

Aus dem
Department für Neurochirurgie und Neurotechnologie
Universitätsklinik für Neurochirurgie Tübingen

**Subgruppen-Analyse des (inflammatorischen)
Microenvironment bei Medulloblastomen und Ependymomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Frychel, Julia Evelyn**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schuhmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Flatz

Tag der Disputation: 20.08.2024

Widmung

Meiner Familie.

und allen die mich auf dem Weg durch Tübingen und die Erstellung dieser
Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

I.	Tabellenverzeichnis.....	6
II.	Abbildungsverzeichnis	6
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	8
1.	Einleitung	10
1.1.	<i>Pädiatrische Tumore des zentralen Nervensystems.....</i>	<i>10</i>
1.2.	<i>Medulloblastome.....</i>	<i>11</i>
1.2.1	<i>Histologische und molekularbiologische Klassifikation der Medulloblastome</i>	<i>12</i>
1.3.	<i>Ependymome.....</i>	<i>16</i>
1.3.1.	<i>Histologische und molekularbiologische Klassifikation der Ependymome</i>	<i>17</i>
1.4.	<i>Inflammatorisches Microenvironment</i>	<i>20</i>
1.4.1.	<i>Rationale</i>	<i>20</i>
1.4.2.	<i>L1CAM</i>	<i>21</i>
1.4.3.	<i>HER2</i>	<i>22</i>
1.4.4.	<i>GD2</i>	<i>23</i>
1.4.5.	<i>EphA2</i>	<i>24</i>
1.4.6.	<i>CD276</i>	<i>24</i>
1.5.	<i>Ziel der Arbeit</i>	<i>25</i>
2.	Material und Methoden.....	26
2.1.	<i>Auswahl der Patienten und Gewebeproben</i>	<i>26</i>
2.2.	<i>Auswahl der Antigene.....</i>	<i>28</i>
2.3.	<i>Datenerhebung.....</i>	<i>28</i>
2.4.	<i>Gewinnung des Tumorgewebes und Herstellung der histologischen Präparate</i>	<i>28</i>
2.5.	<i>Tissue Microarray Methode</i>	<i>29</i>
2.5.1.	<i>Herstellung der TMAs</i>	<i>29</i>
2.6.	<i>Herstellung der mikroskopischen Präparate.....</i>	<i>31</i>
2.7.	<i>Färbeverfahren.....</i>	<i>32</i>
2.7.1.	<i>Entparaffinisierung</i>	<i>32</i>
2.7.2.	<i>Hämatoxylin-Eosin (HE).....</i>	<i>32</i>
2.7.3.	<i>Immunhistochemie</i>	<i>32</i>
2.8.	<i>Lichtmikroskopische Bewertung.....</i>	<i>34</i>
2.8.1.	<i>L1CAM Auswertungskriterien</i>	<i>34</i>
2.8.2.	<i>HER2 Auswertungskriterien</i>	<i>35</i>
2.8.3.	<i>GD2 Auswertungskriterien</i>	<i>36</i>
2.8.4.	<i>EphA2 Auswertungskriterien.....</i>	<i>36</i>
2.8.5.	<i>CD276 Auswertungskriterien</i>	<i>36</i>
2.8.6.	<i>Übersicht der Intensitätsskala.....</i>	<i>37</i>
2.9.	<i>Übersicht der Materialien</i>	<i>37</i>
2.9.1.	<i>TMAs</i>	<i>37</i>
2.9.2.	<i>Antikörper und Färbesubstanzen</i>	<i>38</i>
2.9.3.	<i>Geräte.....</i>	<i>39</i>
2.9.4.	<i>Statistische Analyse</i>	<i>39</i>

3.	Ergebnisse	41
3.1.	<i>Medulloblastome.....</i>	41
3.1.1.	HER2 – Medulloblastome.....	42
3.1.2.	L1CAM – Medulloblastome.....	42
3.1.3.	EphA2- Medulloblastome: Quantität.....	44
3.1.4.	EphA2 – Medulloblastome: Intensität.....	46
3.1.5.	GD2 – Medulloblastome: Quantität und Intensität	49
3.1.6.	CD276 – Medulloblastome: Quantität.....	49
3.1.7.	CD276 – Medulloblastome: Intensität.....	51
3.2.	<i>Ependymome.....</i>	54
3.2.1.	HER2 – Ependymome.....	55
3.2.2.	L1CAM – Ependymome.....	55
3.2.3.	EphA2 – Ependymome: Quantität.....	57
3.2.4.	EphA2 – Ependymome: Intensität.....	59
3.2.5.	GD2 – Ependymome: Quantität	62
3.2.6.	GD2 – Intensität.....	63
3.2.7.	CD276 – Ependymome: Quantität.....	64
3.2.8.	CD276 – Ependymome: Intensität.....	66
3.3.	<i>Vergleich: Medulloblastome und Ependymome</i>	70
3.4.	<i>Vergleiche unter Betrachtung klinischer Faktoren</i>	72
4.	Diskussion	73
4.1.	<i>Diskussion der Patientengruppen.....</i>	73
4.2.	<i>Diskussion der Methodik.....</i>	74
4.3.	<i>Diskussion der AG-Färbungen</i>	75
4.3.1.	L1CAM	76
4.3.2.	EphA2	77
4.3.3.	CD276.....	81
4.4.	<i>Limitationen</i>	81
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literaturverzeichnis	85
7.	Anhang.....	89
7.1.	<i>TMA-Pläne.....</i>	89
7.2.	<i>Statistik: Häufigkeitstabellen</i>	90
7.3.	<i>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift</i>	94
7.4.	<i>Veröffentlichungen.....</i>	95
7.5.	<i>Danksagung</i>	96

I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Medulloblastome in ihre histologischen Subgruppen (8, 15)	13
Tabelle 2: Ependymom-Typen und ihre WHO-Klassifikation (5, 6, 26, 34)	17
Tabelle 3: Übersicht über die histologische und molekulargenetische Einteilung von Ependymomen	20
Tabelle 4: Übersicht der AK-Färbesubstanzen und ihrer Eigenschaften	38
Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung L1CAM-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	43
Tabelle 6: signifikante Unterschiede in der Expression von L1CAM in MB nach molekulargenetischen Subgruppen	44
Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	45
Tabelle 8: signifikante Unterschiede in der quantitativen Expression von EphA2 in MB nach molekulargenetischen Subgruppen	46
Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	47
Tabelle 10: signifikante Unterschiede in der Intensität der Expression von EphA2 in MB nach molekulargenetischen Subgruppen	48
Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	50
Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	52
Tabelle 13: Häufigkeitsverteilung L1CAM-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	56
Tabelle 14: signifikante Unterschiede in der Expression von L1CAM in EP nach molekulargenetischen Subgruppen	57
Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	58
Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	60
Tabelle 17: signifikante Unterschiede in der Intensität der Expression von EphA2 in EP nach molekulargenetischen Subgruppen	61
Tabelle 18: Häufigkeitsverteilung GD2 Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	63
Tabelle 19: Häufigkeitsverteilung GD2 Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	64
Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	65
Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	67
Tabelle 22: MB-Subgruppenklassifizierung nach immunhistochemischer Bestimmung von L1CAM und EphA2 ..	80

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der 2006 - 2010 in den vereinigten Staaten und Washington D.C. (exkl. Arkansas, Minnesota, Nevada, Ohio, Virginia) diagnostizierten Hirntumore. Quelle: North American Association of Central Cancer Registries. (1)	11
Abbildung 2: Übersicht über die molekulargenetischen Subgruppen der Medulloblastome und ihre klinischen sowie molekularen Eigenschaften. Übernommen aus Juraschka et al., Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review, 2019 (19)	15
Abbildung 3: Übersicht der molekulargenetischen Einteilung von Ependymomen im Vergleich. Übernommen aus Pajtler et al., Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. Cancer Cell (2).....	19
Abbildung 4: Flussdiagramm über Inklusions- und Exklusionskriterien der MB- und EP-Gewebeproben	27
Abbildung 5: Darstellung eines für die Arbeit hergestellten TMA-Blockes (TMA1-21).....	31
Abbildung 6: schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Beurteilung von IHC-HER2-gefärbten Gewebeproben (59)	35
Abbildung 7: exemplarische Darstellung der Intensitätsstufen für die AG-Färbungen L1CAM, EphA2, GD2 und CD276. In dieser Abbildung ist die Intensität zunehmen von links nach rechts (A: score 1; B: score 2; C: score 3) dargestellt. Es handelt sich jeweils um Ependymome in EphA2-Färbung	37
Abbildung 8: Kreisdiagramm, Verteilung der molekulargenetischen Diagnosen innerhalb der Gruppe der Medulloblastome, n=27	41

Abbildung 9: Histogramm zur L1CAM-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom.....	42
Abbildung 10: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der L1CAM-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	43
Abbildung 11: Histogramm zur EphA2-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom	44
Abbildung 12: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	45
Abbildung 13: A: WNT-MB in EphA2-Färbung; B: SHH-MB in EphA2-Färbung.....	46
Abbildung 14: Histogramm zur EphA2-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom	47
Abbildung 15: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	48
Abbildung 16: Histogramm zur CD276- Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom	49
Abbildung 17: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	50
Abbildung 18: Histogramm zur CD276-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom	51
Abbildung 19: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	52
Abbildung 20: exemplarische Darstellung der CD276-Expression in Medulloblastomen. A: SHH-MB; B: WNT-MB; C: Gruppe 3-MB; D: Gruppe 4-MB	53
Abbildung 21: Kreisdiagramm, Verteilung der molekulargenetischen Diagnosen innerhalb der Gruppe der Medulloblastome, n=30	54
Abbildung 22: Histogramm zur L1CAM-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom	55
Abbildung 23: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der L1CAM-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen.....	56
Abbildung 24: L1CAM-Färbung zweier RELA-fusionierter Ependymome.....	57
Abbildung 25: Histogramm zur EphA2-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom	58
Abbildung 26: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	59
Abbildung 27: Histogramm zur EphA2-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom	60
Abbildung 28: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen	61
Abbildung 29: A: PF-A-Ependymom in EphA2-Färbung; B: RELA-fusioniertes Ependymom in EphA2-Färbung	62
Abbildung 30: Histogramm zur GD2-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom	62
Abbildung 31: Histogramm zur GD2-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom	63
Abbildung 32: Histogramm zur CD276- Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom	65
Abbildung 33: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	66
Abbildung 34: Histogramm zur CD276-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom	67
Abbildung 35: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen	68
Abbildung 36: CD276-Expression in den Ependymomsubgruppen A: PF-A; B: PF-B; C: myxopapillär; D: RELA-fusioniert	69
Abbildung 37: gruppiertes Balkendiagramm: Vergleich der L1CAM-Quantität zwischen Medulloblastomen und Ependymomen	70
Abbildung 38: gruppiertes Balkendiagramm: Vergleich der CD276-Quantität zwischen Medulloblastomen und Ependymomen	71
Abbildung 39: gruppiertes Balkendiagramm: Vergleich der CD276-Intensität zwischen Medulloblastomen und Ependymomen	71
Abbildung 40: Darstellung der L1CAM-Quantität in Ependymomen, Gruppierung nach Geschlecht	72

III. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CAP	College of American Pathologists
CC1	Cell Conditioner 1
CC2	Cell Conditioner 2
CT	Computertomographie
DKFZ	Deutschen Krebsforschungszentrums
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
Eph	Ephrin
EP	Ependymom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
H3K27	Histon-3-Lysin-27
IFN- γ	Interferon γ
IHC	Immunhistochemie
ISH	Industry Solution Healthcare
IME	Inflammatorisches Microenvironment
L1CAM	L1-cell-adhesion-molecule
MAPK	Mitogen-Aktivierte Proteinkinase
MB	Medulloblastom
ME	Microenvironment
MNP2.0	Molekulare Neuropathologie 2.0
MPE	Myxopapilläres Ependymom
MRT	Magnetresonanztomographie
NF κ B	Nuclear Factor Kappa B
nk	nicht MNP2.0-klassifiziert
OP	Operation
PF	Posterior Fossa
RELA	V-rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A
RT	Radiotherapie
SHH	Sonic Hedgehog
TMA	Tissue Microarray

TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
WNT	Wingless
YAP1	Yes-Associated Protein 1
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Pädiatrische Tumore des zentralen Nervensystems

Bei Kindern machen Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS), wovon sich ca. 40% benigne und 60% maligne darstellen, nach Leukämien den größten Anteil an Krebserkrankungen im Alter von 0 - 14 Jahren aus und sind für die höchste krebsbedingte Sterblichkeitsrate im Kindesalter verantwortlich (1, 4). Die hohe Sterblichkeit ist insbesondere auf Resistenzen und Nebenwirkungen der angewandten Therapieoptionen zurückzuführen (5). Die ZNS-Tumor-Diagnostik sowie -Therapiemöglichkeiten nehmen somit einen großen und wichtigen Teil in der medizinischen Versorgung von Kindern ein. Um die bestmögliche Behandlung betroffener Kinder zu ermöglichen, ist es wichtig die richtige Diagnose zu stellen und eine möglichst effektive Therapie einzuleiten. Die Diagnostik von Hirntumoren folgt in der Regel dem Klassifikationsschema der World Health Organization (WHO), welches regelmäßig überarbeitet und aktualisiert wird. Im Allgemeinen werden die Tumore in Low-Grade-Gliome (Grad I und II) und High-Grade-Gliome (Grad III und IV) kategorisiert, wobei die Grade aufsteigend mit ihrer jeweiligen Malignität korrelieren (5). Während früher vor allem histologische und immunhistochemische Kriterien zur Diagnosestellung herangezogen wurden, treten seit der Überarbeitung von 2016 molekularbiologische Untersuchungen immer stärker in den Vordergrund. Dieser Trend verdeutlicht sich auch in der aktuellen Neuerung der WHO-Klassifikation von 2021 (6, 7). Diese molekulargenetischen Erkenntnisse ermöglichen genauere Zuordnungen der einzelnen Tumorentitäten in Subgruppen und eröffnen neue und zielgerichtete Therapieansätze. Außerdem können Tumorverhaltensweisen, wie beispielsweise Resistenzmechanismen oder Metastasierungsprozesse besser verstanden werden und Aussagen über prognostische sowie prädiktive Marker getätigt werden (8).

Abbildung 1 (aus der Arbeit von Ward et. Al, 2014) zeigt eine Übersicht der 2006 - 2010 diagnostizierten Hirntumore einzelner Staaten Amerikas, wobei in dieser Darstellung nicht zwischen malignen und benignen Tumoren differenziert wird.

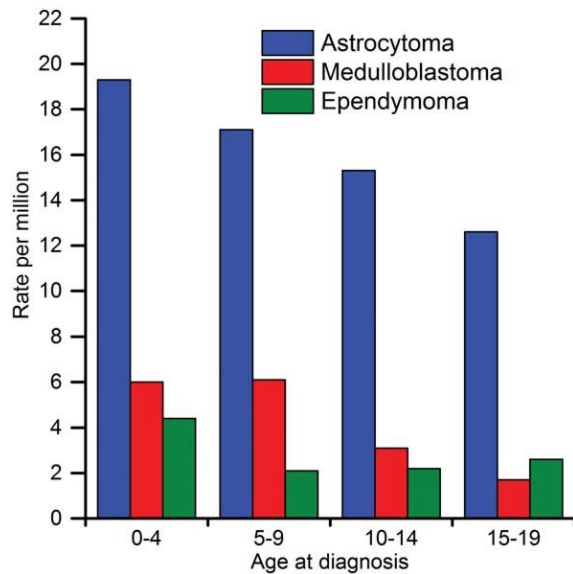


Abbildung 1: Übersicht der 2006 - 2010 in den vereinigten Staaten und Washington D.C. (exkl. Arkansas, Minnesota, Nevada, Ohio, Virginia) diagnostizierten Hirntumore. Quelle: North American Association of Central Cancer Registries. (1)
 Übernommen mit freundlicher Genehmigung des Verlages (25.07.2023, Order-Nr. 5596011045783)

1.2. Medulloblastome

Medulloblastome (MB) machen etwa 15 - 20% und damit den größten Anteil kindlicher maligner Hirntumore aus (5, 9, 10). Sie gehören zu den neuronalen und in dieser Gruppe zu den embryonalen Hirntumoren. Die Erkrankung tritt vor allem bei Kindern im Alter von drei bis zehn Jahren mit einem Altersgipfel von neun Jahren auf. Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen (11, 12). Während der Primärtumor fast ausschließlich in der hinteren Schädelgrube vorkommt, kann eine leptomeningeale Metastasierung entlang der gesamten Neuroachse zu finden sein (9, 12). Bei Metastasierung und histologisch schlecht differenzierten und großen Tumoren ist die Prognose und das Langzeitüberleben schlechter als bei kleinen, gut differenzierten Tumoren ohne Metastasierung. Im Allgemeinen hat sich das 5-Jahres-Überleben in den vergangenen Jahren durch den stetigen Fortschritt der Forschung, bessere Diagnostik und Therapiemöglichkeiten, von ca. 30% auf bis zu 70 - 80% verbessert (13). Durch die Lokalisation des Tumors in der hinteren Schädelgrube und die hohe Toleranz von Kindern sowie deren eingeschränkter Selbstwahrnehmung und Kommunikationsfähigkeit (insbesondere kleinerer Kinder) äußert sich die Erkrankung klinisch oft erst in einem späten Stadium bei Infiltration des 4. Ventrikels und dadurch hervorgerufenen neurologischen Symptomen oder durch Verlegung des 4. Ventrikels.

Der letztere Fall zeigt sich in Form eines Hydrozephalus und erhöhten Hirndrucks. Klinisch sind die Patient:innen lethargisch, leiden unter Übelkeit und morgendlichem Kopfschmerz mit Nüchternerebrechen. Bei Beteiligung des Kleinhirns können ebenfalls Ataxie und Dysmetrie auftreten. Bei kleineren Kindern kann gelegentlich durch den erhöhten intrakraniellen Druck eine Kopfvergrößerung beobachtet werden, die dadurch zustande kommt, dass die teils noch geöffneten Schädelnähte dem erhöhten intrakraniellen Druck leichter nachgeben und auseinanderweichen (9). Zu den ersten Schritten der Diagnostik gehören die Anamnese und eine klinische Untersuchung. Die definitive Diagnosesicherung erfolgt anschließend durch die Bildgebung in Form einer Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) sowie pathologisch oder molekulargenetisch nach entsprechender Gewebegewinnung (9, 14). Die Behandlung von MB setzt sich im Allgemeinen aus einer möglichst vollständigen operativen Tumorentfernung, gefolgt von Chemotherapie und Bestrahlung der ehemaligen Tumorloge zusammen (9, 10). Bei Kindern unter 3 Jahren wird eine Bestrahlung aufgrund hoher Risiken für Langzeitfolgen und möglicher Hirnschädigungen bei noch sehr ausgeprägter Vulnerabilität und Unreife des kindlichen Gehirns nur zurückhaltend angewandt (15). Durch in den vergangenen Jahren vermehrt aufkommende molekulargenetische Untersuchungen des Tumorgewebes werden auslösende Mutationen, die an der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum beteiligt sind, immer besser verstanden. Dies bietet Raum für neue Therapieansätze, die zielgerichtet in die molekularen Signalwege des Tumors eingreifen und die Therapie von MB und das Langzeitüberleben verbessern können (10).

1.2.1 Histologische und molekulare Klassifikation der Medulloblastome

Medulloblastome stellen sich lichtmikroskopisch als zeldichte Tumoren aus kleinen runden blauen Zellen dar. Nach der WHO-Klassifikation lassen sich MB sowohl histologisch als auch molekulargenetisch in verschiedene Subgruppen einteilen. Eine Übersicht der Subgruppen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Histologische Einteilung von Medulloblastomen	<ul style="list-style-type: none"> • Klassisches Medulloblastom • Desmoplastisches/Noduläres Medulloblastom • Großzelliges/Anaplastisches Medulloblastom
Molekulargenetische Einteilung von Medulloblastomen	<ul style="list-style-type: none"> • Wingless (WNT)-aktiviert • Sonic Hedgehog (SHH)-aktiviert • Non-WNT/non-SHH: <ul style="list-style-type: none"> • Gruppe 3 • Gruppe 4

Tabelle 1: Einteilung der Medulloblastome in ihre histologischen Subgruppen (9, 16)

Seit 2016 rücken molekulargenetische Sequenzierungen bei den MB immer weiter in den Vordergrund und gewinnen vor allem bei der Diagnosestellung, der Prognoseeinschätzung sowie bei der Wahl der passenden Therapie an Bedeutsamkeit (6). Ursprung der verschiedenen molekularen MB-Subtypen bilden, neben Veränderungen in molekularbiologischen Signalwegen oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, unter anderem ihr Herkunftsort: WNT-Tumore entstehen beispielsweise mutmaßlich aus der embryologisch unteren rhomboiden Zellschicht und damit aus dem Hirnstamm, bzw. dessen Oberfläche; SHH-Tumore hingegen aus der äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns (17, 18). Eine Übersicht über die Subtypen und ihre molekulargenetischen sowie klinischen Eigenschaften ist Abbildung 2 (aus der Arbeit von Juraschka et al. aus dem Jahr 2019) zu entnehmen.

WNT-MB machen etwa 10% aller MB aus. Sie treten typischerweise bei Kindern über vier Jahren auf und haben im Allgemeinen eine sehr gute Prognose. Jungen und Mädchen sind etwa gleich häufig betroffen. Metastasierungen treten selten auf (19, 20). WNT-MB zeichnen sich durch eine Mutation in CTNNB1-Gen aus, welches für das Strukturprotein β -Catenin codiert (20). Bei β -Catenin handelt es sich um ein Protoonkogen, welches bei Vorliegen eines inaktiven WNT-Signalwegs kontinuierlich im Proteasom abgebaut wird. So wird es daran gehindert, die Transkription von Genen, die die Zellproliferation anregen, zu aktivieren. Wenn das Signalprotein WNT an den β -Catenin-Komplex bindet, wird eine Kaskade aktiviert, welche dazu führt, dass β -Catenin freigesetzt wird und somit Transkriptionen verschiedener zellproliferativer

Proteine gestartet werden können. In Tumorzellen kann dieser Mechanismus fehlerhaft ausgebildet sein, so dass der Komplex auch ohne WNT aktiviert werden kann und es zu einer unkontrollierten Zellproliferation durch Transkriptionsinitiierungen kommt (21). Neben der Transkriptionsregulation spielt β -Catenin eine Rolle in der Aktinvernetzung und bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten.

SHH-MB zeigen zwei Altersgipfel. Sie sind sowohl bei Kleinkindern als auch bei Erwachsenen zu finden. Mädchen und Jungen sind etwa gleich häufig betroffen (19, 20). Zugrunde liegt eine Mutation im Tumorsuppressorgen Patched1, häufig in Kombination mit einer Mutation im Tumorsuppressorgen p53 (5, 22). Dies beeinflusst den SHH-Signalweg und stört damit die embryonale regelrechte Entwicklung des Neuralrohres und fördert die Tumorentwicklung und -progression (20). Fast alle desmoplastischen MB lassen sich der Subgruppe SHH-MB zuordnen (10, 18).

Vom SHH- und WNT-Subtyp werden MB, die keinen Hinweis auf SHH- oder WNT-Aktivierung zeigen unterschieden. Dazu gehören Gruppe 3- und Gruppe 4-MB, die mutmaßlich ihren Ursprung im Nodus des Kleinhirnwurmes haben.

Gruppe 3-MB machen ca. 25% aller MB aus. Sie kommen vor allem bei Kleinkindern und insbesondere bei Jungen vor. Bei Erwachsenen sind sie sehr selten zu finden. Sie metastasieren, genauso wie die Gruppe 4-MB häufiger als WNT- und SHH-MB und haben insgesamt eine schlechte Prognose (19, 20). Molekularbiologisch zeichnen sie sich durch Veränderungen im Chromosom 17 und gelegentlich auch in einer Amplifikation des Transkriptionsfaktors MYC aus. Die Fehlregulation von MYC führt zu einem gestörten Zellzyklus, was sich in unkontrollierter Zellproliferation und demzufolge in Tumorentstehung und -progression äußern kann (5, 23).

Gruppe 4-MB sind die mit etwa 35% am häufigsten vorkommende Subgruppe der MB. Sie sind sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen zu finden. Jungen und Männer sind häufiger betroffen als das weibliche Geschlecht (20). Wie auch bei Gruppe 3-MB finden sich Mutationen auf Chromosom 17 und MYC-Amplifikationen. Außerdem ist die Cyclin abhängige Kinase 6 (CDK6) häufig von Mutationen mit betroffen (5, 22). CDK6 gehört zu den Serin/Threonin Proteinkinasen und spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus, da sie den Eintritt in die Mitose reguliert.

Subgroup		WNT	SHH	Group 3	Group 4
Clinical Characteristics	% of Cases	10	30	25	35
	Age at Diagnosis				
	Gender Ratio (M:F)	1:1	1:1	2:1	3:1
	Anatomic Location				
	Histology	Classic, Rarely LCA	Desmoplastic, Classic, LCA	Classic, LCA	Classic, LCA
	Metastasis at Diagnosis (%)	5-10	15-20	40-45	35-40
	Recurrence Pattern	Rare; Local or metastatic	Local	Metastatic	Metastatic
	Prognosis	Very good	Infants good, others intermediate	Poor	Intermediate
Molecular Characteristics	Proposed Cell of Origin	Progenitor cells in the lower rhombic lip	Granule precursors of the external granule layer	Neural stem cells	Unipolar brush cells
	Recurrent Gene Amplifications	-	<i>MYCN</i> <i>GLI1</i> or <i>GLI2</i>	<i>MYC</i> <i>MYCN</i> <i>OTX2</i>	<i>SNCAIP</i> <i>MYCN</i> <i>OTX2</i> <i>CDK6</i>
	Recurrent SNVs	<i>CTNNB1</i> <i>DDX3X</i> <i>SMARCA4</i> <i>TP53</i>	<i>PTCH1</i> <i>TERT</i> <i>SUFU</i> <i>SMO</i> <i>TP53</i>	<i>SMARCA4</i> <i>KBTBD4</i> <i>CTDNEP1</i> <i>KMT2D</i>	<i>KDM6A</i> <i>ZMYM3</i> <i>KTM2C</i> <i>KBTBD4</i>
	Cytogenetic Events ■ Gain ■ Loss	6	3q, 9p 9q, 10q, 17p	1q, 7, 18 8, 10q, 11, 16q i17q	7, 18q 8, 11p, X i17q
	Other Recurrent Genetic Events	-	-	<i>GF11</i> and <i>GF11B</i> enhancer hijacking	<i>PRDM6</i> , <i>GF11</i> , and <i>GF11B</i> enhancer hijacking

Age: Infant Child Adult

Abbildung 2: Übersicht über die molekulargenetischen Subgruppen der Medulloblastome und ihre klinischen sowie molekularen Eigenschaften. Übernommen aus Juraschka et al., *Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review*, 2019 (20)
Übernommen mit freundlicher Genehmigung des Verlages (31.07.2023)

1.3.Ependymome

Ependymome (EP) sind nach Medulloblastomen und Astrozytomen die dritthäufigste Entität pädiatrischer Hirntumore. Sie gehören zu den glialen Tumoren und entstehen aus Ependymzellen, welche die Liquorräume des ZNS auskleiden. Somit können EP entlang der gesamten Neuroachse, sowohl kranial wie auch spinal auftreten. Kraniale EP sind im Allgemeinen öfter zu finden als spinale. Am häufigsten kommen EP in der hinteren Schädelgrube im Bereich von Cerebellum und Hirnstamm vor, am zweithäufigsten findet man sie supratentoriell. Der Altersgipfel liegt bei 0 - 4 Jahren. Jungen und Mädchen sind etwa gleichhäufig betroffen, vereinzelt zeigt sich eine leichte Tendenz hin zum männlichen Geschlecht (24-27).

Bei Tumoren im Bereich der Ventrikel kann es dazu kommen, dass Liquorräume komprimiert und wichtige Liquorabflusswege verlegt werden. Es kommt in Folge zu einem Hydrozephalus. Daraus resultieren allgemeine Symptome wie Kopfschmerzen, Lethargie, Diplopie, Stauungspapillen, Übelkeit oder Erbrechen (27, 28). Je nach Lokalisation und Tumorausbreitung führen EP, neben den bereits genannten allgemeinen Symptomen, zu spezifischen Symptomen für die jeweilige Lokalisation. Supratentorielle Tumore können bei kortikaler Beteiligung zu Krampfanfällen oder Hemiparesen führen. Bei infratentoriellen Tumoren zeigen sich häufig Schwindel oder Ataxie. Bei Infiltrierung in den Kleinhirnbrückenwinkel, Pons oder Medulla oblongata können Kleinhirn oder Hirnnervenstrukturen mit betroffen sein, was beispielsweise zu Dysarthrie, Dysphagie, Hypakusis oder Dysmetrie führen kann. Spinale EP können sich hingegen in Skoliose, Rückenschmerzen, Sensibilitätsstörungen der Extremitäten, Muskelatrophien, Muskelschwäche bis hin zu Paresen oder Inkontinenz äußern (27, 29-31). Zur Diagnostik der EP gehört neben der Anamnese und einer körperlichen Untersuchung eine MRT des Schädels und des Spinalkanals (27, 28). Die definitive Diagnosesicherung erfolgt histopathologisch oder molekulargenetisch nach entsprechender Gewebegewinnung durch eine Biopsie oder Tumorresektion.

In der Therapie von EP spielt die vollständige chirurgische Resektion die bedeutendste Rolle. Je mehr Tumormasse entfernt werden kann, desto besser ist das 5-Jahres-Überleben. Es wird eine R0-Resektion angestrebt (25, 32-34). Je nach Lokalisation und Ausbreitung des Tumors kann dies eine große Herausforderung darstellen. Nach der Operation wird in den meisten Fällen eine adjuvante Radiotherapie (RT) der Tumorloge vorgenommen. Für die Bestrahlung werden Photonen und, je jünger die

Kinder sind, bevorzugt Protonen verwendet. Insbesondere die Therapie infratentorieller Tumore und Tumorrezidive profitieren von der adjuvanten RT (34). Die RT ist außerdem bei unvollständiger Resektion und niedriggradigen EP von besonderer Wichtigkeit für das Langzeitüberleben (27). Bei kleinen Kindern muss hierbei beachtet werden, dass aufgrund der potenziellen Hirnschädigung bei erhöhter Vulnerabilität in jungem Alter eine RT vorsichtig und eher zurückhaltend eingesetzt werden sollte. Auch die strahlenbedingten Nebenwirkungen und Langzeitfolgen, wie Neoplasien dürfen nicht vernachlässigt werden (15). Der Nutzen einer chemotherapeutischen Behandlung wurde in vielen Studien untersucht und ist aufgrund etwa gleicher Überlebensraten bei Behandlung ohne Chemotherapie umstritten (27, 34).

