen höhergradigen Gliomen identifizierte.¹⁶² Grabovska et al. betonten in diesem Zusammenhang die Möglichkeit die globalen DNA-Methylierungsdaten sowohl im Rahmen der Tumorklassifikation als auch im Rahmen der Dekonvolution zu nutzen und somit mittels bereits vorhandener Daten prognostische Aussagen treffen zu können.¹⁶² Auch bei adulten primären Hirntumoren könnten die im Rahmen der Routinediagnostik generierten DNA-Methylierungsdaten durch zusätzliche Dekonvolution einen Mehrwert bezüglich

prognostisch relevanter Gruppen bieten. Eine im Jahr 2021 publizierte Studie von Singh et al. untersuchte die Assoziation von Copy Number Variationen mit verschiedenen Immunzellpopulationen und den molekularen Subgruppen des Glioblastoms. Die Subgruppe *mesenchymal* war mit vermehrten Infiltrationen von monozytären Zellen und neutrophilen Granulozyten verbunden und zeigte nur selten eine CDKN2A/B-Deletion. Die Subgruppe *RTK 2* zeigte ein gehäuftes Auftreten der EGFR-Amplifikation und CDKN2A/B-Deletion sowie ein Immunzellinfiltrat, welches vorwiegend von Monozyten und B-Zellen geprägt war.¹⁵⁸

Da die Expression von Immunsynapsen-Proteinen durch epigenetische Mechanismen moduliert wird und dieser Mechanismus Auswirkungen auf das Tumormikromilieu hat⁹⁶, wurden im Rahmen einer hierarchischen Clusteranalyse der DNA-Methylierungsstatus von Immunsynapsengenen an der vorliegenden Kohorte untersucht und n=3 Cluster gebildet. Eines der Cluster wurde durch die *RTK*-Phänotypen repräsentiert, während ein weiteres Cluster gänzlich der Subgruppe *mesenchymal* entsprach. Es konnte allerdings keine Assoziation der untersuchten Cluster mit einem differentiellen Gesamtüberleben gefunden werden, wie durch die einleitend aufgeführte Arbeit von Berglund et al. aus dem Jahr 2020 beschrieben wurde.⁹⁶

4.5. „Reine“ und „gemischte“ epigenetische Subgruppen: Ihre prognostische Relevanz und Bedeutung für das Tumormikromilieu

Hypothese 5: „Reine“ und „gemischte“ epigenetische Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp zeigen prognostische Unterschiede und eine differentielle zelluläre Zusammensetzung.

Die Version 11b4 des *Brain Tumor Classifiers* vergibt bis zu drei verschiedene epigenetische Subklassen für ein zu klassifizierendes Tumorsample.⁷² Diejenige Subklasse, die den höchsten Calibrated Score erreichte, entsprach der Subklasse

1. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumoren, wie bereits oben beschrieben, in *reine* und *gemischte* Tumoren unterteilt, je nach Anzahl der vergebenen Subklassen, die einen Tumor beschreiben (siehe Abbildung 17). Die durchgeführten Hauptkomponentenanalysen (siehe Abbildung 16A und 26) sowie die t-SNE-plots basierend auf den 10.000 most variable CpG-sites (siehe Abbildung 27) verdeutlichten, dass es Überschneidungen innerhalb der drei untersuchten epigenetischen Subgruppen gibt. Insbesondere jene Samples, denen eine Methylierungssubgruppe 1 und 2 zugeordnet werden konnte, zeigten in dem t-SNE Ähnlichkeiten zu den beiden zugrundeliegenden epigenetischen Subgruppen. In der hierarchischen Clusteranalyse wurden im Besonderen Cluster gebildet, die sowohl durch die Subgruppe *mesenchymal* als auch durch die Subgruppe *RTK 2* charakterisiert waren (siehe Abbildung 16B).

Die zeitliche und räumliche Heterogenität molekularer Subgruppen innerhalb eines Tumors ist Gegenstand aktueller Studien.^{163–166} In einer Studie von Wenger et al. aus dem Jahr 2019 wurden bei n=12 Glioblastompatienten jeweils drei bis vier verschiedene entnommene Biopsien des gleichen Tumors und deren DNA-Methylierungsprofil untersucht. Während die Methylierungsklasse bei den Proben des gleichen Tumors übereinstimmte, zeigte sich bei fünf der untersuchten Tumoren eine Diskrepanz bezüglich der Methylierungssubklasse. Ein Teil der Tumoren zeigte ein höheres Maß an Heterogenität innerhalb eines Tumors als zwischen den unterschiedlichen Tumoren.¹⁶³ Dass die intratumorale Heterogenität das Ausmaß der intertumoralen Heterogenität überschreiten kann, konnte in einer weiteren Studie auch auf der Genexpressionsebene gezeigt werden.¹⁶⁷ Verburg et al. erklärten die intratumorale Heterogenität der Subgruppen des Glioblastoms durch ein unterschiedliches Ausmaß an Tumorreinheit. In der 2021 publizierte Studie wurden 133 Biopsien von 16 Patienten mit diffusen Gliomen untersucht. Es erfolgte die DNA-methylierungsbasierte Klassifikation und die Autoren konnten zeigen, dass die epigenetischen Subgruppen in den meisten Tumoren konstant zwischen den extrahierten Proben waren. Jedoch zeigte sich bei einem Teil der Tumorproben die

Koexistenz der Subgruppen *RTK 2* und *mesenchymal* innerhalb desselben Tumors, was in diesem Zusammenhang durch die unterschiedliche *tumor purity* bzw. Tumorreinheit erklärt wurde.¹⁶⁴

Die oben genannten Erkenntnisse bezüglich der intratumoralen Heterogenität werden zudem durch eine aktuelle Studie von Gempt et al. aus dem Jahr 2022 unterstützt.¹⁶⁸ Bei 39% der untersuchten Patienten (n=238 Samples von n=56 Patienten) zeigte die DNA-methylierungsbasierte Klassifikation nach Ceccarelli et al.³⁵ die Zuordnung von Tumorsamples zu unterschiedlichen epigenetischen Subgruppen. Zwei gemischte epigenetische Subgruppen waren prädominant, darunter der gemischte Subtyp *classic-/mesenchymal-like*.¹⁶⁸ Dies entspricht der in dieser Arbeit untersuchten gemischten Subgruppe *RTK2, mesenchymal*, deren Bezeichnung auf dem Brain Tumor Classifier nach Capper et al. beruht.²⁴ Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere das gemeinsame Auftreten der Subgruppen *RTK 2* und *mesenchymal* beschrieben. Dieses Zeichen der intratumoralen Heterogenität wurde bereits durch mehrere Autoren sowohl auf Transkriptions- als auch auf DNA-Methylierungsebene beschrieben und lässt eine ähnliche Tumorbilogie dieser Subgruppen vermuten.^{83,164}

Interessanterweise konnten bei den *reinen* und *gemischten* Subgruppen Unterschiede hinsichtlich des klinischen Verlaufes, der zellulären Zusammensetzung sowie der Copy Number Variationen beobachtet werden. Dabei wurde sich im Besonderen auf die Charakteristika der *reinen* Subgruppen und die Bedeutung der Koexistenz der Subgruppen *mesenchymal* und *RTK 2* fokussiert.

Es zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil für die Subgruppe *mesenchymal* gegenüber der Subgruppe *RTK 2*. Darüber hinaus war das Gesamtüberleben der Subgruppe *mesenchymal* länger als das der Subgruppe *RTK 1* und die Subgruppe *RTK 1* überlebte wiederum länger als die Subgruppe *RTK 2*. Nur der zuerst genannte Effekt erwies sich als signifikant. Bezüglich des progressionsfreien Überlebens zeigte sich ein Vorteil für die Gruppe *RTK 1* im Vergleich zu der Gruppe

RTK 2 (siehe zu diesem Abschnitt Abbildung 18 sowie Tabellen 16 und 17). Die alleinige Analyse der *reinen* Subgruppen zeigte im Gegensatz zu der Betrachtung der Gesamtkohorte einen Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens. Ein *mesenchymaler* Phänotyp schien positiv mit dem Überleben charakterisiert zu sein. Es ist hinzuzufügen, dass die Subgruppe *RTK 2* mit dem kürzesten Überleben eine sehr kleine Stichprobenanzahl von n=3 aufwies und einen schlechteren präoperativen Karnofsky-Index zeigte. Dennoch waren die beiden weiteren Subgruppen klinisch vergleichbar und zeigten ein distinktes Überleben.

Im Folgenden wurden die Subgruppen *mesenchymal* und *RTK 2* hinsichtlich ihrer *reinen* und *gemischten* Phänotypen analysiert, um zu untersuchen, ob ein Anteil einer spezifischen Subgruppe in einem gemischten Tumor sich ähnlich auf das Überleben, die zelluläre Zusammensetzung und die Copy Number Variationen auswirkte, wie bei den reinen Subgruppen und der Gesamtkohorte bereits beschrieben wurde.

Innerhalb der Subgruppe *mesenchymal*, die unter den *reinen* Subgruppen das längste Überleben aufwies, wirkte sich ein Anteil der Subgruppe *RTK 2* bei dem *gemischten* Phänotyp negativ auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben aus. *Gemischte* Tumoren waren mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert als *reine* Tumoren (ohne Signifikanz zu erreichen) (siehe Abbildung 19A und B). Auch bezüglich der Copy Number Variationen führte der *gemischte* Phänotyp Eigenschaften der Subgruppe *RTK 2* mit sich und zeigte signifikant häufiger eine EGFR-Amplifikation. Darüber hinaus wies dieser Phänotyp, wie auch für die Subklasse *RTK 2* beschrieben, mehr *Cancer Cells* sowie weniger Immunzellen (in Form von *CD14*-positiven Zellen und *LUMPs*) auf. Der gemischte Phänotyp weist somit Charakteristika sowohl der Subgruppe *mesenchymal* als auch der Subgruppe *RTK 2* auf und ist darüber hinaus mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert zu sein.

