

**Aus der kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
des Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg - Eppendorf
Leitende Ärztin: Frau Dr. med. K. Wenke**

**Korrelation von L1-CAM-Expression
im Neuroblastom mit klinischem Überleben**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinische Fakultät der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Annika Krickhahn

aus Neumünster

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 21.09.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der / die Vorsitzende: PD Dr. D. Kluth

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter / -in: Prof. Dr. T. Strate

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter / -in: Prof. Dr. R. Ertmann

Diese Arbeit widme ich in Liebe
meinen Eltern und meiner Schwester Mareike.

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Desintegrin and Metalloproteinase
B	bone
BM	bone marrow
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EFS	event free survival
FGF	fibroblast growth factor
FH	favourable histology
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	Hämatoxylin Eosin
HRG	High Risk Group
HSS-HRP	high sensitive Streptavidine horseradish peroxidase
IL	Interleukin
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INSS	International Neuroblastoma Pathology Classification
L1-CAM	L1 cell adhesion molecule
LDH	Lactatdehydrogenase
L	liver
LN	lymph node
LOH	loss of heterozygosity
LRG	Low Risk Group
MASA (-Syndrom)	mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumbs
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
MKI	Mitose-Karyorrhexis-Index
MRG	Medium Risk Group
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
NRSS	Neuroblastoma Risk Stratification System
OS	overall survival
PSA	polysialic acid
SIP	small immuno proteine

TBS	tris buffered saline
Trk	Tyrosinkinase
UH	unfavourable histology
VEGF	vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Material und Methoden	7
2.1	Patienten, klinische Daten, Evaluation	13
2.2	Tissue Microarrays	15
2.3	Immunhistochemie	17
2.4	Lichtmikroskopische Analyse	19
2.5	Statistische Auswertung	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Auswertung der klinischen Daten	21
3.2	L1-CAM-Expriemierung in Neuroblastomgewebe	24
3.3	L1-CAM-Expriemierung und Survival	26
3.4	L1-CAM-Expriemierung und Rezidiv & Tod	28
3.5	L1-CAM-Expriemierung und histologisches Grading	29
3.6	L1-CAM-Expriemierung und klinische Charakteristika	30
4	Diskussion	32
4.1	L1-CAM in Neuroblastomgewebe	32
4.2	Overall Survival und Event Free Survival L1-CAM-positiver Neuroblastome	34
4.3	L1-CAM beim Neuroblastom im Vergleich mit L1-CAM bei neuroendokrinen Tumoren des Erwachsenenalters	36
4.4	L1-CAM als Prognosemarker beim Neuroblastom	43
4.5	Immuntherapie als mögliche neue Therapiemodalität bei Neuroblastompatienten; Potetntielle Rolle von L1-CAM	45
5	Zusammenfassung	48
	Literaturverzeichnis	49
	Danksagung	61
	Lebenslauf	62
	Eidesstattliche Versicherung	64

1 Einleitung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter und ist für 8 – 10 % aller malignen Erkrankungen in der Kindheit verantwortlich. Damit ist es der dritthäufigste Tumor bei Kindern unter 15 Jahren und bei einem durchschnittlichen Alter von zwei Jahren bei Diagnosestellung ein typischer Tumor des Säuglings- und frühen Kindesalters (Brodeur et al. 2001). Lediglich 5 % aller Diagnosen betreffen Patienten jenseits des elften Lebensjahres (Conte et al. 2005). Mit seiner Fähigkeit zur Differenzierung in benigne Ganglioneurome sowie der fast ausschließlich bei Säuglingen beobachteten spontanen Regression zeigt das Neuroblastom ein in der gesamten Onkologie äußerst seltenes biologisches Verhalten maligner Tumoren (Evans et al. 1976, D'Angio et al. 1971, Haas et al. 1988). Dieses Phänomen der Involution wird nahezu ausnahmslos bei Neuroblastomen mit intaktem kurzen Arm des Chromosoms 1 und fehlender MYCN-Amplifikation beobachtet (Ambros 1995). Als zugrunde liegende Mechanismen dieses sogenannten *Neuroblastoma in situ* werden neben einer in der Entwicklung verzögert einsetzenden Apoptose (Pritchard et al. 1994) ein H-Ras-vermittelter und Caspase-unabhängiger nichtapoptotischer Zelltod diskutiert (Kitanaka 2002). Als embryonaler Tumor des primitiven sympathischen Nervensystems entsteht das Neuroblastom aus dessen transformierten Progenitorzellen, deren Ursprung in der Neuralleiste liegt. Bezüglich der Pathogenese liegt hier eine Fehlentwicklung auf zellulärer Ebene vor (Brodeur et al. 2001, Carachi 2002, Castleberry 1999, Kushner et al. 2005). Aus der Neuralleiste wandern in der fünften Embryonalwoche als Sympathikoblasten bezeichnete Zellen in verschiedene Regionen der embryonalen Frucht aus, um einen Teil der späteren Pars sympathica des vegetativen Nervensystems zu bilden. Sympathikoblasten sind hierbei die embryonale Vorstufe der paravertebralen sympathischen Grenzstrangganglien, der präaortalen Gangliones coeliacum und mesentericum superior et inferior, der intramuralen Ganglien und sympathischen Nervenplexus von Herz und Lunge sowie der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Sadler 1998). All dies sind mögliche Entstehungsorte des Neuroblastoms, wobei zwei Drittel der Patienten aller Alterstufen mit intraabdominellen Primarien vorstellig werden (Carachi 2002). 45-70 % finden sich abdominal / retroperitoneal, davon 27-36 % adrenal und 18-41 % extra-adrenal, 15 % sind im Thorax / Mediastinum lokalisiert, 7 % im

Hals- und Kopfbereich, 10 % an anderen Lokalisationen. In etwa 7 % der Fälle ist keine Primärlokalisation definierbar (Roald 2001).

Das histopathologische Grading von Neuroblastomen erfolgt nach der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) (Shimada et al. 1999). Aufgrund seiner signifikanten Korrelation mit dem klinischen Verlauf der Patienten sowie einer stärkeren prognostische Aussagekraft hat es sich gegenüber einer Vielzahl anderer Klassifikationssysteme international durchgesetzt (Beckwith et al. 1968, Hughes et al. 1974, Ota et al. 1980, Oppedal et al. 1988). Diese Modifikation des Shimada Systems (Shimada et al. 1984) beinhaltet die Kriterien Gehalt an Schwann-Zellen, Differenzierungsgrad der Neuroblasten und Mitose-Karyorrhexis-Index (MKI) unter Berücksichtigung des Patientenalters. Diesbezüglich werden die Gewebe in Favourable Histology (FH) mit prognostisch niedrigem Risiko sowie Unfavourable Histology (UH) mit prognostisch hohem Risiko kategorisiert.

Nach Hughes et al. erfolgt die histologische Stratifizierung in drei Malignitätsstufen bezüglich des Differenzierungsgrades der Neuroblasten (Hughes et al. 1974).

Das für das Neuroblastom charakteristisch breite klinische Spektrum korreliert eng mit einer Vielzahl wichtiger klinischer und biologischer Faktoren wie Tumorstadium, Patientenalter, Tumorhistologie sowie genetischer Variationen (Brodeur et al.1993, Evans et al. 1987, Shimada et al. 1999). Das Behandlungskonzept ist stets risikobasiert. Grundlage für jede Therapie ist das von der Children's Oncology Group entwickelte Neuroblastoma Risk Stratification System (NRSS), dessen Ursprung das International Risk Grouping System ist (Weinstein et al. 2003, Castleberry et al. 1997). Das weltweit anerkannte Staging System ist das von Brodeur et al. 1988 propagierte und mittlerweile revidierte International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Brodeur et al. 1993). Basierend auf der Analyse von Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, INSS-Stadium, Histopathologie sowie molekularbiologischen Parametern werden die Patienten bezüglich des NRSS in die Low Risk Group (LRG), Medium Risk Group (MRG) oder High Risk Group (HRG) stratifiziert. Die Patienten der drei Risikogruppen bedürfen unterschiedlich intensiver Therapien (Weinstein et al. 2003). Patienten der LRG werden mit minimaler Therapie versorgt. Während im Stadium 4S aufgrund der hohen spontanen Regressionsrate von 85 % (Roald 2001) zunächst eine engmaschige Kontrolle angezeigt ist (Weinstein et al. 2003, Haas et al. 1988), hat sich für die übrigen LRG-Patienten die operative Tumorexstirpation als kurative Methode bewiesen (Losty et al. 1993). Sie spielt nicht nur eine zentrale Rolle für die molekularbiologische Diagnostik

(Hase et al. 2002), sondern führt im Stadium 1 sowie 2A und 2B zu exzellenten Überlebensraten (Perez et al. 2000). Lediglich bis zum zweiten Lebensmonat profitieren Patienten mit rasch progredienten abdominalen Tumoren von früher und intensiver Therapie (Nickerson et al. 2000). In der MRG folgt der chirurgischen Exzision eine minimale postoperative Therapie bestehend aus Chemotherapie, Bestrahlung und 13-cis-Retinsäure je nach klinischem Verlauf und Molekularbiologie (Weinstein et al. 2003, NB 2004 Trial Protocol). Für HRG-Patienten beinhaltet die postoperative Therapie zusätzlich zur aggressiveren Chemotherapie MIBG-Radiotherapie, Ganzkörperbestrahlung sowie autologe Stammzelltransplantation (McCluskey et al. 2005, Matthay et al. 1999, Weinstein et al. 2003). Aktuell wird zusätzlich die Wirksamkeit von STI-571 als Beispiel für Tyrosinkinaseinhibitoren (Vitali et al. 2003), Cyclo-oxygenase (COX)- 2-Inhibitoren (Johnsen et al. 2005), immunoliposomales Medikamententargeting sowie Angiogeneseinhibitoren diskutiert (De Bernardi 2005).

Doch obwohl die Prognose des Neuroblastoms durch erhebliche Erfolge im Bereich Diagnostik und Therapie von LRG- und MRG-Patienten grundsätzlich günstig ist, bleibt sie für die Neuroblastome der HRG trotz intensiver Therapie immer noch schlecht (Matthay et al. 1999, Escobar et al. 2006). Für die INSS-Stadien 3 und 4 betragen die Heilungsraten lediglich 13 bis 38 % (Chan et al. 1997).

Als Basis für Behandlungskonzept und Prognose gilt die Frage, ob das Neuroblastom nach Diagnosestellung weitere Tumorprogression, Differenzierung in ein benignes Ganglioneurom oder spontane Regression zeigt (Grosfeld 2000). In diesem Zusammenhang sind Prognosemarker essentielle Mittel, um Patienten mit unterschiedlichen Risiken zu identifizieren und in die unterschiedlichen Therapiearme zu stratifizieren. Zu diesen Prognosemarkern gehören DNA- und Chromosomenabnormalitäten , Katecholaminabbauprodukte im Urin sowie biologische Marker (Riley et al. 2004). Neben dem Krankheitsstadium, welches üblicherweise nach dem INSS-System stratifiziert (Castleberry 1997) wird, gilt beim Neuroblastom das Patientenalter bei Diagnosestellung als wichtiger unabhängiger Prognosefaktor (Sano et al. 2006). Das Alter korreliert hierbei invers mit der Prognose. Während die Grenze für einen günstigen Verlauf lange Zeit bei 365 Lebenstagen lag, wird aktuell ein Anheben dieser Altersgrenze auf 15-18 Monate gefordert (London et al. 2005, London et al. 2005). Als wichtigster unabhängiger Indikator für eine schlechte Prognose gilt die Amplifikation des MYCN-Onkogens mit einer Inzidenz von ~ 35 % aller Neuroblastome (Schwab et al. 1983,

Vasudevan et al. 2005). Dieser per FISH nachweisbare (Ambros et al. 2003) auf Chromosom 2p23-24 lokalisierte molekulare Marker (Schwab et al. 1984) geht gewöhnlich mit erhöhter MYCN-Expression einher und kodiert ein Nuklearprotein, das als Transkriptionsfaktor fungiert. Dieser Marker korreliert mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium, raschem Tumorwachstum sowie ungünstiger Prognose (Cohn et al. 2004, Schwab 2004).