1.3.1. Histologische und molekularbiologische Klassifikation der Ependymome

Nach der WHO-Klassifikation sind EP von WHO Grad I bis Grad III einzuteilen (35). Somit sind sie sowohl in den niedriggradigen wie auch den hochgradigen Tumoren des ZNS vertreten und können sowohl benigne als auch maligne vorkommen. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der histologischen EP-Typen, ihrer WHO-Klassifikation und der typischen Lokalisation.

Ependymom Typ	WHO-Grad	Typische Lokalisation
Subependymome	I	Supratentoriell, infratentoriell, spinal: vor allem 4. Ventrikel, Seitenventrikel
Myxopapilläre Ependymome	I	Cauda equina des Rückenmarks
Klassische Ependymome <ul style="list-style-type: none"> • Klarzellig • Papillär • Tanyzytär 	II	Supratentoriell, infratentoriell, spinal
Anaplastische Ependymome	III	Supratentoriell, infratentoriell, spinal

Tabelle 2: Ependymom-Typen und ihre WHO-Klassifikation (6, 7, 27, 35)

Seit 2016 wurde das RELA-fusionierte Ependymom als eigene EP-Entität in die WHO-Klassifikation aufgenommen. In der Mehrheit der supratentoriellen EP bei Kindern konnte eine mRNA-Fusion zwischen dem Gen C11orf95 und v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (RELA) nachgewiesen werden, welches für die RelA p65-Untereinheit des nuclear factor kappa B (NFκB)-Komplexes kodiert (6, 36). NFκB beschreibt einen Transkriptionsfaktor und spielt eine bedeutsame Rolle in der Regulation des Immunsystems, Entzündungsreaktionen und im Verhalten von Tumoren und Krebs im Allgemeinen (37). Histologisch entspricht das RELA-fusionierte EP dem WHO-Grad II-III (6). Studien der vergangenen Jahre zeigten, dass EP je nach Lokalisation, unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Obwohl sie histologisch gleich aussehen, sollten sie unterschiedlich behandelt werden. Diese These wurde durch den immer stärker aufkommenden Einsatz von molekulargenetischen Untersuchungsmethoden gestützt, welcher dazu führte, dass EP aktuell molekulargenetisch in insgesamt 9 Subgruppen eingeteilt werden können (5, 34). Eine Übersicht über die molekularen Subgruppen und ihre Eigenschaften ist Abbildung 3 zu entnehmen.

Anatomic Compartment	SPINE (SP-)			Posterior Fossa (PF-)			Supratentorial (ST-)		
Molecular Subgroup	SE	MPE	EPN	SE	EPN-A	EPN-B	SE	EPN-YAP1	EPN-RELA
Histopathology	sub-ependymoma (WHO I)	myxopapillary ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	sub-ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	sub-ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)
Genetics	6q del.	CIN	CIN	balanced	balanced	CIN	balanced	aberr. 11q	aberr. 11q
Oncogenic Driver	?	?	NF2	?	?	?	?	YAP1-fusion	Chromothripsis RELA-fusion
Tumor Location									
Age Distribution (years)									
Gender Distribution									
Patient Survival (OS; months)									

Abbildung 3: Übersicht der molekulargenetischen Einteilung von Ependymomen im Vergleich. Übernommen aus Pajtler et al., *Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups*. *Cancer Cell* (2) Übernommen mit freundlicher Genehmigung des Verlages (25.07.2023, Order Nr. 5596020915507)

Die supratentoriellen RELA fusionierten Tumore wurden zuletzt in ZFTA-fusionierte Tumore unbenannt, da unabhängig von der assoziierten Veränderung im RELA Gen immer eine Fusion des ZFTA Gens vorliegt (38). Im Gegensatz zu den RELA-fusionierten EP zeigen die verhältnismäßig seltener vorkommenden yes-associated protein 1 (YAP1)-fusionierten Tumore eine bessere Prognose (5). Bei YAP1, welches sowohl als Tumorsuppressor- wie auch als Onkogen fungieren kann, handelt es sich um einen Transkriptionsregulator, welcher an Zellproliferation und Apoptosemechanismen sowie der Tumorentstehung beteiligt ist (39). Die Posterior Fossa (PF)-EP können in die zwei Hauptgruppen PF-A und PF-B eingeteilt werden. Molekularbiologisch spielt hierbei die Methylierung des Histon-3-Lysin-27 (H3K27) eine wichtige Rolle. Während H3K27-Trimethylierungen bei PF-B-EP häufig zu finden

sind, kommen sie in PF-A-EP deutlich seltener vor. PF-A-EP sind häufiger bei Säuglingen zu finden und haben eine schlechtere Prognose als PF-B-EP, die eher bei Erwachsenen und älteren Kindern auftreten (38). Durch (Tri-)Methylierung von H3K27 werden Transkriptionsvorgänge unterdrückt, die eine Rolle in der Plastizität von Gewebe spielen und somit Relevanz in der Tumorentstehung zeigen (40).

In Tabelle 3 ist eine Übersicht der unterschiedlichen EP-Subgruppen in der Histologie und im Vergleich dazu der Molekulargenetik dargestellt.

<p>Histologische Einteilung von Ependymomen</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Subependymome • Myxopapilläre Ependymome • Klassische Ependymome <ul style="list-style-type: none"> - klarzellige Ependymome - papilläre Ependymome - tanzytäre Ependymome • Anaplastische Ependymome
<p>Molekulargenetische Einteilung von Ependymomen</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Subependymome • Myxopapilläres Ependymom • Posterior Fossa A • Posterior Fossa B • RELA-fusionierte Ependymome • YAP-1 fusionierte Ependymome

Tabelle 3: Übersicht über die histologische und molekulargenetische Einteilung von Ependymomen

1.4. Inflammatorisches Microenvironment

1.4.1. Rationale

Grundsätzlich ist das menschliche Immunsystem in der Lage, Zellveränderungen zu detektieren und diese durch gezielte Korrekturmechanismen zu beseitigen, um eine mögliche Tumorentstehung zu verhindern. Wenn das Immunsystem geschwächt ist, wie beispielsweise bei krankheitsbedingter oder iatrogener Immunsuppression, oder genetische Veränderungen vorliegen, die diese Korrekturmechanismen behindern, können Zellen entarten und es kommt zur Tumorentstehung (41). Zusätzlich haben viele Tumore die Fähigkeit sich diesen Korrekturmechanismen zu entziehen, indem sie beispielsweise proliferative Signalkaskaden auslösen oder apoptotische Prozesse blockieren können (42). Bei Entstehung eines malignen Tumors, infiltriert dieser in der

Regel in das umliegende Gewebe und verursacht lokal einen Gewebsschaden. Ähnlich wie bei anderen Verletzungen reagiert das umliegende Gewebe auf diesen Schaden mit einer Entzündungsreaktion. Immunkompetente Zellen, vorrangig Mastzellen, wandern daraufhin in das verletzte Gewebe ein und schütten Histamin aus. Dies erhöht die Permeabilität der ortsständigen Blutgefäße und weitere Immunzellen wie Monozyten, neutrophile Granulozyten aber auch Zytokine und Interleukine können die Blutbahn verlassen und weitere Immunzellen rekrutieren. Üblicherweise ist eine Entzündungsreaktion selbstlimitierend. Im Falle eines malignen Geschehens kann der Heilungsprozess aber gestört sein. Umgekehrt kann aus einer chronischen Entzündung durch die kontinuierliche Reizung oder defekte Reparaturmechanismen auch ein neues Malignom entstehen (43). Um einen Tumor effektiv behandeln zu können, ist es notwendig so viel Kenntnis wie möglich über dessen Entstehungs- und Aufrechterhaltungsmechanismen zu haben. Daher werden sowohl die Tumorzellen selbst wie auch ihre unmittelbare Umgebung, ihr sog. Microenvironment (ME), genaustens auf Veränderungen zu gesundem Gewebe untersucht.

Das Tumor-ME besteht sowohl aus pathologisch veränderten wie auch aus physiologisch vorkommenden Zellen. Neben Immunzellen sind biochemische Mediatoren oder Proteine, die am Ablauf unterschiedlicher Signalkaskaden auf molekularer Ebene beteiligt sind, zu finden. Sie können das Tumorwachstum maßgeblich beeinflussen (44). Dazu gehören beispielweise Tumorassoziierte Makrophagen, Tumor Nekrose Faktor A (TNF- α), Interleukine oder NF κ B (43).

Im Folgenden werden fünf verschiedene Marker vorgestellt, die in dieser Arbeit auf ihr Vorhandensein im Tumor-ME von EP und MB untersucht werden.

1.4.2. L1CAM

Das L1-cell-adhesion-molecule (L1CAM) wurde 1984 entdeckt. Es ist auch unter dem Namen p65 bekannt und beschreibt ein etwa 200 kDa schweres transmembranöses Glykoprotein, welches eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion spielt, indem es an andere L1CAM oder an Zelladhäsionsmoleküle in der Zellmembran benachbarter Zellen binden kann. Es ist entscheidend an der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems beteiligt und gehört zur Familie der Immunglobuline (45-47). L1CAM spielt hierbei eine Rolle in der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), was den Vorgang der Zelldifferenzierung von epitheliale in mesenchymales Gewebe

beschreibt und epithelialen Zellen erlaubt, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und zu migrieren (46). Dies kann sowohl in der embryologischen Entwicklung als auch bei der Metastasierung von Tumoren beobachtet werden. Studien der vergangenen Jahre zeigten, dass L1CAM eine präzise Rolle im Tumorwachstum einnimmt. Das Review von Altevogt et al. (45) fasst die Tumorerkrankungen zusammen, in denen L1CAM nachgewiesen werden konnte und gibt Aufschluss über dessen Rolle in der Tumorbio­logie. Neben gynäkologischen Tumoren, wie Ovarial- oder Endometriumkarzinomen findet man eine L1CAM-Überexpression auch in Melanomen, gastrointestinale Tumoren (Magenkarzinomen, GIST, Hepatozelluläre Karzinomen, Gallenblasenkarzinomen, Ösophaguskarzinomen, Kolorektale Karzinome, Pankreaskarzinome), Nierenkarzinomen, Lungenkarzinomen, Prostatakarzinomen sowie Tumoren des Nervensystems. Eine L1CAM-Überexpression ist dabei mit einer schlechteren Prognose, schlechterem Ansprechen auf Therapien und einer erhöhten Neigung zu Invasion und Metastasierung verbunden.

Betrachtet man molekulare Pathways, so findet man unter anderem den WNT/ β -Catenin-Weg als Induktor von L1CAM (45). L1CAM ist zudem an der Aktivierung von NF κ B, einem Transkriptionsfaktor, der in vielen Tumoren in hochregulierter Form vorkommt, beteiligt (47). Weiterhin konnte es bereits auch in Tumorstadien und in entzündetem Gewebe nachgewiesen werden (45).

1.4.3. HER2

Der Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) beschreibt einen transmembranös gelegenen Wachstumsfaktorrezeptor. Durch extrazelluläre Bindung verschiedener Liganden können diverse intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden, die im Allgemeinen zu Zellproliferation und -differenzierung führen (48, 49). Nach der Bindung der Liganden, bei welchen es sich meist um Transkriptionsfaktoren handelt, kommt es zu einer Aktivierung der Rezeptoren in Form einer Homo- oder Heterodimerisierung mit weiteren HER-Rezeptoren (HER-1, HER-3, HER-4) oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Rezeptoren. Darauf folgt eine Autophosphorylierung der zum Rezeptor gehörigen intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase. Dies aktiviert weitere Signalkaskaden, wie beispielsweise die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase C (PKC). All diese Vorgänge haben Zellproliferation,

-differenzierung, -migration, -invasion und Angiogenesen zur Folge. Während die für die HER2-Expression spezifische RNA prinzipiell auf allen Geweben gefunden werden kann, konnte zusätzlich festgestellt werden, dass eine HER2- Überexpression auch in der Tumorgenese eine bedeutende Rolle einnimmt. Dies konnte bei vielen malignen Tumoren, vor allem mit epitheliale Ursprung, nachgewiesen werden. Als wichtigste Vertreter sind das Mammakarzinom, Magenkarzinome, Ovarial- und Endometriumkarzinome, aber auch Lungen- und Blasenkarzinome zu nennen. Bei Mammakarzinomen und Gastro-ösophagealen Tumoren konnten bereits verschiedene Therapieansätze erfolgreich etabliert werden, welche den HER2-Rezeptor als Target haben. Es handelt sich hierbei vor allem um immunologische Antikörpertherapien (49).

1.4.4. GD2

Bei Gangliosiden handelt es sich um eine Form von Lipiden, welche vor allem in Zellmembranen, überwiegend im Nervensystem, zu finden sind. Sie bestehen im Allgemeinen aus einem langkettigen Amino-Alkohol (Sphingosin), einer langkettigen Fettsäure (C18-C20) und einem meist großen Saccharidanteil. Die Nomenklatur setzt sich aus zwei Buchstaben und einer Zahl zusammen, welche Aufschluss über die Struktur des Gangliosids geben.

GD2 besteht aus Sphingosin, zwei Sialinsäureresten und drei Monosacchariden. Ganglioside kommen physiologisch in allen humanen Gewebetypen vor. Sie übernehmen unter anderem Aufgaben, wie Zellkommunikation oder die Regulation von intrazellulären Signalkaskaden, oft in Verbindung mit epidermalen oder vaskulären Wachstumsfaktoren. GD2 ist physiologisch nur in Nervengewebe (im zentralen und peripheren Nervensystem), wie auch in Melanozyten, Lymphozyten und mesenchymalen Stammzellen, aber auch in malignem Tumorgewebe zu finden. Hier sind vor allem Neuroblastome, kleinzellige Lungenkarzinome, Knochensarkome, Melanome, Gliome sowie Brust- und Blasenkarzinome zu nennen. In der Tumorphysiologie kann GD 2 zu einer erhöhten Proliferationsrate, Zellmigration und Invasion führen. Darüber hinaus scheint eine GD2-Expression mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptosemechanismen einherzugehen (50).

1.4.5. EphA2

Ephrin (Eph)-Rezeptoren gehören zur Familie der transmembranären Rezeptor-Tyrosinkinasen. In Folge extrazellulärer Bindung von Liganden oder durch Verknüpfung mit anderen Zelloberflächenrezeptoren können sie intrazelluläre Tyrosinkinasen aktivieren und somit Signalkaskaden anstoßen. Als Liganden fungieren Ephrine, welche als membrangebundene Proteine auf Zelloberflächen zu finden sind. Im Allgemeinen können diese Komplexe, je nach Aufbau des Liganden und nach Bindungspräferenzen, in zwei Subgruppen (EphA und EphB) unterteilt werden (51).

EphA2 hat physiologische Aufgaben im menschlichen Organismus, zu denen unter anderem embryologische Differenzierungen der Nieren oder der Linse sowie des Nervengewebes und des Gefäßsystems gehören. Des Weiteren konnte EphA2 auch in malignen Geweben nachgewiesen werden. Zu diesen gehören Prostata-, Mamma-, Colon- oder Lungenkarzinome, aber auch Melanome oder Tumore des ZNS wie das Glioblastom (51-53). Während EphA2 in gesundem Hirngewebe nicht zu finden ist, zeigt sich eine deutliche Überexpression in Tumorgewebe von Glioblastomen (54). Es spielt dabei eine Rolle in der Tumorprogression und Angiogenese. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es an verschiedenen Signalkaskaden, wie beispielsweise dem MAPK-, Integrin- oder G-protein gekoppelten und weiteren Signalwegen beteiligt ist, welche morphologische Zellveränderungen bewirken oder die Zellproliferation regulieren (53). Durch eine fehlende Hemmung von EGFR bei aktiviertem EphA2 kommt es beispielsweise zur Angiogenese (54). Im Einzelnen ist die Rolle von EphA2 in malignen Erkrankungen aber noch nicht abschließend geklärt und bedarf noch weiterer Forschung (51-53).

1.4.6. CD276

CD276 (auch bekannt als B7-H3) gehört zur sogenannten B7-Familie, welche eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, im Einzelnen in der T-Zell-Antwort, spielt. CD276 stellt dabei einen Immuncheckpoint dar (55). Bei Immuncheckpoints handelt es sich um Rezeptoren auf Immunzellen, welche autoimmune Reaktionen gegen körpereigenes Gewebe verhindern sollen. Erstmals wurde CD276 im Jahr 2001 von Chapoval et al. identifiziert und vorgestellt. Bei dessen Aktivierung sei eine Proliferation von CD4- und CD-8 positiven T-Zellen sowie zytotoxischer T-Zellen beobachtet worden (56). Liu et al. beschrieb 2021 in einer Arbeit über die Rolle von

CD276 in Krebserkrankungen eine dazu gegensätzliche, inhibitorische Wirkung von CD276 auf T-Zellen (55). Daneben wird über eine Reduktion der Ausschüttung von Zytokinen, wie unter anderem Interferon- γ (IFN- γ) oder TNF- α berichtet. Die exakte Wirkung von CD276 in inflammatorischem Gewebe bleibt also unklar, es gibt jedoch Hinweise auf einen engen Zusammenhang mit der Regulation inflammatorischer Zytokine. CD276 ist nicht im peripheren Blut, dafür aber in verschiedenen humanen Geweben nachweisbar. Dazu zählen neben Herz, Lunge, Leber, Darm, den männlichen und weiblichen Geschlechtsorganen, Nieren, Skelettmuskulatur und den lymphatischen Organen auch das Gehirn. Während es in gesundem Gewebe zumeist nur schwach exprimiert ist, konnte es in überexprimierter Form in zahlreichen malignen Tumorgeweben, wie beispielsweise in Melanomen, Cervixkarzinomen, Lungenkarzinomen, Kolorektalen Karzinomen und auch in Leukämien nachgewiesen werden (55, 56). Im Tumorgewebe ist CD276 an der Zellproliferation und -invasion, dem Zellzyklus, Autophagie und Apoptose wie auch EMT beteiligt. Metastasierungsprozesse und Angiogenese werden durch CD276 hochreguliert. Grundsätzlich korreliert die CD276-Expression durch die Induktion von oben genannten Tumorpherationsmechanismen mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf (55). Durch das vermehrte Vorkommen in malignem Gewebe stellt CD276 ein interessantes Ziel in der pharmakologischen Forschung bezüglich neuer Tumorthérapien dar. In den vergangenen Jahren wurde bereits vermehrt an CD276 als Zielstruktur für Immuncheckpoint-Inhibitor-Thérapien oder Antikörper-Thérapien gearbeitet und es zeigten sich *in vitro* sowie *in vivo* bereits erste vielversprechende Ergebnisse (55).

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das inflammatorische Microenvironment (IME) von MB und EP auf das Vorhandensein der fünf Antigene L1CAM, HER2, GD2, EphA2 und CD276 zu untersuchen sowie darzustellen, ob sich Unterschiede in den jeweiligen AG-Expressionen der einzelnen Subgruppen zeigen. Die Erkenntnisse sollen dem besseren Verständnis des Aufbaus und der Eigenschaften der genannten Tumore dienen und können Aufschluss über Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe geben. So können Wachstum, Invasion und Metastasierungsprozesse besser verstanden werden und gegebenenfalls mögliche neue Angriffspunkte für gezielte Tumorthérapien gefunden werden. Zudem kann ein unterschiedliches

Expressionsverhalten gegebenenfalls für eine vereinfachte Tumorklassifizierung verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Auswahl der Patienten und Gewebeproben

Es handelt sich bei der Arbeit um eine retrospektive Untersuchung bereits vorliegender Gewebeproben von pädiatrischen Hirntumoren. Die für diese Arbeit verwendeten Gewebeproben aus MB und EP stammen aus Operationen des Departments für Neurochirurgie und Neurotechnologie (Sektion pädiatrische Neurochirurgie) des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) und wurden in dem Zeitraum von 2010 - 2021 gewonnen. Die Gewebeproben wurden nach der Operation im Department für Pathologie und Neuropathologie (Abteilung Neuropathologie) der Universität Tübingen im Rahmen der klinischen Diagnostik untersucht und dort archiviert.

In der Datenbank für Neuropathologie wurden die Gewebeproben mit der Tumordiagnose „Ependymom“ oder „Medulloblastom“ ausgewählt. Die weiterführende Eingrenzung der Patienten wurde nach dem Alter bei der Operation vorgenommen. Eingeschlossen wurden pädiatrische Patienten im Alter von 0-20 Jahren. Die Tumorentität wurde primär durch die Neuropathologie des UKT histologisch bestimmt. Die Mehrzahl der Tumore wurde im Anschluss durch Teilnahme an der Molekulare Neuropathologie 2.0 (MNP2.0) – Studie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg (DKFZ) untersucht und die Tumorentität bestätigt sowie die genaue molekulargenetische Subgruppe bestimmt. Die molekulargenetische Untersuchung erfolgte mittels Methylierungsanalyse sowie zielgerichteter Genpanel-Sequenzierung (57).

Es wurden insgesamt 62 Patienten mit MB-Diagnose primär analysiert. 32 Patienten oder Proben konnten aus folgenden Gründen nicht eingeschlossen werden: unklare Tumorentität, keine Gewebeproben in der Neuropathologie vorliegend, Pathologiebefund oder Patient im Patientenportal Industry Solution Healthcare-Programms (ISH) nicht auffindbar oder keine erfolgte Operation (OP) am UKT. Unter den verbleibenden 30 Patienten hatte ein Patient Primärtumore an zwei verschiedenen Lokalisationen. Diese wurden als zwei eigenständige Gewebeproben behandelt. Insgesamt lagen somit 31 Gewebeproben vor. Vier der Gewebeproben waren

aufgrund Destruktionen beim Färbeprozess nicht auswertbar. So beschränkt sich die Gesamtzahl der auswertbaren MB auf 27 Tumorgewebeproben.

Es wurden insgesamt 44 Patienten mit EP-Diagnose analysiert. 19 Patienten oder Proben konnten aus folgenden Gründen nicht eingeschlossen werden: unklare Tumorentität, keine Gewebeproben in der Neuropathologie vorliegend, Pathologiebefund oder Patient im Patientenportal (ISH) nicht auffindbar, keine erfolgte OP am UKT. Bei den verbleibenden 25 Patienten erfolgten sechs Rezidiv-Operationen, die jeweils als eigenständige Gewebeproben behandelt wurden. Insgesamt lagen somit 31 Gewebeproben vor. Eine der Gewebeproben war nicht auswertbar. So beschränkt sich die Gesamtzahl der EP auf 30 Tumorgewebeproben. Eine genaue Ausführung der Inklusionskriterien und der geeigneten Gewebeproben ist Abbildung 4 zu entnehmen.

Da es sich bei der Untersuchung um eine retrospektive Analyse an bereits gewonnenem Gewebematerial handelt, war die Stichprobenzahl n in dieser Hinsicht begrenzt und konnte nicht erhöht werden.

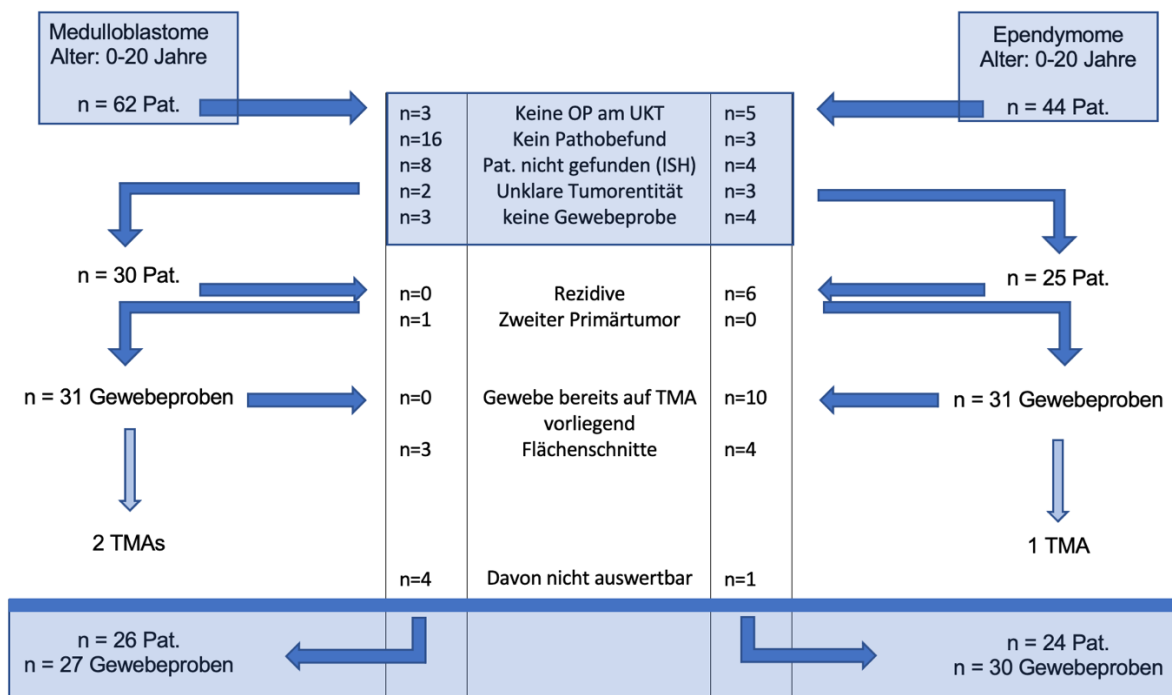


Abbildung 4: Flussdiagramm über Inklusions- und Exklusionskriterien der MB- und EP-Gewebeproben

Die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen hat der Verwendung und Begutachtung der Gewebeproben sowie der Durchführung dieser Studie zugestimmt (Ethik-Antrag-Nr. 488/2020BO). Ein positives Votum der Biobank des Zentrums für Neuroonkologie vom 08.01.2021 liegt vor (ZNO-Antrag Nr. ZNO62).

2.2. Auswahl der Antigene

Die Antigene (AG) L1CAM, HER2, EphA2, GD2 und CD276 wurden in Zusammenarbeit mit Kolleg:innen der pädiatrischen Onkologie des Universitätsklinikums Tübingen ausgewählt. Die ausgewählten AG spielen eine Rolle in der Tumorphysiologie und des Tumorwachstums und konnten im Einzelnen bereits im Gewebe oder IME anderer Tumore nachgewiesen werden. Sie können Hinweise auf Wachstumsverhalten oder Metastasierungsprozesse geben oder könnten als Target in Tumorthapien genutzt werden.

2.3. Datenerhebung

Die Patienteninformationen wurden mit Hilfe des Industry Solution Healthcare (ISH)-Programms des UKT erhoben (SAP ERP 6.0, © SAP EP, Walldorf). Zu den erhobenen Daten gehörten: Geschlecht, Gewebediagnose (histologisch und molekular über die MNP2.0-Studie), Alter bei Operation, Tumorlokalisation, Resektionsstatus, vorangegangene Therapien, nachfolgende Therapien, Rezidivstatus, Metastasierungsstatus, Behandlungsdauer (follow-up) und gegebenenfalls der Todeszeitpunkt. Alle Patientendaten wurden in pseudonymisierter Form mit den dazugehörigen Blocknummern und Fallnummern der Gewebeproben in einer Tabelle zusammengestellt.

2.4. Gewinnung des Tumorgewebes und Herstellung der histologischen Präparate

Die Tumore wurden bei gegebener Indikation zur Resektion zwischen 2010 und 2021 durch Neurochirurgen des Departments für Neurochirurgie und Neurotechnologie (Sektion pädiatrische Neurochirurgie) des UKT entfernt. Die Tumorproben wurden noch im OP in 4%-Formalin und phosphatgepufferter Salzlösung eingelegt und in die Neuropathologie geschickt, wo meist primär eine Schnellschnittdiagnostik durch einen

Facharzt für Neuropathologie zur Diagnosesicherung erfolgte. Danach wurden die Gewebeproben in Paraffinblöcke eingebettet. Aus diesen Blöcken wurden anschließend weitere (meist immunhistochemische) Untersuchungen angeordnet und das Gewebe gegebenenfalls an referenzpathologische Institute geschickt, um die Diagnose durch weitere Neuropathologen zu bestätigen. Die histologische Diagnose erfolgte hierbei nach den bekannten Kriterien der WHO. Die Tumore wurden darüber hinaus, nach Zustimmung der Eltern der Patient:innen, molekularbiologisch durch Methylierungsanalyse und zielgerichteter Genpanel-Sequenzierung untersucht und die genaue molekulare Diagnose wurde im Rahmen der MNP2.0-Studie des DKFZ gesichert (57). Die in Paraffin fixierten Tumorproben werden im Archiv der Neuropathologie Tübingen gelagert und stehen dort für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung.

2.5. Tissue Microarray Methode

Die Tissue Microarray (TMA)-Methode ermöglicht eine gleichzeitige Untersuchung mehrerer Gewebeproben. Teile der in Paraffin eingebetteten Gewebeproben können zylinderförmig ausgestanzt und in einen leeren Paraffinblock (Empfängerblock) mit vorgefertigten leeren Stanzlöchern eingesetzt werden. So entsteht ein Paraffinblock mit vielen nebeneinanderliegenden Gewebeproben. Dieser Block kann dann geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und histologisch eingefärbt werden. Zu jedem TMA gibt es eine Übersicht, auf der erkennbar ist, welche Probe sich an welcher Stelle befindet. Diese Methode ist besonders effizient und bietet eine gute direkte Vergleichbarkeit mehrerer Gewebeproben durch einheitliche Färbung und Auswertung. Die Anwendung der TMA-Methode bietet damit auch eine gute Reproduzierbarkeit und Durchführung von Folgestudien, da repetitiv immer wieder die gleichen Gewebeproben untersucht werden können, zu denen bereits klinische Daten gesammelt und zusammengestellt wurden (58).

