

Zentrum für Neuropathologie der Universität München und dem  
Kinderkrebsforschungszentrum der Universitätsklinik Eppendorf in  
Hamburg

Vorstand/Direktor:

Prof. Dr. Jochen Herms

Die Rolle des WNT- und SHH-Signalweges in der Pathogenese  
intraokulärer Medulloepitheliome

## **Dissertation**

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

Vorgelegt von

Julia Andrea Krevet

Geborene Dietlmeier

Aus

Bogen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med Ulrich Schüller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Elisabeth Messmer Prof. Dr. Rainer Glaß

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med Julia Neumann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2021

Für meine Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Intraokuläre Medulloepitheliom.....	1
1.2 Systematik der Entität und Stand der Forschung.....	2
1.3 Das Auge.....	4
1.3.1 Anatomie.....	4
1.3.2 Ziliarkörper.....	9
1.3.3 Auge und die Augenentwicklung bei der Maus.....	11
1.4 WNT-Signalweg.....	11
1.5 Sonic Hedgehog Signalweg.....	13
1.6 Retinoblastom.....	14
1.7 Medulloblastom.....	14
2 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	16
3 Methodik.....	17
3.1 Experimentelle Methoden.....	17
3.1.1 Humane Proben.....	17
3.1.2 Murine Experimente.....	21
3.1.3 Allgemeine und spezielle immunhistochemische Färbungen.....	26
3.1.4 Genutzte Microarrays.....	31
3.1.5 Zellkultur.....	32
3.2 Statistische Methoden.....	35
3.2.1 Verwendete Programme und Methoden der Genexpressionsdatenanalyse.....	35
3.3 Grafiken.....	39
4 Ergebnisse.....	40
4.1 Histologie der humanen Proben.....	40

4.2	Ergebnisse der Genexpressionsdatenanalyse .....	43
4.2.1	Ergebnisse der Nanostringanalyse .....	43
4.2.2	Ergebnisse der fusionierten Daten.....	48
4.3	Ergebnisse aus den murinen Experimenten .....	52
4.3.1	Ergebnisse des SOX2 Mappings und Augenentwicklung bei Mäusen .....	52
4.3.2	Ergebnisse der induzierten Mäuse .....	54
4.3.3	Getrennte Aktivierung des SHH- und WNT-Signalweges.....	64
4.3.4	Vergleich der Genexpression des Mausmodells und der humanen Proben.....	65
4.4	Ergebnisse der primären Zellkultur .....	68
4.4.1	Deskriptive Ergebnisse .....	68
4.4.2	Quantitative Ergebnisse.....	68
5	Diskussion und Ausblick.....	71
5.1	Das Projekt .....	71
5.2	Auswirkungen auf den aktuellen Forschungsstand .....	72
6	Zusammenfassung .....	75
	Literaturverzeichnis .....	VII
	Anhang .....	XIV
	Curriculum Vitae .....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
	Danksagung .....	XIX
	Eidesstattliche Versicherung .....	XX

## Abkürzungsverzeichnis

BL6	Black 6
CRX	Cones and Rods
CT	Computertomografie
DEPC	Diethylcarbonat
E	Embryonaler Tag
ES	Enrichment Score
ETMR	Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten
GROUP4MB	Gruppe 4 Medulloblastom
GSEA	Gene set enrichment analysis
HE	Hämatoxillin/Eosin
HOX	Homeobox
IOMEPL	Intraokuläres Medulloepitheliom
LBD	Ligand binding domain
MRT	Magnetresonanztomografie
NES	Normalized Enrichment Score
P	Postnataler Tag
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCA	Principal component analysis
PCR	Polymerase chain reaction
RB	Retinoblastom
RB1	Retinoblastoma 1 Gen
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPM	Revolutions per minute
SFM	Serum free Medium
SHH	Sonic Hedhehog
SHHMB	SHH Medulloblastom
SOX2	Sex determining region Y

Vs

Versus

WNT

W von Wg für Wingless, NT von dem Int Gen

WNTMB

WNT Medulloblastom

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Retina.....	5
Abbildung 2: Ursprung der verschiedenen Gewebe im Auge.....	7
Abbildung 3: Anatomie des Ziliarkörpers.....	10
Abbildung 4: Darstellung des WNT-Signalwegs.....	12
Abbildung 5: Schema des SHH-Signalweges .....	13
Abbildung 6: Molekulare Subgruppen der Medulloblastome .....	15
Abbildung 7: Humane IOMEPL .....	18
Abbildung 8: Schema der Hybridisierung .....	20
Abbildung 9: Anzahl der jeweiligen Entitäten in der Nanostringanalyse.....	20
Abbildung 10: Bereits publizierte humane Proben, die in der vorliegenden Arbeit verwendet werden .....	20
Abbildung 11: Verwendete Genotypen der Versuchstiere.....	21
Abbildung 12: Verpaarungsschema des Cre-loxP Systems.....	23
Abbildung 13: Schema der transgenen Mäuse mit dem Genotyp Sox2creERT2:Ctnnb1(ex2)SmoM2 <sup>Fl/+</sup> .....	23
Abbildung 14 Strukturformel des lipophilen Tamoxifens .....	24
Abbildung 15: Verwendete Primerpaare.....	26
Abbildung 16: Verwendete Antikörper .....	28
Abbildung 17: Zellzyklus mit entsprechenden Markern .....	29
Abbildung 18: Genutzte Genchips und Plattformen. ....	31
Abbildung 19 Präparation der Zellkultur .....	35
Abbildung 20: Prinzip einer Geneset Enrichment Analyse .....	36
Abbildung 21: Berechnung des Normalized Enrichment Score (NES).....	37
Abbildung 22 Histologie humaner IOMEPL .....	41
Abbildung 23: Immunhistochemische Darstellung humaner IOMEPL.....	42
Abbildung 24: Clustering der Nanostringanalyse. ....	43
Abbildung 25: Vergleich der IOMEPL und der ETMR .....	45

Abbildung 26: Ereignisse der GSEA des WNT-Signalweges. ....	46
Abbildung 27: Ergebnisse der GSEA des SHH-Signalweges. ....	47
Abbildung 28: Graphische Darstellung der GSEA.....	48
Abbildung 29 Ergebnis der Clusteranalyse des fusionierten Datensets.....	49
Abbildung 30: Ergebnisse der GSEA .....	51
Abbildung 31: Netzwerke der GSEA der IOMEPL vs. Retinoblastome .....	51
Abbildung 32: Größenentwicklung der Augen in der Maus. ....	52
Abbildung 33: Sox2 Immunostaining .....	53
Abbildung 34: Überlebenskurven der induzierten Tiere des Genotyps Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2 <sup>Fl/+</sup> ) .....	54
Abbildung 35: HE-Färbung induzierter Tiere. ....	56
Abbildung 36: HE-Färbung induzierter Tiere. ....	57
Abbildung 37: Dicke der einzelnen Retinaschichten und Längenentwicklung der Retina .....	58
Abbildung 38: CRX-Färbung der verschiedenen Induktionszeitpunkte .....	60
Abbildung 39: Immunhistochemische Färbungen .....	61
Abbildung 40: Zellumsatz in den induzierten Tieren.....	62
Abbildung 41: Immunhistologischer Vergleich humaner und murinen Proben.....	63
Abbildung 42: Histologie bei einer getrennten Aktivierung des SHH und WNT Signalweges. ....	64
Abbildung 43 Ergebnisse der Clusteranalyse der murinen Proben.....	66
Abbildung 44: Ergebnis der PCA.....	67
Abbildung 45: Deskriptive Ergebnisse der unterschiedlichen Sphären in der primären Zellkultur .....	68
Abbildung 46: Quantitative Auswertung der Zellkultur.....	69
Abbildung 47: Prozentualer Anteil der verschiedenen Sphären an den einzelnen Entnahmezeitpunkten.....	70
Abbildung 49: Zerebrale Histologie einer Maus an P12 .....	XIV
Abbildung 48 Histologie der unterschiedlichen Induktionszeitpunkte.....	XV
Abbildung 50: Zerebrale Histologie einer an E12.5 mit Tamoxifen induzierten Maus	XVI

Abbildung 51: Ausgewählte Organsysteme eines an P4 induzierten und P12 präparierten Tieres.....	XVII
Abbildung 52: Zellsignalwege der Nanostringanalyse .....	XVIII

# 1 Einleitung

## 1.1 Das intraokuläre Medulloepitheliom

Das intraokuläre Medulloepitheliom ist eine seltene pädiatrische Tumorentität, das meist in der ersten Lebensdekade diagnostiziert wird (1). Hierbei handelt es sich um eine, in der Mehrzahl der Fälle maligne, Neoplasie des Auges. Trotz der geringen Inzidenz von 1: 450 000 – 1 000 000 stellt es den zweithäufigsten, primär intraokulären Tumor bei Kindern, nach dem Retinoblastom, dar (2). Bisher sind keine Risikofaktoren bekannt, so treten auch keine ethnischen oder geografischen Häufungen auf. Jungen und Mädchen sind in etwa gleich häufig betroffen. Die Neoplasie kann, wie auch das Retinoblastom, sowohl unilateral als auch bilateral entstehen. Die bisherigen Therapieoptionen beschränken sich auf eine Resektion bei kleineren Läsionen und eine Enukleation bei größeren Tumoren. Aufgrund fehlender molekularer Erkenntnisse und einer insgesamt geringen Fallzahl fehlt es an zielgerichteten Strategien. Die Prognose ist insgesamt zwar gut, jedoch kann es zu Metastasen und letalen Verläufen kommen. Eine standardisierte Therapie existiert ebenfalls bei metastasierten Verläufen nicht. In dokumentierten Fällen besteht das Vorgehen aus einer Enukleation, neoadjuvanter Chemotherapie sowie der Resektion extraokulärer Tumoranteile (3)(4)(5).

Klinisch manifestiert sich der Tumor mit einem Visusverlust, einer Leukokorie und, je nach Größe, ausgeprägten Schmerzen. Additiv kann es zu weiteren Symptomen, wie einer Linsensubluxation, einem Glaukom, Katarakt oder Strabismus kommen. Klinisch ist hierbei nicht sicher von einem Retinoblastom zu unterscheiden (6).

Die Diagnosestellung erfolgt primär histologisch mithilfe einer Feinnadelaspiration. Jedoch kann beispielsweise auch eine Sonografie Hinweise auf zystische Veränderungen sowie Verkalkungen geben. In der CT stellt sich der Tumor als unregelmäßige, kontrastmittelaufnehmende Masse dar. In der MRT-Untersuchung ist das IOMEPL als hyperintenses Areal in der T1 und als hypointenses Areal in der T2 Wichtung zu sehen. Eine MRT-Untersuchung ist vor allem bei sehr kleinen Tumoren induziert (2).

Makroskopisch stellt sich das IOMEPL als grau-gelbliche Tumormasse mit einer unregelmäßigen Oberfläche dar. Im fortgeschrittenen Stadium kann der Tumor den kompletten intraokulären Bereich füllen (7).

## 1.2 Systematik der Entität und Stand der Forschung

Die Erstbeschreibung des Tumors als Adenokarzinom erfolgte 1892 durch Badal und Lagrange (8). Weitere dokumentierte Fälle stammen aus dem Jahr 1899 von Schlipp et al. und 1900 von Emanuel et al. (9). Diese ordneten das Medulloepitheliom in die Gruppe der Gliome ein. 1904 entwickelte sich die Bezeichnung „Teratoneuroma“, die von Verhoeff gewählt wurde, um die Histologie besser zu beschreiben (10). Fuchs unterteilte die Tumoren des Ziliarkörpers in eine Gruppe der pädiatrischen Neoplasien, die er Diktyoma nannte, sowie in adulte Tumore, die malignen Epitheliome. Diese Klassifizierung bestand bis 1931, als Grinker beide Gruppen als Medulloepitheliom zusammenfasste (11). Damit bezog sich Grinker auf die morphologische Ähnlichkeit des intraokulären Tumors zu zerebralen Neuralrohrtumoren, die bereits von Bailey und Cushing beschrieben wurde (12).

Der Tumor ist häufig im Bereich des Ziliarkörpers lokalisiert. Es sind jedoch auch andere Lokalisationen beschrieben, wie der Nervus Opticus oder die Retina selbst (3)(6). Histologisch imponieren mehrschichtige Rosetten, tubuläre, trabekuläre oder papilläre Strukturen sowie pseudostratifizierte, neuroepitheliale Zellen (13). Er ähnelt damit insgesamt dem Neuralrohr beziehungsweise der primitiven Retina. Besonders spezifisch ist die Zystenbildung des Tumors (3).

Das intraokuläre Medulloepitheliom kann unterteilt werden in eine teratoide Form und in eine nicht teratoide, undifferenzierte Form. Die teratoide Form enthält verschieden differenzierte Gewebe, wie beispielsweise kartilaginäre Strukturen. Die undifferenzierte Form ähnelt dem medullären Neuroepithel, woher sich auch der Name Medulloepitheliom ergibt. In dieser Form sind die charakteristischen Homer Wright Rosetten zu finden. Zudem lassen sich die Tumoren noch in eine benigne sowie maligne Form unterteilen (12). Diese Einteilung wurde jedoch erst kürzlich von Verdiijk infrage gestellt. Er hält eine Einteilung in drei Ausprägungsgrade entscheidender für das Outcome der Patienten (14). Intraokuläre Medulloepitheliome sind in der aktuellen WHO-Klassifikation als eigene Entität innerhalb der Gruppe der embryonalen Tumore definiert (15).

Histologisch ähneln IOMEPL den embryonalen Tumoren mit mehrschichtigen Rosetten (ETMR), die im Gehirn oder im Rückenmark zu finden sind. Diese Tumoren stellen eine weitere seltene Tumorentität des Kleinkindes dar und wurden bis zur WHO-Klassifikation 2016 als ETANTR (Embryonal tumour with abundant neuropil and true rosettes) bezeichnet und wurden der heterogenen Gruppe der ZNS PNET (primitive neuroectodermal tumor) zugeordnet. Die Neoplasie tritt vor allem bei Mädchen unter 2 Jahren auf. Diese liegt supratentoriell und präsentiert sich klinisch durch Hirndruckzeichen, Hemiparesen,

Kleinhirnausfälle sowie weitere neurologische Ausfälle. Die Zellen der ETMR sind undifferenziert und bilden mehrschichtige Rosetten sowie Areale mit reichlich Neuropil (16).

Lange wurde angenommen, dass es sich bei den ETMR und den IOMEPL um dieselbe Tumorentität in verschiedenen Lokalisationen handelt. Hierzu passt die Positivität für LIN28A, die typisch für beide Entitäten ist. Diese hohe Spezifität ermöglicht zudem den klinischen Einsatz von LIN28A als Marker für ETMR (17).

LIN28A ist ein Protein, das im let7 Signalweg eine entscheidende Rolle spielt. Es blockiert die let-7 mikro-RNA in murinen Stammzellen und verhindert so deren Differenzierung. LIN28A kann außerdem zusammen mit anderen Faktoren pluripotente Vorläuferzellen aus Fibroblasten induzieren (18).

Untersuchungen der Methylierungsmuster der IOMEPL und ETMR ergaben, dass es sich dennoch um zwei distinkte Entitäten handelt. Es zeigte sich zudem bei den ETMR eine Amplifikation im C19MC Locus, während diese bei den IOMEPL nicht nachzuweisen war (19). Bei den ETMR wurde eine starke Aktivierung der WNT- und SHH-Signalwege nachgewiesen. Zudem konnte durch murine Experimente gezeigt werden, dass eine simultane Aktivierung des WNT- und SHH-Signalweges in neuronalen Vorläuferzellen zu einer Entstehung von ETMR geführt hat (20).

Über die Pathogenese sowie die molekularen Eigenschaften der IOMEPL ist insgesamt bisher wenig bekannt. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit konnte in 6 von 19 Fällen Mutationen im *DICER1-Gen* auf Chromosom 14, Genort q32,13 detektieren. IOMEPL mit *DICER1* Mutation zeigten zudem ein anderes Methylierungsmuster als jene ohne nachgewiesene Mutation. Im Gegensatz hierzu wurde in ETMR lediglich in einem der 19 untersuchten Fälle eine Mutation des *DICER1* Gens gefunden (21). Eine weitere, in 5 von 19 IOMEPL nachgewiesene Mutation, liegt im *KMT2D* (= *MLL2*) Gen.

Zudem wurden noch diverse weitere Mutationen gefunden, hierunter in den Genen *ERCA2*, *BRCA1*, *NOTCH2*, *CHD1* und *GSE1*. Diese traten jedoch jeweils nur bei einzelnen Tumoren auf (21).

Eine durchgeführte micro-RNA-Analyse verglich das Expressionsprofil von IOMEPL mit Normalgewebe aus dem Ziliarkörper und stellte deutliche Unterschiede fest. So waren MiR-18a, MiR-217 und MiR216a im Vergleich zur Kontrollgruppe in den IOMEPL deutlich erhöht. Dieselben micro-RNAs sind bereits in mehreren anderen Tumorentitäten nachgewiesen worden und scheinen eine zentrale Rolle in der Tumorgenese zu spielen. Diese sind jedoch nicht spezifisch in den IOMEPL erhöht. Darüber hinaus waren drei micro-RNAs (MiR-146a, MiR-509-3p, MiR-211) herunterreguliert (3).

Mithilfe einer semiquantitativen Analyse immunhistochemischer Färbungen wurde eine Anreicherung des Proteins *EZH2* in IOMEPL verglichen mit Kontrollproben des Ziliarkörpers und der Retina, nachgewiesen. Je undifferenzierter hierbei das histologische Erscheinungsbild des Tumorgewebes, desto stärker war die Expression von *EZH2*. Somit verhält es sich bezüglich dieses Proteins ähnlich wie das Retinoblastom. Auch bei diesem Tumor weisen die stark differenzierten Tumoren eine eher schwache *EZH2-Expression* auf (22). *EZH2* wurde bereits in diversen Entitäten als erhöht nachgewiesen (23) (24).

## 1.3 Das Auge

### 1.3.1 Anatomie

Das Wirbeltierauge besteht aus einer Hülle und einem Innenraum mit Glaskörper und Linse. Hierbei gibt es eine vordere und eine hintere Augenkammer, die jeweils mit Kammerwasser gefüllt sind. Der Bulbus oculi wird von drei Schichten gebildet: der Tunica externa, media und interna (25).

Die äußerste Haut des Augapfels, die Tunica externa beziehungsweise die Tunica fibrosa bulbi, gliedert sich wiederum in zwei Anteile. Zum einen die Kornea, die lichtdurchlässig ist. Diese geht in die weiße, lichtundurchlässige Sklera über, die den Ansatz der Augenmuskulatur bildet.

Die mittlere Schicht, auch Tunica media oder Uvea genannt, gliedert sich in die Choroidea, also die Aderhaut, die die umliegenden Strukturen mit Blut versorgt, den Ziliarkörper und die Iris mit der Pupille (26).

Der innere Anteil des Bulbus wird von der Netzhaut (Retina) gebildet. Dabei ist zu beachten, dass die äußerste, distale Schicht der Retina der dem Licht abgewandten Seite entspricht. Somit besteht ein inverser Aufbau. Die Retina ist beim Menschen an ihrer dünnsten Stelle, der Fovea ca. 0,150 – 0,200 mm dick. An ihrer dicksten Stelle außerhalb der Fovea misst die Dicke ungefähr 0,320 mm (27). Sie besteht aus circa 120 Millionen Stäbchen und Zapfen (27) (siehe Abbildung 1).

Die Netzhaut unterteilt sich in die pars optica retinae und die pars ciliaris retinae, was dem Ziliarepithel entspricht, die an der ora serrata ineinander übergehen, oder in das Pigmentepithel und die neurale Retina ein. Letztere besteht aus 9 Zellschichten. Von außen nach innen gibt es hierbei die Fotorezeptorschicht, mit einem Außen- und Innensegment, die äußere Grenzmembran, die äußere Körnerzellschicht, die äußere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht, die innere plexiforme Schicht, die

Ganglienzellschicht, die Nervenfaserschicht sowie die innere Grenzmembran. Diese Schichten werden auch als stratum nervosum retinae zusammengefasst (28).

Neben dieser rein morphologischen Unterteilung kann die Retina nach ihrer Funktion differenziert werden. Diese bildet die erste Komponente der visuellen Signalverarbeitung und enthält mehrere Umschaltstationen. Eine Unterscheidung erfolgt zwischen dem ersten retinalen Neuron in der Fotorezeptorschicht, dem zweiten retinalen Neuron in der Ganglienzellschicht sowie dem dritten Neuron im Nervus opticus (29).

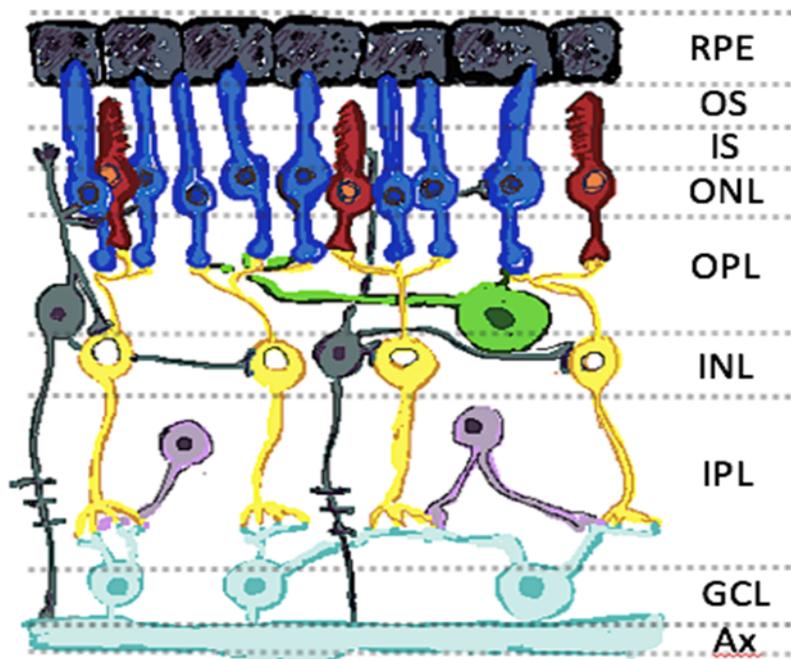


Abbildung 1: Aufbau der Retina

Dunkelgrau= Zellen des Pigmentepithels; Blau = Stäbchen, Rot = Zapfen; Gelb = Bipolarzellen; Türkis = Ganglienzellen; Grün= Horizontalzellen; Grau= Müllerzellen; Lila = Amakrine Zellen; **RPE** = Retinales Pigment Epithel; **OS**= Outer segment (Außensegment der Photorezeptoren); **IS** = Inner segment (Inneres Segment der Photorezeptoren); **ONL** = Outer nuclear layer (Äußere Körnerzellschicht); **OPL** = Outer plexiform layer (Äußere plexiforme Schicht); **INL** = Inner nuclear layer (innere Körnerzellschicht); **IPL** = Inner plexiform layer (Innere, plexiforme Schicht); **GCL** = Ganglienzellschicht (Ganglienzellschicht); **Ax** = Axone (Nervenfaserschicht) (Quelle: Eigene Abbildung)

In der Netzhaut sind ungefähr 50 verschiedene Zelltypen enthalten, die in fünf Subgruppen unterteilt werden. Hierzu zählen die Fotorezeptoren, die Horizontalzellen, die Ganglienzellen, die Müller-Zellen und die amakrinen Zellen, die zusammen eine funktionelle Einheit bilden. Eine Übersicht ist zuvor dargestellten **Abbildung 1** zu entnehmen.

Die Fotorezeptoren werden unterteilt in Stäbchen und Zapfen. Hierbei liegen die lichtempfindlichen Fortsätze im Stratum neuroepitheliale der Retina. Die Somata liegen im Stratum nucleare, in **Abbildung 1** als ONL bezeichnet. Die Neurone sind über Synapsen mit den Bipolarzellen verknüpft. Diese haben ihre Zellkerne in der inneren Körnerzellschicht. Je nachdem, welcher Photorezeptor mit der Bipolarzelle interagiert, wird unterschieden zwischen Zapfenbipolarzellen sowie Stäbchenbipolarzellen. Des Weiteren wird dieser Zelltyp in On-Zellen, die bei einer Aktivierung zu einer Depolarisation führen, sowie Off-Zellen, die bei Aktivierung hyperpolarisieren, unterschieden.

Die dritte große Gruppe der Zellen innerhalb der Retina bilden die Ganglienzellen. Diese sind zudem der einzige Zelltyp der Netzhaut, der Aktionspotenziale ausbildet.

Die Zellen der Pigmentepithelschicht produzieren Melanin und sind zudem für die Regeneration der Retina notwendig (30).

### **1.3.1.1 Entwicklung des Auges**

Bei den IOMEPL handelt es sich um einen kongenitalen Tumor des Auges. Daher ist das Verständnis der Entwicklungsvorgänge im Auge von entscheidender Bedeutung.

Zum Zeitpunkt der Augenentwicklung besteht der Embryo bereits aus drei Keimblättern: dem Ektoderm, dem Mesoderm und dem Endoderm (31).

Das menschliche Auge entsteht aus verschiedenen Anteilen: dem Oberflächenektoderm, aus welchem sich die äußere Kornealschicht entwickelt, dem Mesoderm des Kopfes, also der späteren Aderhaut sowie der inneren Kornealschicht, und dem Neuroektoderm des Vorderhirns, aus welchem die Retina gebildet wird (siehe **Abbildung 2**).

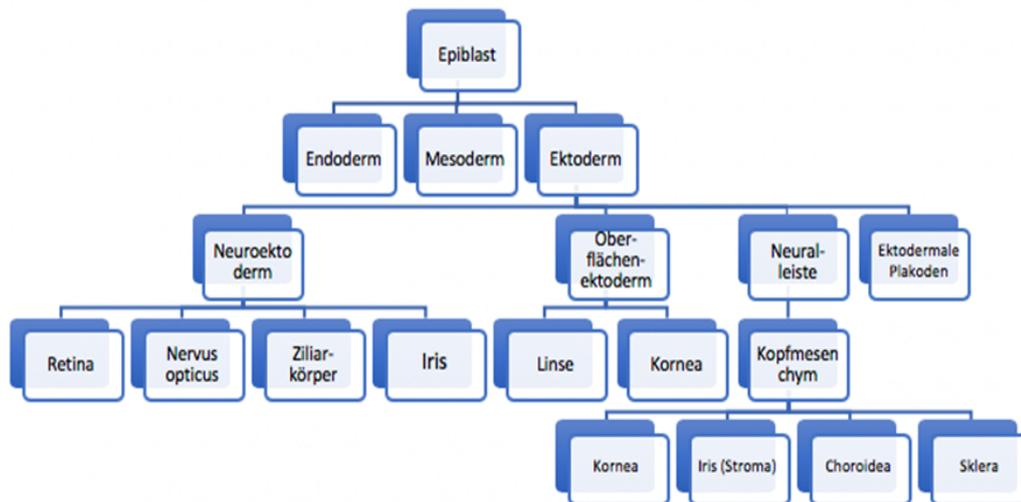


Abbildung 2: Ursprung der verschiedenen Gewebe im Auge (Quelle: Eigene Abbildung)

Die Augenanlage ist beim Menschen ab Tag 22 pc in Form eines verdickten Abschnitts der Medullarplatte der vorderen Abschnitte zu erkennen. Diese befinden sich im Bereich des späteren Zwischenhirns und bilden den Sulcus opticus aus. Diese paarigen Anlagen sind über den Torus opticus verbunden, der später zum Chiasma wird. An Tag 24 pc verschließt sich der rostrale Neuroporus, was zu einer Trennung sowie einer Lateralverschiebung der Augenanlagen führt. Das weitere Auswachsen des Neuroepithels führt zur Bildung des Augenbläschens gegen Ende der 4. Woche pc. Dies sind Ausstülpungen des ersten Gehirnbälchens, auch Proencephalon genannt. Das Lumen der Augenbläschen wird hierbei Sehventrikel genannt und geht kontinuierlich in das Dieenzephalon über (32).

Über diesen Augenbläschen befindet sich eine Schicht aus Oberflächenektoderm, das durch Induktion zur Linsenplakode wird. Durch Einstülpung entsteht aus dem Augenbläschen der Augenbecher und aus der Linsenplakode das Linsenbläschen. Durch diese Einstülpung kommt es außerdem zum Einschluss der Arteria hyaloidea. Der Augenbecher besteht aus zwei Anteilen. Die äußere Schicht entspricht dem prospektiven, retinalen Pigmentepithel, die innere Schicht der neuronalen Retina mit den verschiedenen differenzierten Zelltypen. Der Vorläufer des Ziliarkörpers entspricht hierbei der Umschlagsfalte zwischen der äußeren und der inneren Schicht des Augenbechers und enthält somit sowohl pigmentierte als auch nicht-pigmentierte Anteile (33).

### 1.3.1.2 Molekulare Mechanismen während der Augenentwicklung

An der Entstehung des Auges sind diverse Signalwege beteiligt. Von besonderer Bedeutung sind die sogenannten *Hox* Gene. Diese spielen eine herausragende Rolle in der Entwicklung der Säugetiere, da sie für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren codieren, die für die Zelldifferenzierung und Proliferation wichtig sind. Zu dieser Gengruppe gehören unter anderem die *Rax*-Gene, die die Differenzierung der retinalen Vorläuferzellen steuern. Ein charakteristischer Bestandteil der *Hox*-Gene ist hierbei die Homöobox. Diese besteht zumeist aus 40 bis 80 Aminosäuren und enthält eine DNS-Bindedomäne (34).

*Pax6* und *Pax2* gehören zu den am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren im Auge. So wurde unter anderem in Fliegen nachgewiesen, dass in Abwesenheit von *Pax6* die Augenentwicklung bereits in frühen Stadien stoppt. Hierzu sind keine anderen Mutationen notwendig, weshalb *Pax6* im Auge auch Master-Regulator-Gen genannt wird. Während sich in *Drosophila* und in homozygoten *Pax6*-Knock-out-Tieren kein Auge entwickelt, besteht in Menschen und heterozygoten *Pax6*-Knock-out-Tieren eine Mikrophthalmie (35).

Parallel dazu kommt es zu Missbildungen im Nervus opticus bei einer Fehlexpression von *Pax2*. Die Bedeutung beider Transkriptionsfaktoren für die Augenentwicklung wurde mehrfach bei Mäusen mit *PAX2*<sup>-/-</sup> sowie *PAX6*<sup>-/-</sup> beobachtet (36).

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Augenentwicklung ist der Sonic-Hedgehog-Signalweg. Dieser ist elementar für die Ausbildung einer Trennung der Augenfelder. Wird er gehemmt, kommt es zu einer Zyklopie. Zudem ist er an der Regulation der *PAX*-Gene beteiligt. Hierbei hemmt er die Expression von *PAX6* im Augenbecher und steigert die Expression von *PAX2*. Somit spielt dieser Signalweg eine elementare Rolle in der Differenzierung der Augenbildung und der Achsenausbildung (37). Ein Gegenspieler des SHH-Signalweges ist außerdem *Bmp4*. Hierbei führt ein SHH zur Ausbildung der ventralen Bereiche des Augenbechers, *Bmp4* zur Entwicklung der dorsalen Bereiche.

Weitere beteiligte Transkriptionsfaktoren sind der Fibroblastenwachstumsfaktor 8, *Six3* und *Rx1*(38).