Auch der chromosomale Verlust der Heterozygotie der chromosomalen Bande 1p36 (LOH 1p) korreliert stark mit einem ungünstigen klinischen Verlauf. Die Abwesenheit eines hier lokalisierten Tumorsuppressorgens ist mit fortgeschrittenem Alter, Metastasierung und MYCN-Amplifikation assoziiert (Fong et al. 1989, Caron et al. 1996, Maris et al. 1995). Als weiterer Prognosemarker gilt mittlerweile die unterschiedliche Expression der Neurotrophin-Rezeptoren Trk A-C (Brodeur et al. 1997, Nakagawara et al. 1993). TrkA wird auf klinisch günstigen Tumoren hoch exprimiert, die sich entweder differenzieren oder spontan zurückbilden (Shimada et al. 2004, Schramm et al. 2005), und auch TrkC scheint eine entscheidende Rolle in der Biologie günstiger klinischer Neuroblastome zu spielen (Yamashiro et al. 1997). Im Gegensatz dazu ist eine erhöhte TrkB-Expression mit ungünstigem, aggressivem Tumorwachstum assoziiert (Schramm et al. 2005). Diese Gruppe routinemäßig analysierter Prognosemarker wird komplettiert durch die histopathologische Untersuchung (Shimada et al. (1999). Ergänzende Erhebungen können die Tumorzellploidie (Weinstein et al. 2003), Deletionen der Chromosome 3, 11 und 14 (Attiyeh et al. 2005, Spitz et al. 2003), Insertion des Chromosoms 17 (Bown et al. 1999), die Katecholammetabolite Vanillin- und Homovanillinmandelsäure im Urin sowie die allgemeinen Tumormarker LDH und Ferritin untersuchen (Riley et al. 2004, Selig et al. 1993).

Das Zelladhäsionsmolekül L1-CAM ist ein transmembranäres Glykoprotein der Immunglobulin-Familie (Moos et al. 1988). Mit einer Größe von 200 kDa besteht es aus sechs extrazellulären Immunglobulin-Domänen gefolgt von vier bis fünf Fibronectin Typ III-Domänen und einem hydrophoben transmembranären Segment mit einem kurzen zytoplasmatischen Anteil bestehend aus 85-147 Aminosäuren. Abb. 1 veranschaulicht die Struktur von L1-CAM.

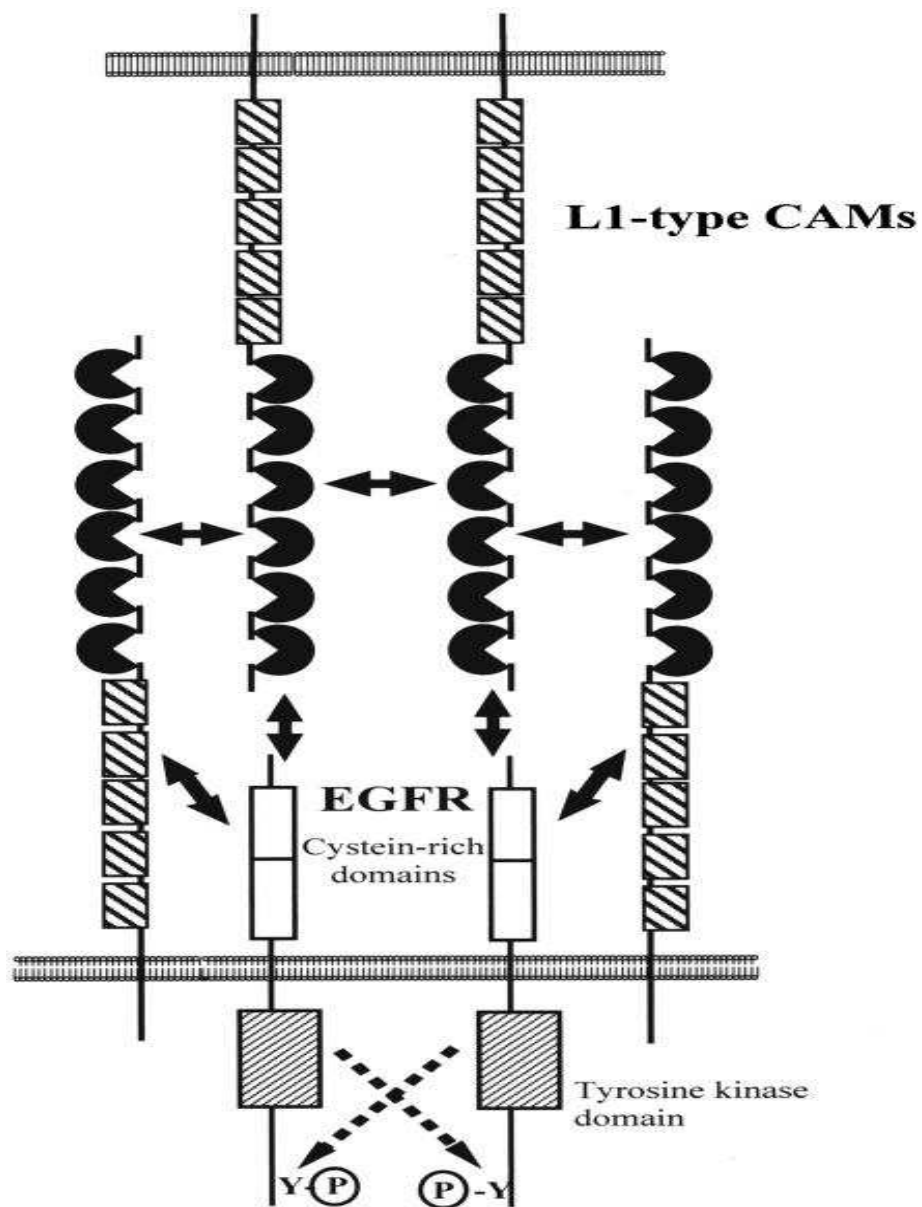


Abb. 1: Struktur von L1-CAM

L1-CAM wird hauptsächlich – wenn auch nicht ausschließlich – auf Zellen des sich entwickelnden peripheren und sympathischen Nervensystems exprimiert. In Neuronen triggert die homophile L1-L1-Interaktion die Aktivierung des neuronalen FGF-Rezeptors. Die resultierende Stimulierung der second-messenger-Kaskade führt zu einer Aktivierung von

Calcium-Kanälen (Williams et al. 1994). Andere extrazelluläre Liganden, die mit L1-CAM interagieren, sind das Matrixmolekül Laminin sowie die Chondroitinsulfatproteoglykane Neurocan und Phosphacan (Hortsch 1996). Über diese und andere Interaktionen spielt L1-CAM eine essentielle Rolle für die Entwicklung des embryonalen Nervensystems, indem es Zellmigration und –adhäsion, Neuritenfaszikulation und Myelinisierung reguliert (Ohnishi et al. 1998, Schachner 1997). Mutationen im L1-CAM-Gen führen zu Hydrozephalus, MASA-Syndrom, spastischer Paraplegie Typ I und mentaler Retardierung (Rosenthal et al. 1992, Jouet et al. 1994, Wong et al. 1995). L1-CAM findet sich ebenfalls auf hämatopoetischen und einigen epithelialen Zellen (Brümmendorf 1998).

Aber auch auf einigen neoplastischen Zellen wird L1-CAM regelmäßig exprimiert und ist hier mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Für Uterus- und Ovarial-Karzinome (Fogel et al. 2003), das kleinzellige Bronchial-Karzinom (Miyahara et al. 2001), Lymphome (Kowitz et al. 1993), Maligne Melanome der Haut (Fogel et al 2003, Thies et al. 2002) sowie neuroendokrine Pankreastumoren (Kaifi et al. 2006) ist die L1-CAM-Expression als signifikanter Indikator für kurzes Overall Survival, rasches Tumorwachstum und hohes Metastasierungspotential beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Expression von L1-CAM beim Neuroblastom als typischem Vertreter kindlicher Tumoren zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben auf Tissue Arrays per immunhistochemischer Färbemethoden untersucht und die zugehörigen Patientendaten statistisch analysiert. Um den L1-CAM-Status auf den klinischen Verlauf zu beziehen, wurden anschließend Event Free Survival (EFS) sowie Overall Survival (OS) mithilfe von Kaplan Meier-Analysen bestimmt. Vor diesem Hintergrund galt es, die folgenden drei Fragen zu klären:

1. Wird L1-CAM auf Neuroblastom-Gewebe exprimiert?
2. Gibt es Tumoren, die L1-CAM weniger oder mehr exprimieren? Wenn ja: korreliert dies mit dem klinischen Verlauf?
3. Eignet sich L1-CAM als möglicher neuer Prognosemarker für Neuroblastom-Patienten?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten , klinische Daten, Evaluation

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf unter der Leitung von Prof. R. Erttmann wurden für diese Arbeit 98 Neuroblastom-Patienten retrospektiv ausgewählt, die dort im Zeitraum von 1992 bis 2005 behandelt wurden. Aus ihren Patientenakten wurden diejenigen klinischen Daten erhoben, die für die Risikogruppenklassifikation sowie die Korrelation mit L1-CAM im späteren Verlauf einzusetzen waren. Hierzu gehörten Angaben zu Primärtumorlokalisation, Metastasierung, Tumorstadium nach INSS, histologische Klassifikation nach Hughes et al., Patientenalter bei Diagnosestellung, MYCN-Amplifikation, Verlust der Heterozygotie des Chromosomes 1 (LOH 1p), Therapie (Chemotherapie , OP, Stammzell-Tx), Event Free Survival (letzter Ambulanzbesuch ohne Krankheitszeichen), Rezidiv, Rezidivzeitpunkt, Tod sowie Todeszeitpunkt. Anschließend erfolgte die Risikogruppenstratifizierung in drei Gruppen bezüglich des Deutschen Neuroblastom 2004 Studienprotokolls (NB 2004 Trial Protocol, Berthold, 2004). Die Einteilung in Observation Group (OG), Medium Risk Group (MRG) oder High Risk Group (HRG) richtet sich hierbei nach dem INSS-Stadium, Alter bei Diagnosestellung, MYCN-Amplifikation sowie LOH 1p. Zur OG gehören demnach Patienten im Stadium 1, 0-21 Jahre, keine MYCN-Amplifikation; oder im Stadium 2, 0-21 Jahre, kein LOH 1p, keine MYCN-Amplifikation; oder im Stadium 3, 0-2 Jahre, kein LOH 1p, keine MYCN-Amplifikation; oder im Stadium 4S, 0-1 Jahr, keine MYCN-Amplifikation. Zur MRG zählen Patienten im Stadium 3, ≥ 2 Jahre, keine MYCN-Amplifikation; oder im Stadium 3, 0-21 Jahre, LOH 1p, keine MYCN-Amplifikation; oder im Stadium 2, 0-21 Jahre, LOH 1p, keine MYCN-Amplifikation; oder im Stadium 4, < 1 Jahr, keine MYCN-Amplifikation. Die HRG beinhaltet Patienten im Stadium 4, ≥ 1 Jahr sowie Patienten jeglichen Alters aller Stadien mit MYCN-Amplifikation.