2.5.1. Herstellung der TMAs

Von jedem Paraffinblock lag ein Gewebeschnitt auf einem Objektträger in HE-Färbung vor, in welchem der Tumor vorab auf die Tauglichkeit für die Erstellung einer TMA untersucht wurde. Falls ein HE-Schnitt seinem Paraffinblock aufgrund von Inkongruenzen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden konnte, wurde ein neuer Schnitt in HE-Färbung hergestellt. Die geeigneten Stellen zur Probenentnahme

wurden auf dem Objektträger mit der HE-Färbung markiert. Geeignet waren Proben, auf denen ausreichend Tumorgewebe vorhanden war, so dass mindestens eine Stanze entnommen werden konnte.

Das Prinzip der TMA-Methode wurde bereits in Abschnitt 2.5 vorgestellt. Die TMA-Herstellung erfolgte mit einem Manual Tissue Microarrayer (Model MTA-1, Beecher Instruments, Inc., Wisconsin, USA)). Im Bodenbereich des Gerätes wurde ein leerer Paraffinblock (Empfängerblock) mit zwei Stellschrauben eingespannt und fixiert, so dass er unverschiebbar war. Über diesen Block wurde eine Brücke gestellt, welche als Ablage für den Spenderblock mit der Tumorprobe dient. Anschließend wurde eine zylinderförmige Probe mit einem Durchmesser von 1mm aus dem zuvor markierten geeigneten Bereich des Spenderblocks ausgestanzt. Die Brücke und der Spenderblock wurden entfernt. Dann wurde der Kopf des Gerätes so geschwenkt, dass sich die zweite Stanze des Gerätes in der Arbeitsposition befand. Mit dieser zweiten Stanze wurde ein Loch von 1mm Durchmesser in den zuvor eingespannten Empfängerblock gestanzt. Anschließend wurde der Kopf des Gerätes zurück geschwenkt, so dass die erste Stanze, in der sich noch die Tumorprobe befand, wieder in der Arbeitsposition stand. Nun konnte die Tumorprobe vorsichtig in die vorgefertigte Position des Empfängerblockes eingebracht werden. Anschließend wurde der Schwenkkopf mit der Stanzvorrichtung um 3 mm nach rechts bzw. unten verschoben und wie oben beschrieben fortgefahren. So wurde der anfangs leere Paraffinblock mit Tumorproben gefüllt, die neben- und untereinanderliegend in sechs Reihen und zehn Spalten angeordnet wurden. Nach Möglichkeit wurden pro Tumor zwei Tumorproben eingesetzt. Bei drei EP und zwei MB reichte das Gewebe nur für eine Stanze. Bei zwei Medulloblastomen konnten drei Proben entnommen werden. Durch das Verwenden mehrerer Proben pro Tumor kann eine exaktere Beurteilbarkeit erzielt werden. Außerdem kann einem Gewebsverlust, welcher beim Schneiden und Färben durch Brüche der Tumorproben vorkommen kann, entgegengewirkt werden. Zur besseren Orientierung und eindeutigen Zuordnung der Tumore auf den späteren TMA-Schnitten wurden in Spalte 9 (I) keine Proben und in Spalte 10 (J) in Zeile 1 und 2 jeweils zwei Kontrollgewebe eingesetzt. Bei den Kontrollgeweben handelte es sich um Gewebeproben eines Pankreaskarzinoms und eines Bronchialkarzinoms. Abschließend wurden die Paraffinblöcke für drei Minuten bei ca. 40°C erwärmt und mit einem Objektträger flachgedrückt. Dies diente der Versiegelung der Proben und der Gewährleistung, dass sich alle Proben auf demselben Höhenniveau befanden. Ein

Plan der erstellten TMAs ist im Anhang (Anl. 1.1 bis 1.3) zu finden. Eine Darstellung der hergestellten TMA-Blöcke ist exemplarisch in Abbildung 5 zu sehen.

Aus den EP wurde ein neues TMA (TMA 3-21) erstellt. Vier EP-Proben waren aufgrund zu dünner Paraffinblöcke nicht für eine TMA geeignet. Aus diesen vier Tumoren wurden Flächenschnitte angefertigt, die ebenfalls mit den zu untersuchenden Antikörpern angefärbt und ausgewertet werden konnten. Zehn von den 24 geeigneten EP lagen bereits auf zwei TMAs von Doktorandenarbeiten aus dem Jahr 2018 vor. Diese TMAs wurden ebenfalls zur Färbung genutzt. Ein Tumor konnte hier aufgrund von zu wenig Gewebe auf dem TMA nicht ausgewertet werden. Aus den MB entstanden zwei neue TMAs (TMA 1-21 und TMA 2-21). Drei MB-Proben waren aufgrund zu dünner Paraffinblöcke nicht für eine TMA geeignet. Aus diesen drei Tumoren wurden Flächenschnitte angefertigt, die ebenfalls mit den zu untersuchenden Antikörpern angefärbt und ausgewertet werden konnten. Vier der MB konnten aufgrund Destruktionen beim Färbeprozess nicht ausgewertet werden.



Abbildung 5: Darstellung eines für die Arbeit hergestellten TMA-Blockes (TMA1-21)

2.6. Herstellung der mikroskopischen Präparate

Um die TMAs färben zu können, ist es notwendig zuvor Flächenschnitte von ihnen herzustellen. Diese wurde mit einem Rotationsmikrotom Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland) mit Mikrotomklingen A35 (Feather, Osaka, Japan) hergestellt. Die Schichtdicke der angefertigten Schnitte betrug 4µm. Die geschnittenen Proben wurden anschließend auf Objektträger aufgetragen. Für die HE-Schnitte wurden Superfrost Objektträger (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) verwendet. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden TOM-1190 Objektträger (TOMO, Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) verwendet. Es wurden jeweils acht solcher Leerschnitte pro TMA hergestellt, um sie im

anschließenden Schritt mit den entsprechenden fünf immunhistochemischen Färbungen oder in HE einzufärben. Zwei Schnitte dienten der Reserve.

2.7. Färbeverfahren

2.7.1. Entparaffinisierung

Zur Entparaffinisierung wird die Gewebeprobe dreimal für zehn Minuten in Xylol, einem aromatischen Kohlenwasserstoff, inkubiert und anschließend in einer Alkoholreihe (Zweimal 100%-Ethanol, dann einmal 96%-Ethanol und abschließend einmal 70%-Ethanol) eingelegt. Dies dient der Entwässerung. Anschließend folgt eine Spülung mit destilliertem Wasser (Aqua dest.).

2.7.2. Hämatoxylin-Eosin (HE)

Zuerst erfolgte eine eineinhalb-minütige Inkubation in Mayers Hämalaun. Es folgten zwei Spülungen mit Aqua dest., eine Spülung unter fließendem Leitungswasser und anschließend wieder eine Spülung mit Aqua dest. Als nächstes wurde die Gegenfärbung mit 0,1% - Erythrosin vorgenommen. Nach dem Einlegen in vergälltem Ethanol (erst 70%-Ethanol, dann in 96%-Ethanol und zweimalig in 100%-Ethanol) folgte eine dreimalige Klärung in Xylol. Abschließend wird die Gewebeprobe mit einem Einschlussmittel (HICO-MIC) fixiert und ein Deckglas aufgelegt.

Die HE-Färbung diente der Übersicht der TMA-Blöcke und Flächenschnitte. In der HE-Färbung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, ob die erstellten TMAs genügend Tumorgewebe enthalten und für eine Auswertung geeignet sind oder ob beim Schneide- oder Färbeprozess Stanzen beschädigt wurden und aus der Wertung genommen werden mussten.

2.7.3. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie (IHC) werden AG durch spezifische Färbungen sichtbar gemacht. Dies ist möglich, indem Gewebe mit speziellen Antikörpern (AK) gefärbt werden, die an die entsprechenden AG binden. Diese AK-AG-Komplexe können im Anschluss farblich sichtbar gemacht werden.

Die IHC-Färbungen erfolgten durch den Färbeautomat Ventana BenchMark GX (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) sowie dem OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA). Die jeweiligen Färbeprotokolle sind den Abschnitten 2.7.3.1 bis 2.7.3.5 zu entnehmen.

Eine Übersicht der verwendeten Antikörper und Färbesubstanzen ist in Tabelle 4 aufgeführt.

2.7.3.1. L1CAM

Zuerst wird die zu färbende Gewebeprobe, welche bereits auf dem Objektträger aufgebracht ist, bei 72°C für vier Minuten gebacken. Danach erfolgt eine 32-minütige Vorbehandlung mit CC1, einer Puffersubstanz. Abschließend erfolgt die Antikörper Inkubation für 32 Minuten bei Raumtemperatur. Die Verdünnung betrug 1:8000.

2.7.3.2. HER2

Zuerst wird die zu färbende Gewebeprobe, welche bereits auf dem Objektträger aufgebracht ist, bei 72°C für vier Minuten gebacken. Danach erfolgt eine 16-minütige Vorbehandlung mit CC1, einer Puffersubstanz. Abschließend erfolgt die Antikörper Inkubation für 12 Minuten bei 37°C. Die Verdünnung betrug 1:500.

2.7.3.3. GD2

Zuerst wird die zu färbende Gewebeprobe, welche bereits auf dem Objektträger aufgebracht ist, bei 72°C für vier Minuten gebacken. Danach erfolgt eine 64-minütige Vorbehandlung mit CC1, einer Puffersubstanz. Abschließend erfolgt die Antikörper Inkubation für 32 Minuten bei Raumtemperatur. Die Verdünnung betrug 1:200.

2.7.3.4. EphA2

Zuerst wird die zu färbende Gewebeprobe, welche bereits auf dem Objektträger aufgebracht ist, bei 72°C für vier Minuten gebacken. Danach erfolgt eine 32-minütige Vorbehandlung mit CC2, einer Puffersubstanz. Abschließend erfolgt die Antikörper Inkubation für 32 Minuten bei Raumtemperatur. Die Verdünnung betrug 1:800.

2.7.3.5. CD276

Zuerst wird die zu färbende Gewebeprobe, welche bereits auf dem Objektträger aufgebracht ist, bei 72°C für vier Minuten gebacken. Danach erfolgt eine 64-minütige Vorbehandlung mit CC1, einer Puffersubstanz. Abschließend erfolgt die Antikörper Inkubation für 32 Minuten bei 37°C. Die Verdünnung betrug 1:75.

2.8. Lichtmikroskopische Bewertung

Alle TMAs wie auch Flächenschnitte wurden mit dem Mikroskop (OLYMPUS VANOX AHBT3, Tokio, Japan) im Department für Pathologie und Neuropathologie (Abteilung Neuropathologie) des UKT lichtmikroskopisch gesichtet und ausgewertet. Das Gerät verfügt über fünf Vergrößerungsobjektive (20x, 100x, 200x, 400x und 1000x). Die Beurteilung der Gewebeproben erfolgte stets unter 20-facher Vergrößerung. Zunächst wurde in der HE-Färbung geprüft, ob es sich bei dem Gewebe auf den TMAs um den zu untersuchenden Tumor handelt und ob genügend Gewebe auf den Objektträgern abgebildet ist, um ihn die Probe die Auswertung mitaufzunehmen. Bei den TMA-Stanzen der EP waren drei Proben ungeeignet. Aufgrund des Aufbringens mehrerer Gewebeproben pro Tumor konnten zwei der betroffenen Gewebeproben durch Auswertung der anderen Stanzen trotzdem verwertet werden.

Bei den TMAs und Flächenschnitten der MB waren 16 Proben ungeeignet. Aufgrund des Aufbringens mehrerer Gewebeproben pro Tumor konnten 12 der betroffenen Gewebeproben durch Auswertung der anderen Stanzen trotzdem verwertet werden.

Zur Auswertung der IHC-Färbungen wurde je ein repräsentatives Areal ausgewählt, als Foto abgespeichert und anschließend ausgewertet. Wenn mehr als eine Stanze pro Tumorgewebeprobe vorhanden war, wurde aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet. Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, dass die Helligkeitsstufe bei jeder Färbung gleich eingestellt war, um zu verhindern, dass die Intensität der eingefärbten Zellen unterschiedlich beurteilt werden könnten.

2.8.1. L1CAM Auswertungskriterien

Es handelt sich um eine zytoplasmatische Färbung. Als positiv wurde die Probe gewertet, wenn >10% der Zellen angefärbt wurden. Des Weiteren wurde je nach Menge der angefärbten Zellen in insgesamt 5 Gruppen unterschieden:

0: negativ, <10% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

1: bis 25% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

2: 25 bis 50% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

3: 50 bis 75% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

4: 75 bis 100% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

Eine qualitative Auswertung ist bei der immunhistochemischen Untersuchung von L1CAM nicht Usus und wurde in dieser Arbeit daher vernachlässigt, um eine

Vergleichbarkeit zu L1CAM-Expressionsmustern in anderen wissenschaftlichen Arbeiten zu ermöglichen.

2.8.2. HER2 Auswertungskriterien

2007 wurden Empfehlungen zur histologischen Auswertung von HER2-positiven Gewebeproben vom American Society of Clinical Oncology (ASCO) und College of American Pathologists (CAP) veröffentlicht (59). Diese dienen einer einheitlichen histologischen Bewertung und Einteilung und ermöglichen eine bessere interindividuelle Beurteilbarkeit. Hintergrund dieser Empfehlung waren die häufig vorkommenden HER-positiven Mammakarzinome, welche angesichts ihres HER-Status unterschiedlichen Therapien zugeführt werden können. So kann weitestgehend eine einheitliche Therapieleitlinie verfolgt werden und allen Patienten eine tumorspezifische Therapie angeboten werden.

In dieser Arbeit werden die Empfehlungen der ASCO und CAP angewendet und die HER2-gefärbten Gewebe nach diesen ausgewertet. Eine schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Beurteilung ist Abbildung 6 zu entnehmen.

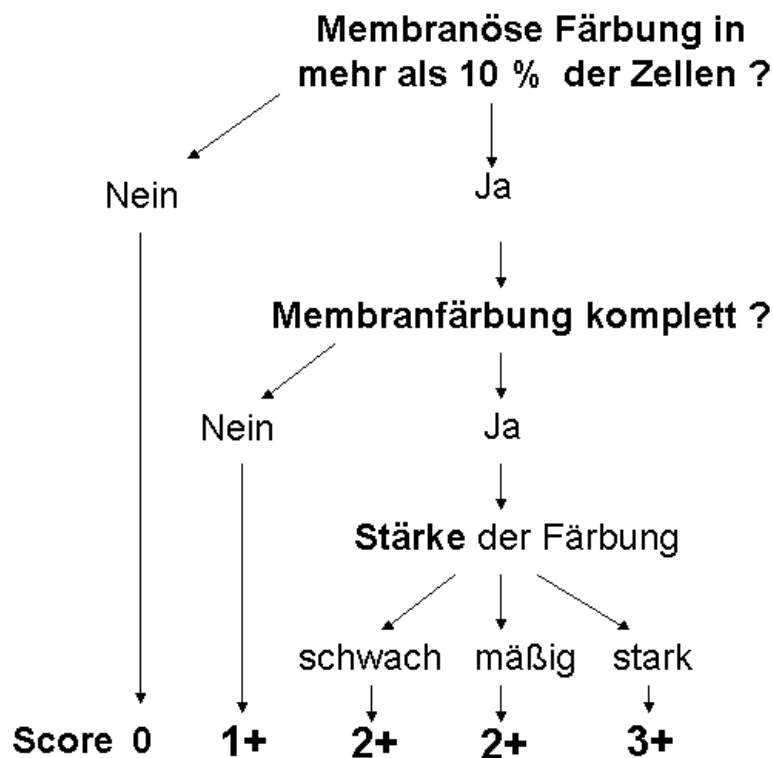


Abbildung 6: schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Beurteilung von IHC-HER2-gefärbten Gewebeproben (60)

2.8.3. GD2 Auswertungskriterien

Es handelt sich um eine zytoplasmatische und membranöse Färbung. Positiv wurden die Proben gewertet, deren Anteil angefärbter Zellen >10% betrug. Je nach Menge der angefärbten Zellen wurden insgesamt 5 Gruppen unterschieden:

0: negativ, <10% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

1: bis 25% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

2: 25 bis 50% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

3: 50 bis 75% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

4: 75 bis 100% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

Die Intensität der Färbung wurde mithilfe einer dreistufigen Skala eingeteilt:

1: schwach gefärbt

2: mittel/moderat gefärbt

3: stark gefärbt

2.8.4. EphA2 Auswertungskriterien

Es handelt sich um eine zytoplasmatische und membranöse Färbung. Als positiv wurde die Probe gewertet, wenn >10% der Zellen angefärbt wurden. Des Weiteren wurde je nach Menge der angefärbten Zellen in insgesamt 5 Gruppen unterschieden:

0: negativ, <10% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

1: bis 25% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

2: 25 bis 50% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

3: 50 bis 75% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

4: 75 bis 100% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

Die Intensität der Färbung wurde mithilfe einer dreistufigen Skala eingeteilt:

1: schwach gefärbt

2: mittel/moderat gefärbt

3: stark gefärbt

2.8.5. CD276 Auswertungskriterien

CD276 zeigt eine membranöse Färbung bei Positivität. Als positiv wurden Proben gewertet, wenn >10% der Zellen angefärbt werden konnten. Weiterführend wurde je nach Menge der angefärbten Zellen in insgesamt 5 Gruppen unterschieden:

0: negativ, <10% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

1: bis 25% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

- 2: 25 bis 50% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar
- 3: 50 bis 75% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar
- 4: 75 bis 100% der Zellen stellten sich in der Färbung positiv dar

Die Intensität der Färbung wurde mithilfe einer dreistufigen Skala eingeteilt:

- 1: schwach gefärbt
- 2: mittel/moderat gefärbt
- 3: stark gefärbt

2.8.6. Übersicht der Intensitätsskala

Für die Auswertung der Färbungsintensität wurde bei L1CAM, EphA2, GD2 und CD276 je eine identische Skalierung der Intensitätsstufen gewählt. In Abbildung 7 ist eine Übersicht über die Intensitätsstufen zur Veranschaulichung dargestellt.

Exemplarisch wurden hierfür EphA2-Färbungen von EP verwendet.

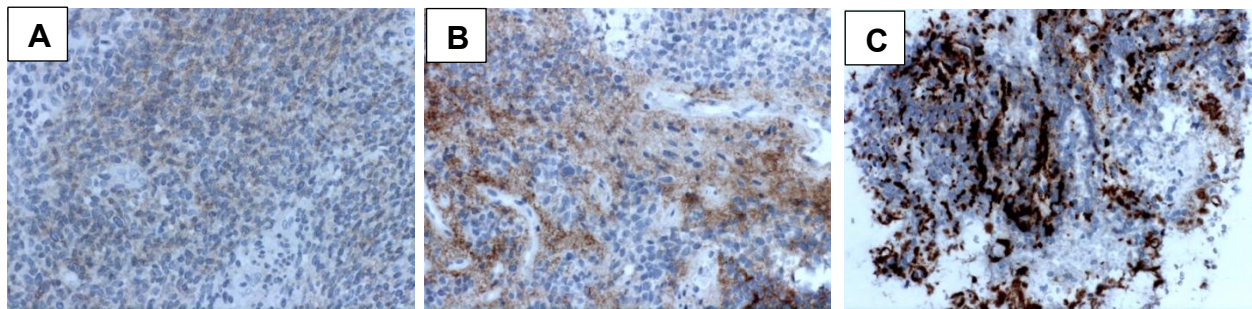


Abbildung 7: exemplarische Darstellung der Intensitätsstufen für die AG-Färbungen L1CAM, EphA2, GD2 und CD276. In dieser Abbildung ist die Intensität zunehmend von links nach rechts (A: score 1; B: score 2; C: score 3) dargestellt. Es handelt sich jeweils um Ependymome in EphA2-Färbung

2.9. Übersicht der Materialien

2.9.1. TMAs

- Paraffinblöcke: Spezialparaffin für Histologie, SAV Liquid Production (Flintsbach am Inn, Deutschland); Einbettkassetten, KABE Labortechnik GmbH (Wiehl-Bomig, Deutschland)

2.9.2. Antikörper und Färbesubstanzen

- HE-Färbung:
- Xylol: Diagonal (Münster, Deutschland)
 - Ethanol (100%, 96%, 70%): AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
 - vergälltes Ethanol (100%, 96%, 70%): Alkoholvertrieb Süd GmbH (Horb am Neckar, Deutschland)
 - Hämalalaun: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
 - Erythrosin: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
 - Aqua dest.: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Antikörper	L1CAM	HER2	GD2	EphA2	CD276
Hersteller	Sigma	Dako	Millipore	Santa Cruz	Bio SB
Protokoll-Nr.	96	993	542	4	8
Spezifität	Monoklonal	Polyklonal	Monoklonal	Monoklonal	Monoklonal
Wirt	Maus	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen
AG Spezies	Human	Human	Human	Human	Human
Isotyp	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
Verdünnung	1:8000	1:500	1:200	1:800	1:75
Puffer- vorbehandlung (Dauer)	CC1 (32 min)	CC1 (16 min)	CC1 (64 min)	CC2 (32 min)	CC1 (64 min)
AK- Inkubationszeit	32 min.	12 min.	32 min.	32 min.	32 min.
Temperatur	Raum- temperatur	37°C	Raum- temperatur	Raum- temperatur	37°C
Negativkontrolle	Endothelien	Endothelien			Tonsille

Tabelle 4: Übersicht der AK-Färbesubstanzen und ihrer Eigenschaften

Cell Conditioner 1 (CC1): leicht basische, TRIS-haltige Puffersubstanz (Produktinformation, Roche (61)): Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, Arizona, USA)

Cell Conditioner 2 (CC2): leicht saure, Citrathaltige Puffersubstanz (Produktinformation, Roche (62)): Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, Arizona, USA)

Durch Behandlung der Gewebeproben mit den Cell Conditionern kommt es zur Lösung der kovalenten Bindungen. Dadurch werden die AG freigelegt und es kann eine bessere Bindung der AK erfolgen.

2.9.3. Geräte

- Stanzgerät: Manual Tissue Microarrayer (Model MTA-1, Beecher Instruments, Inc., Wisconsin, USA)
- Färbung: Ventana BenchMark GX (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA)
- Mikroskop: Olympus VANOX AHB3 (Tokio, Japan)

2.9.4. Statistische Analyse

Die Erstellung der Tabelle zur Datensammlung der Patienteninformationen erfolgte mit Microsoft Excel Office 365 Plus (© Microsoft 2016). Die statistische Analyse wurde mit dem Programm IBM SPSS (Version 28.0.0.1, © IBM Corporations) durchgeführt. Primär erfolgte die Erfassung der deskriptiven Statistik über Erstellung von Häufigkeitstabellen und Histogrammen. Bei ordinalskalierten Ergebnissen für HER2, L1CAM, EphA2, GD2 und CD276 wurden neben den Häufigkeitsverteilungen der Median als Lagemaß und die 25%- sowie die 75%-Quartile als Streuungsmaße erfasst. Mithilfe von Kreuztabellen und dem Chi-Quadrat-Test wurden Zusammenhänge zwischen den molekulargenetischen Subgruppen und den erhobenen Daten für die AG erfasst. Für eine genauere Analyse der Unterschiede in den einzelnen Subgruppen und Bestimmung der Signifikanzen wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) für >2 unverbundene Stichproben genutzt.

Zum Vergleich von Medulloblastomen und Medulloblastomen wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) genutzt und gruppierte Balkendiagramme zur optischen Darstellung erstellt.

Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests auf $< 0,05$ festgelegt.

Die Nullhypothese lautete jeweils: Die Verteilung der AG-Expression (Quantität bzw. Intensität) ist in den einzelnen molekulargenetischen Subgruppen von MB bzw. EP identisch.

Bei einer Signifikanz von $<0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und folgende Alternativhypothese angenommen: Die Verteilung der AG-Expression (Quantität bzw. Intensität) ist in den einzelnen molekulargenetischen Subgruppen von MB bzw. EP nicht identisch. Es liegt eine Abhängigkeit der AG-Expression von der molekulargenetischen Subgruppe vor.

3. Ergebnisse

3.1. Medulloblastome

Es wurden insgesamt 27 MB untersucht. Molekulargenetisch konnten die Tumore wie folgt eingeteilt werden: SSH (n=4), WNT (n=4), Gruppe 3 (n=5), Gruppe 4 (n=12), kein Hinweis auf SHH oder WNT-Aktivierung (n=2) (3). Die Proben stammten von neun Mädchen und 17 Jungen. Das mittlere Alter bei OP betrug 8,04 Jahre (Standardabweichung: 4,67) bei einer Range von 2 – 18 Jahren. Es lagen acht Metastasierungen (SHH n=6, WNT n=0, Gruppe 3 n=1, Gruppe 4 n=1) bereits bei Diagnosestellung vor. Spätere Metastasierungen zeigten sich keine. Keines der Kinder/Jugendlichen entwickelte ein Rezidiv. Bei allen untersuchten MB handelte es sich um Primärtumore. Ein Patient wies zwei Primärtumore auf, welche je als eigenständiger Tumor untersucht wurden.

Eine graphische Darstellung der Verteilung der molekularen Klassifizierung (bestimmt mittels 450k bzw. 850I Array im Rahmen der MNP2.0-Studie) innerhalb der Gruppe der MB ist Abbildung 8 zu entnehmen.

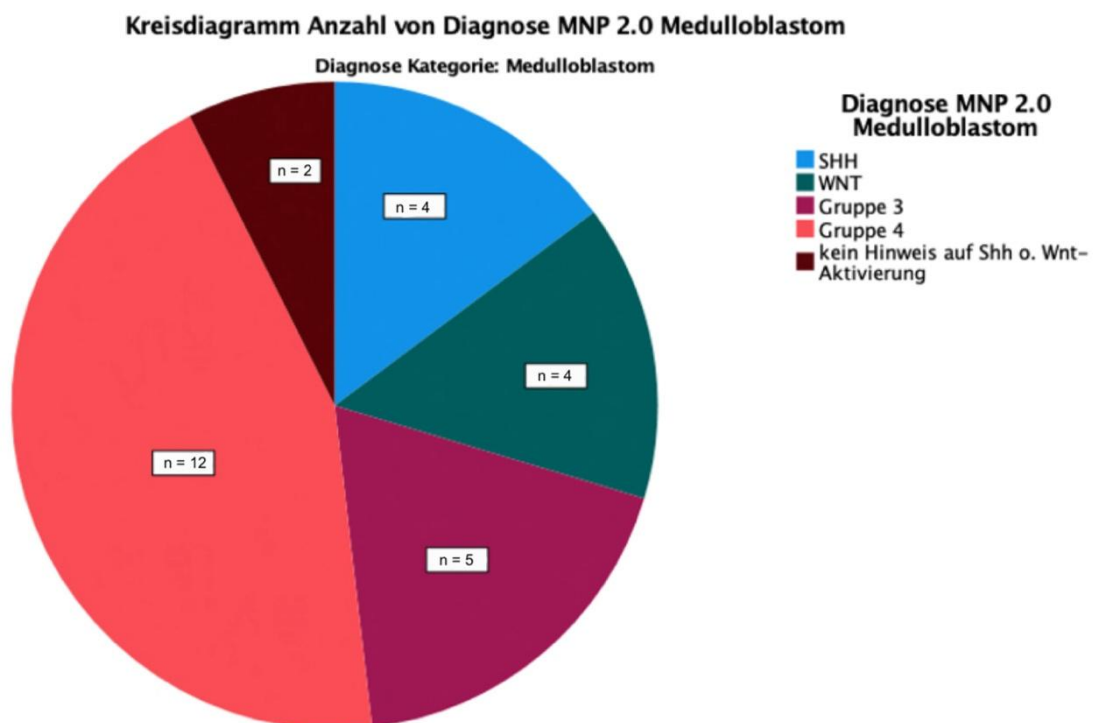


Abbildung 8: Kreisdiagramm, Verteilung der molekulargenetischen Diagnosen innerhalb der Gruppe der Medulloblastome, n=27

3.1.1. HER2 – Medulloblastome

Für die HER2-Färbung konnten 26 der 27 MB ausgewertet werden.

Keine dieser Proben (n=26) zeigten eine HER2-Expression (score 0) (3). Es konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen den molekulargenetischen Subgruppen festgestellt werden.