Die weitere Betrachtung der Subgruppe *RTK 2* sowie ihres *reinen* und ihrer *gemischten* Phänotypen unterstütze die These, dass die Subklassen bei den gemischten Phänotypen eine prognostische Relevanz besitzen. So wies die reine epigenetische Subgruppe *RTK 2* ein kürzeres Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben auf als die gemischten epigenetischen Subgruppen. Patienten, mit dem *gemischten* Phänotyp *RTK 2, RTK 1* überlebten länger als der *reine* Phänotyp und Patienten mit dem *gemischten* Phänotyp *RTK 2, mesenchymal* überlebten wiederum länger, entsprechen der Effekte, die sich bereits bei den *reinen* Subgruppen hervorhoben (siehe Abbildung 22A und B). Zu diskutieren sind in diesem Zusammenhang wiederum die klinischen Charakteristika der reinen Subgruppe, die bereits beschrieben wurden. Dennoch war auch das Überleben der beiden *gemischten* Phänotypen unterschiedlich, die klinisch vergleichbar waren.

Abschließend stellt sich die Frage, ob die Subgruppe *RTK 1* eine eigene Entität darstellt, während bei den Subgruppen *RTK 2* und *mesenchymal* ein Kontinuum je nach *reinem* und *gemischtem Phänotyp* zu vermuten ist, was sich in dem klinischen Verlauf und der zellulären Zusammensetzung widerspiegelte. Die dargestellten Hauptkomponentenanalysen wiesen ebenfalls darauf hin, dass die Subgruppe *RTK 1* eher einen eigenen Phänotyp darstellt (siehe Abbildungen 18C und 26). In der vorliegenden Kohorte war bei den gemischten Phänotypen ein Anteil der Subgruppe *RTK 2* negativ und ein Anteil der Subgruppe *mesenchymal* positiv mit dem Überleben assoziiert. Diese Assoziation konnte, wie beschrieben, auch im Zusammenhang mit der prognostischen Relevanz des MGMT-Promotormethylierungsstatus gezeigt werden.

4.6. Ein Vergleich der Versionen v11b4 und v12.3 des Brain Tumor Classifiers

Hypothese 6: Die etablierte Version des Brain Tumor Classifiers v11b4 und die experimentelle Version v12.3 zeigen konstante Ergebnisse bezüglich der Tumorklassifikation.

Die DNA-methylierungsbasierte Klassifikation diffuser Gliome mittels *Brain Tumor Classifier* findet Anwendung in der neuropathologischen Diagnostik und stellt eine Ergänzung zu den etablierten Methoden der Histologie oder der Immunhistochemie dar.^{24,169,170} Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Verwendung des Brain Tumor Classifiers die Diagnose der meisten ZNS-Tumoren mit hinreichender Sicherheit und in Zusammenspiel mit der entsprechenden Histologie und immunhistochemischen Diagnostik ermöglicht.^{25,169,171} Die Molekularpathologie ist seither ein wichtiges Instrument, um insbesondere schwierig zu klassifizierende Tumoren zu diagnostizieren und um Fehldiagnosen zu vermeiden.¹⁷⁰ Dies zeigte sich neben der Diagnostik von adulten Hirntumoren auch bei der Diagnostik von pädiatrischen Tumoren. Die Implementierung der DNA-Methylierungsanalyse in der neuropathologischen Diagnostik ermöglichte in einer Studie von Pages et al. bei 71% der Tumoren eine Diagnosefindung mittels Molekularpathologie.¹⁷² Jedoch sind bei der Anwendung der Klassifizierung basierend auf DNA-Methylierungsmustern ebenso die Histologie und konventionellen molekularen Testungen weiterhin von hoher Relevanz, sodass die aktuelle WHO-Klassifikation die Zuordnung des zu untersuchenden Tumors zu der Methylierungsklasse *Glioblastom, IDH-Wildtyp* als wünschenswertes, aber nicht essenzielles Kriterium im Rahmen der Glioblastom-Diagnostik darstellt. Neben der Version 11b4, deren Methylierungsklassen der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegen, ist seit Ende des Jahres 2021 ebenfalls die Version 12.3 verfügbar.⁷² Diese beinhaltet weitere Methylierungsklassen und -subklassen und ist an die 5. Version der WHO-Klassifikation angelehnt.¹⁰ Entsprechend der Vorgängerversion werden bei der Version 12.3 ebenfalls mehrere Methylierungsklassen ausgegeben. Diese stimmen für die Glioblastome, IDH-

Wildtyp im Wesentlichen mit der vorherigen Version überein. Es findet sich eine zusätzliche Unterteilung in *adult-type* und *pediatric-type* analog zu der WHO-Klassifikation.

Alle Samples, welche in der Version 11b4 einen Calibrated Score von $>0,84$ bezüglich der Methylierungssubklasse 1 (*mesenchymal*, *RTK 1* oder *RTK 2*) erhielten, wurden durch die Version 12.3 der gleichen Methylierungssubklasse zugeordnet. Diejenigen Samples, welche in der Version 11 einen Calibrated Score $<0,84$ aufwiesen, erhielten auch durch die Version 12 einen niedrigeren Calibrated Score. Dies verdeutlicht die Konsistenz der Methylierungsklassen bei einem hinreichend hohen Calibrated Score. Es zeigte sich eine Diskrepanz bezüglich der Classifier-Versionen bei Samples mit einem Calibrated Score $< 0,84$. Interessanterweise wurde ein Großteil der Samples, welche in der Version 11b4 mit einem niedrigen CS der Subklasse *mesenchymal* zugeordnet wurde, in der Version 12.3 in die Subklasse *RTK 2* eingeteilt. Diese Tatsache unterstützt die These, dass die Subklassen *mesenchymal* und *RTK 2* eine ähnliche Tumorbilogie besitzen, bzw. dass Unterschiede in deren Methylierungsprofilen ein Kontinuum zwischen den beiden Subklassen darstellen, die mit einem unterschiedlichen klinischen Verlauf und Tumormikromilieu einher gehen könnten. Die Klassifikation der Subklasse *RTK 1* blieb mit Ausnahme zweier Samples konstant (siehe Abbildung 28). Zudem können globale DNA-Methylierungsdaten in dimensionsreduzierenden Darstellungen wie dem t-SNE (T-Distributed Stochastic Neighbour Embedding) und UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection) visualisiert werden.^{173,174} Im Falle eines niedrigen Calibrated Scores und einer unsicheren Diagnose zeigte sich ein Zugewinn an Information durch die Nutzung der oben genannten Methoden zur dimensionsreduzierten Visualisierung von multidimensionalen Daten, wie zum Beispiel DNA-Methylierungsdaten. Tumoren, deren DNA-Methylierungsmuster sich ähneln, werden in dieser Darstellung in räumlicher Nähe dargestellt. Dies kann bei schwierig zu klassifizierenden Samples, neben der Klassifizierung mittels *Brain Tumor Classifier*, wichtige Hinweise zu der Diagnosefindung beitragen.¹⁷⁵

5. Ausblick

Epigenetische Subgruppen sowie die DNA-methylierungsbasierte Klassifikation diffuser Gliome gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Etablierte molekulare Marker sind ein elementarer Bestandteil der neuropathologischen Diagnostik und finden in klinischen und therapeutischen Fragestellungen Anwendung. So ist das Vorliegen einer IDH-Mutation von höchster prognostischer Relevanz²⁸ und der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus ein entscheidender Faktor für das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Temozolomid.¹¹

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die klinische Bedeutung epigenetischer Subgruppen. Zwar zeigten die drei etablierten Subgruppen *mesenchymal*, *RTK 1* und *RKT 2* keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens, jedoch konnten bei den *reinen* und *gemischten* epigenetischen Subgruppen Unterschiede hinsichtlich des klinischen Verlaufes demonstriert werden. Die Bedeutung der ersten und zweiten Methylierungssubgruppe ist bisher weitgehend unerforscht. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen jedoch die Wichtigkeit ihrer weiteren Untersuchung im Sinne einer genaueren Charakterisierung und Betrachtung der prognostischen Relevanz in einer größeren Kohorte als der hier untersuchten. Gegenstand weiterer Forschungsbestrebungen könnte unter anderem das Ansprechen der reinen und gemischten Subgruppen auf unterschiedliche Therapieformen sein. Zudem könnte die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung der untersuchten epigenetischen Gruppen ein Ziel für neue Therapien sein oder Subgruppen definieren, welche unterschiedlich auf Therapien ansprechen. Im Sinne einer personalisierten Medizin, könnte somit vor Therapiebeginn eine Prognose hinsichtlich des Ansprechens auf eine Therapieform auch auf Grundlage der zellulären Zusammensetzung des jeweiligen Tumors beruhen.

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die prognostische Relevanz des MGMT-Promotormethylierungsstatus bei den drei untersuchten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp divergiert. Eine detaillierte Untersuchung in einer größeren und therapeutisch homogeneren Kohorte (insbesondere hinsichtlich der Therapie mittels Chemotherapie) stellt einen Anknüpfungspunkt für die beschriebenen Beobachtungen dar.

Darüber hinaus wurde insbesondere die Koexistenz der beiden Subgruppen *mesenchymal* und *RTK 2* beschrieben und analysiert. Bei den *gemischten* epigenetischen Subgruppen wurde ein positiver prognostischer Effekt der Subgruppe *mesenchymal* und ein negativer prognostischer Effekt der Subgruppe *RTK 2*, sowohl auf das Gesamt- als auch auf das progressionsfreie Überleben, gezeigt. Dies rückt die Frage nach der intratumoralen Heterogenität des Glioblastoms und deren klinischen Bedeutung in den Mittelpunkt, welche Gegenstand aktueller Forschung sind.^{83,163,166,168} Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen wären Studien zu der Untersuchung einer differentiellen Tumorbilogie der Subgruppen *RTK 2* und *mesenchymal* sowie deren „reinen“ und „Mischformen“ von großem Interesse. Es stellt sich ebenso die Frage, ob die genaue epigenetische Charakterisierung des Glioblastoms zukünftig die Untersuchung mehrerer Proben desselben Tumors bedarf und Einfluss auf therapeutische Entscheidungen nehmen wird.

