

Aus der Kinderklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel

# **Expression immunmodulierender Marker in Zusammenhang mit Immuntherapie bei kindlichen Hirntumoren**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johanna Lager

aus Hannover

Würzburg, August 2023

**Referent:** Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

**Koreferentin:** Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 13.03.2024

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b> .....	1
1.1	Atypische teratoide Rhabdoidtumore (AT/RT) .....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Inzidenz .....	1
1.1.3	Klinik.....	2
1.1.4	Histologie .....	2
1.1.5	Therapie und Prognose .....	4
1.2	Grundlagen der Immuntherapie .....	5
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	10
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b> .....	12
3.1	Ethikvotum.....	12
3.2	Patientenkohorte .....	12
3.3	Immunhistochemische Untersuchung an Paraffinpräparaten .....	13
3.3.1	Die Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode .....	13
3.3.2	Allgemeines zur Färbung .....	14
3.3.3	Vorbehandlung der Präparate .....	15
3.3.4	Inkubation mit dem Primärantikörper.....	17
3.3.5	Nachweis .....	17
3.3.6	Entwicklung mit DAB .....	18
3.3.7	Färbung mit Hämalaun .....	18
3.3.8	Fixierung.....	19
3.4	Verwendete Antikörper.....	19
3.4.1	CD 3.....	19
3.4.2	Humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA).....	20
3.4.3	PD-L1 .....	21
3.5	Auswertung .....	21
3.5.1	Auswertungskriterien der verschiedenen Antikörper .....	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	24
4.1	CD 3.....	24
4.2	HLA-Klasse I.....	26
4.3	HLA-Klasse II.....	28
4.4	Vergleich zwischen Exprimierung von HLA-Klasse I und II .....	30

4.5	PD-L1 exprimierende Zellen .....	31
4.6	Vergleich der einzelnen Tumore.....	34
4.7	Vergleiche der Glioblastom-Präparate.....	39
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>

## Appendix

- I. Abkürzungsverzeichnis**
- II. Abbildungsverzeichnis**
- III. Tabellenverzeichnis**
- IV. Digitaler Anhang**
- V. Danksagungen**
- VI. Lebenslauf**
- VII. Eigene Veröffentlichungen**

# 1 Einführung

## 1.1 Atypische teratoide Rhabdoidtumore (AT/RT)

### 1.1.1 Definition

Der atypische teratoide Rhabdoidtumor (AT/RT) ist ein hoch maligner Tumor des zentralen Nervensystems (ZNS), der hauptsächlich bei sehr jungen Kindern auftritt. Er besteht aus rhabdoiden Zellen, häufig kombiniert mit primitiven neuroektodermalen Zellen und Zellen mit anderweitiger Differenzierung, zum Beispiel (z. B.) epithelialen, mesenchymalen, neuronalen oder glialen Ursprungs (Haberler et al. 2021). In nahezu allen Zellen des Tumors ist das hSNF5/INI 1-Gen (human sucrose nonfermentable complex 5/Integrase Interactor 1) deaktiviert (Sévenet et al. 1999). Die WHO ordnet dem AT/RT den ZNS WHO Grad 4 zu (Haberler et al. 2021).

### 1.1.2 Inzidenz

Die genaue Inzidenz des AT/RT festzustellen ist auf Grund häufiger Fehldiagnosen sehr schwer (Rorke et al. 1996). Dennoch kann man den AT/RT als sehr seltenen Tumor bezeichnen. Er macht nur circa 1 bis 2 % aller Tumore des ZNS im Kindesalter aus (Haberler et al. 2021). Wenn man jedoch nur die Hirntumore bei Kindern bis zu einem Alter von 3 Jahren betrachtet, findet man AT/RT bei bis zu 20 % der Fälle (Tekautz et al. 2005; Ginn und Gajjar 2012). Der Altersgipfel liegt bei circa 2 Jahren, 75 % der AT/RT werden bei Kindern unter 3 Jahren diagnostiziert. 90 % der Kinder mit AT/RT sind unter 5 Jahren. Jungen scheinen häufiger betroffen zu sein als Mädchen (Strother 2005). Erwachsene sind nur in einzelnen Fällen von AT/RT betroffen. Hier wird die Entstehung aus anderen Tumorentitäten diskutiert (Nobusawa et al. 2016).

### 1.1.3 Klinik

Die Symptome des AT/RT sind unspezifisch und beruhen vor allem auf der Lage des Tumors und den durch Volumenzunahme des Tumors entstehenden Hirndruck sowie Beeinträchtigung anderer Strukturen im Gehirn (Bhattacharjee et al. 1997). Am spezifischsten sind die durch die Lage des Tumors verursachten Nervenausfälle der Hirnnerven VI und VII. Hauptsächlich bei Kindern über 3 Jahren werden außerdem Kopfschmerzen sowie eine Hemiplegie beschrieben (Haberler et al. 2021). Da bei Kleinkindern die Suturen noch nicht verschlossen sind, sind hier häufig eine schnelle Zunahme des Kopfumfanges sowie die Ausbildung eines Hydrocephalus die ersten Anzeichen des schnell wachsenden Tumors (Reddy 2005).

### 1.1.4 Histologie

Die Entität der AT/RT wurde erst 1989 beschrieben und 1996 durch Rorke et alii (et al.) definiert. Es war zu dem Zeitpunkt gelungen, eine Abgrenzung zu primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) zu finden (Rorke et al. 1996). Histopathologisch sehen sich die Tumore sehr ähnlich. Charakteristisch für die AT/RT sind der große Anteil an rhabdoiden Zellen. Diese sind durch den exzentrischen, runden Zellkern, der vesikuläres Chromatin enthält, eosinophile Nucleoli und scharf abzugrenzende Zellmembranen zu erkennen. Die Zellen enthalten zudem einen großen Anteil an eosinophilem Zytoplasma. Jedoch ist nur bei einem kleinen Teil der AT/RT der Anteil der rhabdoiden Zellen tatsächlich vorherrschend. In den meisten Fällen enthalten die Tumore variable Anteile bestehend aus primitiven neuroektodermalen, mesenchymalen und epithelialen Zellen. Tatsächlich findet man in circa 66 % der Tumore kleine embryonale Zellen als Hauptbestandteil des Tumors (Haberler et al. 2021).

Der Durchbruch in der Erkennung der AT/RT erfolgte mit der Entdeckung der biallelischen Mutationen im SMARCB1-Gen (SWI/SNF (switch/sucrose nonfermentable complexes) related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1), das für die hSNF/INI1-Proteine codiert und für einen

Funktionsverlust dieses Gens sorgt (Sévenet et al. 1999; Biegel et al. 1999; Biegel et al. 2002; Alimova et al. 2017; Kohashi und Oda 2017).

Dadurch gelingt immunhistochemisch eine Abgrenzung zu PNET und Medulloblastomen. In der immunhistochemischen Färbung wird gezeigt, dass das Integrase Interactor -1-Protein (INI-1) auf AT/RT nicht exprimiert wird und die Färbung daher negativ bleibt. Des Weiteren zeigt sich die Expression von zytoplasmatischem Vimentin positiv (Morgenstern et al. 2010). Auch in die vorliegende Arbeit wurde nur Tumorgewebe aufgenommen, bei dem die Expression von INI-1 negativ war. Dies wurde zusätzlich referenzpathologisch bestätigt.

Aktuell werden AT/RT in drei verschiedene molekulare Subgruppen eingeteilt: AT/RT-TYR (benannt nach der Überexpression der Tyrosinase), ATRT-SHH (benannt nach der Überexpression des sonic hedgehog pathway Gene) und ATRT-MYC (benannt nach den MYC-Onkogenen). Die Einteilung erfolgt nach Gensequenzierung und Analyse der Methylierung. Inwieweit die Tumorbilogie die Therapie und das Outcome beeinflussen ist aktuell Gegenstand der Forschung (Ho et al. 2020). Da die vorliegenden Gewebeproben vor der Publikation der Subgruppeneinteilung gewonnen und gefärbt wurden, ist in dieser Arbeit keine Zuordnung zu den verschiedenen Subgruppen erfolgt.

Die Infiltration von Immunzellen in AT/RT im Vergleich zu Glioblastomen wurde bisher nur in einer Studie untersucht. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass in AT/RT signifikant mehr CD 8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen als CD 4<sup>+</sup> T-Helferzellen zu finden sind. Weitere Zellen, die gefunden wurden, waren eosinophile Granulozyten und gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) -immunreaktive gliale Zellen (Lu et al. 2012).

Momentaner Gegenstand der Forschung sind hauptsächlich die epigenetischen Veränderungen in diesem Tumor und die damit verbundenen onkogenen Veränderungen, die die Entstehung eines AT/RT begünstigen (Biegel et al. 1999). Neuste Studien haben gezeigt, dass bei AT/RT der PRDM 16 (PR Domäne 16) -Transkriptionsregulator überexprimiert wird. Durch PRDM 16-Inhibition konnte die Proliferationsrate von AT/RT-Zellen vermindert werden (Tegeder et al. 2018).

### 1.1.5 Therapie und Prognose

AT/RT sind hoch maligne Tumore und schwer zu therapieren. Im Januar 2007 wurde auf Grund der Seltenheit der Erkrankung und fehlender Standardisierung der Therapie das EU-Rhab-Register zur Erfassung rhabdoider Tumore gegründet. Durch die Einführung des Registers mit darin verbundenen Therapieempfehlungen führender Experten wurde erstmalig eine Vereinheitlichung des Therapieregimes erreicht (Frühwald et al. 2020; Benesch et al. 2014; Richardson et al. 2018).

Bei der Identifizierung der AT/RTs als eigenständige Entität 1996 lag das mediane Überleben des Patientenkollektivs bei 6 Monaten, das progressionsfreie Überleben sogar nur bei 4,5 Monaten. Hier wurde keine Untergliederung nach erhaltener Therapie vorgenommen, da sich keine relevanten Unterschiede zu diesem Zeitpunkt feststellen ließen (Rorke et al. 1996).

Über die Jahre konnten jedoch verschiedene Faktoren identifiziert werden, welche die Prognose beeinflussen. So scheint ein Alter über 3 Jahre bei Diagnosestellung zu einer besseren Prognose zu führen. Eine Erklärung hierfür wird in dem sparsameren Einsatz von Radiotherapie bei Kindern unter 3 Jahren gesehen. Außerdem ist zu beobachten, dass bei jüngeren PatientInnen schon bei Diagnosestellung häufiger Metastasen vorhanden sind (Tekautz et al. 2005; Frühwald et al. 2020). Frühwald et al. stellten zuletzt die DNA-Methylierungs-Untergruppen als relevanten prognostischen Faktor fest. In einer Auswertung europäischer Daten zeigte sich in dieser Analyse, dass PatientInnen mit einem Alter von unter einem Jahr und einer non-TYR-Methylierungssubgruppe statistisch gesehen die geringste 5-Jahres-Überlebensrate haben (Frühwald et al. 2020).

AT/RT werden mit einem multimedialen Therapieansatz, der Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie miteinschließt, behandelt (Dufour et al. 2012; Frühwald et al. 2016; Richardson et al. 2018). Der Einfluss dieser einzelnen Faktoren wird immer noch stark diskutiert. Eine Meta-Analyse von Athale et al. aus dem Jahr 2009 propagierte die intrathekale Gabe von Chemotherapie (Athale et al. 2009). Wie auch bei Dufour et al. spielte hier die chirurgische Resektion prognostisch eine untergeordnete Rolle (Dufour et al. 2012). Im Widerspruch dazu steht die Studie von Hilden et al., bei der die PatientInnen mit totaler chirurgischer Resektion des Tumors ein medianes Gesamtüberleben

von 20 Monaten hatten, im Vergleich zu PatientInnen mit partieller Resektion, die ein medianes Gesamtüberleben von 15,25 Monaten hatten (Hilden et al. 2004). Dies wurde kürzlich in einer Studie von Richards et al. ebenfalls beschrieben (Richards et al. 2019). Bei Geyer et al. liegt der Fokus vor allem auf der Hochdosis-Chemotherapie nach Induktionstherapie. Von Bestrahlung wird Abstand genommen, da in der Studie von 2005 hier kein Benefit für das Gesamtüberleben gesehen wurde (Geyer et al. 2005). In der ersten prospektiven Forschungsarbeit von Chi et al. wurde sowohl Chirurgie als auch Chemotherapie sowie intrathekale Chemotherapie und Bestrahlung als Therapie verwendet und so ein 2-Jahres-Überleben von 53 %  $\pm$  17 % bei einer Patientenkohorte von 20 PatientInnen erreicht (Chi et al. 2009).

Insgesamt bleibt festzustellen, dass noch mehr prospektive randomisierte klinische Studien nötig sind, um valide Therapieempfehlungen abzugeben. Des Weiteren müssen auch die festgestellten genetischen Veränderungen noch weiter erforscht werden, um einen weiteren Ansatzpunkt für die sogenannte „Targeted Therapy“ zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist erstmalig auch die Expression immunmodulierender Moleküle, welche für eine mögliche Immuntherapie wichtig sein könnten, an einem AT/RT- Kollektiv untersucht worden.

## 1.2 Grundlagen der Immuntherapie

Schon 1972 wurde festgestellt, dass bei PatientInnen mit Hirntumoren die zellvermittelte Immunität unterdrückt wird. Brooks et al. gelangten damals zu der Erkenntnis, dass im Plasma der PatientInnen weniger tritiumhaltiges Thymidin (Trd-<sup>3</sup>h) in Lymphozyten eingebaut wird und damit die Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten vermindert ist (Brooks et al. 1972). Seitdem wird daran geforscht, wie man diesen Aspekt in der Behandlung der Hirntumore nutzen kann. In Tierversuchen hatten Herlinger et al. bereits ein Ansprechen auf eine Gabe von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF) zeigen können (Herlinger et al. 1997). Mittlerweile haben sich einige verschiedene Ansatzweisen für Immuntherapie entwickelt, dazu gehören verschiedene Arten von therapeutischen Impfungen, adoptive T-Zell-Therapie, Immun-Checkpoint-

Blockaden sowie auf monoklonalen Antikörpern basierende Therapien (Farber et al. 2017; Fecci et al. 2014; Geraldo et al. 2019).

Therapeutische Impfungen verfolgen den Ansatz, dass das Immunsystem auf zugeführte Antigene reagiert, einen Abwehrmechanismus in Gang setzt und gleichzeitig eine Immunität gegen diese Antigene entwickelt. Dies möchte man sich ebenfalls in der Therapie des Glioblastom multiforme (GBM) zu Nutze machen. Häufig verwendet man hierzu Peptide, Ribonukleinsäure (RNA) oder das komplette Tumorlysate, um eine Immunantwort zu generieren. Bisher konnten hier allerdings noch keine bahnbrechenden klinischen Erfolge verzeichnet werden (Izumoto et al. 2008; Testori et al. 2008; Ghulam Muhammad et al. 2009; Erhart et al. 2018). Um die Immunantwort nach therapeutischer Vakzinierung zu erhöhen, hat man bereits verschiedene Konzepte getestet. Erfolgsversprechend war eine Untersuchung, bei der durch die Gabe von metronomischem Cyclophosphamid im Vorfeld der Vakzine die Anzahl der regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) um mehr als 40 % vermindert werden konnte. Dies resultierte in einer messbaren Immunantwort (Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) -Produktion) nach Impfung mit Tumorlysate bei fast allen PatientInnen in dieser Kohorte. Das Gesamtüberleben von 6 Monaten lag bei 100 % der 11 PatientInnen, allerdings müssen hier weitere kontrollierte Forschungsarbeiten angeschlossen werden, um eine valide Aussage treffen zu können (Löhr et al. 2018).

Plautz et al. verwendeten bei ihrer Studie an PatientInnen mit Hirntumoren das Prinzip der adoptiven T-Zell-Therapie. Sie injizierten ihnen zunächst eigene, bestrahlte Tumorzellen intradermal, die zuvor über einen kurzen Zeitraum kultiviert worden waren, zusammen mit GM-CSF, welches die lokale Immunantwort verstärken sollte. Nach 8 bis 12 Tagen wurden den PatientInnen dann Lymphknoten entnommen, um aus diesen eine größere Anzahl an T-Zellen zu erhalten und diese in vitro zu expandieren. Diese Leukozyten wurden ihnen danach als Immuntherapie intravenös (i. v.) injiziert. Bei dieser Phase-I-Studie konnten noch keine statistisch signifikanten Daten erhoben werden, da die Kohorte aus lediglich 12 PatientInnen bestand. Allerdings zeigten sich schon hier erste Erfolge wie die Verkleinerung des Tumors (Plautz et al. 2000). In ähnlicher Weise wurden weitere Studien durchgeführt. So wurden beispielsweise Tumorstammzellen identifiziert, die man als geeignetes Tumormaterial in Bezug auf eine Impfung für eine bessere Immunantwort sah (Ji et al. 2010).

Eine weitere Form der Immuntherapie ist die Blockade von Immun-Checkpoints mit monoklonalen Antikörpern. Immun-Checkpoints werden so bezeichnet, weil sie Schlüsselpunkte des Immunsystems darstellen und über weitere Aktivierung oder Regulation des Immunsystems entscheiden. Diesem Therapieprinzip liegt die Vorstellung zu Grunde, dass bei TumorpatientInnen die Immunantwort fälschlicherweise herunter reguliert wird. Wichtige Moleküle, die auf T-Zellen exprimiert werden, sind in diesem Zusammenhang das zytotoxische T-Lymphozyt-assoziierte Protein 4 (CTLA-4), das hauptsächlich auf regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) exprimiert wird und für eine Inaktivierung der T-Zelle sorgt. Ein weiterer Signalweg erfolgt über das apoptoseauslösende programmed death Protein 1 (PD-1). Die Therapie mit sogenannten Checkpoint-Inhibitoren, wie dem CTLA-4 blockierenden Antikörper Ipilimumab und den PD-1 blockierenden Antikörpern Pembrolizumab und Nivolumab, wird bereits sehr erfolgreich bei PatientInnen mit bösartigem Melanom eingesetzt. Die Ausweitung auch auf Tumore des ZNS ist momentan Gegenstand der Forschung (Callahan et al. 2014; Romani et al. 2018).

Monoklonale Antikörper binden, wie bei den anderen Konzepten auch, an exprimierte Oberflächenproteine. In ihrem Fall handelt es sich dabei um Liganden und Rezeptoren, die die Proliferation des GBM stimulieren. Der bisher am meisten untersuchte Antikörper ist Bevacizumab, ein Antikörper, der sich gegen einen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) richtet. In Tierversuchen hatten sich hier auch bei Glioblastomen sehr gute Ergebnisse gezeigt. Leider ließen sich diese aber bisher nicht auf Menschen übertragen. Häufig zeigte sich eine zu ausgeprägte Toxizität. Die Forschung konzentriert sich hier darauf Bevacizumab in ein Therapieschema einzubinden, dass diese Nebenwirkungen vermindert (Diaz et al. 2017; Farber et al. 2017).

Ein weiterer erfolgsversprechender Ansatz ist die sogenannte CAR-T-Immuntherapie. CAR-T steht dabei für chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen. Für diese Form der Immuntherapie werden verschiedene der vorherig beschriebenen Methoden vereint. Initial werden den PatientInnen Leukozyten entnommen. Diese werden ex vivo mittels viraler Gentransfervektoren mit chimären Antigenrezeptoren (CAR) ausgestattet. Dadurch wird erreicht, dass die Veränderung der T-Zellen auch bei Replikation erhalten bleibt. CAR setzen sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammen: ein extrazelluläres Bindeglied, eine „Scharnier“-Region, eine transmembranäre Domäne und eine oder

mehrere Signal-Domänen. Durch die Bindung an ein tumorspezifisches Antigen an der Zelloberfläche der Tumorzelle wird eine Proliferation der T-Zelle verursacht sowie die Zerstörung der Tumorzelle durch T-Killerzellen. Dadurch wird eine Immunreaktion unabhängig von der Expression auf MHC-Molekülen gegen die Tumorzellen begonnen (Hartmann et al. 2017; Filley et al. 2018; Kalos et al. 2011).

Die CAR-T-Immuntherapie ist zum jetzigen Zeitpunkt bereits zugelassen für die B-Zell-akute lymphoblastische Leukämie (ALL) bei Kindern und Jugendlichen unter 25 Jahren. Der zweite Einsatzbereich besteht bei PatientInnen mit großem B-Zell-Lymphom, bei denen schon zwei Therapieversuche gescheitert sind. In vielen Fällen konnte durch die CAR-T-Therapie ein gutes Ansprechen erreicht werden (Neelapu et al. 2017; Maude et al. 2018). Deshalb ist versucht worden, die Erfolge bei hämatopoetischen Erkrankungen auch auf solide Tumore zu übertragen. Da T-Zellen auch die Blut-Hirn-Schranke passieren können, war die CAR-T-Immuntherapie vor allem für Tumore des ZNS, wie das Glioblastom, mit großen Hoffnungen verbunden (Theodorakis et al. 2017).