3.1.2. L1CAM – Medulloblastome

Für die L1CAM-Färbung wurden 27 MB analysiert. Die Verteilung der quantitativen L1CAM – Anfärbung (0 = negativ, 1 = bis 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%) unter allen MB lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 2.1 und dem Histogramm in Abbildung 9 entnehmen. Median = 2,5; Range=0-4; Q₁=0; Q₃=3,5

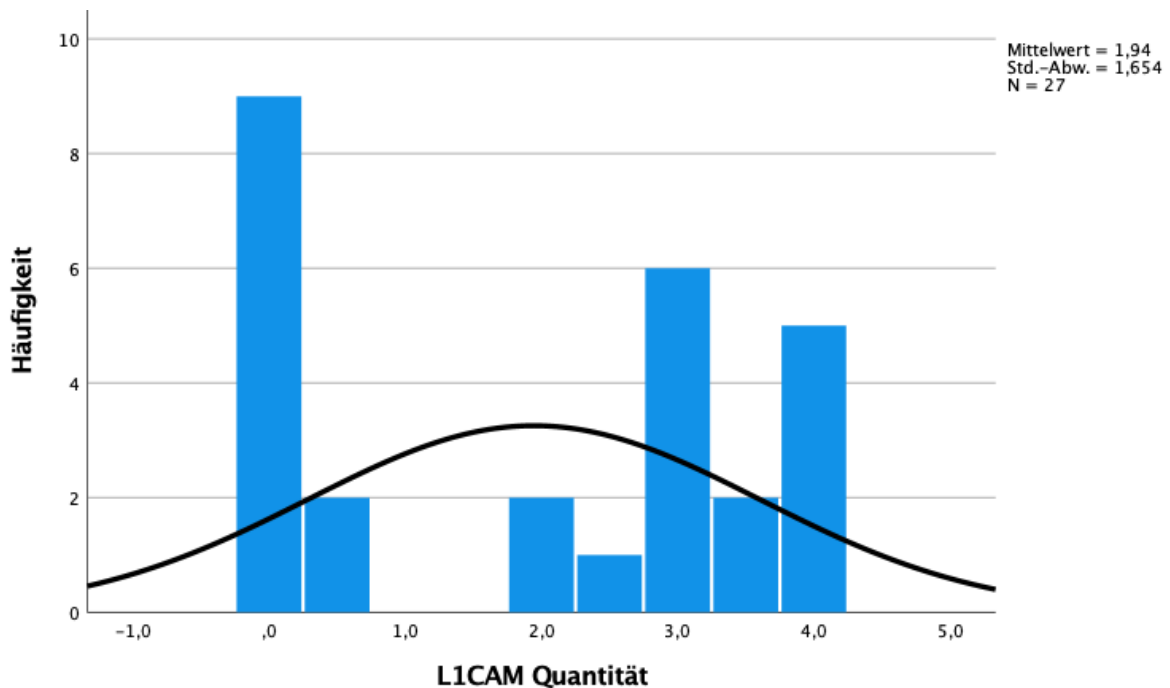


Abbildung 9: Histogramm zur L1CAM-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die L1CAM-Expression quantitativ wie in Tabelle 5 und im Boxplot in Abbildung 10 dargestellt:

L1CAM-Quantität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	Gesamt
SHH	3	1	0	0	0	0	0	0	0	4
WNT	0	0	0	0	1	0	1	0	2	4
Gruppe 3	3	1	0	0	0	0	1	0	0	5
Gruppe 4	2	0	0	0	1	1	3	2	3	12
Kein Hinweis auf SHH/WNT-Aktivierung	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Gesamt	9	2	0	0	2	1	6	2	5	27

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung L1CAM-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

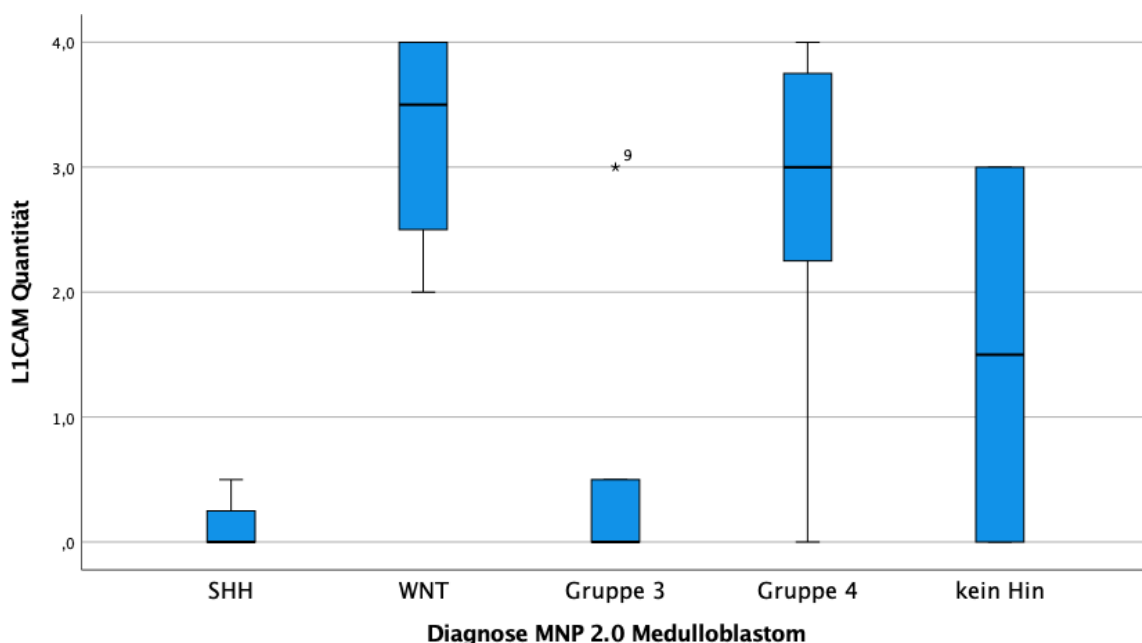


Abbildung 10: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der L1CAM-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

Bei den WNT-MB (Median=3,5; Range=2,0–4,0; $Q_1=2,5$; $Q_3=4,0$) und den Gruppe 4-MB (Median=3,0; Range=0,0–4,0; $Q_1=2,25$; $Q_3=3,75$) lässt sich eine stärkere quantitative Expression von L1CAM beobachten als bei SHH-MB (3) (Median=0; Range=0,0–0,5; $Q_1=0,0$; $Q_3=0,25$) und Gruppe 3-MB (Median=0; Range=0–0,5; $Q_1=0,0$; $Q_3=0,5$). Diese Unterschiede in der quantitativen Expression von L1CAM stellten sich im Chi-Quadrat-Test als nicht-signifikant dar ($p=0,575$). Bei weiterer Testung mittels Kruskal-Willis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,025$). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen zeigten sich wie folgt:

Subgruppen	Signifikanzwerte
SHH-Gruppe 4	0,015
SHH-WNT	0,013
Gruppe 3-Gruppe 4	0,035
Gruppe 3-WNT	0,028

Tabelle 6: signifikante Unterschiede in der Expression von L1CAM in MB nach molekulargenetischen Subgruppen

Die Nullhypothese „Die Verteilung der L1CAM-Expression ist in den einzelnen molekulargenetischen MB-Subgruppen identisch.“ wurde verworfen.

3.1.3. EphA2- Medulloblastome: Quantität

Für die quantitative EphA2-Färbung konnten 27 MB in die Auswertung aufgenommen werden. Die Verteilung der quantitativen EphA2-Anfärbung (0 = negativ, 1 = bis 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%) unter allen MB lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 2.2 und dem Histogramm in Abbildung 11 entnehmen. Median = 0; Range = 0,0–4,0; $Q_1=0,0$; $Q_3=3,0$

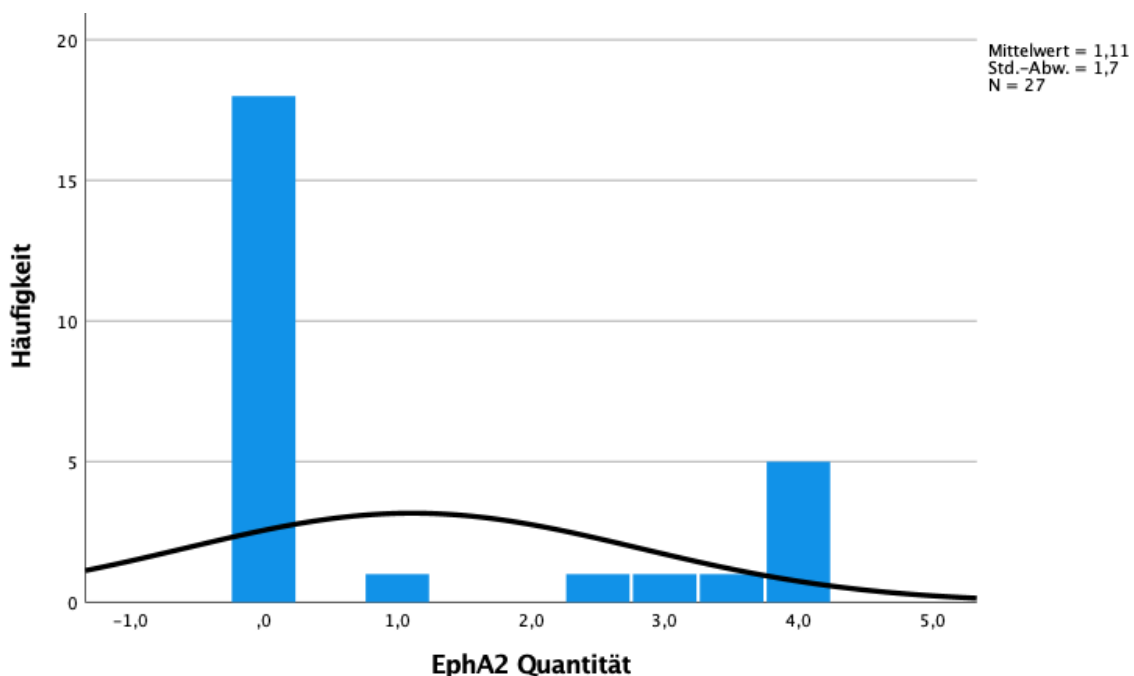


Abbildung 11: Histogramm zur EphA2-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die EphA2-Expression quantitativ wie in Tabelle 7 und im Boxplot in Abbildung 12 dargestellt:

EphA2-Quantität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	Gesamt
SHH	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
WNT	1	0	0	0	0	0	1	1	1	4
Gruppe 3	1	0	1	0	0	0	0	0	3	5
Gruppe 4	11	0	0	0	0	0	0	0	1	12
Kein Hinweis auf SHH/WNT-Aktivierung	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Gesamt	18	0	1	0	0	1	1	1	5	27

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

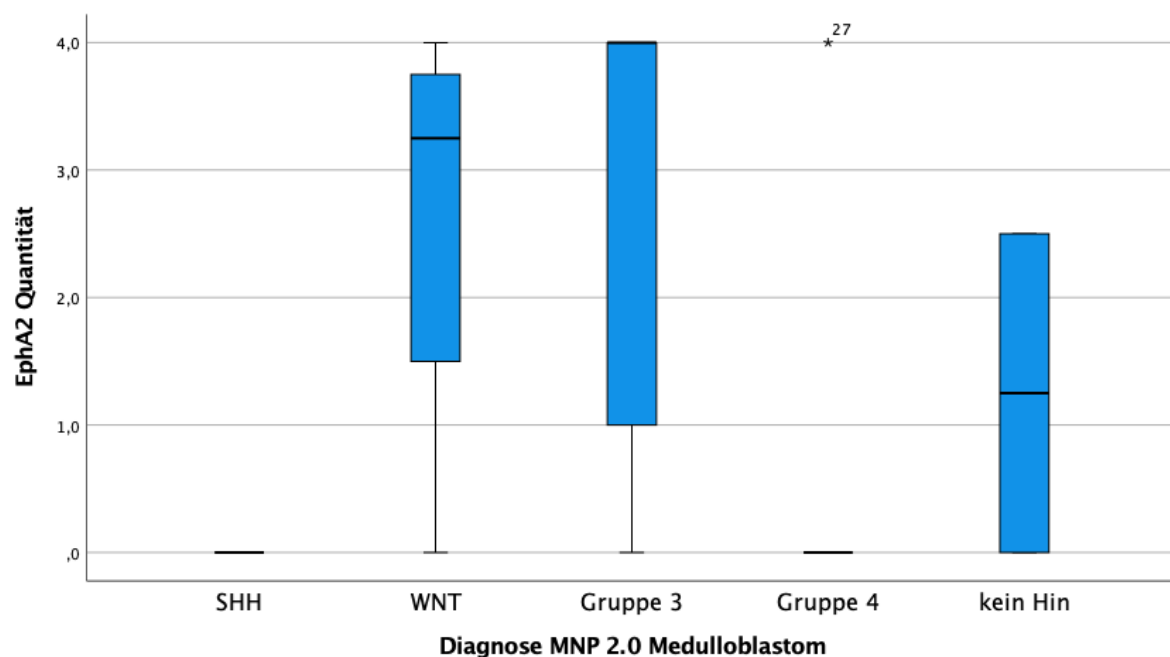


Abbildung 12: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

Bei den WNT-MB (Median=3,25; Range=0–4,0; $Q_1=1,5$; $Q_3=3,75$) und den Gruppe 3-MB (Median=4,0; Range=0–4,0; $Q_1=1,0$; $Q_3=4,0$) lässt sich eine stärkere quantitative Expression beobachten als bei SHH-MB (Median=0; Range=0; $Q_1=0$; $Q_3=0$) und Gruppe 4-MB (Median=0; Range=0; $Q_1=0$; $Q_3=0$), die keine Anfärbung zeigten. Die Tumoren ohne Hinweis auf SHH oder WNT-Aktivierung bilden sich dazwischen ab (Median=1,25, Range=0,0–2,5, $Q_1=0$; $Q_3=2,5$). Der Unterschied in der quantitativen

EphA2-Anfärbung ist im Kruskal Wallis-Test signifikant ($p=0,015$), der Chi-Quadrat-Test zeigte kein signifikantes Ergebnis ($p=0,120$). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen zeigten sich wie folgt:

Subgruppen	Signifikanzwerte
SHH-WNT	0,035
SHH-Gruppe 3	0,012
Gruppe 4-WNT	0,025
Gruppe 3-Gruppe 4	0,005

Tabelle 8: signifikante Unterschiede in der quantitativen Expression von EphA2 in MB nach molekulargenetischen Subgruppen

Die Nullhypothese „Die Verteilung der quantitativen EphA2-Expression ist in den einzelnen molekulargenetischen MB-Subgruppen identisch.“ wurde verworfen.

Abbildung 13 zeigt exemplarisch die unterschiedlichen EphA2-Expressionen eines WNT-MB im direkten Vergleich zu einem SHH-MB.

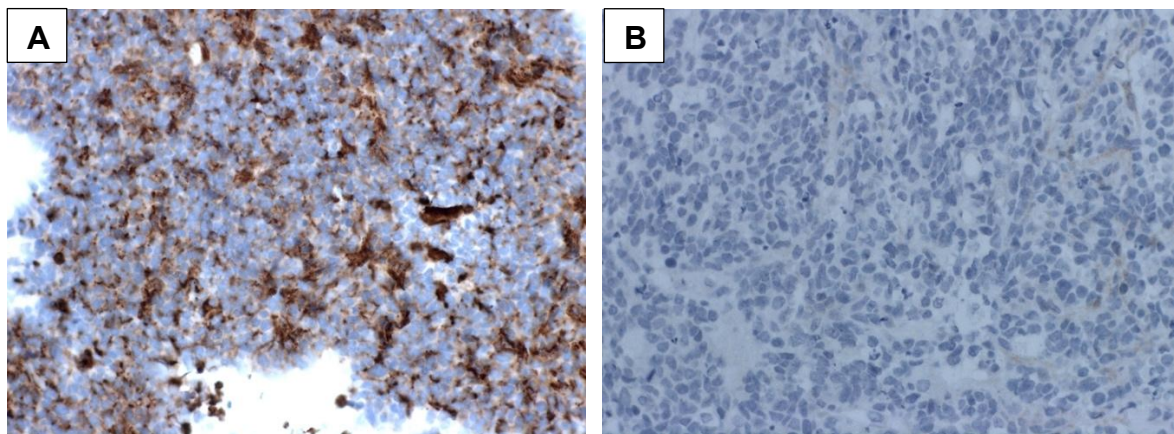


Abbildung 13: A: WNT-MB in EphA2-Färbung; B: SHH-MB in EphA2-Färbung

3.1.4. EphA2 – Medulloblastome: Intensität

Für die qualitative EphA2-Färbung wurden 27 MB analysiert. Die Verteilung der Intensität der EphA2-Anfärbung (0 = negativ, 1 = schwach gefärbt, 2 = moderat gefärbt, 3 = stark gefärbt) unter allen MB lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 2.3 und dem Histogramm in Abbildung 14 entnehmen. Median = 0; Range = 0–3,0; $Q_1=0$; $Q_3=2,0$

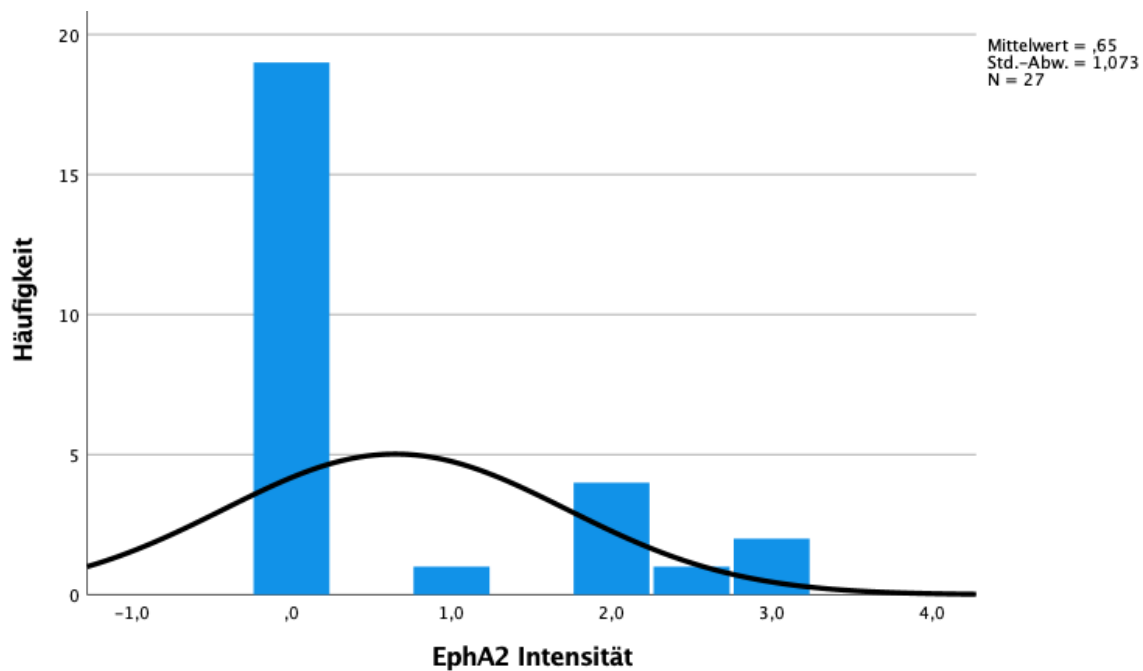


Abbildung 14: Histogramm zur EphA2-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die Intensität der EphA2-Expression wie in Tabelle 9 und im Boxplot in Abbildung 15 dargestellt:

EphA2-Intensität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	Gesamt
SHH	4	0	0	0	0	0	0	4
WNT	1	0	0	0	1	1	1	4
Gruppe 3	2	0	1	0	1	0	1	5
Gruppe 4	11	0	0	0	1	0	0	12
Kein Hinweis auf SHH/WNT-Aktivierung	1	0	0	0	1	0	0	2
Gesamt	19	0	1	0	4	1	2	27

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

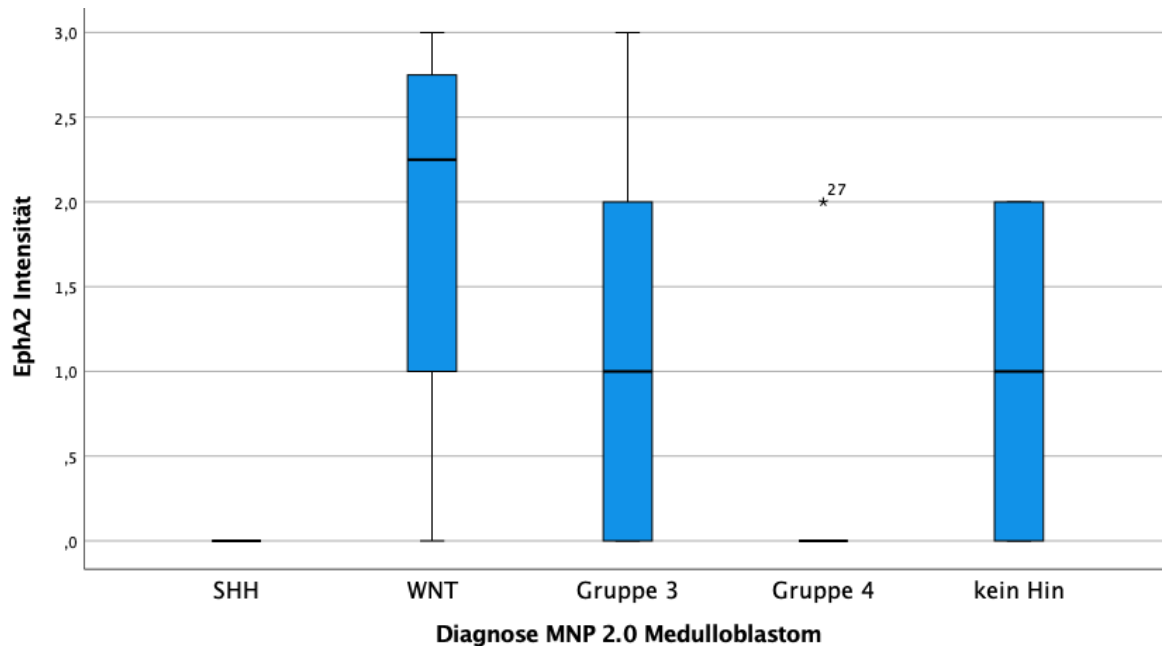


Abbildung 15: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen (3)

Bei den WNT-MB (Median=2,25; Range=0–3,0; Q₁=1,0; Q₃=2,75) und den Gruppe 3-MB (Median=1,0; Range=0–3,0; Q₁=0; Q₃=2,0), sowie Tumoren ohne Hinweis auf SHH oder WNT-Aktivierung (Median=1,0; Range=0–2,0; Q₁=0,0; Q₃=2,0) lässt sich eine stärkere EphA2-Intensitäts-Expression beobachten als bei SHH-MB (Median=0; Range=0; Q₁=0; Q₃=0) und Gruppe 4-MB (Median=0; Range=0; Q₁=0; Q₃=0) (3). Diese Unterschiede in der Expression von EphA2 stellten sich im Kruskal-Willis-Test als signifikant dar (p=0,027) während sich im Chi-Quadrat Test kein signifikanter Unterschied ergab (p=0,315). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen im Vergleich zeigten sich wie folgt:

Subgruppen	Signifikanzwerte
SHH-WNT	0,015
Gruppe 4-Gruppe 3	0,047
Gruppe 4-WNT	0,007

Tabelle 10: signifikante Unterschiede in der Intensität der Expression von EphA2 in MB nach molekulargenetischen Subgruppen

Die Nullhypothese „Die Verteilung der Intensität der EphA2-Expression ist in den einzelnen molekulargenetischen MB-Subgruppen identisch.“ wurde verworfen.

3.1.5. GD2 – Medulloblastome: Quantität und Intensität

Für die GD2-Färbung konnten 27 MB in die Auswertung aufgenommen werden. Keine dieser Proben (n=27) zeigten eine GD2-Expression (3). Es konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen den molekulargenetischen Subgruppen festgestellt werden.

3.1.6. CD276 – Medulloblastome: Quantität

Für die quantitative CD276-Färbung konnten 27 MB in die Auswertung aufgenommen werden. Die Verteilung der quantitativen CD276 – Anfärbung (0 = negativ, 1 = bis 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%) unter allen MB lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 2.4 und dem Histogramm in Abbildung 16 entnehmen. Median = 4,0; Range = 2,0–4,0; $Q_1=3,0$; $Q_3=4,0$

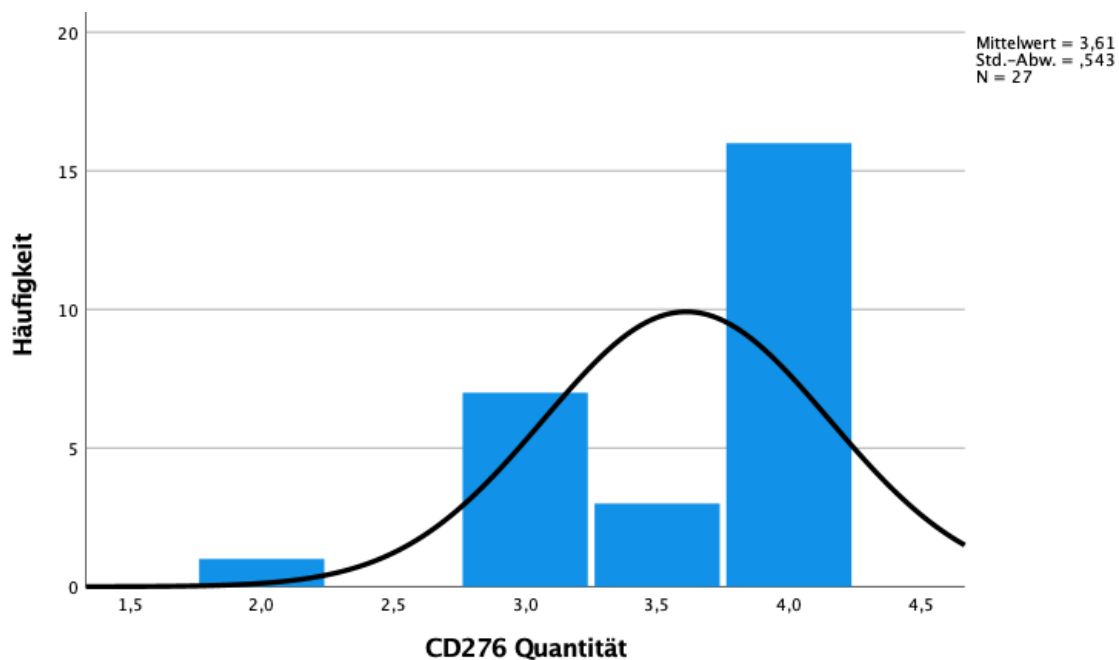


Abbildung 16: Histogramm zur CD276- Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die EphA2-Expression quantitativ wie in Tabelle 11 und im Boxplot Abbildung 17 dargestellt:

CD276-Quantität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	Gesamt
SHH	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4
WNT	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
Gruppe 3	0	0	0	0	1	0	1	0	3	5
Gruppe 4	0	0	0	0	0	0	3	2	7	12
Kein Hinweis auf SHH/WNT-Aktivierung	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
Gesamt	0	0	0	0	1	0	7	3	16	27

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

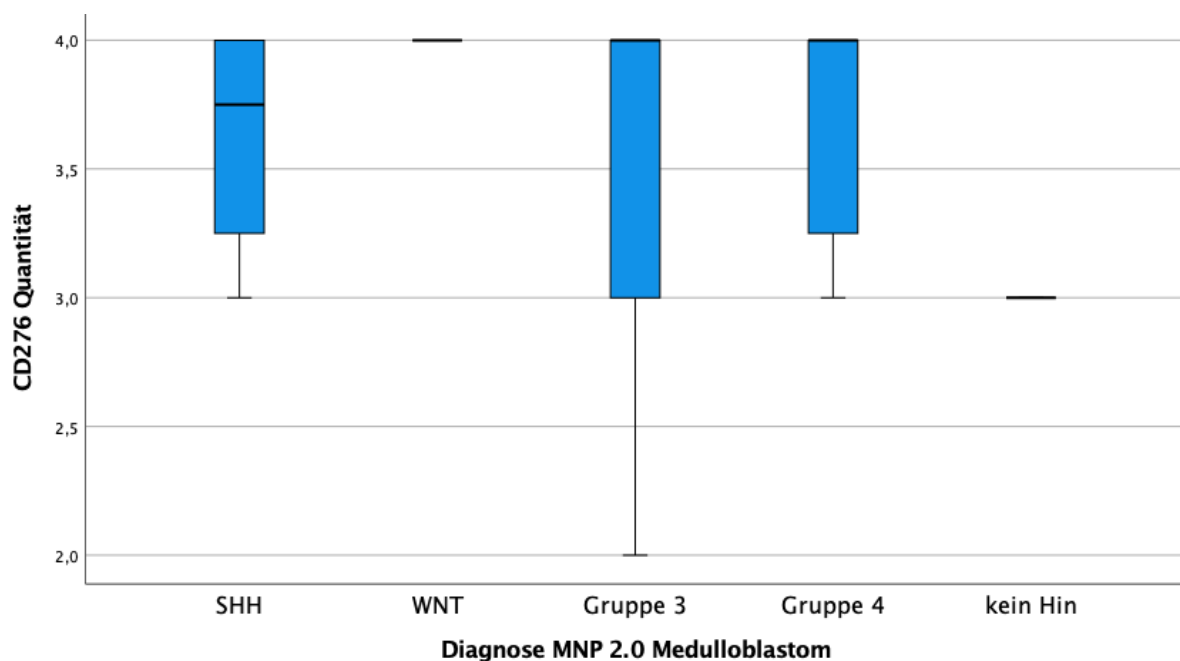


Abbildung 17: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

Alle MB-Subgruppen zeigten eine stark quantitative CD276-Expression. Die stärksten Ausprägungen zeigten sich in Gruppe 4-MB. Diese Häufigkeitsverteilung erwies sich als nicht signifikant (Chi-Quadrat $p=0,278$, Kruskal Wallis $p=0,202$).