Die untersuchten DNA-Methylierungsdaten beziehen sich zudem auf circa 850.000 Methylierungssites, welche sicherlich lediglich eine Teilmenge aller möglicherweise differentiellen Methylierungssites darstellen. Zu dem genaueren Verständnis und zu der detaillierteren Charakterisierung der (etablierten) epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms wäre in Zukunft die Untersuchung von weiteren Methylierungssites interessant, die über die Kapazitäten des verwendeten EPIC-Arrays hinausgehen.

6. Zusammenfassung

Epigenetische Subgruppen diffuser Gliome zeichnen sich durch ein differentielles DNA-Methylierungsmuster und genetische Signaturen aus. Sie werden durch ein unterschiedliches Tumormikromilieu und charakteristische Copy Number Variationen gekennzeichnet. Darüber hinaus gewinnt die DNA-methylierungsbasierte Klassifikation zunehmend an Relevanz in der neuropathologischen Diagnostik und molekulare Marker, wie die IDH-Mutation oder der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, sind von wachsendem therapeutischen Interesse. Die prognostische Relevanz DNA-methylierungsbasierter Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp ist bislang weitgehend unerforscht, was die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellt.

Es wurden epigenetische und genetische Signaturen von n=500 Tumorproben mit klinischen Parametern, wie dem Gesamtüberleben, dem progressionsfreien Überleben oder dem Resektionsausmaß, in Beziehung gesetzt. Globale DNA-Methylierungsdaten, die im Zeitraum von Januar 2017 bis Juli 2021 im Rahmen der neuropathologischen Diagnostik durch die 850k-Methylierungsanalyse generiert wurden, wurden bioinformatisch aufgearbeitet und analysiert. Die zelluläre Zusammensetzung der Tumorproben wurde sowohl mithilfe von *in silico*-Dekonvolutionen als auch anhand von immunhistochemischen Färbungen an FFPE-Gewebe untersucht.

Die drei etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms *RTK 1*, *RTK 2* und *mesenchymal* zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Das Resektionsausmaß war positiv mit dem Überleben assoziiert. Der MGMT-Promotorstatus war in der untersuchten Kohorte insbesondere bei der epigenetischen Subgruppe *mesenchymal* von prognostischer Relevanz. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Copy Number-Variationen und einem differentiellen Tumormikromilieu gezeigt werden. Im Besonderen ging das Auftreten einer EGFR-Amplifikation oder einer PTEN-Deletion

mit einem geringeren Anteil an Immunzellen (LUMPs und CD14-positiven Zellen) und einem größeren Anteil an Cancer Cells einher. Darüber hinaus zeigte das Tumormikromilieu eine prognostische Relevanz. Endothelzellen waren in der GBM,-IDH-Wildtyp-Kohorte positiv mit dem Gesamtüberleben assoziiert, während CD14-positive Zellen, CD4-Effektor-Zellen, Fibroblasten und LUMPs negativ mit dem progressionsfreien Überleben assoziiert waren. Innerhalb der Subgruppe *RTK 2* konnte ein Überlebensnachteil für Patienten mit einem höheren Anteil an CD14-positiven Zellen beobachtet werden.

Interessanterweise konnten bei den *reinen* und *gemischten* epigenetischen Subgruppen Unterschiede hinsichtlich des klinischen Verlaufes, der zellulären Zusammensetzung sowie der Copy Number-Variationen beobachtet werden. Diesbezüglich wurde sich im Besonderen auf die Besonderheiten der *reinen* Subgruppen und die Bedeutung der Koexistenz der Subgruppen *mesenchymal* und *RTK 2* fokussiert. Die Analyse der *reinen* epigenetischen Subgruppen zeigte ein differentielles Gesamtüberleben, allerdings ohne Signifikanz zu erreichen. Bei den *gemischten* epigenetischen Subgruppen wurde ein positiver prognostischer Effekt der Subgruppe *mesenchymal* und ein negativer prognostischer Effekt der Subgruppe *RTK 2*, sowohl auf das Gesamt- als auch auf das progressionsfreie Überleben, beschrieben. Die *gemischten* Subgruppen wiesen Charakteristika (CNV und zelluläre Zusammensetzung) der beteiligten *reinen* Subgruppen auf. Insbesondere die Subklassen *RTK 2* und *mesenchymal* traten gehäuft gemeinsam auf, unterschieden sich jedoch deutlich hinsichtlich CNV und Tumormikromilieus. Dies stellt das Bestreben eines genaueren Verständnisses der molekularen Pathogenese des Glioblastoms und seiner epigenetischen Subgruppen in den Fokus.

7. Abstract

Epigenetic subgroups of diffuse gliomas are characterised by differential DNA methylation patterns and genetic signatures. They are described by a different tumour microenvironment and characteristic copy number variations. In addition, DNA methylation-based classification gains increasing relevance to neuropathological diagnostics and molecular markers, such as IDH mutation or MGMT promoter methylation status, which are of a certain therapeutic interest. To this day, the prognostic relevance of methylation-based subgroups of glioblastoma, IDH wild-type is largely unexplored, which provides the basis of this thesis.

Epigenetic and genetic signatures of n=500 tumor samples were correlated with clinical parameters, such as overall survival, progression-free survival, or extent of resection. Global DNA methylation data was generated from January 2017 to July 2021 as part of neuropathological diagnostics. 850k-DNA-methylation data was bioinformatically processed and analyzed. The cellular composition of tumor samples was examined using both in silico deconvolution and immunohistochemical staining on FFPE tissue.

In terms of overall survival, the three established epigenetic subgroups of glioblastoma *RTK 1*, *RTK 2* and *mesenchymal* did not show significant differences. Extent of resection was positively associated with overall survival. The MGMT promoter status was of prognostic relevance in this cohort, especially in the epigenetic subgroup *mesenchymal*. A correlation between the presence of copy number variations and a differential tumour microenvironment was shown. Specifically, the presence of EGFR amplification or PTEN deletion was associated with a lower proportion of immune cells (LUMPs and CD14-positive cells) and a higher proportion of cancer cells. In addition, the tumour microenvironment showed prognostic relevance. Endothelial cells were positively associated with overall survival, while CD14-positive cells, CD4 effector cells, fibroblasts and LUMPs were negatively associated with progression-free survival. Within the RTK 2 subgroup, a

survival disadvantage was observed for patients with a higher proportion of CD14-positive cells.

Interestingly, differences in the clinical course, tumour cell composition and copy number variations were observed analysing *pure* and *mixed* subgroups. In particular, features of the *pure* subgroups and the significance of the coexistence of the *mesenchymal* and *RTK 2* phenotypes were investigated. *Pure* epigenetic subgroups showed differential overall survival, but without significant differences. For *mixed* epigenetic subgroups, a positive prognostic effect of the *mesenchymal* phenotype and a negative prognostic effect of the *RTK 2* phenotype on overall and progression-free survival were described. The *mixed* subclasses represented characteristics (CNV and tumour cell composition) of the phenotypes involved. In particular, the *RTK 2* and *mesenchymal* subclasses occurred simultaneously, but differed significantly in terms of CNV and tumour microenvironment, which highlights the quest for a more detailed understanding of the molecular pathogenesis of glioblastoma and its epigenetic subgroups.

8. Verzeichnisse

8.1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Copy Number Variationen-Profil eines Glioblastoms, IDH-Wildtyp ⁷²</i>	- 33 -
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der 850k-Kohorte sowie der Ein- und Ausschlusskriterien</i>	- 41 -
<i>Abbildung 3: Überlebenszeitanalysen unter Darstellung der Kaplan-Meier-Kurven und der entsprechenden statistischen Daten nach epigenetischen Subgruppen und klinischen Parametern</i>	- 46 -
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte sowie der Ein- und Ausschlusskriterien</i>	- 48 -
<i>Abbildung 5: Überlebenszeitanalysen nach epigenetischer Subgruppe und entsprechende statistische Daten (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte)</i>	- 53 -
<i>Abbildung 6: Überlebenszeitanalysen (GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte) nach klinischen Parametern und entsprechende statistische Daten</i>	- 56 -
<i>Abbildung 7: Überlebenszeitanalysen nach MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und entsprechende statistische Daten</i>	- 59 -
<i>Abbildung 8: Darstellung der prozentualen Anteile der jeweiligen Copy Number Variationen bei den epigenetischen Subgruppen</i>	- 62 -
<i>Abbildung 9: Zelluläre Zusammensetzung der etablierten epigenetischen Subgruppen des Glioblastoms, IDH-Wildtyp</i>	- 65 -
<i>Abbildung 10: Darstellung des Zellanteils der Immunzellen (erhoben durch immunhistochemische Untersuchungen) mittels Boxplots</i>	- 68 -
<i>Abbildung 11: Darstellung der (linearen) Zusammenhänge zwischen LUMPs und immunhistochemisch untersuchten Mikroglia- und Makrophagenmarkern (A-E) sowie zwischen CD14-positiven Zellen und immunhistochemisch untersuchten Mikroglia- und Makrophagenmarkern (F-J)</i>	- 70 -
<i>Abbildung 12: Darstellung der Zusammenhänge zwischen untersuchten Copy Number Variationen und der zellulären Zusammensetzung mittels Boxplots</i>	- 74 -
<i>Abbildung 13: Darstellung der Assoziation der Zellpopulationen mit dem Gesamtüberleben (A-I) und dem progressionsfreien Überleben (J-R) mittels Kaplan-Meier-Kurven sowie entsprechende statistische Daten bei statistischer Signifikanz</i>	- 80 -
<i>Abbildung 14: A: hierarchische Clusteranalyse der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte basierend auf allen mittels MethylCIBERSORT-Algorithmus erhobenen Zellpopulationen und Darstellung vier verschiedener Cluster in repräsentativen Farben, B: Kaplan-Meier-Überlebenskurven basierend auf dargestellten Clustern</i>	- 82 -
<i>Abbildung 15: A: hierarchische Clusteranalyse der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte basierend auf ausgewählten Zellpopulationen und farbliche Darstellung fünf verschiedener Cluster, B: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der dargestellten Cluster, C: Kaplan-Meier-Kurven (Cluster 1 und 4, OS), Kaplan-Meier-Kurven (Cluster 1 und 4, PFS), E: Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf den Anteilen an CD4_Eff, Fibroblast, CD14 und endothelial, farbliche Darstellung der Cluster, F: Hauptvektoren der PCA, G: Darstellung der Gruppenunterschiede (Cluster 1 und 4) bzgl. der einbegriffenen Zellpopulationen mittels Boxplots,</i>	- 84 -
<i>Abbildung 16: Ergebnisse der RnBeads-Analyse</i>	- 87 -
<i>Abbildung 17: Übersichtsdarstellung der Zusammensetzung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte nach reinen (markiert durch *) und gemischten Subgruppen mittels Sankey-Diagramms</i>	- 88 -
<i>Abbildung 18: A: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem Gesamtüberleben der reinen epigenetischen Subgruppen, B: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem progressionsfreien Überleben der reinen epigenetischen Subgruppen, C: PCA basierend auf den 10.000 most variable CpG Sites</i>	- 91 -
<i>Abbildung 19: Subgruppe mesenchymal (reine und gemischten Samples)</i>	- 95 -