## 1.3.2 Ziliarkörper

### 1.3.2.1 Anatomie und Funktion

Das IOMEPL ist häufig am Ziliarkörper lokalisiert, daher sind der genaue Aufbau und die Histologie wichtig zum Verständnis der Pathogenese.

Der Ziliarkörper, auch Corpus ciliare genannt, gehört zur Tunica media bulbi und damit zusammen mit der Iris und der Choroidea zum mittleren Abschnitt der Aderhaut. Er besteht aus zwei Anteilen. Zum einen dem Musculus ciliaris, der ringförmig verläuft und einem zweischichtigen Epithel, das dem Muskel aufliegt.

Zum anderen bildet der Ziliarkörper den Übergang zwischen der Retina (Pars ciliaris retinae) und dem Pigmentepithel (Pars caeca retinae) und somit die Grenze zwischen dem pigmentierten und unpigmentierten Epithel (39).

Eine weitere Einteilung erfolgt in pars plana und pars plicata (siehe Abbildung 3). Ersterer bezeichnet den hinteren Abschnitt des Ziliarkörpers, der in der Ora serrata in die Choroidea übergeht. Dieser Teil ist stark pigmentiert und ohne Ausläufer. Der pars plicata bildet den Übergang zur hinteren Iris und beinhaltet die großen und kleinen Ausläufer, die die Ultrafiltration des Ziliarkörpers ermöglichen. Zwischen dem Ziliarkörper und der Choroidea liegt die „Ciliary marginal zone“. Hier befinden sich die für die Entwicklung und die Regeneration des Auges essenziellen retinalen Stammzellen.

Der ebenfalls im Stroma des Ziliarkörpers enthaltene Musculus ciliaris ist ein wesentlicher Bestandteil der Akkomodation. Die Linse ist hierbei über Zonulafasern mit dem Ziliarmuskel verbunden. Aufgrund seiner ringförmigen Anordnung kommt es bei der Kontraktion des Muskels zu einem Erschlaffen der Zonulafasern, die infolgedessen weniger Zug auf die Linse ausüben können. Diese wird konvexer, was der Nahakkomodation dient, da sich hierbei die Brechkraft der Linse erhöht. Andersherum kommt es bei der Relaxation des Musculus ciliaris zu einem stärkeren Zug auf die Zonulafasern und daraufhin zu einer abgeflachten Linse, also zur Fernakkomodation durch verringerte Brechkraft (40).

Neben der Akkomodation ist der Ziliarkörper auch ein wesentlicher Bestandteil der intraokulären Druckregulation. Er ist sowohl für die Bildung als auch für die Drainage des Kammerwassers zuständig. Ersteres erfolgt durch die Filtration aus einem Netz aus Kapillaren und den unpigmentierten Zellen des Epithels. Der Abfluss der filtrierten Flüssigkeit in das venöse System läuft über ein Trabekelwerk und dem Schlemm'schen Kanal, auch Plexus venosus sclerae genannt, der sich im skleralen Teil des Iridokornealwinkels (Kammerwinkel) befindet. Bei Dysregulation kann es zu einem Glaukom kommen, also

einer übermäßigen intraokulären Drucksteigerung, die zu Sehstörungen, Schmerzen oder im schlimmsten Fall zu Erblindung führen kann (40).

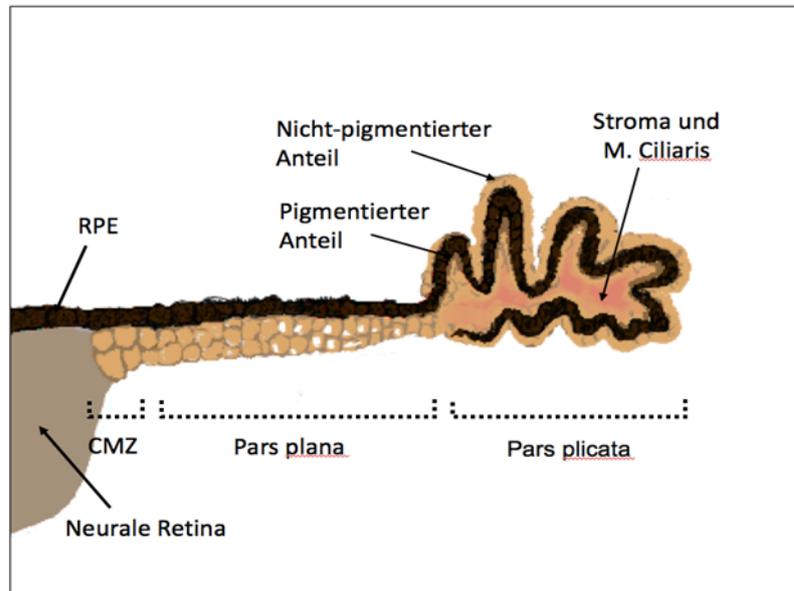


Abbildung 3: Anatomie des Ziliarkörpers

Schema des Ziliarkörpers:

RPE = Retinal pigmented epithelium; CMZ = Ciliary marginal zone (Quelle: Eigene Abbildung)

### 1.3.2.2 Entwicklung des Ziliarkörpers

Die Entwicklung des Ziliarkörpers beginnt beim Menschen in der 9. Woche pc und geht von den distalen Bereichen des Augenbeckers aus. Die Induktion erfolgt durch die Neuroretina. Der Corpus ciliare entsteht aus zwei Anteilen: dem Mesektoderm und dem Neuroektoderm. Aus Ersterem bilden sich das Stroma sowie der Musculus ciliare, der sich bereits in der 11. bis 12. Schwangerschaftswoche vom umliegenden Mesenchym abgrenzen lässt. Das Neuroektoderm ist der Ursprung des zweischichtigen Ziliarepithels und seiner Fortsätze. Die Ziliarfortsätze, die das spätere Kapillarnetz ausbilden, entstehen durch die Faltenbildung im Ziliarepithel selbst. Die Kammerwasserproduktion beginnt circa im vierten Schwangerschaftsmonat.

Wichtig für die Ausbildung des Ziliarkörpers sind außerdem auch die intraokulären Druckverhältnisse (41).

### 1.3.3 Auge und die Augenentwicklung bei der Maus

Da es sich sowohl bei der Maus als auch beim Menschen um Wirbeltiere handelt, ist die grundsätzliche Anatomie des Auges gleich. Die Maus zählt zu den dämmerungs- und nachtaktiven Tieren, daher unterscheidet sich das Verhältnis von Stäbchen und Zapfen. In der Retina tagaktiver Wirbeltiere dominieren die Zapfen, die ein Farbsehen ermöglichen, während bei dämmerungsaktiven Tieren die Anzahl der Stäbchen, die vor allem Hell-dunkel-Kontraste erkennen, überwiegt. Ansonsten ist der Aufbau der Retina mit ihren neun Schichten und dem Pigmentepithel gleich. Ebenso verhält es sich mit dem Ziliarkörper und den restlichen Augenkompartimenten.

Die normale Tragzeit bei Mäusen beträgt ungefähr 21 Tage. Die Augenentwicklung beginnt circa an Tag E8.5 mit der Ausbildung des Augenbechers. Die Differenzierung der einzelnen Schichten der Retina erfolgt erst ab Tag E14.5 (42). Zuvor können lediglich eine äußere neuroblastische Schicht und eine innere neuroblastische Schicht mit unreifen Zellen unterschieden werden.

Die Genese des Auges verläuft parallel zu der des menschlichen Auges, daher stellt die Maus ein geeignetes Versuchstier für die Erforschung intraokulärer Vorgänge während der Entwicklung dar (43).

## 1.4 WNT-Signalweg

In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem die Rolle des WNT-Signalweges in der Pathogenese der IOMEPL dargestellt. Daher folgt ein Überblick über die Signalkaskade (siehe **Abbildung 4**).

Das WNT-Gen wurde 1982 von Nusse und Varmus entdeckt. Der Signalweg selbst ist nach dem Hauptliganden, WNT, benannt. „W“ steht hierbei für „wingless“, also flügellos, da die ersten Versuche einer Wg-Mutation bei *Drosophila* eine fehlende Flügelanlage zur Folge hatten (44).

Die beteiligten Proteine spielen bei diversen Vorgängen in der Entwicklung eine zentrale Rolle. So zum Beispiel bei der Ausbildung der Körperachsen, Organanlagen oder Segmentpolarität (45). In adulten, ausgereiften Zellen ist er zumeist inaktiv. Eine Ausnahme hierbei bilden Organe, in welchen ubiquitär Stammzellen enthalten sind, beispielsweise das Colon. Darüber hinaus ist eine Aktivierung des WNT-Signalweges bereits für diverse Tumoren beschrieben worden.

Die Wirkung des WNT-Signalweges beruht auf der gesteigerten Transkription verschiedener Gene durch die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors beta-Catenin. In Zellen mit

inaktiviertem WNT-Signal liegt dieses beta-Catenin in einem Komplex vor und wird somit ständig abgebaut. Hieran beteiligt sind APC, AXIN-1, AXIN-2, casein kinase 1 alpha, PP2A und GSK-3 beta.

Bei Aktivierung, wenn also WNT an einen „frizzled“ und den Co-Rezeptor „LRP“ bindet, wird das Protein „DVL“ aktiviert, das den Komplex inhibiert. Dadurch wird das beta-Catenin nicht mehr abgebaut und kann in den Zellkern gelangen, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert (45).

In Tumoren mit überaktiviertem WNT-Signalweg ist dieser meist von dem Liganden WNT unabhängig und daher dauerhaft aktiviert (46).

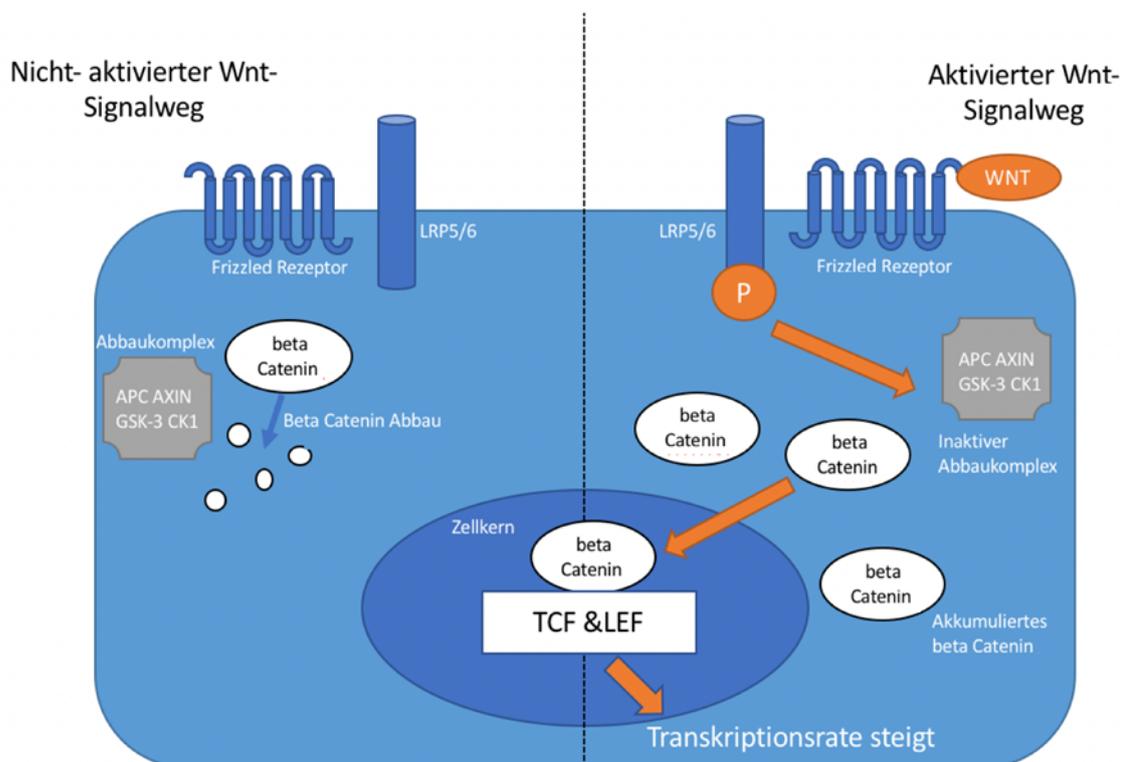


Abbildung 4: Darstellung des WNT-Signalwegs

Bei fehlender Aktivierung kommt es zum Abbau des beta-Catenins. Bei Aktivierung kommt es zu einer Inaktivierung des Abbaukomplexes. Dadurch akkumuliert beta-Catenin und fungiert als Transkriptionsfaktor. (Quelle: Eigene Abbildung)

## 1.5 Sonic Hedgehog Signalweg

Da der SHH-Signalweg in ETMR ebenfalls erhöht ist, wird im Folgenden seine Rolle in der Pathogenese der IOMEPL dargestellt (siehe **Abbildung 5**).

Der Name der Kaskade beziehungsweise seines Hauptliganden „SHH“, leitet sich von dem Computerspiel „Sonic the Hedgehog“ ab, in dem ein Igel den Hauptcharakter darstellt. In Loss-of-function Versuchen bei Fruchtfliegen wurden stachelähnliche Auswüchse beobachtet, die an einen Igel erinnern. Daher wurde der Ligand danach benannt (47).

Der SHH-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung in der Embryogenese. Eine seiner Hauptaufgaben ist die Ausbildung der Polarität im ZNS und auch anderer Kompartimente (48). Er reguliert außerdem die Differenzierung der Neuralrohrzellen. Infolgedessen führt eine Inhibition zu einer ausbleibenden Spezialisierung und Differenzierung verschiedener Neuronen und anderer Zellen. Der transmembrane Rezeptor PTC1 (= Patched 1) verhindert in Abwesenheit seines Liganden Hh die Aktivierung der Signaltransduktion durch das Protein Smo (= Smoothend). Bindet Hedgehog den PTC-Rezeptor, kommt es zu einer Aktivierung des Signalwegs. Die Transkriptionsfaktoren Gli-1, Gli-2 und Gli-3 können nun in den Zellkern einwandern und eine Expression diverser Proteine bewirken (49).

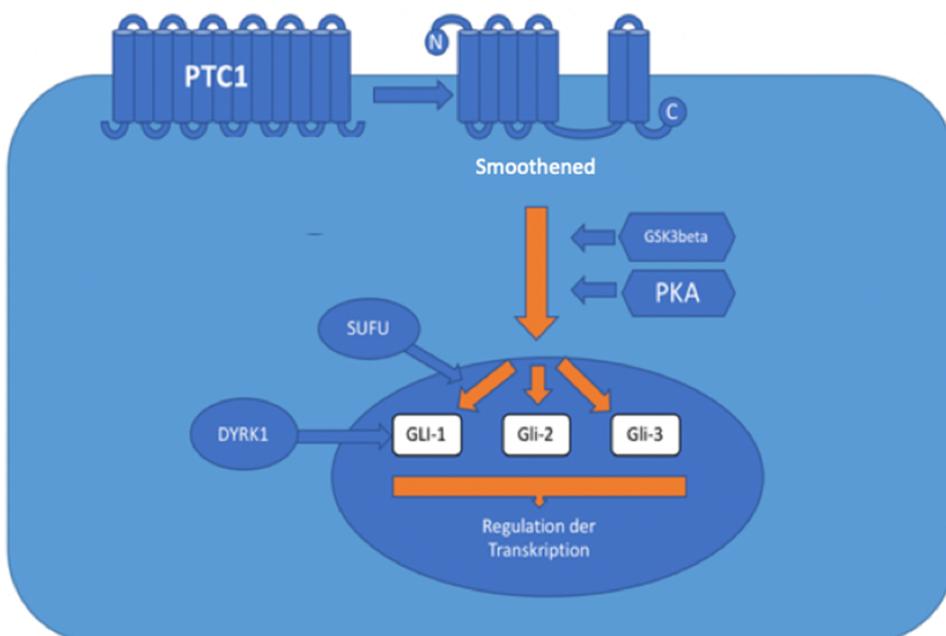


Abbildung 5: Schema des SHH-Signalweges

In Abwesenheit von Hedgehog inhibiert PTC 1 den Rezeptor Smo. In Anwesenheit von Hedgehog wird Smo und damit der SHH-Signalweg aktiviert. Gli1, Gli2 und Gli3 fungieren als Transkriptionsfaktor. (Quelle: Eigene Abbildung)

## 1.6 Retinoblastom

Da das Retinoblastom eine wichtige Differenzialdiagnose zum IOMEPL darstellt, wird im Folgenden darauf eingegangen. Mit einer weltweiten Inzidenz von 1:14 000 bis 1:20 000 stellt es die häufigste, primär intraokuläre Neoplasie im Kindesalter dar (50). Der Tumor wächst entweder endophytisch in den Glaskörper oder exophytisch in den Subretinalraum ein. Die Ursache der Entstehung liegt in einer Mutation im *RB1* Gen, dem ersten analysierten Tumorsuppressorgen. Hierbei kommt es zu einem Funktionsverlust des Retinoblastomgens auf dem Chromosom 13. Dabei tritt die Neoplasie in 60 % der Fälle unilateral, in 40 % der Fälle bilateral auf (51). Erstere Erscheinungsform, die meist sporadisch entsteht, tritt im Median der Diagnosestellung 8 Monate später auf als die bilaterale Form (52). Die hereditäre Form ist autosomal dominant vererbt und besitzt eine Penetranz von circa 90 % (51).

Histologisch besteht die Neoplasie aus zytoplasmaarmen, sarkomähnlichen Tumorzellen, die wie beim IOMEPL rosettenartig differenziert sein können. Ebenso können differenzierte Formationen von undifferenzierten Formen unterschieden werden. Diese Unterteilung hat jedoch keine Bedeutung für die Prognose. Durch das schnelle Tumorstadium kommt es auch hier zu Nekrosebildungen und Verkalkungen. Insgesamt lassen sich die Tumore, abgesehen von ihrer bevorzugten Lokalisation, rein histologisch schwer von den IOMEPL unterscheiden. Ebenso fehlen bisher spezielle immunhistochemische Marker. Das Retinoblastom kann mittels Mutationsanalyse des *RB1*-Gens diagnostiziert werden (53).

## 1.7 Medulloblastom

Das Medulloblastom wird für diese Arbeit als Vergleichsgruppe verwendet. Die hochmaligne, embryonale Neoplasie stellt die häufigste Form infantiler Hirntumore dar (54)(19). Er besteht aus undifferenzierten, neuroektodermalen Zellen und liegt infratentoriell. Der Tumor ist sehr zell dicht und besitzt eine hohe Kern-/Plasma-Relation. Die mitotische Aktivität ist ebenfalls stark erhöht. Typisch für die Morphologie sind neuroblastische Rosetten, wie diese auch bei IOMEPL, ETMR und Retinoblastomen zu finden ist (55). Seit der WHO-Klassifikation 2016 werden vier molekulare Subgruppen unterschieden: SHH-Medulloblastome, WNT-Medulloblastome, Gruppe 3- und Gruppe 4-Medulloblastome. Letzteren beiden Gruppen kann keiner der beiden Signalwege eindeutig zugeordnet werden. Diese zeigen stattdessen eine erhöhte Expression von *MYC* sowie *OTX2*, welches auch in WNT-Medulloblastomen exprimiert wird, und kommen nur sehr selten in Erwachsenen vor (siehe **Abbildung 6**). Die SHH-Medulloblastome werden zudem noch

in p53- Wildtyp und p53- Mutation unterschieden. Die beste Prognose haben die WNT-Medulloblastome (56).

	WNT	SHH	GROUP 3	GROUP 4
<b>Metastasen</b>	Selten	Selten	Häufig	Sehr häufig
<b>Genetik</b>	Ctnnb1 Mutation	PTCH1/SMO/ SUFU Mutation GLI2 Amplifikation, MYCN Amplifikation	MYC Amplifikation	CDK6 Amplifikation MYCN Amplifikation
<b>Prognose</b>	Sehr gut	Mittel bis gut	Schlecht	Mittel
<b>Altersgruppe</b>	Kinder und Erwachsene	Kleinkinder bis Erwachsene	Kleinkinder und Kinder	Vor allem Kinder

Abbildung 6: Molekulare Subgruppen der Medulloblastome

Molekulare Subgruppen der Medulloblastome, die in der vorliegenden Arbeit als Kontrollgruppen verwendet wurden.

## 2 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Die genaue Herkunft der IOMEPL ist bisher nicht abschließend geklärt. Trotz der Ähnlichkeit zu ETMR handelt es sich um eine eigene Tumorentität. Daher können die Ergebnisse aus der Forschung zu den ETMR nur teilweise auf die IOMEPL übertragen werden. Aufgrund fehlender Erkenntnisse der Pathogenese gibt es bisher keine zielgerichteten Therapien. Den Patienten bleibt meist nur die Möglichkeit einer Resektion oder einer Enukleation. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Ursprungszellen von IOMEPL und die Pathogenese dieser Tumoren weiter aufzuklären. Des Weiteren sollen zukünftig die derzeitigen Behandlungsoptionen um zielgerichtete Strategien erweitert werden.

Diese Arbeit unterteilt sich in zwei Hauptthematiken sowie eine Reihe von Nebenaspekten.

Der erste Teil des Projektes beschäftigt sich mit der Frage, welche Signalwege in den humanen IOMEPL aktiviert beziehungsweise deaktiviert sind. Die Hypothese hierbei ist, dass es, wie in den ETMR, zu einer Überaktivierung der SHH- und WNT-Signalwege kommt. Um diese Annahme zu überprüfen, wird eine Nanostringanalyse der IOMEPL, der ETMR sowie mehrerer Unterarten der Medulloblastome durchgeführt. Durch den Vergleich mit anderen Tumorentitäten können die Signalwege herausgefiltert werden, die speziell in den IOMEPL hochreguliert sind. Zudem soll die Genexpression von ETMR und IOMEPL miteinander verglichen werden. Diese Erkenntnisse sind einerseits wichtig für das theoretische Verständnis der Pathogenese, zum anderen bieten diese Möglichkeiten der Testung einer zielgerichteten Therapie im klinischen Umfeld.

Im zweiten Teil wird ein Mausmodell für IOMEPL entwickelt. Dies soll ebenfalls einer späteren Therapietestung dienen. In dem hier verwendeten Genotyp (*Sox2cre-ERT2:Ctnnb1(ex3)<sup>Fl/+</sup>SmoM2<sup>Fl/+</sup>*) kommt es in den transgenen Mäusen zu einer Überaktivierung des WNT- und SHH-Signalwegs. Die Hauptfrage ist, ob sich durch die simultane Aktivierung der beiden genannten Signalwege reproduzierbar in der Maus Augentumore induzieren lassen und diese den humanen IOMEPL histologisch und molekular ähneln.

Zudem wird eine Isolierung retinaler Stammzellen zur Anlage einer primären Zellkultur durchgeführt. Dies soll Ausgangspunkt für eine spätere *in vitro* Therapietestung sein. Hierbei steht zunächst die Etablierung dieser Methodik im Vordergrund.

## 3 Methodik

### 3.1 Experimentelle Methoden

#### 3.1.1 Humane Proben

##### 3.1.1.1 Auswahl der Gruppen für die Nanostringanalyse

Für die molekularen Analysen der IOMEPLs wurden acht verschiedene Proben von Prof. Dr. Andrey Korshunov (Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe. Das Patientenkollektiv ist in **Abbildung 7** dargestellt. Bei den Tumoren wurde nicht zwischen teratoid und nicht-teratoid unterschieden. Das Alter der Betroffenen schwankte zwischen 9 Monaten und 9 Jahren mit einem mittleren Diagnosealter von 4,9 Jahren. Sieben der acht Proben wurden als maligne klassifiziert, nur eine als benigne. Jeweils vier der Patienten waren männlich, der Rest weiblich. Dieses Patientenkollektiv wurde bereits von Sahm et al. 2016 in der Veröffentlichung „*Somatic mutations of DICER1 and KMT2D are frequent in intraocular medulloepitheliomas.*“ verwendet (57).

Zudem wurden drei ETMR sowie Medulloblastome mit verschiedenen molekularen Profilen in die Analyse mit eingeschlossen. Die Proben umfassen 5 WNT-Medulloblastome, 4 SHH-Medulloblastome sowie vier Tumore aus der molekularen Subgruppe 4.

Nummer	Alter	Geschlecht	Gradingung	Mutierte Gene	Gain-of-Function Mutationen	Loss-of-Function Mutationen
1	6y	F	ML	KMT2D, CCND1, GSE1GNAS, ARI D1B, PTCH1	1q,8,12p,13q	1p,4,16,19
2	1y	F	ML	CDH1, KIT	2,6p,7,8,20	6q
3	9y	M	ML	KMT2D, ATM, D2HGDH, MSH2, FGFR1, KDR	2,3,7,8,14q,17,18,20	1p,4,14q
4	5y	M	ML	KMT2D, NOTCH2, CDH1, KIT, KDR	1q,8	1p,4,6,9,10,13q,14q,16,17,19,21q
5	2y	M	BN	KMT2D	1q,2,3,8,11,12,16,17,20	1p,4
6	7y	M	ML	BRCA1, MSH6, CDK6	2,5p,8,20	1p,4,9,12,13q,15q,16,18,19q,22q
7	9m	F	ML	KMT2D, BRCA2	1q,2,7,8,12,13q,14q,15q,21q,	1p,3,4,5,6,9,10,11,16,18
8	9y	F	ML	Dicer1, TP53, CDKN2B	3q	7q,10q,17p,18,19q

Abbildung 7: Humane IOMEPL

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte humane IOMEPL, die vorliegenden genetischen und klinischen Informationen wurden bereits in der Arbeit von Sahn et al. 2016 publiziert (57).

### 3.1.1.2 Prinzip der Nanostringanalyse

Die Nanostringmethode wurde speziell für die Tumorforschung entwickelt und stellt eine Alternative zur klassischen Microarrayanalyse dar. Mit verschiedenen Panels, die bis zu 800 Gene umfassen, können einzelne oder mehrere Signalwege betrachtet werden. Diese Panels können hierbei individuell zusammengestellt oder aus einer bestehenden Auswahl verwendet werden. Das Prinzip fundiert auf der Messung von mRNA.

Zunächst erfolgt eine Extraktion der RNA aus paraffiniertem Gewebe. Hierzu muss zunächst das Paraffin entfernt werden. Das Gewebe wird in 1ml Xylen gegeben und

durchmischt, bis die Probe durchsichtig ist. Danach kann die Probe für 5 Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand wird danach abpipettiert. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis kein Paraffin mehr enthalten ist. Danach wird das Pellet in 1 ml 100 % Ethanol gegeben und erneut für 3 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol kann als Überstand abpipettiert werden. Dieser Vorgang wird wiederholt und das Pellet anschließend für 20 Minuten bei 37° C getrocknet.

Zu dem Pellet werden danach 400 µl DNA Lysis Buffer T und 20 µl Proteinase K gegeben und in Suspension gebracht. Diese wird bei 50 ° C für 30 Minuten inkubiert und anschließend in einen Thermomixer bei 95° C gegeben. Anschließend werden 200 µl DNA Binding Buffer zugegeben und 30-mal auf- und abpipettiert. Es folgen zwei Waschschrte mit DNA Wash Buffer, danach wird das Gefäß für 2 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert und vollständig getrocknet.

Die Nanostring Untersuchung selbst besteht aus drei Einzelschritten. Zunächst findet eine Hybridisierung statt (siehe **Abbildung 8**). Das Gewebe wird in eine Lösung gegeben, die Farbcodierungen für die einzelnen mRNA enthält. Diese binden an die gesuchte mRNA und geben je nach Sequenz ein Signal ab. Der zweite Schritt beinhaltet die Aufreinigung und die Immobilisierung der Lösung sowie der enthaltenen Bestandteile. Danach werden die Proben beziehungsweise deren Farbcodes, im nCounter Catridge ausgezählt. Hierbei wurde die Anzahl an Transkripten für jedes Gen des Panels mithilfe eines Excel-Makros analysiert. Das Ergebnis ist eine Liste der verschiedenen mRNA und den jeweiligen Counts, also der Anzahl des jeweiligen Farbcodes, pro Probe. Je mehr Counts es gibt, desto höher ist das Protein in dem untersuchten Material exprimiert (58).

Für die folgenden Analysen wird das Pan Cancer Pathway Panel verwendet. Dieses enthält 770 Gene mit 13 Tumor-assoziierten Signalwegen. Hierunter Zellzyklusgene, Apoptosegene, der RAS-, MAPK-, STAT-, P13K-, WNT- und SHH-Signalweg. Zudem auch Gene zur Regulation von Chromatin und TGF beta (59). Dies ermöglicht einen umfassenden Blick über die molekularen Vorgänge in den IOMEPL. Die genaue Auflistung findet sich im Anhang.

Die mithilfe dieser Methode analysierten Proben sind in **Abbildung 9** dargestellt.

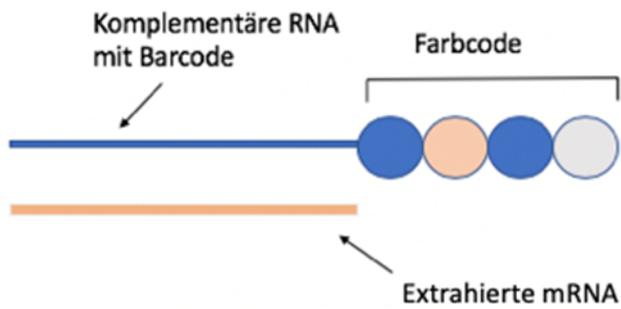


Abbildung 8: Schema der Hybridisierung

Hautfarben = mRNA, Blau = komplementäres RNA Stück mit Barcode. Diese Farbcodes können in einem zweiten Schritt gezählt werden. (Quelle: Eigene Abbildung)

Entität	ETMR	MB4	SHHMB	WNTMB	IOMEPL
Anzahl	3	4	5	4	8

Abbildung 9: Anzahl der jeweiligen Entitäten in der Nanostringanalyse

### 3.1.1.3 Analyse bereits publizierter Daten

Zur Verfügung standen 69 humane Proben. In **Abbildung 10** werden die Proben gezeigt, die bereits publiziert wurden.

Entität	ATRT	ETMR	MB3	MB4	RB	SHHMB	WNTMB	Uveales Melanom
Anzahl	5	7	6	1	15	4	2	4

Abbildung 10: Bereits publizierte humane Proben, die in der vorliegenden Arbeit verwendet werden (Quelle: Accession Numbers: GSE59983, GSE73038, GSE27831)

### 3.1.2 Murine Experimente

#### 3.1.2.1 Allgemeines

Insgesamt wurden für die histologischen Untersuchungen 64 Tiere präpariert. Alle Tiere wurden nach geltenden Tötungsrichtlinien von Versuchstieren mittels zervikaler Dislokation getötet. Die genaue Einteilung der unterschiedlichen Genotypen ist anhand der **Abbildung 11 dargestellt**. Hinzu kommen die bereits eingebetteten Gewebe. Diese werden in der Arbeit entsprechend gekennzeichnet.

Genotyp	BL6	Sox2cre-ERT: Ctnnb1(ex3) SmoM2 <sup>F1/+</sup>	Ctnnb1(ex3):SmoM2 <sup>F1/+</sup>	Sox2cre-ERT2 <sup>F1/F1</sup>	Ctnnb1(ex3) <sup>F1/F1</sup>	Smo/YFP <sup>F1/+</sup>
Anzahl	10	22	14	7	7	3

Abbildung 11: Verwendete Genotypen der Versuchstiere

Die Tiere mit den Genotypen BL6, Ctnnb1(ex3)<sup>F1/+</sup>SmoM2<sup>F1/+</sup>, Sox2cre:ERT2, Ctnnb1(ex3)<sup>F1/+</sup> werden hierbei als Kontrolltiere verwendet.