SHH-MB (Median=3,75; Range=3,0–4,0; $Q_1=3,25$; $Q_3=4,0$)

WNT-MB (Median=4,0; Range=4,0; $Q_1=4,0$; $Q_3=4,0$)

Gruppe 3-MB (Median=4,0; Range=2,0–4,0; $Q_1=3,0$; $Q_3=4,0$)

Gruppe 4-MB (Median=4,0; Range=3,0–4,0; $Q_1=3,5$; $Q_3=4,0$)

Tumoren ohne Hinweis auf SHH oder WNT-Aktivierung (Median=3,0, Range=3,0; Q₁=3,0; Q₃=3,0)

3.1.7. CD276 – Medulloblastome: Intensität

Für die qualitative CD276-Färbung wurden 27 MB in die Auswertung aufgenommen. Die Verteilung der Intensität der CD276-Anfärbung (0 = negativ, 1 = schwach gefärbt, 2 = moderat gefärbt, 3 = stark gefärbt) unter allen MB lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 2.5 und dem Histogramm in Abbildung 18 entnehmen. Median = 2,0; Range = 1,0–3,0; Q₁=2,0; Q₃=3,0

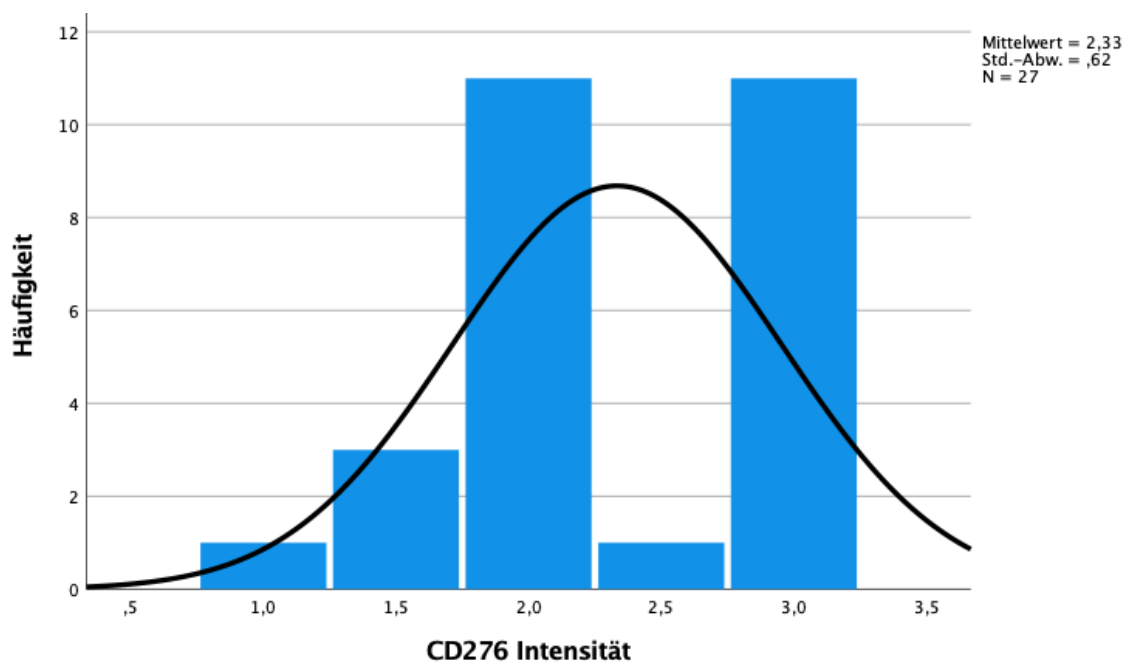


Abbildung 18: Histogramm zur CD276-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die Intensität der CD276-Expression wie in Tabelle 12 und im Boxplot Abbildung 19 dargestellt:

CD276-Intensität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	Gesamt
SHH	0	0	0	1	3	0	0	4
WNT	0	0	0	0	1	0	3	4
Gruppe 3	0	0	0	1	1	0	3	5
Gruppe 4	0	0	1	0	6	1	4	12
Kein Hinweis auf SHH/WNT-Aktivierung	0	0	0	1	0	0	1	2

Gesamt	0	0	1	3	11	1	11	27
---------------	---	---	---	---	----	---	----	----

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

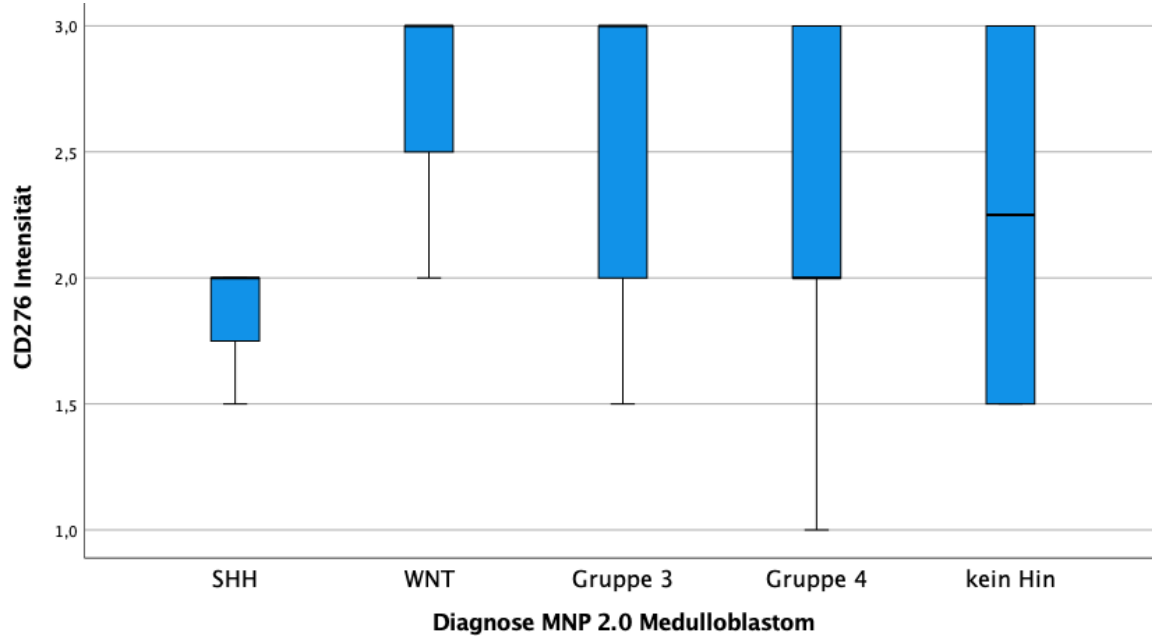


Abbildung 19: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

Alle MB-Subgruppen zeigten eine moderate bis starke CD276-Expression (3):
 SHH-MB (Median=2,0; Range=1,5–2,0; Q₁=1,75; Q₃=2,0)
 WNT-MB (Median=3,0; Range=2,0–3,0; Q₁=2,5; Q₃=3,0)
 Gruppe 3-MB (Median=3,0; Range=1,5–3,0; Q₁=2,0; Q₃=3,0)
 Gruppe 4-MB (Median=2,0; Range=1,0–3,0; Q₁=2,0; Q₃=3,0)
 Tumoren ohne Hinweis auf SHH oder WNT-Aktivierung (Median=2,25, Range=1,5–3,0; Q₁=1,5; Q₃=3,0). Die WNT-, Gruppe 3 und Gruppe 4 Medulloblastome zeigten dabei eine stärkere Anfärbung als SHH-MB. Diese Unterschiede in der Expression von CD276 stellten sich nicht als signifikant dar (Chi-Quadrat p=0,563, Kruskal Wallis p=0,324).

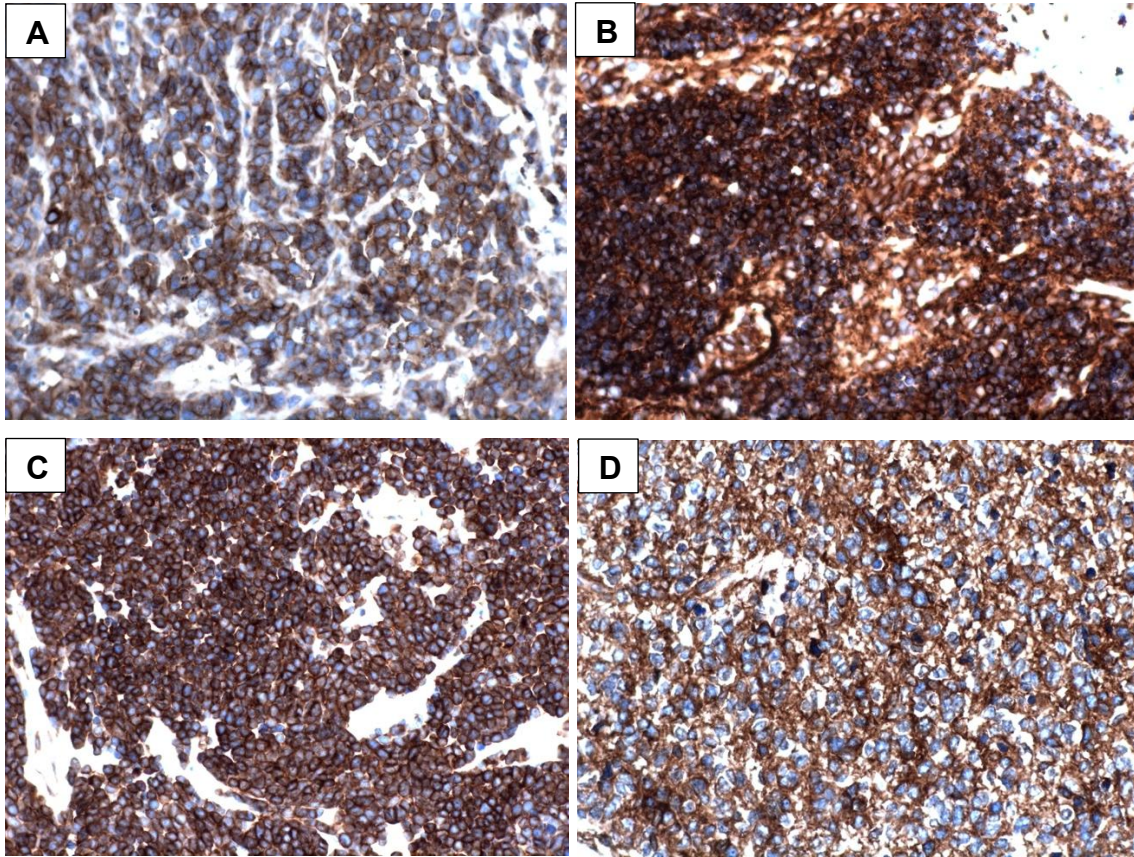


Abbildung 20: exemplarische Darstellung der CD276-Expression in Medulloblastomen. A: SHH-MB; B: WNT-MB; C: Gruppe 3-MB; D: Gruppe 4-MB (3)

3.2. Ependymome

Es wurden insgesamt 30 EP untersucht. Davon waren 10 supratentoriell, 17 infratentoriell und 3 spinal lokalisiert. Molekulargenetisch konnten die Tumore wie folgt eingeteilt werden: PF-A (n=11), PF-B (n=1), RELA-fusioniert (n=10), myxopapillär (n=2). 6 Tumore konnten im Rahmen der MNP2.0-Studie nicht molekulargenetisch klassifiziert (nk) werden. Davon waren n=3 infratentoriell, n=2 supratentoriell und n=1 Tumore spinal lokalisiert.

Insgesamt stammten die Proben von 12 Mädchen und 12 Jungen. Das mittlere Alter bei OP betrug 5,96 Jahre (Standardabweichung: 5,16) bei einer Range von 0–20 Jahren. Es lagen keine Metastasierungen bereits bei der Diagnosestellung vor. Spätere Metastasierung zeigten sich bei sechs Tumoren (PF-A n=2, PF-B n=0, RELA-fusioniert n=3, ohne MNP2.0-Diagnose n=1). Elf der Tumore bildeten im Verlauf ein Rezidiv (PF-A n=6, PF-B n=0, RELA-fusioniert n=3, nk n=2).

Eine graphische Darstellung der Verteilung der molekularen Klassifizierung (bestimmt mittels 450k bzw. 850I Array im Rahmen der MNP2.0-Studie) innerhalb der Gruppe der EP ist Abbildung 21 zu entnehmen.

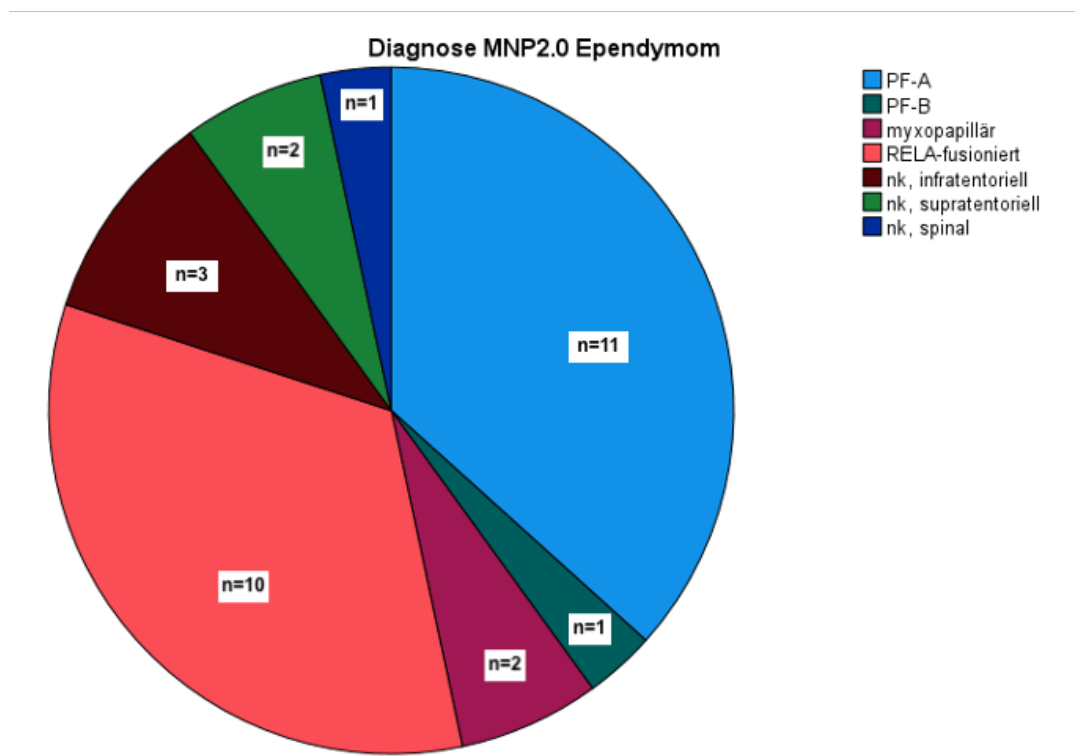


Abbildung 21: Kreisdiagramm, Verteilung der molekulargenetischen Diagnosen innerhalb der Gruppe der Medulloblastome, n=30

3.2.1. HER2 – Ependymome

In der HER2-Färbung wurden 30 EP ausgewertet.

Keiner der Proben (n=30) zeigten eine HER2-Expression (score 0). Es konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen den molekulargenetischen Subgruppen festgestellt werden.

3.2.2. L1CAM – Ependymome

Für die L1CAM-Färbung wurden 30 EP analysiert. Die Verteilung der quantitativen L1CAM-Anfärbung (0 = negativ, 1 = bis 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%) unter allen EP lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 3.1 und dem Histogramm in Abbildung 22 entnehmen. Median = 0; Range=0–4; Q₁=0; Q₃=1

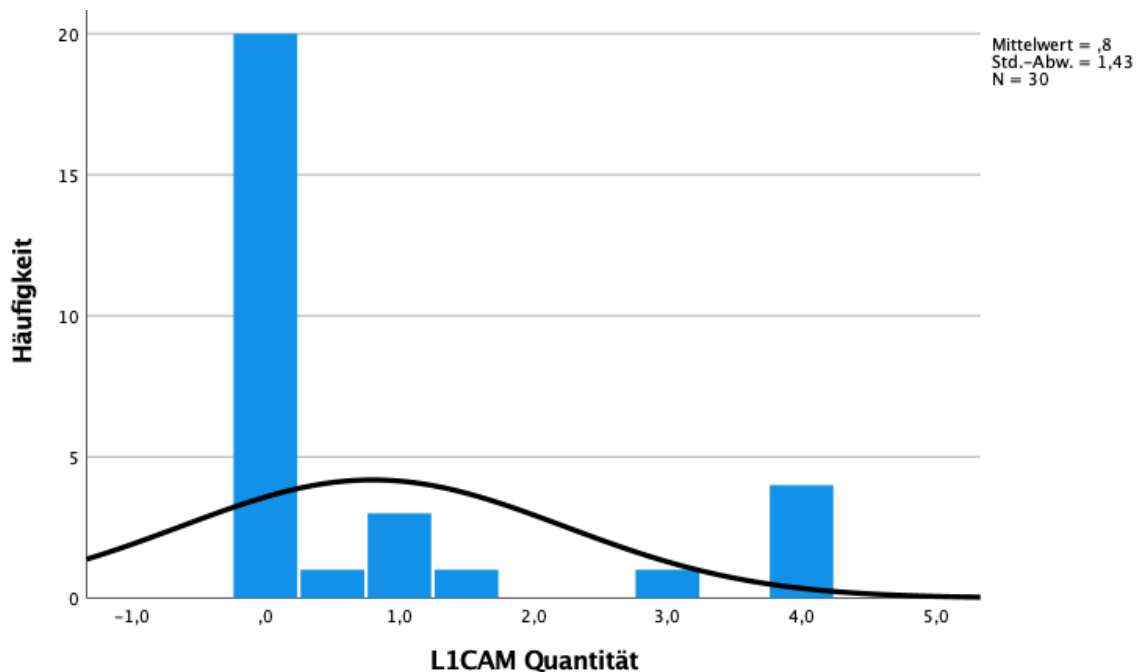


Abbildung 22: Histogramm zur L1CAM-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die L1CAM-Expression quantitativ wie in Tabelle 13 und im Boxplot Abbildung 23 dargestellt:

L1CAM-Quantität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	Gesamt
PF-A	11	0	0	0	0	0	0	0	0	11
PF-B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MPE	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
RELA	1	1	3	1	0	0	0	1	3	10
nk, infratent.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3
nk, supratent.	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
nk, spinal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Gesamt	20	1	3	1	0	0	1	1	4	30

Tabelle 13: Häufigkeitsverteilung L1CAM-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen

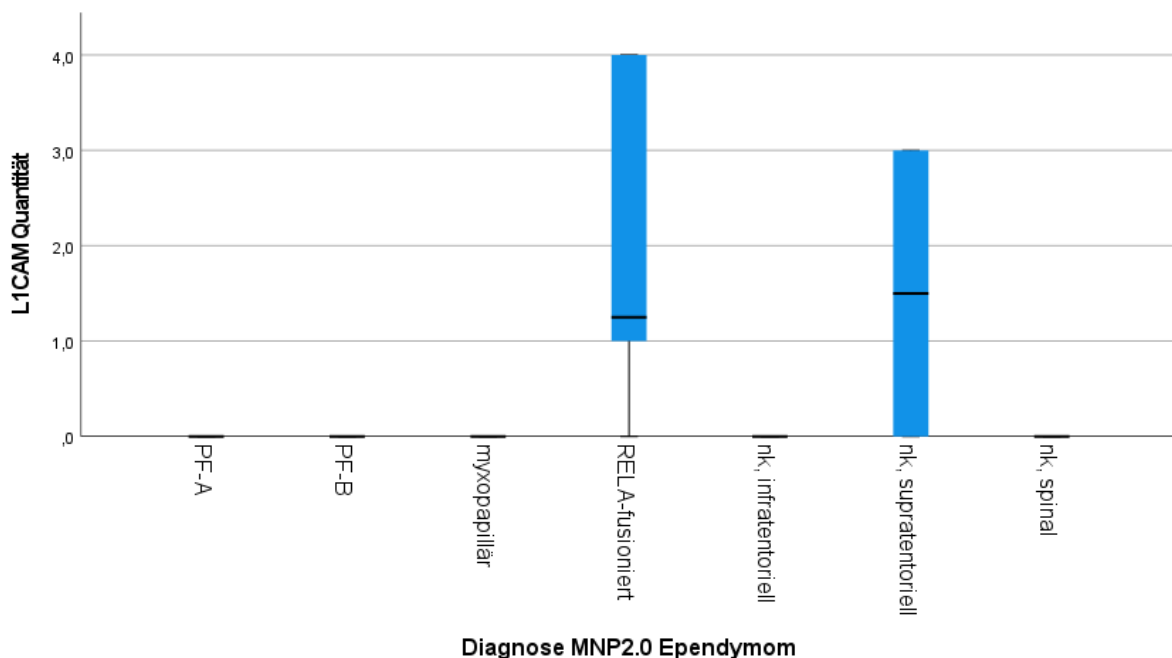


Abbildung 23: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der L1CAM-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen

Ein L1CAM-Nachweis konnte bei RELA-fusionierten EP (Median=1,25; Range=0–4,0; Q₁=1,0; Q₃=4,0) sowie bei nk-supratentoriellen Tumoren (Median=1,5; Range=0–3,0; Q₁=0,0; Q₃=3,0) beobachtet werden. In den anderen Subgruppen zeigte sich keine Anfärbung auf L1CAM. Die Analyse der Kreuztabellen mittels Chi-Quadrat-Test zeigt sich als nicht signifikant (p=0,301). Im Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben konnte hingegen eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Expressionsmuster für die einzelnen Subgruppen beobachtet werden (p=0,001). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen zeigten sich wie folgt:

Subgruppen	Signifikanzwerte
PFA-RELA	<0,001
Myxopapillär-RELA	0,019
nk infratentoriell-RELA	0,006

Tabelle 14: signifikante Unterschiede in der Expression von L1CAM in EP nach molekulargenetischen Subgruppen

Die Nullhypothese „Die Verteilung der L1CAM-Expression ist in den einzelnen molekulargenetischen EP-Subgruppen identisch.“ wurde verworfen.

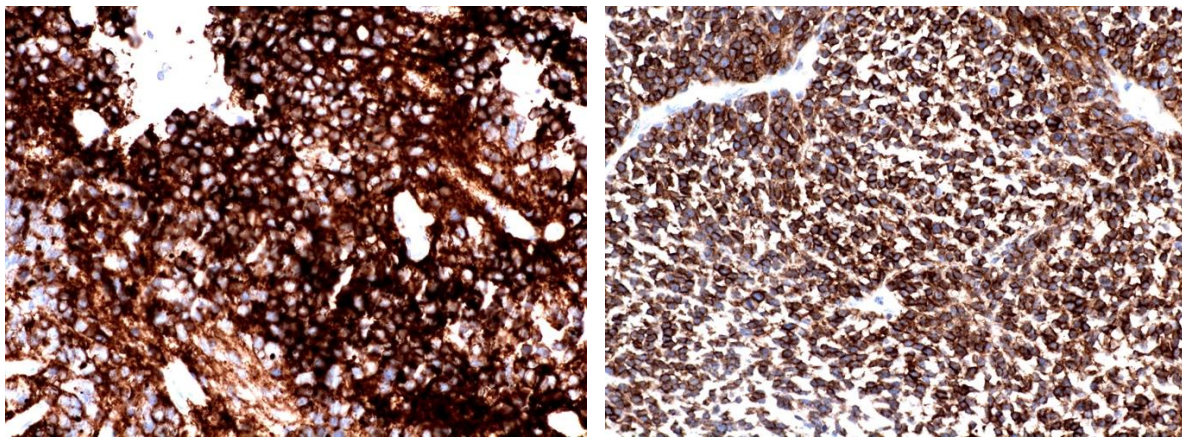


Abbildung 24: L1CAM-Färbung zweier RELA-fusionierter Ependymome

3.2.3. EphA2 – Ependymome: Quantität

Für die quantitative EphA2-Färbung wurden 30 EP analysiert. Die Verteilung der quantitativen EphA2-Anfärbung (0 = negativ, 1 = bis 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%) unter allen EP lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 3.2 und dem Histogramm in Abbildung 25 entnehmen. Median = 0,0; Range = 0–4,0; Q₁=0; Q₃=3,0

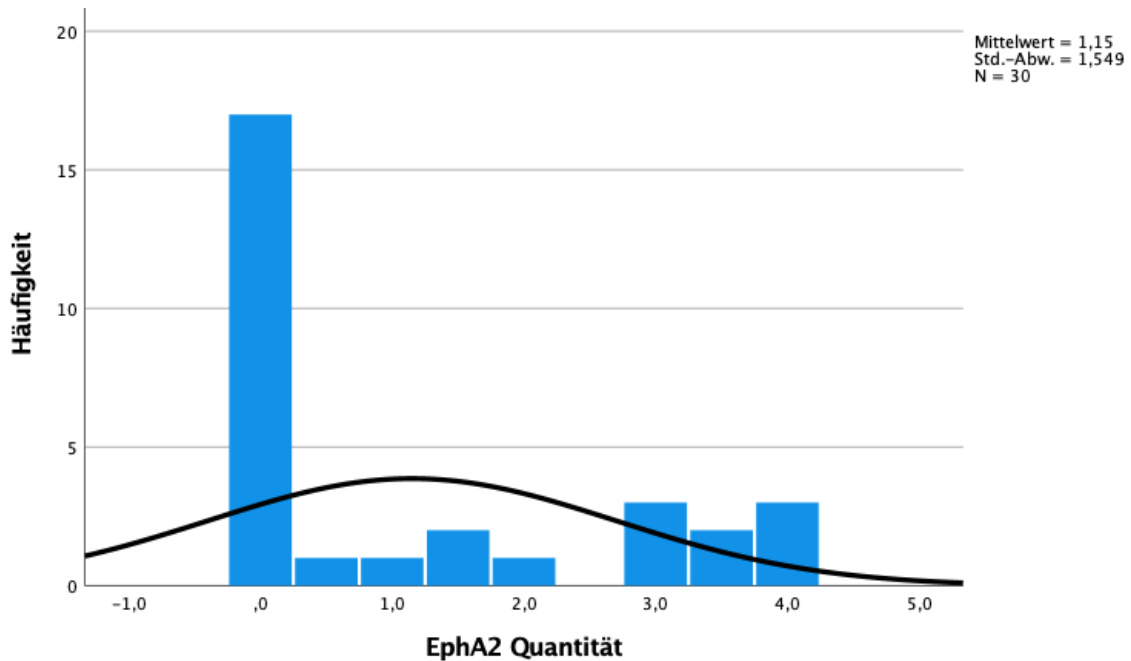


Abbildung 25: Histogramm zur EphA2-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependyomom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die EphA2-Expression quantitativ wie in Tabelle 15 und im Boxplot in Abbildung 26 dargestellt:

EphA2-Quantität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	Gesamt
PF-A	2	0	1	2	0	0	2	2	3	11
PF-B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MPE	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
RELA	8	0	0	0	0	0	1	1	0	10
nk, infratent.	2	0	0	0	1	0	0	0	0	3
nk, supratent.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
nk, spinal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Gesamt	17	1	1	2	1	0	3	3	3	30

Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependyomomen

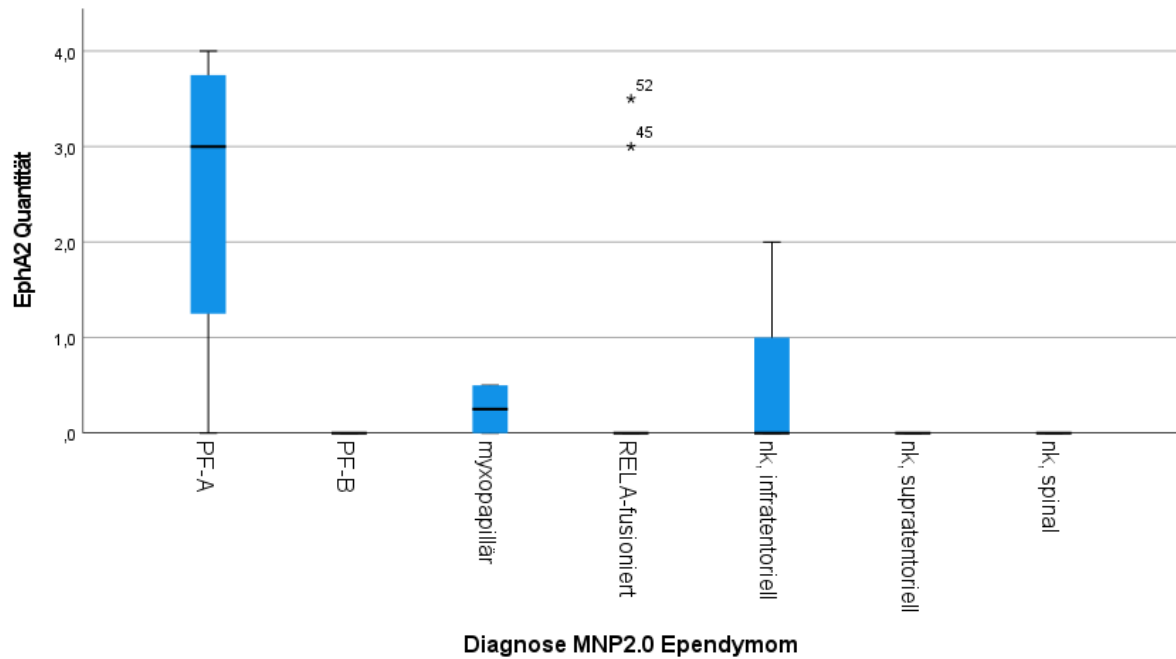


Abbildung 26: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

Eine quantitativ starke EphA2-Expression konnte vor allem bei PF-A-Tumoren beobachtet werden (Median=3,0; Range=0–4; $Q_1=1,25$; $Q_3=3,75$). In der Gruppe der myxopapillären EP zeigte sich eine schwach quantitative Ausprägung der EphA2-Expression (Median=0,25; Range=0–0,5,0; $Q_1=0$; $Q_3=0,5$) sowie auch in der Gruppe der nk infratentoriellen EP (Median=0; Range=0–2,0; $Q_1=0$; $Q_3=1,0$). In den übrigen EP konnte keine EphA2-Expression nachgewiesen werden. Die Verteilung der quantitativen EphA2-Expression zeigte sich als nicht-signifikant (Chi-Quadrat $p=0,511$, Kruskal-Wallis $p=0,066$).