Abbildung 20: Darstellung der zellulären Zusammensetzung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (mesenchymal) mittels Boxplots	- 96 -
Abbildung 21: Darstellung der Assoziation der Copy Number Variationen und der Zellpopulationen mit dem OS (A-L) und dem PFS (M-X) mittels Kaplan-Meier-Kurven und der entsprechenden statistischen Daten	- 100 -
Abbildung 22: Subgruppe RTK 2 aufgeteilt nach reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (RTK 2): A: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem Gesamtüberleben sowie statistische Parameter, B: Kaplan-Meier-Kurven basierend auf dem progressionsfreien Überleben sowie statistische Parameter	- 103 -
Abbildung 23: Verteilung der Copy Number Variationen nach reiner und gemischten Subgruppen (RTK 2)	- 104 -
Abbildung 24: Darstellung der Zellanteile mittels Boxplots,	- 106 -
Abbildung 25: Darstellung der Assoziation der Zellpopulationen mit dem OS (A-H) und dem PFS (I-P) mittels Kaplan-Meier-Kurven	- 109 -
Abbildung 26: Hauptkomponenten-Analyse basierend auf allen untersuchten CpG-Sites unter Darstellung der verschiedenen reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (A) sowie unter Darstellung der Gesamtheit der reinen und gemischten Samples (unabhängig von ihrer epigenetischen Subgruppe) (B)	- 112 -
Abbildung 27: t-SNE Plots basierend auf den 10.000 most variable CpG-Sites	- 114 -
Abbildung 28: Schematische Gegenüberstellung der Zuordnung der Samples zu einer Methylierungsklasse basierend auf den Versionen 11 und 12 des Brain Tumor Classifiers	- 116 -
Abbildung 29: DNA-Methylierungsstatus von Immunsynapsengenen	- 118 -

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunsynapsengene und ihre Funktionen nach Berglund et al. ⁹⁶	- 24 -
Tabelle 2: Output des Brain Tumor Classifiers (exemplarisch für ein Glioblastom, IDH-Wildtyp)	- 31 -
Tabelle 3: Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen	- 37 -
Tabelle 4: Charakterisierung der 850k-Kohorte nach klinischen und neuropathologischen Parametern	- 43 -
Tabelle 5: Deskriptive Charakterisierung der GBM, IDH-Wildtyp-Kohorte nach epigenetischen Subgruppen, klinischen und neuropathologischen Parametern	- 50 -
Tabelle 6: Deskriptive Charakterisierung der EPIC-TMA-Kohorte und Darstellung der erhobenen klinischen und neuropathologischen Parameter	- 52 -
Tabelle 7: Vorkommen der Copy Number Variationen bei den epigenetischen Subgruppen in absoluten Zahlen	- 61 -
Tabelle 8: tabellarische Darstellung der Unterschiede zwischen den epigenetischen Subgruppen bezüglich des Vorkommens von Copy Number Variationen	- 61 -
Tabelle 9: Darstellung statistischer Unterschiede bzgl. der Zellzusammensetzung	- 66 -
Tabelle 10: Übersicht des Medians der Zellpopulationen in den epigenetischen Subgruppe	- 67 -
Tabelle 11: statistische Unterschiede bzgl. der Zellzusammensetzung zwischen den epigenetischen Subgruppen	- 69 -
Tabelle 12: Median der untersuchten Zellpopulationen in den Subgruppen	- 69 -
Tabelle 13: Darstellung der jeweiligen Zellanteile (Median) in Abhängigkeit von den untersuchten Copy Number Variationen sowie Darstellung von Gruppenunterschieden bzw. der entsprechenden p-Werte	- 76 -
Tabelle 14: Median des jeweiligen Zellanteils bei den Clustern 1 und 4	- 85 -
Tabelle 15: Charakterisierung der reinen epigenetischen Subgruppen nach klinischen und neuropathologischen Parametern	- 90 -
Tabelle 16: Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens der reinen Subgruppen	- 92 -
Tabelle 17: Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich des progressionsfreien Überlebens der reinen Subgruppen	- 92 -
Tabelle 18: Charakterisierung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (mesenchymal) nach klinischen Parametern	- 94 -
Tabelle 19: Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich der CNV	- 94 -
Tabelle 20: Statistische Unterschiede bzgl. der Zellzusammensetzung zwischen den Subgruppen	- 97 -
Tabelle 21: Charakterisierung der reinen und gemischten epigenetischen Subgruppen (RTK 2) nach klinischen Parametern	- 102 -
Tabelle 22: tabellarische Darstellung der Gruppenunterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens der reinen und gemischten Subgruppen (RTK 2)	- 103 -
Tabelle 23: Gruppenunterschiede bezüglich des progressionsfreien Überlebens der reinen und gemischten Subgruppen (RTK 2)	- 104 -
Tabelle 24: absolute Häufigkeiten der Copy Number Variationen	- 105 -
Tabelle 25: Gruppenunterschiede bzgl. des Auftretens von Copy Number Variationen	- 105 -
Tabelle 26: Statistische Unterschiede bzgl. der Zellanteile zwischen den Subgruppen	- 107 -

8.3. Abkürzungsverzeichnis

ATRX	Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centre for Disease Control
CDKN2A/B	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B
c-IMPACT-NOW	Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Officially WHO
CNV	Copy Number Variation
CS	Calibrated Score
CSG	Co-Stimulierende Gene
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GBM	Glioblastom
G-CIMP	Glioma CpG-Island Methylator Phenotype
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GTDS	Gießener Tumordokumentationssystem
H	Histon
IBA1	Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1
ICG	Immuncheckpointgen
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
KM	Kontrastmittel
LOH	Loss of Heterozygosity
LUMP	Leukocyte Unmethylation For Purity
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
NCI	National Cancer Institute

NF1	Neurofibromatose Typ 1
OS	Overall Survival
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor A
PFS	Progression Free Survival
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RNA	Ribonucleic Acid
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STX	Stereotaxie
TAMs	Tumorassoziierte Makrophagen
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TMA	Tissue Micro Array
t-SNE	t-distributed Stochastic Neighbour Embedding plots
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.4. Literaturverzeichnis

1. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, et al. *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Robert Koch-Institut; 2021. doi:10.25646/8353
2. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-Oncol*. 2020;22(Supplement_1):iv1-iv96. doi:10.1093/neuonc/noaa200
3. Ostrom QT, Cote DJ, Ascha M, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Adult Glioma Incidence and Survival by Race or Ethnicity in the United States From 2000 to 2014. *JAMA Oncol*. 2018;4(9):1254-1262. doi:10.1001/jamaoncol.2018.1789
4. Ostrom QT, Francis SS, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2021;21(12):68. doi:10.1007/s11910-021-01152-9
5. Wrensch M, Lee M, Miike R, et al. Familial and Personal Medical History of Cancer and Nervous System Conditions among Adults with Glioma and Controls. *Am J Epidemiol*. 1997;145(7):581-593. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009154
6. GliomaScan Consortium, Melin BS, Barnholtz-Sloan JS, et al. Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nat Genet*. 2017;49(5):789-794. doi:10.1038/ng.3823
7. Labreche K, Kinnersley B, Berzero G, et al. Diffuse gliomas classified by 1p/19q co-deletion, TERT promoter and IDH mutation status are associated with specific genetic risk loci. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018;135(5):743-755. doi:10.1007/s00401-018-1825-z
8. Wick W. *Gliome, S2k-Leitlinie, 2021*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie; 2021. Accessed February 6, 2022. www.dgn.org/leitlinien
9. Osswald M, Jung E, Sahm F, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*. 2015;528(7580):93-98. doi:10.1038/nature16071
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *CENTRAL NERVOUS SYSTEM TUMOURS*. WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2022.
11. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330
13. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):e315-e329. doi:10.1016/S1470-2045(17)30194-8
14. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1027-1037. doi:10.1056/NEJMoa1611977
15. Zülch KJ. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*.

WHO; 1979.

16. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System.*; 1993.

Accessed February 5, 2022. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-84988-6>

17. Kleihues P, International Agency for Research on Cancer, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. IARC Pr; 2000.

18. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4

19. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1

20. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018;136(5):805-810. doi:10.1007/s00401-018-1913-0

21. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2020;139(3):603-608. doi:10.1007/s00401-020-02127-9

22. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol*. 2021;23(8):1231-1251. doi:10.1093/neuonc/noab106

23. Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, et al. Molecular Classification of Low-Grade Diffuse Gliomas. *Am J Pathol*. 2010;177(6):2708-2714. doi:10.2353/ajpath.2010.100680

24. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 2018;555(7697):469-474. doi:10.1038/nature26000

25. Capper D, Stichel D, Sahm F, et al. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018;136(2):181-210. doi:10.1007/s00401-018-1879-y

26. Wen PY, Packer RJ. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: clinical implications. *Neuro-Oncol*. 2021;23(8):1215-1217. doi:10.1093/neuonc/noab120

27. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-1812. doi:10.1126/science.1164382

28. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2008;116(6):597-602. doi:10.1007/s00401-008-0455-2

29. Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-Oncol*. 2009;11(4):341-347. doi:10.1215/15228517-2009-025

30. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-773. doi:10.1056/NEJMoa0808710

31. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-744. doi:10.1038/nature08617
32. Struys EA. 2-Hydroxyglutarate is not a metabolite; D-2-hydroxyglutarate and L-2-hydroxyglutarate are! *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(51):E4939-E4939. doi:10.1073/pnas.1318777110
33. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012;483(7390):474-478. doi:10.1038/nature10860
34. Nounshmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*. 2010;17(5):510-522. doi:10.1016/j.ccr.2010.03.017
35. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016;164(3):550-563. doi:10.1016/j.cell.2015.12.028
36. Arita H, Narita Y, Fukushima S, et al. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2013;126(2):267-276. doi:10.1007/s00401-013-1141-6
37. Napier CE, Huschtscha LI, Harvey A, et al. ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget*. 2015;6(18):16543-16558. doi:10.18632/oncotarget.3846
38. Schniederjan MJ. *Biopsy Interpretation of the Central Nervous System*. Second edition. Wolters Kluwer; 2018.
39. Gupta M, Djalilvand A, Brat DJ. Clarifying the Diffuse Gliomas: An Update on the Morphologic Features and Markers That Discriminate Oligodendroglioma From Astrocytoma. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(5):755-768. doi:10.1309/6JNX4PA60TQ5U5VG
40. Perry A. Oligodendroglial Neoplasms: Current Concepts, Misconceptions, and Folklore: *Adv Anat Pathol*. 2001;8(4):183-199. doi:10.1097/00125480-200107000-00001
41. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992;359(6398):845-848. doi:10.1038/359845a0
42. Reuss DE, Sahm F, Schimpf D, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015;129(1):133-146. doi:10.1007/s00401-014-1370-3
43. Fujimoto K, Arita H, Satomi K, et al. TERT promoter mutation status is necessary and sufficient to diagnose IDH-wildtype diffuse astrocytic glioma with molecular features of glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2021;142(2):323-338. doi:10.1007/s00401-021-02337-9
44. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*.

2015;372(26):2499-2508. doi:10.1056/NEJMoa1407279

45. Tesileanu CMS, Dirven L, Wijnenga MMJ, et al. Survival of diffuse astrocytic glioma, IDH1/2 wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: a confirmation of the cIMPACT-NOW criteria. *Neuro-Oncol.* 2020;22(4):515-523.

doi:10.1093/neuonc/noz200

46. Burger PC, Pearl DK, Aldape K, et al. Small Cell Architecture—A Histological Equivalent of EGFR Amplification in Glioblastoma Multiforme? *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(11):1099-1104. doi:10.1093/jnen/60.11.1099

47. Perry A, Aldape KD, George DH, Burger PC. Small cell astrocytoma: An aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer.* 2004;101(10):2318-2326.

doi:10.1002/cncr.20625

48. Liu L, Bäcklund LM, Nilsson BR, et al. Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J Mol Med.* 2005;83(11):917-926. doi:10.1007/s00109-005-0700-2

49. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-1068. doi:10.1038/nature07385

50. Wick W, Meisner C, Hentschel B, et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology.* 2013;81(17):1515-1522. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a95680

51. Heitz E. *Das Heterochromatin Der Moose.* Bornträger; 1928.

52. Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):10-13.

doi:10.1093/ije/dyr184

53. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet.* 2016;17(8):487-500. doi:10.1038/nrg.2016.59

54. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429(6990):457-463.

doi:10.1038/nature02625

55. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975;187(4173):226-232.

56. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Genome Res.* 1975;14(1):9-25. doi:10.1159/000130315

57. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(11):2291-2298.

doi:10.1093/nar/27.11.2291

58. Jones PA, Laird PW. Cancer-epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999;21(2):163-167. doi:10.1038/5947

59. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415-428. doi:10.1038/nrg816

60. Jones PA, Baylin SB. The Epigenomics of Cancer. *Cell.* 2007;128(4):683-692. doi:10.1016/j.cell.2007.01.029

61. Hovestadt V, Jones DTW, Picelli S, et al. Decoding the regulatory landscape

- of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. *Nature*. 2014;510(7506):537-541. doi:10.1038/nature13268
62. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res*. 2012;22(2):407-419. doi:10.1101/gr.119867.110
63. Hovestadt V, Remke M, Kool M, et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2013;125(6):913-916. doi:10.1007/s00401-013-1126-5
64. Pajtler KW, Witt H, Sill M, et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell*. 2015;27(5):728-743. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.002
65. Sahm F, Schrimpf D, Stichel D, et al. DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2017;18(5):682-694. doi:10.1016/S1470-2045(17)30155-9
66. Röhrich M, Koelsche C, Schrimpf D, et al. Methylation-based classification of benign and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(6):877-887. doi:10.1007/s00401-016-1540-6
67. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, et al. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*. 2016;164(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2016.01.015
68. Koelsche C, Hartmann W, Schrimpf D, et al. Array-based DNA-methylation profiling in sarcomas with small blue round cell histology provides valuable diagnostic information. *Mod Pathol*. 2018;31(8):1246-1256. doi:10.1038/s41379-018-0045-3
69. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, et al. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012;22(4):425-437. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024
70. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020
71. Wang LB, Karpova A, Gritsenko MA, et al. Proteogenomic and metabolomic characterization of human glioblastoma. *Cancer Cell*. 2021;39(4):509-528.e20. doi:10.1016/j.ccell.2021.01.006
72. Baumann M, Weyrich U, Pfister S, Deimling A. *MolecularNeuropathology.Org - The Platform for next Generation Neuropathology*. www.molecularneuropathology.org
73. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157-173. doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019
74. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-477. doi:10.1016/j.cell.2013.09.034

75. Mao P, Joshi K, Li J, et al. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(21):8644-8649. doi:10.1073/pnas.1221478110
76. Azam Z, To SST, Tannous BA. Mesenchymal Transformation: The Rosetta Stone of Glioblastoma Pathogenesis and Therapy Resistance. *Adv Sci Weinh Baden-Wurttt Ger*. 2020;7(22):2002015. doi:10.1002/advs.202002015
77. Behnan J, Finocchiaro G, Hanna G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain*. 2019;142(4):847-866. doi:10.1093/brain/awz044
78. Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, et al. Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell*. 2013;24(3):331-346. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.001
79. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*. 2010;463(7279):318-325. doi:10.1038/nature08712
80. Chow KH, Park HJ, George J, et al. S100A4 Is a Biomarker and Regulator of Glioma Stem Cells That Is Critical for Mesenchymal Transition in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2017;77(19):5360-5373. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1294
81. Fedele M, Cerchia L, Pegoraro S, Sgarra R, Manfioletti G. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2746. doi:10.3390/ijms20112746
82. Liu T, Ma W, Xu H, et al. PDGF-mediated mesenchymal transformation renders endothelial resistance to anti-VEGF treatment in glioblastoma. *Nat Commun*. 2018;9(1):3439. doi:10.1038/s41467-018-05982-z
83. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396-1401. doi:10.1126/science.1254257
84. Chaligne R, Gaiti F, Silverbush D, et al. Epigenetic encoding, heritability and plasticity of glioma transcriptional cell states. *Nat Genet*. 2021;53(10):1469-1479. doi:10.1038/s41588-021-00927-7
85. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet*. 2011;43(8):768-775. doi:10.1038/ng.865
86. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, et al. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012;22(4):425-437. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024
87. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016;19(1):20-27. doi:10.1038/nn.4185
88. Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer*. 2015;1(4):252-265. doi:10.1016/j.trecan.2015.10.009
89. Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*. 2000;29(4):293-304.
90. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev*. 2006;213(1):48-65. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x

91. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):26-41. doi:10.1038/s41568-019-0205-x
92. Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H. Disruption of astrocyte–vascular coupling and the blood–brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun*. 2014;5(1):4196. doi:10.1038/ncomms5196
93. Hu F, a Dzaye OD, Hahn A, et al. Glioma-derived versican promotes tumor expansion via glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. *Neuro-Oncol*. 2015;17(2):200-210. doi:10.1093/neuonc/nou324
94. Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB. Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1987;74(3):269-277. doi:10.1007/BF00688191
95. Chen Z, Hambardzumyan D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol*. 2018;9:1004. doi:10.3389/fimmu.2018.01004
96. Berglund A, Mills M, Putney RM, Hamaidi I, Mulé J, Kim S. Methylation of immune synapse genes modulates tumor immunogenicity. *J Clin Invest*. 2020;130(2):974-980. doi:10.1172/JCI131234
97. Okano T, Nakagawa T, Kita T, et al. Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea. *J Neurosci Res*. 2008;86(8):1758-1767. doi:10.1002/jnr.21625
98. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 17):3073-3084.
99. Kaffes I, Szulzewsky F, Chen Z, et al. Human Mesenchymal glioblastomas are characterized by an increased immune cell presence compared to Proneural and Classical tumors. *Oncol Immunology*. 2019;8(11):e1655360. doi:10.1080/2162402X.2019.1655360
100. Hickey WF, Kimura H. Perivascular Microglial Cells of the CNS Are Bone Marrow-Derived and Present Antigen in Vivo. *Science*. 1988;239(4837):290-292. doi:10.1126/science.3276004
101. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*. 2014;41(1):21-35. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.013
102. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(5):300-312. doi:10.1038/nrn3722
103. Hutchins KD, Dickson DW, Rashbaum WK, Lyman WD. Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Dev Brain Res*. 1990;55(1):95-102. doi:10.1016/0165-3806(90)90109-C
104. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
105. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015

106. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* 2013;281(1):51-61. doi:10.1016/j.cellimm.2013.01.010
107. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med.* 2015;21(8):938-945. doi:10.1038/nm.3909
108. Hattermann K, Sebens S, Helm O, et al. Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. *Oncol Rep.* 2014;32(1):270-276. doi:10.3892/or.2014.3214
109. Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, et al. Glioma-Associated Microglia/Macrophages Display an Expression Profile Different from M1 and M2 Polarization and Highly Express Gpnmb and Spp1. Harrison JK, ed. *PLOS ONE.* 2015;10(2):e0116644. doi:10.1371/journal.pone.0116644
110. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986-995. doi:10.1038/ni.2705
111. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science.* 2010;330(6005):841-845. doi:10.1126/science.1194637
112. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci.* 2013;16(3):273-280. doi:10.1038/nn.3318
113. Casano AM, Peri F. Microglia: Multitasking Specialists of the Brain. *Dev Cell.* 2015;32(4):469-477. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.018
114. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature.* 2015;518(7540):547-551. doi:10.1038/nature13989
115. Sevenich L. Brain-Resident Microglia and Blood-Borne Macrophages Orchestrate Central Nervous System Inflammation in Neurodegenerative Disorders and Brain Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:697. doi:10.3389/fimmu.2018.00697
116. Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci.* 2017;20(2):136-144. doi:10.1038/nn.4475
117. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(12):E1738-E1746. doi:10.1073/pnas.1525528113
118. Korzhhevskii DE, Kirik OV. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci Behav Physiol.* 2016;46(3):284-290. doi:10.1007/s11055-016-0231-z
119. Sousa C, Biber K, Michelucci A. Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Front Immunol.* 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00198
120. Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, et al. Increased Regulatory T-Cell Fraction Amidst a Diminished CD4 Compartment Explains Cellular Immune Defects in Patients with Malignant Glioma. *Cancer Res.* 2006;66(6):3294-3302. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3773
121. Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, et al. Effector T-Cell Infiltration Positively

- Impacts Survival of Glioblastoma Patients and Is Impaired by Tumor-Derived TGF- β . *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4296-4308. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2557
122. Alexiou GA, Vartholomatos G, Karamoutsios A, Batistatou A, Kyritsis AP, Voulgaris S. Circulating progenitor cells: a comparison of patients with glioblastoma or meningioma. *Acta Neurol Belg*. 2013;113(1):7-11. doi:10.1007/s13760-012-0097-y
123. Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses¹. *Neuro-Oncol*. 2006;8(3):261-279. doi:10.1215/15228517-2006-008
124. Wainwright DA, Sengupta S, Han Y, Lesniak MS. Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. *Neuro-Oncol*. 2011;13(12):1308-1323. doi:10.1093/neuonc/nor134
125. Berglund A, Putney RM, Hamaidi I, Kim S. Epigenetic dysregulation of immune-related pathways in cancer: bioinformatics tools and visualization. *Exp Mol Med*. 2021;53(5):761-771. doi:10.1038/s12276-021-00612-z
126. Ehrlich M. DNA Methylation and Cancer-associated Genetic Instability. In: Back N, Cohen IR, Kritchevsky D, Lajtha A, Paoletti R, Nigg EA, eds. *Genome Instability in Cancer Development*. Vol 570. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer-Verlag; 2005:363-392. doi:10.1007/1-4020-3764-3_13
127. Heimberger AB, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, et al. Incidence and Prognostic Impact of FoxP3⁺ Regulatory T Cells in Human Gliomas. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5166-5172. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0320
128. Han S, Zhang C, Li Q, et al. Tumour-infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2560-2568. doi:10.1038/bjc.2014.162
129. Kim YH, Jung TY, Jung S, et al. Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br J Neurosurg*. 2012;26(1):21-27. doi:10.3109/02688697.2011.584986
130. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):71-78. doi:10.1038/nrc1256
131. Zeiner PS, Preusse C, Golebiewska A, et al. Distribution and prognostic impact of microglia/macrophage subpopulations in gliomas: Immune polarization in gliomas. *Brain Pathol*. 2019;29(4):513-529. doi:10.1111/bpa.12690
132. Martinez-Lage M, Lynch TM, Bi Y, et al. Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):203. doi:10.1186/s40478-019-0803-6
133. Doucette T, Rao G, Rao A, et al. Immune Heterogeneity of Glioblastoma Subtypes: Extrapolation from the Cancer Genome Atlas. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(2):112-122. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0028
134. Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017;32(1):42-56.e6. doi:10.1016/j.ccell.2017.06.003
135. Mehani B, Asanigari S, Chung HJ, et al. Immune cell gene expression signatures in diffuse glioma are associated with IDH mutation status, patient

- outcome and malignant cell state, and highlight the importance of specific cell subsets in glioma biology. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):19. doi:10.1186/s40478-022-01323-w
136. Braun Y, Filipinski K, Bernatz S, et al. Linking epigenetic signature and metabolic phenotype in *IDH* mutant and *IDH* wildtype diffuse glioma. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021;47(3):379-393. doi:10.1111/nan.12669
137. Dejaegher J, Solie L, Hunin Z, et al. DNA methylation based glioblastoma subclassification is related to tumoral T-cell infiltration and patient survival. *Neuro-Oncol.* 2021;23(2):240-250. doi:10.1093/neuonc/noaa247
138. *Infinium® HD Assay Methylation Protocol Guide.* illumina; 2015. Accessed October 2, 2022. https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/infinium_assays/infinium_hd_methylation/infinium-hd-methylation-guide-15019519-01.pdf
139. Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics.* 2013;14(1):293. doi:10.1186/1471-2164-14-293
140. Assenov Y, Müller F, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat Methods.* 2014;11(11):1138-1140. doi:10.1038/nmeth.3115
141. Müller F, Scherer M, Assenov Y, et al. RnBeads 2.0: comprehensive analysis of DNA methylation data. *Genome Biol.* 2019;20(1):55. doi:10.1186/s13059-019-1664-9
142. Aran D, Sirota M, Butte AJ. Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nat Commun.* 2015;6(1):8971. doi:10.1038/ncomms9971
143. Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods.* 2015;12(5):453-457. doi:10.1038/nmeth.3337
144. Chakravarthy A, Furness A, Joshi K, et al. Pan-cancer deconvolution of tumour composition using DNA methylation. *Nat Commun.* 2018;9(1):3220. doi:10.1038/s41467-018-05570-1
145. Alizadeh, Newman. *CIBERSORT.* Stanford University www.cibersort.stanford.edu
146. Bogart S. *SankeyMATIC A Sankey Diagram Builder for Everyone.* www.sankeymatic.com
147. Wick A, Kessler T, Platten M, et al. Superiority of temozolomide over radiotherapy for elderly patients with RTK II methylation class, MGMT promoter methylated malignant astrocytoma. *Neuro-Oncol.* 2020;22(8):1162-1172. doi:10.1093/neuonc/noaa033
148. Kessler T, Berberich A, Sadik A, et al. Methylome analyses of three glioblastoma cohorts reveal chemotherapy sensitivity markers within DDR genes. *Cancer Med.* 2020;9(22):8373-8385. doi:10.1002/cam4.3447
149. Rutledge WC, Kong J, Gao J, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Glioblastoma Are Associated with Specific Genomic Alterations and Related to Transcriptional Class. *Clin Cancer Res.* 2013;19(18):4951-4960. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0551

150. Kessler T, Berberich A, Casalini B, et al. Molecular profiling-based decision for targeted therapies in IDH wild-type glioblastoma. *Neuro-Oncol Adv.* 2020;2(1):vdz060. doi:10.1093/oaajnl/vdz060
151. Brown TJ, Brennan MC, Li M, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2016;2(11):1460. doi:10.1001/jamaoncol.2016.1373
152. D'Amico RS, Englander ZK, Canoll P, Bruce JN. Extent of Resection in Glioma—A Review of the Cutting Edge. *World Neurosurg.* 2017;103:538-549. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.041
153. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, et al. Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor With Survival Within Molecular Subgroups of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *JAMA Oncol.* 2020;6(4):495. doi:10.1001/jamaoncol.2019.6143
154. Drexler R, Schüller U, Eckhardt A, et al. DNA methylation subclasses predict the benefit from gross total tumor resection in IDH-wildtype glioblastoma patients. *Neuro-Oncol.* Published online July 22, 2022: noac177. doi:10.1093/neuonc/noac177
155. Thon N, Eigenbrod S, Grasbon-Frodl EM, et al. Predominant influence of MGMT methylation in non-resectable glioblastoma after radiotherapy plus temozolomide. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82(4):441-446. doi:10.1136/jnnp.2010.214593
156. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7
157. Weller J, Waha A, Schneider M, et al. BIOM-08. DNA METHYLATION-BASED SUBGROUPING PREDICTS SURVIVAL BENEFIT FROM LOMUSTINE/TEMOZOLOMID COMBINATION THERAPY IN MGMT PROMOTOR-METHYLATED GLIOBLASTOMA. *Neuro-Oncol.* 2021;23(Supplement_6):vi11-vi11. doi:10.1093/neuonc/noab196.039
158. Singh O, Pratt D, Aldape K. Immune cell deconvolution of bulk DNA methylation data reveals an association with methylation class, key somatic alterations, and cell state in glial/glioneuronal tumors. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):148. doi:10.1186/s40478-021-01249-9
159. Prins RM, Soto H, Konkankit V, et al. Gene Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1603-1615. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2563
160. Yang I, Tihan T, Han SJ, et al. CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J Clin Neurosci.* 2010;17(11):1381-1385. doi:10.1016/j.jocn.2010.03.031
161. Brooks WH, Markesbery WR, Gupta GD, Roszman TL. Relationship of lymphocyte invasion and survival of brain tumor patients. *Ann Neurol.* 1978;4(3):219-224. doi:10.1002/ana.410040305
162. Grabovska Y, Mackay A, O'Hare P, et al. Pediatric pan-central nervous

system tumor analysis of immune-cell infiltration identifies correlates of antitumor immunity. *Nat Commun.* 2020;11(1):4324. doi:10.1038/s41467-020-18070-y

163. Wenger A, Ferreyra Vega S, Kling T, Bontell TO, Jakola AS, Carén H. Intratumor DNA methylation heterogeneity in glioblastoma: implications for DNA methylation-based classification. *Neuro-Oncol.* 2019;21(5):616-627. doi:10.1093/neuonc/noz011

164. Verburg N, Barthel FP, Anderson KJ, et al. Spatial concordance of DNA methylation classification in diffuse glioma. *Neuro-Oncol.* 2021;23(12):2054-2065. doi:10.1093/neuonc/noab134

165. Varn FS, Johnson KC, Wade TE, et al. *Longitudinal Analysis of Diffuse Glioma Reveals Cell State Dynamics at Recurrence Associated with Changes in Genetics and the Microenvironment.* *Cancer Biology*; 2021. doi:10.1101/2021.05.03.442486

166. Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, et al. The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nat Med.* 2018;24(10):1611-1624. doi:10.1038/s41591-018-0156-x