#### 3.1.2.2 Cre-lox-P-System

Der genaue Entstehungszeitpunkt der IOMEPL ist bisher unbekannt. Aus diesem Grund ist ein Mausmodell nötig, das ermöglicht, den Einfluss der Signalwege während verschiedener Entwicklungsphasen zu betrachten. Das Cre-loxP-System erlaubt eine gezielte Regulation verschiedener Signalwege durch alternatives Splicen.

Die Signalwege, die uns im Besonderen interessieren, sind der SHH- und der WNT-Signalweg. Zum einen, da diese Signalwege an der Pathogenese der ETMR beteiligt sind, zum anderen, weil auch in den humanen Proben eine deutliche Überregulation nachgewiesen werden konnte, wie an späterer Stelle gezeigt wird.

Cre (vom englischen „Cyclization recombination“) ist eine Rekombinase, die ein gezieltes Entfernen einzelner DNA-Sequenzen im lebenden Organismus ermöglicht. Hierzu werden gezielt loxP-Stellen vor und hinter den zu entfernenden Abschnitt gesetzt. Diesen Vorgang wird als floxen bezeichnet. Somit bleiben Gewebe, in welchen Cre nicht aktiviert wird, unverändert (60).

Ein potenzieller Nachteil der Cre-Rekombinase bei der Erforschung von Tumoren besteht darin, dass die meisten Promotoren früh in der Embryonalentwicklung aktiv sind

und es daher zu einer baldigen Exzision der Genabschnitte kommt. Im folgenden Projekt sollen hingegen verschiedene Zeitpunkte betrachtet werden, kommt hierbei eine modifizierte Cre-Rekombinase zum Einsatz. Die Rekombinase creERT2 bietet den Vorteil der Induzierbarkeit (59). Cre bildet hierbei ein Fusionsprotein mit einem mutierten humanen Östrogenrezeptor und ist im Zytoplasma lokalisiert. Erst durch eine Injektion von Tamoxifen kommt es zu einer Translokation in den Zellkern und somit zu einer Aktivierung der Rekombinase. Dies ist wichtig, um nachzuvollziehen, an welchen Zeitpunkten der Entwicklung das Auge sensibel für die Entstehung eines IOMEPL ist.

### 3.1.2.3 Mausmodell

Es wird angenommen, dass es sich beim IOMEPL um einen kongenitalen Tumor handelt, weshalb die WNT- und SHH-Signalwege früh embryonal innerhalb des Auges aktivieren werden sollen. Bei den verwendeten transgenen Tieren handelte es sich um die Linie *Sox2-creERT2::Ctnnb1(ex3)<sup>F/+</sup> SmoM2<sup>F/+</sup>*. Hierbei wurden Tiere der Stämme *Sox2-creERT2* und *Ctnnb1(ex3)<sup>F/FI</sup> SmoM2<sup>F/FI</sup>* miteinander verpaart (siehe **Abbildung 12**).

Der Promotor, unter dessen Einfluss die Cre-Rekombinase steht, ist in der genutzten Linie der Sox2-Promotor. Dieses Protein findet sich vor allem in den Stammzellen und in noch entwickelnden Zellen. Da ein kongenitaler Beginn der Pathogenese der IOMEPL angenommen wird, wird somit sichergestellt, dass ein Großteil der Zellen im embryonalen Auge getroffen wird. Die Signalwege selbst werden hier über zwei verschiedene Mechanismen aktiviert (siehe **Abbildung 13**). Die Überregulation des WNT-Signalweges beruht hierbei auf der Entfernung des Exon 3 im Beta Catenin 1 Gen. Dieses 88kDA große Protein ist eine Downstream-Komponente des kanonischen WNT-Signalweges (61). In diesem Mausmodell entsteht ein stabilisiertes beta-Catenin 1, das nicht mit Ubiquitin abgebaut wird. Dieses akkumuliert im Kern und fungiert als Cotranskriptionsfaktor der TCF/LEF Familie. Die Aktivierung des SHH-Signalwegs wird durch eine Überexpression des SmoM2-Proteins erreicht. Das Protein enthält die Punktmutation W538L. Diese führt durch die Gegenwart von Cre zur Entfernung einer rLoxP-flankierten PolyA-Sequenz, die zuvor als Stopcodon fungiert. Das Entfernen des Stopcodons führt zu einer Expression des mutierten Smoothed, das von PTC unabhängig ist. Somit wird der Signalweg konstitutiv aktiviert.

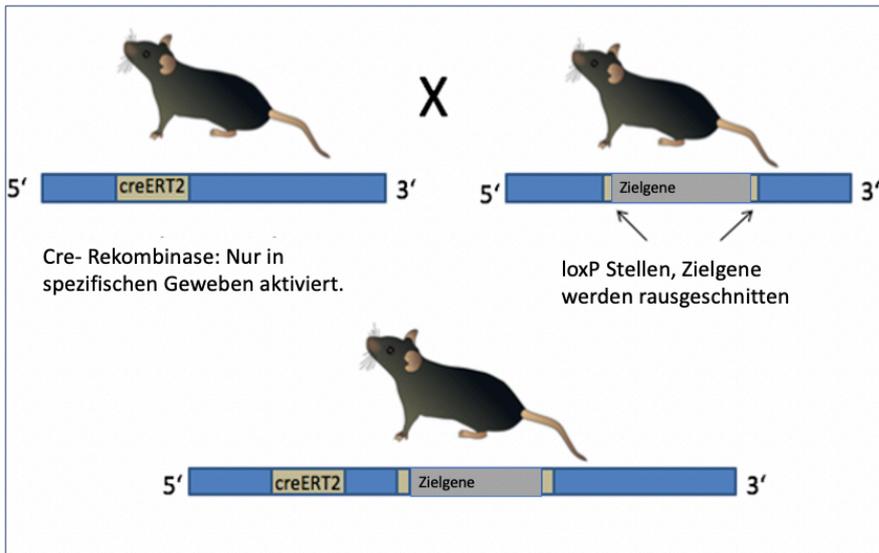


Abbildung 12: Verpaarungsschema des Cre-loxP Systems

Oben: 1. Generation der Versuchstiere. Hierbei wird eine transgene Maus mit einer Cre-Rekombinase in ihrer DNA mit einer Maus mit einem oder mehreren geflochtenen Genen verpaart. Unten: Die 2. Generation enthält somit sowohl die Cre-Rekombinase als auch die Allele mit den geflochtenen Genen. (Quelle: Eigene Abbildung)

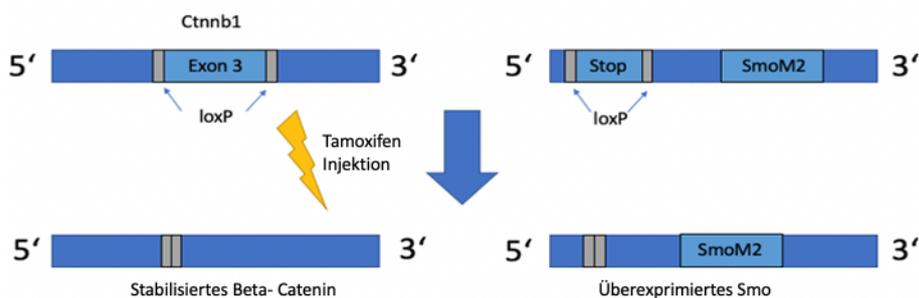


Abbildung 13: Schema der transgenen Mäuse mit dem Genotyp *Sox2cre-ERT2:Ctnnb1(ex2)SmoM2<sup>F1/+</sup>*

Durch die Injektion von Tamoxifen schneidet die Cre-Rekombinase entlang der loxP-Seiten und fügt die DNA anschließend wieder zusammen. Der WNT-Signalweg wird somit durch Entfernung des Exons 3 aktiviert. Hierdurch entsteht stabilisiertes beta-catenin. Der SHH-Signalweg wird durch das Entfernen eines Stopcodons vor dem Gen des SHH-Rezeptors Smo überaktiviert. (Quelle: Eigene Abbildung)

### 3.1.2.4 Tamoxifen

Tamoxifen ist ein Östrogenrezeptormodulator, der unter anderem als Arzneistoff zur Therapie von Brustkrebs bei Frauen vor der Menopause eingesetzt wird. In dieser Arbeit wird Tamoxifen dazu verwendet, die Aktivierung der Signalwege in den transgenen Mäusen zu induzieren. Es führt zu einer Translokation der Cre-Rekombinase in den Zellkern (62). Die Injektionszeitpunkte waren an E8.5 (E für Embryonaltag), E10.5, E12.5, E14.5, E16.5, E20.5, P0 (P für Postnatal), P4, P7 und P30. Dabei wurde den embryonalen Tieren das Medikament mittels Injektionen in die mütterliche Bauchhöhle zugeführt. Die Dosierung war 1 mg. Bei den postnatalen Zeitpunkten wurden den Jungtieren jeweils 100 µg verabreicht. Tamoxifen ist nicht wasserlöslich (siehe **Abbildung 14**). Vor der Applikation werden 40 mg Tamoxifen (Sigma Aldrich) in ein 15 ml Eppendorfer Gefäß gegeben und 400 µl 100%iger Ethanol hinzugegeben. Nach Durchmischung kommen hierzu noch 3,6 ml Maisöl. Danach wird das Gefäß für 5 Minuten geschüttelt. Diese Mischung ist dann für ungefähr 5 Tage bei 4° C haltbar. Die Konzentration beträgt 10 mg/ml.

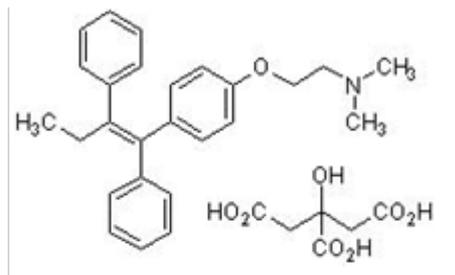


Abbildung 14 Strukturformel des lipophilen Tamoxifens

### 3.1.2.5 Genotypisierung

#### 3.1.2.5.1 Isolation der DNA

Für die Genotypisierung standen bei embryonalen Tieren und Jungtieren Schwanzspitzen und bei adulten Tieren Ohrstanzen der Mäuse zur Verfügung. Diese wurden für 2 Stunden bei 55° in einer Pufferlösung (300 µl, 100 mM Tris pH 8.5, 5 mM EDTA pH 8.0, 0,2 % SDS und 200 mM NaCl und 10 µl Proteinkinase K) lysiert. Hinzugefügt wird danach 300 µl Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol und die Lösung für 5 Minuten durchmischt. Die Röhrchen werden bei Raumtemperatur für 15 Minuten und 13 000/m Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Zum Überstand hinzu kommen 50 µl einer 3 M Natriumacetat Lösung (pH 5.2) und 1 ml einer 95 % Ethanol-Lösung. Nach mehrfachen Auf- und Abpipettieren wird die Lösung bei 4° C für 10 Minuten und 13 000 g zentrifugiert. Die verbleibende Flüssigkeit wird verworfen und das Pellet in 800 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Es folgt eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten und

13 000 g. Danach wird erneut die Flüssigkeit verworfen und das DNA-Pellet in 100 µl DEPC-Wasser gelöst und bei 4° C gelagert.

### **3.1.2.6 PCR**

Die PCR (= Polymerase chain reaction) ermöglicht die *in vitro* Amplifikation zuvor definierter DNS-Stränge. Durch Oligonukleotid-Primer und eine hitzeresistente DNS-Polymerase erfolgen zyklische Kettenverlängerungen. Somit wird der Abschnitt zwischen den zuvor gewählten Primern amplifiziert. Diese sollten eine Länge von mindestens 18 bp (= Basenpaare) aufweisen und im besten Fall eine ähnliche Annealing (= Anlagerung) Temperatur besitzen. Je höher diese Temperatur ist, desto spezifischer ist die Bindung des Primers (63).

In dieser Arbeit wird die PCR genutzt, die Genabschnitte des mutierten Beta-catenins bzw. smc sowie cre zu vervielfältigen. Diese können in einem nächsten Schritt mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Der Ansatz der PCR besteht aus den verschiedenen Proben zu je 500 ng DNS, zu welchen jeweils 25 pmol/µl Primer A und Primer B, 10-mal PCR-Pufferlösung (mit dNTPs), 5 U/µl Taq-DNS Polymerase und Wasser zugeführt werden. Die PCR läuft zyklisch in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt eine initiale Denaturierung (bei ca. 94° C, 5 Minuten), eine Denaturierung (94° C, 10 Sekunden), eine Primeranlagerung (55° C, 30 Sekunden), eine Polymerisation (72° C, 30 Sekunden) und eine finale Polymerisation (72° C, 5 Minuten). Diese Zyklen werden 35-Mal wiederholt.

### **3.1.2.7 Gelelektrophorese**

Für die DNS-Elektrophorese werden 1,2%ige Agarose-Gele verwendet. Das Agarose Pulver wurde in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, Thermo Fisher Scientific) in Suspension gebracht und durch das Aufkochen in der Mikrowelle aufgelöst. Durch Hinzugabe von 1 µl/ 20ml Ethidiumbromid können die Banden später sichtbar gemacht werden. Die Flüssigkeit wird in einen Gelträger gegossen und ein Kamm zur Kammerbildung verwendet. Anschließend muss das Gel abkühlen.

Genotyp	Verwendete Primer Sequenz 5' -> 3'
Sox2creERT2	AGGCTGAGTCGGGTCAATTA und CATCCAAGCTAGGCAGGTT
SmoM2	AAGTTCATCTGCACCACCG und TCCTTGAAGAAGATGGTGCG
Ctnnb1(ex3)	CGTGGACAATGGCTACTCAA und TGTCCTCAACTCCATCAGGTCA

Abbildung 15: Verwendete Primerpaare

Danach können die zuvor amplifizierten Proben in die Kammern hineinpipettiert werden. Zuvor wird noch 1 µl DNS-Loading Buffer (Thermo Fisher Scientific) in die einzelnen Eppendorfer Gefäße hinzugegeben. In die jeweils erste Kammer einer Reihe wird eine DNS-Leiter gegeben. Diese wird je nach erwarteter Größe des Amplifikationsprodukts gewählt.

Nachdem alle Proben in die Kammern gefüllt sind, wird für ein bis 2 Stunden eine Spannung von 120 Volt angelegt. Danach können die Banden in einer UV-Licht-Kammer betrachtet werden.

### 3.1.3 Allgemeine und spezielle immunhistochemische Färbungen

#### 3.1.3.1 Allgemeine Methodik der Fixierung, Paraffinierung und Färbung

Um die Veränderungen in den Versuchstieren beobachten, mussten aus den Köpfen beziehungsweise den Augen, histologische Schnitte angefertigt werden. Hierzu wurden die Tiere getötet und in 4%igem Formaldehyd über Nacht fixiert. Hierbei ist zu beachten, dass Embryonen vor E16.5 als Ganzes, bei Embryonen nach E16.5 Kopf und Körper separat voneinander eingebettet wurden.

Nach der Fixierung können die Tiere in 10%iger EDTA-Lösung (pH 7,4) entkalkt werden. Anschließend werden diese in einem Paraffin-Block eingebettet. Für HE Färbungen wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, für immunhistochemische Färbungen 4 µm dicke Schnitte. Fotos wurden jeweils mit Olympus Bx41 und Bx50 Mikroskopen mithilfe der Cell Software beziehungsweise dem „Color view soft Imaging System“ von Olympus angefertigt.

### **3.1.3.2 Methodik immunhistochemischer Färbungen**

Mithilfe der Immunhistochemie können Proteine in histologischen Schnitten sichtbar gemacht werden. Damit kann nachgewiesen werden, ob und in welchen Kompartimenten der Zelle ein bestimmtes Protein vorhanden ist.

Hierbei erfolgt eine Unterscheidung zwischen einer direkten und einer indirekten Methode. Bei der direkten Methode reagiert ein Primärantikörper direkt mit einem Gewebantigen, was zu einer geringen Signalverstärkung führt. Die indirekte Methode ist hierbei eine sensitivere Alternative mittels eines Sekundärantikörpers, der das Signal verstärkt.

### **3.1.3.3 Verwendete Antikörper**

Zur Charakterisierung der Entwicklung des Auges sowie des induzierten Tumors wurden verschiedene Primärantikörper verwendet (siehe **Abbildung 16**).

Antikörper	Spezies	Firma	Nummer	Verdünnung	Vorbehandlung
<b>Caspase-3</b>	Kaninchen	Cell Signalling Tech	9664	1:100	Citratpuffer
<b>CRX</b>	Kaninchen	Sigma Aldrich	WHO0001406M2	1:100	Erhitzung
<b>Ki67</b>	Kaninchen	Abcam	Ab16667	1:200	Erhitzung
<b>Nestin</b>	Maus	Abcam	Ab22035	1:200	Citratpuffer
<b>NeuN</b>	Maus	Abcam	Ab104224	1:200	Erhitzung
<b>Pax2</b>	Kaninchen	Zymed	71-6000	1:200	Erhitzung
<b>Pax6</b>	Maus	DSHB	-	1:25	Erhitzung
<b>PHH3</b>	Maus	Cell Signalling Tech	97065	1:1000	Citratpuffer
<b>SOX2</b>	Kaninchen	Abcam	Ab97959	1:200	Erhitzung
<b>Vimentin</b>	Kaninchen	Abcam	Ab92547	1:1000	Citratpuffer

Abbildung 16: Verwendete Antikörper

Zum einen wurden Antikörper verwendet, die eine Aussage bezüglich des Zellumsatzes ermöglichen: Caspase3 als Marker für apoptotische Zellen, Ki67 sowie pHH3 als Indikator für sich teilende Zellen. Hierbei zeigt der Marker Ki67 Zellen an, die sich in der G1-, S- und M-Phase befinden. PHH3 hingegen beschränkt sich auf das Signal bei Zellen in der M-Phase (siehe **Abbildung 17**) (64).

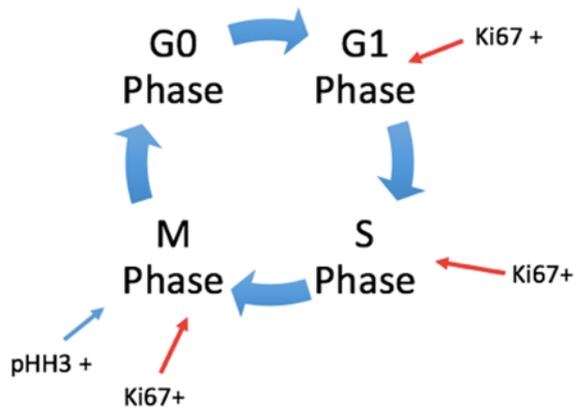


Abbildung 17: Zellzyklus mit entsprechenden Markern

G = Growth (Wachstumsphase), M = Mitosis (Zellteilungsphase), S = Synthesis (Synthesephase); Der Marker Ki67 zeigt ein positives Signal, wenn sich die Zelle in der G1-, S- oder M- Phase befindet. PHH3 zeigt ein positives Signal, wenn die Zelle gerade in der Mitose ist. (Quelle: Eigene Abbildung)

Als Stammzellmarker wurden Sox2 und Nestin verwendet. Da die im Mausmodell genutzte Cre Rekombinase unter dem Einfluss des Sox2-Promotors steht, wurden hierfür zusätzliche Sox2-Färbungen an verschiedenen Entwicklungszeitpunkten durchgeführt. Somit war zu sehen, wann, in welchen Zellen die Cre-Rekombinase in den induzierten Mäusen aktiv sein wird.

Zur Feststellung der Differenzierungen der Zellen wurde die Marker CRX zum Nachweis der Stäbchen und Zapfen der Retina, NeuN zum Nachweis neuronaler Zellen, also der Ganglienzellen, sowie Vimentin bei epithelial differenzierten Zellen des Ziliarkörpers verwendet.

Darüber hinaus wurden Pax2- und Pax6-Färbungen verwendet, da diese Proteine eine große Rolle in der physiologischen Augenentwicklung spielen. Hierbei ist Pax6 vor allem in der entstehenden Retina exprimiert, Pax2 in den ventralen Bereichen des Augenbeckens.

### 3.1.3.4 3,3' Diaminobenzidin (DAB)-Markierung

Die DAB-Färbung ist eine indirekte immunhistochemische Färbung. Hierbei kommt es durch das Enzym Peroxidase zu einer Oxidation des Farbstoffs 3,3' Diaminobenzidin. Dadurch zeigt das positive Signal eine braune Farbe im betreffenden Kompartiment, wohingegen das negative Signal blau bleibt.

Die immunhistologische Einzelfärbung besteht aus fünf Schritten: der Entparaffinierung, der Demaskierung der Antigene, der Behandlung mit einem Primärantikörper gegen das gesuchte Antigen, einer Behandlung mit einem Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper und anschließend dem Sichtbarmachen des Primär-Sekundärantikörper-Komplexes mit einem Chromogen.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Schritte kurz eingegangen.

Die Entparaffinierung erfolgt durch eine absteigende Alkoholreihe. Hierzu werden die Objektträger mit Xylol (20 Minuten), 100 % Ethanol (2 x 5 Minuten), 96 % Ethanol (5 Minuten), 70 % Ethanol (5 Minuten) und destilliertem Wasser behandelt. Durch die Formalinfixierung entstehen Methylenbrücken, die durch Quervernetzung zu Strukturveränderungen von Proteinen führen können, was dazu führen kann, dass ein Antikörper das gesuchte Antigen nicht erkennt. Um dies zu vermeiden, werden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6) mehrmals in der Mikrowelle bei 600 Watt aufgeköcht. Dieser Reaktionsschritt dient der Antigendemaskierung sowie dem Aufbrechen von gesuchten Epitopen. Zur Vorbehandlung werden die Objektträger in verschiedene Lösungen getaucht, um die gesuchten Proteine für den Primärantikörper zugänglich zu machen: Lösungsgemisch aus einem Teil H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und fünf Teilen Methanol (15 – 20 Minuten), Leitungswasser (5 Minuten), destilliertes Wasser (eingetaucht), PBS-Puffer (= Phosphate Buffered Saline) und Brij (= nichtionisches Tensid) (5 Minuten), Blocking-Lösung aus 2 % FCS im PBS (5 Minuten). Anschließend werden die Schnitte mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration über Nacht im Kühlschrank bei 4° Celsius inkubiert.

Um den Kontrast und die Intensität der Färbung zu optimieren, wird am darauf folgenden Tag ein Reagenz, bestehend aus Superenhancer und PBS (Mischverhältnis 1:1), aufgetragen. Anschließend folgt ein weiterer Waschgang mit PBS für 5 Minuten. Nun werden die Schnitte mit einem Reagenz aus Poly-HRP (= Horseradish (Merrettich) peroxidase) und PBS im Verhältnis 1:1 für 30 Minuten behandelt. Dabei bindet die dem Sekundärantikörper angelagerte Peroxidase an die Fc-Region des Primärantikörpers.

Nach einem erneuten Waschgang mit PBS (5 Minuten) werden im nächsten Schritt 38 µl DAB-Lösung vermischt mit 1 ml Substratpuffer titriert. Durch die Reaktion der Peroxidase mit dem in der DAB-Lösung befindlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kommt es zu einer Farbentwicklung. Es folgt ein Waschgang in destilliertem Wasser (2 x 2 Minuten).

Im nächsten Schritt werden die Schnitte zur Gegenfärbung der Zellkerne für 30 Sekunden in Hämalaun eingetaucht und in Leitungswasser gewaschen. Zum Abschluss der Färbung werden die Objektträger in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben. Zunächst wird der Objektträger in 70%igen und 96%igen Alkohol getaucht. Danach folgen jeweils 5 Minuten 100%iger Alkohol, erneuter 100%iger Alkohol und 2-Mal Xylol.

Anschließend werden die Schnitte mit einer Harzlösung und einem Glasplättchen eingedeckt und unter einem Olympus BX50 Lichtmikroskop mit 40x / (0,75) Objektiv untersucht.

### 3.1.4 Genutzte Microarrays

Bei insgesamt sieben Mäusen wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. Dies diente der genauen Analyse der molekularen Auswirkung einer Überaktivierung der SHH- und WNT-Signalwege im Auge. Drei der Tiere hatten den Genotyp *Sox2-cre-ERT2::Ctnnb1(ex3) SmoM2<sup>Fl/+</sup>*, im Folgenden „Induced“ (= induziert) genannt. Die restlichen Tiere (n = 4) waren Kontrolltiere. Diese Mäuse entstammten dem gleichen Wurf und wurden an E12.5 mit Tamoxifen induziert. Nach geltenden Tierschutzrichtlinien wurden die Versuchstiere an P0 getötet und die Augen zur Analyse entnommen. Hierzu wurde er Affymetrix Genechip 1.0 ST verwendet. Er enthält über 30 000 Gene und ist zudem in einer Version für humane Proben erhältlich, was wichtig ist, um die Ergebnisse mit bereits publizierten humanen Daten zu vergleichen.

In dieser Arbeit wurden zudem bereits veröffentlichte Genexpressionsdaten von verschiedenen Plattformen verwendet (siehe **Abbildung 18**).

Entität	ATRT	ETMR	MB3	MB4	RB	SHHMB	WNTMB	Uveales Melanom
Anzahl	5	7	6	1	15	4	2	4

Entität	Retinoblastom	Hepg2 Cells	Hepg2 Cells	CNS-PNETs	Maus-Daten	Uveale Melanome
Plattform	Affymetrix U133 Plus PM	Affymetrix U133 Plus PM	Affymetrix U133 Plus 2.0	Affymetrix U133 Plus 2.0	Affymetrix 1.0ST	Affymetrix U133 Plus 2.0
Accession number	GSE59983	GSE54254	GSE45802	GSE73038	-	GSE27831

Abbildung 18: Genutzte Genchips und Plattformen.

Oben: Aus Abbildung 10 bereits publizierte humane Proben, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden. Unten: Hepg2 Cells-Datensätze werden zum Angleich der Affymetrix U133 Plus PM Daten an die Affymetrix U133 Plus 2.0 verwendet.

### 3.1.5 Zellkultur

#### 3.1.5.1 Isolation adulter, retinaler Stammzellen

Verwendet wurden 4 Wochen alte BL6-Mäuse. Die Tiere wurden gemäß den Leitlinien zur sachgerechten Tötung von Versuchstieren getötet. Die Augen wurden anschließend möglichst gewebeschonend entnommen und in PBS-Puffer gelegt.

Für die Präparation der adulten Tiere wird nach dem Protokoll „Dissection of a Mouse Eye for a Whole Mount of the Retina Pigment Epithelium“ (65) vorgegangen. Ziel hierbei ist die Ciliary marginal zone, in welcher sich die Stammzellen des Auges befinden, zu isolieren.

Material und Lösungen:

- SFM = Serum free Medium (Thermo Fisher Scientific)
- ACSF = Artificial cerebral spinal fluid (119 mM NaCl, 26,2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose)
- Kynurenic Acid (0,2 mg/mL); aufgelöst in 10 ml ACSF im 37° C warmen Wasserbad
- Trypsin (1,33 mg/ml, Thermo Fisher Scientific)
- Hyaluronidase (0,67 mg/ml, Stemcell technologies)
- Ovamucoid (1 mg/ml, Sigma Aldrich) = Trypsin Inhibitor, aufgelöst in SFM
- SFM + FGF2 (10 ng/ml) + Heparin (2 µg/ml) als Kulturmedium

Hierbei werden zunächst die Augenmuskeln und der Nervus opticus vom Auge entfernt. Anschließend wird das Auge halbiert. Die Schere beginnt hierbei am Ansatz des Nervus opticus. Anschließend wird der Glaskörper sowie die Linse entfernt, sodass lediglich die Retina, das Pigmentepithel, die Sklera und die Cornea erhalten bleiben. Dieses Material wird in eine neue Petrischale mit ACSF gegeben. Im nächsten Schritt wird die CMZ vorsichtig herauspräpariert und wiederum in eine neue Petrischale gegeben. Nachdem beim zweiten Auge ebenso verfahren wurde, werden die beiden Streifen in eine neue Petrischale mit 2 ml DispaseLösung gelegt. Die Schale kommt für 10 Minuten in den Inkubator mit 37° C. Die Streifen werden danach in eine Schale mit 2 ml Trypsin, Hyaluronidase und Kynurenic Acid gelegt. Im Anschluss kann unter dem Dissektionsmikroskop die Sklera entfernt werden. Nun sind nur noch die Zellen in der Petrischale, aus welchen die Kultur angefertigt werden soll.

Diese werden danach mehrmals auf- und abpipettiert und in ein 15 ml Eppendorfer Gefäß übertragen. Dieses wird für 5 Minuten und 1500 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und mit 1 ml Ovamucoïd ersetzt. Diese Lösung wird ebenfalls mindestens 50-Mal auf- und abpipettiert und erneut bei 1500 RPM 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und durch 1 ml Kulturmedium ersetzt.

Die Zelldichte sollte nun bei ca. 10 Zellen/ $\mu$ l liegen. Ausgesät wird in einer 24 Well-Platte, die dann für 7 Tage in einen 37° C Inkubator gestellt wird.

Gezählt werden Sphären ab einer Größe von 75  $\mu$ m, die frei beweglich sind und noch eine Wachstumstendenz zeigen.

### **3.1.5.2 Isolation retinaler Stammzellen aus embryonalen Tieren**

Zu den Versuchen bei adulten Tieren wurde zudem noch die Isolation retinaler Stammzellen in embryonalen beziehungsweise sehr jungen Tieren etabliert. Die Zeitpunkte hierbei waren E13.5, E16.5 und P4. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch den Entwicklungsstand an E16.5.

Die Embryonen sind zu diesem Zeitpunkt von Kopf bis zum Scheitel ca. 11mm groß (siehe **Abbildung 19**), weshalb die Präparation nur mithilfe eines Dissektionsmikroskops möglich ist.

Material:

- Dissektionsmikroskop
- 35 mm Petrischalen
- 60 mm Petrischalen
- 2 Forceps (#5 oder #55 Dumont)
- Gebogene Forceps (#7 Dumont)
- Mikrodissektionsschere
- 15 ml Tubes für Zentrifuge
- Glas Pipetten

Lösungen:

- D-PBS (Cold Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline)
- Serum-free media (SFM, Thermo Fisher Scientific)
- Growth Factor media (FGF2 (4 ng/ml) + heparin (1:1 000) + SFM von Thermo Fisher Scientific)
- Dispase II (Sigma Aldrich)

Zunächst wird die trächtige BL6-Maus nach geltenden Tierschutzrichtlinien getötet und die Embryonen entnommen. Diese werden in 60 mm Petrischalen mit PBS-Puffer gelegt, um diese für die Präparation vor Austrocknung zu schützen. Pro Wurf war mit ca. 6 bis 12 Tieren zu rechnen. Bei diesen wurden ebenfalls vorsichtig die Augen entfernt und in eine neue 35 mm Petrischale mit PBS-Puffer gegeben. Hierbei ist darauf zu achten, dass das RPE nicht verletzt oder das Auge punktiert wird. In diesem Fall würde das Auge von der Dispase zu stark geschädigt werden. In der Zwischenzeit wird die Dispase in ein 37° C warmes Wasserbad gelegt und jeweils 1 ml des SFM in ein 15 ml Eppendorfer Gefäß gegeben.