Abb. 2 zeigt ein Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Risikogruppenstratifizierung.

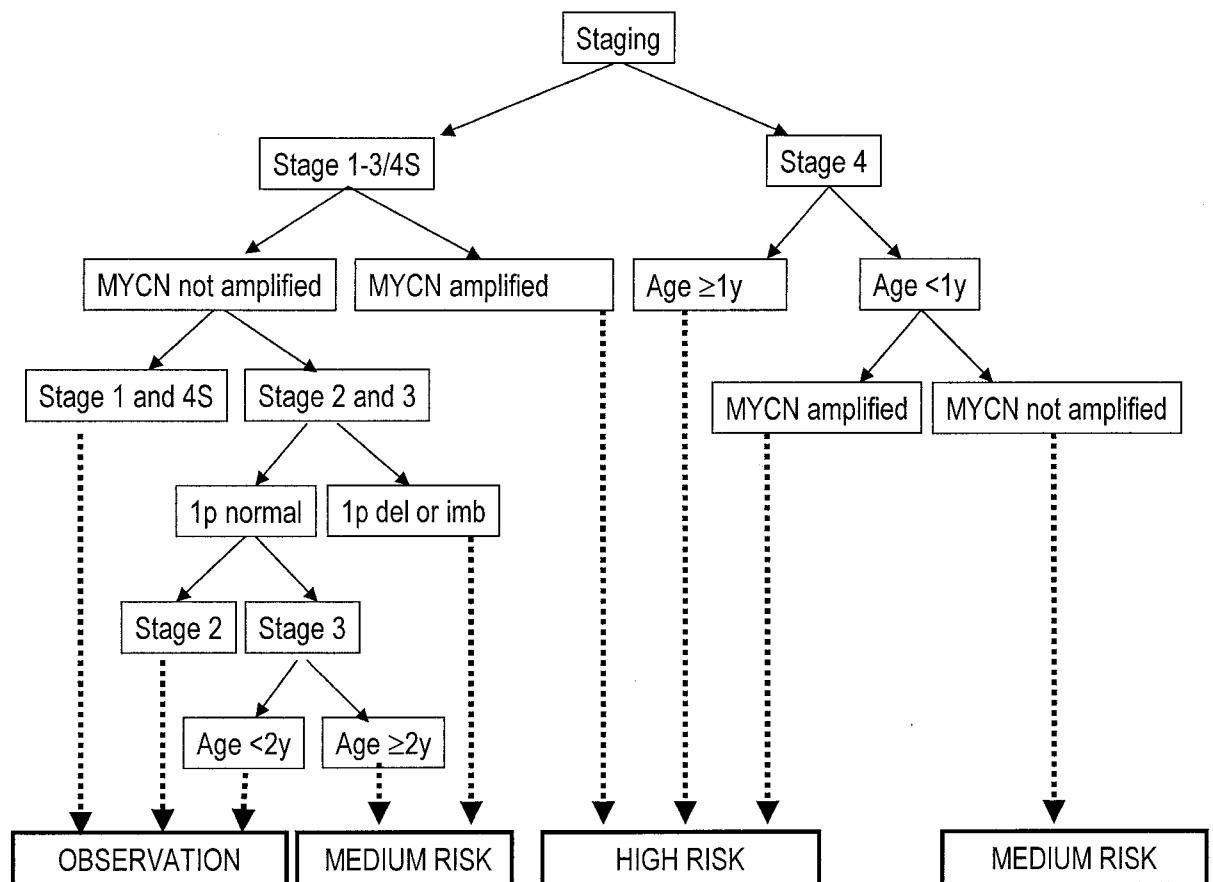


Abb 2: Flussdiagramm zur Risikogruppenstratifizierung in Low Risk Group, Medium Risk Group und High Risk Group; aus *NB 2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma*, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Version 1.00, 01. September 2004

Zusätzlich zu einer teilweise unzureichenden Gewebequalität, die die immunhistochemisch gewonnenen Ergebnisse aus technischen Gründen nicht reproduzierbar machte, war für einige Patienten ein ungenügender Beobachtungszeitraum dokumentiert, so dass das ursprüngliche Kollektiv auf 62 Patienten reduziert wurde.

Demnach ließen sich 43 der in dieser Arbeit untersuchten Patienten (69,4 %) in die OG gruppieren, 5 Patienten (8,1 %) zählten zur MRG, 10 Patienten (16,1 %) wurden in die HRG stratifiziert. Aufgrund mangelnder Datenlage bezüglich LOH 1p konnten 4 (6,5 %) Patienten nicht klassifiziert werden. Tabelle 1 fasst diese Daten zusammen.

Alle Daten wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung der Eltern erhoben.

Risikogruppe	Patienten , n (%)
OG	43 (69,4)
MRG	5 (8,1)
HRG	10 (16,1)
keine Angabe	4 (6,5)

Tab. 1: Risikogruppenstratifizierung der Patienten

2.2 Tissue Microarrays

Um die L1-CAM-Expression der Tumorproben zu bestimmen sowie die histologische Einteilung zu verifizieren, wurden die Gewebe unter Verwendung von Tissue Microarrays untersucht. Die Microarrays wurden im Institut für Pathologie (Universitätsklinik Hamburg Eppendorf) von Dr.A. Quaas unter der Leitung von Prof. G. Sauter angefertigt und mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt. Diese Methode ermöglicht die rasche Untersuchung einer hohen Anzahl von Gewebeproben hinsichtlich einer Vielzahl von Strukturen. Bis zu 1000 zylindrische Gewebebiopsien können mit Hilfe eines Microarrays analysiert werden (Kononen et al. 1998, Theillet 1998). Parallele Serienschnitte des Array-Blockes ermöglichen dann die gleichzeitige Untersuchung von DNA-, RNA- und Proteinstrukturen sowie unterschiedlicher Genexpressionen individueller Proben per Immunhistochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder RNA/RNA-in-situ-Hybridisierung. Bei den insgesamt 160 Proben dieser Arbeit handelte es sich um 120 Tumorproben inklusive Metastasengewebe. 40 gesunde Gewebe bildeten die Kontrollgruppe.

Noch vor Ausstanzen der zu untersuchenden Gewebeproben wurden morphologisch repräsentative Gebiete aus den in Paraffin eingebetteten Tumorblöcken ausgewählt. Dies geschah mittels Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Schnitte, die der Oberfläche des Tumorblocks entstammten. Zur Orientierung wurden diese repräsentativen Areale jeweils markiert. Im zweiten Schritt wurden nun aus diesen Sektoren Gewebeproben entnommen. Die verwendeten

Stanzen hatten dabei einen Durchmesser von 600 μm , die aufgrund ihrer Konstruktion ausschließlich parallel zu ihrer eigenen Achse stanzen konnten. Basierend auf der Markierung des korrespondierenden HE-Schnittes wurde der Tumorblick stets so unter der Stanze positioniert, dass die Entnahme morphologisch repräsentativen Gewebes gewährleistet war. Erst kurz vor dem Stanzvorgang wurde der parallele Schnitt jeweils entfernt.

Die entnommene zylindrische Gewebeprobe wurde anschließend in definierte Array-Koordinaten des Empfängerblockes, einem weiteren Paraffinblock, übertragen. Diesen Vorgang wiederholte man für jeden Donorblock. Um die spätere Interpretation der Array-Analyse zu erleichtern, erfolgte die Anordnung im Empfängerblock durch Gruppierung gleicher Gewebearten (Primärtumoren, Metastasen, Kontrollgewebe). Der Abstand zwischen den einzelnen Elementen im Empfängerblock betrug jeweils 100 μm .

Nachdem die insgesamt 160 Stanzproben, jede mit einem Durchmesser von 600 μm , in den Empfängerblock transferiert worden waren, wurden von diesem durch Gebrauch eines Mikrotomes mehrere parallele Schnitte angefertigt, die in einem späteren Schritt den unterschiedlichen Färbungen unterzogen werden sollten. Die Dicke eines jeden Schnittes betrug hierbei 5 μm . Auf der Blockoberfläche befestigte Klebestreifen erleichterten dabei sowohl die Ablösung des Schnittes vom Mikrotom als auch die Übertragung auf die Objektträger. Schließlich wurden die Klebestreifen entfernt, so dass die Arrays für die histologische Beurteilung und Immunhistochemie präpariert waren.

Abb. 3 zeigt ein Schema der Tissue Microarray-Methode nach Kononen et al., 1998.

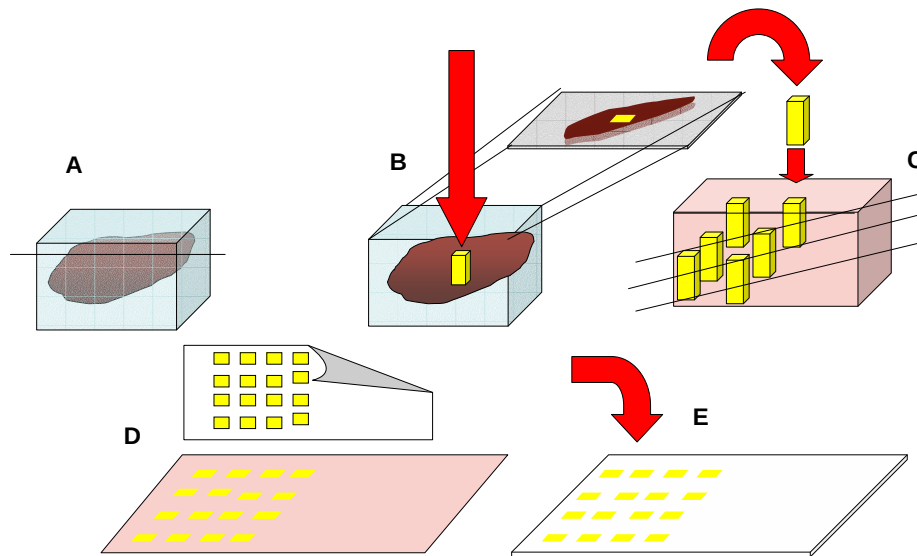


Abb. 3: Methode der Tissue Microarrays, modifiziert nach Kononen et al. (1998), *Nature Medicine* 4(7): 844-847

- A: horizontaler Schnitt aus Oberfläche des Tumorblockes, welcher lichtmikroskopisch begutachtet wird
- B: Ausstanzen der Gewebeprobe aus morphologisch repräsentativen Arealen
- C: Übertragung der Gewebeprobe in definierte Array-Koordinaten des Empfängerblockes, Anfertigen paralleler Serienschritte
- D: Übertragung der Gewebeprobe auf Klebestreifen
- E: Übertragung der Serienschritte auf Objektträger mittels Klebestreifen

2.3 Immunhistochemie

Um zu gewährleisten, dass es sich bei den Serienstanzen um repräsentatives Neuroblastom-Gewebe handelt, wurden zunächst die gängigen Marker S 100 sowie NSE nachgewiesen. Hierzu wurden die 5 µm dicken Schnitte der Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe

unter Verwendung von 3-Triethoxysilylpropylamin (Merck, Darmstadt, Deutschland) immunhistochemisch gefärbt.

Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung zum Nachweis von L1-CAM. Als Primärantikörper wurde der monoklonale IgG1 anti-humane Antikörper UJ 127.11 verwendet, der an die Ektodomäne von L1-CAM bindet (NeoMarkers, Fremont, California, USA, Cat.-No.: MS-770-P1, Verdünnung 1:50 in Dako's Antibody Diluent (Dako, Cat.-No.: S0809)). Die Immunfärbung erfolgte mit Hilfe des Biotin-Streptavidin-Amplifikations-Nachweissystems. Zunächst wurden die Paraffinschnitte deparaffinisiert und rehydriert. Dazu wurde auf die Schnitte 4x 5 Minuten Rotihistol (Carl Roth GmbH-Co) aufgetragen. Im Anschluss wurde eine absteigende Alkoholreihe angewendet, die mit 3x 3 minütiger Verwendung von 100%igem EtOH begann, gefolgt von jeweils 2x 3 Minuten 95%iges, 80%iges und 70%iges EtOH und abgeschlossen wurde durch ein Abspülen mit Aqua dest. für 2 Minuten. Zur Säuberung der Zelloberfläche wurden die Schnitte danach für 5 Minuten mit TBS-Puffer, (0,05 mol, pH 7,6 mit 0,1%igem Tween 20) gewaschen.

Mit dem Ziel der Demaskierung wurden die Gewebeschnitte nun vorbehandelt. Dafür wurden sie für 30 Minuten in 1%igem NH₄/TBS (0,05 mol, pH 7,6, ohne Tween 20) und anschließend 5 Minuten in TBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde durch Waschen in 0,05 molarem Glycin/TBS (0,05 mol, pH 7,6, ohne Tween 20) für 15 Minuten und 5 Minuten in TBS wiederholt. Dann wurden die Schnitte für 10 Minuten im Citratpuffer in der Mikrowelle inkubiert (pH 6,0; Dako, ChemMate Target Retrieval Solution, Cat.No.: S2031, zehnfach konzentriert, 40 ml verdünnt auf 400 ml) und abschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

Nun erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität unter Verwendung des HRP-AEC Mouse Kit (R&D Systems, Cat.No.: CTS003). Im Anschluss an ein 5minütiges Waschen mit Peroxidase Blocking Reagent (Part 865005) (nicht länger als 5 Minuten) wurden die Schnitte für 5 Minuten mit TBS und dann für 15 Minuten mit Serum Blocking Reagent D (Part 865015) gewaschen. Die Schnitte ließ man jetzt nur abtropfen. Danach erfolgte ein Waschen mit Avidin Blocking Reagent (Part 865009) für 15 Minuten, gefolgt von TBS für 1 Minute, Biotin Blocking Reagent (Part 865008) für 15 Minuten und abschließend erneut mit TBS für 1 Minute.

Jetzt wurde der Primärantikörper mit Hilfe eines hintergrundreduzierenden Antikörper-Verdünnungsmediums im Verhältnis 1:50 verdünnt und auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Diese wurden dann 45 Minuten in einer feuchten Kammer gelagert.

Die Negativ-Kontrollen erfolgten mit Hilfe von MOPC, welches im Verhältnis 1:200 im Antikörper-Verdünnungsgemisch (Dako, Cat.No.: S0809) verwendet wurde.

Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal 3-5 Minuten mit TBS gewaschen.

Als Sekundär-Antikörper wurde ein biotinylierter Multi-Link-Antikörper (Part 865001) auf die Schnitte aufgetragen. Es folgte eine 45 minütige Inkubation. Nach dreimaligem Waschen mit TBS der Dauer 3-5 Minuten wurde der „Tertiärantikörper“, die hoch sensitive Meerrettichperoxidase (HSS-HRP, High Sensitive Streptavidin-HRP Conjugate) (Part 865006) aufgetragen und dies für 30 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden erneut dreimal für 2 Minuten mit TBS gewaschen.

Als Färbesubstrat wurde in 14 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2) und 0,15 ml 3% H₂O₂ gelöste AEC Chromogen Solution (Part 860004) verwendet, welches durch die enzymatische Wirkung der Peroxidase in einen bräunlichen Farbstoff umgewandelt wird. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten. Um eine ausreichende Intensität der Gewebefärbung zu gewährleisten, wurde dies lichtmikroskopisch intermittierend kontrolliert. Dann wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült.

Nun erfolgte die Kernfärbung mit Hämalun nach Mayer (Sigma, Cat.No.: MHS-16). Die Schnitte wurden vertikal auf Filterpapier getrocknet, so dass überschüssiges Färbemedium ablaufen konnte. Schließlich waren sie zur lichtmikroskopischen Analyse bereit.

2.4 Lichtmikroskopische Analyse

Im Rahmen der jetzt folgenden lichtmikroskopischen Analyse wurde zunächst die Verifikation der aus den Patientenakten gewonnenen histologischen Einteilung vorgenommen. Dies geschah im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) durch Dr. A. Quaas. Anschließend wurden die Gewebe in L1-CAM-positiv und L1-CAM-negativ unterteilt. Dabei galt es, die zwei beobachteten Färbereaktionen der Gewebeproben zu berücksichtigen: Zum Einen wurde eine zelluläre Färbereaktion der Tumorzellen beobachtet, zum Anderen zeigte sich

eine Färbereaktion der Neurofibrillen. Beide Reaktionsmuster waren spezifisch, so dass die Gewebe demnach als L1-CAM-positiv klassifiziert wurden. Diese Einteilung wurde durch drei unabhängige Untersucher vorgenommen (Dr. HC Fiegel, Dr. J. Kaifi, Dr. A. Quaas).

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von SPSS für Windows (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Das vorliegende Ergebnis der retrospektiven Studie von 62 Neuroblastom-Patienten hatte zensierte Überlebenszeiten zu berücksichtigen, da am Stichtag der Auswertung für nicht alle eingeschlossenen Patienten die tatsächlichen Überlebenszeiten zur Verfügung standen. Gerade diese zensierten Überlebenszeiten bilden ein Problem bei der Berechnung von Überlebensraten. Ein Verfahren, das es gestattet, sie in die Berechnung sinnvoll einzubeziehen, ist das Schätzverfahren von E. Kaplan und P. Meier. Eine entsprechende graphische Darstellung dient der Veranschaulichung der Überlebensraten in Abhängigkeit von der Zeit. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode entwarfen wir Überlebenskurven für Overall Survival und Event Free Survival der Patienten und analysierten unter Verwendung des log-rank Tests. Des Weiteren wurden unter Verwendung des X^2 -Tests (für zwei Variablen) und des Exakten Tests nach Fisher (für mehr als zwei Variablen) Kreuztabellenstatistiken entworfen. Signifikante Aussagen dieser Arbeit beziehen sich auf p- beziehungsweise F-Werte bei zweiseitigen Tests, die $< 0,05$ waren.

3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung der Patientenakten der in diese Studie eingeschlossenen 62 Neuroblastom-Patienten. Nach dem immunhistochemischen Nachweis von L1-CAM im Tumorgewebe galt es, eine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und L1-CAM-Status zu untersuchen.

3.1 Auswertung der klinischen Daten

Die Erhebung der klinischen Daten aus den Patientenakten ergab die folgenden Ergebnisse, die in Tab. 2 wiedergegeben sind.

22 (35 %) der 62 retrospektiv analysierten Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 1 Jahr alt, 40 (65%) Patienten waren älter. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug 30,0 Monate.

Die Analyse der Primärtumorlokalisationen ergab 34 Patienten (55%) mit adrenalen Primarien, 13 (21%) lagen im thorakalen Bereich, 11 (18%) waren abdominal lokalisiert, 2 Tumoren (3%) waren cervikalen Ursprungs, für 2 Patienten (3%) fanden sich keine Angaben.

Die Auswertung des Metastasierungsstatus ergab zusammenfassend 24 Patienten (39%) mit metastasierten Neuroblastomen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, bei 37 Patienten (60%) lag eine auf den Primärtumor begrenzte Erkrankung vor. Für einen Patienten (1%) existiert diesbezüglich keine Daten.

26 Patienten (42%) wurden in das INSS-Stadium 1 gruppiert, 16 (26%) in das Stadium 2, 10 (16%) erfüllten die Kriterien des Stadium 3, 5 (8%) diejenigen des Stadium 4, 5 Patienten (8%) stratifizierte man in das Stadium 4S.

Die Daten bezüglich des histologischen Gradings nach Hughes et al. lieferten zusammenfassend 23 Patienten (37%) mit einem Neuroblastom Grad I, 15 (24%) Patienten mit Grad II, 21 (34%) mit Grad III, von drei (5%) Patienten konnte das Tumorgewebe nicht klassifiziert werden, so dass diesbezüglich keine Information vorlag.

Die Ermittlung des LOH1p- und MYCN-Status fiel wie folgt aus: 11 Tumorgewebe (18%) zeigten einen Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 1, eine MYCN-Amplifikation war für 9 Patienten (15%) dokumentiert.

Ein Rezidiv erlitten 7 der 62 Patienten (11%).

Im Verlauf des Beobachtungszeitraums verstarben 6 der 62 Patienten (10%). 54 (86%) hingegen überlebten rezidivfrei.

Das durchschnittliche Overall Survival aller 62 untersuchten Patienten betrug 67,4 Monate.

3.2 L1-CAM-Exprimierung in Neuroblastom-Gewebe

Die im Anschluss folgende immunhistochemische Färbung der Tissue Microarrays ermöglichte den Nachweis von L1-CAM im untersuchten Neuroblastom-Gewebe.

Hierbei zeigten sich zwei verschiedene Färbereaktionen in den Gewebeproben: zum Einen konnte eine zelluläre Färbereaktion der Tumorzellen beobachtet werden, des Weiteren präsentierten sich Färbereaktionen der Neurofibrillen. Beide Reaktionen erwiesen sich als spezifisch für L1-CAM, so dass die Tumoren im Falle eines positiven Färbeergebnisses als L1-CAM-positiv klassifiziert wurden.

Von den in dieser Arbeit gefärbten 62 Neuroblastom-Proben wiesen 53 Gewebe (86%) eine L1-CAM-Exprimierung auf und wurden somit als L1-CAM-positiv eingestuft. 9 (14%) Tumoren zeigten keine L1-CAM-Exprimierung. Sie bildeten demnach die L1-CAM-negative Gruppe.

Abb. 4, 5 und 6 zeigen exemplarisch Ausschnitte eines mit Peroxidase gegen L1-CAM gefärbten Tissue Microarrays und die einfache Unterscheidung zwischen L1-CAM-positivem und L1-CAM-negativem Gewebe.