Die bestehenden Schwierigkeiten sind vor allem durch die unterschiedlichen Merkmale solider Tumore im Vergleich zu den hämatopoetischen Erkrankungen zu erklären. Der größte Unterschied besteht in der Expression der Oberflächenproteine. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Tumorzellen konnte bei soliden Tumoren bislang noch kein Oberflächenprotein entdeckt werden, das auf allen Tumorzellen, jedoch nicht im gesunden Gewebe, exprimiert wird. Durch die Heterogenität war es bislang nicht möglich CAR-T-Zellen, die alle Tumorzellen gleichermaßen erkennen, zu entwickeln. Somit blieben bislang immer Zellen bestehen, die im Verlauf für die Progression der Erkrankung sorgten.

Eine weitere Hürde stellt die Mikroumgebung des Tumors dar. Durch immunsuppressive Faktoren, wie beispielsweise die vermehrte Expression von PD-L1, kann die aktive Immunantwort des Körpers unterdrückt werden und auch die CAR-T-Zellen können nicht suffizient zum Tumorgewebe transportiert werden um in den Tumor vordringen. Durch bestehende Zytokine wie die Prostaglandine IL 6 und IL 10 wird die Immunantwort ebenfalls gemindert. Gleichzeitig herrscht in der Mikroumgebung eines Tumors ständige Hypoxie, die ebenfalls für eine Immunsuppression sorgt.

Als weiterer Punkt im Bereich der malignen Erkrankungen im ZNS sind Tumorzellen und Neurone fast ausschließlich vom Glukose-Stoffwechsel abhängig, weswegen durch den hohen Verbrauch auch die Mikroumgebung des Tumors ein sehr glukosearmes Gebiet ist. T-Zellen wiederum sind jedoch für die Proliferation und Effektorfunktion ebenfalls von einer erhöhten Glukoseaufnahme abhängig. Auch hier werden sie also durch die Mikroumgebung des Tumors gehemmt (Yong et al. 2017; Li et al. 2018; Bagley et al. 2018).

Wichtig in Bezug auf CAR-T-Immuntherapie sind die Nebenwirkungen, vor allem der Zytokinsturm nach der Infusion der CAR-T-Zellen. Es treten sowohl neurologische Nebenwirkungen, wie die Enzephalopathie, als auch schwere und langanhaltende Zytopenien auf. Davon sind besonders die schweren Neutropenien relevant, die zu weiteren Komplikationen führen (Maude et al. 2018). Die beschriebenen Schwierigkeiten sind momentan Gegenstand der Forschung, um die CAR-T-Immuntherapie sowohl nebenwirkungsärmer als auch für solide Tumore effektiver zu machen. Auch diese Arbeit soll der weiteren Erforschung insbesondere der AT/RT dienen, um mögliche Ansatzpunkte der Immuntherapie zu evaluieren.

## 2 Ziel der Arbeit

AT/RT haben trotz intensiver onkologischer Forschung weiterhin eine schlechte Prognose. Das mediane Überleben liegt auch heute noch zwischen 6 bis 12 Monaten. Es werden unterschiedliche Therapieansätze diskutiert. Bisher konnte anhand der klinischen Ergebnisse noch kein Standard etabliert werden. Viele der bestehenden Therapien verursachen starke Nebenwirkungen, weshalb sie in diesem besonders vulnerablen Patientenkollektiv nicht eingesetzt werden können. Ein Beispiel hierfür ist die Bestrahlung, die nicht oder nur in begrenztem Umfang bei Kindern unter 3 Jahren angewendet werden kann, da die Bestrahlung in diesem Alter die kognitive Entwicklung sehr stark beeinträchtigt und die Therapie selbst kanzerogen ist. Allerdings sind 75 % der Kinder bei Diagnosestellung unter 3 Jahre alt (Dufour et al. 2012; Richards et al. 2019; Richardson et al. 2018; Ginn und Gajjar 2012; Chi et al. 2009). Deshalb ist es dringend notwendig alternative Therapieoptionen zu entwickeln. Eine neue Option könnte die Immuntherapie darstellen. Dadurch könnte man eine gezieltere Therapie der AT/RT ermöglichen und so Schäden, die durch die bisherigen Therapieansätze entstehen, reduzieren.

Für die Entwicklung einer Immuntherapie ist die Kenntnis des immunologischen Mikromilieus innerhalb des Tumors unabdingbar.

Dieser Arbeit liegt deshalb die Frage zu Grunde, ob HLA-Klasse I und II Moleküle auch bei AT/RTs exprimiert werden und wenn ja, in welchem Ausmaß. Diese Daten können unser Verständnis der Immunologie dieser Tumore vertiefen, was dann wiederum die Grundlage für eine verbesserte Immuntherapie darstellen könnte.

Des Weiteren wurde die Expression von PD-L1 untersucht. PD-L1 und PD-1 Antikörper, wie beispielsweise Pembrolizumab, werden bei Melanomen bereits erfolgreich eingesetzt. Die PD-1-PD-L1-Achse ist ein klassisches Beispiel eines sogenannten Immuncheckpoints. Immuncheckpoints sind wichtige periphere, inhibitorische Mechanismen des Immunsystems, welche überschießende Immunantworten und Autoimmunität vermeiden sollen. Eine gezielte Blockade dieser Checkpoints kann T-Zellantworten gegen Tumore freisetzen, gleichzeitig aber auch Autoimmunität verursachen (Cristescu et al. 2018; Romani et al. 2018). Diese Arbeit soll herausfinden,

ob in AT/RTs solche Checkpoint-Moleküle konstitutiv exprimiert werden, was eine Therapie mit entsprechenden Inhibitoren zur Folge haben könnte.

Außerdem wurden mit demselben immunhistochemischen Panel zwei Fälle von Glioblastoma multiforme Rezidiven untersucht. Es handelt sich hierbei um Gewebe, welches jeweils vor und nach einer Immuntherapie (therapeutische Vakzinierung) entnommen wurde. Als Frage stellte sich hier, ob die tumor-spezifische Impfung zu einer messbaren Veränderung dieser immunologischen Marker führt.

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Ethikvotum**

Für diese Arbeit liegen zwei Ethikvoten vor. Für die Bereitstellung anonymisierter AT/RT-Gewebeschnitte das Votum der Ethikkommission #85/15. Für den Vergleich der Gewebeschnitte zweier GlioblastompatientInnen liegt ebenfalls ein positives Votum der lokalen Ethikkommission vor (#175/16\_ff).

#### **3.2 Patientenkohorte**

Zur immunhistochemischen Färbung mit Markern für HLA-ABC, HLA-DP DQ DR, CD 3 und PD-L1 wurde formalinfixiertes, in Paraffinblöcke gegossenes Tumormaterial von 17 PatientInnen verwendet. Hiervon wurden sieben PatientInnen zwischen 1998 und 2015 in der Neurochirurgie des Universitätsklinikums Würzburg beziehungsweise (bzw.) in der Neurochirurgie des Leopoldina Krankenhauses in Schweinfurt operiert. Das Tumorgewebe wurde im Rahmen einer Resektion entnommen und im neuropathologischen Institut der Universität Würzburg histologisch begutachtet und klassifiziert. Die Tumorgewebeproben wurden jeweils in anonymisierter Form zur Verfügung gestellt (Votum der lokalen Ethikkommission #86/15). Neben den Würzburger Proben wurden sechs weitere Gewebeproben in Form von fertiggestellten Schnitten vom neuropathologischen Institut der Universität München sowie vier weitere aus dem neuropathologischen Institut der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Auch von diesen ebenfalls anonymisierten Proben waren keine Informationen zur Erkrankung oder zum klinischen Verlauf verfügbar. Bei allen Präparaten wurde durch einen erfahrenen Neuropathologen sichergestellt, dass es sich um AT/RT-Tumore handelt. Des Weiteren wurden alle Präparate in dem nationalen Referenzzentrum für Neuropathologie in Bonn begutachtet.

Die untersuchten Gewebeschnitte der GlioblastompatientInnen entstammen der Pilotphase der HIT-HGG Rez Immunovac Studie (Eudra-CT 2013-000419-26). Auch für diese Studie liegt ein positives Votum der lokalen Ethikkommission vor (#175/16\_ff).

Die beiden GBM-PatientInnen hatten nach Operation eines Tumorrezidivs eine Immuntherapie in Form einer therapeutischen Vakzinierung mit autologen, Tumorlysat-beladenen dendritischen Zellen erhalten. Im weiteren Verlauf war es jedoch zu einem weiteren Rezidiv gekommen, bei welchem nach Einschätzung der behandelnden Onkologen und Neurochirurgen eine weitere Operation therapeutisch sinnvoll war. Das Überschussmaterial aus diesen Drittoperationen wurde für die hier gezeigten Färbungen verwendet. Der Abstand der Drittoperationen zu den vorherigen Operationen und damit der zeitliche Abstand des gewonnenen Materials nach Beginn einer therapeutischen Vakzinierung lag bei PatientIn A bei 5 Monaten, bei PatientIn B bei 8 Monaten.

### 3.3 Immunhistochemische Untersuchung an Paraffinpräparaten

#### 3.3.1 Die Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode

Bei der durchgeführten Färbung wurde die Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode, eine indirekte Immunperoxidase-Färbetechnik, angewandt. Diese Methode wurde 1981 von Dunn et al. entdeckt und gilt seit dem als Standard in der histologischen Färbung und Diagnostik (Strother 2005; Dunn et al. 1981). Sie zeichnet sich durch hohe Sensitivität und einfache Handhabung aus.

Das Prinzip hinter der Färbemethode besteht aus verschiedenen Antikörpern. Der nicht konjugierte Primärantikörper bindet an ein Gewebsantigen. Der sekundäre Antikörper ist biotinyliert und richtet sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers. An diesen wiederum bindet der Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex, wodurch eine färbende Reaktion ermöglicht wird (Boenisch 1989).

Bei aktuellen Untersuchungen wird die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) durch eine sogenannte „labeled avidin biotin“-Methode (LAB) modifiziert. Der Unterschied der Methoden besteht darin, dass anstelle des Avidin-Biotin Komplexes Streptavidin direkt mit einer Peroxidase kombiniert ist. Dadurch ist die Methodik um 4 bis 8 mal sensibler als die ABC-Methode (Giorno 1984).

Als Substrat der Peroxidase wurde das 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) verwendet. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid bildet das DAB einen Enzym-Substrat-Komplex mit der Peroxidase. Dabei wird DAB oxidiert und in ein unlösliches, bräunliches Polymer umgewandelt. Dieses ist wiederum lichtmikroskopisch sichtbar, wodurch stattgehabte Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar werden (Heyderman 1979; Boenisch 1989).

### 3.3.2 Allgemeines zur Färbung

Die operativ gewonnenen Tumorgewebeproben wurden mittels 4 %-iger Formalinlösung fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet. Für die histologische Untersuchung wurden an einem Leica SM 2000 R Microtom ca. 3 µm dicke Schnitte abgetragen und auf Super-Frost-Objektträger aufgezogen. Die Super-Frost Oberflächenbeschichtung ist durchgehend positiv geladen und sorgt so für eine bessere Adhäsion der in Paraffin eingebetteten Gewebsschnitte. So soll ein Abschwemmen des Gewebes während der Färbung verhindert werden. Die aufgezogenen Gewebeschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Bei den verschiedenen Färbungen wurden je eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein vom Hersteller des Antikörpers empfohlenes Gewebe verwendet. Dieses Gewebe exprimiert sicher das zu detektierende Antigen und dient somit als Nachweis des Erfolges der Färbung. Die Negativkontrolle dient zur Einschätzung der Hintergrundfärbung. Dafür wurde eine Gewebeprobe ohne Zusatz des Antikörpers bei der Färbung mitgeführt.

Um ein Austrocknen der feinen Gewebeschnitte zu verhindern, was zu falsch-negativen Ergebnissen führen würde, wurden diese in feuchten Kammern inkubiert.

Gearbeitet wurde, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

### 3.3.3 Vorbehandlung der Präparate

#### 3.3.3.1 Entparaffinierung

Diese erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe:

Xylol für 2 x 10 Minuten

100 % Ethanol für 5 Minuten

96 % Ethanol für 5 Minuten

70 % Ethanol für 5 Minuten

Zum Schluss wurden die Präparate mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült.

#### 3.3.3.2 Freilegung der Antigen-Bindungsstellen

Durch die Fixierung mit Formalin wurden die Aminosäureketten der Proteine quervernetzt. Um die Antigen-Bindungsstellen des fixierten Gewebes wieder frei zu geben, müssen die Präparate vorbehandelt werden.

In dieser Studie wurden die Gewebeschnitte hierzu in Citronensäure mit einem pH-Wert von 6,0 in einem handelsüblichen Dampfkochtopf auf über 100 °C erhitzt und 10 Minuten gekocht. Die Citronensäure wird aus 42 g Citronensäure-1-hydrat und 21 g Natriumhydroxid hergestellt, die in 10 Liter (l) Aqua dest. gelöst werden. Der pH-Wert wird mit Hilfe von Salzsäure (HCL) oder Natronlauge (NaOH) auf 6 titriert.

Anstelle von Citronensäure ist auch das Kochen in Target Retrieval Solution (TRS) mit einem pH-Wert von 8 oder 9 möglich. Allerdings ist in den vorausgegangenen Testungen mit den jeweiligen Antikörpern die Methode mit Citronensäure durch weniger Hintergrundfärbung als besser hervorgegangen.

Nach dem Kochen lässt man die Präparate auskühlen und spült sie anschließend für 2 Minuten in Aqua dest.

### *3.3.3.3 Block der endogenen Peroxidase*

In vielen Geweben sind endogene Peroxidasen enthalten, wie beispielsweise das Hämoglobin in Erythrozyten oder Zytochrome in Granulozyten oder Monozyten. Da die Färbung mit der Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode ebenfalls auf der Aktivierung durch eine Peroxidase beruht, müssen die endogenen Peroxidasen blockiert werden, um eine spezifische Färbung zu erhalten. Dies schafft man durch einen Substratüberschuss.

Die Präparate wurden für 15 Minuten in eine Lösung aus 250 Milliliter (ml) Aqua dest. und 6 ml Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gestellt. Da  $H_2O_2$  sehr flüchtig ist, kann man diese Lösung erst kurz vor Anwendung herstellen.

Anschließend werden die Gewebeschnitte wieder für 2 Minuten mit Aqua dest. gespült. Es erfolgt eine weitere Spülung mit Tris-Buffered Saline (TBS) Lösung mit einem pH-Wert von 7,6.

Die Stammlösung wurde aus 121,1 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, 169,4 g Natriumchlorid (NaCl) und 80 ml HCl (25 %), aufgefüllt mit zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.) auf 2000 ml hergestellt und auf pH 7,6 eingestellt. Für die Verwendung wird die Stammlösung noch auf 1:10 verdünnt.

### *3.3.3.4 Protein-Block*

Bevor man den Primärantikörper auf das Gewebe gibt, muss man verhindern, dass dieser sich an jegliche auch unspezifische geladene Bindungsstellen, wie Kollagenfasern oder andere Proteine, anlagert, um falsch-positive Färbereaktionen zu vermeiden. Durch das Auftragen von 2 bis 3 Tropfen des gebrauchsfertigen 10 %-igen non-immune normal goat Serum (Invitrogen<sup>TM</sup>) wurden diese unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Dafür müssen die Präparate 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Das Serum wurde anschließend nicht abgespült, es wird nur von den Objektträgern abgekippt.

### 3.3.4 Inkubation mit dem Primärantikörper

Um eine gute Anfärbung der gewünschten Antigenbindung zu erreichen, jedoch ohne zu viel Hintergrundanfärbung zu erhalten, muss der Antikörper verdünnt werden. Die optimale Verdünnung wurde in Färbungen mit der Positiv- und Negativkontrolle in Verdünnungsreihen herausgefunden. Für die Herstellung des Verdünnungspuffers verwendet man eine Lösung aus TBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA). Dieses soll weitere vorhandene unspezifische Immunglobuline binden und so unspezifische Färbung im Ergebnis minimieren.

Die Präparate wurden mit 150 Mikroliter ( $\mu$ l) der Mischung des Antikörpers und dem Verdünnungspuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate erst einzeln mit TBS abgespült und anschließend für 2 x 5 Minuten in einer Küvette mit TBS gespült, wobei die Lösung zwischen den Spülungen gewechselt wurde.

### 3.3.5 Nachweis

Der Nachweis erfolgte, wie oben beschrieben, mittels der Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode. Dazu wurde das MultiLink-Kit der Firma BioGenex verwendet.

Zuerst wurde der sekundäre, der sogenannte Link-Antikörper, aufgetragen. Um die Bindung zu ermöglichen, wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Präparate wieder einzeln mit TBS abgespült und daraufhin für 2 x 5 Minuten in einer Küvette mit TBS gespült, wobei die Lösung zwischen den Spülungen gewechselt wurde.

Als nächstes erfolgte das Auftragen des sogenannten Label-Antikörpers, welcher aus einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat besteht. Die Präparate wurden erneut für 30 Minuten inkubiert.

Es erfolgte im Anschluss eine weitere Waschung, die aus dem einzelnen Abspülen der Präparate mit TBS sowie der anschließenden Spülung in einer Küvette mit TBS für 2 x 5 Minuten besteht, wobei die Lösung zwischen den Spülungen gewechselt wurde.

Die Präparate wurden im Anschluss vorsichtig getrocknet.

### 3.3.6 Entwicklung mit DAB

Für die anschließende Anfärbung, wie bereits in 3.2.1 beschrieben, wurde DAB verwendet. Es wurden 20 µl des Chromogens mit 1 ml des Substratpuffers (gebrauchsfertig von der Firma Dako) verdünnt. Jedes Präparat wurde mit der Lösung beschichtet und anschließend für 5 Minuten inkubiert.

Es erfolgte die Spülung mit TBS und Aqua dest.

### 3.3.7 Färbung mit Hämalaun

Für die bessere Übersicht und Darstellung der Zelle erfolgte noch eine Kernfärbung mit Hämalaun.

Dazu wurden die Schnitte für 2 Minuten in Hämalaun gestellt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Danach erfolgte die Bläuung, wozu man die Präparate für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser stellt.

Das Hämalaun wurde nach Meyer wie folgt hergestellt: 1,2 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, 50 g Chloralhydrat und 1 g Citronensäure nacheinander in einigen Millilitern Aqua dest. auflösen und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen. Die Lösung über Nacht auf einen Magnetrührgerät stellen. Das Behältnis anschließend abdecken und vor der Benutzung etwa 4 Wochen reifen lassen.

Nach der Bläuung wurden die Gewebeschnitte nochmals mit Aqua dest. gespült.

### 3.3.8 Fixierung

Um die Präparate haltbar zu machen, erfolgte anschließend die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

70 % Ethanol für 2 Minuten

96 % Ethanol für 2 Minuten

100 % Ethanol für 2 Minuten

Xylol für 2 Minuten

Anschließend erfolgte die Eindeckung mithilfe eines xylohaltigen Histokits (Karl Hecht GmbH & Co KG).

## 3.4 Verwendete Antikörper

In dieser Arbeit wurden vier verschiedenen Antikörper verwendet, die sich gegen spezifische Oberflächen-Antigene richten, die im Folgenden beschrieben werden.

### 3.4.1 CD 3

Das Immunsystem wird durch glykoproteininhaltige Oberflächenstrukturen klassifiziert. Dieses bezeichnet man im internationalen Kontext auch als Cluster of Differentiation Antigene (CD-Antigene). CD 3-Antigene werden auf T-Lymphozyten exprimiert. Das CD 3-Antigen ist mit dem T-Zellrezeptorkomplex assoziiert und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen (Ansorge und Träger 2014). Der verwendete CD 3-Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper in der Verdünnung 1:150. Als Positivkontrolle wurde lymphozytenreiches Gewebe der Tonsille verwendet.

### 3.4.2 Humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, major histocompatibility complex) des Menschen wurde beim Menschen als erstes auf Leukozyten entdeckt, deshalb nennt man ihn auch Humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA). Nach Prozessierung von Antigenen im Inneren von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) werden die entstehenden Peptide von dem MHC-Molekül übernommen und den T-Lymphozyten auf der Zelloberfläche präsentiert. Somit bilden diese Strukturen eine Grundlage für das Immunsystem zur Unterscheidung zwischen fremden und eigenen Zellen (Ansorge und Träger 2014).

#### 3.4.2.1 HLA-Klasse I: HLA-A, HLA-B, HLA-C

Aus den Hauptgenen HLA-B, HLA-C und HLA-A wird der HLA-Klasse-I-Komplex gebildet. Er wird auf der Plasmamembran aller kernhaltigen Zellen exprimiert. Es ist bekannt, dass Tumorzellen die Expression verringern können, um sich zu schützen und der Immunantwort des Körpers zu entgehen. MHC-I-Moleküle präsentieren Peptidfragmente den CD 8<sup>+</sup>-cytotoxischen T-Zellen (Ansorge und Träger 2014).

Der verwendete Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper HLA-Klasse I ABC [EMR 8-5] der Firma Abcam. Für die Verwendung wurde er in einem Verhältnis von 1:16.000 verdünnt. Als Positivkontrolle wurde Lebergewebe mitgeführt und zur besseren Einschätzung der Hintergrundfärbung gesundes Hirngewebe verwendet.