Im nächsten Schritt wird eine 2 ml Dispaseösung (das Enzym wird in 50 mM HEPES/KOH mit pH 7,4 mit 150 mM NaCl bei einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst) in eine 35 mm Petrischale pipettiert. Jeweils zwei Augen werden gleichzeitig in die Lösung gelegt und für ca. 30 Sekunden bis 1 Minute belassen, bis die äußere Schicht beginnt, sich aufzulösen. Danach werden die Augen in eine neue 35 mm Petrischale mit PBS-Puffer gegeben.

Unter dem Dissektionsmikroskop wird nun das extraokuläre Gewebe, das sich noch an den Augen befindet, entfernt. Nun wird das RPE von der Neuralretina entfernt und in ein 15 mL Tube gelegt. Hierbei werden zwei Augen pro Tube verwendet. Diese Lösung wird nun mindestens 60-Mal auf- und abpipettiert, bis eine Einzellösung entstanden ist. Hierbei muss auf eventuell verursachte Luftblasen geachtet werden.

Das Eppendorfer Röhrchen wird danach bei 1 500 RPM für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Flüssigkeit wird mit Nährmedium inklusive Wachstumsfaktoren ersetzt (ca. 1 ml).

Zur Aussaat der Kultur werden 24-Well-Platten verwendet. Somit befindet sich pro Well ca. ein Auge.

Die Kulturen werden alle 3 Tage mit FGF2 und SFM gefüttert.

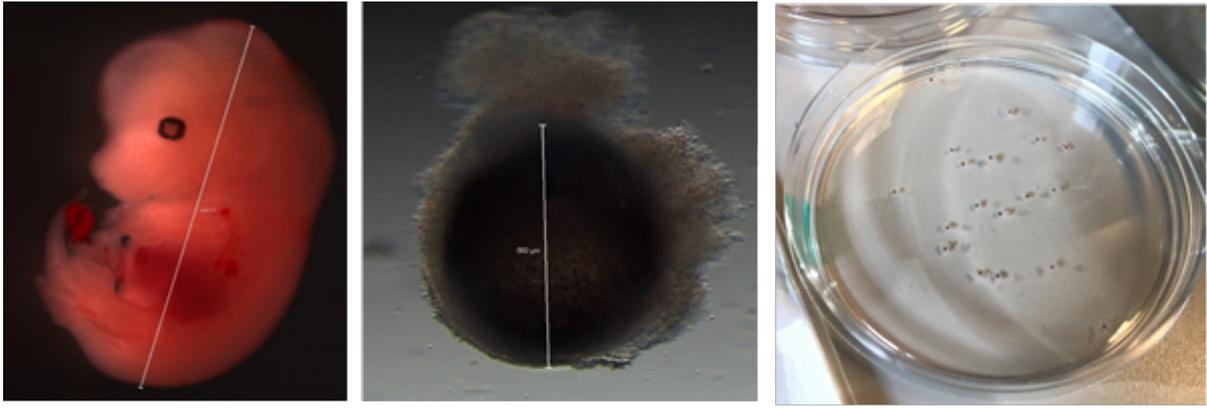


Abbildung 19 Präparation der Zellkultur

Links: Aufnahme eines Mäuseembryos an E 16.5 unter einem Dissektionsmikroskop. Die Länge hierbei beträgt 11mm. Mitte: Herausgenommenes Auge in PBS Puffer, der Durchmesser beträgt 860  $\mu\text{m}$ , Rechts: Präparierte Augen eines Wurfes in PBS.

## 3.2 Statistische Methoden

### 3.2.1 Verwendete Programme und Methoden der Genexpressionsdatenanalyse

#### 3.2.1.1 Gene-Set-Enrichment-Analyse

Um die Signalwege der einzelnen Entitäten miteinander zu vergleichen, wurde die GSEA (= Gene-Set-Enrichment-Analyse) gewählt. Dieses Programm steht auf der Homepage des Broad Institutes zur Verfügung ([www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org)). Hierbei wird die Expression zuvor definierter, funktioneller Genlisten in zwei Entitäten in Relation zueinander gesetzt. Anhand dieser Relation kann bestimmt werden, ob ein bestimmter Signalweg signifikant verstärkt oder abgeschwächt ist (66). Die Datensets werden als txt-Datei in das Programm eingegeben. Zudem werden sogenannte „Phenotype labels“ als cls-Datei benötigt, um die verschiedenen Samples den Entitäten zuzuordnen.

Die Methode selbst beinhaltet mehrere Einzelschritte (siehe Abbildung 20). Zunächst muss eine Liste an Genen ausgewählt werden, deren Expression in zwei Gruppen miteinander verglichen werden soll. Hierzu gibt es eine große Breite an bereits veröffentlichten Genlisten. Eine Alternative ist die Erstellung einer eigenen Genliste. Hierbei ist es sinnvoll, Gene zu wählen, die in biologischen Prozessen eine gemeinsame Rolle spielen oder in den gleichen Signalwegen vorkommen. Zunächst wird die Genexpression zweier Gruppen miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wird mithilfe von

Samplepermutationstests ermittelt. Die Gene werden dann in eine Rangfolge gebracht, indem die Expression in den Entitäten in Relation zueinander gesetzt werden. Somit entsteht eine geordnete Liste, bei welcher ersichtlich wird, welche Gene, in welcher Tumorgruppe relativ erhöht sind. Das Programm errechnet hierfür einen Enrichment Score (= ES). Dieser spiegelt wider, wie stark die Expression von mRNAs einer Genliste in Gruppe A im Verhältnis zu Gruppe B erhöht ist. Das Programm summiert die relative Expression entlang der zuvor gerankten Liste. Die höchste, aufsummierte Expression entspricht hierbei dem ES. Aus dem ES wird mittels Normalisierung der NES (= Normalized enrichment score) errechnet. Die Genliste wird in einen Graphen übertragen. Hierbei entspricht die y-Koordinate dem NES und die x-Achse der sortierten Genliste. Je nach Form dieser Kurve kann hieraus bereits abgelesen werden, ob der betrachtete Signalweg in der Entität relativ erhöht ist. Bei einer erhöhten Expression befindet sich der höchste Ausschlag auf der linken Bildhälfte und es zeigt sich eine insgesamt stark positive Kurve. Bei erniedrigter Expression befindet sich der höchste Ausschlag auf der rechten Bildhälfte im negativen Bereich (67).

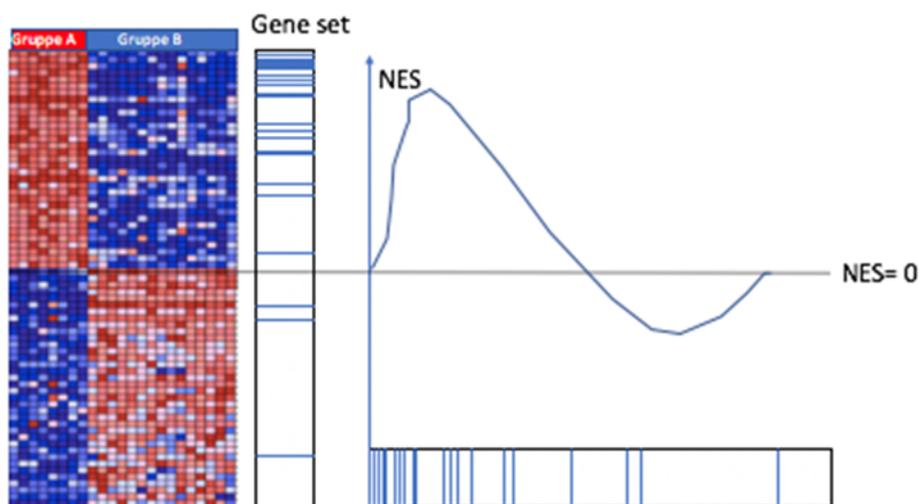


Abbildung 20: Prinzip einer Geneset Enrichment Analyse

Abgebildet wird hier auf der linken Seite eine Heatmap der zwei zu vergleichenden Tumorentitäten. Gene, welche die höchste Expression in der zu testenden Entität gegenüber der Kontrollgruppe zeigen, stehen in der Map weit oben (NES > 0), Gene, die eine sehr geringe Expression in der zu testenden Entität haben, stehen weit unten. Über diese Matrix kann in einem zweiten Schritt ein Graph (Rechts) erstellt werden. Hierbei entspricht ein Strich jeweils einem Gen des Sets. Die Genesets werden vor der Analyse festgelegt.

Zur Auswertung wird die NES genutzt. Zur Berechnung wird der ES durch den Mittelwert aller Permutationen geteilt (siehe **Abbildung 21**). Je höher dieser Score, desto höher ist die Aktivierung der Gene in der zu testenden Gruppe im Vergleich zu einer anderen Gruppe. Ist der Wert positiv, ist der Signalweg in der Testgruppe relativ überaktiviert. Ist der Wert negativ, so ist die Aktivierung geringer als in der Vergleichsgruppe. Beträgt der Wert 0, gibt es keinen Unterschied in der Expression. Ein signifikantes Ergebnis liegt vor, wenn  $p < 0.05$ . Als metrisches Maß wurde Signal2noise genutzt. Dieses Maß ist vor allem bei kleinen Fallzahlen empfehlenswert (65). Bei der Interpretation gilt es, zu beachten, dass hierbei kein einzelner Tumor verglichen wird, sondern eine vorher definierte Gruppe. Bei der vorliegenden Arbeit werden stets vordefinierte Gensets aus der KEGG-Plattform genutzt ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)).

Alle statistischen Methoden wurden vor Testung der einzelnen Entitäten festgelegt.

$$\text{NES} = \frac{\text{Enrichment Score (ES)}}{\text{Mittelwert (ES gegen alle Permutationen)}}$$

Abbildung 21: Berechnung des Normalized Enrichment Score (NES)

### 3.2.1.2 String Network

Mithilfe des String Network Programms (<https://string-db.org>) können funktionale Netzwerke visualisiert werden. Hierbei kann entweder ein einzelnes Gen analysiert und die jeweiligen Interaktionen betrachtet werden oder eine Liste an Genen eintragen und die Zusammenhänge zwischen ihnen beurteilt werden. Hierfür muss die Spezies angegeben werden, in der ein bestimmtes Gen zu finden ist, sowie die Mindestkorrelation, die zwei Gene haben sollen. Je höher diese Mindestkorrelation ist, desto weniger Interaktionen werden angezeigt. In dieser Arbeit wurde eine mittlere Mindestkorrelation von 0,7 genutzt.

Aus diesen Daten wird ein funktionelles Netzwerk visualisiert. Diese Daten können in einem zweiten Schritt in weitere Programme eingefügt werden. In dieser Arbeit werden die erhaltenen Informationen zur Weiterverarbeitung in Cytoscape verwendet.

### **3.2.1.3 Cytoscape**

Zur Visualisierung der Daten der GSEA sowie der Datenbank des String Networks v.10 wurde das Programm Cytoscape 3.6.1 verwendet (68).

In der vorliegenden Arbeit wird das Programm zum Vergleich der humanen und der murinen IOMEPL sowie den molekularen Parallelen zu den ETMR und den Unterschieden zum Retinoblastom genutzt.

### **3.2.1.4 MEV und hierarchische Clusteranalyse**

MeV (= Multiple Experiment Viewer, MeV v4.8; Dana- Farber Cancer Institute Boston, MA, USA) ist ein webbasiertes Programm zur Analyse und grafischen Darstellung von Genexpressionsdaten. In dieser Arbeit wurde es zur Durchführung einer Clusteranalyse sowie einer Principal-Component-Analyse verwendet.

Für die Clusteranalyse wurden die auszuwertenden Entitäten nach ihren Genexpressionsmustern mithilfe der TM4 Microarray Software Suite des MeV in einzelne Gruppen unterteilt und ein hierarchischer Cluster erstellt. Dabei ist es nicht entscheidend, in welche Gruppe die einzelnen Tumoren histologisch sortiert wurden, sondern wie sich die Entitäten auf Basis der Genexpressionsdaten voneinander unterscheiden beziehungsweise sich einander ähneln.

Als statistisches Maß wurde der Pearson Korrelationskoeffizient mit average linkage verwendet.

Die Signifikanz zwischen den verschiedenen Gruppen wurde mithilfe des Anova Tests mit Bonferroni Korrektur ( $\alpha > 0.05$ ) bestimmt.

Ziel dieser Analyse ist die Frage, ob sich die bereits publizierten Ergebnisse der Methylierungsmuster bezüglich der Distinktheit der ETMR und der IOMEPL auch in den Nanostringanalysen nachvollziehen lassen. Des Weiteren sollen die molekularen Beziehungen der IOMEPL zu den Retinoblastomen, den Medulloblastomen sowie den uvealen Melanomen dargestellt werden.

Mithilfe dieser Methode lässt sich außerdem ermitteln, ob die induzierten Tumore zusammen mit den humanen IOMEPL clustern oder molekulargenetisch eher den Retinoblastomen ähneln.

### **3.2.1.5 Principal- Component- Analyse**

Die Principal-Component-Analyse (= PCA), auch Hauptkomponentenanalyse genannt, ist eine statistische Methode, mit der komplexe Genexpressionsdaten (multidimensionale Daten) veranschaulicht werden können (Dimensionsreduktion). Hierbei liegt zu meist eine Matrix zugrunde, die in einem dreidimensionalen Raum dargestellt wird und die wesentlichen Informationen des Datensatzes enthält. Mathematische Grundlage ist die Hauptachsenanalyse. So werden die Datensätze in einen Vektorraum mit neuer Basis überführt. Die Methode ist vor allem bei normal verteilten Datensätzen aussagekräftig. In der vorliegenden Arbeit wird somit ermittelt, wie nah sich verschiedene Tumorentitäten in einem dreidimensionalen Raum sind. Hier wird diese Methode unter anderem dafür verwendet, zu ermitteln, wie ähnlich sich die induzierten Tumore und die humanen Proben sind und in welchem Verhältnis diese zu anderen embryonalen Tumoren stehen (69). Verwendet wurde Past4 (Oyvind Hammer, 2020).

### **3.2.1.6 Statistische Methoden und Quantifikation**

Zur statistischen Analyse wird das Programm Graphpad Prism 5.2 sowie das Excel Add in XLstat verwendet. Die Überlebenszeitkurven werden mit Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die Signifikanz der einzelnen Gruppentests wird mithilfe des Chi-Quadrat-Tests ermittelt. Ein  $p < 0.05$  gilt hierbei als signifikant.

Ki67, pHH3 sowie Caspase3-positive Zellen werden mithilfe des Programms ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; USA) in repräsentativen Querschnitten durch das Auge gezählt. Hierbei werden immer mindestens 5 Ausschnitte einer 200-fachen Vergrößerung bewertet und sämtliche Zellen ausgezählt. Die positiven Zellen werden hierbei in Relation zu der Gesamtzahl gesetzt.

## **3.3 Grafiken**

Histologische Schnitte werden mit Photoshop C.6.1 bearbeitet. Hierbei wird stets nur ein Weißabgleich durchgeführt.

Sofern nicht anders im Text erwähnt, werden die Abbildungen mithilfe des Programms GIMP 2.10.4 oder mit Powerpoint 16.14.1 erstellt. Hierzu wird das Grafiktablet HUION 1060 Plus verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histologie der humanen Proben

In diesem Abschnitt wird die Histologie der analysierten humanen IOMEPL-Proben beschrieben. Dies dient dem späteren Vergleich mit den murinen Gewebeproben. Hierbei erfolgt keine Unterscheidung zwischen teratoiden und nicht-teratoiden Tumoren. Es handelt sich vorwiegend um HE gefärbte Präparate. Bei dem Fällen 7 und 8 wird jeweils eine CRX, SOX2 sowie eine LIN28A Färbung durchgeführt.

Insgesamt 6 der 8 zur Verfügung gestellten Proben weisen undifferenzierte Zellverbände auf. Diese sind tubulär angeordnet und enthalten zum Teil Homer Wright Rosetten, die typisch für IOMEPLs sind. Die Zellen selbst sind klein und dicht angeordnet. Sie erinnern hierbei an Zellen des Neuralrohrs.

Zwei der Proben weisen ein teratoides Differenzierungsmuster auf. Fall 3 imponiert hierbei durch einen kartilaginär differenzierten Bereich, während Fall 6 gleichmäßig angeordnete Fibroblasten enthält. Es ist insgesamt zu erkennen, dass sich die Histologie der IOMEPL sehr heterogen und uneinheitlich darstellt. Dies erschwert die Diagnosestellung sowie die genaue Einteilung des Tumors zusätzlich (siehe **Abbildung 22**).

Auf den immunhistochemischen Färbungen ist zu erkennen, dass sowohl Fall 7, als auch Fall 8 positiv für Sox2 sind. Dies zeigt die Anwesenheit unreifer Zellen. Auch die CRX-Färbung erwies sich in Fall 8 als positiv, was für eine Ausbildung reifer Fotorezeptoren spricht. Im Fall 7 zeigte sich kein positives Signal für CRX. Anders als bei den ETMR, bei welchen die LIN28A Färbung mittlerweile auch ein klinisch-diagnostisches Mittel ist, ist diese in den beiden gezeigten Fällen negativ (siehe **Abbildung 23**).

## Intraokuläres Medulloepitheliom

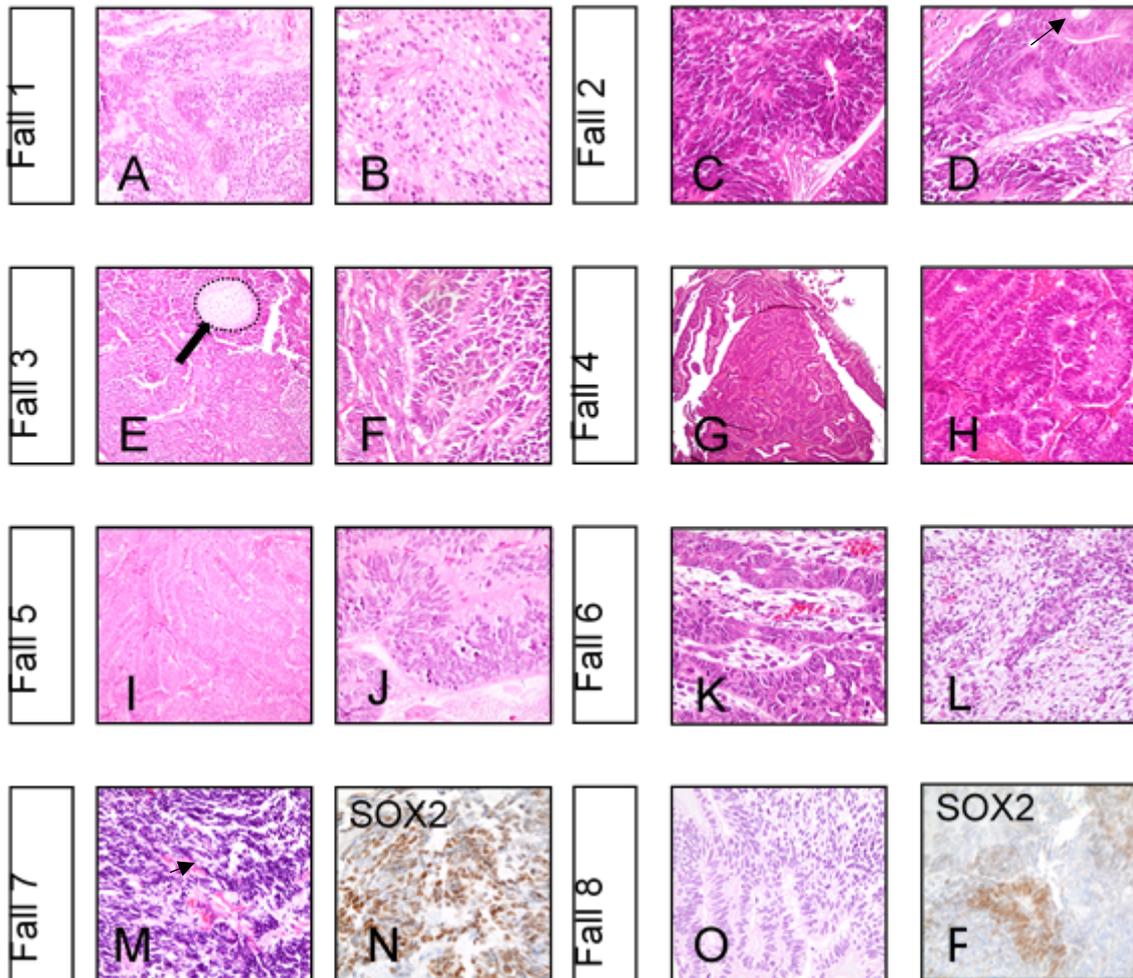


Abbildung 22 Histologie humaner IOMEPL

**A- M** und **O**: HE Färbung, **N** und **P**: Sox2 Färbung. Pfeil: Kartillaginäre Struktur in einem teratoiden IOMEPL, keine Rosettenbildung; **C** und **D**: Klassische, mehrschichtige Rosetten, zum Teil tubuläre Strukturen, dicht gelagerte Zellen, Zystenbildung (Pfeil). **E** und **F** : Teratoide Differenzierung der IOMEPL, kartillaginäre Gebilde. **G** und **H**: Undifferenzierte Erscheinungsform, tubuläre Strukturen. **I** und **J**: Zum Teil Einblutungen zu erkennen, tubuläre Differenzierung mit rosettenähnlichen Strukturen. **K** und **L**: Locker angeordnete Zellverbände. **M**: Undifferenziertes IOMEPL mit hyaloiden Einschüssen (Pfeil), **N**: SOX2 stark positiv. **O**: Tubulär strukturierter Tumor, **P**: Positives SOX2 Signal

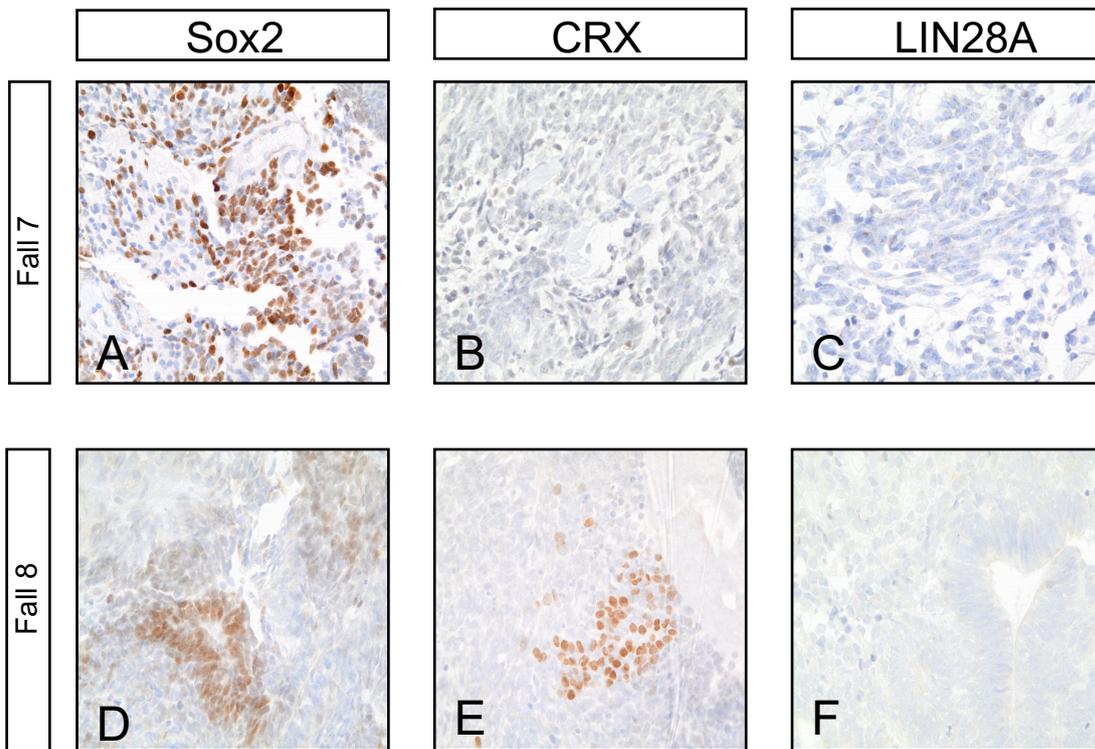


Abbildung 23: Immunhistochemische Darstellung humaner IOMEPL

**A-C:** Fall 7, **D-F:** Fall 8. **A:** SOX2- Färbung mit stark positivem, nukleären Signal. **B:** CRX Färbung, negativ; **C:** LIN28A Färbung, ebenfalls negativ. **D:** SOX2 Färbung, mit positivem Signal; **E:** CRX Färbung mit positivem Signal, **F:** LIN28A Färbung ohne positives Signal. **A** und **D** wurden bereits in **Abbildung 22** gezeigt.

## 4.2 Ergebnisse der Genexpressionsdatenanalyse

### 4.2.1 Ergebnisse der Nanostringanalyse

#### 4.2.1.1 Clusteranalyse

Es erfolgt ein Vergleich der Genexpression der IOMEPL und ETMR mithilfe der Nanostringanalyse, um zu analysieren, ob und inwiefern IOMEPL den ETMR auf Genexpressionsebene ähneln. Medulloblastome dienen hierbei als Vergleichsgruppe. Ein hierarchisches Clustering der Genexpressionsdaten basierend auf allen signifikant differenziell exprimierten Genen zeigt, dass die IOMEPL und die ETMR jeweils eine distinkte Entität bilden, die beiden Gruppen zusammen clustern und sich klar von den Medulloblastomen abgrenzen (siehe **Abbildung 24**).

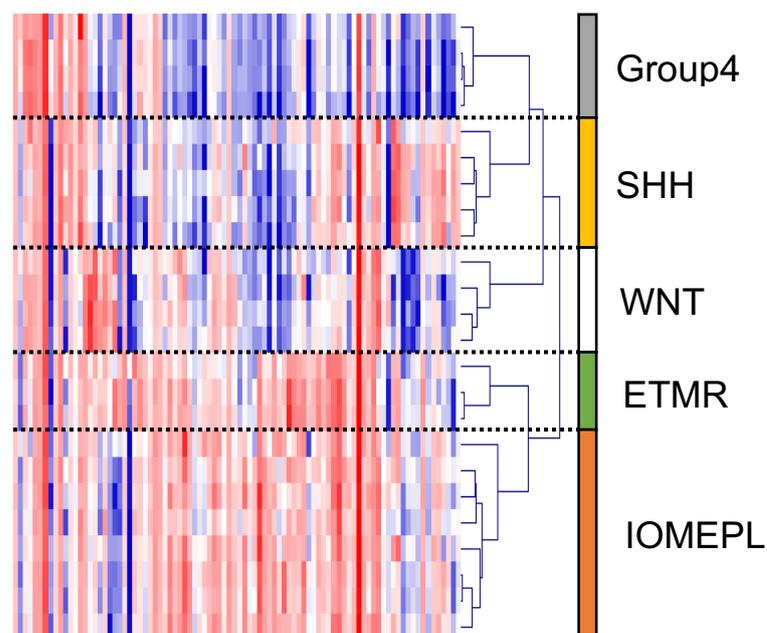


Abbildung 24: Clustering der Nanostringanalyse.

Die IOMEPL und die ETMR bilden jeweils eine distinkte Entität. Diese beiden Gruppen clustern zusammen und grenzen sich molekulargenetisch von den verschiedenen Medulloblastomen ab. Die unterschiedlichen molekularen Gruppen der Medulloblastome clustern in dieser Abbildung jeweils zusammen. Rot steht hierbei für eine verstärkte Expression, blau für eine abgeschwächte Expression. Die einzelnen Kästchen entsprechen jeweils einem Gen.

#### 4.2.1.2 Vergleich zwischen IOMEPL und ETMR

Um genauer zu analysieren, wo die funktionellen Unterschiede der beiden Entitäten hinsichtlich einer Signalwegsaktivierung liegen, werden zusätzlich verschiedene Geneset-Enrichment-Analysen durchgeführt.

Hierbei können die Genexpressionen der einzelnen Entitäten anhand von Signalwegen unterschieden werden. Um einen Überblick der Unterschiede zwischen den ETMR und den IOMEPL zu erhalten, wird zunächst ein 187 Gensets umfassendes Kollektiv („Oncogenetic signature „ c6.all.v3.1.symbols.gmt des Broad institutes) analysiert. Hierbei zeigen 116 Gensets eine Erhöhung in den IOMEPL im direkten Vergleich zu ETMR. Davon sind zwei Gensets mit  $p < 0.01$  signifikant und 7 Gensets mit einem  $p < 0.05$  signifikant. Die signifikant erhöhten Signalwege sind hierbei: BRCA1, MEK, CyclinD1, PDGF, CRX, EGFR, JNK, RB, PRC2 und EZH2 (Details zu den Listen im Anhang). Davon sind wiederum die 50 Gene mit den höchsten NES erstellt (siehe **Abbildung 25**). Hierbei sind auch diverse Proteine des WNT-Signalweges enthalten (z. B. Ctnnb1, Wnt16 und DKK2). Auch der Rezeptor Smo („Smoothened“) des SHH-Signalweges ist signifikant erhöht.

In der Gruppe der ETMR gibt es hingegen 71 Gensets, die aktiviert sind. Die 50 Gene, die hierbei am stärksten erhöht sind, werden ebenfalls in **Abbildung 25** dargestellt. Auch hier sind Proteine des WNT-Signalweges zu finden sowie beispielsweise das Gen PAX3, das bei der Augenentwicklung maßgeblich beteiligt ist. Zudem sind mehrere Proteine des MAP Kinase-Signalweges zu sehen (z. B. MAPK8, FGF13, FZD7).

Diese Daten zeigten, dass sich beide Entitäten in Bezug auf die Genexpression signifikant voneinander unterscheiden.

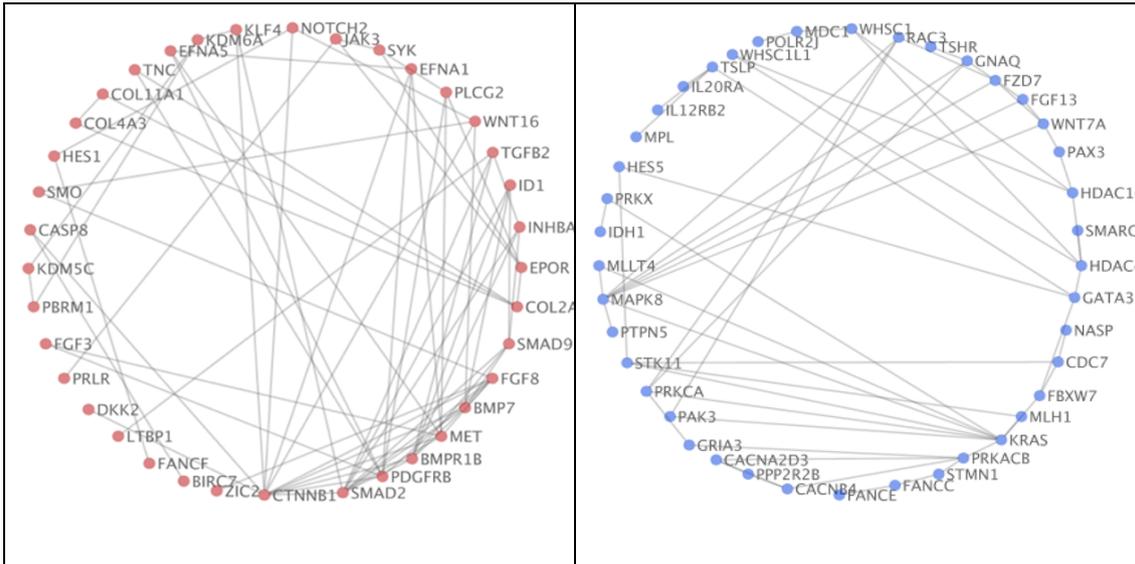


Abbildung 25: Vergleich der IOMEPL und der ETMR

Links: 50 Gene mit dem höchsten NES der IOMEPL gegenüber ETMR; Rechts: 50 Gene mit dem niedrigsten NES der IOMEPL gegenüber der ETMR. Die Verbindungslinien zeigen jeweils einen funktionellen Zusammenhang zwischen den Genen. Der Cutoff lag hierbei bei einer Korrelation von 0.700.