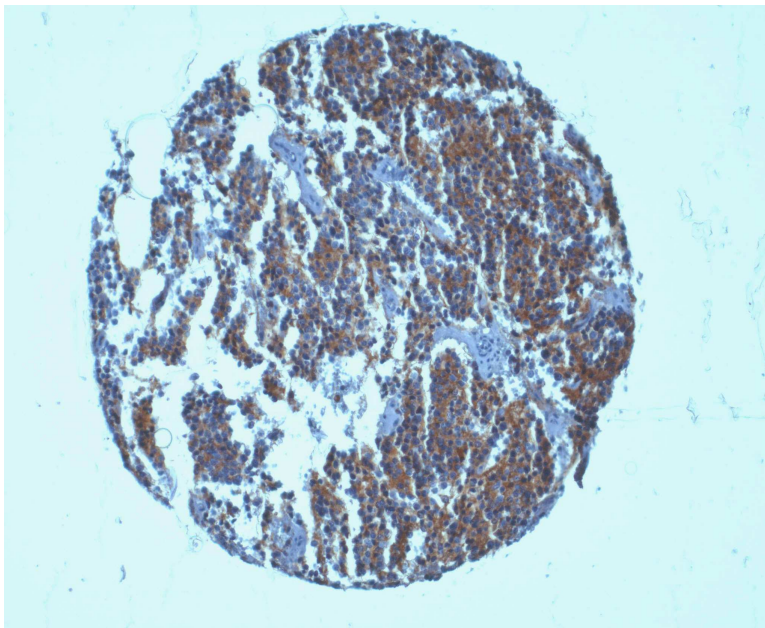


Abb. 4: lichtmikroskopische Darstellung eines L1-CAM-positiven stromaarmen Neuroblastoms mit spezifischem Färbemuster von Neurofibrillen und undifferenzierte Tumorzellen mit niedrigem MKI, Grad III

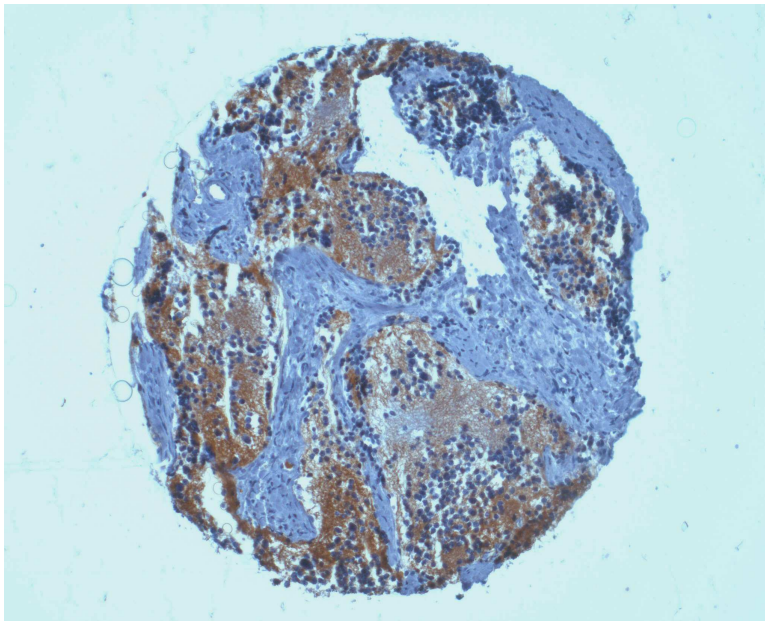


Abb. 5: lichtmikroskopische Darstellung von L1-CAM-positivem stromareichem Tumor mit Tellnestern mit hohem MKI, Grad II

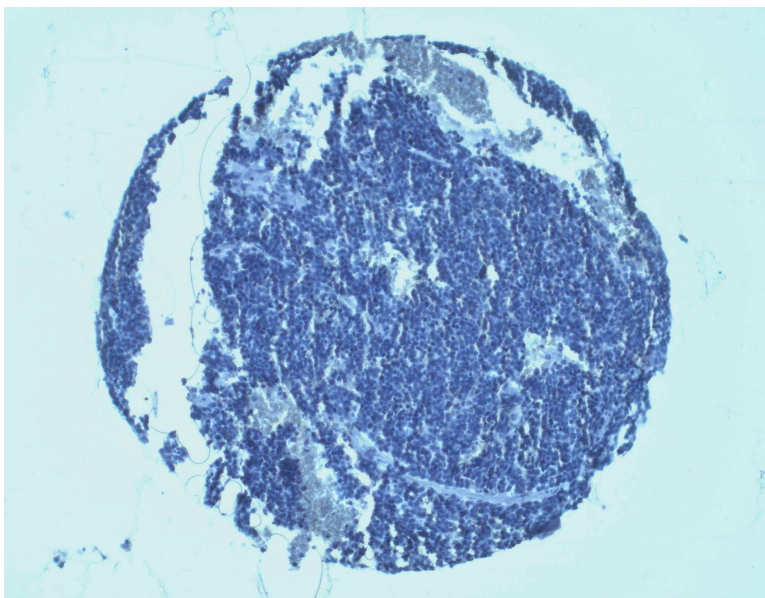


Abb. 6: lichtmikroskopische Darstellung eines L1-CAM-negativen stromaarmen Tumors mit diffus verteilten gering differenzierten Tumorzellen, Grad III

3.3 L1-CAM-Exprimierung und Survival

Mit Hilfe statistischer Analysen galt es nun, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem L1-CAM-Status der Patienten und ihrem klinischen Verlauf zu ermitteln. Um diese eventuelle Korrelation zu untersuchen wurden im folgenden Schritt Kaplan Meier-Überlebenskurven entworfen. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde durch Anwendung des log rank-Tests sowie ANOVA untersucht.

Bezüglich des Overall Survivals zeigten die Kaplan Meier-Kurven statistisch signifikant bessere Ergebnisse für Patienten, deren Neuroblastome L1-CAM-Exprimierung aufwiesen im Vergleich mit dem L1-CAM-negativen Patientenkollektiv ($p = 0,0001$ im log rank-Test). Patienten, deren Tumoren L1-CAM exprimierten, lebten deutlich länger als die L1-CAM-negative Gruppe. Erstere überlebten durchschnittlich $73,1 \pm 31,1$ Monate. Indessen betrug der durchschnittliche Überlebenszeitraum Letzterer lediglich $43,4 \pm 44,5$ Monate ($p = 0,016$ mit ANOVA).

Abb. 7 stellt dieses Ergebnis in der zugehörigen Überlebenskurve dar.

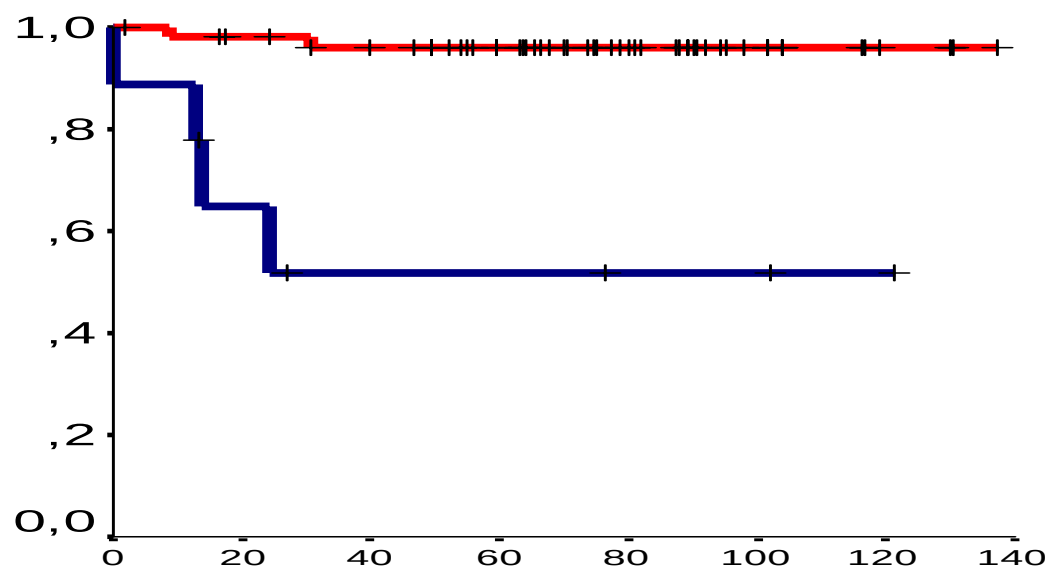


Abb. 7: Kaplan Meier-Kurve für das Overall Survival in Monaten ; $p < 0,0001$

rote Kurve: L1-CAM-positive Patienten ($n = 53$)

blaue Kurve: L1-CAM-negative Patienten ($n = 9$)

Betrachtet man das Event Free Survival, zeigt die zugehörige Kaplan Meier-Kurve auch in diesem Fall ein statistisch signifikant besseres Resultat für Patienten mit L1-CAM-positiven Neuroblastomen verglichen mit L1-CAM-negativen ($p = 0,0022$ im log rank-Test). Erstere erlitten signifikant seltener ein Rezidiv oder verstarben, dies betraf lediglich 9 der 62 Patienten (15%).

Das durchschnittliche Event Free Survival der Patienten mit L1-CAM-Exprimierung betrug $68,5 \pm 32,8$ Monate. Das der L1-CAM-negativen Gruppe $42,3 \pm 45,2$ Monate ($p = 0,040$ mit ANOVA).

Abb. 8 demonstriert dieses Ergebnis. Tab. 3 fasst die Überlebenszeiträume zusammen.

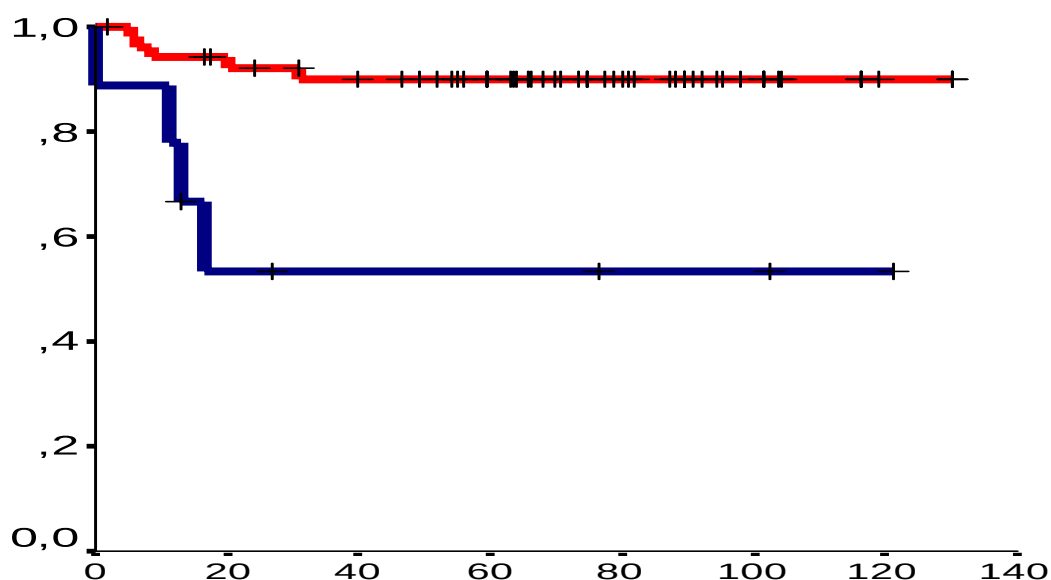


Abb. 8: Kaplan Meier-Kurve für das Event Free Survival in Monaten ; $p=0,0022$

rote Kurve: L1-CAM-positive Patienten ($n = 53$)

blaue Kurve: L1-CAM-negative Patienten ($n = 9$)

Tab. 3: Event Free Survival sowie Overall Survival und L1-Status

	L1-CAM-negativ ($n=9$)	L1-CAM-positiv ($n=53$)
Event Free Survival	$42,3 \pm 45,2$ Monate	$68,5 \pm 32,9$ Monate
Overall Survival	$43,4 \pm 44,5$ Monate	$73,2 \pm 31,1$ Monate

Zusammenfassend ergaben sich also statistisch signifikant bessere Überlebensraten für das L1-CAM-positive Patientenkollektiv gegenüber dem L1-CAM-negativen. Dies betrifft sowohl das Overall Survival als auch das Event Free Survival.

3.4 L1-Exprimierung und Rezidiv & Tod

Von den 62 untersuchten Patienten erlitten 7 (11%) während des Beobachtungszeitraumes ein Rezidiv. 4 davon verstarben. 2 weitere Patienten verstarben bereits an ihrem Primärtumor. 2 der insgesamt 6 verstorbenen Patienten (33%) hatten L1-CAM-positive Neuroblastome, 4 (67 %) waren L1-CAM-negativ.

Unter den 7 Rezidiv-Patienten befanden sich 4 (57%), für die L1-CAM-Positivität zu verzeichnen war, bei 3 (43%) fand sich keine L1-CAM-Exprimierung., dargestellt in Tab. 4.