#### 3.4.2.2 HLA-Klasse II: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP

Die HLA-Klasse-II-Komplex wird aus den Hauptgenen HLA-DP, HLA-DM, HLA-DQ und HLA-DR gebildet. MHC II-Moleküle kommen vor allem auf Immunzellen, wie zum Beispiel aktivierten T-Lymphozyten und insbesondere antigenpräsentierende Zellen, vor. Dazu gehören Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Man hat herausgefunden, dass die Expression der HLA-Klasse II durch Aktivierung der Zellen

stark erhöht werden kann. MCH II-Moleküle präsentieren Peptidfragment-Antigene vor allem CD 4<sup>+</sup>-T-Helferzellen (Ansorge und Träger 2014).

In dieser Untersuchung wurde der monoklonale Mausantikörper HLA-DR+DP+DQ [CR3/43] der Firma Abcam verwendet. Er wurde im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Als Positivkontrolle wurde Gewebe einer Tonsille mitgeführt.

### 3.4.3 PD-L1

Für die Immunantwort sind der „Programmed death 1 receptor“ (PD-1) und sein Ligand (PD-L1) von entscheidender Bedeutung. PD-1 wird auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Durch den Liganden PD-L1 soll eine Überaktivierung vor allem gegen körpereigene Zellen verhindert werden. Die auf den aktivierten T-Lymphozyten exprimierten PD-1 Rezeptoren binden an den PD-L1 einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) und werden dadurch inhibiert (Riella et al. 2012). Tumorzellen machen sich diese inhibierende Eigenschaft zu Nutze, in dem sie eine Überexpression von PD-L1 zeigen. Somit binden T-Lymphozyten dann an diese PD-L1 und es findet keine Immunantwort gegen die Tumorzellen statt (Herbst et al. 2014; Schumacher et al. 2015).

Der verwendete PD-L1 Antikörper wurde für die Färbung in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. Es wurde Gewebe der Placenta als Positivkontrolle mitgeführt.

## 3.5 Auswertung

Die Auswertung der Präparate hinsichtlich der exprimierten Oberflächenproteine (HLA-ABC, HLA-DQ, DP, DR und PD-L1) und vorhandenen T-Zellen (CD 3) erfolgte mikroskopisch (Axioplan, Firma Zeiss) in 400-facher Vergrößerung. Mit Hilfe einer mit dem Mikroskop verbundenen Kamera (Coolpix, Firma Nikon) wurden von jedem der 17 Tumore zehn Aufnahmen des angefärbten Gewebes angefertigt. Die zu fotografierenden Abschnitte wurden randomisiert ausgewählt, es musste sich bei dem Bildausschnitt lediglich um Tumorgewebe handeln.

Die Tumorzellen wurden manuell ausgezählt. Aus forschungsökonomischen Gründen wurde dabei jeweils nur ein Viertel des dargestellten Gewebeschnittes berücksichtigt und dessen Anzahl an Tumorzellen dann vervierfacht, um die Gesamtzahl der Tumorzellen für den kompletten Bildausschnitt zu erhalten. Dazu wurde zuerst mit Hilfe des freiverfügbaren open source Bildbearbeitungsprogrammes GIMP (Version 2.8.16) jedes Bild horizontal und vertikal in vier gleichgroße Abschnitte aufgeteilt, die durch rote Hilfslinien markiert wurden. Von der Markierungslinie geschnittene Zellen wurden nur gezählt, wenn mehr als 50 % der Zelle in dem zu zählenden Abschnitt lag. Es wurde immer der linke obere Bildabschnitt ausgezählt. In Fällen, in denen in diesem Abschnitt überwiegend Nekrose vorhanden war, wurde auf einen anderen, repräsentativeren Abschnitt ausgewichen. Intravaskulär gelegene Zellen wurden nicht gewertet. Die durch die verschiedenen Antikörper angefärbten Zellen wurden jeweils im gesamten Gewebeschnitt gezählt.

Des Weiteren wurden Gewebeschnitte zweier Glioblastome vor und nach immunmodulierender Therapie mittels Impfung von Tumorzellen analog zum bereits beschriebenen Verfahren analysiert. Hier wurden komparativ die gleichen Tumorabschnitte mikroskopiert. Diese wurden auf dem Präparat markiert, um sie in der Mikroskopie zu orten. Im Anschluss konnte eine semiquantitative Auswertung über die Häufigkeit des Auftretens verschiedener Immunzellen erfolgen.

### 3.5.1 Auswertungskriterien der verschiedenen Antikörper

Das Kriterium für die Anfärbung der Zellen durch die verschiedenen Antikörper war bei jeder Färbung Niederschlag der bräunlichen Farbe durch die Entwicklung mit DAB. Da es sich bei den verwendeten Antikörpern um Antikörper gegen exprimierte Oberflächenantigene handelt, gilt eine Zelle als angefärbt, wenn die Zellmembran mindestens 75 % angefärbt ist (Ansorge und Träger 2014).

Insbesondere bei der Färbung mit dem PD-L1 Antikörper war die Färbung der Zellmembran ausschlaggebend. Die Färbung des Zytoplasmas wurde vernachlässigt. Die PD-L1 angefärbten Tumore wurden einem Score zugeordnet. Dieser orientiert sich an der

Arbeit von Scheel et al., die die Tumore in fünf Gruppen einteilt: Anteil der PD-L1 exprimierende Tumorzellen  $< 1\%$ ,  $\geq 1\%$ ,  $\geq 5\%$ ,  $\geq 10\%$  und  $\geq 50\%$  der Tumorzellen insgesamt (Scheel et al. 2016).

Daraus ergibt sich folgender Score:

0 – 0,9 % entspricht Score 0

1 – 4,9 % entspricht Score 1

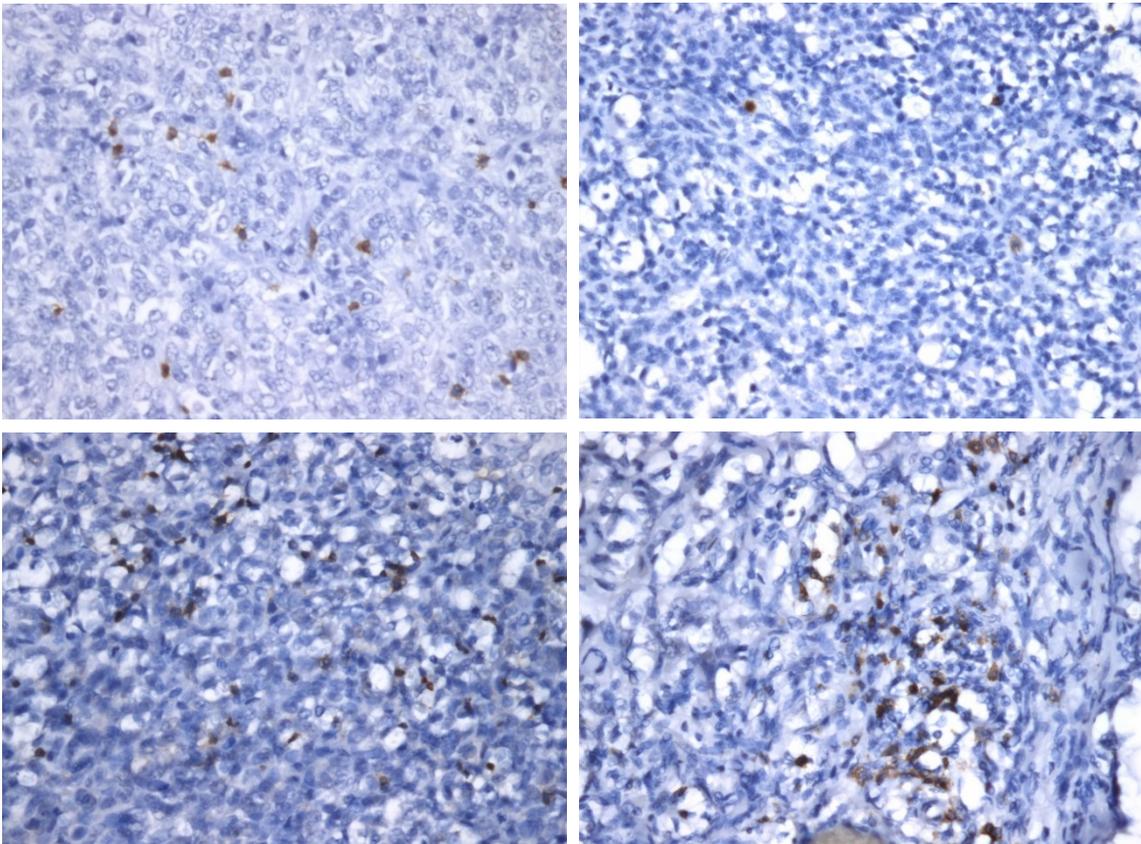
5 – 9,9 % entspricht Score 2

10 – 49,9 % entspricht Score 3

50 – 100 % entspricht Score 4

## 4 Ergebnisse

### 4.1 CD 3



*Abb. 1: Auf den Bildern sind beispielhaft Ausschnitte verschiedener AT/RT (von links oben nach rechts unten: Tumor Nr. 4, Tumor Nr. 5, Tumor Nr. 6, Tumor Nr. 10) in 400-facher Vergrößerung dargestellt, auf denen die CD 3 exprimierenden Zellen angefärbt sind (siehe Abschnitt Material und Methoden).*

Der prozentuale Anteil der CD 3 exprimierenden Zellen im Vergleich zu Tumorzellen war von Tumor zu Tumor und selbst innerhalb der einzelnen Tumorabschnitte stark variabel von maximal 143 Zellen und minimal 0 Zellen.

Diese Variabilität ist in der Abbildung 2 in Form eines Boxplot-Diagrammes dargestellt (Daten aus der Tabelle im Anhang).

Die stärkste intratumorale Variabilität fand man bei dem Präparat des Tumors Nr. 5. Hier waren zwischen 9 und 143 Zellen CD 3 exprimierende Zellen.

Im Mittel waren 1,75 % der Zellen der verschiedenen Tumorpräparate CD 3 exprimierende Zellen.

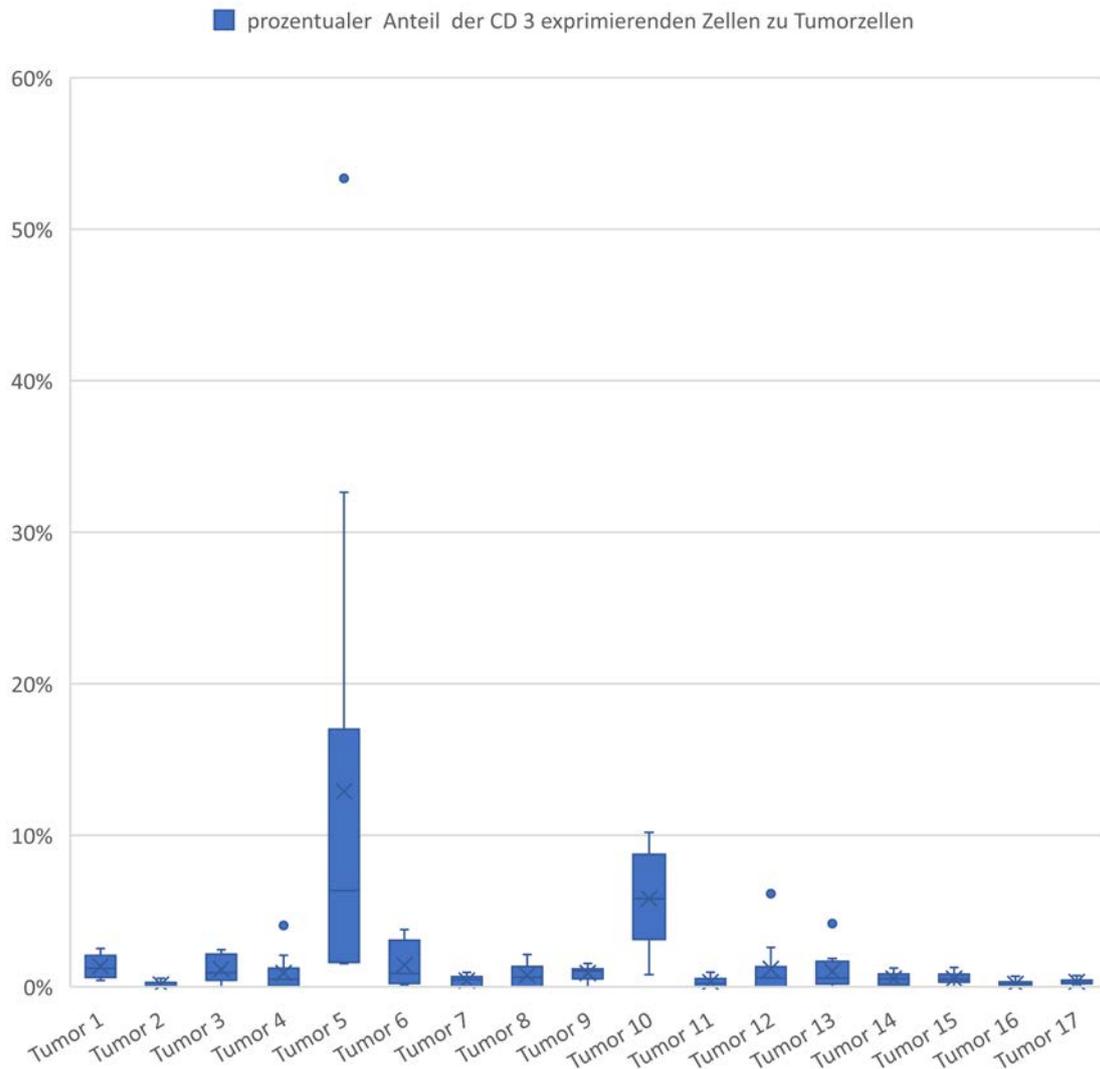
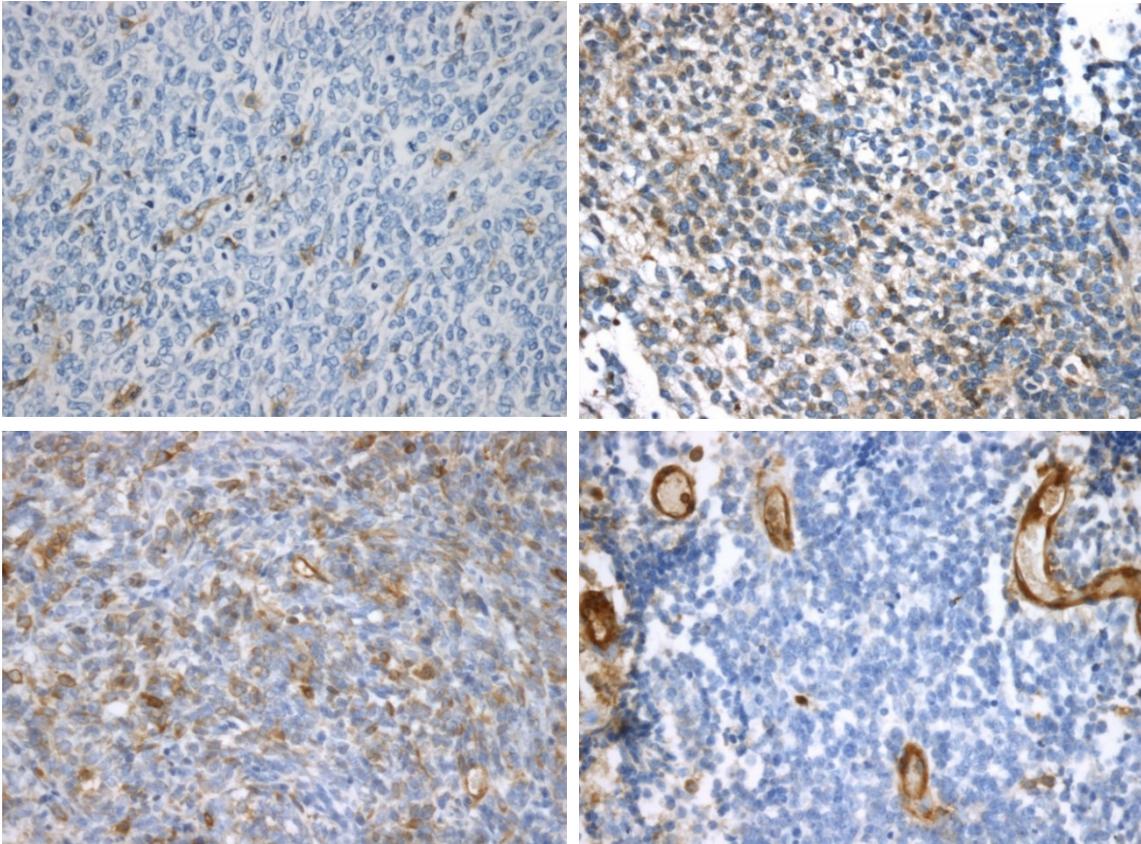


Abb. 2: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der CD 3 exprimierenden Zellen im Verhältnis zu Tumorzellen innerhalb der einzelnen Tumorpräparate. Im Boxplot-Diagramm wird jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum angezeigt. Die Box gibt somit den Bereich an, in dem 50 % der Werte liegen. Ausreißende Werte werden als einzelne Punkte angezeigt.

## 4.2 HLA-Klasse I



*Abb. 3: Auf den Bildern sind beispielhaft verschiedene AT/RT abgebildet (von links oben nach rechts unten: Tumor Nr. 1, Tumor Nr. 2, Tumor Nr. 8, Tumor Nr. 10) in 400-facher Vergrößerung, bei denen HLA-Klasse I exprimierende Zellen angefärbt wurden. Im Bild des Tumors Nr. 10 sieht man vor allem auch die Färbung der Gefäßmembranen mit jeweils innenliegenden Erythrozyten. Es wurden in der Zählung nur die angefärbten Tumorzellen berücksichtigt (vgl. Abschnitt Material und Methoden).*

Hier zeigte sich wieder eine große Variabilität auch innerhalb eines Tumors. Minimal wurden in einem Ausschnitt 4 Zellen angefärbt, maximal 198 Zellen.

Die Variabilität ist in Form eines Boxplot-Diagramms in Abbildung 4 dargestellt.

Die stärkste Variabilität ergab sich bei dem Präparat des Tumors Nr. 2. Hier variierte der prozentuale Anteil der exprimierenden Tumorzellen zwischen 5 % und 70 %.

Im Mittel waren 12,9 % der Tumorzellen HLA-Klasse I exprimierende Tumorzellen.

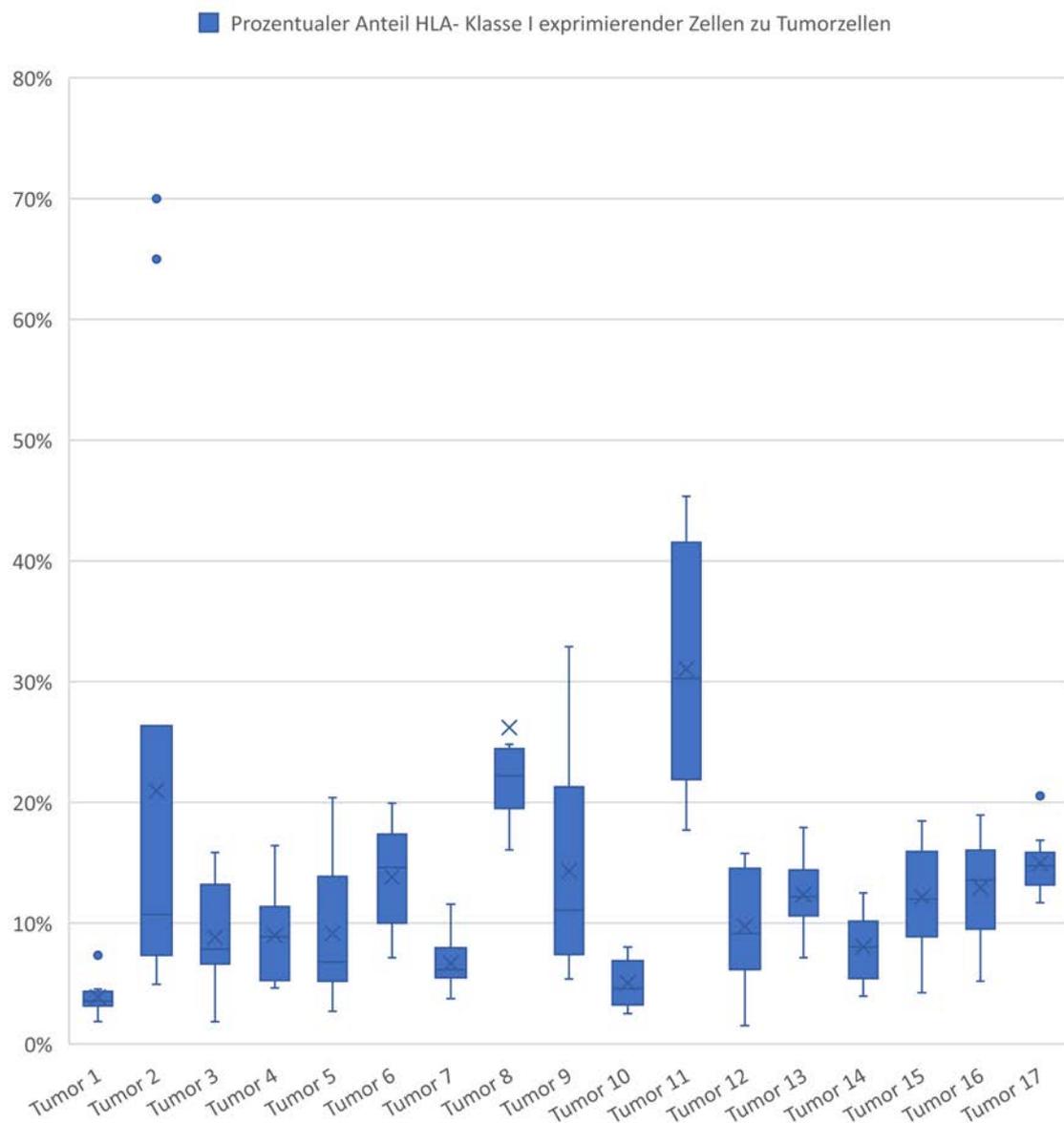


Abb. 4: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der HLA-Klasse I exprimierenden Zellen im Verhältnis zu Tumorzellen innerhalb der einzelnen Tumorpräparate. Im Boxplot-Diagramm wird jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum angezeigt. Die Box gibt somit den Bereich an, in dem 50 % der Werte liegen. Ausreißende Werte werden als einzelne Punkte angezeigt.