### 4.2.1.3 WNT-Signalweg

Um die These zu überprüfen, ob in IOMEPL ebenso wie es bereits für die ETMR gezeigt wurde, eine funktionelle Aktivierung des WNT-Signalwegs besteht, wird das Genset des WNT-Signalwegs in den ETMR und IOMEPL mit den verschiedenen Subgruppen der Medulloblastome verglichen. Die Daten hierzu kommen aus den Nanostringanalysen, was eine eventuelle Verzerrung durch andere Genchips ausschließt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 26** zusammengefasst dargestellt. Die ETMR zeigen eine deutliche Erhöhung des WNT-Signalweges gegenüber der Gruppe 4 MB mit einem NES von 1,78 und einer Signifikanz von  $p < 0,01$ . Auch im Vergleich zu den SHHMB (NES = 1,76 bei  $p < 0,01$ ) und den WNTMB (NES = 0,66 bei  $p < 0,01$ ) ist eine klare Überaktivierung zu erkennen. Dies entspricht den bereits publizierten Erkenntnissen, wonach eine Überexpression im WNT-Signalweg zur Pathogenese der ETMR beiträgt. Auch im Vergleich zu den IOMEPL zeigen die ETMR eine Erhöhung mit einem NES von 1,9 bei  $p < 0,01$ . Die IOMEPL wiederum zeigen ebenfalls eine Überaktivierung gegenüber der Gruppe 4 (NES = 1,3 bei  $p = 0,03$ ) und der SHHMB (NES = 1,18 bei  $p = 0,11$ ). Allerdings ist die Expression im Vergleich zu den WNTMB verringert (NES = -0,8 bei  $p = 0,25$ ).

	IOMEPL	ETMR	SHH	GROUP4	WNTMB
IOMEPL	0	1,9	- 1,17	-1,3	0,8
ETMR	-1,9	0	-1,7	-1,78	-0,66
SHHMB	1,18	1,75	0	-1,01	0,9
GROUP4	1,3	1,78	-0,9	0	0,9
WNTMB	-0,8	0,66	1,01	-0,9	0

Abbildung 26: Ereignisse der GSEA des WNT-Signalweges.

Aufgetragen wird jeweils der NES der horizontalen Reihe gegenüber der vertikalen Reihe. Die höchste Aktivierung des WNT-Signalwegs gegenüber den anderen Entitäten zeigten hierbei die ETMR gegenüber den SHH- sowie den WNT-Medulloblastomen. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind hierbei gelb hinterlegt.

#### 4.2.1.4 SHH-Signalweg

Um die These zu überprüfen, ob in IOMEPL ebenso wie es bereits für die ETMR gezeigt wurde, eine funktionelle Aktivierung des SHH-Signalwegs besteht, wird das Genset des SHH-Signalwegs der IOMEPL und der ETMR mit den Medulloblastomsubgruppen verglichen.

Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, kommt es auch hier in allen Vergleichsgruppen zu einer Überaktivierung des Signalwegs. Der stärkste NES beträgt hierbei 1,68 bei  $p < 0,01$  in der Vergleichsgruppe der SHHMB. Die IOMEPL zeigen ebenfalls eine Erhöhung im SHH-Signalweg im Vergleich zu den WNTMB (NES = 1,24 bei  $p = 0,04$ ), den SHHMB (NES = 1,27 bei  $p = 0,07$ ) und der Gruppe 4 MB (NES = 1,30 bei  $p = 0,07$ ). Hingegen zeigt sich ebenfalls im Vergleich mit den ETMR eine Reduktion der Aktivierung (NES = -1,55 bei  $p < 0,01$ ). Die SHHMB weisen eine Erhöhung dieses Signalweges gegenüber den anderen Medulloblastom Untergruppen auf.

	IOMEPL	ETMR	SHHMB	GROUP4	WNTMB
IOMEPL	0	1,55	-1,30	-1,30	-1,25
ETMR	-1,55	0	-1,71	-1,37	-1,45
SHHMB	1,27	1,68	0	-1,41	-1,19
GROUP4	1,30	1,41	1,40	0	1,01
WNTMB	1,24	1,45	1,19	-1,01	0

Abbildung 27: Ergebnisse der GSEA des SHH-Signalweges.

Aufgetragen wird jeweils der NES der horizontalen Reihe gegenüber der vertikalen Reihe. Die höchste Aktivierung zeigt hierbei die Gruppe der ETMR gegenüber der SHH Medulloblastomen. Gelb hinterlegt hierbei die Ergebnisse mit  $p < 0,05$ . Die statistisch signifikanten Unterschiede sind hierbei gelb hinterlegt.

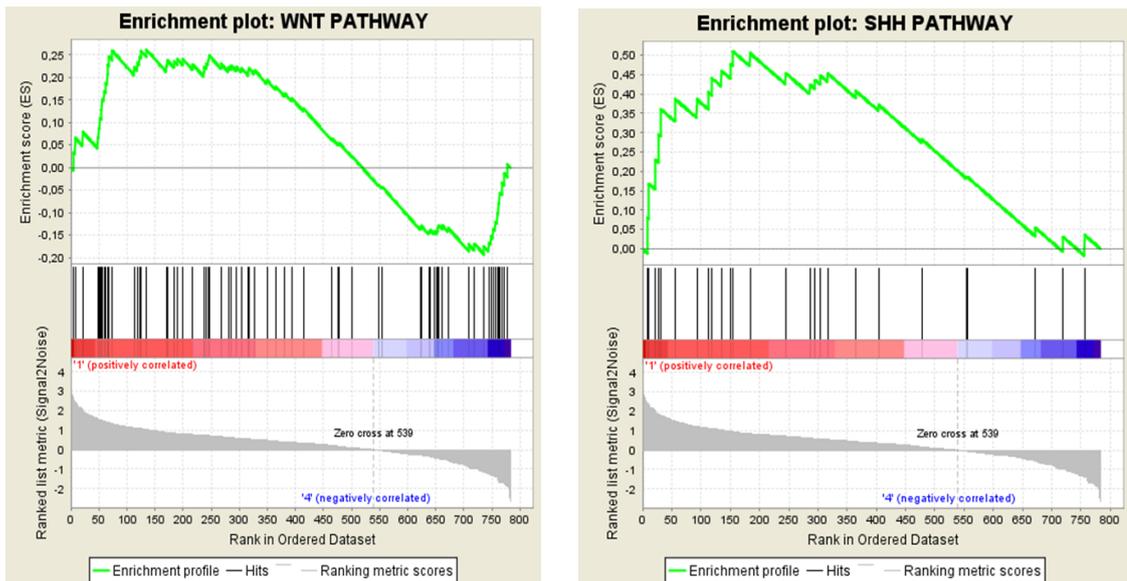


Abbildung 28: Graphische Darstellung der GSEA

Gezeigt wird hier der Vergleich zwischen IOMEPL und der Gruppe 4 Medulloblastomen. Genutzt werden Datensets des SHH und WNT Signalweges der KEGG Plattform. In beiden Fällen sieht man eine starke Erhöhung der Signalwege, welche sich im gezeigten Graphen widerspiegelt. WNT: NES= 1,3 bei  $p < 0,05$ ; SHH: NES = 1,3 bei  $p = 0,07$ . Zusammenfassend zeigt sich für ETMR eine WNT- und SHH Aktivierung.

## 4.2.2 Ergebnisse der fusionierten Daten

### 4.2.2.1 Ergebnis der Clusteranalyse

Im nächsten Schritt wurden die Daten der Nanostringanalyse mit bereits öffentlich verfügbaren Genexpressionsdaten verschiedener Tumorentitäten fusioniert und hieraus eine erneute Clusteranalyse durchgeführt. Auch hier bilden die ETMR und die IOMEPL zwei distinkte Entitäten, die jedoch wiederum einen gemeinsamen Cluster bilden und ein ähnliches Genexpressionsmuster zeigen (siehe **Abbildung 29**). Es zeigt sich auch hier eine Trennung von den Medulloblastomen sowie der Retinoblastome. Die Medulloblastome clustern jeweils in ihrer molekulargenetischen Gruppe. Auch die Retinoblastome bilden ein einheitliches Pattern.

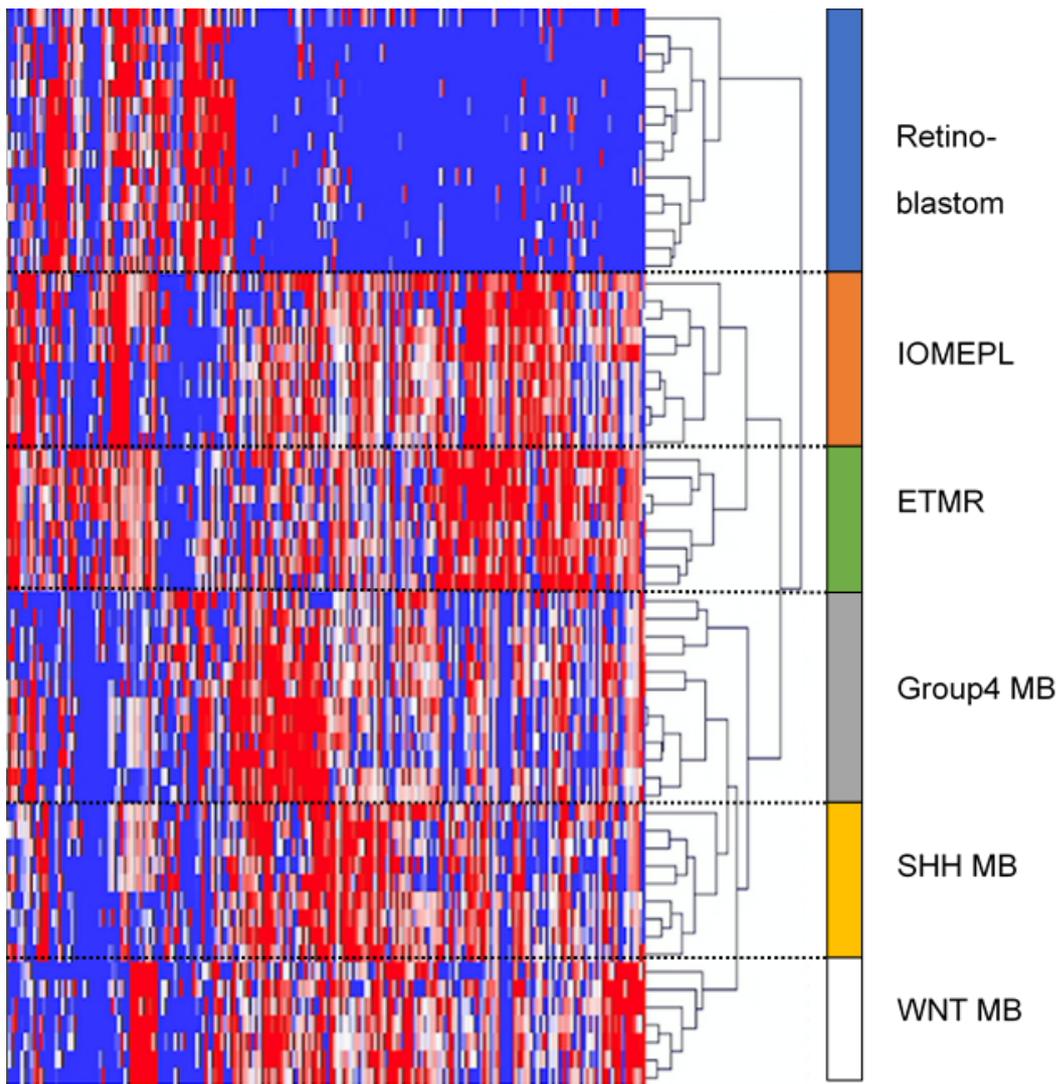


Abbildung 29 Ergebnis der Clusteranalyse des fusionierten Datensets.

Die IOMEPL und die ETMR bilden auch hier distinkte Entitäten, clustern jedoch jeweils in einer Gruppe. Zu sehen ist außerdem die Trennung von den anderen Medulloblastomen sowie der Restinoblastome. Diese clustern jeweils gemeinsam in eine molekuläre Gruppe. ( Retinoblastome = 15 Proben, IOMEPL = 10 Proben, ETMR = 8 Proben, Gruppe 4 Medulloblastome = 12 Proben, SHH Medulloblastome = 9 Proben, WNT Medulloblastome = 7 Proben )

#### 4.2.2.2 Vergleich zwischen den IOMEPL und den Retinoblastomen

Um funktionelle Unterschiede der wichtigen Differenzialdiagnose der Retinoblastome gegenüber den IOMEPL darzustellen, wird eine GSEA durchgeführt.

Hier zeigt sich eine signifikante Erhöhung des WNT-Signalweges in den IOMEPL gegenüber der Retinoblastome (NES = 1,9 bei  $p < 0,01$ ). Auch der SHH-Signalweg zeigt eine Erhöhung in den humanen IOMEPL ( $n = 8$ ) gegenüber den Retinoblastomen ( $n = 15$ ), allerdings war diese nicht signifikant (NES = 1,21 bei  $p = 0,129$ ). Weitere Signalwege, die bei den IOMEPL in Relation mit den Retinoblastomen erhöht waren, sind in **Abbildung 30** dargestellt. Die deutlichste Überaktivierung ist hierbei im p53 Pathway (NES = 1,9 bei  $p < 0,01$ ) und im MAP-Kinase-Weg (NES = 1,41 bei  $p < 0,01$ ) zu erkennen.

Dahingegen sind der PPAR-Signalweg (NES = -1,3 bei  $p < 0,05$ ), der mismatch-repair-Signalweg (NES = -0,7 bei  $p = 0,38$ ) und der mTOR Signalweg (NES = -1,0 bei  $p = 0,19$ ) in den IOMEPL relativ zu den Retinoblastomen erniedrigt.

Zusätzlich wurden die zwei Entitäten mithilfe des KEGG Gensets „Pathways in cancer“ analysiert. Hierbei ergab sich eine Gesamterhöhung des NES auf 1,64 der Retinoblastome im Vergleich zu den IOMEPL bei einem  $p < 0,01$ . Diese stärkste relative Überaktivierung zeigen hierbei die Gene NKD (NES = 5,0), DKK4 (NES = 4,9), CDK 6 (NES = 4,9), MAP2K6 (NES = 4,9), PRLR (NES = 4,1), AXIN2 (NES = 3,7) und TCF3 (NES = 3,4). Auffällig hierbei ist, dass es sich bei der Mehrzahl dieser erhöhten Gene um Bestandteile des WNT-Signalweges handelt.

Es wurden außerdem die Genlisten „Oncogenetic signatures“ des Broad institutes getestet. Diese beinhalten sämtliche Gene der Nanostringanalyse, was eine komplette Betrachtung der Genexpression ermöglicht. Hierbei waren 131 der 187 Gensets in IOMEPL gegenüber den Retinoblastomen hochreguliert. Davon zeigten 26 Gensets eine signifikante Erhöhung bei  $p < 0,05$  und 12 Gensets eine signifikante Erhöhung bei  $p < 0,01$ .

Entität	WNT	SHH	VEG	TG	PPAR	Missmatch- Repair	P53	mTO	Cellcycle	MAPK	Apoptose
NES	1,90	1,2 1	1,30	1,37	-1,3	-0,7	1,9	-1,0	1,4 3	1,42	1,30
p	< 0,0 1	0,1 1	< 0,0 5	< 0,0 5	< 0,0 5	0,3 8	< 0,0 1	0,1 9	0,0 5	< 0,0 1	< 0,0 5

Abbildung 30: Ergebnisse der GSEA

Auch diese Genlisten enthielten Proteine des WNT-Signalweges (z. B. Axin2, NJD1, CTNNB1) (siehe **Abbildung 31**). Es zeigte sich außerdem eine starke Erhöhung des Proteins EZH2 in Retinoblastomen gegenüber den IOMEPL. Diese Erhöhung wurde bereits in der Literatur beschrieben (22).

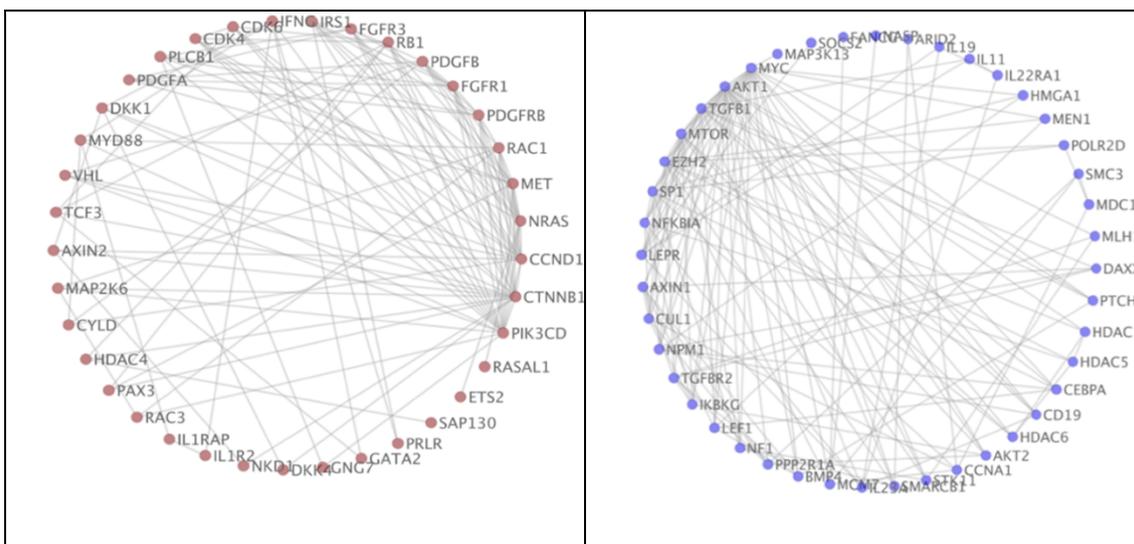


Abbildung 31: Netzwerke der GSEA der IOMEPL vs. Retinoblastome

Rot = Gene, die in den IOMEPL gegenüber der Retinoblastomen erhöht sind.

Blau = Gene, die in den IOMEPL gegenüber den Retinoblastomen geringer aktiviert sind.

Verwendet wurden Gensets der Kegg-Plattform (<http://www.genome.jp>). Der NES bezieht sich auf das Verhältnis der IOMEPL gegenüber der Retinoblastome. Die stärkste Aktivierung findet sich hierbei im WNT-Signalweg. Gelb hinterlegt werden die signifikant erhöhten Signalwege.

## 4.3 Ergebnisse aus den murinen Experimenten

### 4.3.1 Ergebnisse des SOX2 Mappings und Augenentwicklung bei Mäusen

Mit der Fragestellung, ob eine Aktivierung der WNT- und SHH-Signalwege essenziell für die Pathogenese von IOMEPL ist, werden die WNT- und SHH-Signalwege *in vivo* im Mausmodell aktiviert. Anhand **Abbildung 32** ist die Größenentwicklung des embryonalen Auges der Maus dargestellt. Der Ziliarkörper entsteht aus der Umschlagsfalte zwischen der Neuralretina und dem Pigmentepithel. Die Fortsätze entwickeln sich bei der Maus ebenfalls erst am Ende der Schwangerschaft. Auffällig ist hierbei auch die starke Größenzunahme des Auges zwischen E12.5 und E14.5.

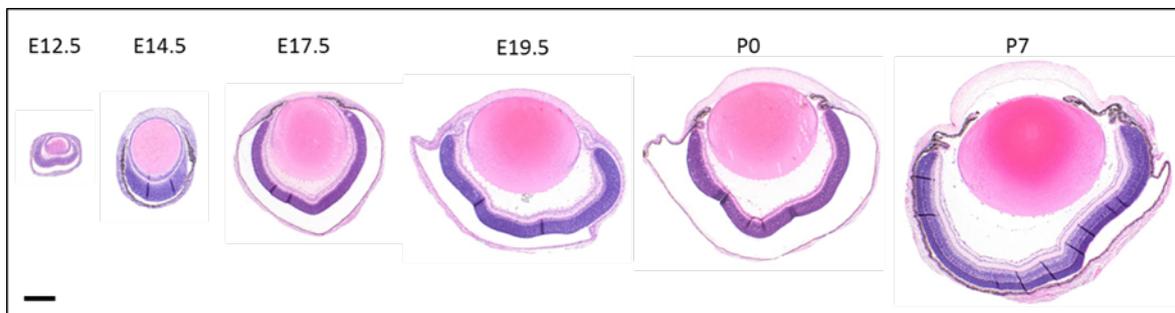


Abbildung 32: Größenentwicklung der Augen in der Maus.

Die dargestellte Größenveränderung umfasst einen Zeitraum von 3 Wochen. In frühen Stadien der Entwicklung verdoppelt sich das Volumen der Augen alle zwei bis drei Tage. Maßbalken = 50µm, HE-Färbung.

Da Sox2 als Vorläuferzellmarker im ZNS bereits beschrieben wurde, wird die Hypothese verfolgt, dass Sox2 im sich entwickelnden Auge exprimiert wird (70). Um diese Hypothesen zu testen, wird zunächst mithilfe von immunhistochemischen Färbungen bestimmt, zu welchen Zeitpunkten dieses Protein im sich entwickelnden Auge exprimiert wird.

Zunächst kann in der embryonalen Retina lediglich die äußere, neuroblastische Schicht (ONBL= Outer neuroblastic layer) und die innere, neuroblastische Schicht (INBL= Inner neuroblastic layer) unterschieden werden (siehe **Abbildung 33**, E12.5 und E14.5). Erst kurz vor Ende der Tragezeit können die Schichten weiter differenziert werden. Wie auf **Abbildung 33** zu sehen ist, wird Sox2 zu Beginn der Entwicklung in der kompletten Retina exprimiert. Die Expression wird zunächst in den zentralen Bereichen der Retina geringer und bleibt in den peripheren, ziliarkörpernahen Lokalisationen vorerst erhalten. Erst an späteren Zeitpunkten (Nach P7) ist keine Expression im Auge mehr nachzuweisen. Die Schicht, die in den zentralen Bereichen als erstes ihr positives Sox2-Signal

verliert, ist die Ganglienzellschicht an E18.5. Danach die Bipolarzellschicht kurz vor P0. Die Stäbchen und Zapfen, in **Abbildung 33** als ONL (= Outer nuclear layer; Äußere Körnerzellschicht) gekennzeichnet sind noch an P0 positiv für Sox2.

Zusammenfassend wird Sox2 während der Augenentwicklung sowohl in Vorläuferzellen der Retina als auch im Ziliarkörper exprimiert und eignet sich somit als Zielzellpopulation, um die WNT- und SHH-Signalweg in vivo zu aktivieren. Entsprechend wird eine *Sox2-CreERT2* Mauslinie für die folgenden Versuche eingesetzt und mit *Ctnnb1(ex3)<sup>F/F</sup>* (zur Aktivierung des WNT-Signalwegs) und *SmoM2<sup>F/F</sup>* Tieren (zur Aktivierung des SHH-Signalwegs) verpaart.

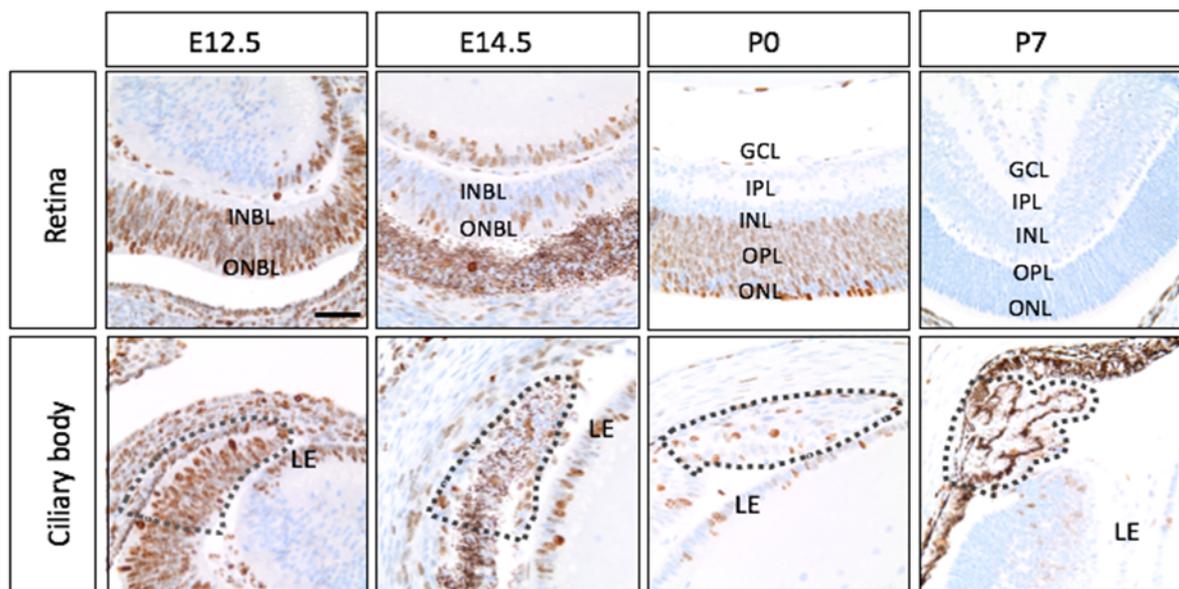


Abbildung 33: Sox2 Immunostaining

Die obere Reihe zeigt die Entwicklung der Retina an den angegebenen Entwicklungszeitpunkten. Die untere Reihe zeigt die Entwicklung des Ziliarkörpers. INBL = Inner neuroblastic layer (Innere, neuroblastische Schicht); ONBL = Outer neuroblastic layer (Äußere, neuroblastische Schicht); GCL = Gangliens cell layer (Ganglienzellschicht); IPL = Inner, plexiform layer (Innere, plexiforme Schicht); INL = Inner nuclear layer (Innere Körnerzellschicht); OPL = Outer, plexiform layer (Äußere, plexiforme Schicht); ONL = Outer nuclear layer (Äußere Körnerzellschicht) LE = Lens epithelium (Linsenepithel)

An E12.5 und E14.5 ist das Sox2 Signal noch stark ausgeprägt. Dieses nimmt mit zunehmendem Alter der Embryonen bzw. der Jungtiere zunehmend ab. Zuerst verlieren die zentralen Anteile der Retina ihre Positivität, erst später die peripheren Anteile. Ein kleiner Teil der Zellen bleibt hierbei Sox2 positiv.

## 4.3.2 Ergebnisse der induzierten Mäuse

### 4.3.2.1 Klinik der induzierten Mäuse und Überlebenskurven

Da in den humanen Proben der IOMEPL eine Überaktivierung des WNT- und SHH-Signalweges nachgewiesen werden konnte, ist der nächste Schritt die Generierung eines Mausmodells zur Induktion des Tumors. Hier soll gezeigt werden, dass eine simultane Aktivierung der beiden Signalwege ähnlich wie beim Menschen zur Pathogenese eines Medulloepithelioms im murinen Auge führt. Wie im Methodenteil und im vorigen Absatz beschrieben, wurde als Promotor des induzierbaren Mausmodells Sox2 gewählt.

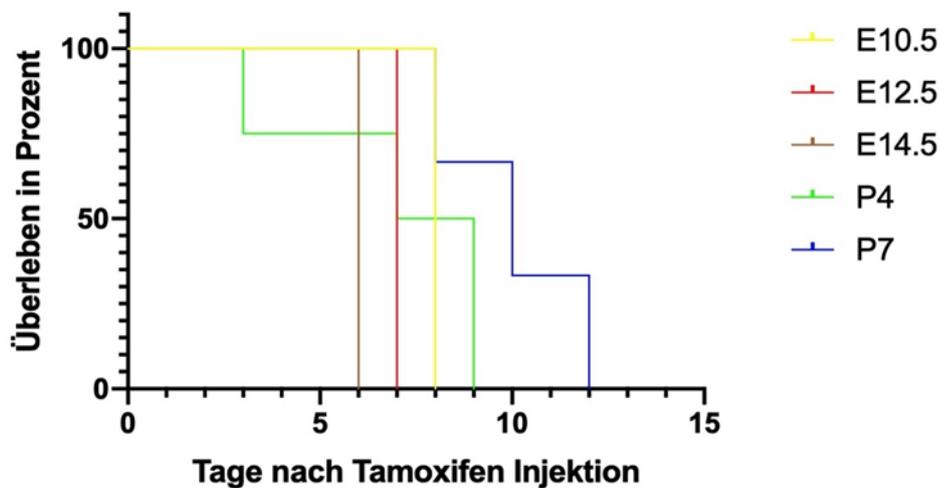


Abbildung 34: Überlebenskurven der induzierten Tiere des Genotyps Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>F/+</sup>)

In der Abbildung ist zu sehen, dass die Tiere, die an E10.5 (n = 4), E12.5 (n = 3) und E14.5 (n = 4) induziert werden, jeweils an E19.5 entnommen werden. Bei den später induzierten Tieren (P4 mit n = 5, P7 mit n = 3) zeigt sich, dass das Überleben länger ist, je später die Tiere induziert werden.

Dieses Protein ist neben den Vorläuferzellen des Auges in diversen stammzellhaltigen neuronalen sowie nicht-neuronalen Geweben exprimiert (71) (72). Somit entwickeln sich potenziell nicht nur Augen bzw. ZNS Pathologien, sondern auch in anderen Organsystemen.

Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)<sup>F/+</sup> SmoM2<sup>F/+</sup> Tiere, die an einem frühen Entwicklungszeitpunkt induziert werden, waren hiervon mehr betroffen als jene eines späteren Induktionszeitpunktes. Rein äußerlich fallen die Versuchstiere durch einen schlechten Ernährungszustand sowie eine geringere Körpergröße im Vergleich zu ihren Geschwistern auf.

Verlaufswerte hierzu fehlen, da sich die Tiere rasch klinisch verschlechtern und aus dem Versuch genommen werden. Aufgrund Problemen während der Geburt werden die Schwangerschaften der früh-embryonal induzierten Tiere (E10.5, E12.5, E14.5) an E19 beendet und die Tiere entnommen (siehe **Abbildung 34**).

#### **4.3.2.2 HE-Färbungen**

Zur Bewertung der Augenmorphologie und der Ähnlichkeit zu humanen Proben werden die Augenquerschnitte der induzierten Tiere mit denen der Kontrolltiere verglichen. In der Auswertung wird das Auge in Retina und Ziliarkörper aufgeteilt.

Der Ziliarkörper, der die bevorzugte Lokalisation der IOMEPL darstellt, bleibt in den Versuchstieren tumorfrei und meist unauffällig. Zum Teil ist eine gestörte Ausbildung der Fortsätze zu erkennen.

Bei der Retina kommt es je nach Injektionszeitpunkt zu unterschiedlichen Pathologien. Hierbei fällt auf, dass sich bei den Injektionszeitpunkten vor E14.5 eine tumorähnliche Struktur bildet, während bei späteren Injektionszeitpunkten lediglich eine Fältung der Retina auftritt (siehe **Abbildung 35**).