Tab. 4: L1-CAM-Status der Patienten mit Event

Ereignis	Patienten (n (%))	davon L1-CAM-positiv (n (%))	davon L1-CAM-negativ (n (%))
Rezidiv	7 (11)	4 (57)	3 (43)
Tod	6 (10)	2 (33)	4 (67)

Insgesamt 53 Patienten (86%) erlitten weder Tod noch Rezidiv, sie blieben somit während des Beobachtungszeitraumes event free. In diesem klinisch günstigen Kollektiv hatte die signifikante Mehrheit von 48 Patienten (91%) L1-CAM-positive Tumoren, 5 (9%) erwiesen sich als L1-CAM-negativ.

Tab. 5: L1-CAM-Status der Patienten mit Event Free Survival

	Patienten (n (%))	davon L1-CAM-positiv (n (%))	davon L1-CAM-negativ (n (%))
Event Free Survival	53 (86)	48 (91)	5 (9)

Auch an dieser Stelle ergab die Analyse eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Event (Rezidiv und / oder Tod) und L1-CAM-Status der Neuroblastom-Patienten ($p = 0,0020$ im Fisher Exact-Test).

L1-CAM-positive Tumoren fanden sich somit signifikant häufiger bei rezidivfrei überlebten Patienten im Vergleich mit dem Event-Patientenkollektiv. Dies ist in Tab. 5 dargestellt.

3.5 L1-CAM-Exprimierung und histologisches Grading

Es wurde in allen drei nach Hughes et al. unterschiedenen histologischen Graden immunhistochemisch L1-CAM-Exprimierungen nachgewiesen. Hierbei ließ sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen L1-CAM-Status der Patienten und histologischem Grad ihres Neuroblastoms feststellen.

Tab. 6 zeigt die folgenden Ergebnisse: 21 (91%) der 23 Grad I- Tumoren exprimierten L1-CAM. Unter den 15 Grad II- Neuroblastomen zeigten sich 13 (87%) als L1-CAM-positiv. In der Gruppe der Grad III-Tumoren fanden sich 18 (86%) L1-CAM-positive.

Tab. 6: L1-CAM-Status in unterschiedlichen histologischen Graden nach Hughes et al.

histologischer Grad nach Hughes et al.	Patienten (n (%))	L1-CAM-positive Tumoren (n (%))
Grad I	23 (37)	21 (91)
Grad II	15 (24)	13 (87)
Grad III	21 (34)	18 (86)

3.6 L1-CAM-Exprimierung und klinische Charakteristika

Zusätzlich galt es, den Zusammenhang zwischen klinischen Charakteristika und L1-CAM-Exprimierung zu ermitteln. Hierbei waren insbesondere die etablierten Risikofaktoren MYCN-Amplifikation und LOH1p, die Risikogruppen bezüglich des Deutschen Neuroblastom Studienprotokolls 2004 aber auch das Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von Interesse. Die Resultate sind in Tab. 7 dargestellt.

20 (91%) der 22 Patienten < 1 Jahr bei Diagnosestellung wiesen in ihrem Tumorgewebe eine Exprimierung von L1-CAM auf. Unter den 40 älteren Patienten waren 33 (83%) L1-CAM-positiv.

Die Analyse der Risikogruppen (OG, MRG, HRG) ergab 39 (91%) der 43 OG-Patienten mit L1-CAM-positiven Neuroblastomen, 4 (80%) der 5 MRG-Patienten, unter den 10 Patienten der HRG fanden sich 6 (60 %) mit L1-CAM-positiven Tumoren.

Für 9 Patienten des Gesamtkollektivs war eine Amplifikation des Risikofaktors MYCN dokumentiert. 5 (56%) davon wiesen eine L1-CAM-Exprimierung auf.

Für insgesamt 11 Patienten war ein Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 1 verzeichnet. Unter ihnen fanden sich 8 (73%) L1-CAM-positive Tumorgewebe.

Tab. 7: L1-CAM-Status bei ausgewählten klinischen Charakteristika

	Patienten (n (%))	L1-CAM-positive Tumoren (n (%))
Gesamtkollektiv	62	53 (86)
bei Diagnose < 1 Jahr	22 (36)	20 (91)
bei Diagnose > 1 Jahr	40 (65)	33 (83)
Risikogruppe bzgl. des Deutschen Neuroblastom 2004 Studienprotokolls		
Observation Group (OG)	43 (74)	39 (91)
Middle Risk Group (MRG)	5 (9)	4 (80)
High Risk Group (HRG)	10 (17)	6 (60)
Risikofaktoren:		
MYCN-Amplifikation	9 (15)	5 (56)
LOH-1p	11 (20)	8 (73)

Es wurde an dieser Stelle keine statistisch signifikante Korrelation zwischen L1-CAM-Exprimierung und Alter bei Diagnosestellung, Risikogruppenzugehörigkeit und den Risikofaktoren MYCN-Amplifikation und Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 1 beobachtet.

Es fand sich jedoch eine geringerer Prozentsatz von L1-CAM-positiven Patienten in der klinisch ungünstigen HRG (60%) sowie unter den Patienten mit positiven Risikofaktoren MYCN-Amplifikation (56%) und LOH1p (73%) als bei Studienbeginn erwartet. Weiterhin zeigten MYCN-positive Patienten mit L1-CAM-Expression deutlich längere Überlebenszeiten verglichen mit der L1-CAM-negativen Gruppe. Alle diese Patienten überlebten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von L1-CAM auf Neuroblastom-Gewebe untersucht. Insbesondere die Analyse seines Einflusses auf den klinischen Verlauf von 62 Patienten erbringt überraschende Ergebnisse. Im Rahmen der Risikogruppenstratifizierung von Neuroblastom-Patienten könnte L1-CAM als Prognosemarker zukünftig eine bedeutende Rolle spielen.

4.1 *L1-CAM in Neuroblastom-Gewebe*

Durch immunhistochemische Färbungen von Tissue Microarrays erfolgt in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von L1-CAM auf Neuroblastom-Gewebe. Aktuell finden sich in der Literatur diesbezüglich lediglich Berichte von Tumoren, die nahezu ausnahmslos im Erwachsenenalter auftreten (Fogel et al 2003, Thies et al. 2002, Miyahara et al. 2001, Allory et al. 2005, Kowitz et al. 1993, Kaifi et al. 2006). Gutwein et al. beschrieben 2000 die L1-CAM-Expression auf der Zelloberfläche von humanen Neuroblastom-Zelllinien (Gutwein et al. 2000). Wir können nun L1-CAM auf dem von uns untersuchten Originaltumorgewebe nachweisen. Damit ist das Neuroblastom bis dato der einzige solide Tumor des Kindesalters, für den dies bekannt ist. Da der Ursprung dieser malignen embryonalen Neubildung entartete Zellen der Neuralleiste sind, kann dieses Ergebnis jedoch nachvollzogen werden. Denn L1-CAM ist ein Marker des sich entwickelnden Nervensystems.

Unser Verständnis über das transmembranäre neuronale Ig-Zelladhäsionsmolekül L1-CAM konnte in den vergangenen Jahren stark erweitert werden. Zu Beginn der 1980er Jahre wurde es erstmals im Nervensystem entdeckt (Lindner et al. 1983, Rathjen et al. 1984). In den folgenden Jahren wurde zunächst seine zentrale Rolle in der Entwicklung des Nervensystems in zahlreichen Untersuchungen intensiv erforscht und belegt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Migration unreifer Neurone und deren Adhäsion als auch der statische Zusammenhalt benachbarter Axone und ihre Myelinisierung durch die Interaktion von L1-CAM mit zahlreichen Liganden reguliert werden (Lindner et al. 1983, Rathjen et al. 1984, Hortsch 1996, Schachner 1997, Walsh et al. 1997, Brümmendorf et al. 1998, Ohnishi et al.

1998). Abb. 9 zeigt exemplarisch das histologische Bild eines adulten Nerven und das reichliche Vorkommen von L1-CAM in seinen Myelinscheiden.

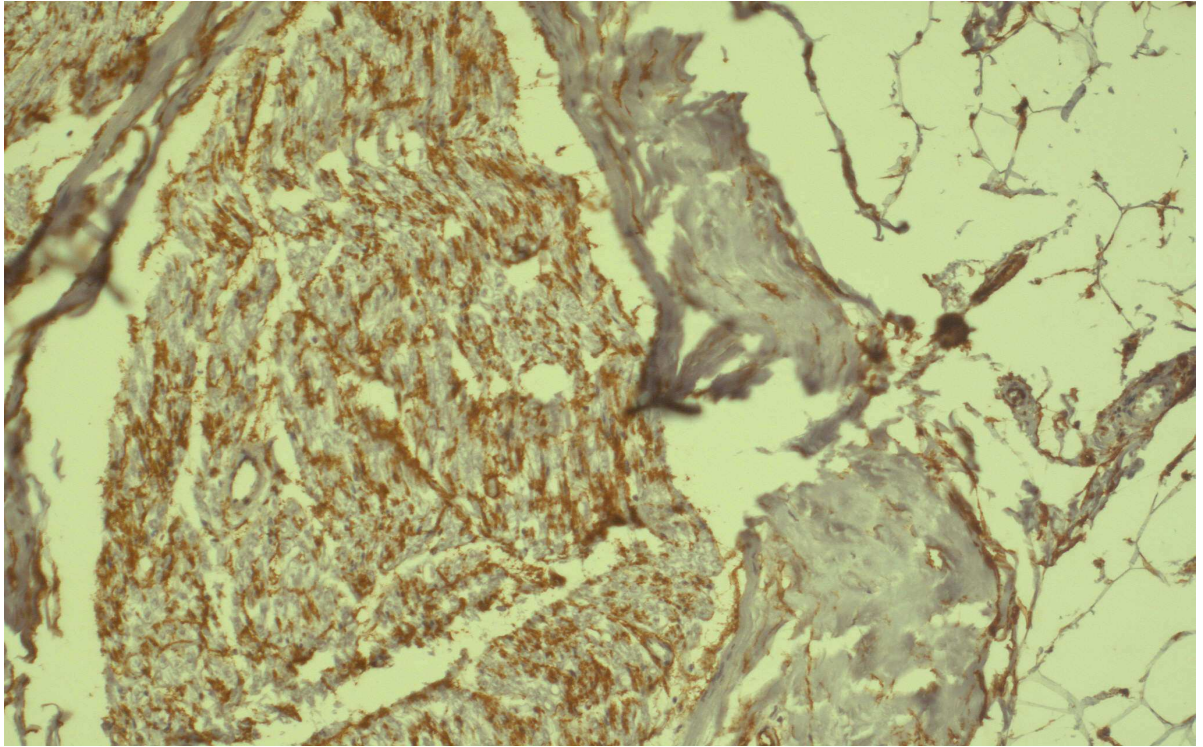


Abb. 9: Histologische Darstellung eines adulten Nerven ; das hier verwendete Chromogen DAB stellt L1-CAM in den Myelinscheiden braun dar

Dass Mutationen im L1-CAM-Gen zu Defiziten wie spastischer Paraplegie Typ I und mentaler Retardierung führen, belegt seine essentielle Rolle in diesen Prozessen (Rosenthal et al. 1992, Jouet et al. 1994, Wong et al. 1995). Die genauen Mechanismen konnten erst später entschlüsselt werden: Zusätzlich zu homophilen L1-L1-Bindungen interagiert L1-CAM hierbei mit diversen zytosolischen Bindungspartnern, unter ihnen Ankyrin, Komponenten des Clathrin AP-2 Komplexes sowie den Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) (Dickson et al. 2002, Schaefer et al. 2002, Zhang et al. 1998). Von den extrazellulären Liganden sei das Matrixmolekül Laminin genannt (Hortsch 1996). Abgesehen von seiner Expression auf der Zelloberfläche kann die extrazellulär lokalisierte L1-CAM-Ektodomäne durch die Metalloproteinase ADAM10 sowie durch Plasmin gespalten werden (Gutwein et al. 2000, Beer

et al. 1999, Nayeem et al. 1999). Das lösliche L1-CAM ist dann in der Lage, Zellmigration und –überleben durch autokrine / parakrine Bindung an Integrine zu stimulieren (Mechtersheimer et al. 2001, Voura et al. 2001).