### 4.3 HLA-Klasse II

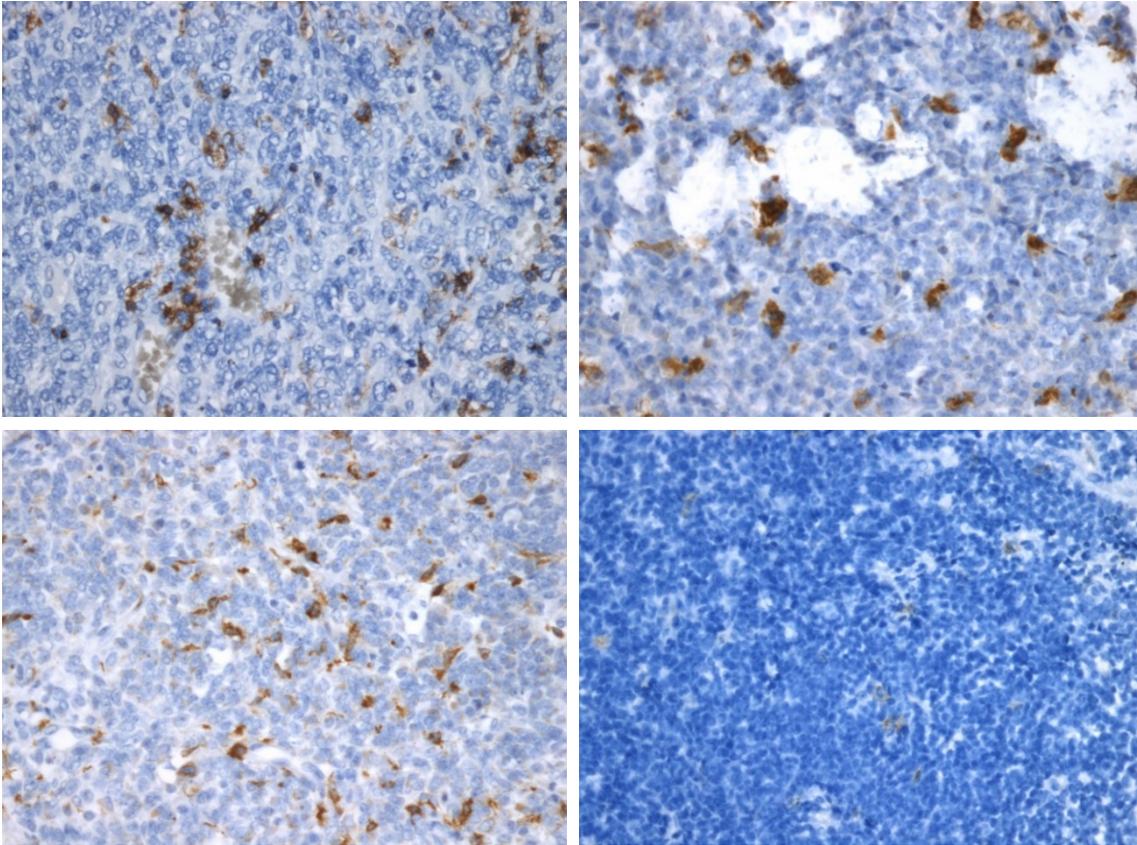


Abb. 5: Exemplarische Abbildung verschiedener AT/RT (von links oben nach rechts unten: Tumor Nr. 1, Tumor Nr. 5, Tumor Nr. 8, Tumor Nr. 16) in 400-facher Vergrößerung, bei denen die Expression von HLA-Klasse II angefärbt wurde.

Die Variabilität innerhalb eines einzelnen und unter den verschiedenen Tumoren ist stark ausgeprägt. Diese wurde in Abbildung 6 in einem Boxplot-Diagramm dargestellt. Exprimierende Tumorzellen kamen häufig in der Nähe von Blutgefäßen vor, allerdings nicht ausschließlich. Darstellung eines Blutgefäßes beispielhaft bei Tumor 1 (1. Bild, obere Reihe, links).

Minimal wurden in einem Ausschnitt keine Tumorzelle angefärbt, maximal 74 Tumorzellen.

Die größte intratumorale Variabilität bestand bei dem Präparat des Tumors Nr. 10. Hier variierte der prozentuale Anteil an exprimierenden Tumorzellen zwischen 4,9 % und 30,1 %.

Im Mittel waren 2,98 % der Tumorzellen HLA-Klasse II exprimierende Tumorzellen.

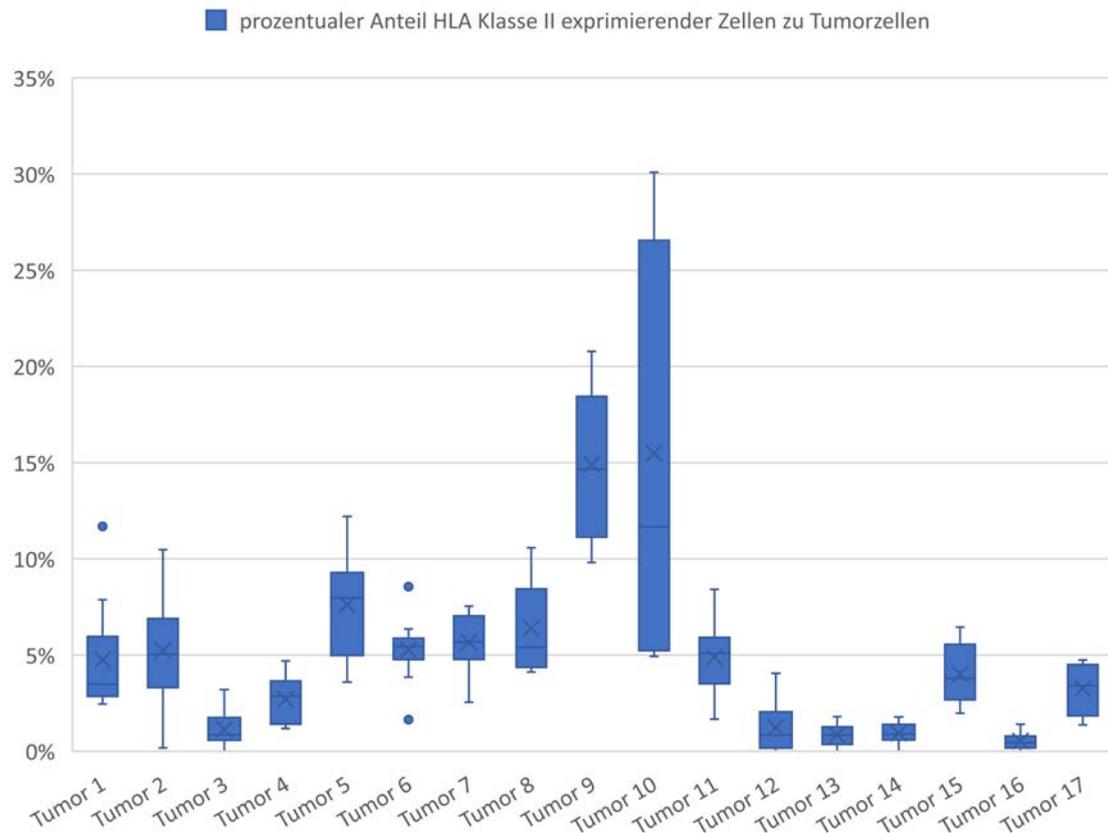


Abb. 6: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der HLA-Klasse II exprimierenden Zellen im Verhältnis zu Tumorzellen innerhalb der einzelnen Tumorpräparate. Im Boxplot-Diagramm wird jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum angezeigt. Die Box gibt somit den Bereich an, in dem 50 % der Werte liegen. Ausreißende Werte werden als einzelne Punkte angezeigt.

#### 4.4 Vergleich zwischen Expressierung von HLA-Klasse I und II

Im folgenden Boxplot-Kastendiagramm ist die Expressierung von HLA-Klasse I und II in den unterschiedlichen Tumoren gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, dass eine starke Expressierung von HLA-Klasse I nicht auf eine starke Expressierung von HLA-Klasse II schließen lässt und umgekehrt.

Eine höhere intratumorale Variabilität war bei HLA-Klasse I gegeben.

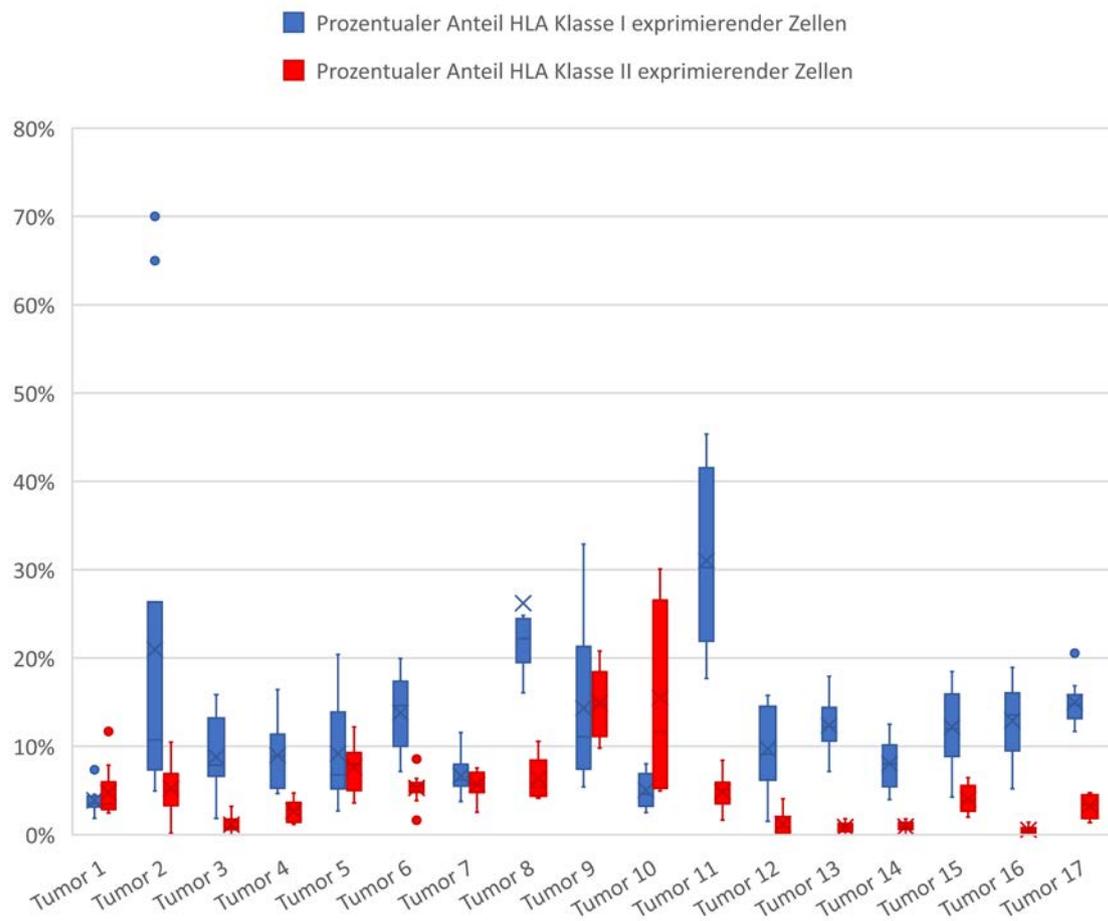
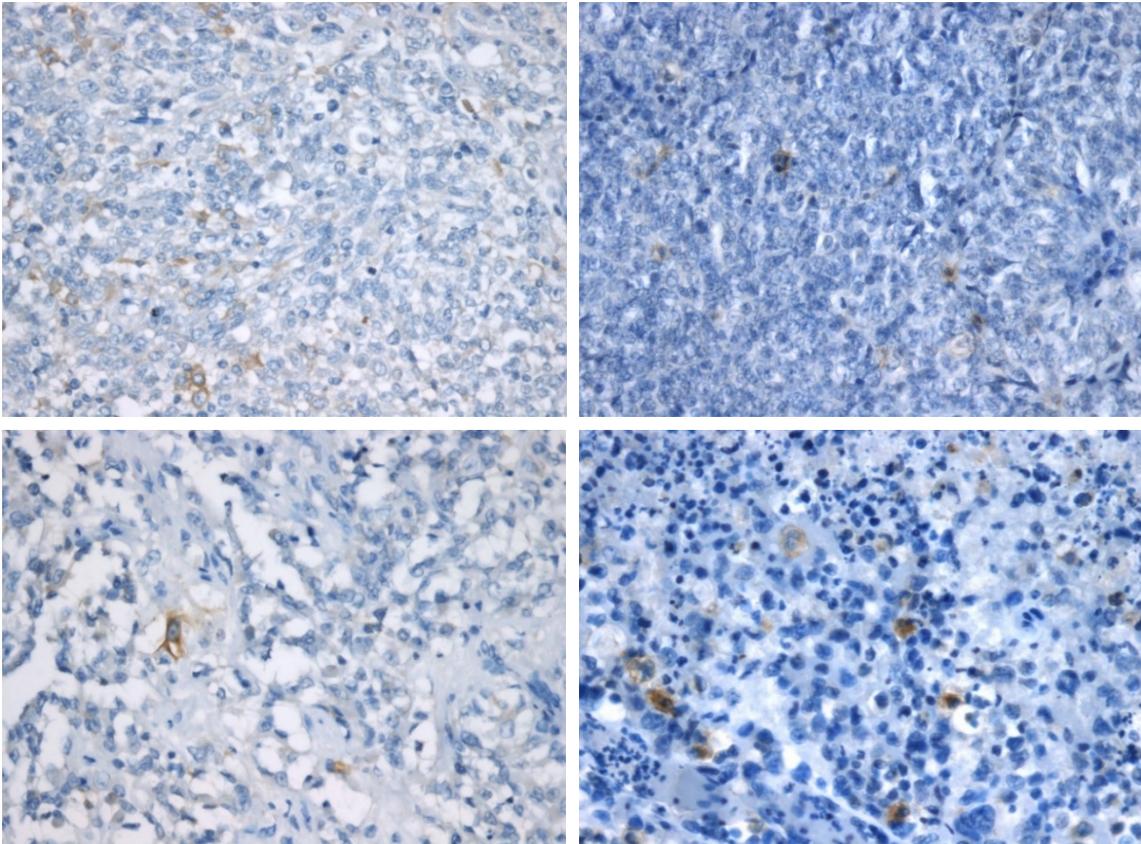


Abb. 7: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der HLA-Klassen I und II exprimierenden Zellen im Verhältnis zu Tumorzellen innerhalb der einzelnen Tumorpräparate im Vergleich nebeneinander dargestellt. Im Boxplot-Diagramm wird jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum angezeigt. Die Box gibt somit den Bereich an, in dem 50 % der Werte liegen. Ausreißende Werte werden als einzelne Punkte angezeigt.

#### 4.5 PD-L1 exprimierende Zellen



*Abb. 8: Exemplarische Abbildung verschiedener AT/RT-Präparate (von links oben nach rechts unten: Tumor Nr. 4, Tumor Nr. 5, Tumor Nr. 9, Tumor Nr. 13) in 400-facher Vergrößerung, bei denen die Expressierung des PD-L1 angefärbt wurde. Wie bereits im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, wurde hier eine Expressierung gewertet, wenn die Zellmembran angefärbt war, eine alleinige Färbung des Zytoplasmas wurde nicht gewertet.*

Die intratumorale Variabilität des prozentualen Anteils der PD-L1 exprimierenden Tumorzellen wurde in einem Boxplot-Kastendiagramm dargestellt.

Minimal wurden in einem Ausschnitt keine Tumorzelle angefärbt, maximale Anzahl der exprimierenden Tumorzellen in einem Ausschnitt lag bei 537.

Insgesamt zeigte sich die stärkste intratumorale Variabilität bei dem Präparat des Tumors Nr. 17. Hier variierte der prozentuale Anteil der exprimierenden Tumorzellen zwischen 6,4 % und 47,8 %.

Der Mittelwert des prozentualen Anteils der PD-L1 exprimierenden Tumorzellen lag bei 5,1 %.

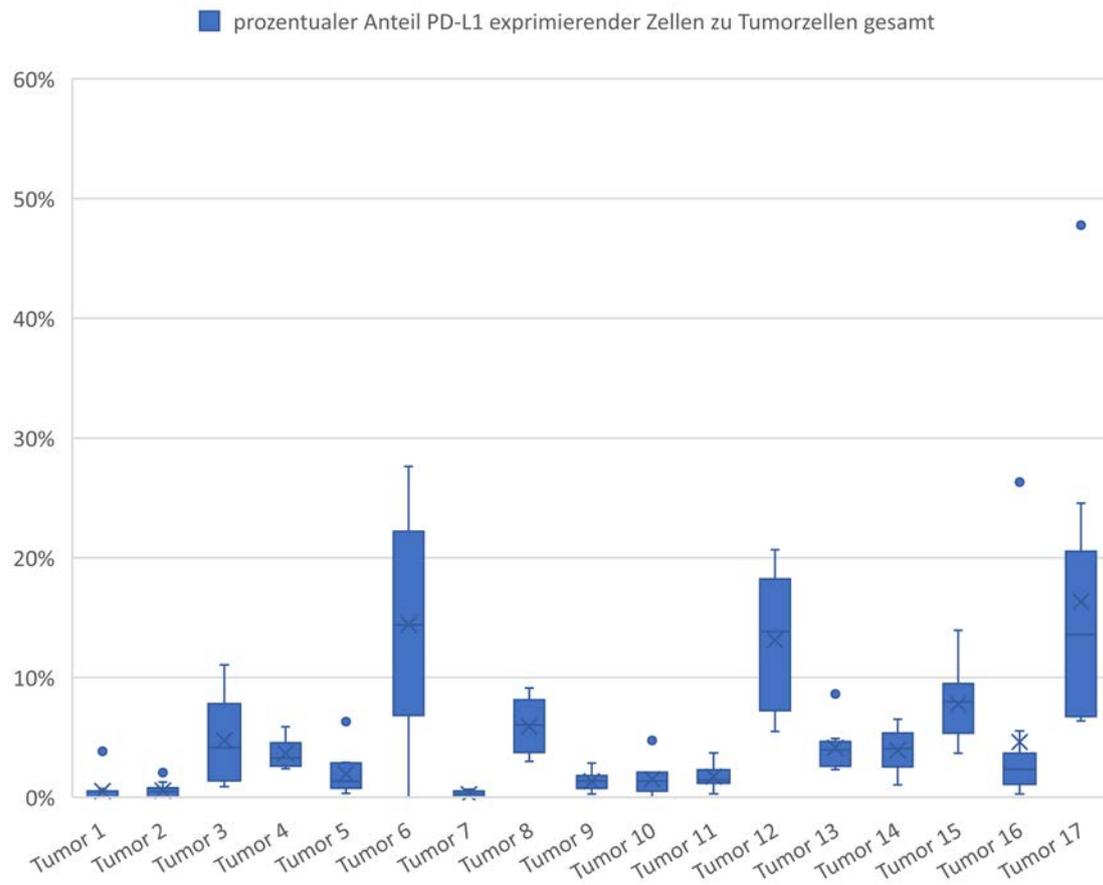


Abb. 9: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der PD-L1 exprimierenden Zellen im Verhältnis zu Tumorzellen innerhalb der einzelnen Tumorpräparate. Im Boxplot-Diagramm wird jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum angezeigt. Die Box gibt somit den Bereich an, in dem 50 % der Werte liegen. Ausreißende Werte werden als einzelne Punkte angezeigt.

Anhand des prozentualen Mittelwertes der einzelnen Tumore wurden diese, wie im Teil Material und Methoden beschrieben, einem Score zugeordnet, der einer Einteilung der Tumorpräparate nach Anteil der PD-L1 exprimierenden Tumorzellen von Tumorzellen insgesamt beschreibt.