Die an E8.5, E10.5 und an E12.5 induzierten Tiere entwickeln mehrere Strukturen, die den mehrschichtigen Rosetten der Medulloepitheliome ähneln, innerhalb ihrer Retina. Der vorherrschende Zelltyp hierbei sind kleine, undifferenzierte Zellen, womit diese in ihrer Morphologie insgesamt den nicht-teratoiden IOMEPL ähneln. Die rosettenartigen Formationen erinnern an die humanen Proben. Insbesondere die Läsionen, die bei einer Injektion an E12.5 entstehen, weisen eine starke Ähnlichkeit zu den humanen, nicht-teratoiden IOMEPL auf. Teratoide Differenzierungen, wie beispielsweise kartilaginäre Strukturen, traten hingegen nicht auf.

Nach E14.5 ist es nicht mehr möglich, eine neoplastische Formation im Auge auszulösen. Hierbei kommt es lediglich zu einer Fältung der Retina, wobei vor allem die Länge der Retina zunimmt (siehe **Abbildungen 35, 36, 37**). Die Länge nimmt umso mehr zu, je früher die Induktion mit Tamoxifen stattfindet. Jedoch nimmt zudem die Dicke der einzelnen Schichten, insbesondere die Fotorezeptorschicht, ab (siehe **Abbildung 37**).

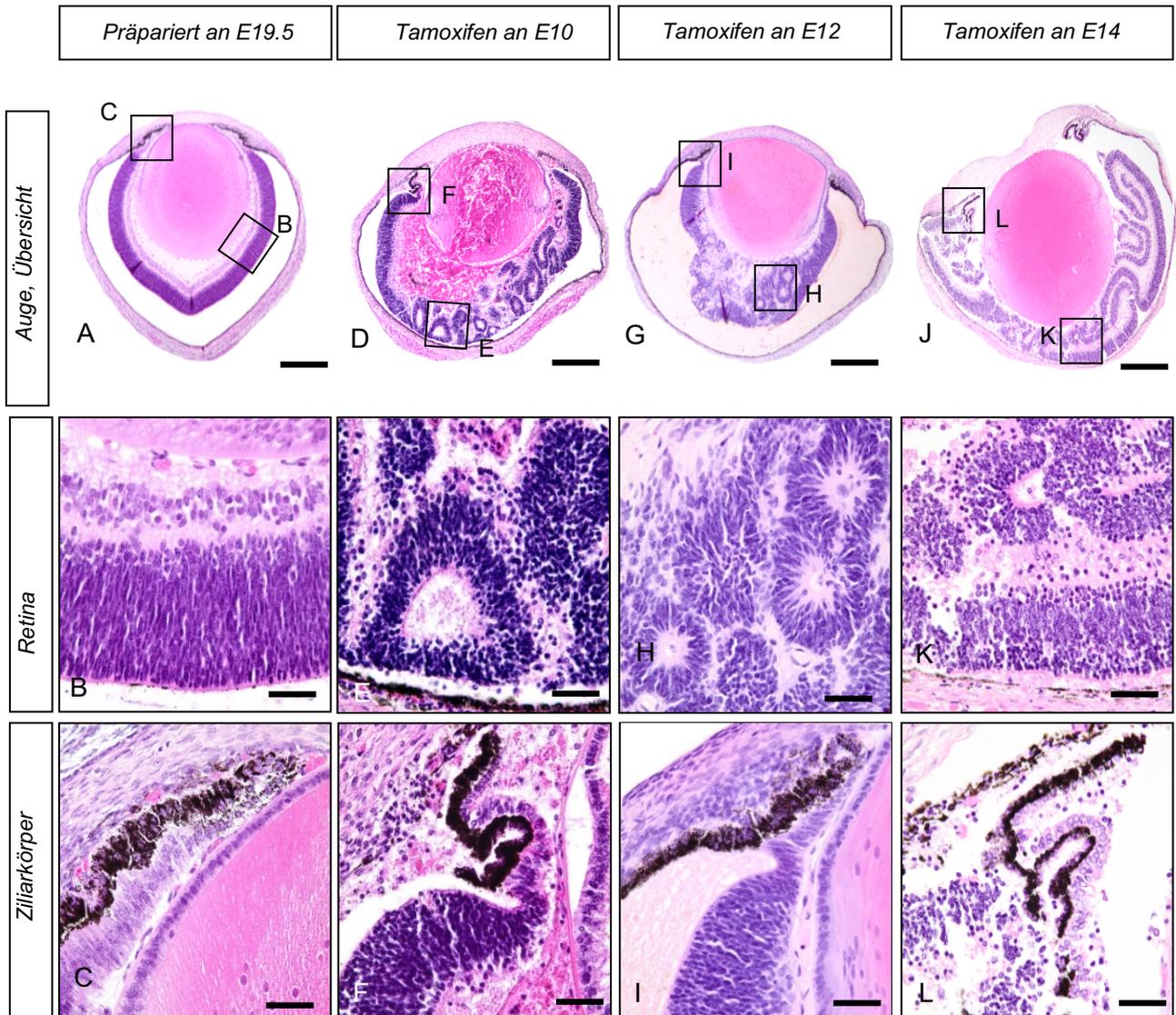


Abbildung 35: HE-Färbung induzierter Tiere.

Alle Schnitte stammen aus Tieren an P0; Der Genotyp ist Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2FI/+. Bei den Kontrolltieren erfolgt keine Injektion von Tamoxifen. A, B, C Kontrolltier an P0; A Übersicht des physiologischen Auges der Maus, B: bereits in Schichten unterteilte Retina; C: Ziliarkörper; D, E, F: An E10.5 induzierte Maus; D: Übersicht. Hier werden bereits pathologische Vorgänge ersichtlich; E: Tubuläre Strukturen in der Retina F: Ziliarkörper leicht verändert; G, H, I: Tiere mit einer Tamoxifen Gabe an E12.5; Mehrschichtige Rosetten. Das Erscheinungsbild ähnelt den humanen IOMEPL: Ziliarkörper blande; J, K, L: Tamoxifeninjektion an E14.5 Es lassen sich ab diesem Zeitpunkt keine tumorähnliche Läsionen mehr darstellen. Es kommt zu einer Fältelung der Retina ohne klar abgrenzbare Raumforderungen. L: Ziliarkörper wirkt aufgelockert. Messbalken: 50µm

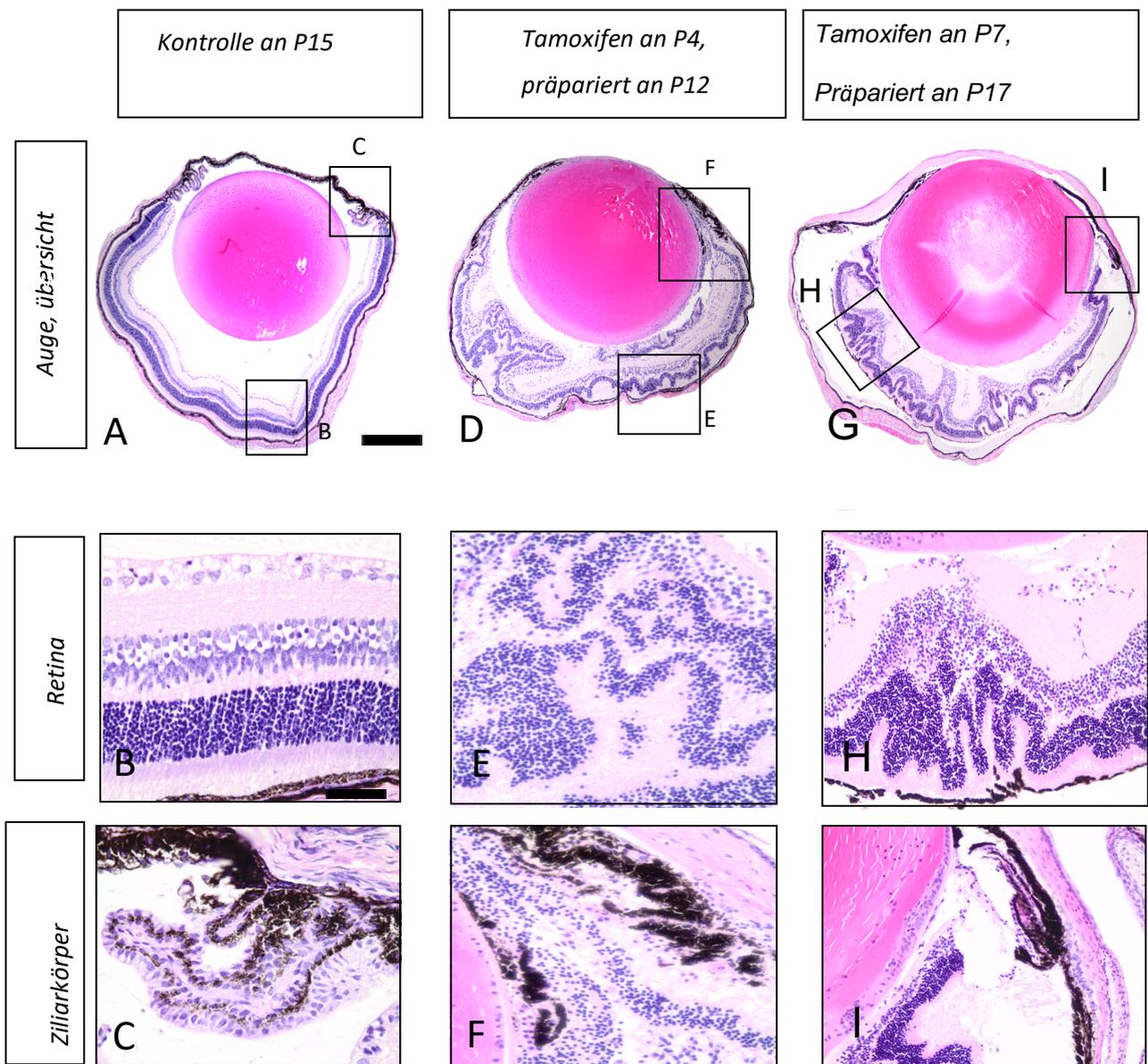


Abbildung 36: HE-Färbung induzierter Tiere.

**A, B, C:** Kontrolltier mit dem Genotyp BL6 an P15; **D- I:** Tiere mit dem Genotyp *Sox2cre-ERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>Fl/+</sup>*; **D, E, F:** Tamoxifen an P4, präpariert an P12. Es zeigt sich eine Fältelung der Retina, eine Neoplasie weder in der Retina noch im Ziliarkörper zu erkennen. **D, H, I:** Tamoxifen an P7, präpariert an P17. Man sieht auch hier eine Fältelung der Retina und keine Neoplasie im Ziliarkörper oder der Retina.

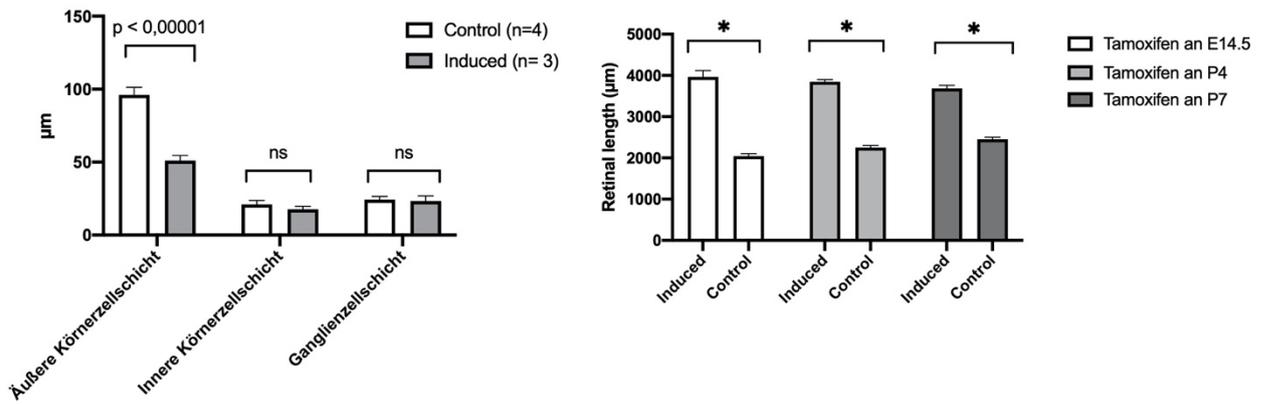


Abbildung 37: Dicke der einzelnen Retinaschichten und Längenentwicklung der Retina

Links: Genotyp der induzierten Tiere *Sox2creERT2:ctnbb1(ex3)SmoM2<sup>FL/+</sup>*; Tamoxifen an E14.5. Vergleich der Dicke der einzelnen Retinaschichten. Insbesondere in der äußeren Körnerzellschicht, also der Schicht der Photorezeptoren, nimmt die Dicke durch die Induktion stark ab.

Rechts: Genotyp der Tiere *Sox2creERT2:ctnbb1(ex3)SmoM2<sup>FL/+</sup>*. Die Länge der Retina nimmt durch Induktion mit Tamoxifen zu. Je früher die Tiere induziert werden, desto mehr nimmt die Länge der Retina zu. \* =  $p < 0,001$

### 4.3.2.3 Immunhistochemische Färbungen der murinen Schnitte

Um die tumorähnlichen Läsionen besser zu charakterisieren und mit den humanen I-OMEPL zu vergleichen, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierbei ging es zum einen um die Frage nach der Differenzierung der verschiedenen Läsionen sowie um die Mitose- bzw. Apoptoseraten.

Anhand der **Abbildung 38** ist eine CRX-Färbung zu sehen. Diese zeigt die Differenzierung der Photorezeptoren an. Verglichen werden hier Kontrolltiere mit induzierten Mäusen des Genotyps *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>FL/+</sup>* zum jeweils gleichen Zeitpunkt.

Die Kontrollmäuse an E19.5 zeigen ein stark positives Signal in der äußeren Körnerzellschicht. Die Versuchstiere an E19.5 wurden an E12.5 induziert. Sie zeigen die zuvor beschriebenen mehrschichtigen Rosetten in der Retina. Hierbei fällt auf, dass das positive Signal in der äußeren Körnerzellschicht erhalten bleibt. Ebenso ist die innere Schicht der mehrschichtigen Rosetten positiv für CRX. Dies spricht für eine erhaltene Differenzierung der Fotorezeptoren, bei einer Induktion der Tiere an oder vor E12.5.

Werden hingegen die Injektionszeitpunkte nach E12.5 betrachtet, ist zu erkennen, dass eine Differenzierung der Fotorezeptoren ausbleibt. Der CRX-Marker zeigt kein positives Signal.

Am Injektionszeitpunkt E14.5 wird die Retina noch in eine äußere und innere neuroblastische Schicht eingeteilt. Hierbei kommt es durch die Gabe von Tamoxifen und dementsprechend der Aktivierung von WNT und SHH zu einer ausbleibenden Differenzierung der Fotorezeptoren. Interessant hierbei ist, dass es auch bei einer Injektion an P4 zu einem ausbleibenden, positiven Signal in der Retina kommt. Betrachtet man die CRX-Färbung in der Kontrolle an Zeitpunkt P4, so fällt auf, dass es hier bereits zu einer Differenzierung der Fotorezeptoren gekommen ist. Somit bewirkt eine Aktivierung von SHH und WNT in unseren Versuchstieren eine gewisse Rückbildung der Retina in undifferenzierte Zellen oder zumindest einen Verlust der Differenzierung der Fotorezeptoren. Eine Schichtung ist trotzdem noch zu erkennen. Analog dazu verhält es sich auch bei späteren Injektionszeitpunkten (siehe **Abbildung 38**).

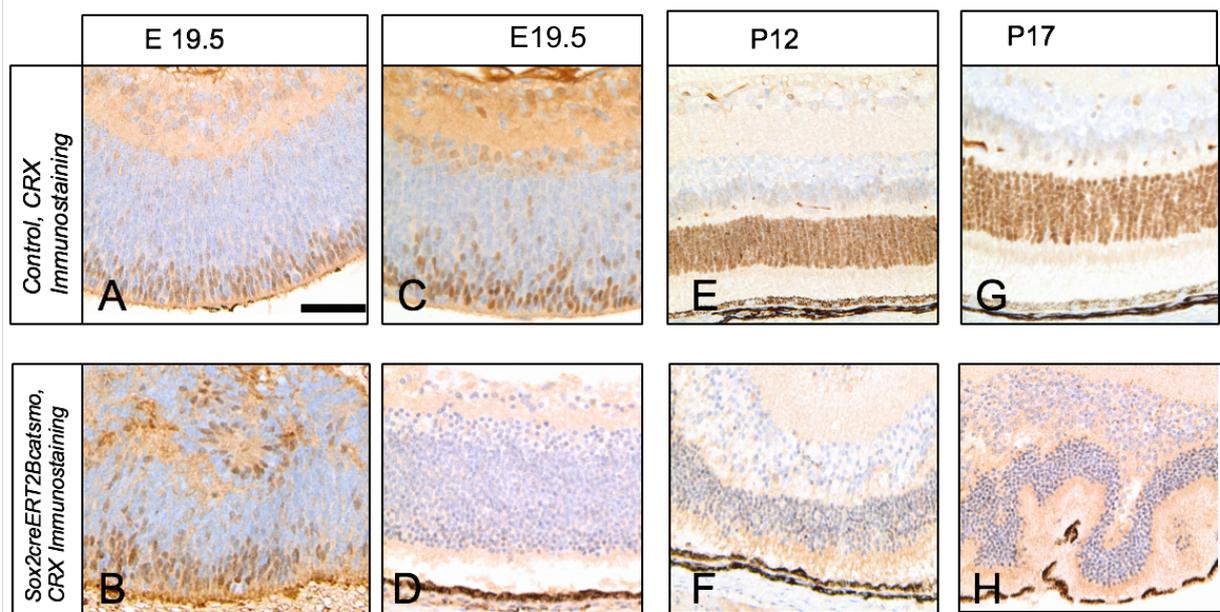


Abbildung 38: CRX-Färbung der verschiedenen Induktionszeitpunkte

**A, C, E, G:** Kontrolltiere an E19.5, P0, P12, P17. Positives Signal für CRX in der äußeren Körnerzellschicht. An früheren Entwicklungszeitpunkten nur in den Außensegmenten vorhanden. Mit zunehmendem Alter in der kompletten Photorezeptorschicht.

**B, D, F, H:** Genotyp *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>Fl/Fl</sup>* **B:** Induktion an E12.5. Positives Signal für CRX innerhalb der mehrschichtigen Rosetten sowie in den äußeren Bereichen der Retina; **D:** Induktion an E14.5. Keine Expression von CRX; **H:** Induktion an P7, Präparation an P17: Keine Expression von CRX. Verlust der Differenzierung der Photorezeptoren bei einer Aktivierung des WNT- und SHH Signalwegs nach E12.5. Messbalken: 50µm.

Um dies weiter zu untersuchen, wird ebenfalls eine SOX2-Färbung bei den Versuchstieren durchgeführt. Ein stark positives Signal würde hier für einen Verbleib stammzellähnlicher Zellen sprechen. Hierbei gibt es jedoch keinen wesentlichen Unterschied in der Expression der früh beziehungsweise spät induzierten Tiere. Es kommt sogar zu einer geringeren Expression von Sox2 gegenüber den Kontrollen (siehe Abbildung 39).

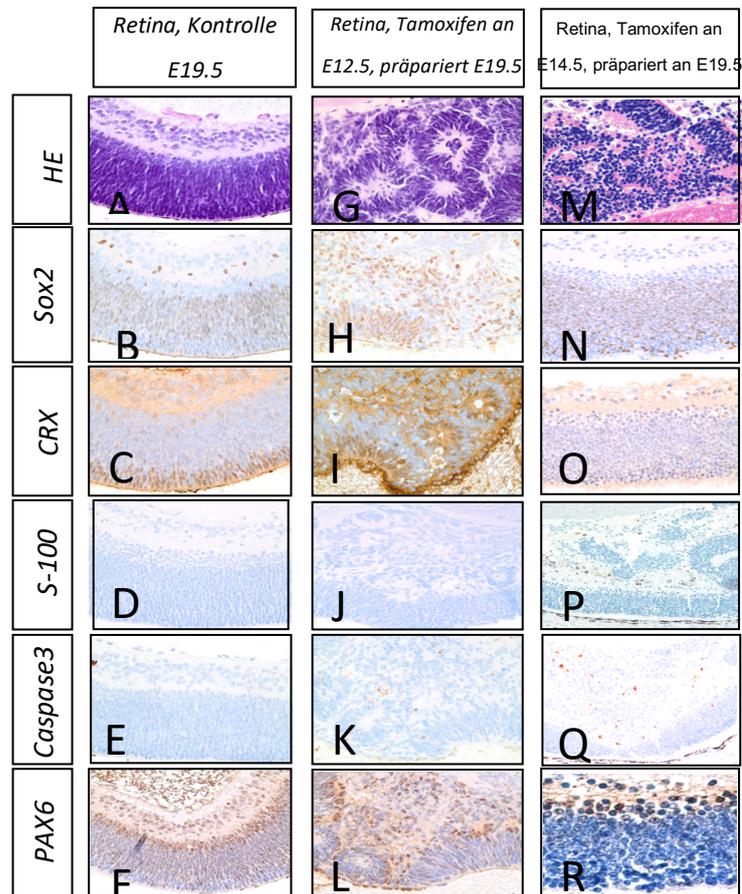


Abbildung 39: Immunhistochemische Färbungen

A-F: Kontrolltiere an E19.5. G-L: Genotyp Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2Fl/+ induziert an E12.5. M-R: Genotyp Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2Fl/+. Sox2 ist sowohl in den Kontrollen, als auch in die induzierten Tieren positiv. Es findet sich keine Erhöhung gegenüber der Kontrollen. Die CRX Färbung ist in den Kontrolltieren, sowie in den E12.5 induzierten Tieren positiv. Bei den an E14.5 induzierten Tieren bleibt dieses Signal aus. S-100 ist lediglich in P positiv. Die Caspase 3 Färbung ist bei den E14.5 induzierten Tieren im Vergleich zu den anderen Tieren erhöht. PAX6 ist bei F und L ähnlich stark positiv, bei R zeigt sich keine Positivität.

Um den Zellumsatz in den induzierten Tieren zu bestimmen, wurde eine Caspase 3 Färbung als Marker für Apoptose sowie eine Ki-67-Färbung als Proliferationsmarker durchgeführt (siehe **Abbildung 40**) dargestellt. An beiden Induktionszeitpunkten zeigen sich positiv markierte Zellen für beide Marker. Während sich die apoptotischen Zellen in den an E14.5 induzierten Tieren vor allem in den gefalteten Bereichen befinden, zeigen sich die mitotisch aktiven Zellen in erster Linie in den mittleren Bereichen der Retina, also der Lokalisation der Bipolarzellen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Caspase-3-Aktivität in den an E12.5 induzierten Tieren geringer ist, als in den zuvor beschriebenen Mäusen. Dennoch finden sich auch hier apoptotische Zellen. In den neu gebildeten, rosettenartigen Formationen der Retina ist auch deutlich eine mitotische Aktivität zu erkennen. Dies spricht für ein Wachstum der tumorähnlichen Läsionen. Bei einer Quantifizierung zeigte sich jedoch eine Erniedrigung der Mitoserate gegenüber den Kontrollen.

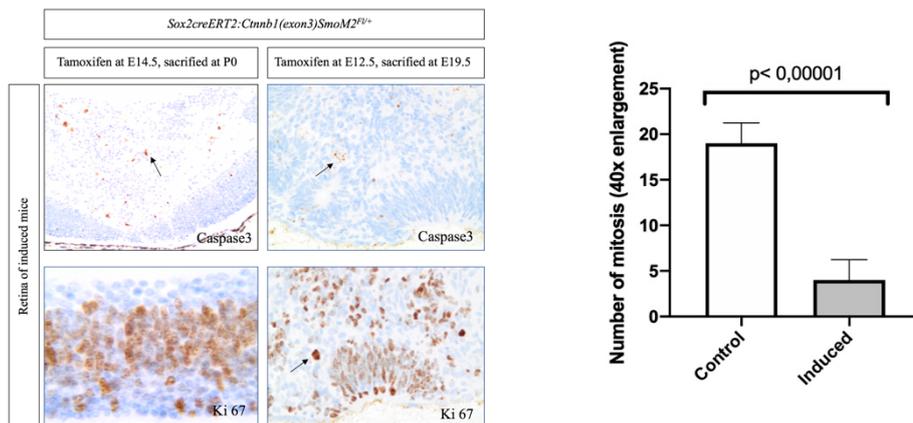


Abbildung 40: Zellumsatz in den induzierten Tieren

Genotyp der induzierten Tiere *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>F/+</sup>*. Links oben: Caspase 3, an beiden Induktionszeitpunkten positiv. Pfeile: positive Zellen; Links unten: Ki67 Färbung. An beiden Induktionszeitpunkten positives Signal. Dies spricht für einen hohen Zellumsatz an beiden Zeitpunkten. Rechts: Vergleich der an E12.5. induzierten Tieren und Kontrolltieren. Es zeigt sich eine erhöhte mitotische Aktivität in der Retina der Kontrolltiere.

#### 4.3.2.4 Vergleich mit den humanen Proben

**Abbildung 41** zeigt den immunhistochemischen Vergleich der humanen und der murinen Proben. Bei den verwendeten Schnitten zeigte sich in den humanen Proben ein positives Signal für Sox2 und CRX sowie eine Negativität für LIN28A. Dies entspricht den Ergebnissen der an E12.5 induzierten Tiere. Anders verhält es sich mit den an E14.5 induzierten Tiere. Hier zeigt sich zwar auch ein schwach positives Signal für Sox2, jedoch keines für CRX sowie für LIN28A.

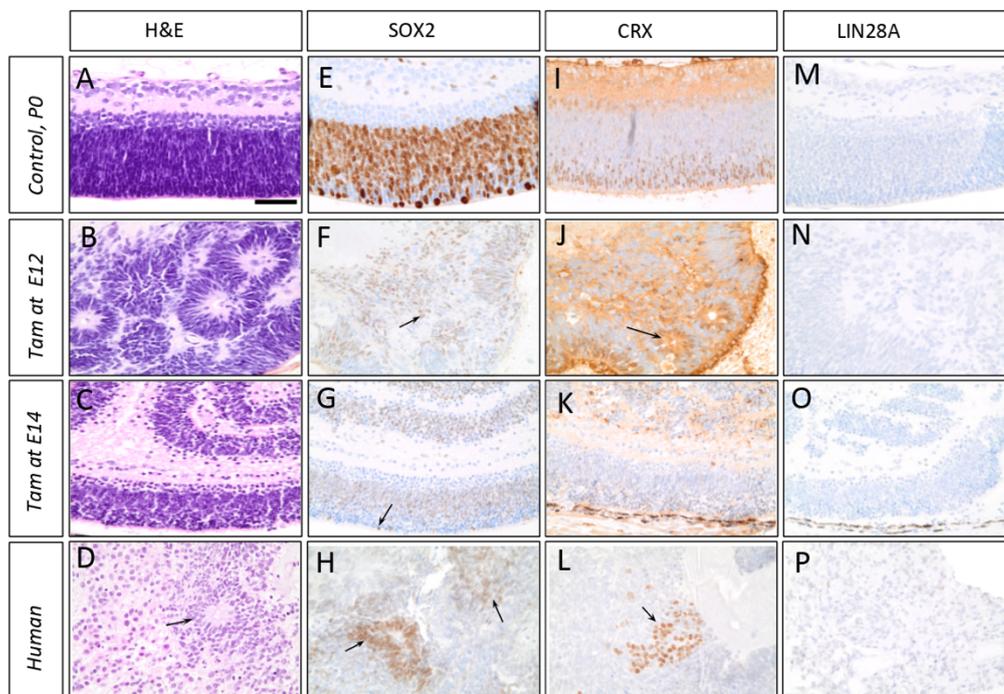


Abbildung 41: Immunhistologischer Vergleich humaner und murinen Proben.

**A, E, I, M:** Kontrolltiere an P0 mit Genotyp BL6. **B, F, J, N:** Genotyp *Sox2cre-ERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>Fl/+</sup>* **D, H, L, P:** Humane Proben der IOMEPL.

**E, F, G, H:** Sox2 Färbung. In allen Schnitten zeigt sich eine Positivität. Das stärkste Signal findet sich hierbei in der murinen Kontrollgruppe. **I, J, K, L:** CRX Färbung. Die an E14.5. induzierten Tiere (**K**) sind negativ für CRX. Bei den restlichen Tieren zeigt sich ein positives Signal für den Photorezeptormarker. **M, N, O, P:** LIN28A. In keinem der gezeigten Ausschnitte findet sich ein positives Signal. Pfeile: positive Zellen.

### 4.3.3 Getrennte Aktivierung des SHH- und WNT-Signalweges

Neben der gemeinsamen Aktivierung des WNT- und SHH-Signalweges werden zudem die Auswirkungen der separaten Hochregulierung beider Kaskaden beobachtet. Hierbei wird der Genotyp *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)<sup>F/+</sup>* zur Aktivierung des WNT-Signalweges und die Linie *Sox2creERT2:SmoM2<sup>F/+</sup>* zur Aktivierung des SHH-Signalweges. Die Induktion erfolgt an E14.5, um die Ergebnisse mit den bereits untersuchten Tieren zu vergleichen. Hierbei kommt es zu keiner Fältelung der Retina und zu keiner tumor-ähnlichen Läsion (siehe Abbildung 42).

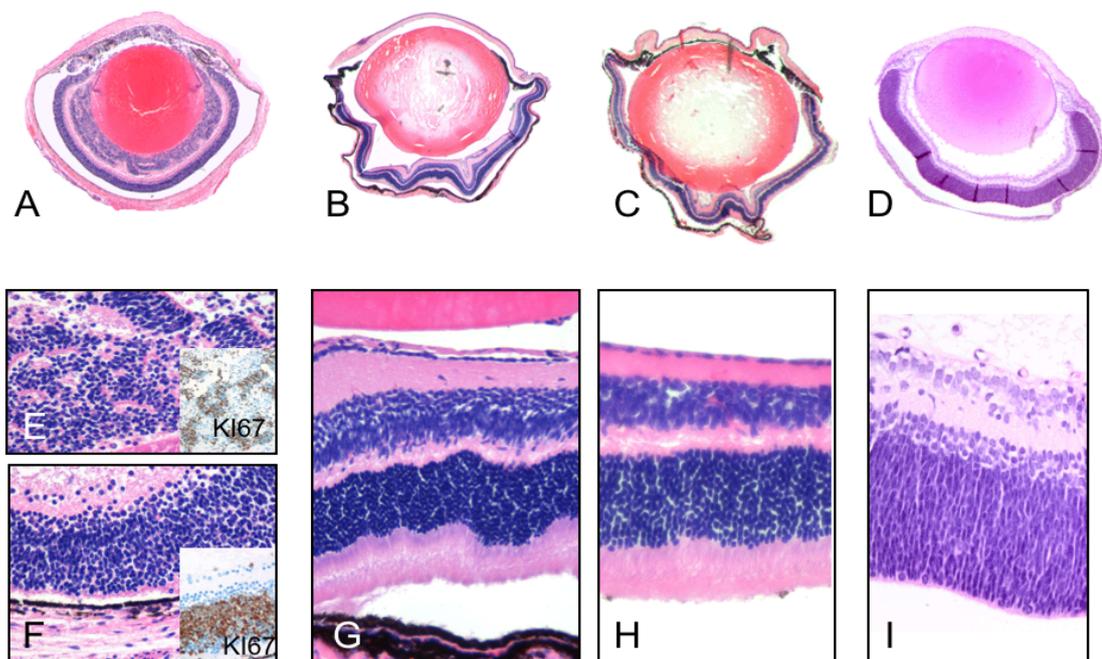


Abbildung 42: Histologie bei einer getrennten Aktivierung des SHH und WNT Signalweges.