In Bezug auf den von uns erbrachten Nachweis von L1-CAM auf Neuroblastom-Gewebe könnte diese Kenntnis von L1-CAM und seiner Bedeutung für die Entwicklung des Nervensystems eine Erklärung darstellen. Da der Ursprung des Tumors in der Neuralleiste liegt, mag der Nachweis des Zelladhäsionsmoleküls nicht verwunderlich erscheinen.

Wir beobachten jedoch nicht bei allen Geweben eine positive Färbereaktion. Denn nur 53 (68 %) der 62 untersuchten Tumorproben weisen eine L1-CAM-Expression auf.

9 Neuroblastome (14 %) hingegen zeigen eine negative Färbereaktion. Demnach bildeten wir zwei Patientenkollektive, eine L1-CAM-positive und eine L1-CAM-negative Gruppe. Im Hinblick auf obigen Erklärungsansatz ist das Ausprägungsmuster zunächst überraschend, doch ist dieses unterschiedliche Vorkommen bereits bekannt aus Arbeiten über mehrere oben genannte Tumoren des Erwachsenenalters. Auch hier stehen Tumoren mit unterschiedlichem L1-CAM-Expressionsgrad einander gegenüber, die durch unterschiedliche klinische Verläufe gekennzeichnet sind (Fogel et al. 2003, Thies et al. 2002, Miyahara et al. 2001, Allory et al. 2005, Kowitz et al. 1993, Kaifi et al. 2006).

4.2 Overall Survival und Event Free Survival L1-CAM-positiver Neuroblastome

Im Hinblick auf seine prognostische Aussagekraft bei eingangs erwähnten Tumoren im Erwachsenenalter gilt es nun herauszufinden, inwiefern der L1-CAM-Status unserer Neuroblastom- Patienten mit ihrem klinischen Verlauf korreliert. In der Onkologie sind in diesem Zusammenhang die Überlebensraten der Patienten von besonderem Interesse. Overall sowie Event Free Survival spielen hierbei eine besondere Rolle.

Sowohl das Overall als auch Event Free Survival betreffend liefern die statistischen Analysen und Kaplan-Meier-Kurven in der vorliegenden Arbeit signifikant bessere Ergebnisse für das L1-CAM-positive Patientenkollektiv als für die entsprechend negative Patientengruppe

(OS: $73,1 \pm 31,1$ Monate vs. $43,4 \pm 44,5$ Monate; EFS: $68,5 \pm 32,8$ Monate vs. $42,3 \pm 45,2$ Monate). Berechnungen des medianen Overall und Event Free Survivals liefern ebenfalls signifikant längere Überlebenszeiten für Patienten mit L1-CAM-positiven Tumoren. Diese Ergebnisse sind insofern überraschend, als wir zu Beginn der Arbeit einen entgegen gesetzten Zusammenhang erwartet hatten. Ähnlich erstaunliche Resultate zeigt die Analyse der Beziehung zwischen L1-CAM-Status und Event (Patienten, die während des Beobachtungszeitraums ein Rezidiv erlitten hatten oder verstorben waren). Auch hier korreliert die Expression von L1-CAM mit einem günstigen klinischen Verlauf: L1-CAM-positive Tumoren finden sich signifikant häufiger in dem rezidivfrei überlebten Patientenkollektiv (EFS: 91 % vs. Rezidiv: 57 % und Tod: 33 %).

Zwar findet sich keine signifikante Korrelation zwischen dem L1-CAM-Status der Patienten und klinischen Charakteristika wie LOH1p, Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder Risikogruppenzugehörigkeit. Doch stellen unsere Daten ein Indiz für ein vermehrtes Vorkommen L1-CAM-positiver Tumoren in günstigen Risikogruppen dar. So finden wir nur wenige L1-CAM-negative Neuroblastomgewebe der OG, der Gruppe mit ausgezeichneter Prognose. In der HRG hingegen beobachten wir eine ähnliche Anzahl L1-CAM-positiver und -negativer Tumoren. Im Hinblick auf die Risikogruppenstratifizierung finden wir also einen Trend von vermehrtem Vorkommen L1-CAM-positiver Neuroblastome in günstigen Risikogruppen.

Eine weitere interessante Feststellung machen wir bezüglich der Bedeutung von L1-CAM im Hinblick auf die Amplifikation von MYCN. Dieser Parameter gilt als wichtigster unabhängiger Indikator für eine schlechte Prognose (Schwab et al. 1983, Vasudevan et al. 2005).

Untersuchen wir den Einfluss der L1-CAM-Expression auf die Überlebensrate von allein den Patienten, denen der Risikofaktor MYCN-Amplifikation fehlt, resultieren folgende Ergebnisse: hier liefert die Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen dem L1-CAM-positiven und -negativen Patientenkollektiv. Andererseits fallen jedoch deutlich längere Überlebensraten für Patienten mit nachgewiesener MYCN-Amplifikation auf, deren Tumorgewebe Expression von L1-CAM aufweist. Zusätzlich verstarb keiner der betroffenen 5 Patienten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Leider können wir hier nur von einer geringen Patientenzahl berichten, deren Tumoren gleichzeitig MYCN-Amplifikation als auch L1-CAM-Expression aufweisen. Doch gerade diese Konstellation ist von besonderem Interesse, als die Untersuchung beider Marker allein jeweils unterschiedliche prognostische Tendenzen zeigen würde. Aufgrund der

exzellenten Überlebenszeiten scheint die Stratifizierung dieser Patienten in die HRG nicht gerechtfertigt.

Lediglich bezüglich des histologischen Grades der 62 Patienten finden wir keinerlei Korrelation zur Expression von L1-CAM. Sowohl die Patientendaten als auch die zusätzliche Verifikation des histologischen Gradings durch Dr. A Quaas im Institut für Pathologie richten sich nach den Kriterien von Hughes et al.. Danach werden Neuroblastome bezüglich ihres Reifegrades in drei Malignitätsstufen eingeteilt. Je unreifer hierbei das histologische Bild ist, desto ungünstiger ist die Prognose (Hughes et al. 1974). Wir finden ein annähernd gleiches Vorkommen von L1-CAM in allen drei histologischen Graden.

Zusammenfassend können wir somit mit unseren Daten demonstrieren, dass L1-CAM-positive Neuroblastom-Patienten unserer Studie zu einer besseren klinischen Risikogruppe gehören. Des Weiteren zeigen sie signifikant längere Überlebensraten verglichen mit Patienten ohne L1-CAM-Expression. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass L1-CAM im Rahmen der Neuroblastom-Diagnostik eine bislang unbekannte prognostische Aussagekraft besitzen könnte. Konsekutiv könnte L1-CAM eine Ergänzung zu den aktuell üblichen Risikofaktoren darstellen. Interessanter Weise sind diese Ergebnisse konträr zur aktuellen Literatur über L1-CAM bei einer Vielzahl anderer Tumoren.

4.3 L1-CAM beim Neuroblastom im Vergleich mit L1-CAM bei neuroendokrinen Tumoren des Erwachsenenalters

Zusätzlich zu seiner Funktion als Regulatorprotein für die Entwicklung des Nervensystems findet sich L1-CAM auf zahlreichen weiteren Zellen. Hierzu zählen epitheliale und hämatopoetische Zellen wie z.B. Vorläuferzellen von Granulozyten und Lymphozyten im Knochenmark und die Mehrzahl reifer Thymozyten sowie lienaler Lymphozyten (Brodt 1991). Aber auch auf einer Reihe von Tumorzellen wird L1-CAM exprimiert. Inzwischen konnte dies für das Uterus- und Ovarial-Karzinom, Maligne Melanom, kleinzellige Bronchial-Karzinom, Nierenzellkarzinom, Lymphom und neuroendokrine Pankreastumoren nachgewiesen werden.

Unsere Beobachtungen von 62 Neuroblastom-Patienten sind insofern überraschend, als eine L1-CAM-Expression bei fast allen bisher untersuchten Tumoren mit einer ungünstigen Prognose korreliert (Fogel et al. 2003, Thies et al. 2002, Miyahara et al. 2001, Allory et al. 2005, Kowitz et al. 1993, Kaifi et al. 2006).

Studien über das Maligne Melanom der Haut, welches im metastasierten Stadium eine fatale Prognose aufweist und dessen Inzidenz rapide zunimmt, weisen eine erhöhte L1-CAM-Expression auf Malignen Melanomen und seinen Metastasen im Gegensatz zu harmlosen melanozytären Naevi nach. Bei dieser bösartigen Neubildung korreliert die L1-CAM-Expression signifikant mit Metastasierung. L1-CAM wird hier während der Progression benigner Naevi zum Malignen Melanom kontinuierlich aufreguliert. Das Molekül erweist sich dabei als exzellenter unabhängiger Prognosemarker für das Metastasierungsrisiko. Es führt in Ergänzung zu älteren Markern wie Tumordicke und Ulzeration zu einer genaueren Risikoeinschätzung der betroffenen Patienten. Da der Nachweis von L1-CAM auf gesunden Melanozyten bislang nicht gelingen konnte, scheint sein Expressionsgrad in diesem Fall an die Zellproliferation gebunden zu sein. Man vermutet, dass L1-CAM hier zur Tumorprogression beiträgt, indem es die für die Disseminierung von Tumorzellen entscheidenden Schritte der Zelladhäsion und –migration fördert (Thies et al. 2002, Fogel et al. 2003).

Auch im Zusammenhang mit Uterus- und Ovarial-Karzinomen wurde L1-CAM untersucht. In einer retrospektiv klinischen Studie konnte das Molekül in einem Großteil der untersuchten Tumoren nachgewiesen werden. Dabei erweist sich L1-CAM als exzellenter Marker für eine ungünstige Prognose. Seine Expression korreliert bei beiden Neoplasien, die die häufigste Ursache für onkologische Sterbefälle in der Gynäkologie darstellen, signifikant mit kurzem Überleben und einer damit ungünstigen Prognose. Auch in einem Teil der Endometriumkarzinome, die generell durch eine günstige Prognose gekennzeichnet sind, kann L1-CAM nachgewiesen werden und kennzeichnet dann gering differenzierte Tumoren mit rascher Wachstumstendenz und hohem Metastasierungspotential. Als molekularbiologische Erklärung für diese Beobachtung wird die über ADAM10 vermittelte Spaltung von L1-CAM diskutiert, die Tumorwachstum und Disseminierung über Zellmigration induziert (Fogel et al. 2003).