Tabelle 1: Zuordnung der Tumore zum Score

Score	Anzahl der zugeordneten Tumore
0	3
1	9
2	2
3	3
4	0

Dies wurde im folgendem Kreisdiagramm prozentual dargestellt. Mit 53 % überwiegt der Anteil der Score 1 zugeordneter Tumore. Jeweils drei Tumore und somit 17,65 % waren den Scores 0 und 3 zugeordnet. Bei keinem Tumor war der Anteil der angefärbten Tumorzellen über 50 %, deshalb wurde kein Score höher als 3 vergeben.

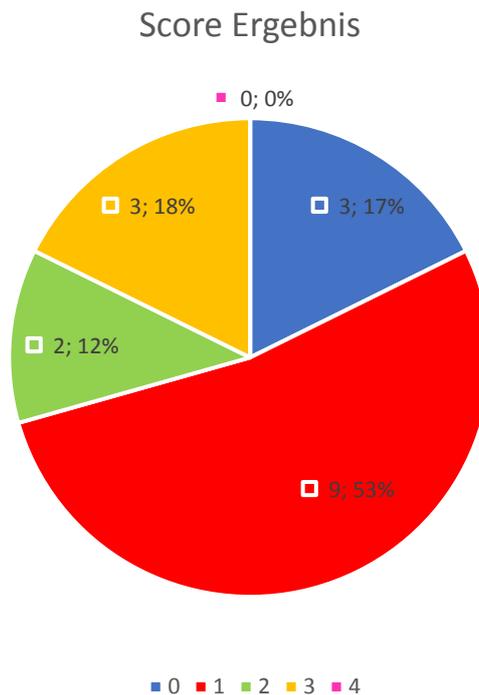


Abb. 10: Kreisdiagramm zur prozentualen Darstellung der erreichten Score-Einteilungen der AT/RT Tumorpräparate. Einteilung der nach Anteil der PD-L1 exprimierenden Tumorzellen von Tumorzellen insgesamt: 0 – 0,9 % entspricht Score 0; 1 – 4,9 % entspricht Score 1; 5 – 9,9 % entspricht Score 2; 10 – 49,9 % entspricht Score 3; 50 – 100 % entspricht Score 4

## 4.6 Vergleich der einzelnen Tumore

Um die jeweilige Expression der verschiedenen Marker in einem Tumor vergleichen zu können, wurde auf die jeweiligen Mittelwerte pro Tumor zurückgegriffen.

Das dargestellte Balkendiagramm in Abbildung 11 veranschaulicht, dass in jedem Tumor eine unterschiedliche Expression vorlag. Es bestand keine Korrelation zwischen den einzelnen Proteinen.

Die Expression von HLA-Klasse I war prozentual in den einzelnen Ausschnitten der Tumore am stärksten vertreten.

Die höchste Anzahl von CD 3 exprimierenden Zellen trat im Präparat des Tumors Nr. 5 auf.

Der höchste prozentuale Anteil an HLA-Klasse I exprimierenden Tumorzellen konnte das Präparat des Tumors Nr. 11 aufweisen.

Im Präparat des Tumors Nr. 10 war der prozentuale Anteil an HLA-Klasse II exprimierenden Tumorzellen am größten.

PD-L1 exprimierende Tumorzellen waren im Präparat des Tumors Nr. 17 am häufigsten aufzufinden.

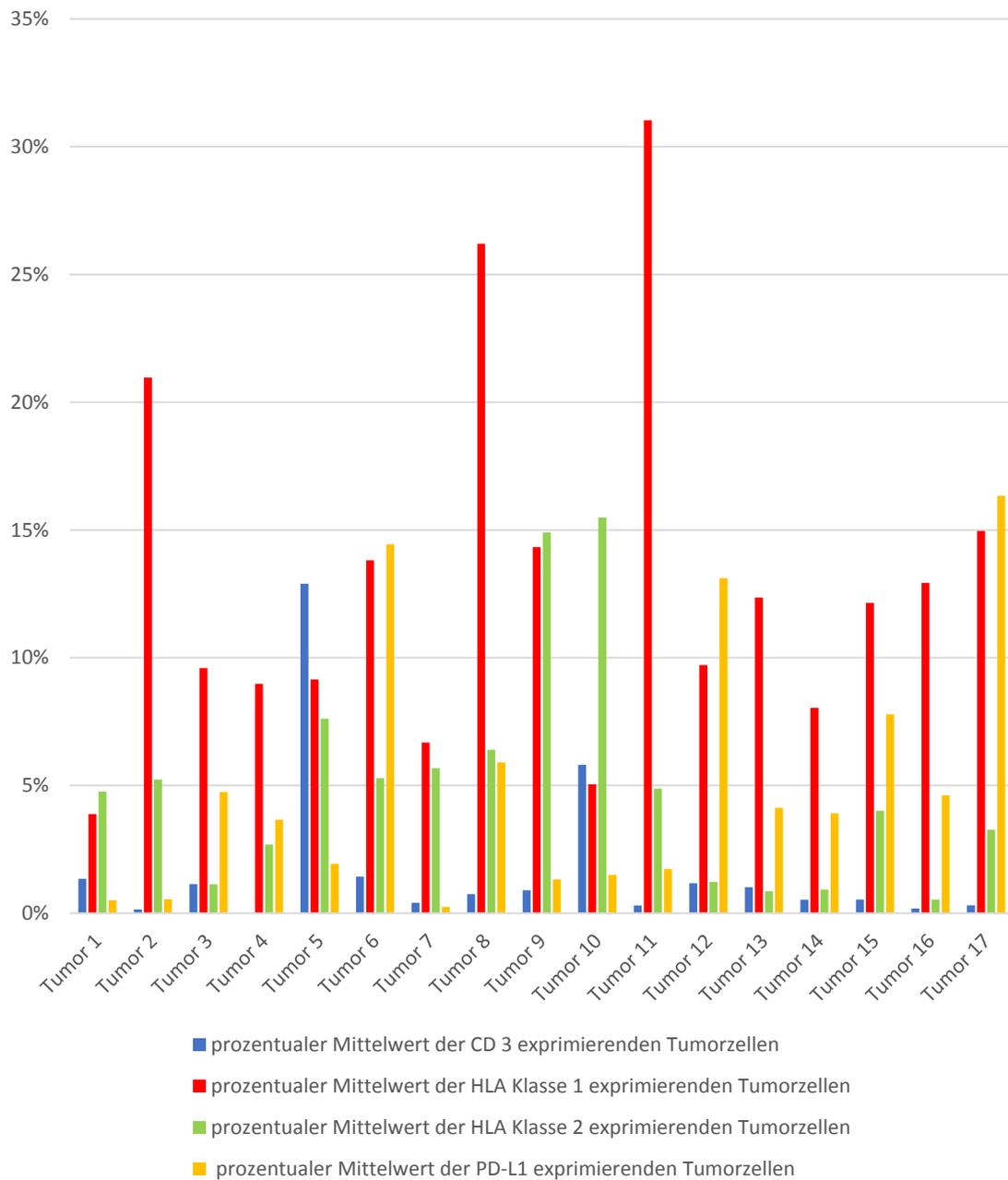


Abb. 11: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Mittelwerte der prozentualen Anteile der Marker exprimierenden Tumorzellen von allen Tumorzellen der einzelnen Präparate.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, zeigt sich kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen den prozentualen Mittelwerten der positiven Tumorzellen für die Marker CD 3, PD-L1, HLA-Klasse I und HLA-Klasse II.

Jedoch, wie in den einzelnen vorher gehenden Abschnitten dargestellt, besteht jeweils innerhalb eines Präparats eine sehr große Variabilität der exprimierenden Zellen.

Um die große Schwankungsbreite der Ergebnisse stärker zu berücksichtigen, wurde eine logit-Transformation der Daten durchgeführt mit Elimination der jeweiligen ausschlagenden Werte nach oben und unten. Aus den so transformierten Daten wurde für alle vier Parameter eine Regressionsanalyse nach Pearson berechnet (Tabelle 2).

*Tabelle 2: Lineare Regressionsanalyse nach Pearson für die vier immunhistochemischen Marker nach logit-Transformation. Signifikante Zusammenhänge sind fett markiert.*

		CD 3	HLA-I	HLA-II	PD-L1
CD-3	Korrelation nach Pearson	1	-,492	,417	,000
	Signifikanz (2-seitig)		<b>,045</b>	,096	,999
	N	17	17	17	17
HLA-I	Korrelation nach Pearson	-,492	1	-,070	,488
	Signifikanz (2-seitig)	<b>,045</b>		,789	<b>,047</b>
	N	17	17	17	17
HLA-II	Korrelation nach Pearson	,417	-,070	1	-,312
	Signifikanz (2-seitig)	,096	,789		,223
	N	17	17	17	17
PD-L1	Korrelation nach Pearson	,000	,488	-,312	1
	Signifikanz (2-seitig)	,999	<b>,047</b>	,223	
	N	17	17	17	17

Auch nach logit-Transformation konnte keine statistisch signifikante Korrelation der Expression der HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Antigene festgestellt, sowie HLA-Klasse II in Bezug auf CD 3 oder PD-L1 nachgewiesen werden.

Es zeigte sich jedoch eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der Expression der HLA-Klasse I und CD3<sup>+</sup> Zellen. Die Korrelation beträgt  $-0,492$  nach Pearson ( $p=0,045$ ). Das bedeutet, je weniger CD 3<sup>+</sup> Zellen in dem Tumorpräparat vorhanden waren, desto mehr HLA-Klasse I exprimierende Tumorzellen waren anfärbbar.

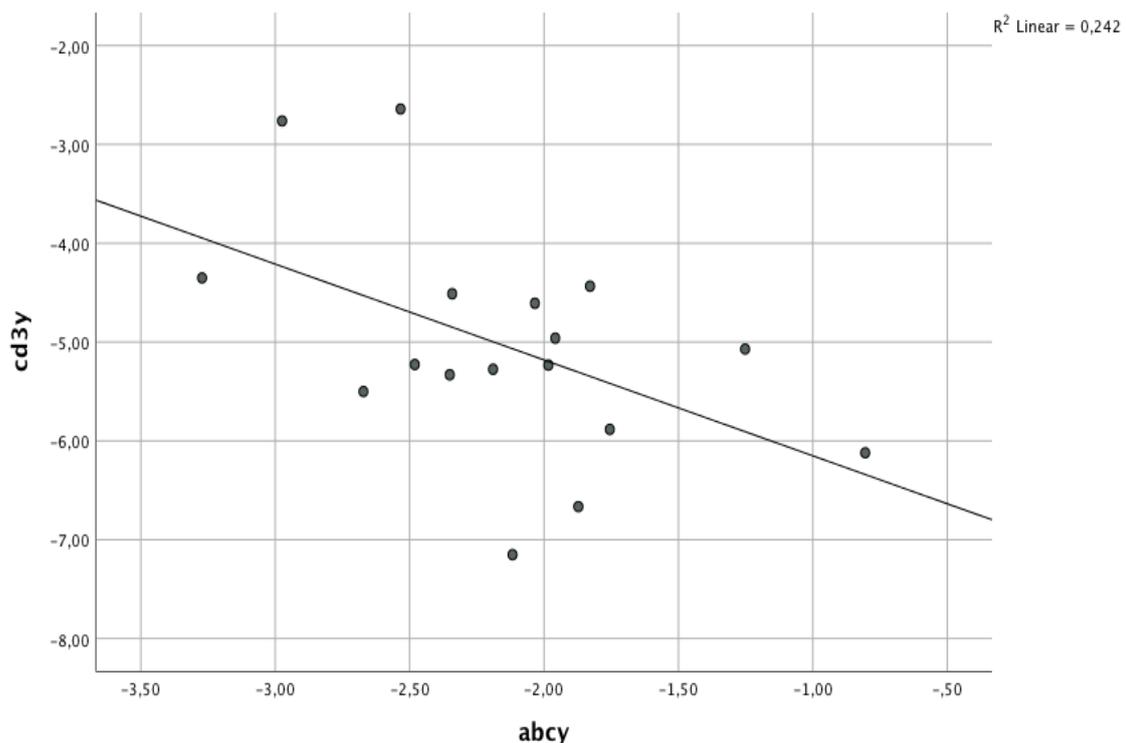


Abb. 12: Graphische Darstellung der Regressionsgerade nach Pearson zwischen der Expression der HLA-Klasse I (x-Achse) und der CD 3<sup>+</sup> Zellen (y-Achse). Negative Skalenbeschriftung auf Grund der logit-Transformation.

Des Weiteren konnte eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der Expression der HLA-Klasse I und der Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Korrelation beträgt  $0,488$  nach Pearson ( $p=0,047$ ). Das

bedeutet, dass je mehr HLA-Klasse I exprimierende Tumorzellen in einem Präparat vorhanden sind, desto mehr wird auch PD-L1 von der Tumorzelle exprimiert.

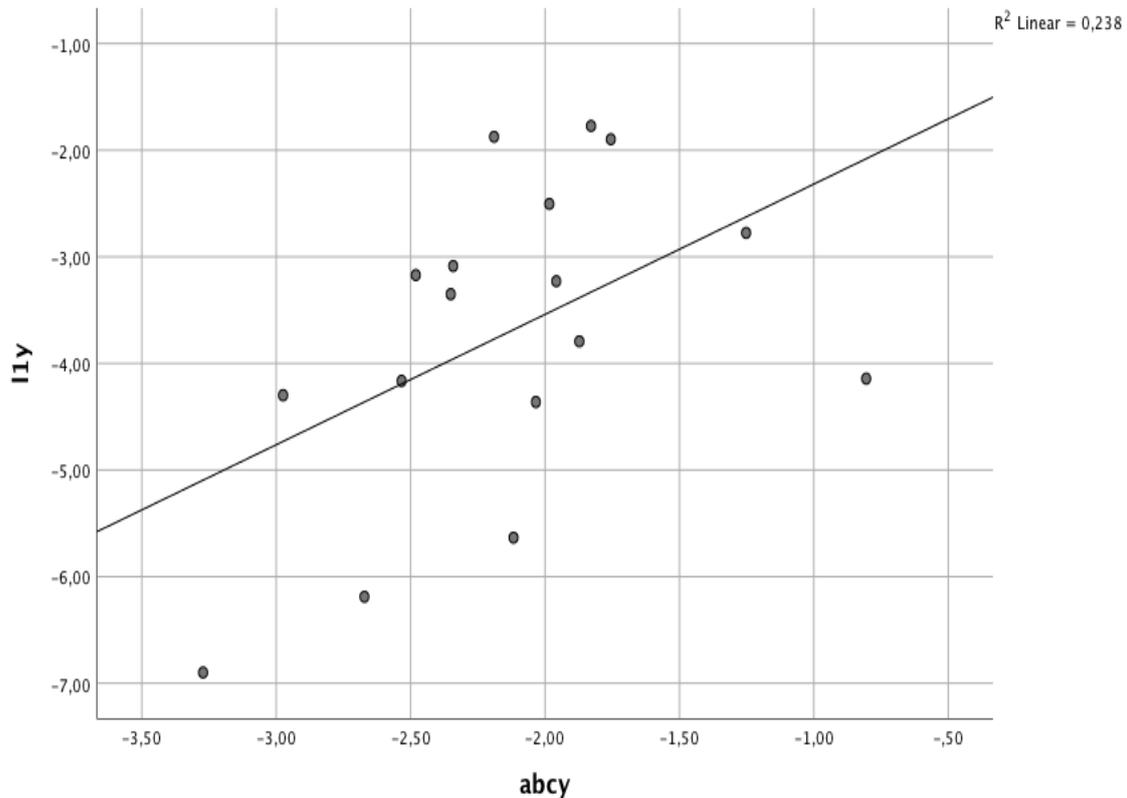


Abb. 13: Graphische Darstellung der Regressionsgerade nach Pearson zwischen den HLA-Klasse I (x-Achse) und den PD-L1 exprimierenden Tumorzellen (y-Achse). Negative Skalenbeschriftung auf Grund der logit-Transformation.

Daraus lässt sich schließen, dass die Expression von HLA-Klasse I und von PD-L1 Molekülen auf Tumorzellen gleichsinnig reguliert zu sein scheint. Eine vermehrte Infiltration des Tumormikromilieus mit CD 3<sup>+</sup> T-Zellen geht mit einer Herabregulierung von HLA-Klasse I Molekülen, nicht jedoch von PD-L1 auf Tumorzellen, einher.

## 4.7 Vergleiche der Glioblastom-Präparate

Um die Auswirkung von Immuntherapie besser verstehen zu können, wurden bei zwei immuntherapeutisch behandelten PatientInnen Präparate des Hirntumors vor und nach Erhalt der Therapie angefertigt. Da die Immuntherapie bei AT/RTs weder in der Standardtherapie noch in klinischen Studien derzeit etabliert ist, wurden für diese Fragestellung zwei PatientInnen mit Glioblastom-Rezidiv aus der Pilotphase einer laufenden Phase I/II-Immuntherapiestudie (HIT\_HGG Rez Immunovac, Eudra-CT 2013-000419-26) untersucht. Für die Analyse wurden jeweils gleichwertige Abschnitte eines Tumors in Bezug auf die Anzahl an angefärbten Zellen verglichen, also Zellen, die jeweils das Oberflächenprotein exprimieren. In dieser Zusammenfassung wurden vor allem die Oberflächenproteine genauer betrachtet, die von Zellen des Immunsystems exprimiert werden und somit bei diesen PatientInnen im Tumorgewebe des Glioblastoms oder in der unmittelbaren Umgebung des Tumors vorkommen.

CD 45 ist ein Pan-Leukozyten-Marker. Er färbt alle Zellen hämatopoetischen Ursprungs an, mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten (Dalchau et al. 1980). Er gibt somit einen Überblick über die Immunzellinfiltration im jeweiligen Gewebeschnitt. Bei PatientIn A konnten vor der Immuntherapie nur wenige Leukozyten nachgewiesen werden. Auch nach der Immuntherapie zeigte sich kein bedeutender Anstieg. Auch bei PatientIn B konnten nur wenige Leukozyten vor und auch nach der Therapie nachgewiesen werden.

Zur genaueren Differenzierung wurden CD 3-Antigene angefärbt. Diese werden auf T-Lymphozyten exprimiert. Das CD 3-Antigen ist mit dem T-Zellrezeptorkomplex assoziiert und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen (Ansorge und Träger 2014). Insgesamt ergab sich bei beiden PatientInnen ein ähnliches Bild wie bereits bei der Anfärbung von CD 45. Im Tumor- und umliegendem Hirngewebe zeigten sich nur wenige CD 3 exprimierende Zellen. Diese waren vor allem am Randbereich des Tumors vorhanden. Vor und nach der Immuntherapie konnte kein Unterschied festgestellt werden.

CD 4 wird an der Oberfläche vor allem von T-Helferzellen, aber auch von Monozyten und Makrophagen, sowie von Mikroglia durch den MHC-II-Komplex exprimiert (Maddon et al. 1987). CD 8 gehört ebenfalls zu den Oberflächenproteinen des Immunsystems, es ist aber hauptsächlich auf zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu finden. Es wird außerdem von dendritischen Zellen exprimiert (Elgert 2009). Für die Expression wird der MHC-I-Komplex benötigt. Es konnte sowohl bei PatientIn A als auch bei PatientIn B vor der Immuntherapie mehr CD 8 als CD 4 Zellen im normalen Hirngewebe festgestellt werden. Nach der Immuntherapie waren bei PatientIn A keine CD 8 exprimierenden Zellen mehr vorhanden, an der Anzahl an CD 4 exprimierenden Zellen hatte sich nichts verändert. Bei PatientIn B hat sich das Verhältnis zwischen CD 4 und CD 8 nicht verändert. Im Tumorgewebe waren bei dieser PatientIn sowohl vor der Immuntherapie als auch danach keine CD 8 exprimierenden Zellen vorhanden.

Makrophagen exprimieren CD 163 als Oberflächenprotein. CD 163 spielt eine große Rolle für die Regulation der Entzündungsreaktion über die Freisetzung von Zytokinen (Moestrup und Møller 2004). Bei beiden PatientInnen waren Makrophagen sowohl vor als auch nach der Immunisierung vorhanden. Sie waren diffus verteilt, auch Bestandteil des normalen Hirngewebes und dabei nicht auf ein bestimmtes Areal oder den Rand des Tumorgewebes begrenzt.

Zusammenfassend konnte im Vergleich dieser PatientInnen keine Veränderung im Bestand der Immunzellen durch die Immuntherapie im Bereich des Hirn- und Tumorgewebes festgestellt werden.

## 5 Diskussion

AT/RTs sind trotz der Fortschritte in der pädiatrischen Onkologie weiterhin eine der Kinderkrebsformen mit sehr geringen Überlebenschancen. Auch wenn sich die Prognose in den letzten Jahren verbessert hat, liegt das 5-Jahres-Überleben der PatientInnen immer noch zwischen 15 und 50 %. Die Rate der Betroffenen, die diese 5 Jahre ohne erneutes Ereignis überleben, ist trotz Ausschöpfen der bis heute verfügbaren Therapieoptionen bei gerade einmal 30 % (Chi et al. 2009; Frühwald et al. 2016; Frühwald et al. 2020).