167. Puchalski RB, Shah N, Miller J, et al. An anatomic transcriptional atlas of human glioblastoma. *Science.* 2018;360(6389):660-663. doi:10.1126/science.aaf2666

168. Gempt J, Withake F, Aftahy AK, et al. Methylation subgroup and molecular heterogeneity is a hallmark of glioblastoma: implications for biopsy targeting, classification and therapy. *ESMO Open.* 2022;7(5):100566. doi:10.1016/j.esmoop.2022.100566

169. Jaunmuktane Z, Capper D, Jones DTW, et al. Methylation array profiling of adult brain tumours: diagnostic outcomes in a large, single centre. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):24. doi:10.1186/s40478-019-0668-8

170. Priesterbach-Ackley LP, Boldt HB, Petersen JK, et al. Brain tumour diagnostics using a DNA methylation-based classifier as a diagnostic support tool. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020;46(5):478-492. doi:10.1111/nan.12610

171. Wu Z, Abdullaev Z, Pratt D, et al. Impact of the methylation classifier and ancillary methods on CNS tumor diagnostics. *Neuro-Oncol.* Published online September 23, 2021: noab227. doi:10.1093/neuonc/noab227

172. Pages M, Uro-Coste E, Colin C, et al. The Implementation of DNA Methylation Profiling into a Multistep Diagnostic Process in Pediatric Neuropathology: A 2-Year Real-World Experience by the French Neuropathology Network. *Cancers.* 2021;13(6):1377. doi:10.3390/cancers13061377

173. van der Maaten L, Hinton G. Visualizing Data using t-SNE. *J Mach Learn Res.* 2008;(2008;9):2579-2605.

174. McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. Published online 2018. doi:10.48550/ARXIV.1802.03426

175. Pratt D, Sahm F, Aldape K. DNA methylation profiling as a model for discovery and precision diagnostics in neuro-oncology. *Neuro-Oncol.* 2021;23(Supplement_5):S16-S29. doi:10.1093/neuonc/noab143

9. Anhang

9.1. R-Codes und Sample Sheets

9.1.1. R-Code: MethylCIBERSORT

```
< library(minfi)
<setwd("/Users/tabeahartung/Desktop/Auswertung_ab0721/methylCIBERSORT_1
00wt ")
< THset100wt<-
read.metharray(c("200992270024_R07C01","201465970027_R05C01","20146597
0056_R04C01","201490030090_R06C01","201490030090_R07C01","2018685001
09_R01C01","201868500181_R03C01","201868500181_R04C01","201868500224
_R01C01","201868500224_R05C01","202163550030_R02C01","202163550030_
R05C01","202163550030_R06C01","202172220048_R03C01","202172220048_R
07C01","202172220048_R08C01","202273260130_R03C01","202273260130_R06
C01","202273260205_R01C01","202273260205_R03C01","202274990007_R03C
01","202274990009_R02C01","202274990009_R04C01","202274990042_R03C01
","202274990137_R05C01","202274990137_R07C01","202301620088_R08C01","
202301620092_R01C01","202301620092_R08C01","202410000098_R02C01","20
2410000109_R05C01","202775690039_R02C01","202775690039_R03C01","2028
22930115_R02C01","202822930115_R04C01","202995850073_R01C01","202995
850073_R02C01","203020780081_R02C01","203020900031_R03C01","20306865
0038_R07C01","203160030030_R01C01","203160030058_R01C01","2031894800
75_R07C01","203189480075_R08C01","203273200198_R06C01","203273200221
_R01C01","203273200221_R02C01","203282450240_R02C01","203282450240_
R08C01","203537580049_R01C01","203537580049_R07C01","203537580055_R
03C01","203537580063_R01C01","203537580063_R07C01","203537580065_R06
C01","203537580069_R07C01","203537580069_R08C01","203841950016_R05C
01","203841950016_R08C01","203841950017_R01C01","203845510001_R06C01
","203845510008_R01C01","203845510027_R01C01","203845510044_R02C01","
203845520005_R05C01","203911080028_R05C01","203911080044_R05C01","20
3911080044_R06C01","203922140037_R05C01","203922140037_R06C01","2039
22140037_R07C01","203922140043_R04C01","203922140049_R01C01","203922
140053_R02C01","203923030097_R01C01","204228980074_R02C01","20422898
0084_R06C01","204229110082_R01C01","204237140085_R06C01","2042941200
33_R04C01","204294120051_R06C01","203675240006_R06C01","203675240027
_R02C01","203693970027_R04C01","204237140027_R06C01","204237140071_
R08C01","204237150082_R05C01","204237150085_R02C01","204237150110_R
03C01","204339200052_R06C01","204339200106_R02C01","205061430068_R05
C01","205061430068_R06C01","205061430075_R08C01","205062740046_R04C
01","205062740046_R05C01","205062740048_R07C01","205062740092_R01C01
","205062740122_R01C01","205089030041_R02C01"),force=TRUE)
< qcReport(THset100wt)
< preprocessNoob(THset100wt)
```

```

< THset100wt.beta<-getBeta(THset100wt)
< sum(is.na(THset100wt.beta))
< THset100wt.beta.cleared<-na.omit(THset100wt.beta)
< library(MethylCIBERSORT)
< GBMv2_reference<-read.delim("GBM.sig.txt")
< Prep.CancerType(THset100wt.beta.cleared,Probes=GBMv2_reference$NAME,
fname = "GBM_Mixture")

```

9.1.2. R-Code: RnBeads

```

< library(RnBeads)
< Sys.setenv(R_ZIPCMD="zip")
< data.dir <- „E:/AG Harter/Tabea“
< idat.dir <-file.path(data.dir,"idats")
< sample.annotation<-
file.path(data.dir"RnBeads_100wt_pure_and_mixed_9_groups.txt")
< analysis.dir <- „E:/AG Harter/Tabea/RnBeads/analysis“
< report.dir <- file.path(analysis.dir,"reports")
< rnb.options(min.group.size=1)
< rnb.options(filtering.sex.chromosomes.removal=TRUE)
< rnb.options("differential.enrichment.go"=TRUE)
< rnb.options(differential.comparison.columns="Sample_Group",differential
.comparison.columns.all.pairwise="Sample_Group") oder: pairwise=NULL
<rnb.run.analysis(dir.reports=report.dir,sample.sheet=sample.annotation,data.dir=i
dat.dir,data.type="infinium.idat.dir")

```

9.1.3. R-Code: LUMP-Algorithmus

Der folgende Code wurde im Anschluss an eine RnBeads-Analyse verwendet. Die Input-Daten mussten dementsprechend nicht mehr in R geladen werden.

```

< rnb.options(interference.immune.cells=TRUE)
< immune.content <- rnb.execute.lump
< data.source <- c(idat.dir,sample.annotation)
< report.dir <- "E:/AG Harter/Tabea“
< rnb.set <-
rnb.execute.import(data.source=data.source,data.type="Infinium.idat.dir")
rnb.set <- rnb.run.inference(rnb.set,report.dir)$rnb.set

```

9.1.4. Sample Sheet für RnBeads-Analyse mit drei Gruppen

Sample_ID, Sentrix_ID, Sentrix_Position, Sample_Type, Sample_Group
E-28-17,200992270024,R07C01,RTK II,2
E-32-18,201465970027,R05C01,RTK I,1
E-2813-17-2,201465970056,R04C01,RTK II,2
E-2746-17,201490030090,R06C01,mesenchymal,3
E-2749-17-3,201490030090,R07C01,mesenchymal,3
E-3026-17,201868500109,R01C01,mesenchymal,3
E-3070-17-1,201868500181,R03C01,RTK I,1
E-3080-17,201868500181,R04C01,mesenchymal,3
E-2916-17,201868500224,R01C01,mesenchymal,3
E-2982-17,201868500224,R05C01,RTK II,2
E-254-18-2,202163550030,R02C01,mesenchymal,3
E-299-18,202163550030,R05C01,RTK II,2
E-301-18,202163550030,R06C01,mesenchymal,3
E-789-18-2,202172220048,R03C01,RTK II,2
E-888-18,202172220048,R07C01,RTK I,1
E-890-18,202172220048,R08C01,mesenchymal,3
E-2565-18-1,202273260130,R03C01,RTK II,2
E-2611-18-2,202273260130,R06C01,RTK I,1
E-2652-18-2,202273260205,R01C01,RTK II,2
E-2653-18-1,202273260205,R03C01,RTK I,1
E-1450-18-2,202274990007,R03C01,mesenchymal,3
E-1481-18-3,202274990009,R02C01,mesenchymal,3
E-1504-18-2,202274990009,R04C01,mesenchymal,3
E-624-18-2,202274990042,R03C01,RTK II,2
E-535-18-1,202274990137,R05C01,RTK II,2
E-537-18,202274990137,R07C01,RTK I,1
E-1247-18-2,202301620088,R08C01,mesenchymal,3
E-1993-18,202301620092,R01C01,mesenchymal,3
E-2133-18-1,202301620092,R08C01,mesenchymal,3
E-1836-18,202410000098,R02C01,RTK I,1
E-1712-18-2,202410000109,R05C01,mesenchymal,3
E-2160-18,202775690039,R02C01,mesenchymal,3
E-2217-18,202775690039,R03C01,mesenchymal,3
E-2955-18,202822930115,R02C01,mesenchymal,3
E-2966-18-2,202822930115,R04C01,RTK I,1
E-2995-18-1,202995850073,R01C01,mesenchymal,3
E-3006-18,202995850073,R02C01,mesenchymal,3
E-901-19,203020780081,R02C01,RTK I,1
E-3234-18-1,203020900031,R03C01,RTK I,1
E-3076-18-2,203068650038,R07C01,RTK II,2