3.2.4. EphA2 – Ependymome: Intensität

Für die qualitative EphA2-Färbung wurden 30 EP analysiert. Die Verteilung der Intensität der EphA2-Anfärbung (0 = negativ, 1 = schwach gefärbt, 2 = moderat gefärbt, 3 = stark gefärbt) unter allen EP lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 3.3 und dem Histogramm in Abbildung 27 entnehmen. Median = 0; Range = 0–3,0; $Q_1=0$; $Q_3=2,5$

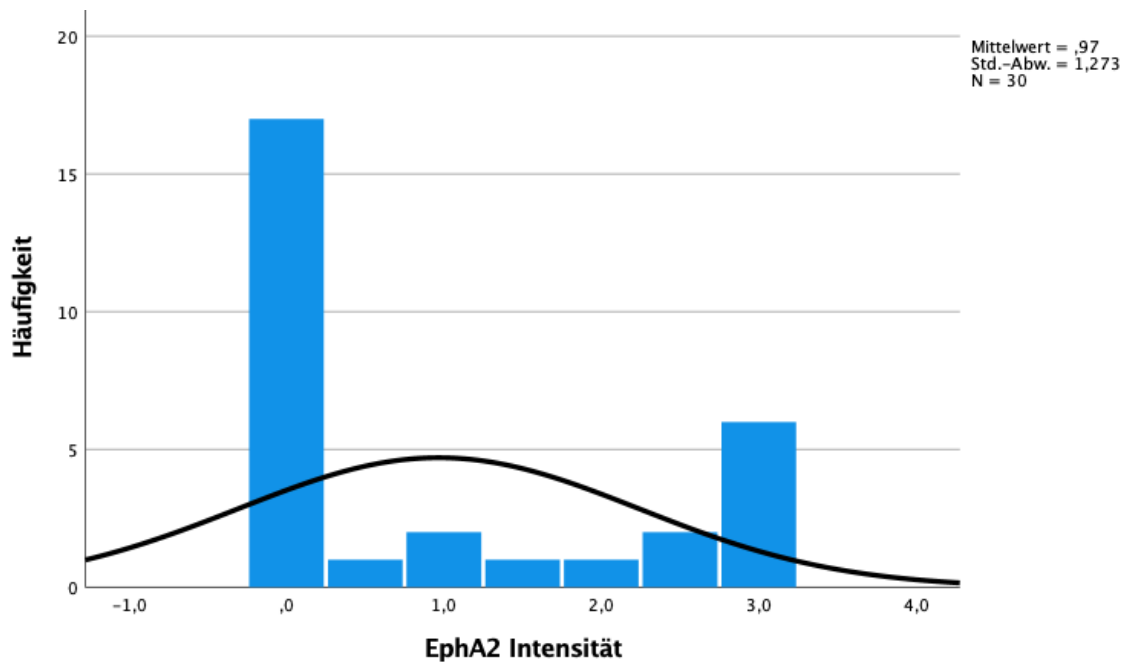


Abbildung 27: Histogramm zur EphA2-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependyomom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die Intensität der EphA2-Expression wie in Tabelle 16 und im Boxplot Abbildung 28 dargestellt:

EphA2-Intensität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	Gesamt
PF-A	2	0	1	0	0	2	6	11
PF-B	1	0	0	0	0	0	0	1
MPE	1	1	0	0	0	0	0	2
RELA	8	0	1	0	1	0	0	10
nk, infratent.	2	0	0	1	0	0	0	3
nk, supratent.	2	0	0	0	0	0	0	2
nk, spinal	1	0	0	0	0	0	0	1
Gesamt	17	1	2	1	1	2	6	30

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependyomomen

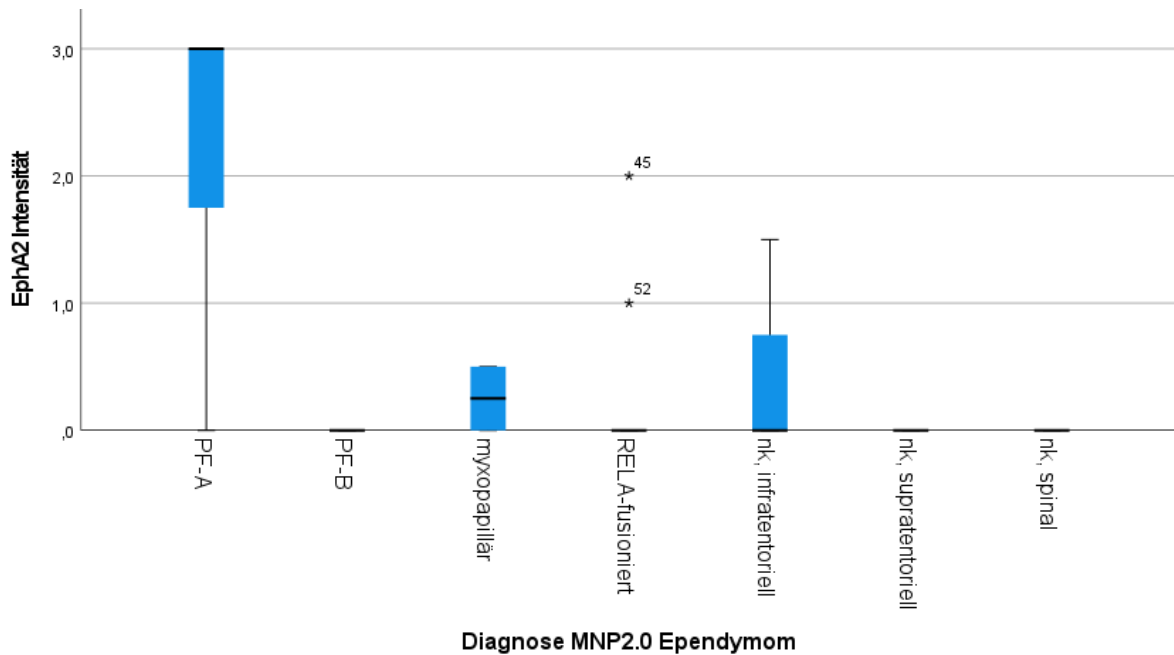


Abbildung 28: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der EphA2-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Medulloblastomen

Eine moderate bis starke EphA2-Expression konnte vor allem bei PF-A-Tumoren beobachtet werden (Median=3,0; Range=0–3,0; $Q_1=1,75$; $Q_3=3,0$). In der Gruppe der myxopapillären EP zeigte sich eine schwache Ausprägung der EphA2-Intensität (Median=0,25; Range=0–0,5,0; $Q_1=0,0$; $Q_3=0,5$). Die nk, infratentoriellen EP zeigten ebenfalls eine schwach ausgeprägte EphA2-Expression (Median=0; Range=0–1,5,0; $Q_1=0$; $Q_3=0,75$). Während sich im Chi-Quadrat kein signifikanter Unterschied herausstellte ($p=0,147$), zeigte der Kruskal-Wallis-Test ein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster in den EP-Subgruppen ($p=0,021$).

Die signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen zeigten sich wie folgt:

Subgruppen	Signifikanzwerte
nk supratentoriell-PF-A	0,025
RELA-PF-A	0,001

Tabelle 17: signifikante Unterschiede in der Intensität der Expression von EphA2 in EP nach molekulargenetischen Subgruppen

Die Nullhypothese „Die Verteilung der Intensität der EphA2-Expression ist in den einzelnen molekulargenetischen EP-Subgruppen identisch.“ wurde verworfen.

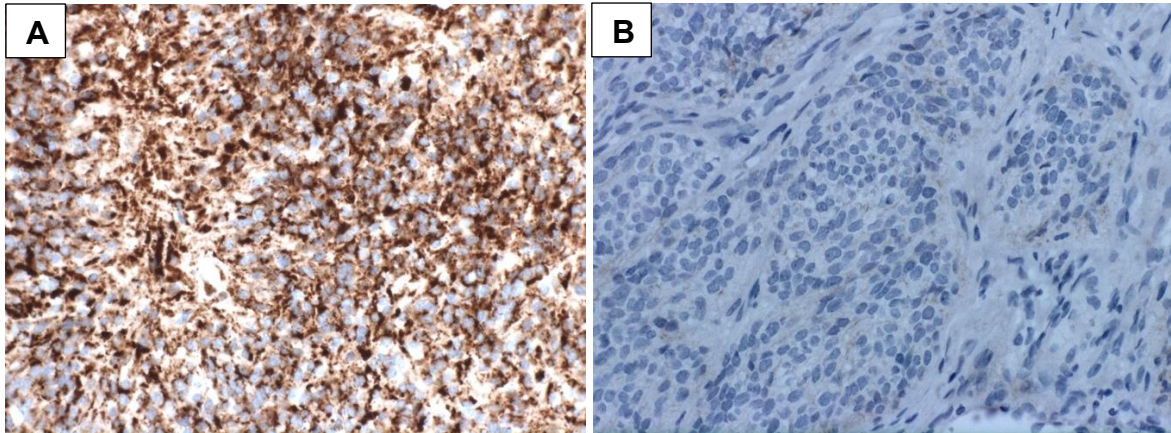


Abbildung 29: A: PF-A-Ependymom in EphA2-Färbung; B: RELA-fusioniertes Ependymom in EphA2-Färbung

3.2.5. GD2 – Ependymome: Quantität

Für die quantitative GD2-Färbung wurden 30 EP analysiert. Die Verteilung der quantitativen GD2-Anfärbung (0 = negativ, 1 = bis 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%) unter allen EP lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 3.4 und dem Histogramm in Abbildung 30 entnehmen. Median = 0; Range = 0–4,0; Q₁=0,0; Q₃=0,0

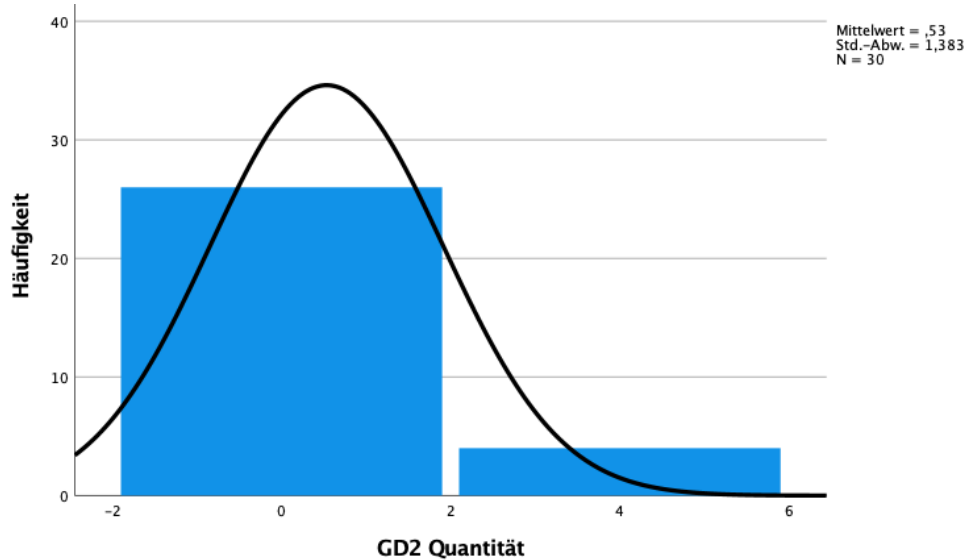


Abbildung 30: Histogramm zur GD2-Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die Quantität der GD2-Expression wie in Tabelle 18 dargestellt:

GD2-Quantität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	Gesamt
PF-A	10	0	0	0	0	0	0	0	1	11
PF-B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MPE	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
RELA	9	0	0	0	0	0	0	0	1	10
nk, infratent.	2	0	0	0	0	0	0	0	1	3
nk, supratent.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
nk, spinal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Gesamt	26	0	0	0	0	0	0	0	4	30

Tabelle 18: Häufigkeitsverteilung GD2 Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen

Eine starke quantitative GD2-Ausprägung (Wert 4,0) konnte in jeweils einem PF-A, RELA-fusionierten, nk infratentoriellen sowie nk spinalen EP nachgewiesen werden. Alle anderen EP zeigten sich GD2-negativ. Diese Beobachtung ist weder im Chi-Quadrat ($p=0,199$), noch im Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p=0,218$).

3.2.6. GD2 – Intensität

Für die qualitative GD2-Färbung wurden 30 EP analysiert. Die Verteilung der Intensität der GD2 – Anfärbung (0 = negativ, 1 = schwach gefärbt, 2 = moderat gefärbt, 3 = stark gefärbt) unter allen EP lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 3.5 und dem Histogramm in Abbildung 31 entnehmen. Median = 0; Range = 0-1,0; $Q_1=0$; $Q_3=0$

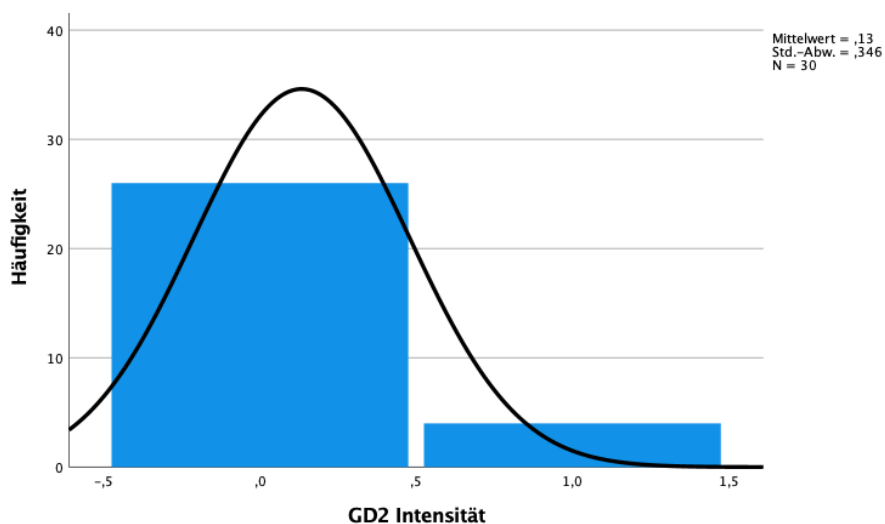


Abbildung 31: Histogramm zur GD2-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die Intensität der GD2-Expression wie in Tabelle 19 dargestellt:

GD2-Intensität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	Gesamt
PF-A	10	0	1	0	0	0	0	11
PF-B	1	0	0	0	0	0	0	1
MPE	2	0	0	0	0	0	0	2
RELA	9	0	1	0	0	0	0	10
nk, infratent.	2	0	1	0	0	0	0	3
nk, supratent.	2	0	0	0	0	0	0	2
nk, spinal	0	0	1	0	0	0	0	1
Gesamt	26	0	4	0	0	0	0	30

Tabelle 19: Häufigkeitsverteilung GD2 Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen

In jeweils einem PF-A- und RELA-fusionierten, sowie nk infratentoriellen und nk spinalen EP konnte eine schwache GD2-Expression nachgewiesen werden. Alle anderen EP zeigten sich GD2-negativ. Diese Beobachtung ist weder im Chi-Quadrat ($p=0,199$), noch im Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p=0,218$).

3.2.7. CD276 – Ependymome: Quantität

Für die quantitative CD276-Färbung wurden 30 EP analysiert. Die Verteilung der quantitativen CD276-Anfärbung (0 = negativ, 1 = bis 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, 4 = 75–100%) unter allen EP lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 3.6 und dem Histogramm in Abbildung 32 entnehmen. Median = 4,0; Range = 3,0-4,0; $Q_1=4,0$; $Q_3=4,0$

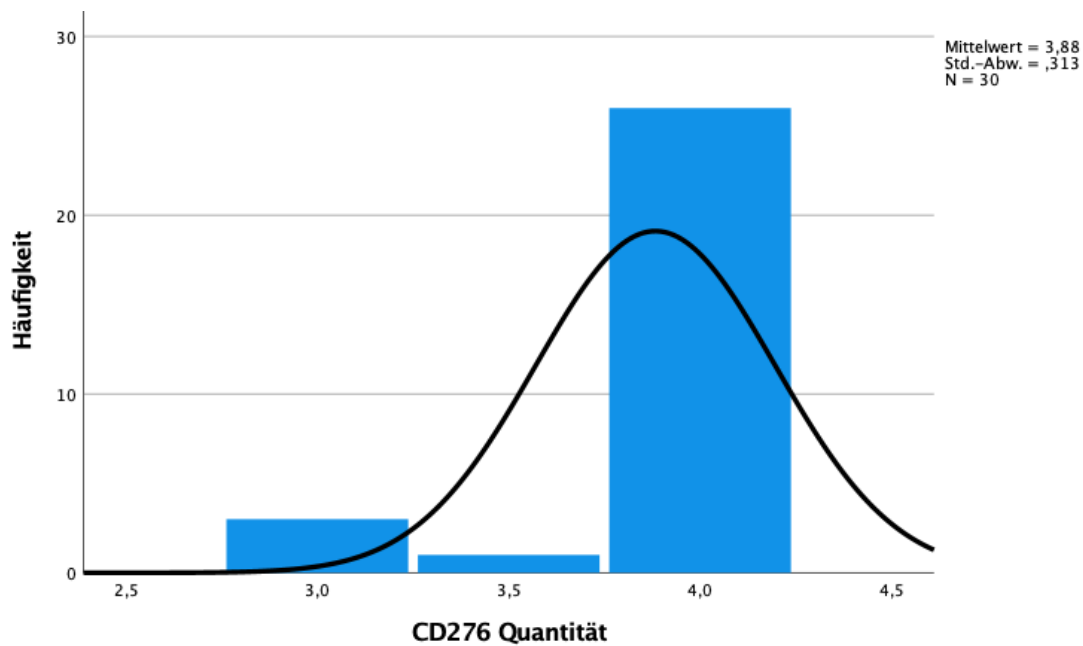


Abbildung 32: Histogramm zur CD276- Quantitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependymom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die CD276-Expression quantitativ wie in Tabelle 20 und im Boxplot in Abbildung 33 dargestellt:

CD276-Quantität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	Gesamt
PF-A	0	0	0	0	0	0	3	1	7	11
PF-B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
MPE	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
RELA	0	0	0	0	0	0	0	1	9	10
nk, infratent.	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
nk, supratent.	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
nk, spinal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Gesamt	0	0	0	0	0	0	3	2	25	30

Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen

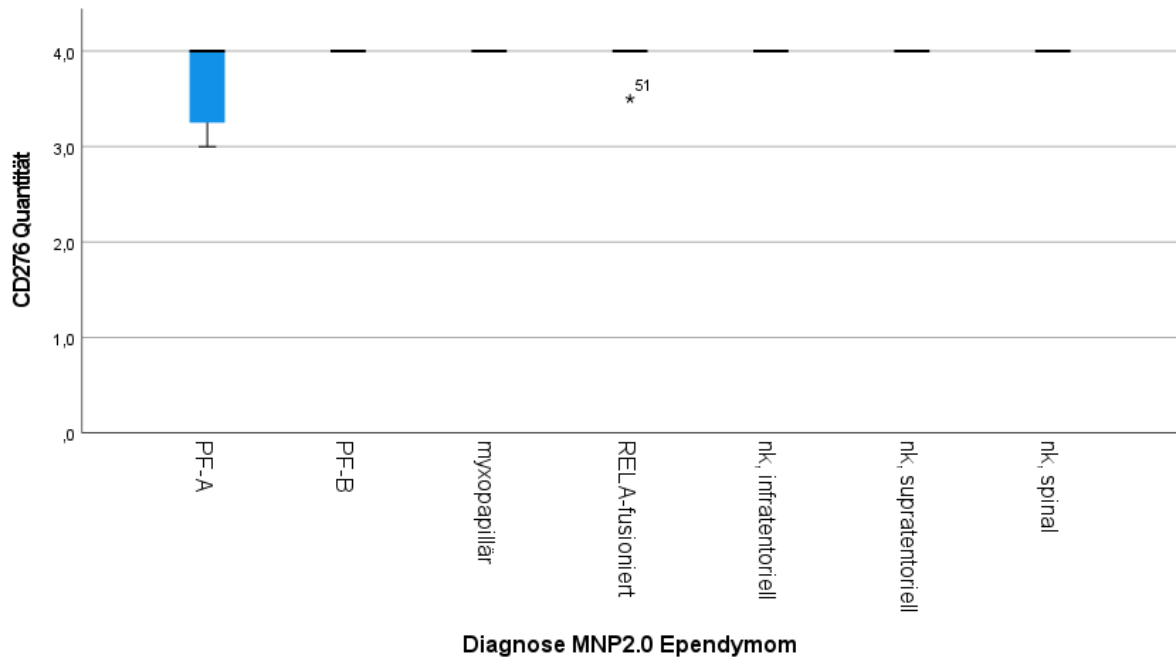


Abbildung 33: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependymomen

Alle EP-Subgruppen zeigten eine nicht signifikant unterschiedliche (Chi Quadrat $p=0,863$, Kruskal-Wallis $p=0,499$), stark quantitative CD276-Expression von $> 50\%$ der Zellen. Keine EP-Probe zeigte sich CD276-negativ.

3.2.8. CD276 – Ependymome: Intensität

Für die qualitative CD276-Färbung wurden 30 EP analysiert. Die Verteilung der Intensität der CD276-Anfärbung (0 = negativ, 1 = schwach gefärbt, 2 = moderat gefärbt, 3 = stark gefärbt) unter allen EP lässt sich der Häufigkeitstabelle Anlage 3.7 und dem Histogramm in Abbildung 34 entnehmen. Median = 2,5; Range = 1,0–3,0; $Q_1=2,0$; $Q_3=3,0$

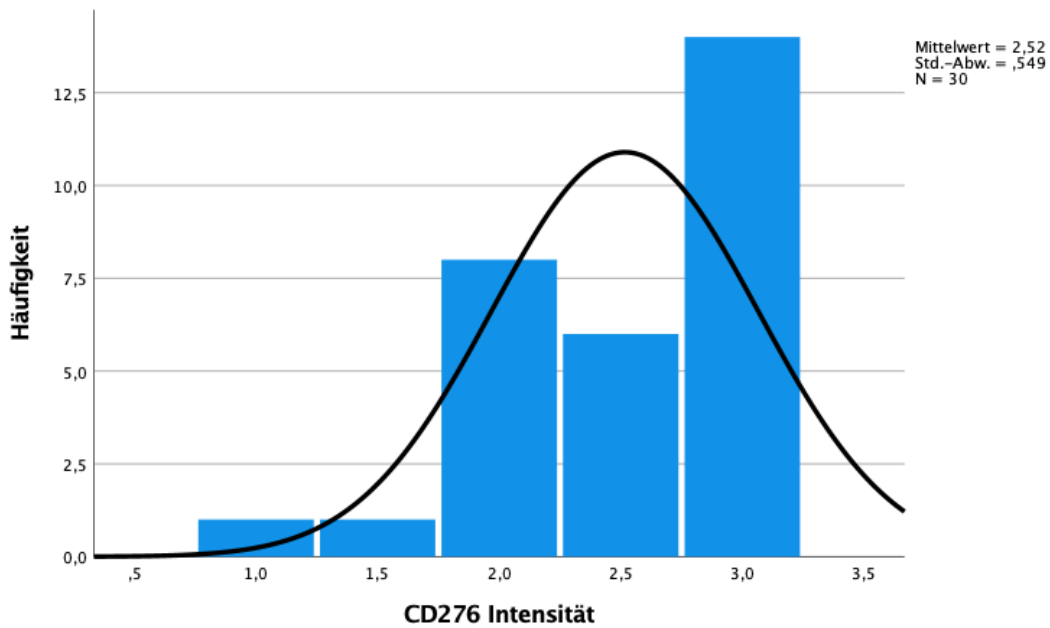


Abbildung 34: Histogramm zur CD276-Intensitätsverteilung in der Diagnosekategorie Ependyomom

Innerhalb der molekulargenetischen Gruppen verteilte sich die Intensität der CD276-Expression wie in Tabelle 21 und im Boxplot Abbildung 35 dargestellt:

CD276-Intensität	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	Gesamt
PF-A	0	0	0	1	3	2	5	11
PF-B	0	0	1	0	0	1	0	1
MPE	0	0	0	0	0	0	2	2
RELA	0	0	0	0	3	2	4	10
nk, infratent.	0	0	0	0	0	0	3	3
nk, supratent.	0	0	0	0	1	1	0	2
nk, spinal	0	0	0	0	1	0	0	1
Gesamt	0	0	1	1	8	6	14	30

Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependyomomen

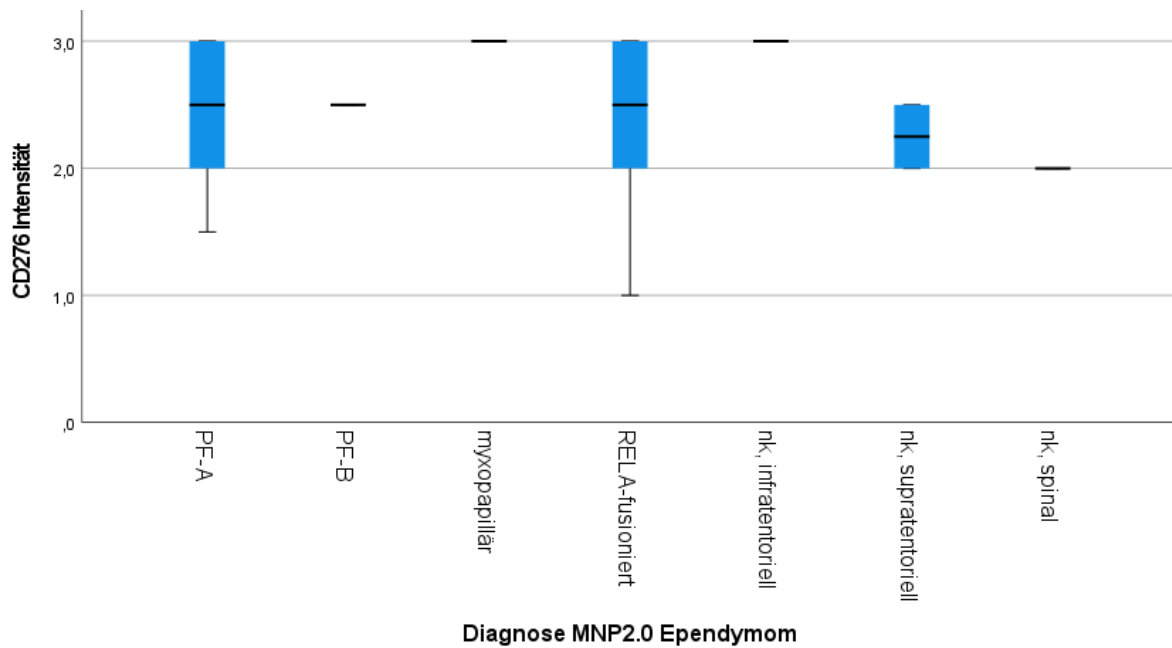


Abbildung 35: Boxplot zur Häufigkeitsverteilung CD276-Intensität innerhalb der molekularen Subgruppen bei Ependyomen

Alle EP-Subgruppen zeigten eine moderate bis starke CD276-Expression:

PF-A (Median=2,5; Range=1,5–3,0; Q₁=2,0; Q₃=3,0)

PF-B (Median=2,5; Range=2,5; Q₁=2,5; Q₃=2,5)

Myxopapilläres EP (Median=3,0; Range=3,0; Q₁=3,0; Q₃=3,0)

RELA-fusioniertes EP (Median=2,5; Range=1,0–3,0; Q₁=2,0; Q₃=3,0)

Nk, infratentorielles EP (Median=3,0; Range=3,0; Q₁=3,0; Q₃=3,0)

Nk, supratentorielles EP (Median=2,25; Range=2,0–2,5; Q₁=2,0; Q₃=2,5)

Nk, spinales EP (Median=2,0; Range=2,0; Q₁=2,0; Q₃=2,0)

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen festgestellt werden (Chi-Quadrat $p=0,797$, Kruskal-Wallis $p=0,304$).

Abbildung 36 zeigt exemplarisch die CD276-Expression in vier der untersuchten EP-Subgruppen.

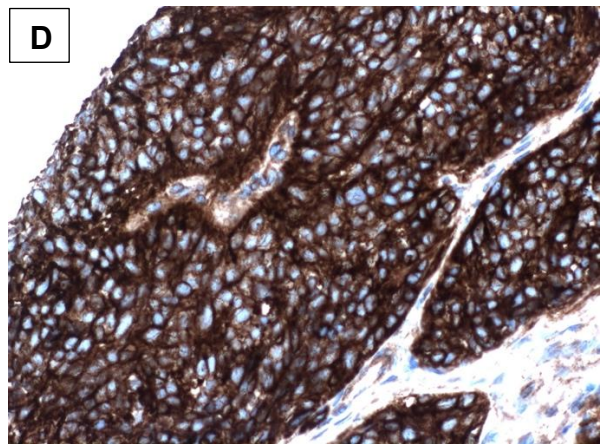
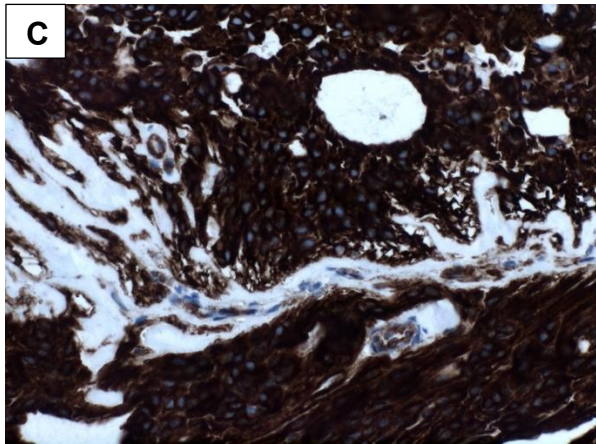
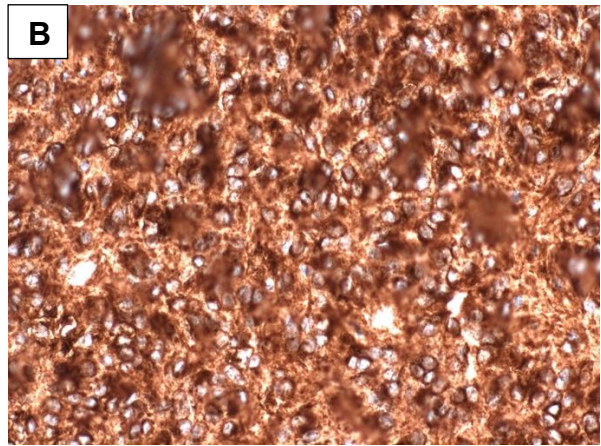
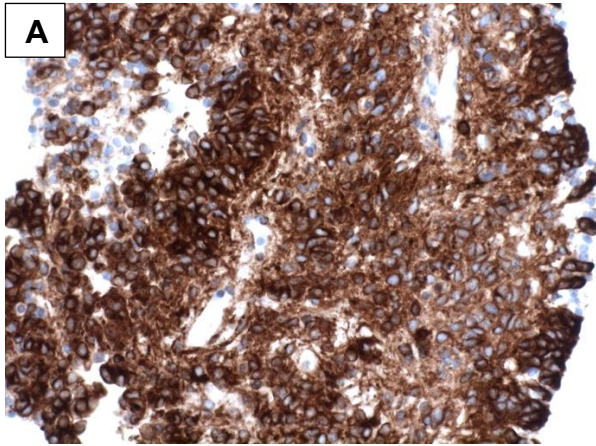


Abbildung 36: CD276-Expression in den Ependymomsubgruppen A: PF-A; B: PF-B; C: myxopapillär; D: RELA-fusioniert

3.3. Vergleich: Medulloblastome und Ependymome

Im direkten Vergleich der AG-Expressionen zwischen EP und MB zeigten sich signifikante Unterschiede in den Kategorien L1CAM-Quantität ($p=0,012$) und CD276-Quantität ($p=0,02$). Eine L1CAM-Expression konnte vermehrt in MB beobachtet werden, während sich die EP überwiegend negativ darstellen.