Schon die Therapie an sich stellt auch heute noch eine große Herausforderung dar. Nach Protokoll des EU-Rhab wird zunächst die chirurgische Resektion vorgesehen. Die prognostische Relevanz der totalen Tumorsektion ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Metaanalyse der bisher erhobenen Daten bezüglich der entfernten Tumormasse zeigte einen Überlebensvorteil durch totale Tumorsektion mit einem medianen Überleben von gerundet 4,2 Jahren im Gegensatz zu 0,9 Jahren bei einer subtotalen, jedoch über 90 %-igen Entfernung. Bei einer partiellen Tumorsektion hingegen, wenn weniger als 50 % des Tumors entfernt werden konnten, ist das mediane Überleben bei gerundet 0,6 Jahren (Egiz et al. 2022). Die totale Tumorsektion kann jedoch in vielen Fällen durch die Nähe des Tumors zum Hirnstamm, beziehungsweise zu relevanten funktionellen anatomischen Strukturen, nicht erreicht werden. Gerade bei PatientInnen unter einem Jahr hat man es zudem auf Grund der anatomischen Größen- bzw. Wachstumsverhältnisse und spät eintretender Symptomatik mit sehr ausgedehnten Hirntumoren zu tun, was wiederum die Resektionsmöglichkeiten beeinträchtigt. Eine second-look-Operation wird immer dann empfohlen, wenn die weitere Entfernung von Tumormasse eine Verkleinerung des Bestrahlungsfeldes sowie eine bessere Wirksamkeit der Chemotherapie erbringen kann (vgl. EU-Rhab Protokoll Stand 08.12.2016; (Gnekow 1995; Richards et al. 2019)).

Das junge Erkrankungsalter stellt nicht nur im Zusammenhang mit der chirurgischen Intervention einen entscheidenden Faktor für die Therapieoptionen dar. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind der Großteil der betroffenen PatientInnen Kinder unter drei Jahren. Bei Kindern unter einem Jahr machen AT/RT zwischen 40 bis 50 % aller ZNS-Tumore aus (Tekautz et al. 2005; Frühwald et al. 2016; Hilden et al. 2004; Morgenstern et al. 2010).

Gerade in diesem vulnerablen Patientenkollektiv sind die Therapieoptionen bedingt durch das Alter deutlich eingegrenzt. Eine Bestrahlung, die wie bereits im Kapitel 1.1.5 beschrieben, einen wichtigen Bestandteil innerhalb der multimodalen Therapie darstellt, ist auch nach den aktuellen Richtlinien des EU-Rhab erst für Kinder über 18 Monate empfohlen und wird nur in Einzelfällen schon früher durchgeführt (siehe EU-Rhab Protokoll Stand 08.12.2016). Bei Säuglingen unter einem Jahr wird somit überbrückend die Chemotherapie begonnen. Doch auch hier zeigen sich Herausforderungen. Da AT/RT das zentrale Nervensystem betreffen, ist die Blut-Hirn-Schranke eine wesentliche Einschränkung in der Therapie. Die beim gesunden Menschen bestehende Schutzfunktion, die viele Noxen vom Eindringen in das sensible Nervensystem abhält, wird hier zur Schranke für die tumorbekämpfenden Medikamente. Rhabdoidtumore sind nur mäßig empfindlich gegenüber Chemotherapeutika, sodass meist nicht alle Tumorzellen abgetötet werden können. Aus den verbleibenden Zellen entwickeln sich Rezidive, welche insgesamt zu einer erneuten Progredienz der Erkrankung führen und mit einer hohen Mortalität einhergehen (Ginn und Gajjar 2012; Frühwald et al. 2020; Hoff et al. 2011; Benesch et al. 2014; Chi et al. 2009).

Es ist somit relevant neue Behandlungskonzepte für dieses vulnerable Patientenkollektiv zu entwickeln, um die Behandlungserfolge der an einem AT/RT erkrankten PatientInnen signifikant zu verbessern. Die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag in der Grundlagenforschung dazu leisten, die Eignung der Immuntherapie als neue Therapieoption für AT/RTs zu eruieren.

Erstmals konnte mit dieser Arbeit durch die Färbung des CD 3-Antigens die Anwesenheit von T-Zellen im Tumorgewebe von AT/RTs nachgewiesen werden. Generell galt das ZNS lange Zeit als immunprivilegiert. Man nahm an, dass wenig bis keine Immunzellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Dies wurde durch diverse Experimente wie zum Beispiel der Transplantation von Haut auf Hirngewebe unterstrichen (Medawar 1948; Widner und Brundin 1988). Gleichzeitig wurde im Gegensatz zu dieser Hypothese schon damals gezeigt, dass es bei der allogenen Hauttransplantation auf Hirngewebe zu einer ähnlichen Abstoßungsreaktion wie bei einer peripheren Hauttransplantation beispielsweise auf der Brust kam, wenn im Vorfeld bereits eine periphere allogene Hauttransplantation stattgefunden hatte (Medawar 1948; Louveau et al. 2015a). Es konnte also eine erlernte Immunantwort angenommen werden. Für diese Besonderheit der

Immunreaktion innerhalb des ZNS wurde zum einen die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich gemacht, zum anderen befinden sich innerhalb des ZNS keine Lymphbahnen. Die Funktion der Leitung der antigenpräsentierenden Zellen zu einem lymphatischen Organ für die Initiierung einer Immunantwort wird durch den Liquor übernommen (Ransohoff und Engelhardt 2012). Somit enthält das Nervenwasser auch die meisten Immunzellen im ZNS (Kivisäkk et al. 2003). In der von mir durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass CD 3<sup>+</sup> Zellen auch in der unmittelbaren Umgebung von AT/RTs zu finden sind. Um eine Immunantwort auslösen zu können, werden zudem antigenpräsentierende Zellen benötigt. Im gesunden Hirngewebe sind das Monozyten und Mikroglia, die über die Expression von HLA-Klasse I, HLA-Klasse II und CD 40 Antigene präsentieren können (Ransohoff und Engelhardt 2012; Louveau et al. 2015b).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass AT/RT des ZNS sowohl HLA-Klasse I als auch HLA-Klasse II Peptidkomplexe exprimieren. Dies ist zum heutigen Stand die erste Arbeit, welche diese Expression nachweist. Wie bereits erläutert, sind die HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Proteine essentiell für eine antigenspezifische Immunantwort durch T-Zellen. Durch die HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Peptidkomplexe werden Antigene auf der Zelloberfläche T-Lymphozyten präsentiert. Dadurch werden sowohl CD 4<sup>+</sup> als auch CD 8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aktiviert und es kann eine direkte zytotoxische Immunantwort, die Bildung von Gedächtniszellen sowie die Ausschüttung von Zytokinen ausgelöst werden (Lampson 1995; Sant und Yewdell 2003).

Der positive Nachweis von CD 3<sup>+</sup> T-Zellen im AT/RT-Gewebe legt das potentielle Vorhandensein einer Immunantwort und somit auch die Möglichkeit nahe, eine Immunantwort therapeutisch nutzbar zu machen. Dies deckt sich mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Leruste et al., die auch eine hohe Anzahl an Immunzellen im Tumorgewebe nachweisen konnte und ebenfalls daraus ein Potential für mögliche Immuntherapien ableiten (Leruste et al. 2019).

Glioblastome weisen eine ausgeprägte lokale und systemische Immunsuppression auf, die nur teilweise als Folge von Bestrahlung und Chemotherapie angesehen werden kann. Diese tumorintrinsic Immunsuppression stellt eine weitere Barriere für die Wirksamkeit einer möglichen Immuntherapie dar (Grossman et al. 2011). Bei AT/RTs ist

ein solcher Effekt bislang nicht untersucht. In wie weit sich die etablierten Therapieoptionen auf die Immuntherapie auswirken, ist noch ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte innerhalb der angefärbten Präparate eine starke Variabilität des Verhältnisses von infiltrierenden Immunzellen zu Tumorzellen dargestellt werden. Da bislang kaum publizierte Daten zu diesem Thema vorliegen, wurde nach möglichen Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Immunparametern gesucht. Dabei wurde die Hypothese formuliert, dass die negative Korrelation zwischen CD 3 und HLA-ABC als getriggerte HLA-Herabregulation interpretiert werden kann. Dies könnte Teil eines reversiblen, epigenetisch regulierten Tumor-Escape-Mechanismus sein. Dieser Mechanismus wurde bereits in ähnlicher Weise bei Glioblastomen und anderen Tumoren nachgewiesen (Vlková et al. 2014; Marcu et al. 2021). Hierbei kann die Herabregulation der HLA-Klasse I Moleküle als eine akute Reaktion auf den Immundruck der T-Zellen interpretiert werden. Der Tumor versucht somit durch die Herabregulation der Antigenpräsentation den Immunzellen keine Angriffsfläche mehr zu bieten und so der Immunantwort zu entgehen. Als weitere Auffälligkeit ist hier zu sehen, dass insgesamt der Anteil an HLA-Klasse I präsentierenden Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe mit im Mittel 13 % bereits niedrig ist. Ob hier eine so genannte *hard lesion*, also genetische fixierte Deletion von HLA-Genen im Tumor oder eine *soft lesion*, also reaktive und gegebenenfalls temporäre Herunterregulierung des HLA-Komplexes vorliegt, konnte durch diese Arbeit nicht bestimmt werden. Hierzu empfiehlt es sich weitere Arbeiten anzuschließen, welche die Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung untersuchen und neben der immunhistochemischen Färbung (IHC) auch molekulare Untersuchungsmethoden anwenden. Zur Überprüfung der hier aufgestellten Hypothese ist außerdem eine größere Fallzahl notwendig. Anpassungsmechanismen, mit denen Tumore der körpereigenen Immunantwort entgehen (Tumor-Escape-Mechanismus), sind für andere Tumorentitäten, wie beispielsweise astrozytische Tumore, bereits beschrieben worden. So konnte 2005 durch Facoetti et al. bei ca. 50 % der Glioblastoma multiforme ein Verlust der HLA-Klasse I Moleküle festgestellt werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass der Verlust der HLA-Expression im Zusammenhang mit einem höherem Tumorgrad steht (Facoetti et al. 2005). Leone et al. sehen durch die reduzierte HLA-Expression eine Schwächung der CD 8<sup>+</sup>-T-Zellen und somit die reduzierte Expression als einen Mechanismus, durch den der Tumor sich der

Immunkontrolle entzieht und damit sein Wachstum sichert (Leone et al. 2013). Die niedrigere HLA-Expression bei Glioblastomen könnte ein Grund sein, weshalb T-Zell-gebundene Immuntherapien bislang nur mäßige klinische Erfolge erzielen konnten. Mit den hier erarbeiteten Daten konnten wir erstmalig zeigen, dass eine HLA-Herunterregulierung im Zusammenhang mit T-Zellinfiltrationen auch für AT/RTs nachzuweisen ist.

Ein Weg den Tumor-Escape-Mechanismus mittels Störung der HLA-Peptid-T-Zell-Rezeptor (TCR) Interaktion bei ZNS-Tumoren zu umgehen, könnte die CAR-T-Zelltherapie sein, die beim GBM bereits in klinischen Studien getestet wird (Filley et al. 2018; Bagley et al. 2018). Wie bereits im Kapitel 1.2 beschrieben, sind die CAR-T-Zellen nicht mehr abhängig von der Präsentation eines vorbestimmten HLA-gebundenen Peptidantigens, sondern es können verschiedene Oberflächenproteine der Tumorzellen als Zielstruktur dienen (Hartmann et al. 2017). Dies könnte z. B. beim GBM einen entscheidenden Unterschied machen, da CAR-T-Zellen trotz des HLA-Verlustes aktiviert werden und Tumorzellen lysieren können (Leone et al. 2013). Ein zumindest partieller HLA-Verlust scheint auch bei AT/RTs eine Rolle zu spielen. Bei GBM wurden tumorspezifische Oberflächenantigene wie beispielsweise der epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) oder human epidermal growth factor receptor 2 (HER II) als interessante Targets für CAR-T-Zellen identifiziert (Bagley et al. 2018). Bei der von Pule et al. durchgeführten Studie mit HER II-spezifischen CAR-T-Zellen wurden virusspezifische T-Zellen als Träger des CARs verwendet. Die tumorspezifische Aktivität wird durch den CAR gegen HER II vermittelt, die gleichzeitige Triggerung des nativen T-Zellrezeptors durch Viruspeptide soll die Proliferation und Persistenz der CAR-T-Zelle verbessern (Pule et al. 2008; Ahmed et al. 2017). Verwendete TCR richten sich gegen Peptide von Cytomegalieviren, Epstein-Barr-Virus und Adenoviren, also Viren, mit denen sich die meisten Menschen bereits in der Kindheit und Jugend infiziert haben und über stabile Gedächtnis-T-Zellantworten verfügen (Lynch et al. 2011; Nowalk und Green 2016; Dioverti und Razonable 2016). Ähnliche Ansätze werden aktuell auch für AT/RTs verfolgt. Onkolytische Viren sind Viren, die sich die Besonderheit der Tumorzellen, wie eben auch die CAR-T-Zellen, zunutze machen und so die Tumorzellen infizieren und eine Apoptose der Tumorzelle herbeiführen. Gesunde Zellen werden nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil infiziert,

wodurch eine geringe Rate an unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet wurde (Parato et al. 2005). Um eine Immunantwort durch die Virusexpression erhalten zu können, müssen die Virusantigene ebenfalls über HLA-Klasse I Komplexe präsentiert werden. In einer Studie von Studebaker et al. wurde im Jahr 2017 gezeigt, dass im Xenograftmodell auch bei AT/RTs ein signifikant längeres Überleben sowie eine bessere Wirksamkeit von Cyclophosphamid durch die Verwendung von onkolytischen Herpesviren rRp450 erreicht werden konnte (Studebaker et al. 2017). Das onkolytische Masernvirus zeigte in klinischen Versuchen bei Myelomen bereits Erfolge (Russell et al. 2014). Auch bei AT/RTs laufen aktuell nach erfolgsversprechenden präklinischen Xenograftmodellen erste klinische Phase-I-Studien (wie bspw. Studie Nr. NCT02962167) (Studebaker et al. 2015). Auch für die onkolytische Virustherapie ist es elementar die Oberflächenproteine der Tumorzellen auszumachen, um weitere Targets für eine Therapie zu nutzen. Des Weiteren könnte auch die in dieser Arbeit festgestellte negative Korrelation, also je mehr CD 3<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden sind, desto weniger MHC-I-Komplexe gibt es, auf ein Hindernis in der onkolytischen Virustherapie bei AT/RT hinweisen. Auch hier könnte der oben bereits beschriebene Tumor-Escape-Mechanismus vorliegen.

Neben der Herunterregulierung von HLA-Molekülen gibt es weitere Immune-Escape-Mechanismen, mit denen der Tumor sich einem Zugriff des Immunsystems zu entziehen versucht. Bei Gliom-Zellen kommt es z. B. zu einer verstärkten Expression des B7-homolog 1 (B7-H1), was zu einer Inhibition der T-Zellen führt und die Zytokinsekretion und Aktivierung bremst (Wintterle et al. 2003). Ob dies auch bei AT/RTs der Fall ist, wurde bislang noch nicht untersucht. Jedoch könnte auch hier der Grund für wenige CD 3<sup>+</sup> Zellen im Tumorgewebe liegen. In dieser Arbeit waren im Mittel nur 1,75 % der Zellen CD 3 exprimierende Zellen. Trotzdem kann nur durch die geringe Anzahl der vorhandenen Zellen nicht auf deren Funktionalität und Aktivität geschlossen werden. Hier ist weitere klinische Forschung unabdingbar.

Um eine erhöhte Immuntoleranz zu erreichen sind regulatorische T-Zellen (T<sub>regs</sub>) für Tumore von entscheidender Bedeutung. T<sub>regs</sub> sind CD 4<sup>+</sup> T-Zellen und erkennen HLA-Klasse II gebundene Peptide. Bei GBM konnte die Erhöhung der indoleamin 2,3 deoxygenase (IDO) mit einer vermehrten Anwesenheit von T<sub>regs</sub> in Verbindung gebracht werden (Wainwright et al. 2012). In unserer AT/RT-Serie waren im Mittel 2,98 % der Tumorzellen HLA-Klasse II exprimierende Tumorzellen. Eine

statistisch signifikante Korrelation mit der Anwesenheit CD 3<sup>+</sup> Zellen konnte hier nicht festgestellt werden. Zur genauen Identifikation von T<sub>regs</sub> wäre eine weitere Untersuchung der forkhead-box-Protein P3 (FoxP3)-Expression aufschlussreich. Eine CAR-T-Zelltherapie kann, wie beim GBM gezeigt, ebenso zu einem Anstieg der IDO-Expression führen (O'Rourke et al. 2017). IDO-Inhibitoren parallel zu einer T-Zellimmuntherapie könnten daher die Effektivität der T-Zellen steigern. Ob die Ergebnisse beim GBM auf AT/RTs übertragen werden können, muss in weiteren Studien gezeigt werden.

In den letzten Jahren hat man auf Grund der hohen intertumoralen Variabilität der AT/RT Anstrengungen unternommen eine präzisere Unterteilung der AT/RT in verschiedene Subtypen zu ermöglichen. So hat man die AT/RT in drei Subgruppen eingeteilt. Die Subgruppen wurden anhand der Methylierung und/oder Gensequenzierung identifiziert. In wie weit sich das Ansprechen auf die unterschiedlichen Therapieoptionen in den Subgruppen unterscheidet, ist aktuell Gegenstand der Forschung (Ho et al. 2020; Johann et al. 2016). Dass sowohl die Methylierung als auch das Alter einen Einfluss auf das Outcome und die Prognose der Lebenserwartung haben, zeigten Frühwald et al. 2020. In der Arbeit stellte sich vor allem das Alter unter einem Jahr und die Zugehörigkeit zu der non-TYR Methylierungs-Subgruppe als negative Prognosefaktoren heraus (Frühwald et al. 2020). Bei Federico et al. wurde die AT/RT-SHH Subgruppe weiter aufgegliedert und innerhalb der heterogenen Subgruppe noch weitere Einteilungen bezüglich Alter, Lokalisation und Methylierung vorgenommen. Diese haben ebenfalls Einfluss auf das Outcome und das Ansprechen auf unterschiedliche Therapien (Federico et al. 2022). Da bei Gewinnung der hier analysierten Tumorgewebe die Einteilung der AT/RTs in die diversen Subgruppen noch nicht publiziert waren, lagen uns leider keine Informationen zum AT/RT-Subtypenstatus vor, somit konnte dies auch nicht in die Auswertung unserer Ergebnisse einfließen. Des Weiteren war eine Korrelation der hier analysierten immunhistochemischen Marker mit klinischen Outcomeparametern nicht möglich, da die Tumorgewebe überwiegend aus Tumorbanks stammten und nicht mit klinischen Daten annotiert waren. Eine Analyse bezüglich Geschlechterverteilung, Alter der PatientInnen, Tumorlokalisierung sowie Therapieansprechen und Überleben wären sehr interessante Gesichtspunkte, die in künftigen Analysen berücksichtigt werden sollten. Weitere relevante Punkte wären, ob die Expression der IHC-Marker sich in den verschiedenen und/oder innerhalb der gleichen Subgruppen unterscheidet. Dies könnte gegebenenfalls

zu einem differenzierten Therapieansatz führen. Möglicherweise ist die starke Variabilität der Ergebnisse, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, bereits ein Hinweis auf Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen.

Gleichzeitig müssen diverse Umstände dieser Arbeit kritisch betrachtet werden. Bei der für die Auswertung relevanten Auszählung der verschiedenen Zellen wurden die antigenexprimierenden Zellen in jeweils 10 verschiedenen Anschnitten eines Tumorpräparats ermittelt. Durch die hohe, tumorintrinsic Heterogenität ergibt sich, dass durch die Limitierung auf 10 verschiedene Anschnitte nur eine Stichprobe des einzelnen Tumors ausgewertet wird. Aus forschungsökonomischen Gründen wurde außerdem für die gesamte Anzahl der im Anschnitt vorhandenen Tumorzellen jeweils nur ein Viertel der Fläche der mikroskopisch entstandenen Bilder manuell ausgezählt und diese im Anschluss wieder vervierfacht, um so die angenommene Gesamtanzahl der vorhanden Tumorzellen zu erhalten. Eine genauere Darstellung der tatsächlich vorhandenen Zellen kann beispielsweise durch die computergestützte Bildauswertung nach Mehrfarben-IHC gewonnen werden. Weitere histopathologische Untersuchungsmethoden sind auch für die Unterscheidung von Tumorzellen und Mikroglia wichtig. In dieser Arbeit wurden die Zellen jeweils nach mikroskopischer Betrachtung der jeweiligen Zellgruppe zugeordnet und so Tumorzellen identifiziert. Auch wenn sich AT/RT-Zellen durch bestimmte Kriterien auszeichnen, ist durch die reine mikroskopische Betrachtung eine eindeutige Unterscheidung zu Mikroglia nicht immer möglich. Um diese eventuellen Fehlzuordnungen zu vermeiden, müsste man beispielsweise gleichzeitig eine Anfärbung der zu betrachtenden Antigene sowie der hSNF5/INI 1-Gensequenz durchführen, da diese bei nahezu allen Tumorzellen inaktiviert ist. Dies war auf Grund der Komplexität für den Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Genauere Forschungsarbeiten sollten deshalb hierzu folgen. Des Weiteren wäre es aufschlussreich zu erforschen in wie weit sich die Präsenz einzelner Zellen, wie CD 3 exprimierende T-Zellen oder der Anstieg der PD-L1 exprimierender Zellen, auf die Prognose der PatientInnen auswirkt. Bislang konnte eine Korrelation zwischen hoher Präsenz von CD 68<sup>+</sup> Zellen und einem schlechteren Outcome nachgewiesen werden (Melcher et al. 2020).