E-1293-19-2,203160030030,R01C01,RTK II,2
E-1371-19-2,203160030058,R01C01,mesenchymal,3
E-1626-19-2,203189480075,R07C01,RTK II,2
E-1633-19-2,203189480075,R08C01,mesenchymal,3
E-755-19-3,203273200198,R06C01,RTK I,1
E-467-19-2,203273200221,R01C01,RTK II,2
E-484-19,203273200221,R02C01,RTK I,1
E-2074-19-2,203282450240,R02C01,RTK II,2
E-2133-19-1,203282450240,R08C01,RTK II,2
E-2324-19-2,203537580049,R01C01,mesenchymal,3
E-2325-19-1,203537580049,R07C01,RTK II,2
E-1690-19-2,203537580055,R03C01,RTK I,1
E-2169-19-2,203537580063,R01C01,RTK II,2
E-2290-19-1,203537580063,R07C01,mesenchymal,3
E-1548-19-2,203537580065,R06C01,RTK I,1
E-1178-19-3,203537580069,R07C01,mesenchymal,3
E-1174-19-1,203537580069,R08C01,RTK II,2
E-2361-2020-2,203675240006,R06C01,mesenchymal,3
E-2150-2020,203675240027,R02C01,RTK II,2
E-2120-2020-3,203693970027,R04C01,RTK II,2
E-2600-19,203841950016,R05C01,mesenchymal,3
E-2634-19-1,203841950016,R08C01,mesenchymal,3
E-2437-19-3,203841950017,R01C01,RTK I,1
E-2729-19-2,203845510001,R06C01,mesenchymal,3
E-2650-19,203845510008,R01C01,RTK I,1
E-31-20,203845510027,R01C01,mesenchymal,3
E-2761-19,203845510044,R02C01,RTK II,2
E-2901-19-2,203845520005,R05C01,RTK II,2
E-610-20-2,203911080028,R05C01,RTK I,1
E-424-20-2,203911080044,R05C01,RTK I,1
E-532-20-2,203911080044,R06C01,RTK I,1
E-162-20,203922140037,R05C01,RTK II,2
E-166-20-2,203922140037,R06C01,RTK II,2
E-161-20,203922140037,R07C01,RTK I,1
E-390-20,203922140043,R04C01,mesenchymal,3
E-235-20,203922140049,R01C01,RTK I,1
E-383-20-2,203922140053,R02C01,mesenchymal,3
E-3241-19-1,203923030097,R01C01,RTK II,2
E-1265-2020-1,204228980074,R02C01,RTK II,2
E-1134-2020,204228980084,R06C01,RTK II,2
E-818-2020-2,204229110082,R01C01,mesenchymal,3
E-1843-2020,204237140027,R06C01,RTK II,2
E-1787-2020-1,204237140071,R08C01,RTK II,2
E-1720-2020,204237140085,R06C01,RTK II,2
E-214-2021,204237150082,R05C01,RTK I,1

E-2287-2020-1,204237150085,R02C01,mesenchymal,3
 E-2258-2020,204237150110,R03C01,RTK II,2
 E-1524-2020-1,204294120033,R04C01,mesenchymal,3
 E-1457-2020-3,204294120051,R06C01,RTK I,1
 E-2517-2020,204339200052,R06C01,RTK II,2
 E-1127-2021,204339200106,R02C01,mesenchymal,3
 E-1300-2021-2,205061430068,R05C01,mesenchymal,3
 E-1299-2021-1,205061430068,R06C01,RTK I,1
 E-1095-2021,205061430075,R08C01,RTK I,1
 E-550-2021-1,205062740046,R04C01,mesenchymal,3
 E-551-2021-1,205062740046,R05C01,RTK I,1
 E-975-2021,205062740048,R07C01,RTK II,2
 E-916-2021-2,205062740092,R01C01,RTK II,2
 E-819-2021,205062740122,R01C01,RTK II,2
 E-1520-2021-3,205089030041,R02C01,RTK II,2

9.1.5. Sample Sheet für RnBeads-Analyse mit neun Gruppen

Sample_ID,Sentrix_ID,Sentrix_Position,Sample_Type,sc1u2,pure_mixed,Sample_Group
 E-28-17,200992270024,R07C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
 E-32-18,201465970027,R05C01,RTK I,RTK I,pure,1
 E-2813-17-2,201465970056,R04C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
 E-2746-17,201490030090,R06C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
 E-2749-17-3,201490030090,R07C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
 E-3026-17,201868500109,R01C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
 E-3070-17-1,201868500181,R03C01,RTK I,RTK I,pure,1
 E-3080-17,201868500181,R04C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
 E-2916-17,201868500224,R01C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
 E-2982-17,201868500224,R05C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
 E-254-18-2,202163550030,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
 E-299-18,202163550030,R05C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
 E-301-18,202163550030,R06C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
 E-789-18-2,202172220048,R03C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
 E-888-18,202172220048,R07C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
 E-890-18,202172220048,R08C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
 E-2565-18-1,202273260130,R03C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
 E-2611-18-2,202273260130,R06C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
 E-2652-18-2,202273260205,R01C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
 E-2653-18-1,202273260205,R03C01,RTK I,RTK I,pure,1
 E-1450-18-2,202274990007,R03C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
 E-1481-18-3,202274990009,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9

E-1504-18-2,202274990009,R04C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-624-18-2,202274990042,R03C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-535-18-1,202274990137,R05C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-537-18,202274990137,R07C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-1247-18-2,202301620088,R08C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-1993-18,202301620092,R01C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-2133-18-1,202301620092,R08C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-1836-18,202410000098,R02C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-1712-18-2,202410000109,R05C01,mesenchymal,mesenchymal RTK I,mixed,8
E-2160-18,202775690039,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-2217-18,202775690039,R03C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-2955-18,202822930115,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-2966-18-2,202822930115,R04C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
E-2995-18-1,202995850073,R01C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-3006-18,202995850073,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-901-19,203020780081,R02C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-3234-18-1,203020900031,R03C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-3076-18-2,203068650038,R07C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-1293-19-2,203160030030,R01C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-1371-19-2,203160030058,R01C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-1626-19-2,203189480075,R07C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-1633-19-2,203189480075,R08C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-755-19-3,203273200198,R06C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-467-19-2,203273200221,R01C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-484-19,203273200221,R02C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-2074-19-2,203282450240,R02C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-2133-19-1,203282450240,R08C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-2324-19-2,203537580049,R01C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-2325-19-1,203537580049,R07C01,RTK II,RTK II,pure,4
E-1690-19-2,203537580055,R03C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-2169-19-2,203537580063,R01C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-2290-19-1,203537580063,R07C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-1548-19-2,203537580065,R06C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-1178-19-3,203537580069,R07C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-1174-19-1,203537580069,R08C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-2361-2020-2,203675240006,R06C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-2150-2020,203675240027,R02C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-2120-2020-3,203693970027,R04C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-2600-19,203841950016,R05C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-2634-19-1,203841950016,R08C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-2437-19-3,203841950017,R01C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-2729-19-2,203845510001,R06C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-2650-19,203845510008,R01C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-31-20,203845510027,R01C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7

E-2761-19,203845510044,R02C01,RTK II,RTK II,pure,4
E-2901-19-2,203845520005,R05C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-610-20-2,203911080028,R05C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-424-20-2,203911080044,R05C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
E-532-20-2,203911080044,R06C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
E-162-20,203922140037,R05C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-166-20-2,203922140037,R06C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-161-20,203922140037,R07C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
E-390-20,203922140043,R04C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-235-20,203922140049,R01C01,RTK I,RTK I mesenchymal,mixed,3
E-383-20-2,203922140053,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-3241-19-1,203923030097,R01C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-1265-2020-1,204228980074,R02C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-1134-2020,204228980084,R06C01,RTK II,RTK II,pure,4
E-818-2020-2,204229110082,R01C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-1843-2020,204237140027,R06C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-1787-2020-1,204237140071,R08C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-1720-2020,204237140085,R06C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-214-2021,204237150082,R05C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
E-2287-2020-1,204237150085,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-2258-2020,204237150110,R03C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-1524-2020-1,204294120033,R04C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-1457-2020-3,204294120051,R06C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-2517-2020,204339200052,R06C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-1127-2021,204339200106,R02C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-1300-2021-2,205061430068,R05C01,mesenchymal,mesenchymal,pure,7
E-1299-2021-1,205061430068,R06C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-1095-2021,205061430075,R08C01,RTK I,RTK I,pure,1
E-550-2021-1,205062740046,R04C01,mesenchymal,mesenchymal RTK II,mixed,9
E-551-2021-1,205062740046,R05C01,RTK I,RTK I RTK II,mixed,2
E-975-2021,205062740048,R07C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-916-2021-2,205062740092,R01C01,RTK II,RTK II RTK I,mixed,5
E-819-2021,205062740122,R01C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,6
E-1520-2021-3,205089030041,R02C01,RTK II,RTK II mesenchymal,mixed,

10. Lebenslauf

11. Publikationen

DNA methylation subclasses predict the benefit from gross total tumor resection in IDH-wildtype glioblastoma patients.

Drexler, R., Schüller, U., Eckhardt, A., Filipinski, K., **Hartung, T. I.**, Harter, P. N., Divé, I., Forster, M. T., Czabanka, M., Jelgersma, C., Onken, J., Vajkoczy, P., Capper, D., Siewert, C., Sauvigny, T., Lamszus, K., Westphal, M., Dührsen, L., & Ricklefs, F. L. (2022) *Neuro-oncology*, noac177. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac177>

Combination of Immune Checkpoint Inhibitors and Liver-Specific Therapies in Liver-Metastatic Uveal Melanoma: Can We Thus Overcome Its High Resistance?

Blomen, C. L., Kött, J., **Hartung, T. I.**, Torster, L. K., & Gebhardt, C. (2021). *Cancers*, 13(24), 6390.

DNA methylation-based prediction of response to immune checkpoint inhibition in metastatic melanoma.

Filipinski, K., Scherer, M., Zeiner, K. N., Bucher, A., Kleemann, J., Jurmeister, P., **Hartung, T. I.**, Meissner, M., Plate, K. H., Fenton, T. R., Walter, J., Tierling, S., Schilling, B., Zeiner, P. S., & Harter, P. N. (2021). *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(7), e002226.

12. Danksagungen

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Klinische Bedeutung epigenetischer und genetischer Signaturen diffuser Gliome auf Grundlage globaler DNA-Methylierungsdaten

Im neurologischen Institut Frankfurt am Main (Edinger Institut) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Patrick Nikolaus Harter mit Unterstützung durch Dr. Katharina Weber (geb. Filipski) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)