**A:** *Sox2creERT2:Ctnnb1SmoM2<sup>F/+</sup>*; Übersicht eines Auges an P0 bei einer Induktion an E14.5. **E und F:** Verlust der Schichtung in der Retina sowie stark positiver Ki-67 Marker. **B:** *Sox2creERT2:Ctnnb1<sup>F/+</sup>* Augenübersichtsaufnahme an P21 mit Induktion an E14.5; **G:** Keine pathologische Veränderung zu erkennen. **C:** *Sox2creERT2:SmoM2<sup>F/+</sup>* mit Induktion an E14.5, präpariert an P51; **H:** Keine Veränderungen in der Retina zu erkennen. **D und I:** Kontrolltier an P0.

## **4.3.4 Vergleich der Genexpression des Mausmodells und der humanen Proben**

### **4.3.4.1 Ergebnisse des Clusterings**

Um zu analysieren, inwiefern die tumorähnlichen Läsionen im Mausmodell den humanen IOMEPL auf molekularer Ebene ähneln, wurden jeweils Augenpaaren dreier Sox2cre-ERT2:SmoM2Fl/+ Mäuse mit Induktion an E12.5 sowie von vier Geschwisterkontrollen hinsichtlich der globalen Genexpressionsdaten der humanen Tumorentitäten fusioniert und verglichen.

Wie anhand der Abbildung 43 zu sehen ist, bilden die humanen IOMEPL ein eigenständiges Cluster bezüglich ihrer Genexpression und stehen der Gruppe der induzierten Neoplasien im Mausmodell am nächsten. Die ETMR sind basierend auf dem Pearson Korrelationskoeffizienten wiederum den IOMEPL und der induzierten Neoplasien im Mausmodell am nächsten. Ebenfalls zu erkennen ist, dass die Retinoblastome einen eigenständigen Cluster bilden. Somit zeigt sich auch hier eine klare Trennung von den Retinoblastomen und den IOMEPL beziehungsweise deren Korrelaten im Mausmodell.

Die Uvealen Melanome bilden als weitere Differenzialdiagnose eines undifferenzierten intraokulären Tumors, ein von IOMEPL, ETMR, Retinoblastomen und dem Mausmodell separates Pflaster.

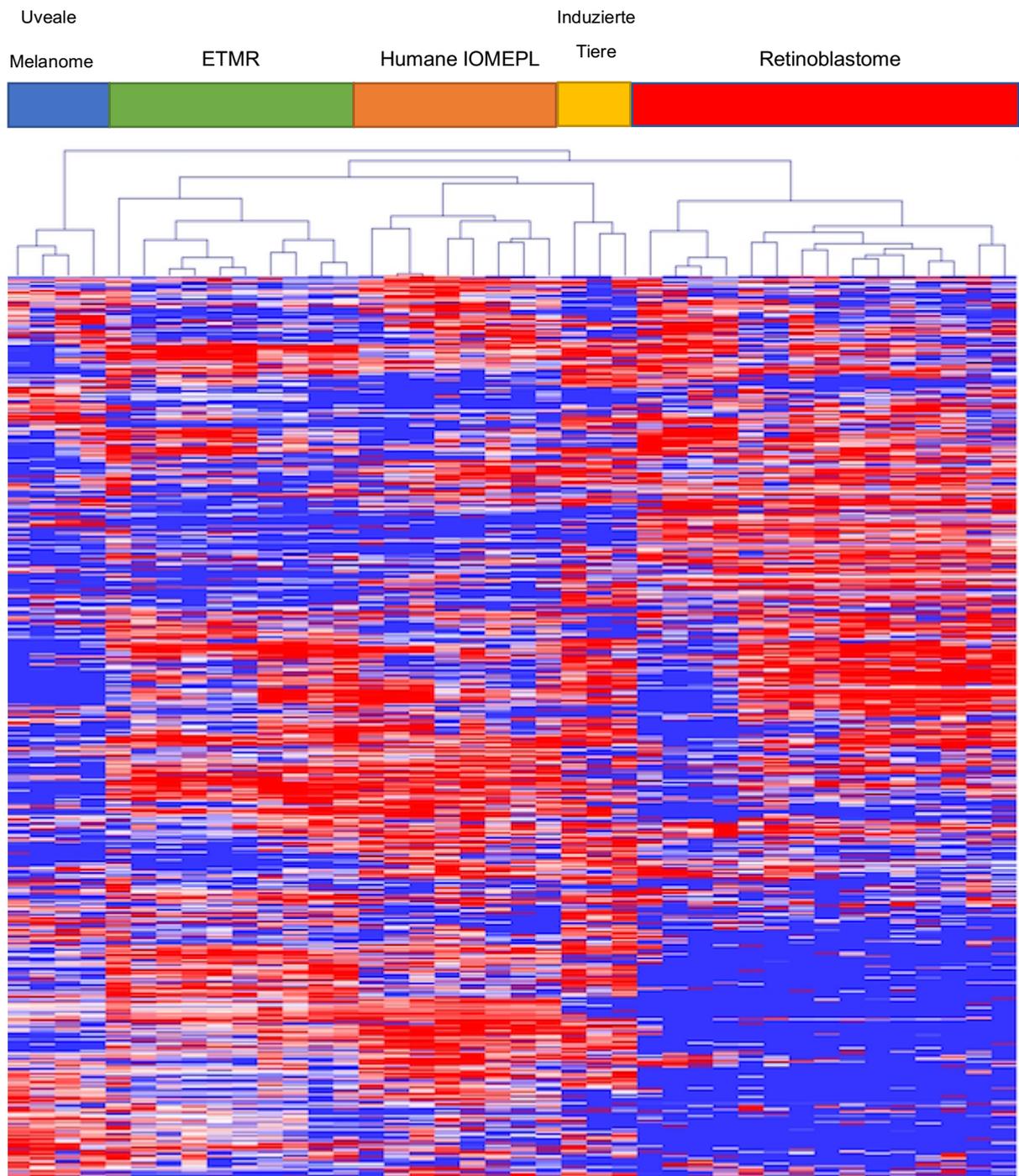


Abbildung 43 Ergebnisse der Clusteranalyse der murinen Proben.

Jede der untersuchten Entitäten bildet hierbei eine eigenständige Gruppe. Die humanen IOMEPL clustern zusammen mit den murinen, induzierten Neoplasien, was für eine ähnliche Genexpression spricht. Die Abbildung zeigt ebenfalls, dass das Retinoblastom nicht in diese Gruppe, zu welcher auch die ETMR zählen, clustert. Die ebenfalls im Ziliarkörper lokalisierten uvealen Melanome bilden eine zu den anderen Entitäten distinkte Gruppe.

#### 4.3.4.2 Ergebnisse einer PCA

Mithilfe einer Principal-Component-Analyse basierend auf den ermittelten Genexpressionsdaten, wie anhand der **Abbildung 44** gezeigt, verhält sich die Gruppe der an E12.5 induzierten Versuchstiere mit dem Genotyp *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>F/+</sup>* im dreidimensionalen Raum ähnlich zu den humanen IOMEPL. Jedoch ist keine Überlapung der beiden Entitäten zu erkennen. ETMR und IOMEPL hingegen bilden in dieser Abbildung eine homogene Gruppe. Dies lässt Rückschlüsse auf eine ähnliche Pathogenese zu. Die Retinoblastome bilden hierbei eine komplett eigenständige Gruppe. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei den induzierten tumorähnlichen Läsionen trotz ihrer Lokalisation in der Retina nicht um Retinoblastome handelt. Uveale Melanome sind ebenfalls als eine distinkte Entität ohne Nähe zu den anderen analysierten Gruppen anzusehen.

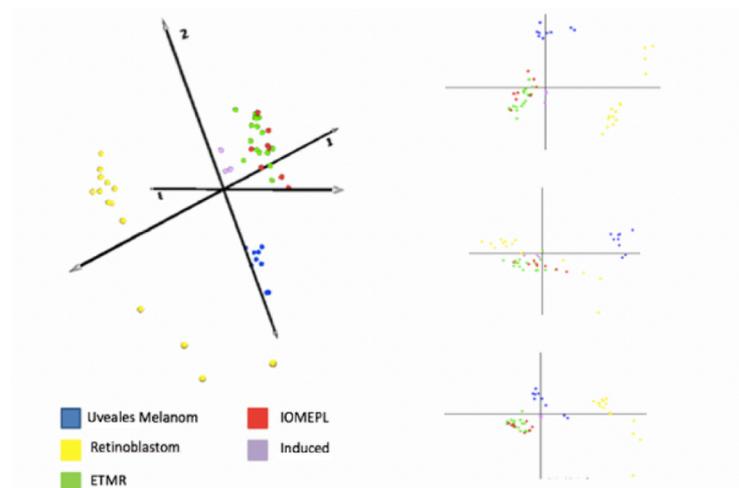


Abbildung 44: Ergebnis der PCA

Man erkennt hier, dass sich die Gruppe der induzierten Tumore („Induced“) ähnlich zu den IOMEPL und den ETMR verhalten. Das spricht für eine ähnliche Genexpression der Gruppen. Zudem befinden sich die Retinoblastome und die uvealen Melanome weit von den drei Gruppen entfernt.

## 4.4 Ergebnisse der primären Zellkultur

### 4.4.1 Deskriptive Ergebnisse

Für zukünftige und weiterführende *in vitro* Experimente soll ein Zellkultursystem etabliert werden. In den durchgeführten embryonalen Zellkulturen entstehen sowohl bei den an E13.5 als auch an E16.5 und P4 präparierten Tieren drei unterschiedliche Arten von Sphären: Pigmentierte, nicht-pigmentierte und gemischte (siehe Abbildung 45). Hierbei fällt ein Größenunterschied zwischen den einzelnen Untergruppen auf. Die Unterteilung in verschiedene Arten von Sphären wird in dem verwendeten Protokoll für adulte Tiere verwendet. Je nach Phänotyp unterscheidet sich auch die durchschnittliche Größe der Sphären. Um die vorkommenden Zellen näher zu charakterisieren, müssen noch weitere immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden.

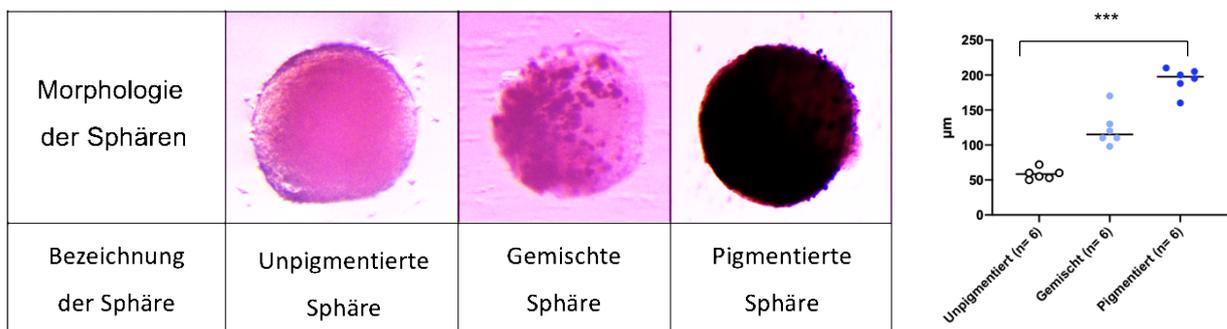


Abbildung 45: Deskriptive Ergebnisse der unterschiedlichen Sphären in der primären Zellkultur

Die Präparation erfolgte an E13.5. Die Sphären lassen sich in nicht-pigmentierte, gemischte und pigmentierte Zellen unterscheiden. Zu sehen sind hier jeweils eine Sphäre. Je nach Unterart wiesen sie ein deutlich anderes Größenspektrum auf, wie in der Abbildung rechts zu sehen ist. Der Median der unpigmentierten Sphären liegt hier bei 55 µm (n = 6), der gemischten Sphären bei 107 µm (n = 6) und der der pigmentierten Sphären bei 195 µm (n = 6). \*\*\* p < 0.01

### 4.4.2 Quantitative Ergebnisse

Um die embryonale Zellkultur zu etablieren, wurden die retinalen Stammzellen an mehreren Zeitpunkten entnommen und die dabei entstandenen Sphären gezählt. Die Anzahl wird hier in Sphären pro Well angegeben. Gezählt wurden die Sphären nach 3, 5, 7, 14 und 17 Tagen. Die Kulturen wurden jeweils an Tag 10 passagiert.

Wie auf der Abbildung 46 zu sehen ist, nimmt die Anzahl der Sphären pro Well mit steigendem Alter der Versuchstiere ab. Daher lässt sich das stärkste Sphärenwachstum

anfänglich bei einer Isolation der Zielzellen an E13.5 feststellen. Die Anzahl der Sphären sinkt im Zeitverlauf. Nach der Passagierung ab Tag 10 ist kein Zell- oder Sphärenwachstum mehr zu erkennen. Das Maximum der Sphärenzahl war am 3. Tag erreicht.

Die an E16.5 entnommene primäre Zellkultur zeigte hingegen ein langsames, aber kontinuierliches Wachstum der Sphären bis zu Tag 7. Hier kam es außerdem zu einer weiteren Zunahme der Sphärenanzahl nach der Passage an Tag 10. Jedoch waren auch hier an Tag 17 keine Sphären mehr zu erkennen.

Die schlechtesten Resultate wurden bei der Entnahme an P4 erzielt. Auch hier sank die Anzahl der Sphären kontinuierlich und es zeigte sich nach der Passage kein weiteres Sphärenwachstum.

Neben der rein quantitativen Bewertung wurden auch die einzelnen Sphärenarten unterschieden. Hier wurden die Well-Platten nach 7 Tagen in Kultur ausgezählt. An E12.5 überwog hierbei die Anzahl der nicht-pigmentierten Sphären. An E16.5 nahm der Anteil der gemischten Sphären zu. An P4 waren keine gemischten Sphären mehr zu erkennen, dafür eine größere Anzahl pigmentierter Sphären (siehe Abbildungen 46 und 47).

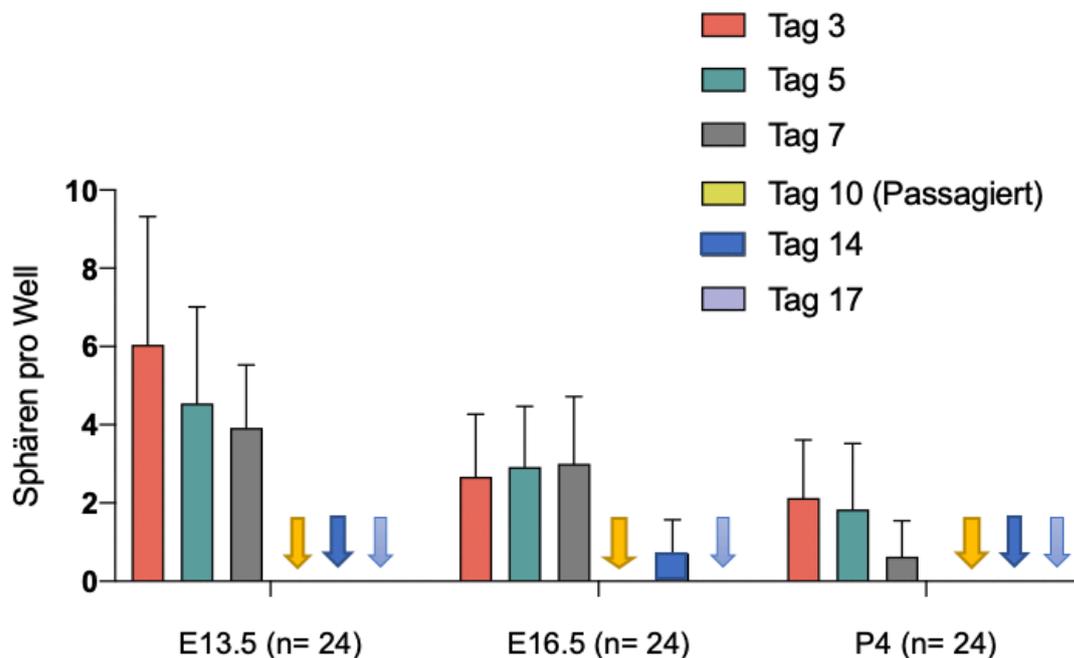


Abbildung 46: Quantitative Auswertung der Zellkultur

Gezeigt wird hierbei die Anzahl der Sphären pro Well bei n = 24. Die Aufteilung erfolgt nach der Präparationszeit. Es lässt sich erkennen, dass die höchste Anzahl der Sphären nach 3 Tagen bei einer Entnahme der Zellen an E13.5 entsteht. Die Zahl sinkt hierbei im Zeitverlauf. Nach der Passage der Zellen ist keine weitere Sphärenbildung zu erkennen. Anders verhält es sich bei einer Entnahme an E16.5. Die anfängliche Anzahl war niedriger als an E13.5, jedoch kam es zu

einer Vermehrung der Sphären, das sich auch nach der Passage zeigt. Die schlechtesten Resultate zeigt die Zellkultur an P4. Pfeile= keine Sphären nachweisbar.

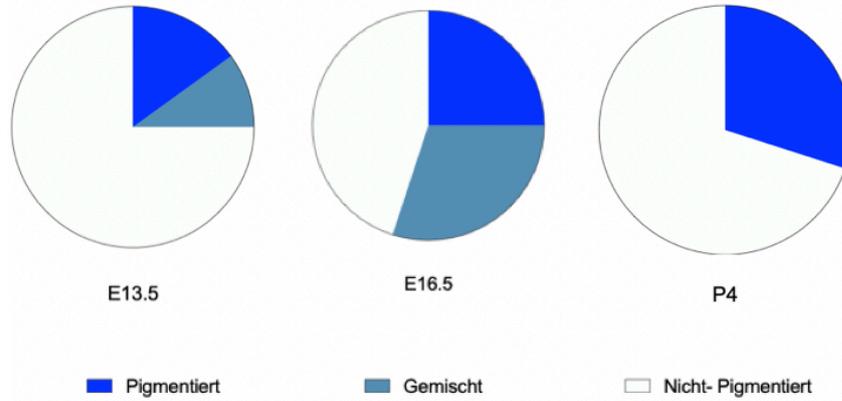


Abbildung 47: Prozentualer Anteil der verschiedenen Sphären an den einzelnen Entnahmezeitpunkten.

Der Anteil der nicht- pigmentierten Sphären ist hierbei stets am höchsten. An E13.5 und E16.5 kommt es zusätzlich zu der Bildung nicht- pigmentierter Sphären. Diese kommen an P4 nicht mehr vor.

## 5 Diskussion und Ausblick

### 5.1 Das Projekt

Die genauen Vorgänge in der Pathogenese intraokulärer Medulloepitheliome sind bisher nicht geklärt. Die Neoplasie ist trotz ihrer geringen Inzidenz der zweithäufigste, primär intraokuläre Tumor im Kindesalter. Aufgrund fehlender molekularer Erkenntnisse stehen momentan noch keine zielgerichteten Therapien zur Verfügung.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung der IOMEPLs und möglicher Ansatzpunkte für spezifische Therapien. Insbesondere die Rolle des WNT- und SHH-Signalweges sind hierbei von Bedeutung, da diese auch in der Pathogenese der ETMRs beteiligt sind. Da diese Entität des Großhirns den IOMEPLs morphologisch und bezüglich ihres immunhistochemischen Verhaltens stark ähnelt, ist auch eine molekulare Ähnlichkeit ihrer Entstehung wahrscheinlich.

Mithilfe einer Nanostringanalyse konnte in den humanen IOMEPL eine signifikante Erhöhung des WNT-Signalweges und des SHH-Signalweges gegenüber Medulloblastomen nachgewiesen werden. Auch im Vergleich zu einem Kollektiv von Retinoblastomen zeigte sich eine starke Erhöhung beider Kaskaden.

Um eine kausale Verbindung zwischen der Erhöhung der Signalwegsaktivität und der Entstehung der Tumore darzustellen, wurde in diesem Projekt ein bisher einmaliges Mausmodell zur Induktion der IOMEPL gezeigt. Die transgenen Mäuse mit dem Genotyp *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>FL/+</sup>* konnten zu verschiedenen Zeitpunkten mithilfe von Tamoxifen induziert werden. So konnten der SHH- und WNT-Signalweg gezielt, während verschiedener Entwicklungsstadien hochreguliert werden. Hier entstanden bei einer Induktion an E12.5 tumorähnliche Läsionen mit mehrschichtigen Rosetten, die den humanen IOMEPL histomorphologisch und immunhistochemisch stark ähnelten. Diese Tumore wurden zusammen mit murinen Kontrollaugen hinsichtlich ihrer globalen Genexpression analysiert und mit den humanen Daten verglichen. Dabei ähnelten die Augenläsionen in ihrer Genexpression stark den humanen IOMEPL. Auch findet sich eine Ähnlichkeit zu den ETMR, was zu den bereits publizierten Daten passt, nach welchen der SHH- und der WNT-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Entstehung dieser Tumore des Großhirns hat.

Der Beweis, ob es sich bei den Augenläsionen tatsächlich um propagierbare Tumoren handelt, steht nicht aus. Aufgrund der zudem bestehenden histologischen Ähnlichkeit zur retinalen Dysplasie muss also bei den Läsionen auch eine möglicherweise zugrunde liegende nicht-neoplastische Fehlbildung des Auges diskutiert werden.

Diese kongenitale Fehlbildung des Auges, die mit tubulären Strukturen in der Retina einhergeht, kann mitunter dem Retinoblastom oder dem Medulloepitheliom ähneln und somit eine wichtige Differenzialdiagnose für die detektierten Augenläsionen in der Maus darstellen. Es kommt allerdings nicht zu mehrschichtigen Rosetten. Zudem wurde bereits ein Zusammenhang mit dem WNT- und SHH-Signalweg von Jakobiec et al. 2011 beschrieben. (73)(74). Bei der Dysplasie kommt es nach der Geburt nicht mehr zu einem Wachstum der Läsion oder einer Verschlechterung des Zustandes. Da die Versuchstiere in diesem Projekt jedoch kein langes Überleben zeigen, können hierzu keine Aussagen getroffen werden.

## **5.2 Auswirkungen auf den aktuellen Forschungsstand**

Aufgrund der geringen Inzidenz des Tumors sind bisher wenige molekulare Eigenschaften bekannt. Bisher im Fokus der Forschung standen eine Microarray-Analyse, die mehrere erhöhte mi-RNA-Level gezeigt hat, jedoch keine IOMEPL spezifische mi RNAs. Ebenso wurden häufig auftretende Mutationen im DICER1 Gen sowie im KM2TD und im EZH2 Gen gefunden.

In der vorliegenden Arbeit kann die zuvor getroffene Hypothese bestätigt werden, dass sowohl der SHH als auch der WNT-Signalweg eine Bedeutung in der Pathogenese der IOMEPLs besitzen. Somit ähneln diese sich in ihrer Entstehung den ETMRs. Dennoch handelt es sich hierbei um zwei distinkte Entitäten. Dies wurde bereits in zuvor erschienenen Publikationen gezeigt. Hier wurde für ETMR eine Amplifikation für C19MC nachgewiesen, die in den IOMEPLs fehlt. Auch in unserer durchgeführten Nanostringanalyse zeigte sich eine klare Trennung der zerebralen Tumore und der IOMEPLs. Auch konnte somit nachgewiesen werden, dass die Retinoblastome eine komplett eigenständige Gruppe bilden und molekulargenetisch keine Gruppe mit den IOMEPLs bilden. EZH2 und KM2TD zeigten in unserer Analyse keine erhöhte Expression in IOMEPLs gegenüber den meisten Entitäten. Lediglich in der Vergleichsgruppe der ETMRs war ein Enrichment von EZH2 zu sehen. Gegenüber den Retinoblastomen hingegen war die Expression stark vermindert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der WNT- und SHH-Signalwege ausreicht, um in der Maus Augenläsionen zu induzieren, die wiederum humanen IOMEPL ähneln. Interessanterweise entstanden die Läsionen im murinen Modell in der Retina. Die humanen Tumoren hingegen entstehen meistens im Ziliarkörper und nur selten retinal oder im Nervus opticus. Die Gründe der unterschiedlichen Lokalisation in der Maus sind bisher nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass die SOX2

Expression in der Retina wesentlich stärker ist als im Bereich des Ziliarkörpers (siehe **Abbildung 33**).

Da die Tiere nach der Induktion nicht lange überleben, wäre es durchaus vorstellbar, dass eine Neoplasie nach längerer Zeit auch im Ziliarkörper entsteht. Da Sox2 ubiquitär in der Entwicklung auftritt, treten hierunter diverse Komplikationen auf. Um ein längeres Überleben zu gewährleisten, muss ein neuer Promotor gewählt werden. Dieser müsste spezifisch für den Augenbecher sein, um mögliche unerwünschte, systemische Nebenwirkungen zu minimieren.

Ein möglicher Ansatzpunkt ist der Promotor des Proteins Rax (engl. „Retina and anterior neural fold homeobox“). 2014 wurde dieser Promotor als ein ebenfalls mit Tamoxifen induzierbares Modell beschrieben (75). Rax kommt im embryonalen Körper nur im Augenbecher und im Hypothalamus vor. Die Aktivierung von WNT und SHH in Rax-positiven Zellen führt somit nur zu wenigen systemischen Nebenwirkungen und ermöglicht ein längeres Beobachten der Mäuse. Hierbei geht es nicht nur um die Lokalisation des Tumors, sondern auch der klinische Verlauf der Mäuse sowie eine Therapietestung. Ob es an den untersuchten Injektionspunkten ebenfalls zur Bildung einer tumorähnlichen Läsion kommt, muss in weiteren Forschung noch analysiert werden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass es auch im Ziliarkörper zu Neoplasien kommt, was dazu führt, dass das murine-Modell den humanen Korrelaten noch ähnlicher wäre. Letztendlich bleibt noch zu beweisen, dass es sich bei den entstehenden Läsionen um einen propagierbaren Tumor handelt. Hierbei können Zellen entweder direkt aus der Maus oder nach zwischenzeitlicher Kultivierung und Vermehrung *in vitro* in die Retina oder den Glaskörper von Empfängermäusen transplantiert werden.

Die Injektion in die Retina wäre mit einem erheblichen, technischen Aufwand verbunden, bietet jedoch sehr physiologische Wachstumsbedingungen. Die Alternative wäre eine Injektion in den Glaskörper. Der Vorteil hierbei wäre seine leichte Durchführbarkeit. Jedoch sind die Bedingungen nicht komplett identisch mit denen in der Retina oder dem Ziliarkörper. Die Aussagekraft wäre hierbei also begrenzt.

Weitere Versuche müssen mithilfe der Zellkultur erfolgen. In dieser Arbeit wird gezeigt, zu welchen Zeitpunkten eine embryonale, retinale Stammzellkultur möglich ist. Die entstehenden Sphären sollten hierbei noch weiter charakterisiert werden, da in der bisherigen Arbeit nur zwischen pigmentiert, nicht-pigmentiert und gemischt unterschieden wurde. Dies kann zum Beispiel mithilfe immunhistochemischer Färbungen erfolgen. In einem zweiten Schritt können Zellen aus *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2* Mäusen (oder Kontrollzelle, die mithilfe von Viren eine SHH- und WNT-Signalwegsaktivierung erfahren) kultiviert werden. Die Annahme hierbei wäre, dass es hierbei parallel zu den

murinen-Versuchen zu einer Zunahme der Proliferation sowie, je nach Transduktionszeitpunkt, zu einem Ausbleiben der Differenzierung kommt. Mithilfe dieser *in vitro* Induktion könnten zukünftige Therapien zuerst so getestet werden, bevor sie *in vivo* an Mäusen versucht werden. Die entstehenden Sphären der Zellkultur müssen außerdem noch genauer differenziert werden. Bisher wurden sie lediglich in nicht-pigmentierte, pigmentierte sowie gemischte Sphären unterteilt. Diese kann im Folgenden zur *in vitro* Induktion verwendet werden. Hierfür kann entweder das Gewebe einer transgenen Maus mit dem Genotyp Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2, die zuvor mit Tamoxifen induziert wurde, entnommen werden.

Durch die gewonnenen Erkenntnisse der verschiedenen Signalwege können zielgerichtete Therapien entwickelt werden. Da die Leitlinie momentan noch eine Entfernung des Tumors bei kleinem Befall beziehungsweise eine komplette Enukleation des Auges bei größeren Tumoren empfiehlt, könnte hierdurch eine Verbesserung der Überlebensraten beziehungsweise der Lebensqualität erreicht werden.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Pathogenese intraokulärer Medulloepitheliome. Dies ist eine seltene Tumorentität, über die bisher noch wenig bekannt ist. Das IOMEPL wird vornehmlich in der ersten Lebensdekade diagnostiziert und stellt trotz seiner Seltenheit den zweithäufigsten, primär intraokulären Tumor bei Kindern, nach dem Retinoblastom, dar. Er entsteht meist im Bereich des Ziliarkörpers, kann auch im Bereich der Retina oder dem Nervus Opticus lokalisiert sein. Da ETMR (embryonale Tumoren des ZNS), die den IOMEPL stark ähneln, durch eine Aktivierung der WNT- und SHH-Signalwege gekennzeichnet sind, soll die Rolle dieser Signalwege bei IOMEPL analysiert werden. Das Projekt zeigt, dass sowohl der WNT, als auch der SHH-Signalweg maßgeblich an der Entstehung intraokulärer Medulloepitheliome beteiligt sind. Genexpressionsanalysen an humanen Tumoren zeigen eine Aktivierung beider Signalwege in IOMEPL. Zudem führt die gleichzeitige Aktivierung der WNT- und SHH-Signalwege in Sox2-positiven Vorläuferzellen des Auges bis E12 zur Entstehung tumorähnlicher Läsionen im Bereich der Retina, die humanen IOMEPL histologisch, immunhistochemisch und auf globaler Genexpressionsebene ähneln. Zudem wurde eine primäre Zellkultur durch die Isolierung retinaler, embryonal entnommener Stammzellen etabliert. Diese Kultur soll für künftige präklinische Therapietestungen verwendet werden.