Durch die fehlenden klinischen Daten zu den Tumorgeweben war dies jedoch hier leider nicht möglich. Bei Glioblastomen konnte bereits ein schlechteres Outcome bei hoher PD-L1 Expression nachgewiesen werden (Nduom et al. 2016).

Immuncheckpoint-Inhibitoren wie PD 1-Inhibitoren zeigen eine große Wirksamkeit bei soliden Tumoren mit einer hohen Mutationslast, wie zum Beispiel beim Melanom, dem Nierenzellkarzinom oder Nicht-kleinzelligem-Lungenkarzinom (Reck et al. 2016; Byrne und Fisher 2017; Schumacher und Schreiber 2015). Leider gehören ZNS Tumore im Allgemeinen und AT/RTs im Besonderen zu den Tumoren mit einer niedrigen Mutationslast (Medikonda et al. 2021; Marcu et al. 2021; Lawrence et al. 2013). Immuncheckpointmoleküle sind ein Mechanismus des Immunsystems, welcher periphere Toleranz gegenüber Selbstantigenen sicherstellen soll. Tumorzellen machen sich diesen Mechanismus häufig zu Nutze, indem sie die Immuncheckpointmoleküle (z. B. PD-L1 oder anti-CTLA4) heraufregulieren. Dies ist unter anderem beim Glioblastom nachgewiesen worden (Medikonda et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von PD-L1 bei AT/RT untersucht. Bislang ist dies nur in einer weiteren koreanischen Studie untersucht worden, bei der 7 von 20 AT/RT Tumore eine PD-L1 Expression aufwiesen (Hwang et al. 2018). Vor allem beim Melanom ist die Therapie mit PD-/PD-L1 Immuncheckpoint-Inhibitoren bereits in Anwendung und deren Wirkung gut belegt. Es wurde das Adaptive-Resistenz-Model entdeckt, in dem beschrieben wird, dass durch eine rege T-Zell Infiltration die Expression von PD-L1 durch den Mediator Interferon  $\text{IFN } \gamma$  induziert wird. Eine hohe Anzahl von infiltrierenden  $\text{CD } 8^+$ -T-Zellen geht dementsprechend mit einer hohen Rate an PD-L1 exprimierenden Zellen einher (Spranger et al. 2013). Für die Immuntherapie könnte somit eine niedrige Anzahl an Immunzellen im Tumorgewebe mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie mit PD-/PD-L1 Immuncheckpoint-Inhibitoren assoziiert sein. Hinweise für einen solchen Zusammenhang konnten ebenfalls in dieser Arbeit nachwiesen werden. Auch hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen PD-L1 exprimierenden Zellen und HLA-Klasse I exprimierenden Zellen. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen CD 3 und PD-L1 exprimierenden Zellen konnte jedoch in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Dieser Zusammenhang sollte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten mit größeren Fallzahlen und weiteren Markern zur Identifizierung eines breiteren Panels an Immunzellen sein.

In einer aktuellen klinischen Studie war die Mono- bzw. Kombinationstherapie von Nivolumab und Ipilimumab bei PatientInnen mit rezidivierten pädiatrischen Hirntumoren inklusive einer eigenen AT/RT-Kohorte nicht erfolgreich (Dunkel et al. 2023). Weitere klinische Studien mit Checkpointinhibitoren wie Atezolizumab (NCT05286801), Nivolumab (NCT02834013 und NCT02834013), Ipilimumab (NCT02834013) und Tiragolumab (NCT05286801) rekrutieren aktuell noch und werden uns weitere Erkenntnisse zum Einsatz dieser Substanzen bei AT/RTs und Hirntumoren liefern (Estevez-Ordonez et al. 2022). Es zeichnet sich jedoch bereits ab, dass Immuncheckpointinhibitoren mit weiteren Substanzen kombiniert werden müssen, um das komplexe Tumormikromilieu von ZNS-Tumoren aufzubrechen. Diese und viele weitere laufende Studien streben einen individualisierten Weg in der Tumorthherapie an, da die jetzigen verfügbaren Therapieoptionen mit zahlreichen Nebenwirkungen, einer Abnahme der Lebensqualität und weiterhin einer schlechten Prognose einhergehen. Die Immuntherapie bietet das Potential einer zielgerichteten Therapie mit geringerem Nebenwirkungsprofil und idealerweise sogar der Etablierung eines langfristigen Immungedächtnisses. Für die Immuntherapie ist jedoch ein grundlegendes Verständnis des Tumoraufbaus, sowie der Beschaffenheit des Tumormikromilieus und der spatiotemporalen Antigenexpression zwingend notwendig. Gerade bei AT/RT stehen wir hier noch ganz am Anfang. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen einen ersten wichtigen Beitrag zum Verständnis der Interaktion von AT/RTs mit Immunzellen dar und dienen somit als Fundament für weitere Forschungsprojekte.

## **6 Zusammenfassung**

Atypische teratoide Rhabdoidtumore sind trotz Ausschöpfen der multimodalen Therapieoptionen weiterhin mit einer schlechten Prognose belastet. Gründe hierfür liegen in den oftmals unzureichenden Resektionsmöglichkeiten, dem jungen Erkrankungsalter der PatientInnen und der Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika (Frühwald et al. 2020; Egiz et al. 2022; Richards et al. 2019). Gerade deshalb versucht man durch die aktuelle Forschung zu kindlichen Hirntumoren mit Immuntherapie ein besseres Outcome zu erreichen. Wichtige Grundlagen hierzu sind durch diese Arbeit dargestellt worden. Erstmals wurde gezeigt, dass Tumorzellen der AT/RT sowohl HLA-Klasse I und -Klasse II Antigene präsentieren. Es wurde außerdem die Expression von PD-L1 nachgewiesen. Des Weiteren konnte die Anwesenheit von Immunzellen durch den Nachweis CD 3<sup>+</sup> Zellen bewiesen werden. Insgesamt zeigte sich eine große Heterogenität innerhalb des einzelnen und unter den verschiedenen Tumoren. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Expression von MHC I und CD 3<sup>+</sup> Zellen, welche insgesamt für einen Tumor Escape Mechanismus sprechen könnte, wie er bereits bei Glioblastomen nachgewiesen wurde (Bagley et al. 2018; Marcu et al. 2021). Es sollte eine Ausweitung der hier begonnenen Forschung mit Einbeziehung der personenbezogenen Daten und Vergrößerung der untersuchten Fallzahl erfolgen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmed, Nabil; Brawley, Vita; Hegde, Meenakshi; Bielasowicz, Kevin; Kalra, Mamta; Landi, Daniel et al. (2017): HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. In: *JAMA oncology* 3 (8), S. 1094–1101. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.0184.
- Alimova, Irina; Pierce, Angela M.; Harris, Peter; Donson, Andrew; Birks, Diane K.; Prince, Eric et al. (2017): Targeting Polo-like kinase 1 in SMARCB1 deleted atypical teratoid rhabdoid tumor. In: *Oncotarget* 8 (57), S. 97290–97303. DOI: 10.18632/oncotarget.21932.
- Ansorge, Siegfried; Täger, Michael (2014): Immunologie. In: Peter C. Heinrich und Georg Löffler (Hg.): *Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch), S. 893–929.
- Athale, Uma H.; Duckworth, JoAnn; Odame, Isaac; Barr, Ronald (2009): Childhood atypical teratoid rhabdoid tumor of the central nervous system: a meta-analysis of observational studies. In: *Journal of pediatric hematology/oncology* 31 (9), S. 651–663. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181b258a9.
- Bagley, Stephen J.; Desai, Arati S.; Linette, Gerald P.; June, Carl H.; O'Rourke, Donald M. (2018): CAR T-cell therapy for glioblastoma: recent clinical advances and future challenges. In: *Neuro Oncol* 20 (11), S. 1429–1438. DOI: 10.1093/neuonc/noy032.
- Benesch, M.; Bartelheim, K.; Fleischhack, G.; Gruhn, B.; Schlegel, P. G.; Witt, O. et al. (2014): High-dose chemotherapy (HDCT) with auto-SCT in children with atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT): a report from the European Rhabdoid Registry (EU-RHAB). In: *Bone marrow transplantation* 49 (3), S. 370–375. DOI: 10.1038/bmt.2013.208.
- Bhattacharjee, Meenakshi; Hicks, John; Langford, Lauren; Dauser, Robert; Strother, Douglas; Chintagumpala, Murali et al. (1997): Central Nervous System Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors of Infancy and Childhood. In: *Ultrastructural Pathology* 21 (4), S. 369–378. DOI: 10.3109/01913129709021935.
- Biegel, J. A.; Zhou, J. Y.; Rorke, L. B.; Stenstrom, C.; Wainwright, L. M.; Fogelgren, B. (1999): Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. In: *Cancer research* 59 (1), S. 74–79.
- Biegel, Jaclyn A.; Tan, Lu; Zhang, Fan; Wainwright, Luanne; Russo, Pierre; Rorke, Lucy B. (2002): Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8 (11), S. 3461–3467.

- Boenisch, T. (1989): Färbemethoden. In: S. J. Naish (Hg.): Handbuch II immunohistochemischer Färbemethoden. 3. Aufl. Carpinteria: Dako Corporation, S. 22–27.
- Brooks, W. H.; Netsky, M. G.; Normansell, D. E.; Horwitz, D. A. (1972): Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. Characterization of a humoral immunosuppressive factor. In: *The Journal of experimental medicine* 136 (6), S. 1631–1647.
- Byrne, Elizabeth H.; Fisher, David E. (2017): Immune and molecular correlates in melanoma treated with immune checkpoint blockade. In: *Cancer* 123 (S11), S. 2143–2153. DOI: 10.1002/cncr.30444.
- Callahan, Margaret K.; Postow, Michael A.; Wolchok, Jedd D. (2014): CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. In: *Frontiers in oncology* 4, S. 385. DOI: 10.3389/fonc.2014.00385.
- Chi, Susan N.; Zimmerman, Mary Ann; Yao, Xiaopan; Cohen, Kenneth J.; Burger, Peter; Biegel, Jaclyn A. et al. (2009): Intensive multimodality treatment for children with newly diagnosed CNS atypical teratoid rhabdoid tumor. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (3), S. 385–389. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.7724.
- Cristescu, Razvan; Mogg, Robin; Ayers, Mark; Albright, Andrew; Murphy, Erin; Yearley, Jennifer et al. (2018): Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. In: *Science (New York, N.Y.)* 362 (6411). DOI: 10.1126/science.aar3593.
- Dalchau, R.; Kirkley, J.; Fabre, J. W. (1980): Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. In: *European journal of immunology* 10 (10), S. 737–744. DOI: 10.1002/eji.1830101003.
- Diaz, Roberto Jose; Ali, Sheikh; Qadir, Mehreen Gull; La Fuente, Macarena I. de; Ivan, Michael E.; Komotar, Ricardo J. (2017): The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. In: *Journal of neuro-oncology* 133 (3), S. 455–467. DOI: 10.1007/s11060-017-2477-x.
- Dioverti, M. Veronica; Razonable, Raymund R. (2016): Cytomegalovirus. In: *Microbiology spectrum* 4 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015.
- Dufour, Christelle; Beaugrand, Annick; Le Deley, Marie Cécile; Bourdeaut, Franck; André, Nicolas; Leblond, Pierre et al. (2012): Clinicopathologic prognostic factors in childhood atypical teratoid and rhabdoid tumor of the central nervous system: a multicenter study. In: *Cancer* 118 (15), S. 3812–3821. DOI: 10.1002/cncr.26684.
- Dunkel, I. J., Doz, F., Foreman, N. K., Hargrave, D., Lassaletta, A., André, N., Hansford, J. R., Hassall, T., Eyrych, M., Gururangan, S., Bartels, U., Gajjar, A., Howell, L., Warad, D., Pacius, M., Tam, R., Wang, Y., Zhu, L., & Cohen, K.

- (2023). Nivolumab with or without ipilimumab in pediatric patients with high-grade CNS malignancies: Safety, efficacy, biomarker, and pharmacokinetics-CheckMate 908. In: *Neuro-oncology*, 25(8), 1530–1545. DOI: 10.1093/neuonc/noad031
- Dunn, B. M.; Pham, C.; Raney, L.; Abayasekara, D.; Gillespie, W.; Hsu, A. (1981): Interaction of alpha-dansylated peptide inhibitors with porcine pepsin: detection of complex formation by fluorescence energy transfer and chromatography and evidence for a two-step binding scheme. In: *Biochemistry* 20 (25), S. 7206–7211.
- Egiz, Abdullah; Kannan, Siddarth; Asl, Sarvin Farajzadeh (2022): The Impact of Surgical Resection and Adjuvant Therapy on Survival in Pediatric Patients with Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor: Systematic Review and Pooled Survival Analysis. In: *World neurosurgery* 164, S. 216–227. DOI: 10.1016/j.wneu.2022.04.073.
- Elgert, Klaus D. (2009): Immunology. Understanding the immune system. 2. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Erhart, Friedrich; Buchroithner, Johanna; Reitermaier, René; Fischhuber, Katrin; Klingenbrunner, Simone; Sloma, Ido et al. (2018): Immunological analysis of phase II glioblastoma dendritic cell vaccine (Audencel) trial: immune system characteristics influence outcome and Audencel up-regulates Th1-related immunovariabiles. In: *Acta neuropathologica communications* 6 (1), S. 135. DOI: 10.1186/s40478-018-0621-2.
- Estevez-Ordonez, Dagoberto; Gary, Sam; Atchley, Travis J.; Maleknia, Pedram; George, Jordan; Laskay, Nicholas M. B. et al. (2022): Immunotherapy for Pediatric Brain and Spine Tumors, Current State and Future Directions. In: *Pediatric neurosurgery*. DOI: 10.1159/000528792.
- Facoetti, Angelica; Nano, Rosanna; Zelini, Paola; Morbini, Patrizia; Benericetti, Eugenio; Ceroni, Mauro et al. (2005): Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (23), S. 8304–8311. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2588.
- Farber, S. Harrison; Elsamadicy, Aladine A.; Atik, Ahmet Fatih; Suryadevara, Carter M.; Chongsathidkiet, Pakawat; Fecci, Peter E.; Sampson, John H. (2017): The Safety of available immunotherapy for the treatment of glioblastoma. In: *Expert opinion on drug safety* 16 (3), S. 277–287. DOI: 10.1080/14740338.2017.1273898.
- Fecci, Peter E.; Heimberger, Amy B.; Sampson, John H. (2014): Immunotherapy for primary brain tumors: no longer a matter of privilege. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (22), S. 5620–5629. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0832.
- Federico, Aniello; Thomas, Christian; Miskiewicz, Katarzyna; Woltering, Niklas; Zin, Francesca; Nemes, Karolina et al. (2022): ATRT-SHH comprises three molecular

- subgroups with characteristic clinical and histopathological features and prognostic significance. In: *Acta neuropathologica* 143 (6), S. 697–711. DOI: 10.1007/s00401-022-02424-5.
- Filley, Anna C.; Henriquez, Mario; Dey, Mahua (2018): CART Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors. In: *Frontiers in oncology* 8, S. 453. DOI: 10.3389/fonc.2018.00453.
- Frühwald, Michael C.; Biegel, Jaclyn A.; Bourdeaut, Franck; Roberts, Charles W.M.; Chi, Susan N. (2016): Atypical teratoid/rhabdoid tumors—current concepts, advances in biology, and potential future therapies. In: *Neuro Oncol* 18 (6), S. 764–778. DOI: 10.1093/neuonc/nov264.
- Frühwald, Michael C.; Hasselblatt, Martin; Nemes, Karolina; Bens, Susanne; Steinbügl, Mona; Johann, Pascal D. et al. (2020): Age and DNA methylation subgroup as potential independent risk factors for treatment stratification in children with atypical teratoid/rhabdoid tumors. In: *Neuro Oncol* 22 (7), S. 1006–1017. DOI: 10.1093/neuonc/noz244.
- Geraldo, Luiz Henrique Medeiros; Garcia, Celina; da Fonseca, Anna Carolina Carvalho; Dubois, Luiz Gustavo Feijó; Sampaio E Spohr, Tânia Cristina Leite de; Matias, Diana et al. (2019): Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. In: *Trends in cancer* 5 (1), S. 46–65. DOI: 10.1016/j.trecan.2018.11.002.
- Geyer, J. Russell; Sposto, Richard; Jennings, Mark; Boyett, James M.; Axtell, Richard A.; Breiger, David et al. (2005): Multiagent chemotherapy and deferred radiotherapy in infants with malignant brain tumors: a report from the Children's Cancer Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (30), S. 7621–7631. DOI: 10.1200/JCO.2005.09.095.
- Ghulam Muhammad, A. K. M.; Candolfi, Marianela; King, Gwendalyn D.; Yagiz, Kader; Foulad, David; Mineharu, Yohei et al. (2009): Antiglioma immunological memory in response to conditional cytotoxic/immune-stimulatory gene therapy: humoral and cellular immunity lead to tumor regression. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (19), S. 6113–6127. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1087.
- Ginn, Kevin F.; Gajjar, Amar (2012): Atypical teratoid rhabdoid tumor: current therapy and future directions. In: *Frontiers in oncology* 2, S. 114. DOI: 10.3389/fonc.2012.00114.
- Giorno, R. (1984): A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. In: *Diagnostic immunology* 2 (3), S. 161–166.
- Gnekow, A. K. (1995): Recommendations of the Brain Tumor Subcommittee for the reporting of trials. SIOP Brain Tumor Subcommittee. International Society of Pediatric Oncology. In: *Medical and pediatric oncology* 24 (2), S. 104–108. DOI: 10.1002/mpo.2950240209.

- Grossman, Stuart A.; Ye, Xiaobu; Lesser, Glenn; Sloan, Andrew; Carraway, Hetty; Desideri, Serena; Piantadosi, Steven (2011): Immunosuppression in patients with high-grade gliomas treated with radiation and temozolomide. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (16), S. 5473–5480. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-11-0774.
- Haberler, C.; Hasselblatt, M.; Huang, A.; Judkins, A. R.; Kool, M.; Wesseling, P. (2021): Atypical teratoid/rhabdoid tumour. In: International Agency for Research on Cancer (Hg.): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours. 5. Aufl.: World Health Organization, S. 221–225.
- Hartmann, Jessica; Schübler-Lenz, Martina; Bondanza, Attilio; Buchholz, Christian J. (2017): Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. In: *EMBO molecular medicine* 9 (9), S. 1183–1197. DOI: 10.15252/emmm.201607485.
- Herbst, Roy S.; Soria, Jean-Charles; Kowanzetz, Marcin; Fine, Gregg D.; Hamid, Omid; Gordon, Michael S. et al. (2014): Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. In: *Nature* 515 (7528), S. 563–567. DOI: 10.1038/nature14011.
- Herrlinger, U.; Kramm, C. M.; Johnston, K. M.; Louis, D. N.; Finkelstein, D.; Reznikoff, G. et al. (1997): Vaccination for experimental gliomas using GM-CSF-transduced glioma cells. In: *Cancer gene therapy* 4 (6), S. 345–352.
- Heyderman, E. (1979): Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. In: *Journal of clinical pathology* 32 (10), S. 971–978.
- Hilden, Joanne M.; Meerbaum, Sharon; Burger, Peter; Finlay, Jonathan; Janss, Anna; Scheithauer, Bernd W. et al. (2004): Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumor: results of therapy in children enrolled in a registry. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (14), S. 2877–2884. DOI: 10.1200/JCO.2004.07.073.
- Ho, Ben; Johann, Pascal D.; Grabovska, Yura; Dieu Andrianteranagna, Mamy Jean de; Yao, Fupan; Frühwald, Michael et al. (2020): Molecular subgrouping of atypical teratoid/rhabdoid tumors-a reinvestigation and current consensus. In: *Neuro Oncol* 22 (5), S. 613–624. DOI: 10.1093/neuonc/noz235.
- Hoff, Katja von; Hinkes, Bernward; Dannenmann-Stern, Elke; Bueren, André O. von; Warmuth-Metz, Monika; Soerensen, Niels et al. (2011): Frequency, risk-factors and survival of children with atypical teratoid rhabdoid tumors (AT/RT) of the CNS diagnosed between 1988 and 2004, and registered to the German HIT database. In: *Pediatric blood & cancer* 57 (6), S. 978–985. DOI: 10.1002/pbc.23236.
- Hwang, Kihwan; Koh, Eun Jung; Choi, Eun Jin; Kang, Tae Hee; Han, Jung Ho; Choe, Gheeyoung et al. (2018): PD-1/PD-L1 and immune-related gene expression pattern in pediatric malignant brain tumors: clinical correlation with survival data in