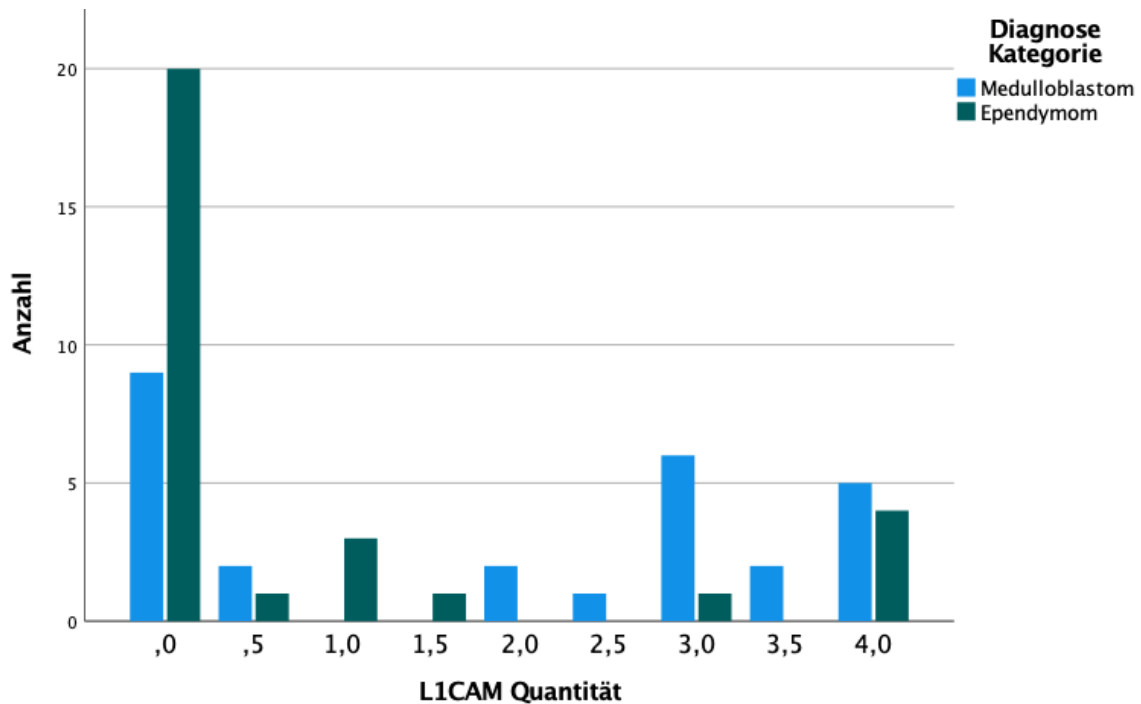


Abbildung 37: gruppiertes Balkendiagramm: Vergleich der L1CAM-Quantität zwischen Medulloblastomen und Ependymomen

In der CD276-Quantität zeigen die EP ein Färbemuster von $>50\%$, während bei den MB auch quantitative Anfärbungen von 25–50% vorkommen. Den größten Anteil macht in beiden Diagnosekategorien der Anteil 75–100% angefärbter Zellen aus. Im Vergleich der CD276-Intensität fällt auf, dass sowohl EP wie auch MB überwiegend eine moderate bis starke Anfärbung der Zellen aufwiesen.

In den weiteren AG-Färbungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen MB und EP festgestellt werden.

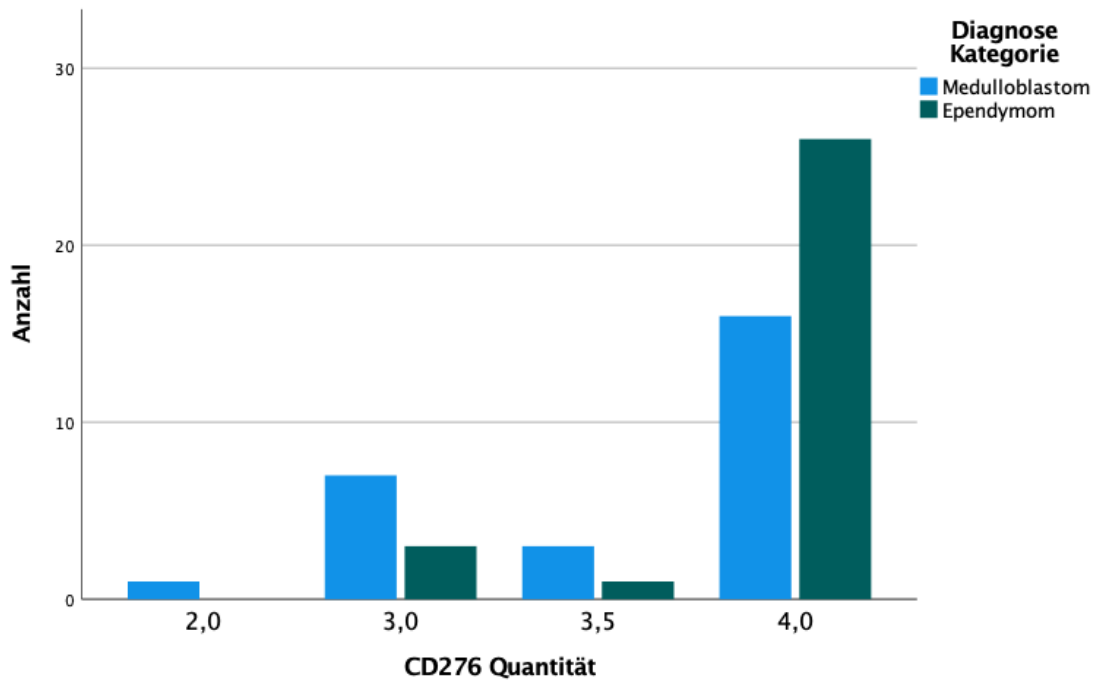


Abbildung 38: gruppiertes Balkendiagramm: Vergleich der CD276-Quantität zwischen Medulloblastomen und Ependymomen

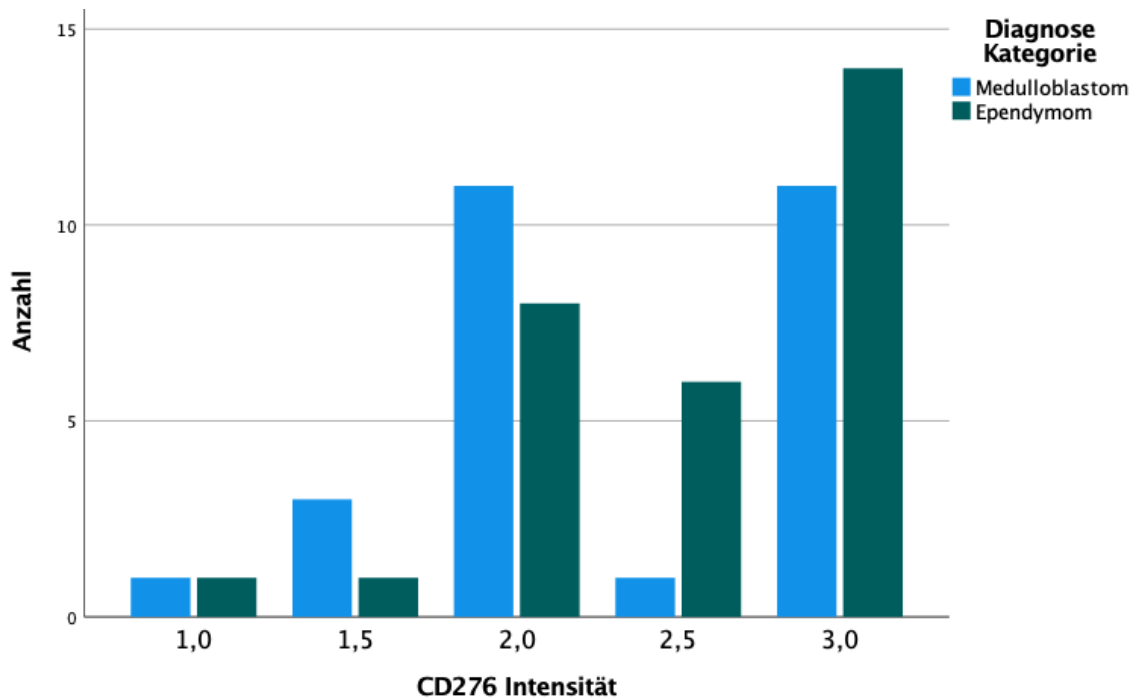


Abbildung 39: gruppiertes Balkendiagramm: Vergleich der CD276-Intensität zwischen Medulloblastomen und Ependymomen

3.4. Vergleiche unter Betrachtung klinischer Faktoren

In der Gruppe der MB konnte kein Zusammenhang zwischen dem Patientengeschlecht und der AG-Expression festgestellt werden. Bei den EP hingegen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der L1CAM-Expression und dem Patientengeschlecht ($p=0,05$).

Eine starke Ausprägung von $>50\%$ konnte nur bei weiblichen Patientinnen nachgewiesen werden. Bei Jungen zeigte sich lediglich eine L1CAM Expression von bis zu 25%.

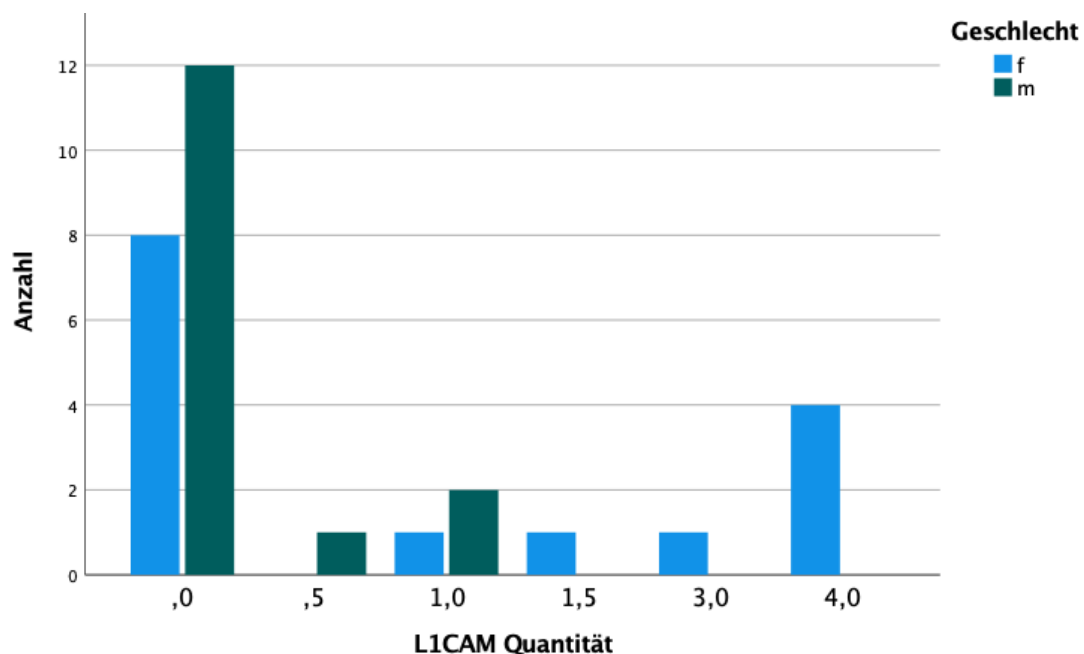


Abbildung 40: Darstellung der L1CAM-Quantität in Ependymomen, Gruppierung nach Geschlecht

Es besteht weder bei MB noch bei EP ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Patientengeschlecht und der Ausbildung von Rezidiven oder Metastasen. Ebenso konnte kein Zusammenhang zum Vorliegen von Metastasen zum Diagnosezeitpunkt festgestellt werden. Es gibt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der AG-Expression und dem Vorliegen eines Primärtumors oder Rezidivs. Ferner konnte auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der AG-Expression und dem Vorliegen von Metastasen zum Diagnosezeitpunkt oder späterer Ausbildung von Metastasen gefunden werden.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Patientengruppen

Während in der Literatur von einer Altersrange von etwa drei bis zehn Jahren und einem Altersgipfel von neun Jahren für das Vorliegen eines MB berichtet wird, ist die Range mit einem Alter von zwei bis 18 Jahren in dieser Arbeit etwas weiter (11, 12). Der Altersgipfel beläuft sich in dieser Arbeit auf 8,04 Jahre, wobei hier zu erwähnen ist, dass dies nicht dem mittleren Alter bei Diagnosestellung, sondern dem Alter bei Operation am UKT entspricht. Da MB nach Diagnosestellung meist zeitnah operiert werden, kann dieser Wert äquivalent genutzt werden.

Die Geschlechterverteilung entspricht in dieser Arbeit mit 17 Jungen zu neun Mädchen der Erwartung, da Jungen im Allgemeinen etwas häufiger betroffen sind, als Mädchen (11).

Die Verteilung der Subgruppen entspricht nur teilweise bereits bekannten Erkenntnissen. Gruppe 4-MB machen dabei den größten Anteil aus. In dieser Arbeit entspricht dies einem Anteil von 44,44 %. Die Gruppen SHH und WNT stellen sich hier mit einem Anteil von jeweils 14,81% gleichgroß dar. Erwartungsgemäß überwiegt der Anteil der SHH-MB (30%) über die WNT-MB (10%) in der Verteilung der Subgruppen. Die Gruppe 3-MB sind 18,52% bei einer erwarteten Häufigkeit von 25% etwas unterrepräsentiert (20).

Bei den EP konnte ebenfalls eine größere Altersrange (0 – 20 Jahre) als erwartet (0 – 4 Jahre) verzeichnet werden (26, 27). Gründe hierfür können in der Bildung von Metastasen (36%) oder Rezidiven (20%) und der daraus resultierenden längeren Behandlung der Patient:innen (mittleres Follow-up 32,37 Monate; Minimum: 0; Maximum: 129; Standardabweichung: 39,90) liegen.

Die Geschlechterverteilung ist in dieser Arbeit für Mädchen (50%) und Jungen (50%) gleich verteilt. In der Literatur sind Jungen etwas häufiger betroffen als Mädchen (27). PF-A-EP kommen, gefolgt von RELA-fusionierten EP am häufigsten vor. MPE sind nach PF-B-EP eher seltener zu finden. Noch seltener sind YAP1-fusionierte EP (2). Aufgrund dieser Seltenheit findet sich in der kleinen Kohorte dieser Studie kein YAP1 fusioniertes EP. Weiterhin berücksichtigt die molekulare Klassifizierung nach der MNP2.0-Studie in den hier verwendeten EP-Tumorproben nicht die neuere, erst ab 2022/23 in die Routine eingegangene Differenzierung zwischen ZFTA fusionierten RELA-positiven und ZFTA fusionierten RELA-negativen supratentoriellen EP. Letztere

sind allerdings deutlich seltener und in der Stichprobe offensichtlich nicht enthalten, da alle supratentoriellen EP RELA fusioniert waren. Aus diesem Grund wird in der weiteren Diskussion der Begriff RELA fusioniert beibehalten statt der Bezeichnung „ZFTA fusionierte RELA positive“ EP.

In dieser Arbeit stellen die PF-A-EP mit 45,83% gefolgt von RELA-fusionierten EP mit 41,67% ebenfalls die zwei größten Subgruppen dar. Die Myxopapillären EP bilden 8,33% ab. PF-B-EP sind in dieser Studie mit 4,17% unterrepräsentiert. Ein YAP1 fusioniertes EP war nicht vorhanden.

Die wesentliche Ursache für die Abweichung der Gruppenverteilung bei MB und EP im Vergleich zur Literatur liegt in der kleinen Gruppengröße dieser Studie, die nicht ausreichend repräsentativ ist.

4.2. Diskussion der Methodik

Für die Untersuchung der einzelnen AG wurde das TMA-Verfahren genutzt, welches die gleichzeitige Untersuchung einer hohen Probenanzahl ermöglicht. Die Produktion der TMAs und deren Färbungen erfolgten problemlos. Die Untersuchungen der Gewebe sind mit diesem Verfahren besonders effizient und kostengünstig, da mit der Färbung eines Flächenschnitts des TMA zeitgleich viele Gewebeprobeen eingefärbt werden. Dies verhindert Unterschiede im Färbeverfahren und erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit (58). Des weiteren ermöglicht die Anwendung der TMA-Methode eine gute Reproduzierbarkeit und Durchführung von Folgestudien, da so repetitiv immer wieder die gleichen Gewebeprobeen untersucht werden können, zu denen bereits klinische Daten gesammelt und zusammengestellt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Nutzen der TMA-Methode auf die Kohorte der kindlichen Hirntumore erweitert.

In der Auswertung der einzelnen Färbungen wurde für HER2 sowie für L1CAM ein von den anderen Färbungen abweichendes Bewertungsmuster verwendet. Dies liegt daran, dass die immunhistochemischen HER2 sowie die L1CAM-Färbungen bereits häufig in diversen Studien genutzt und immer nach diesem Muster ausgewertet werden. Bei HER2 handelt es sich um Empfehlungen der ASCO und CAP, bei L1CAM beruht die Auswahl auf den für die Arbeit genutzten Quellen, in denen eine L1CAM-Färbung angewandt wurde, sowie auf Rücksprache mit dem Department für

Pathologie und Neuropathologie (Abteilung Neuropathologie) der Universität Tübingen. Für die übrigen Färbungen (EphA2, GD2, CD276) liegen in der Literatur keine eindeutigen Auswertungsempfehlungen vor. Demnach wurde ein eigenes System entwickelt, welches sich an die L1CAM-Quantitätsauswertungskriterien anlehnt.

Auf eine Übernahme dieses Systems für die HER2 und L1CAM-Färbungen wurde verzichtet, um in diesen Kategorien eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien ermöglichen zu können.

4.3. Diskussion der AG-Färbungen

In dieser Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Expression von **L1CAM** bei RELA-fusionierten EP nachgewiesen werden. Ebenso fand sich ein positiver Zusammenhang zwischen der L1CAM-Expression bei EP und dem weiblichen Patientengeschlecht. MB stellten sich hingegen insgesamt häufiger und stärker positiv für L1CAM dar als EP. Insbesondere zeigt sich die Expression bei WNT und Gruppe 4-MB.

Weiterhin zeigte sich ein positiver signifikanter Zusammenhang zwischen der **EphA2**-Expression und der EP-Subgruppe PF-A sowie mit den MB-Subgruppen WNT und Gruppe 3.

Eine durchweg hohe Expression, sowohl im Sinne der Quantität als auch der Intensität, ließ sich für **CD276** in EP wie auch in MB nachweisen. Die quantitative CD 276-Expression zeigte sich in WNT-MB stärker ausgeprägt als in den MB ohne SHH oder WNT-Aktivierung.

In der Untersuchung der Antigene HER2, GD2 konnten keine signifikanten Erkenntnisse gewonnen werden.

Ein Zusammenhang zwischen Geschlecht und Diagnose oder dem Vorliegen von Metastasierung oder Rezidiven konnte nicht festgestellt werden.

4.3.1. L1CAM

Ein immunhistochemischer Nachweis von L1CAM im Zusammenhang mit **RELA-fusionierten EP** ist bereits aus vorherigen Untersuchungen bekannt. Molekulargenetisch betrachtet tritt die RELA-Fusion vermehrt gemeinsam mit einer hohen Expression von NFκB auf (47, 63). In dem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass L1CAM neben der Hochregulation von Zell-Zell-Adhäsionen und Tumorinvasion ebenfalls eine Rolle in der NFκB-Aktivierung spielt (63). NFκB ist auch in chronisch entzündlichem Gewebe zu finden und spielt eine Rolle in der inflammatorischen Immunantwort. Es fördert die Zellproliferation, entzieht Zellen der Apoptose und erhöht das Potential für Metastasierung und Angiogeneese. Das Vorhandensein von L1CAM im Tumor wie auch im IME fördert die dortige Aktivierung von NFκB (43). L1CAM ist demnach mit einer schlechteren Prognose, schlechterem Therapieansprechen und vermehrter Metastasenbildung assoziiert (45). In der Untersuchung der hier vorliegenden Tumore konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen L1CAM-positiven oder RELA-fusionierten EP und dem Vorliegen von Metastasierung oder Rezidiven festgestellt werden. Eine mögliche Limitation hierfür ist, dass bestehende Rezidive oder Metastasierungen an anderen Kliniken behandelt wurden, da viele Patient:innen lediglich für eine operative Versorgung im UKT behandelt wurden und im ISH-Tübingen daher keine klinischen Informationen zu diesen Ereignissen auffindbar waren. Des Weiteren wäre es möglich, dass etwaige Metastasen oder Rezidivereignisse im Rahmen unserer Untersuchungen noch nicht diagnostiziert wurden und erst bei einem längeren Follow-up zu finden sind. Das mittlere Follow-up der EP-Patienten betrug in dieser Studie 32,37 Monate (Minimum: 0, Maximum: 129, Standardabweichung: 39,90). Durch die fortdauernde Teilnahme betroffener Patient:innen an verschiedenen Therapiestudien zu EP befindet sich die Versorgung kindlicher Hirntumore in einem stetigen Prozess der Therapie-Weiterentwicklung und dem Versuch das Langzeitüberleben zu verbessern. In diesem Zusammenhang besteht der Verdacht, dass das Vorkommen von Metastasierungen und Rezidiven mit steigender Überlebensrate sinkt. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, sind Langzeitstudien nötig.

Die Expression von L1CAM in EP zeigte eine signifikante Korrelation zum weiblichen Geschlecht. Bei Untersuchung der Geschlechtsverteilung in der Gruppe der RELA-fusionierten EP zeigt sich, dass Mädchen im Allgemeinen häufiger betroffen sind als

Jungen (2). Von den in dieser Arbeit untersuchten RELA-fusionierten EP-Proben stammten 80% von weiblichen und 20% von männlichen Patient:innen. Bei den Tumoren der Mädchen konnte außerdem eine stärkere Expression als bei den Jungen festgestellt werden. Klein und Flanagan stellten 2016 eine Arbeit vor, in welcher die Unterschiede zwischen den Geschlechtern in Hinsicht auf inflammatorische Prozesse untersucht wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass das weibliche Geschlecht eher für chronische Inflammationen anfällig ist während bei männlichen Individuen eher akute Entzündungen auftreten (64). Durch den kontinuierlichen Reiz der Gewebsdestruktion durch den Tumor bildet sich eine chronische Entzündungsreaktion an dieser Stelle. Die erhöhte L1CAM Expression könnte hierauf zurückzuführen sein (45).

Neben RELA-fusionierten EP zeigten auch alle (n=2) nk supratentoriell lokalisierten EP eine L1CAM-Expression. Da keine der anderen molekulargenetischen Subgruppen ein solches Muster aufweisen liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei diesen Tumoren ebenfalls um RELA-fusionierte Tumoren handeln könnte.

Im Vergleich der Diagnosekategorien zeigten die **MB** insgesamt eine stärkere L1CAM-Expression als EP. In den molekulargenetischen MB-Subgruppen zeigten WNT- und Gruppe 4-MB eine signifikant stärkere L1CAM-Expression als SHH und Gruppe 3-MB.

Die L1CAM-Expression eignet sich somit in der Kategorie EP zur Unterscheidung zwischen RELA-fusionierten supratentoriellen EP und den anderen infratentoriellen und spinalen Ependymomen. Da diese Unterscheidung allerdings bereits aufgrund der Lokalisation des Tumors getroffen werden kann, hat der Nachweis eine LCAM1 Expression keinen diagnostischen, sondern nur einen pathophysiologischen Wert., Zur Unterscheidung zwischen MB-Subgruppen oder zur Zuordnung in die Diagnosekategorien MB oder EP ist L1CAM ebenfalls nicht geeignet.

4.3.2. EphA2

Eine Untersuchung der Expression von EphA2 in tumorösem Gewebe war bereits mehrfach Gegenstand klinischer und experimenteller Untersuchungen. Okada et al. untersuchten beispielsweise im Jahr 2007 die Expression von EphA2 in zerebralen malignen Tumoren verschiedener Lokalisationen bei pädiatrischen Patient:innen,

nachdem in älteren Studien bereits eine starke Überexpression von EphA2 in adulten Glioblastomen nachgewiesen werden konnte (54, 65). In einer Studie von Kong et al. wurde 2014 unter anderem die EphA2-Expression in den benignen Subependymomen untersucht, wobei keine signifikante Expression dargestellt werden konnte (66).

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung auf eine EphA2-Expression erstmals explizit auf pädiatrische MB und EP in Bezug auf deren jeweiligen molekulargenetischen Subgruppen erweitert, was in der Literatur bislang nicht beschrieben wurde.

In der Gruppe der **PF-A-EP** zeigte sich in neun von elf Fällen eine überwiegend starke Expression sowie eine hohe quantitative Anfärbung mit EphA2. Zwei PF-A-EP stellten sich negativ dar. Donovan et al. stellten bereits 2020 signifikante Expressionen von EphA2 in PF-A-EP vor, wobei in dieser Studie nicht zwischen adulten und pädiatrischen Tumoren unterschieden wurde (67). In PF-A-EP konnte in älteren Untersuchungen ein Zusammenhang zum MAPK-Signalweg beobachtet werden, in welchem auch EphA2 eine wichtige Rolle spielt. Der MAPK-Signalweg ist an vielen komplexen tumorproliferativen Prozessen mitbeteiligt (34, 52). EphA2 ist physiologisch sowohl beim Erwachsenen wie auch beim Säugling zu finden, wo es Aufgaben in der Zellmigration sowie der neuronalen und vaskulären Differenzierung übernimmt. Weiterführend konnte auch ein Zusammenhang zwischen Inflammation und EphA2 nachgewiesen werden, wo es vor allem der Angiogenese und der Gefäßpermeabilität dient. Durch die Gewebsdestruktion kommt es im Tumorgewebe zu Nekrosen und respektive zu einem hypoxischen und inflammatorischen Milieu (53). In diesem IME werden tumorassoziierte Makrophagen aktiv und schütten VEGF aus, dessen Aktivität durch das Vorhandensein von EphA2 weiter gesteigert wird und so zu Gefäßbildungen führt (43). Somit werden dem geschädigten Gewebe durch einen erhöhten Blutfluss vermehrt Immunzellen bereitgestellt, was wiederum zu einer Verstärkung der Inflammation führt (53). Allerdings wird durch die Angiogenese auch eine gute Versorgung des proliferierenden Tumors mit Glucose und Sauerstoff sichergestellt. Das Vorhandensein von EphA2 im IME kann somit ein Hinweis auf die Aktivität des Tumors und dessen Umgebung geben und die neovaskularisierenden und zellproliferativen Eigenschaften könnten ein Zeichen für mögliche Metastasierungsprozesse oder Tumorwachstum sein. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen PF-A-EP und Metastasierung konnte in dieser Arbeit, möglicherweise aufgrund der kleinen Kohorte, nicht festgestellt werden.

In den Gruppen der nk-infratentoriellen Tumore ließ sich nur einer, bei den RELA-fusionierten EP zwei Tumore schwach bis moderat anfärben. Hier kann aus den aktuellen Ergebnissen auf keinen Zusammenhang geschlossen werden.

Auch bei den pädiatrischen MB konnte erstmals vermehrt EphA2 nachgewiesen werden. Explizit in der Gruppe der **WNT-MB** wurde EphA2 quantitativ wie auch qualitativ stark exprimiert. Drei von vier WNT-MB zeigten sich hier positiv. Der WNT-Signalweg zeigt unter anderem eine Assoziation zum Rezeptor-Tyrosinkinase-, Ras- und MAPK-Signalweg, in welchen EphA2 wie bereits erwähnt eine teilhabende Rolle zukommt. Die genannten Signalwege scheinen hierbei gemeinsame Zielstrukturen, wie die Hochregulation von HOX-Genen zu haben (68). Bei den HOX-Genen handelt es sich um eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die in der Embryologie an der morphologischen Entwicklung von Geweben beteiligt sind. Sie sind aber auch sowohl in entzündetem wie auch in Tumorgewebe zu finden (69, 70).

Der Zusammenhang zwischen EphA2 und dem WNT-Signalweg sowie der damit assoziierten EMT wurde von Huang et al. bereits in Magenkarzinomen untersucht und dargestellt. Der genaue Zusammenhang zwischen der EphA2-Expression und der EMT ist hierbei aber noch unklar (68). Das Vorhandensein von EphA2 im IME könnte einen Hinweis auf eine potenzielle Evasion der Tumorzellen geben.

Auch in den **Gruppe 3-MB** wurde quantitativ viel EphA2 von schwacher bis moderater Intensität exprimiert. Drei von fünf Gruppe 3-MB stellten sich positiv für EphA2 dar. Donovan et al. stellten 2020 bereits erstmals Ergebnisse einer signifikanten Überexprimierung von EphA2 in Gruppe 3-MB vor. Bei den untersuchten Tumoren wurde allerdings nicht zwischen adulten und pädiatrischen Tumoren unterschieden (67). Bei Gruppe 3-MB ist unter anderem eine Störung in der MYC-Regulation zu finden, was durch den Eingriff in den natürlichen Zellzyklus zu Störungen und Überproliferation führen kann (5). Song et al. konnten in einer Studie zu Mammakarzinomen einen Zusammenhang zwischen einer hohen EphA2-Expression und einer vermehrten Aktivierung von MYC darstellen (71).

Das Vorhandensein von EphA2 scheint im Allgemeinen einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die genannten Transkriptionsfaktoren bzw. Signalwege zu haben und weist durch Hochregulation von EMT, Angiogeneese und Zellproliferation auf eine schlechtere Prognose hin.

Prinzipiell lassen diese ersten Ergebnisse bei einer kleinen Kohorte die Vermutung zu, dass analog der nachfolgenden Tabelle mit der recht einfachen Bestimmung der L1CAM und EphA2 Immunhistochemie eine grobe Zuordnung zu bestimmten Gruppen von MB möglich ist (3).

	L1CAM	EphA2
SHH	-	-
WNT	+	+
G3	-	+
G4	+	-

Tabelle 22: MB-Subgruppenklassifizierung nach immunhistochemischer Bestimmung von L1CAM und EphA2

Liegt keine erkennbare Expression von L1CAM und EphA2 vor und ist der Tumor in der Kleinhirnhemisphäre lokalisiert, besteht eine hohe Chance auf eine Zuordnung zur SHH Gruppe. Sind beide Marker stark exprimiert, sowohl in Intensität semiquantitativ als auch quantitativ in der Zahl der exprimierenden Zellen, und hat der Tumor intraoperativ eine Zuordnung zum Hirnstamm, dann handelt es sich mutmaßlich um einen Tumor der WNT Gruppe.

Bei einem Tumor mit Bezug zum Vermis und starker EphA2- sowie fehlender L1CAM Expression handelt es sich mit höherer Wahrscheinlichkeit um ein Gruppe 3-MB, bei umgekehrter Expression, also starker L1CAM- und fehlender EphA2-Expression, am ehesten um ein Gruppe 4-MB.