## Literaturverzeichnis

1. Saunders T, Margo CE. Intraocular medulloepithelioma. Arch Pathol Lab Med. Februar 2012;136(2):212–6.
2. Sansgiri RK, Wilson M, McCarville MB, Helton KJ. Imaging features of medulloepithelioma: report of four cases and review of the literature. Pediatr Radiol. Oktober 2013;43(10):1344–56.
3. Edward DP, Alkatan H, Rafiq Q, Eberhart C, Al Mesfer S, Ghazi N, u. a. MicroRNA profiling in intraocular medulloepitheliomas. PloS One. 2015;10(3):e0121706.
4. Hellman JB, Harocopos GJ, Lin LK. Successful treatment of metastatic congenital intraocular medulloepithelioma with neoadjuvant chemotherapy, enucleation and superficial parotidectomy. Am J Ophthalmol Case Rep. September 2018;11:124–7.
5. Andersen S.R. Medulloepithelioma of the retina. Int Ophthalmol Clin. 1962;483–506.  
Saakyan SV, Tsygankov AY, Ivanova OA, Zakharova GP, Isaeva RT, Moiseeva NI, u. a. [Malignant medulloepithelioma mimicking retinoblastoma - clinical and morphological case analysis and cell culture experience]. Vestn Oftalmol. 2016;132(6):64–9.
6. Peshtani A, Kaliki S, Eagle RC, Shields CL. Medulloepithelioma: A triad of clinical features. Oman J Ophthalmol. Mai 2014;7(2):93–5.
7. Bernoulli R. Über das sogenannte Diktyom – Neuroepithelioma teratoides ciliare–. Ophthalmologica. 1961;141(5):386–97.
8. Fralick FB, Wilder HC. Intraocular diktyoma and glioneuroma. Trans Am Ophthalmol Soc. 1949;47:317–24.
9. Verhoeff FH. A rare tumor arising from the pars ciliaris retinae (terato-neuroma) of a nature hitherto unrecognized, and its relation to the so-called glioma-retinae. Trans Am Ophthalmol Soc. 1904;10(Pt 2):351–77.
10. Grinker RR. GLIOMAS OF THE RETINA: INCLUDING THE RESULTS OF STUDIES WITH SILVER IMPREGNATIONS. Arch Ophthalmol. 1. Juni 1931;5(6):920.
11. Fralick FB, Wilder HC. Intraocular diktyoma and glioneuroma. Trans Am Ophthalmol Soc. 1949;47:317–24.
12. Takei H, Florez L, Moroz K, Bhattacharjee MB. Medulloepithelioma: Two unusual locations. Pathol Int. Februar 2007;57(2):91–5.

13. Verdijk RM. On the Classification and Grading of Medulloepithelioma of the Eye. *Ocul Oncol Pathol*. April 2016;2(3):190–3.
14. Pickles JC, Hawkins C, Pietsch T, Jacques TS. CNS embryonal tumours: WHO 2016 and beyond. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Februar 2018;44(2):151–62.
15. Korshunov A, Jakobiec FA, Eberhart CG, Hovestadt V, Capper D, Jones DTW, u. a. Comparative integrated molecular analysis of intraocular medulloepitheliomas and central nervous system embryonal tumors with multilayered rosettes confirms that they are distinct nosologic entities. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. Dezember 2015;35(6):538–44.
16. Jakobiec FA, Kool M, Stagner AM, Pfister SM, Eagle RC, Proia AD, u. a. Intraocular Medulloepitheliomas and Embryonal Tumors With Multilayered Rosettes of the Brain: Comparative Roles of LIN28A and C19MC. *Am J Ophthalmol*. Juni 2015;159(6):1065-1074.e1.
17. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, u. a. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*. 23. November 2011;147(5):1066–79.
18. Lambo S, Gröbner SN, Rausch T, Waszak SM, Schmidt C, Gorthi A, u. a. The molecular landscape of ETMR at diagnosis and relapse. *Nature*. Dezember 2019;576(7786):274–80.
19. Neumann JE, Wefers AK, Lambo S, Bianchi E, Bockstaller M, Dorostkar MM, u. a. A mouse model for embryonal tumors with multilayered rosettes uncovers the therapeutic potential of Sonic-hedgehog inhibitors. *Nat Med*. Oktober 2017;23(10):1191–202.
20. Durieux E, Descotes F, Nguyen A-M, Grange JD, Devouassoux-Shisheboran M. Somatic DICER1 gene mutation in sporadic intraocular medulloepithelioma without pleuropulmonary blastoma syndrome. *Hum Pathol*. Mai 2015;46(5):783–7.
21. Avedschmidt SE, Stagner AM, Eagle RC, Harocopos GJ, Dou Y, Rao RC. The Targetable Epigenetic Tumor Protein EZH2 is Enriched in Intraocular Medulloepithelioma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 01 2016;57(14):6242–6.
22. Szurián K, Csala I, Marosvári D, Rajnai H, Dezső K, Bödör C, u. a. EZH2 is upregulated in the proliferation centers of CLL/SLL lymph nodes. *Exp Mol Pathol*. 18. Juli 2018;

23. Zhou L, Wei E, Zhou B, Bi G, Gao L, Zhang T, u. a. Anti-proliferative benefit of curcuminol on human bladder cancer cells via inactivating EZH2 effector. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. August 2018;104:798–805.
24. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D. *Anatomy of the Eye* [Internet]. 2. Aufl. Sunderland: Sinauer Associates; 2001. (Neuroscience). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11120/>
25. Kolb H. *Gross Anatomy of the Eye*. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, Herausgeber. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995 [zitiert 23. Juli 2018]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11534/>
26. Kolb H. *Facts and Figures Concerning the Human Retina*. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, Herausgeber. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995 [zitiert 20. September 2018]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11556/>
27. Kolb H. *Simple Anatomy of the Retina*. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, Herausgeber. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995 [zitiert 20. September 2018]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11533/>
28. Mrinali Gupta. *Retinal Anatomy and Pathology*. 2015. (Developments in ophthalmology).
29. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*. Dezember 2010;10(9):802–23.
30. Tamm ER, Ohlmann A. [Development of the human eye]. *Ophthalmol Z Dtsch Ophthalmol Ges*. September 2012;109(9):911–28.
31. Gilbert S. *Developmental Biology, Development of the Vertebrate Eye*. 6. Aufl. Sunderland: Sinauer Associates; 2000.
32. Hinrichsen KV. *Augenentwicklung*. In: Hinrichsen KV, Beier HM, Breucker H, Christ B, Duncker H-R, Dvořák M, u. a., Herausgeber. *Humanembryologie: Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1990. S. 477–500. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-07815-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-662-07815-0_19)
33. Boncinelli E. Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev*. Juni 1997;7(3):331–7.

34. Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, u. a. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet.* August 1992;1(5):328–32.
35. Bäumer N, Marquardt T, Stoykova A, Spieler D, Treichel D, Ashery-Padan R, u. a. Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Dev Camb Engl.* Juli 2003;130(13):2903–15.
36. Kucerova R, Dorà N, Mort RL, Wallace K, Leiper LJ, Lowes C, u. a. Interaction between hedgehog signalling and PAX6 dosage mediates maintenance and regeneration of the corneal epithelium. *Mol Vis.* 2012;18:139–50.
37. Slavotinek AM. Eye development genes and known syndromes. *Mol Genet Metab.* Dezember 2011;104(4):448–56.
38. Delamere NA. Ciliary Body and Ciliary Epithelium. *Adv Organ Biol.* 1. Januar 2005;10:127–48.
39. Borges- Giampani AS, Giampani J. Anatomy of Ciliary Body, Ciliary Processes, Anterior Chamber Angle and Collector Vessels. In: Rumelt S, Herausgeber. *Glaucoma - Basic and Clinical Aspects* [Internet]. InTech; 2013 [zitiert 23. Juli 2018]. Verfügbar unter: <http://www.intechopen.com/books/glaucoma-basic-and-clinical-aspects/anatomy-of-ciliary-body-ciliary-processes-anterior-chamber-angle-and-collector-vessels>
40. Beebe DC. Development of the ciliary body: a brief review. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1986;105 (Pt 2):123–30.
41. Zhao L, Saitsu H, Sun X, Shiota K, Ishibashi M. Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mech Dev.* Februar 2010;127(1–2):62–72.
42. Foster FS, Zhang M, Duckett AS, Cucevic V, Pavlin CJ. In vivo imaging of embryonic development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Juni 2003;44(6):2361–6.
43. Li X, Noll M. Role of the gooseberry gene in Drosophila embryos: maintenance of wingless expression by a wingless--gooseberry autoregulatory loop. *EMBO J.* Dezember 1993;12(12):4499–509.
44. Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W. Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget.* 12. Januar 2018;9(4):5492–508.
45. Polakis P. WNT signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1. Mai 2012;4(5).

46. Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, u. a. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci*. Januar 2014;21(1):28–31.
47. Stewart GA, Hoyne GF, Ahmad SA, Jarman E, Wallace WAH, Harrison DJ, u. a. Expression of the developmental Sonic hedgehog (SHH) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the SHH receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *J Pathol*. April 2003;199(4):488–95.
48. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo H-W. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers*. 15. Februar 2016;8(2).
49. Ritter-Sovinz P, Temming P, Wackernagel W, Tarmann L, Langmann G, Benesch M, u. a. Retinoblastom: Klinische Symptome, Diagnostik und Management. *Monatsschr Kinderheilkd*. September 2017;165(9):764–71.
50. Havers W. Retinoblastom. In: Seeber S, Schütte J, Herausgeber. *Therapiekonzepte Onkologie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993 [zitiert 22. Juli 2018]. S. 363–6. Verfügbar unter: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-10495-8\\_33](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-10495-8_33)
51. Dimaras H, Kimani K, Dimba EAO, Gronsdahl P, White A, Chan HSL, u. a. Retinoblastoma. *Lancet Lond Engl*. 14. April 2012;379(9824):1436–46.
52. Ursus-Nikolaus Riede, Schäfer H-E. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1999.
53. Raffel C. Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia N Y N*. August 2004;6(4):310–22.
54. Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A. Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15. Februar 2008;14(4):971–6.
55. Cambruzzi E. Medulloblastoma, WNT-Activated/SHH-Activated: clinical impact of molecular analysis and histogenetic evaluation. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg*. Mai 2018;34:809–15.
56. Sahm F, Jakobiec FA, Meyer J, Schimpf D, Eberhart CG, Hovestadt V, u. a. Somatic mutations of DICER1 and KMT2D are frequent in intraocular medulloepitheliomas. *Genes Chromosomes Cancer*. Mai 2016;55(5):418–27.
57. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, u. a. Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter

- Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples. *Cancer Res.* 1. Juli 2015;75(13):2587–93.
58. Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;530:343–63.
59. Kos CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev.* Juni 2004;62(6 Pt 1):243–6.
60. Ma J, Cheng J, Gong Y, Tian L, Huang Q. Downregulation of WNT signaling by sonic hedgehog activation promotes repopulation of human tumor cell lines. *Dis Model Mech.* April 2015;8(4):385–91.
61. Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;530:343–63.
62. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 11. November 1990;18(21):6409–12.
63. Bosch DE, Kilgore MR, Schmidt RA, Swanson PE, Rendi MH, Chang OH. Comparison of Proliferation Markers Ki67 and Phosphohistone-H3 (pHH3) in Breast Ductal Carcinoma In Situ. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2017;25(8):543–7.
64. Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K, Palanisamy M. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci.* August 2012;4(Suppl 2):S307-309.
65. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, u. a. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25. Oktober 2005;102(43):15545–50.
66. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, u. a. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci.* 25. Oktober 2005;102(43):15545–50.
67. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, u. a. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* November 2003;13(11):2498–504.
68. Groth D, Hartmann S, Klie S, Selbig J. Principal components analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;930:527–47.

69. van Schaijik B, Davis PF, Wickremesekera AC, Tan ST, Itinteang T. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *J Clin Pathol*. Januar 2018;71(1):88–91.
70. Feng R, Wen J. Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development. *Biol Chem*. August 2015;396(8):883–91.
71. Hagey DW, Klum S, Kurtsdotter I, Zaouter C, Topcic D, Andersson O, u. a. SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs. *PLoS Genet*. 2018;14(2):e1007224.
72. Lambert NG, Mamalis N, Patel BCK, Ramasubramanian A. Unilateral Retinal Dysplasia Mimicking Retinoblastoma. *J Pediatr*. Dezember 2015;167(6):1449-1449.e1.
73. Jakobiec FA, Zakka FR, D'Amato R, DeAngelis MM, Walton DS, Rao RC. Unilateral sporadic retinal dysplasia: Results of histopathologic, immunohistochemical, chromosomal, genetic, and VEGF-A analyses. *J Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus*. Dezember 2011;15(6):579–86.
74. Pak T, Yoo S, Miranda-Angulo AL, Miranda-Angulo AM, Wang H, Blackshaw S. Rax-CreERT2 knock-in mice: a tool for selective and conditional gene deletion in progenitor cells and radial glia of the retina and hypothalamus. *PloS One*. 2014;9(4):e90381.

## Anhang

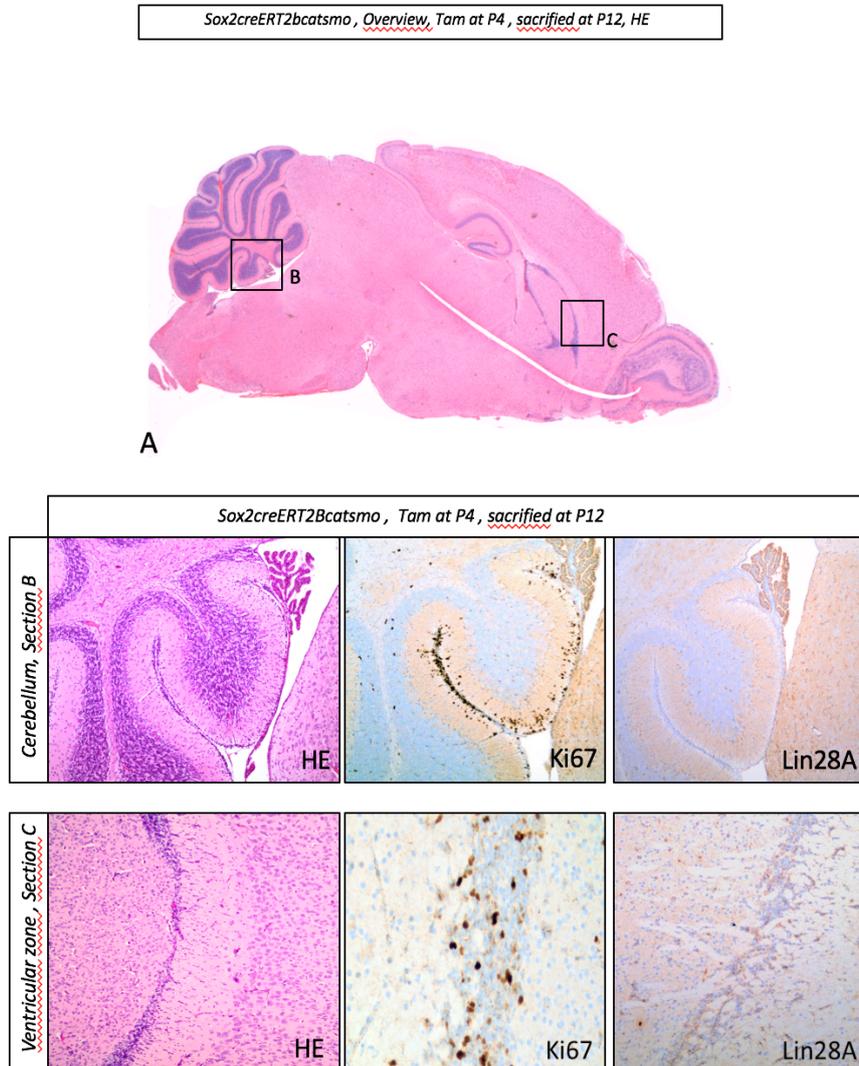


Abbildung 48: Zerebrale Histologie einer Maus an P12

Die Induktion mit Tamoxifen erfolgte an P4. Genotyp der Maus ist *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>Fl/+</sup>*. **A:** HE, Sagittalschnitt des Gehirns in der Übersicht. Hier sind keine größeren Auffälligkeiten zu erkennen; **B:** Cerebellum; **C:** periventriculäre Zone. Mittels HE Färbung zeigen sich keine großen Pathologien. Ki67 ist sowohl im Cerebellum als auch in der ventrikuläre Zone erhöht. LIN28A ist in beiden Bereichen positiv. Es sind keine tumorähnlichen Läsionen oder Rosetten zu erkennen. Dies spricht dafür, dass sich auch im zerebralen Bereich an späteren Induktionszeitpunkten keine Neoplasien mehr induzieren lassen.

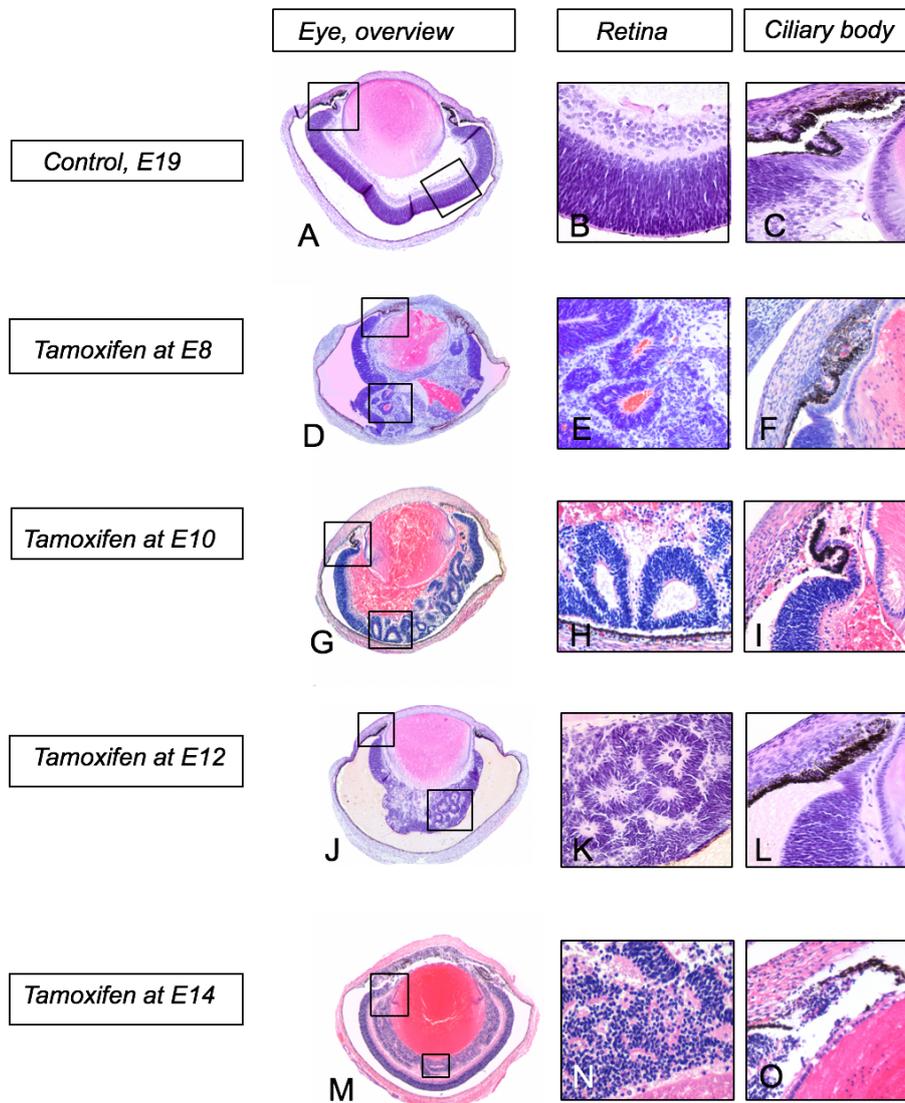


Abbildung 49 Histologie der unterschiedlichen Induktionszeitpunkte.

A, B, C: Kontrolltier an E19.5. Genotyp der untersuchten Tiere D- O: *Sox2cre-ERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>F/+</sup>*. D, E, F zeigen die Induktion der Tiere an E8.5. Hier folgt eine stark fehlgebildete Retina mit Einblutungen und tubulären Strukturen. G, H, I: Die Induktion der Tiere an E10.5 führt ebenfalls zu einer Ausbildung von tubulären Strukturen. Man erkennt zudem eine Einblutung in die hintere Kammer. J, K, L: Die Induktion an E12.5 führt zu einer Ausbildung von mehrschichtigen Rosetten, welche den humanen Tumoren stark ähneln. M,

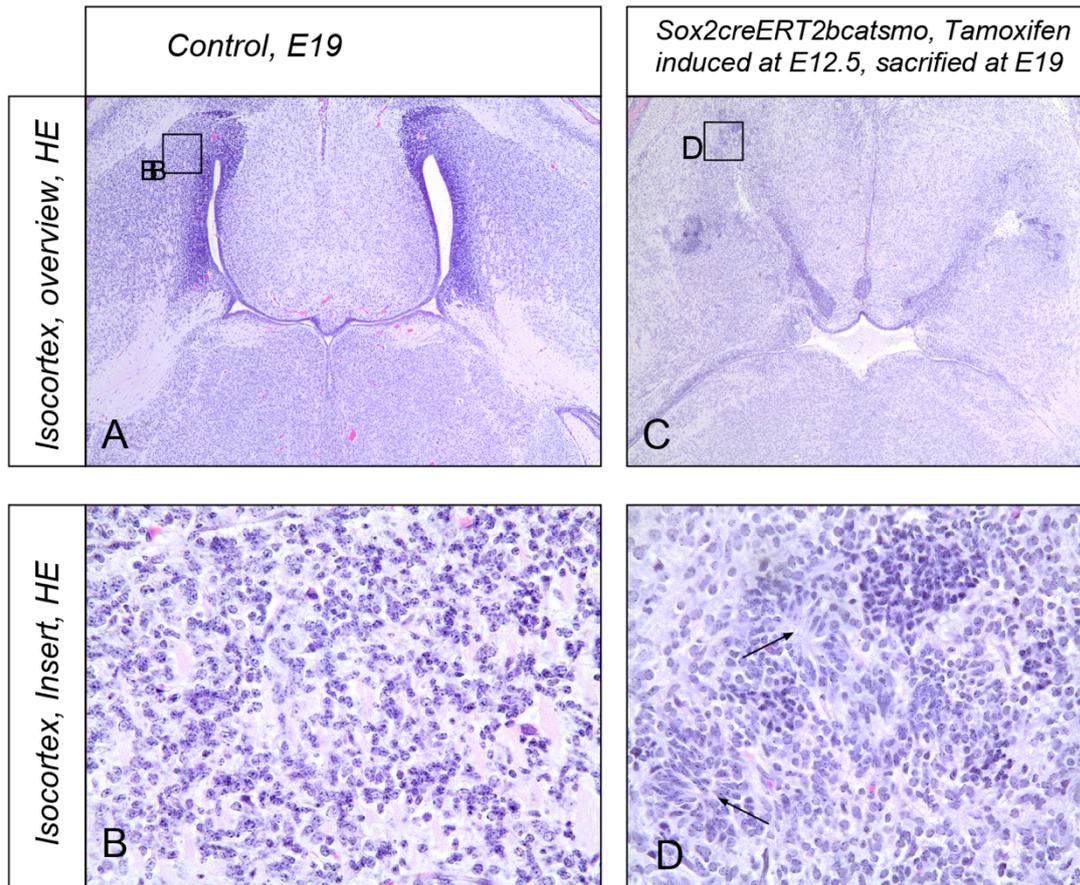


Abbildung 50: Zerebrale Histologie einer an E12.5 mit Tamoxifen induzierten Maus

Genotyp der induzierten Maus: *Sox2creERT2:Ctnnb1(ex3)SmoM2<sup>F/+</sup>*; **A, B**: Kontrolle, HE Aufnahme; **A**: Physiologischer Isokortex in einer Übersichtsaufnahme, **B**: 40-fache Vergrößerung des Isokortex- **C, D**: An 12.5 induziertes Tier, HE Färbung. **C**: Übersichtsaufnahme des veränderten Isokortex. **D**: Pfeile: Mehrschichtige Rosetten, ähnlich den ETMR.

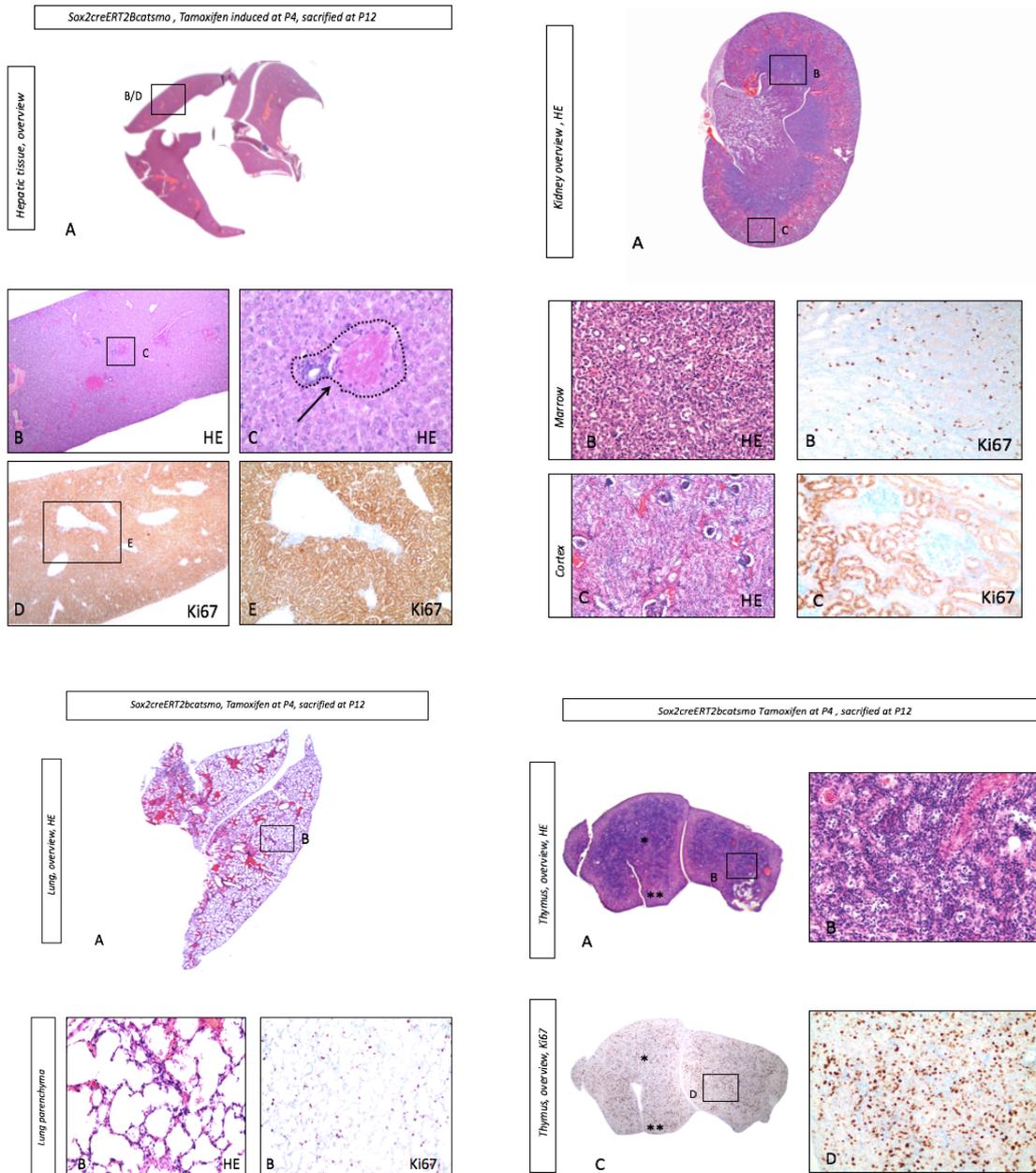


Abbildung 51: Ausgewählte Organsysteme eines an P4 induzierten und P12 präparierten Tieres.

	cytokines and growth factors	transcription factors	homeodomain proteins	cell differentiation markers	protein kinases	translocated cancer genes	oncogenes	tumor suppressors
tumor suppressors	0	4	0	2	0	1	0	20
oncogenes	3	18	1	8	20	36	55	
translocated cancer genes	3	16	1	4	11	38		
protein kinases	2	0	0	10	47			
cell differentiation markers	3	0	0	24				
homeodomain proteins	0	2	2					
transcription factors	0	60						
cytokines and growth factors	45							

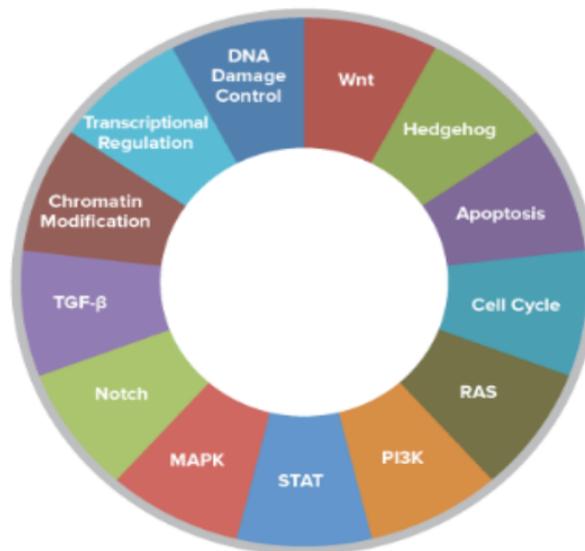


Abbildung 52: Zellsignalwege der Nanostringanalyse

Dargestellt werden die analysierten Signalwege der durchgeführten Nanostringanalyse.

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulrich Schüller bedanken. Mir wurde ein äußerst interessantes und spannendes Thema anvertraut. Ich wurde stets unterstützt und konnte jederzeit Fragen oder Probleme ansprechen. Während der kompletten Zeit wurde mir eine exzellente Betreuung und viel konstruktive Kritik entgegengebracht. Egal zu welcher Uhrzeit, ich bekam stets eine zeitnahe Antwort. Da ich mir darüber bewusst bin, dass das nicht der Normfall ist möchte ich an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön aussprechen!

Dasselbe gilt für meine Betreuerin, Dr. Julia Neumann. Da ich zuvor nur wenig Erfahrung im wissenschaftlichen Arbeiten hatte wurde mir von Frau Dr. Neumann alles von der Pike auf erklärt und beigebracht. Ich kann mir vorstellen, wie anstrengend das war und möchte mich daher auch bei ihr bedanken!

Ich bedanke mich zudem bei Herrn Dr. Jochen Herms für die Möglichkeit, im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung arbeiten zu dürfen. Zusätzlich ein Dankeschön an das Forschungsinstitut für Kinderkrebsforschung in Hamburg, für die Gelegenheit einige Monate in ihren Räumlichkeiten zu forschen.

Vielen Dank zudem an Frau Silvia Occhionero, Frau Pia Schindler und Herrn Michael Schmidt für eure stetige Hilfe und Unterstützung. Ohne Euch wäre das Projekt nicht möglich gewesen. Danke auch an alle anderen, die mir in München und Hamburg geholfen und mit mir zusammengearbeitet haben.

Zusätzlich möchte ich mich bei der Deutschen Krebshilfe für die Aufnahme in das Mildred-Scheel Stipendiaten Programm bedanken. Dies ermöglichte mir, mich diesem Projekt mit vollem Herzblut zu widmen. Zudem vielen Dank an die Kind-Philipp-Stiftung, welche mir die Möglichkeit gab, einen Vortrag in Liverpool auf der ISPNO 2016 zu halten. Hierbei möchte ich zudem die Wichtigkeit dieser Stipendien für die Förderung forschungsinteressierter Studierender hervorheben. Vielen Dank!

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden. Allen voran meinen Eltern und meiner Schwester Caroline für die große Geduld und Unterstützung in der Zeit der Dissertation.

Vielen Dank auch an meinen Mann, der mittlerweile wahrscheinlich alles über intraokuläre Medulloepitheliome weiß.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist, insbesondere dass ich alle Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen sind, durch Zitate als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere auch, dass die von mir eingereichte schriftliche Version mit der digitalen Version übereinstimmt. Weiterhin erkläre ich, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde / Prüfungsstelle vorgelegen hat. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit der Öffentlichkeit zugänglich gemacht wird. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Digitalversion dieser Arbeit zwecks Plagiatsprüfung auf die Server externer Anbieter hoch geladen werden darf.

München, 14.10.2020

Krevet, Julia Andrea