- Korean population. In: *Journal of neuro-oncology* 139 (2), S. 281–291. DOI: 10.1007/s11060-018-2886-5.
- Izumoto, Shuichi; Tsuboi, Akihiro; Oka, Yoshihiro; Suzuki, Tsuyoshi; Hashiba, Tetsuo; Kagawa, Naoki et al. (2008): Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. In: *Journal of neurosurgery* 108 (5), S. 963–971. DOI: 10.3171/JNS/2008/108/5/0963.
- Ji, Jianfei; Black, Keith L.; Yu, John S. (2010): Glioma stem cell research for the development of immunotherapy. In: *Neurosurgery clinics of North America* 21 (1), S. 159–166. DOI: 10.1016/j.nec.2009.08.006.
- Johann, Pascal D.; Erkek, Serap; Zapatka, Marc; Kerl, Kornelius; Buchhalter, Ivo; Hovestadt, Volker et al. (2016): Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes. In: *Cancer cell* 29 (3), S. 379–393. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.02.001.
- Kalos, Michael; Levine, Bruce L.; Porter, David L.; Katz, Sharyn; Grupp, Stephan A.; Bagg, Adam; June, Carl H. (2011): T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. In: *Science translational medicine* 3 (95), 95ra73. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- Kivisäkk, Pia; Mahad, Don J.; Callahan, Melissa K.; Trebst, Corinna; Tucky, Barbara; Wei, Tao et al. (2003): Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14), S. 8389–8394. DOI: 10.1073/pnas.1433000100.
- Kohashi, Kenichi; Oda, Yoshinao (2017): Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors. In: *Cancer science* 108 (4), S. 547–552. DOI: 10.1111/cas.13173.
- Lampson, L. A. (1995): Interpreting MHC class I expression and class I/class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings. In: *Microscopy research and technique* 32 (4), S. 267–285. DOI: 10.1002/jemt.1070320402.
- Lawrence, Michael S.; Stojanov, Petar; Polak, Paz; Kryukov, Gregory V.; Cibulskis, Kristian; Sivachenko, Andrey et al. (2013): Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. In: *Nature* 499 (7457), S. 214–218. DOI: 10.1038/nature12213.
- Leone, Patrizia; Shin, Eui-Cheol; Perosa, Federico; Vacca, Angelo; Dammacco, Franco; Racanelli, Vito (2013): MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. In: *Journal of the National Cancer Institute* 105 (16), S. 1172–1187. DOI: 10.1093/jnci/djt184.
- Leruste, Amaury; Tosello, Jimena; Ramos, Rodrigo Nalio; Tauziède-Espariat, Arnault; Brohard, Solène; Han, Zhi-Yan et al. (2019): Clonally Expanded T Cells Reveal

- Immunogenicity of Rhabdoid Tumors. In: *Cancer cell* 36 (6), 597-612.e8. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.10.008.
- Li, Jian; Li, Wenwen; Huang, Kejia; Zhang, Yang; Kupfer, Gary; Zhao, Qi (2018): Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. In: *Journal of hematology & oncology* 11 (1), S. 22. DOI: 10.1186/s13045-018-0568-6.
- Löhr, Mario; Freitag, Benjamin; Technau, Antje; Krauss, Jürgen; Monoranu, Camelia-Maria; Rachor, Johannes et al. (2018): High-grade glioma associated immunosuppression does not prevent immune responses induced by therapeutic vaccines in combination with Treg depletion. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 67 (10), S. 1545–1558. DOI: 10.1007/s00262-018-2214-0.
- Louveau, Antoine; Harris, Tajie H.; Kipnis, Jonathan (2015a): Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. In: *Trends in immunology* 36 (10), S. 569–577. DOI: 10.1016/j.it.2015.08.006.
- Louveau, Antoine; Smirnov, Igor; Keyes, Timothy J.; Eccles, Jacob D.; Rouhani, Sherin J.; Peske, J. David et al. (2015b): Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. In: *Nature* 523 (7560), S. 337–341. DOI: 10.1038/nature14432.
- Lu, Jian-Qiang; Wilson, Beverly A.; Yong, V. Wee; Pugh, Jeffrey; Mehta, Vivek (2012): Immune cell infiltrates in atypical teratoid/rhabdoid tumors. In: *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 39 (5), S. 605–612.
- Lynch, Joseph P.; Fishbein, Michael; Echavarría, Marcela (2011): Adenovirus. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 32 (4), S. 494–511. DOI: 10.1055/s-0031-1283287.
- Maddon, P. J.; Molineaux, S. M.; Maddon, D. E.; Zimmerman, K. A.; Godfrey, M.; Alt, F. W. et al. (1987): Structure and expression of the human and mouse T4 genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24), S. 9155–9159. DOI: 10.1073/pnas.84.24.9155.
- Marcu, Ana; Schlosser, Andreas; Keupp, Anne; Trautwein, Nico; Johann, Pascal; Wölfl, Matthias et al. (2021): Natural and cryptic peptides dominate the immunopeptidome of atypical teratoid rhabdoid tumors. In: *Journal for immunotherapy of cancer* 9 (10). DOI: 10.1136/jitc-2021-003404.
- Maude, Shannon L.; Laetsch, Theodore W.; Buechner, Jochen; Rives, Susana; Boyer, Michael; Bittencourt, Henrique et al. (2018): Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 378 (5), S. 439–448. DOI: 10.1056/NEJMoa1709866.

- Medawar, P. B. (1948): Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. In: *British journal of experimental pathology* 29 (1), S. 58–69.
- Medikonda, Ravi; Dunn, Gavin; Rahman, Maryam; Fecci, Peter; Lim, Michael (2021): A review of glioblastoma immunotherapy. In: *Journal of neuro-oncology* 151 (1), S. 41–53. DOI: 10.1007/s11060-020-03448-1.
- Melcher, Viktoria; Graf, Monika; Interlandi, Marta; Moreno, Natalia; Faria, Flavia W. de; Kim, Su Na et al. (2020): Macrophage-tumor cell interaction promotes ATRT progression and chemoresistance. In: *Acta neuropathologica* 139 (5), S. 913–936. DOI: 10.1007/s00401-019-02116-7.
- Moestrup, Søren K.; Møller, Holger J. (2004): CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. In: *Annals of medicine* 36 (5), S. 347–354. DOI: 10.1080/07853890410033171.
- Morgenstern, Daniel A.; Gibson, Sian; Brown, Tanya; Sebire, Neil J.; Anderson, John (2010): Clinical and pathological features of paediatric malignant rhabdoid tumours. In: *Pediatric blood & cancer* 54 (1), S. 29–34. DOI: 10.1002/pbc.22231.
- Nduom, Edjah K.; Wei, Jun; Yaghi, Nasser K.; Huang, Neal; Kong, Ling-Yuan; Gabrusiewicz, Konrad et al. (2016): PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. In: *Neuro Oncol* 18 (2), S. 195–205. DOI: 10.1093/neuonc/nov172.
- Neelapu, Sattva S.; Locke, Frederick L.; Bartlett, Nancy L.; Lekakis, Lazaros J.; Miklos, David B.; Jacobson, Caron A. et al. (2017): Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 377 (26), S. 2531–2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
- Nobusawa, Sumihito; Hirato, Junko; Sugai, Tsutomu; Okura, Naoki; Yamazaki, Tatsuya; Yamada, Seiji et al. (2016): Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor (AT/RT) Arising From Ependymoma: A Type of AT/RT Secondarily Developing From Other Primary Central Nervous System Tumors. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 75 (2), S. 167–174. DOI: 10.1093/jnen/nlv017.
- Nowalk, Andrew; Green, Michael (2016): Epstein-Barr Virus. In: *Microbiology spectrum* 4 (3). DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0011-2015.
- O'Rourke, Donald M.; Nasrallah, MacLean P.; Desai, Arati; Melenhorst, Jan J.; Mansfield, Keith; Morrissette, Jennifer J. D. et al. (2017): A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. In: *Science translational medicine* 9 (399). DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- Parato, Kelley A.; Senger, Donna; Forsyth, Peter A. J.; Bell, John C. (2005): Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (12), S. 965–976. DOI: 10.1038/nrc1750.

- Plautz, G. E.; Miller, D. W.; Barnett, G. H.; Stevens, G. H.; Maffett, S.; Kim, J. et al. (2000): T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6 (6), S. 2209–2218.
- Pule, Martin A.; Savoldo, Barbara; Myers, G. Doug; Rossig, Claudia; Russell, Heidi V.; Dotti, Gianpietro et al. (2008): Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. In: *Nature medicine* 14 (11), S. 1264–1270. DOI: 10.1038/nm.1882.
- Ransohoff, Richard M.; Engelhardt, Britta (2012): The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (9), S. 623–635. DOI: 10.1038/nri3265.
- Reck, Martin; Rodríguez-Abreu, Delvys; Robinson, Andrew G.; Hui, Rina; Csőszi, Tibor; Fülöp, Andrea et al. (2016): Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *The New England journal of medicine* 375 (19), S. 1823–1833. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774.
- Reddy, Alyssa T. (2005): Atypical teratoid/rhabdoid tumors of the central nervous system. In: *Journal of neuro-oncology* 75 (3), S. 309–313. DOI: 10.1007/s11060-005-6762-8.
- Richards, Alexandra; Ved, Ronak; Murphy, Christopher; Hennigan, Dawn; Kilday, John-Paul; Kamaly-Asl, Ian et al. (2019): Outcomes with respect to extent of surgical resection for pediatric atypical teratoid rhabdoid tumors. In: *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. DOI: 10.1007/s00381-019-04478-5.
- Richardson, Elizabeth Anne; Ho, Ben; Huang, Annie (2018): Atypical Teratoid Rhabdoid Tumour : From Tumours to Therapies. In: *Journal of Korean Neurosurgical Society* 61 (3), S. 302–311. DOI: 10.3340/jkns.2018.0061.
- Riella, L. V.; Paterson, A. M.; Sharpe, A. H.; Chandraker, A. (2012): Role of the PD-1 pathway in the immune response. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12 (10), S. 2575–2587. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x.
- Romani, Massimo; Pistillo, Maria Pia; Carosio, Roberta; Morabito, Anna; Banelli, Barbara (2018): Immune Checkpoints and Innovative Therapies in Glioblastoma. In: *Frontiers in oncology* 8, S. 464. DOI: 10.3389/fonc.2018.00464.
- Rorke, L. B.; Packer, R. J.; Biegel, J. A. (1996): Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. In: *Journal of neurosurgery* 85 (1), S. 56–65. DOI: 10.3171/jns.1996.85.1.0056.

- Russell, Stephen J.; Federspiel, Mark J.; Peng, Kah-Whye; Tong, Caili; Dingli, David; Morice, William G. et al. (2014): Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. In: *Mayo Clinic proceedings* 89 (7), S. 926–933. DOI: 10.1016/j.mayocp.2014.04.003.
- Sant, Andrea; Yewdell, Jonathan (2003): Antigen processing and recognition. In: *Current Opinion in Immunology* 15 (1), S. 66–68. DOI: 10.1016/S0952-7915(02)00020-1.
- Scheel, Andreas H.; Dietel, Manfred; Heukamp, Lukas C.; Jöhrens, Korinna; Kirchner, Thomas; Reu, Simone et al. (2016): Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 29 (10), S. 1165–1172. DOI: 10.1038/modpathol.2016.117.
- Schumacher, Ton N.; Kesmir, Can; van Buuren, Marit M. (2015): Biomarkers in cancer immunotherapy. In: *Cancer cell* 27 (1), S. 12–14. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.12.004.
- Schumacher, Ton N.; Schreiber, Robert D. (2015): Neoantigens in cancer immunotherapy. In: *Science (New York, N.Y.)* 348 (6230), S. 69–74. DOI: 10.1126/science.aaa4971.
- Sévenet, N.; Sheridan, E.; Amram, D.; Schneider, P.; Handgretinger, R.; Delattre, O. (1999): Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers. In: *American journal of human genetics* 65 (5), S. 1342–1348. DOI: 10.1086/302639.
- Spranger, Stefani; Spaapen, Robbert M.; Zha, Yuanyuan; Williams, Jason; Meng, Yuru; Ha, Thanh T.; Gajewski, Thomas F. (2013): Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. In: *Science translational medicine* 5 (200), 200ra116. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006504.
- Strother, Douglas (2005): Atypical teratoid rhabdoid tumors of childhood: diagnosis, treatment and challenges. In: *Expert review of anticancer therapy* 5 (5), S. 907–915. DOI: 10.1586/14737140.5.5.907.
- Studebaker, Adam W.; Hutzen, Brian; Pierson, Christopher R.; Shaffer, Terri A.; Raffel, Corey; Jackson, Eric M. (2015): Oncolytic measles virus efficacy in murine xenograft models of atypical teratoid rhabdoid tumors. In: *Neuro Oncol* 17 (12), S. 1568–1577. DOI: 10.1093/neuonc/nov058.
- Studebaker, Adam W.; Hutzen, Brian J.; Pierson, Christopher R.; Haworth, Kellie B.; Cripe, Timothy P.; Jackson, Eric M.; Leonard, Jeffrey R. (2017): Oncolytic Herpes Virus rRp450 Shows Efficacy in Orthotopic Xenograft Group 3/4 Medulloblastomas and Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors. In: *Molecular therapy oncolytics* 6, S. 22–30. DOI: 10.1016/j.omto.2017.05.005.

- Tegeder, Isabel; Thiel, Katharina; Erkek, Serap; Johann, Pascal D.; Berlandi, Johannes; Thatikonda, Venu et al. (2018): Functional relevance of genes predicted to be affected by epigenetic alterations in atypical teratoid/rhabdoid tumors. In: *Journal of neuro-oncology*. DOI: 10.1007/s11060-018-03018-6.
- Tekautz, Tanya M.; Fuller, Christine E.; Blaney, Susan; Fouladi, Maryam; Broniscer, Alberto; Merchant, Thomas E. et al. (2005): Atypical teratoid/rhabdoid tumors (ATRT): improved survival in children 3 years of age and older with radiation therapy and high-dose alkylator-based chemotherapy. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (7), S. 1491–1499. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.187.
- Testori, Alessandro; Richards, Jon; Whitman, Eric; Mann, G. Bruce; Lutzky, Jose; Camacho, Luis et al. (2008): Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (6), S. 955–962. DOI: 10.1200/JCO.2007.11.9941.
- Theodorakis, Panagiotis E.; Müller, Erich A.; Craster, Richard V.; Matar, Omar K. (2017): Physical insights into the blood-brain barrier translocation mechanisms. In: *Physical biology* 14 (4), S. 41001. DOI: 10.1088/1478-3975/aa708a.
- Vlková, Veronika; Štěpánek, Ivan; Hrušková, Veronika; Šenigl, Filip; Mayerová, Veronika; Šrámek, Martin et al. (2014): Epigenetic regulations in the IFN $\gamma$  signalling pathway: IFN $\gamma$ -mediated MHC class I upregulation on tumour cells is associated with DNA demethylation of antigen-presenting machinery genes. In: *Oncotarget* 5 (16), S. 6923–6935. DOI: 10.18632/oncotarget.2222.
- Wainwright, Derek A.; Balyasnikova, Irina V.; Chang, Alan L.; Ahmed, Atique U.; Moon, Kyung-Sub; Auffinger, Brenda et al. (2012): IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (22), S. 6110–6121. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2130.
- Widner, H.; Brundin, P. (1988): Immunological aspects of grafting in the mammalian central nervous system. A review and speculative synthesis. In: *Brain research* 472 (3), S. 287–324. DOI: 10.1016/0165-0173(88)90010-0.
- Winterle, Sabine; Schreiner, Bettina; Mitsdoerffer, Meike; Schneider, Dagmar; Chen, Lieping; Meyermann, Richard et al. (2003): Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. In: *Cancer research* 63 (21), S. 7462–7467.
- Yong, Carmen S. M.; Dardalhon, Valerie; Devaud, Christel; Taylor, Naomi; Darcy, Phillip K.; Kershaw, Michael H. (2017): CAR T-cell therapy of solid tumors. In: *Immunology and cell biology* 95 (4), S. 356–363. DOI: 10.1038/icb.2016.128.

# Appendix

## I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µl	Mikroliter
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
APZ	Antigen präsentierende Zelle
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATRT	atypische teratoide Rhabdoidtumore
bspw.	beispielsweise
CAR	chimeric antigen receptor (chimerischer Antigen-Rezeptor)
CAR-T	CAR-expressing T-cells (CAR-exprimierende T-Zellen)
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyt-assoziiertes Protein 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor)
et al.	et alii (= und andere)
EU-Rhab Register	europäisches Rhabdoidregister
Fc	crystalisable Fragment
Fox-P3	forkhead-box-Protein P3
GBM	Glioblastom Multiforme
GFAP	gliales fibrilläres saures (=acidic) Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HER II	human epidermal growth factor receptor 2
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hSNF5	human sucrose nonfermentable complexes 5
i. v.	intravenös
IDH 1/2	Isocitrat Dehydrogenase 1/2
IDO	indoleamin 2,3 deoxygenase
IFN γ	Interferon γ
IHC	immunhistochemische Färbung
INI-1	Integrase Interactor 1
l	Liter

LAB-Methode	Labeled avidin biotin Methode
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PD-1	Programmed death 1 receptor (Programmierter Zelltod 1 Rezeptor)
PD-L1	Programmed death 1 ligand (Programmierter Zelltod 1 Ligand)
PNET	primitive neuroektodermale Tumore
PRDM 16	PR Domäne 16 (Protein codierendes Gen)
PTEN	Phosphatase and Tensin homology Gene
RNA	Ribonukleinsäure
SMARCB1- Gen	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SWI/SNF	switch/sucrose nonfermentable complexes
TAA	Tumor associated antigens (Tumor assoziierte Antigene)
TBS	Tris-Buffered Saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
Trd- <sup>3</sup> h	tritiumhaltiges Thymidin
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TRS	Target Retrieval Solution
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## **II. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Tumorgewebe mit angefärbten CD 3 exprimierenden Zellen	S. 24
Abb. 2: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der CD 3 exprimierenden Zellen	S. 25
Abb. 3: Tumorgewebe mit angefärbten HLA-Klasse I exprimierenden Zellen	S. 26
Abb. 4: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der HLA-Klasse I exprim. Zellen	S. 27
Abb. 5: Tumorgewebe mit angefärbten HLA-Klasse II exprimierenden Zellen	S. 28
Abb. 6: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der HLA-Klasse II exprim. Zellen	S. 29
Abb. 7: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der HLA-Klassen I und II	S. 30
Abb. 8: Tumorgewebe mit angefärbten PD-L1 exprimierenden Zellen	S. 31
Abb. 9: Boxplot-Diagramm zur Verteilung PD-L1 exprimierender Zellen	S. 32
Abb. 10: Kreisdiagramm zur Score-Einteilung nach PD-L1 exprim. Zellen	S. 33
Abb. 11: Balkendiagramm der prozentualen Mittelwerte exprimierter Antigene	S. 35
Abb. 12: Regressionsgerade nach Pearson HLA-Klasse I und CD 3	S. 37
Abb. 13: Regressionsgerade nach Pearson HLA-Klasse I und PD-L1	S. 38

## **III. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zuordnung der Tumore zum Score nach PD-L1 exprim. Zellen	S. 33
Tabelle 2: Lineare Regressionsanalyse nach Pearson	S. 36

## **IV. Digitaler Anhang**

Bilder der Gewebeschnitte

Tabellarische Auswertung der Bilder

(Vermerk: Auf Grund der Beschaffenheit und Größe des Anhangs, ist dieser Teil nur auf dem USB-Stick vorhanden.)

## **V. Danksagungen**

Ich möchte mich ganz besonders bei Prof. Dr. med. Matthias Eyrich für die hervorragende Betreuung meiner Promotionsarbeit bedanken. Danke, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest, mir stets mit Rat und Tat zur Seite standest und mich auch in Durststrecken motiviert hast, die Arbeit zu vollenden.

Mein weiterer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. med. Camelia Monoranu und ihrem Team Frau Herud, Frau Hartmann und Frau Schraut. Ihr habt mir das Färben und Arbeiten vor allem mit den Gewebeschnitten beigebracht, so dass ich am Ende in der Lage war, mir mein eigenes kleines immunhistochemisches Labor einzurichten. Danke für eure Geduld und dass ich euch, egal mit welchen Kleinigkeiten, immer wieder ansprechen konnte. Danke Camelia, dass du dir so viel Zeit genommen hast, jedes Mal wieder die Verdünnungen und neu gefärbten Gewebeschnitte durchzugehen, mit mir die fertigen Gewebeschnitte begutachtet hast und mir dein Laborequipment zur Verfügung gestellt hast.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und Roland danken. Für die Liebe, die ihr mir entgegenbringt und die Unterstützung, die ihr in meinem Leben seid. Danke für alles.

## VI. Eigene Veröffentlichungen

Publikation der Daten inklusive Coautorenschaft in der Publikation:

Marcu, A., Schlosser, A., Keupp, A., Trautwein, N., Johann, P., Wölfl, M., **Lager, J.**, Monoranu, C. M., Walz, J. S., Henkel, L. M., Krauß, J., Ebinger, M., Schuhmann, M., Thomale, U. W., Pietsch, T., Klinker, E., Schlegel, P. G., Oyen, F., Reisner, Y., Rammensee, H. G., Eyrich, M. (2021). Natural and cryptic peptides dominate the immunopeptidome of atypical teratoid rhabdoid tumors. In: *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(10), e003404. DOI: 10.1136/jitc-2021-003404