Sicherlich ist es notwendig, diese ersten Hinweise in einer suffizient großen Gruppe von mindestens 100 Medulloblastomen zu bestätigen oder als Zufallsbefund einzuordnen.

Ein weiterer Aspekt der EphA2-Expression in EP und MB ist die mögliche Entwicklung und Anwendung neuer Therapieoptionen, die EphA2 oder dessen Signalwege, wie beispielsweise den MAPK-Signalweg als Zielstruktur haben (52, 72). Durch dessen Angriff kann es zu Veränderung des IME kommen, was in Folge auch die Vitalität und das Wachstumsverhalten des Tumors verändern könnten.

4.3.3. CD276

In den beiden Diagnosekategorien **MB** und **EP** konnte beobachtet werden, dass insgesamt eine moderate bis starke Expression (EP: Mittelwert 2,52; Standardabweichung 0,55) (MB: Mittelwert 2,33; Standardabweichung 0,62) von relativ hoher Quantität (EP: Mittelwert 3,88; Standardabweichung 0,31) (MB: Mittelwert 3,61; Standardabweichung 0,54) in allen Subgruppen vorliegt.

Es gibt Hinweise auf eine Verbindung von CD276 zu maligner Proliferation, wobei bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob der Marker allgemein proliferativ oder inhibitorisch auf T-Zellen wirkt. Während man ursprünglich von einer immunstimulierenden Funktion ausging, zeigen neuere Studien eher immunsuppressive Wirkungen auf Zytokine wie beispielsweise TNF- α (55, 56). Im IME übernimmt TNF- α je nach Menge der Expression verschiedene Aufgaben: in hohen Konzentrationen werden Tumorgefäße vermehrt zerstört und der Tumor wird nekrotisch. In konstant niedrigen Konzentrationen wirkt es tumorproliferativ (43). Während TNF- α also durch die konstante Entzündungsreaktion durch den Tumor initiiert wird, kann eine hohe CD276-Expression dem entgegenwirken und die TNF- α -Ausschüttung drosseln. Dies weist auf eine konstante moderate Aktivierung von TNF- α hin, was im Gesamten eine tumorproliferative Wirkung zeigt und die Korrelation einer CD276-Expression mit einer schlechteren Prognose erklären kann (55).

4.4. Limitationen

In beiden Hauptdiagnosegruppen liegt eine geringe Gewebeprobenzahl vor (MB n=27, EP n=30). Daraus ergeben sich sehr kleine Stichprobengrößen in den einzelnen molekulargenetischen Subgruppen. Bei den EP stellt sich beispielsweise die Gruppe PF-B mit n=1 dar. Mit einer so geringen Stichprobengröße ist eine Vergleichbarkeit nicht gewährleistet. Daher konnten keine signifikant verlässlichen Ergebnisse erhoben werden. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Untersuchung bereits vorliegender Gewebeproben handelt, war es nicht möglich die Anzahl der unterrepräsentierten Subgruppen zu erhöhen. Eine weiterführende Untersuchung dieser unterrepräsentierten Gruppen mit höheren Stichprobengrößen könnte zusätzliche signifikante Ergebnisse in Hinblick auf das IME liefern und weitere Zusammenhänge identifizieren. Im Allgemeinen eignet sich diese Arbeit als Pilotprojekt für mögliche Hinweise auf neue Erkenntnisse für das Vorhandensein von

inflammatorischen AG im IME oder weiterführend für Therapieoptionen im Bereich der EP und MB. Hier stellen sich vor allem vielversprechende Ergebnisse für die Expressionen von EphA2 in PF-A-EP, Gruppe 3-MB und WNT-MB dar.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die TMA - Methode genutzt, um das inflammatorische Microenvironment von pädiatrischen Medulloblastomen und Ependymomen auf das Vorhandensein zuvor festgelegter Antigene (L1CAM, EphA2, GD2, HER2 und CD276) zu untersuchen. Dabei handelt es sich um Antigene, die unter anderem in inflammatorischem Gewebe zu finden sein können und bereits in anderen Tumorentitäten nachgewiesen wurden.

In der Gruppe der pädiatrischen PF-A-EP sowie WNT-MB und Gruppe 3-MB zeigten sich erstmals signifikante Anfärbungen für EphA2. Dies weist im IME auf Migrationsfähigkeiten des Tumors und eine schlechtere Prognose hin. Diese ist zum Beispiel für PF-A Ependymome und für Gruppe 3 Medulloblastome gegeben, nicht aber für WNT Medulloblastome, die im Allgemeinen eine sehr gute Prognose haben und als low-risk Tumore gelten.

EphA2 kann durch dessen Rolle im Zellzyklus Rückschlüsse auf die Aktivität des Tumorgewebes geben und könnte sich somit hilfreich für Therapieoptionen darstellen, wenn es in der Zukunft therapeutische Interventionsmöglichkeiten gäbe, die EphA2 als Target haben.

Eine L1CAM-Expression konnte in RELA-fusionierten EP, insbesondere bei Mädchen, nachgewiesen werden. Dies entspricht dem aktuellen Kenntnisstand. Im IME spricht diese Expression für eine schlechtere Prognose und erhöhte Metastasierungs- und Rezidivraten. ZFTA fusionierte und RELA positive supratentorielle Ependymome haben ein höheres Rezidiv- und Metastasierungsrisiko und gelten als problematisch.

CD276 konnte in MB wie auch in EP in allen molekulargenetischen Subgruppen in starker Expression nachgewiesen werden. CD276 geht ebenfalls mit einer schlechteren Prognose und vermehrter Tumorprogression einher.

Eine Korrelation zu Rezidiven oder Metastasierungen konnte in dieser Arbeit für keine der genannten Antigene nachgewiesen werden.

Der Nachweis der genannten Antigene verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Tumorwachstumsprozessen und Entzündungsreaktionen des umliegenden Gewebes. Die Mediatoren, welche im inflammatorischen Microenvironment zu finden sind, spielen auch in der Modulation des Tumorwachstums eine bedeutende Rolle und

heben die Wichtigkeit der Erfassung dieser molekularen Prozesse hervor. Durch weitere Studien und aufbauende Erkenntnisse kann das Verständnis der Tumorphysiologie erweitert werden und neben prädiktiven und prognostischen Markern auch neue Therapiemöglichkeiten ergründet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA - A Cancer Journal for Clinicians*. 2014;64(2):83-103.
2. Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F, et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell*. 2015;27(5):728-43.
3. Frychel J, Zipfel J, Schuhmann M. Inflammatorisches Microenvironment in Medulloblastomen - eine Pilotstudie (Inflammatory microenvironment in medulloblastoma - a pilot study) [e-Poster]. 74 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie; Stuttgart: Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC); 27.06.2023.
4. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncology*. 2019;21(Supplement_5):v1-v100.
5. Cacciotti C, Fleming A, Ramaswamy V. Advances in the molecular classification of pediatric brain tumors: a guide to the galaxy. *Journal of Pathology*. 2020;251(3):249-61.
6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
7. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncology*. 2021;23(8):1231-51.
8. Funakoshi Y, Hata N, Kuga D, Hatae R, Sangatsuda Y, Fujioka Y, et al. Pediatric Glioma: An Update of Diagnosis, Biology, and Treatment. *Cancers*. 2021;13(4).
9. Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurology*. 2007;6(12):1073-85.
10. Khatua S, Song A, Citla Sridhar D, Mack SC. Childhood Medulloblastoma: Current Therapies, Emerging Molecular Landscape and Newer Therapeutic Insights. *Current Neuropharmacology*. 2018;16(7):1045-58.
11. Smoll NR, Drummond KJ. The incidence of medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours in adults and children. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2012;19(11):1541-4.
12. Millard NE, De Braganca KC. Medulloblastoma. *Journal of Child Neurology*. 2016;31(12):1341-53.
13. Aref D, Croul S. Medulloblastoma: recurrence and metastasis. *CNS Oncology*. 2013;2(4):377-85.
14. Koeller KK, Rushing EJ. From the archives of the AFIP: medulloblastoma: a comprehensive review with radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2003;23(6):1613-37.
15. Donahue B. Short- and long-term complications of radiation therapy for pediatric brain tumors. *Pediatric Neurosurgery*. 1992;18(4):207-17.
16. Orr BA. Pathology, diagnostics, and classification of medulloblastoma. *Brain Pathology*. 2020;30(3):664-78.
17. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currie DS, Eden C, et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 2010;468(7327):1095-9.
18. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(12):818-34.

19. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):473-84.
20. Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *Journal of Neurosurgery Pediatrics.* 2019;24(4):353-63.
21. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2004;20:781-810.
22. Fangusaro J, Bandopadhyay P. Advances in the classification and treatment of pediatric brain tumors. *Curr Opin Pediatr.* 2021;33(1):26-32.
23. Chen H, Liu H, Qing G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther.* 2018;3:5.
24. Elsamadicy AA, Koo AB, David WB, Lee V, Zogg CK, Kundishora AJ, et al. Comparison of epidemiology, treatments, and outcomes in pediatric versus adult ependymoma. *Neuro-Oncology Advances.* 2020;2(1).
25. Jünger ST, Timmermann B, Pietsch T. Pediatric ependymoma: an overview of a complex disease. *Child's Nervous System.* 2021;37(8):2451-63.
26. McGuire CS, Sainani KL, Fisher PG. Incidence patterns for ependymoma: a surveillance, epidemiology, and end results study. *Journal of Neurosurgery.* 2009;110(4):725-9.
27. Vitanza NA, Partap S. Pediatric Ependymoma. *Journal of Child Neurology.* 2016;31(12):1354-66.
28. Yuh EL, Barkovich AJ, Gupta N. Imaging of ependymomas: MRI and CT. *Child's nervous system.* 2009;25(10):1203-13.
29. El-Gaidi MA. Descriptive epidemiology of pediatric intracranial neoplasms in Egypt. *Pediatric Neurosurgery.* 2011;47(6):385-95.
30. Allen JC, Siffert J, Hukin J. Clinical manifestations of childhood ependymoma: a multitude of syndromes. *Pediatric Neurosurgery.* 1998;28(1):49-55.
31. Rawlings CEI, Giangaspero F, Burger PC, Bullard DE. Ependymomas: a clinicopathologic study. *Surgical Neurology International.* 1988;29(4):271-81.
32. Massimino M, Miceli R, Giangaspero F, Boschetti L, Modena P, Antonelli M, et al. Final results of the second prospective AIEOP protocol for pediatric intracranial ependymoma. *Neuro Oncology.* 2016;18(10):1451-60.
33. Merchant TE, Bendel AE, Sabin ND, Burger PC, Shaw DW, Chang E, et al. Conformal Radiation Therapy for Pediatric Ependymoma, Chemotherapy for Incompletely Resected Ependymoma, and Observation for Completely Resected, Supratentorial Ependymoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2019;37(12):974-83.
34. Khatua S, Ramaswamy V, Bouffet E. Current therapy and the evolving molecular landscape of paediatric ependymoma. *European journal of cancer.* 2017;70:34-41.
35. Neumann JE, Spohn M, Obrecht D, Mynarek M, Thomas C, Hasselblatt M, et al. Molecular characterization of histopathological ependymoma variants. *Acta Neuropathologica.* 2020;139(2):305-18.
36. Pietsch T, Wohlers I, Goschzik T, Dreschmann V, Denkhaus D, Dörner E, et al. Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95–RELA fusions leading to pathological activation of the NF- κ B signaling pathway. *Acta Neuropathologica.* 2014;127(4):609-11.
37. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine.* 2016;8(3):227-41.

38. Ellison DW, Aldape KD, Capper D, Fouladi M, Gilbert MR, Gilbertson RJ, et al. cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathology*. 2020;30(5):863-6.
39. Szulzewsky F, Holland EC, Vasioukhin V. YAP1 and its fusion proteins in cancer initiation, progression and therapeutic resistance. *Dev Biol*. 2021;475:205-21.
40. Das P, Taube JH. Regulating Methylation at H3K27: A Trick or Treat for Cancer Cell Plasticity. *Cancers*. 2020;12(10).
41. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine*. 2016;279(6):541-62.
42. Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*. 2020;9(10).
43. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr Pharm Des*. 2009;15(17):1949-55.
44. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)*. 2019;56(1).
45. Altevogt P, Doberstein K, Fogel M. L1CAM in human cancer. *International Journal of Cancer*. 2016;138(7):1565-76.
46. Kiefel H, Bondong S, Hazin J, Ridinger J, Schirmer U, Riedle S, et al. L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adhesion & Migration*. 2012;6(4):374-84.
47. Onishi S, Yamasaki F, Nakano Y, Takayasu T, Amatya VJ, Kolakshyapati M, et al. RELA fusion-positive anaplastic ependymoma: molecular characterization and advanced MR imaging. *Brain Tumor Pathol*. 2018;35(1):41-5.
48. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-87.
49. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*. 2014;2014.
50. Nazha B, Inal C, Owonikoko TK. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2020;10.
51. Wilson K, Shiuan E, Brantley-Sieders DM. Oncogenic functions and therapeutic targeting of EphA2 in cancer. *Oncogene*. 2021;40(14):2483-95.
52. London M, Gallo E. The EphA2 and cancer connection: potential for immune-based interventions. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(10):8037-48.
53. Coulthard MG, Morgan M, Woodruff TM, Arumugam TV, Taylor SM, Carpenter TC, et al. Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. *Am J Pathol*. 2012;181(5):1493-503.
54. Wykosky J, Gibo DM, Stanton C, Debinski W. EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res*. 2005;3(10):541-51.
55. Liu S, Liang J, Liu Z, Zhang C, Wang Y, Watson AH, et al. The Role of CD276 in Cancers. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:654-84.
56. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nature Immunology*. 2001;2(3):269-74.
57. Heidelberg K. Molekulare Neuropathologie 2.0 (MNP 2.0) o.J. [Available from: <https://www.kitz-heidelberg.de/klinische-studien/diagnostik-studien/mnp-20/>].
58. Behling F, Schittenhelm J. Tissue microarrays - translational biomarker research in the fast lane. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(10):833-5.
59. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer:

- American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3997-4013.
60. Dr. Turzynski PDG, Prof. Dr. Lebeau, Dr. Leuenroth. Pathologie Her2/neu 2001-2014 [Available from: https://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Antikorper/Her2_neu/her2_neu.html].
61. Ventana R. Cell Conditioning Solution 1 (CC1) 2022 [updated 17.02.2022. Available from: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/web/de/de/documents/download/08e72e53-6633-ea11-fa90-005056a772fd>].
62. Ventana R. Cell Conditioning Solution 2 (CC2) 2022 [updated 17.02.2022. Available from: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/00a1ae86-6733-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=de>].
63. Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, Weinlich R, Dalton JD, Li Y, et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF- κ B signalling in ependymoma. *Nature*. 2014;506(7489):451-5.
64. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(10):626-38.
65. Okada H, Low KL, Kohanbash G, McDonald HA, Hamilton RL, Pollack IF. Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas. *J Neurooncol*. 2008;88(3):245-50.
66. Kong LY, Wei J, Haider AS, Liebelt BD, Ling X, Conrad CA, et al. Therapeutic targets in subependymoma. *J Neuroimmunol*. 2014;277(1-2):168-75.
67. Donovan LK, Delaidelli A, Joseph SK, Bielamowicz K, Fousek K, Holgado BL, et al. Locoregional delivery of CAR T cells to the cerebrospinal fluid for treatment of metastatic medulloblastoma and ependymoma. *Nat Med*. 2020;26(5):720-31.
68. Huang J, Xiao D, Li G, Ma J, Chen P, Yuan W, et al. EphA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer cells. *Oncogene*. 2014;33(21):2737-47.
69. Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol*. 2005;205(2):154-71.
70. Pai P, Sukumar S. HOX genes and the NF- κ B pathway: A convergence of developmental biology, inflammation and cancer biology. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1874(2):188450.
71. Song W, Hwang Y, Youngblood VM, Cook RS, Balko JM, Chen J, et al. Targeting EphA2 impairs cell cycle progression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers. *Oncogene*. 2017;36(40):5620-30.
72. Yuan J, Dong X, Yap J, Hu J. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13(1).

7. Anhang

7.1. TMA-Pläne

	TMA 1-21									
	1 (A)	2 (B)	3 (C)	4 (D)	5 (E)	6 (F)	7 (G)	8 (H)	9 (I)	10 (J)
1	1813/10	1813/10	1851/11	817/12	817/12	16/13	16/13	671/13	leer	Kontrolle M5/21
2	671/13	733/13	733/13	1732/13	17/14	17/14	85/14	85/14	leer	Kontrolle 556/01 1
3	438/14	438/14	1867/14	1867/14	454/15	454/15	575/16	575/16	leer	
4	1430/16	1430/16	89/17	87/17	973/17	973/17	frei f. 1703/17	402/18	leer	
5	402/18	402/18	frei f. 654/18	1911/18	1911/18	1913/18	1913/18	1977/18	leer	
6	1977/18	2109/18	2109/18	532/19	532/19	leer	leer	leer	leer	

	TMA Medulloblastome									
	TMA 2-21									
	1 (A)	2 (B)	3 (C)	4 (D)	5 (E)	6 (F)	7 (G)	8 (H)	9 (I)	10 (J)
1	1007/19	1007/19	frei f. 1083/19	1381/19	1381/19	9/20	9/20	9/20	leer	Kontrolle M5/21
2	166/20	166/20	1022/20	1022/20	2258/20	2258/20			leer	Kontrolle 556/01 1
3									leer	
4									leer	
5									leer	
6								leer	leer	

Anlage 1.1 und 1.2: TMA-Übersicht der hergestellten MB-TMAs TMA 1-21 und TMA 2-21

	TMA Ependymome									
	TMA 3-21									
	1 (A)	2 (B)	3 (C)	4 (D)	5 (E)	6 (F)	7 (G)	8 (H)	9 (I)	10 (J)
1	frei f. 246/11	56/14	56/14	360/14	360/14	891/14	1288/18	1288/18	leer	Kontrolle M5/21
2	frei f. 1395/18	1406/18	1406/18	1861/18	1861/18	2351/18	2351/18	796/19	leer	Kontrolle 556/01 2
3	795/19	frei f. 1282/19	1515/19	1515/19	1566/19	1566/19	2082/19	frei f. 2144/19	leer	
4	180/20	180/20	596/20	596/20	1072/20	1072/20	1169/20	1169/20	leer	
5	2187/20	2187/20	239/21						leer	
6									leer	

Anlage 1.3: TMA-Übersicht der hergestellten EP-TMA TMA 3-21

7.2. Statistik: Häufigkeitstabellen

L1CAM Quantität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	,0	9	33,3	33,3	33,3
	,5	2	7,4	7,4	40,7
	2,0	2	7,4	7,4	48,1
	2,5	1	3,7	3,7	51,9
	3,0	6	22,2	22,2	74,1
	3,5	2	7,4	7,4	81,5
	4,0	5	18,5	18,5	100,0
	Gesamt	27	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Medulloblastom

Anlage 2.1: Häufigkeitstabelle für die quantitative L1CAM-Auswertung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

EphA2 Quantität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	,0	18	66,7	66,7	66,7
	1,0	1	3,7	3,7	70,4
	2,5	1	3,7	3,7	74,1
	3,0	1	3,7	3,7	77,8
	3,5	1	3,7	3,7	81,5
	4,0	5	18,5	18,5	100,0
	Gesamt	27	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Medulloblastom

Anlage 2.2: Häufigkeitstabelle für die quantitative EphA2-Auswertung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

EphA2 Intensität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	,0	19	70,4	70,4	70,4
	1,0	1	3,7	3,7	74,1
	2,0	4	14,8	14,8	88,9
	2,5	1	3,7	3,7	92,6
	3,0	2	7,4	7,4	100,0
	Gesamt	27	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Medulloblastom

Anlage 2.3: Häufigkeitstabelle für die qualitative EphA2-Auswertung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

CD276 Quantität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	2,0	1	3,7	3,7	3,7
	3,0	7	25,9	25,9	29,6
	3,5	3	11,1	11,1	40,7
	4,0	16	59,3	59,3	100,0
	Gesamt	27	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Medulloblastom

Anlage 2.4: Häufigkeitstabelle für die quantitative CD276-Auswertung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

CD276 Intensität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1,0	1	3,7	3,7	3,7
	1,5	3	11,1	11,1	14,8
	2,0	11	40,7	40,7	55,6
	2,5	1	3,7	3,7	59,3
	3,0	11	40,7	40,7	100,0
	Gesamt	27	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Medulloblastom

Anlage 2.5: Häufigkeitstabelle für die qualitative CD276-Auswertung in der Diagnosekategorie Medulloblastom

L1CAM Quantität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	,0	20	66,7	66,7	66,7
	,5	1	3,3	3,3	70,0
	1,0	3	10,0	10,0	80,0
	1,5	1	3,3	3,3	83,3
	3,0	1	3,3	3,3	86,7
	4,0	4	13,3	13,3	100,0
	Gesamt	30	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Ependymom

Anlage 3.1: Häufigkeitstabelle für die quantitative L1CAM-Auswertung in der Diagnosekategorie Ependymom

EphA2 Quantität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	,0	17	56,7	56,7	56,7
	,5	1	3,3	3,3	60,0
	1,0	1	3,3	3,3	63,3
	1,5	2	6,7	6,7	70,0
	2,0	1	3,3	3,3	73,3
	3,0	3	10,0	10,0	83,3
	3,5	2	6,7	6,7	90,0
	4,0	3	10,0	10,0	100,0
	Gesamt	30	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Ependymom

Anlage 3.2: Häufigkeitstabelle für die quantitative EphA2-Auswertung in der Diagnosekategorie Ependymom

EphA2 Intensität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	,0	17	56,7	56,7	56,7
	,5	1	3,3	3,3	60,0
	1,0	2	6,7	6,7	66,7
	1,5	1	3,3	3,3	70,0
	2,0	1	3,3	3,3	73,3
	2,5	2	6,7	6,7	80,0
	3,0	6	20,0	20,0	100,0
	Gesamt	30	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Ependymom

Anlage 3.3: Häufigkeitstabelle für die qualitative EphA2-Auswertung in der Diagnosekategorie Ependymom

GD2 Quantität^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	26	86,7	86,7	86,7
	4	4	13,3	13,3	100,0
	Gesamt	30	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Ependymom

Anlage 3.4: Häufigkeitstabelle für die quantitative GD-Auswertung in der Diagnosekategorie Ependymom

GD2 Intensität^a

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig 0	26	86,7	86,7	86,7
1	4	13,3	13,3	100,0
Gesamt	30	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Ependymom

Anlage 3.5: Häufigkeitstabelle für die qualitative GD2-Auswertung in der Diagnosekategorie Ependymom

CD276 Quantität^a

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig 3,0	3	10,0	10,0	10,0
3,5	1	3,3	3,3	13,3
4,0	26	86,7	86,7	100,0
Gesamt	30	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Ependymom

Anlage 3.4: Häufigkeitstabelle für die quantitative CD276-Auswertung in der Diagnosekategorie Ependymom

CD276 Intensität^a

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig 1,0	1	3,3	3,3	3,3
1,5	1	3,3	3,3	6,7
2,0	8	26,7	26,7	33,3
2,5	6	20,0	20,0	53,3
3,0	14	46,7	46,7	100,0
Gesamt	30	100,0	100,0	

a. Diagnose Kategorie = Ependymom

Anlage 3.5: Häufigkeitstabelle für die qualitative CD276-Auswertung in der Diagnosekategorie Ependymom

7.3. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Department für Neurochirurgie der Universitätsklinik Tübingen in der Sektion pädiatrische Neurochirurgie unter Leitung von Herr Prof. Dr. med. Martin Schuhmann durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herr Dr. med. Julian Zipfel und Herr Prof. Dr. med. Martin Schuhmann. Die Erstellung der klinischen Datenbank erfolgte durch Herr Dr. med. Julian Zipfel und mich. Die Anfertigung der TMAs wurde, nach Einarbeitung durch Frau Dr. med. Christina Fodi und Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm, durch mich durchgeführt. Das Schneiden der Blöcke mit dem Mikrotom, als auch die Durchführung der HE- und immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch die Mitarbeiter des Labors des Neuropathologischen Instituts. Die anschließende Auswertung wurde nach Einarbeitung durch Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm und Rücksprache mit Herr Dr. med. Julian Zipfel durch mich durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich, in Zusammenarbeit mit Herr Dr. med. Julian Zipfel. Ich versichere, das Manuskript vollständig selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 04.01.2024

7.4. Veröffentlichungen

- Frychel, J., Zipfel, J., Schuhmann, M. (2023, 27.06.). Inflammatorisches Microenvironment in Medulloblastomen - eine Pilotstudie (Inflammatory microenvironment in medulloblastoma - a pilot study) [e-Poster]. 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Stuttgart.

Inflammatorisches Microenvironment in Medulloblastomen - eine Pilotstudie

Julia Frychel, Julian Zipfel, Martin Ulrich Schuhmann



Universitätsklinikum
Tübingen

Einführung

- 15 - 20% aller kindlichen malignen Hirntumore sind Medulloblastome (1, 2)
- Molekulargenetische Einteilung je nach Veränderungen in molekular-biologischen Signalwegen oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren: Sonic-Hedgehog (SHH), Wingless (WNT), Non-SHH/WNT: Gruppe 3 (G3) und Gruppe 4 (G4) - Medulloblastome (3)
- Tumore und Entzündungsreaktionen gehen miteinander einher (4)

Targets:

GD2: Gangliosid; Zellproliferation, -migration, Invasion, Apoptoseresistenz

HER2: Wachstumsfaktorrezeptor; Zellproliferation, -differenzierung, -migration, Invasion, Angiogenesen

EphA2: Ephrin-Rezeptor; Tumorprogression, Angiogenese

L1CAM: Zelladhäsionsmolekül; Zellmigration, Invasion, Metastasierung

CD276: Immuneckpoint; Regulator inflammatorischer Zytokine, Metastasierung, Angiogenese, Zellproliferation, Invasion, Apoptose

Methodik

Tissue Microarray-Methode

- Gleichzeitige Untersuchung mehrerer Gewebeprobe
- aus Tumorgewebeprobe werden relevante Bereiche (1mm) ausgestanzt und in einen leeren Paraffinblock eingesetzt. Dieser wird mittels Mikrotom geschnitten und auf Objektträger aufgebracht, welche immunhistochemisch angefärbt und lichtmikroskopisch untersucht werden.
- Untersuchung von 27 Proben: 4 SHH, 4WNT, 5 G3, 12 G4, 2 nonSHH/WNT

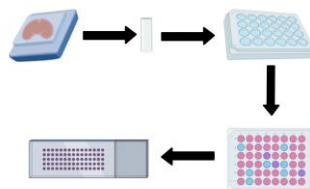


Abb. 1: schematische Darstellung der Microarray-Methode, © 2023 BioRender

Ergebnisse

EphA2: WNT- und G3-Medulloblastome zeigten quantitativ eine signifikant stärkere Anfärbung im Vergleich zu SHH und G4.

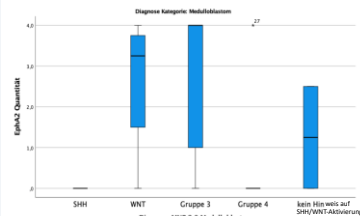


Abb. 2: Boxplot: Häufigkeitsverteilung der EphA2-Quantität innerhalb der molekularen Subgruppen

CD276: starke quantitative sowie qualitative Expression in allen Subgruppen.

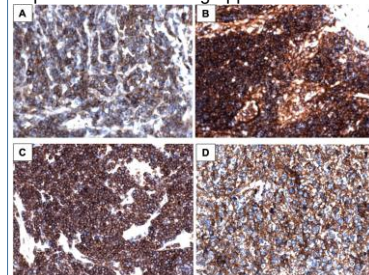


Abb. 3: CD276-Expression in Medulloblastomen. A: SHH, B: WNT, C: G3, D: G4

GD2, HER2: keine Anfärbung.

L1CAM: geringfügig vermehrte Anfärbung in WNT- und G4- Medulloblastomen.

- Möglicherweise Subgruppendifferenzierung möglich:

	L1CAM	EphA2
SHH	-	-
WNT	+	+
G3	-	+
G4	+	-

Tab. 1: Subgruppendifferenzierung nach L1CAM und EphA2-Expression

Zusammenfassung

- Möglicher klinischer/prognostischer Einfluss von EphA2 (und L1CAM): größere Kohorte und weitere Untersuchungen nötig
- Ubiquitäre Expression von CD276: mögliches Target für therapeutische Intervention wie z.B. CAR-T Zell-Therapie

Quellen:

(1) Cacciotti, C., A. Fleming, and V. Ramaswamy, *Advances in the molecular classification of pediatric brain tumors: a guide to the galaxy*. Journal of Pathology, 2020. 251(3): p. 249-261; (2) Khatua, S., et al., *Childhood Medulloblastoma: Current Therapies, Emerging Molecular Landscape and Newer Therapeutic Insights*. Current Neuropharmacology, 2018. 16(7): p. 1045-1058; (3) Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathologica, 2016. 131(6): p. 803-20; (4) Keibel, A., V. Singh, and M.C. Sharma, *Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression*. Curr Pharm Des, 2009. 15(17): p. 1949-55.

7.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Marcos Tatagiba, der mir ermöglicht hat meine Dissertation in seiner Abteilung der Neurochirurgie und Neurotechnologie des Universitätsklinikums Tübingen abzulegen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Martin Schuhmann, leitender Oberarzt und Leiter der Sektion pädiatrische Neurochirurgie, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Doktorarbeit unter seiner Betreuung zu verfassen.

Mein außerordentlicher Dank geht an Herrn Dr. med. Julian Zipfel für die Konzeption und Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit, für die zuverlässige und hervorragende Betreuung als Mentor und dessen stetige Erreichbarkeit. Ohne die enge Zusammenarbeit und wertvolle Beratung wäre mir dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm und das Team der Neuropathologie aussprechen, welche mich als Kooperationspartner der Neuropathologie der Universitätsklinik Tübingen unterstützt haben. All meine Fragen wurden geduldig und zuverlässig beantwortet und ich habe mich stets willkommen gefühlt.

Ein großer Dank geht an alle Patienten, die ihre Zustimmung gegeben haben, dass das Tumorgewebe und die klinischen Daten für die Forschung verwendet werden dürfen.

Der größte Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich in jedem Schritt der Dissertationsanfertigung unterstützt und motiviert haben.