Des Weiteren wurde die prognostische Relevanz von L1-CAM für das Nierenzellkarzinom untersucht. Die Subtypen dieses Tumors haben einen jeweils unterschiedlichen entwicklungsgeschichtlichen Ursprung, der ihren variablen L1-CAM-Status erklären könnte. So

fehlt Tumoren, deren Ursprungszellen L1-CAM im physiologischen Zustand exprimieren, dieses Molekül, während L1-CAM in einem signifikanten Anteil papillärer und klarzelliger Nierenzellkarzinome exprimiert wird. Diese Tumoren entstehen aus Zellen, die im gesunden Zustand kein L1-CAM aufweisen, weder während früher Stadien der fetalen Entwicklung noch im adulten Gewebe. Für Letztere zeigt sich eine wichtige prognostische Aussagekraft von L1-CAM, indem seine Expression hier mit einem höheren Metastasierungsrisiko assoziiert ist. Auch wenn sein Vorkommen nicht mit den etablierten älteren Prognosemarkern korreliert, könnte L1-CAM doch in Ergänzung Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom, die unter erhöhtem Metastasierungsrisiko stehen, akkurater identifizieren und ihre Therapie somit optimieren. Zusätzlich wird es als neues potentiell Ziel für Immuntherapie dieser bösartigen Neubildung in Erwägung gezogen. (Allory et al. 2005). Zuletzt konnte die hervorragende prognostische Aussagekraft von L1-CAM bei neuroendokrinen Pankreas-Tumoren nachgewiesen werden. Es zeigt sich eine signifikante Assoziation zwischen seiner Expression und der Klassifikation dieser Neubildungen, indem L1-CAM spezifisch auf gering differenzierten Tumoren nachgewiesen werden kann. Diese sind durch hohe Malignität, kurzes Überleben und eine damit schlechte Prognose charakterisiert. Trotz der geringen Anzahl L1-CAM-positiver Patienten der betreffenden Studie scheint L1-CAM also auch bei neuroendokrinen Pankreastumoren ein spezifischer Marker für den malignen Phänotyp zu sein. Da es sich auf gesunden Langerhans-Zellen, die als Ursprung für diesen Tumor angesehen werden, nicht nachweisen lässt, könnte die Aufregulierung von L1-CAM auch hier eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen (Kaifi et al. 2006). Unklar bleibt die Bedeutung von L1-CAM beim kleinzelligen Bronchial-Karzinom. Zwar konnten Miyahara et al. 2001 seine Expression auf allen Tumorgeweben von 17 betroffenen Patienten durch immunhistochemische Färbungen nachweisen. Das granuläre und homogene Vorkommen von L1-CAM legte hierbei auch nahe, dass das Molekül von den Tumorzellen selbst synthetisiert wird. Da die beobachtete Färbereaktion jedoch in allen Fällen nahezu gleich ausfiel, scheint die Synthese hier aber unabhängig vom Proliferationsgrad der einzelnen Tumorzellen zu sein. Ein Einfluss auf die Klinik von diesem rasch invasiv wachsenden Tumor mit hohem Metastasierungspotential wird weiterhin vermutet, ein endgültiger Beweis steht jedoch aus. Vielmehr zeichnet sich hier die größere Bedeutung eines weiteren neuronalen Zelladhäsionsmoleküls N-CAM und seiner PSA-Seitenketten ab. Es findet sich der Trend einer

höheren Überlebenswahrscheinlichkeit für N-CAM-positive Tumoren, die keine PSA-Seitenketten besitzen (Miyahara et al. 2001).

Allein bezüglich Lymphomen zeigt sich eine andere prognostische Aussagekraft von L1-CAM. Zwar ist es auch hier mit Wachstum und Metastasierung assoziiert, doch geht seine Expression auf der Oberfläche von Lymphomzellen mit einem geringeren Metastasierungsrisiko einher (Kowitz et al. 1993).

Mit Ausnahme der Kenntnisse zum Lymphom (Kowitz et al. 1993) und kleinzelligen Bronchial-Karzinom (Miyahara et al. 2001) lässt sich also zusammenfassen, dass L1-CAM bei einer Vielzahl anderer Tumoren einen ungünstigen klinischen Verlauf indiziert, indem es signifikant mit erhöhter Metastasierungstendenz, rascher Tumorprogression und damit hoher Malignität und kurzem Überleben korreliert (Thies et al. 2002, Fogel et al. 2003, Allory et al. 2005, Fogel et al. 2003, Kaifi et al. 2006). Da die meisten untersuchten Tumorzellen im gesunden Zustand einen Mangel an L1-CAM aufweisen, und L1-CAM erst während der Tumorgenese aufreguliert wird, scheint der Expressionsgrad in den meisten Fällen an die Tumorzellproliferation gebunden zu sein (Thies et al. 2002, Fogel et al. 2003, Allory et al. 2005, Kaifi et al. 2006). In diesen bösartigen Neubildungen des Erwachsenenalters, ist L1-CAM also Zeichen eines geringeren Reifegrades der entarteten Tumorzellen. Dies erklärt seine Assoziation mit einer aggressiven Tumorbiologie. Die ADAM10-vermittelte Spaltung von L1-CAM, wie sie aus der Entwicklung des Nervensystems bekannt ist, wird als Promotor der Zelldisseminierung diskutiert, indem die so ermöglichte Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel von Blut- und Lymphgefäßen die Metastasierung fördert (Fogel et al. 2003). Die signifikante Korrelation zwischen L1-CAM-Expression und einem günstigen klinischen Verlauf bei Neuroblastom-Patienten könnte sich ebenfalls mit dem Reifegrad der Neuroblasten und damit der Tumorbiologie erklären lassen.

Wie ursprünglich von Brodeur et al. propagiert, kann sich das Neuroblastom in drei Formen manifestieren, die ein jeweils unterschiedlicher Reifegrad verschiedener Malignität kennzeichnet (Brodeur et al. 1997, Brodeur et al. 1998). Das aktuelle hypothetische Modell zur Tumorgenese des Neuroblastoms - dargestellt in Abb. 8 - geht von unreifen Neuroblasten als Ursprung aus, die unter dem Einfluss genetischer Veränderungen einem jeweils unterschiedlichen Entwicklungsprozess unterworfen sind. Die Expression von Wachstumsfaktoren, Aktivierung von ruhenden Onkogenen sowie Inaktivierung von

Tumorsuppressorgenen führen über mitotische und genomische Instabilitäten zu Proliferation, Apoptose oder Differenzierung der Ursprungszellen. Die betroffenen genomischen und molekularen Veränderungen wie beispielsweise LOH1p, TrkA und MYCN eignen sich dann auch als Prognosemarker und sind mittlerweile etablierte Werkzeuge im Rahmen der Neuroblastom-Diagnostik (Brodeur 1995, Maris et al. 1999 Khanna et al. 2006). Diese Einflüsse führen zu Neuroblastomen verschiedener Reifegrade, die durch ein unterschiedlich aggressives Wachstum gekennzeichnet sind. Im Gegensatz zu den erwähnten Tumoren des Erwachsenenalters, deren aller Ursprung ausgereifte Zellen unterschiedlichen Primärgewebes ist, handelt es sich beim Neuroblastom um einen embryonalen Tumor. Die Ursprungszellen entstammen der Embryonalzeit und sind unreif. Entarten diese embryonalen Zellen und proliferieren, entsteht Tumorgewebe hoher Malignität. Reifen sie allerdings zu Ganglioneuroblastomen oder gar Ganglioneuromen aus, handelt es sich um benignes Gewebe mit günstiger Prognose. Diese Tatsache könnte erklären, dass die Expression von L1-CAM mit einem günstigen klinischen Verlauf korreliert. L1-CAM als Marker des sich entwickelnden und somit noch unreifen Nervensystems bleibt also auf gutartigem Tumorgewebe exprimiert, das durch differenzierte, reife Zellen gebildet wird. Im Gegensatz dazu fehlt es entarteten Zellen, deren Biologie aufgrund genomischer Instabilität vom physiologischen Entwicklungsprozess abweicht.

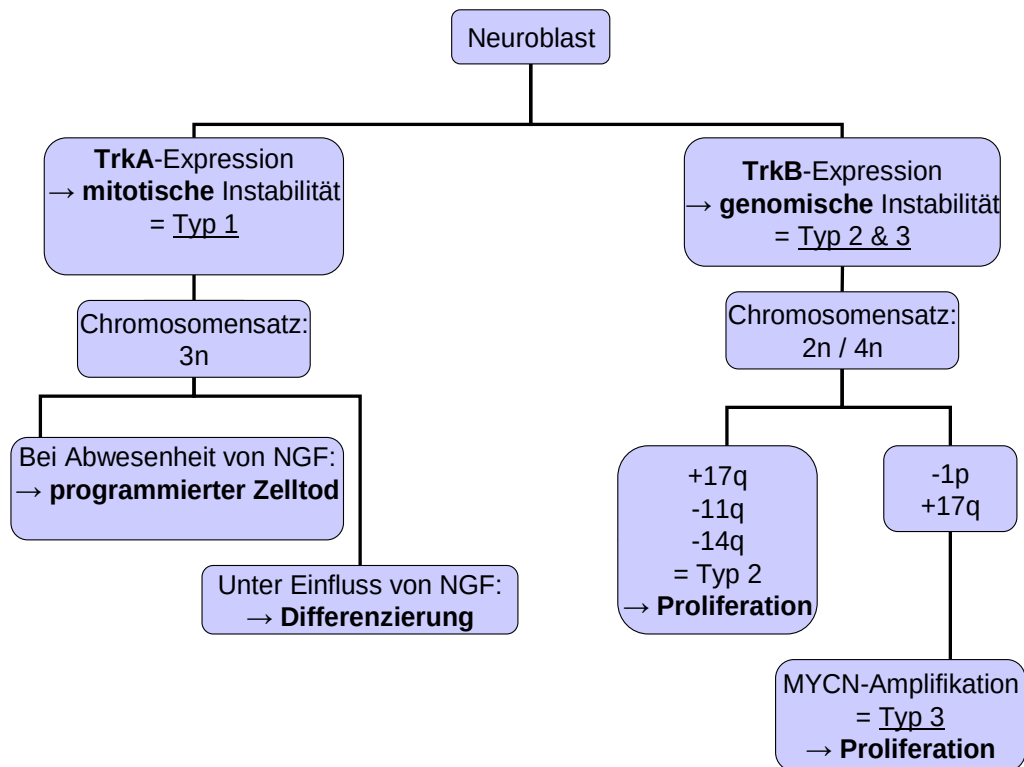


Abb. 8: Hypothetisches Modell über den genetischen Ursprung von Neuroblastomen; Undifferenzierte Neuroblasten sind während des Entwicklungsprozesses unterschiedlichen Mutationen unterworfen, Resultat ist die Tumorentstehung. Der Differenzierungsgrad zum Zeitpunkt der malignen Transformation bestimmt das Expressionsmuster der Neurotrophine. Typ 1-Tumore sind durch TrkA-Expression mitotisch instabil, daher häufig triploid und können je nach An-/ oder Abwesenheit von NGF differenzieren oder einem programmierten Zelltod unterliegen. TrkB exprimierende Tumore (Typ 2 und 3) sind gekennzeichnet durch genomische Instabilität, mit unterschiedlichen strukturellen chromosomalen Aberrationen – Verlust der Heterozygotie verschiedener Chromosomen sowie MYCN-Amplifikation. modifiziert nach Maris et al. (1999) *J Clin Oncol*, 17(7):2264-2297

An dieser Stelle seien die Methoden dieser Arbeit kritischer hinterfragt, um mögliche Fehlerquellen zu eruieren. Als erstes sei die Auswahl des zu stanzenden Gewebeausschnitts genannt. So könnte die Gewebeentnahme eines nicht repräsentativen Ausschnittes zu falschen Ergebnissen führen. Dies ist aus folgenden zwei Gründen unwahrscheinlich: Zum Einen gewährleistet die vorangehende histologische Begutachtung des Gewebes durch Dr. A. Quaas im Institut für Pathologie die Gewebeentnahme aus einem für die anschließenden Färbungen repräsentativen Areals. Als zusätzliche Sicherheit minimieren Serienfärbungen der Tissue Microarrays auf S100 sowie N-CAM die Wahrscheinlichkeit, mangelhaftes Gewebe für die immunistochemischen Färbungen heranzuziehen. Da es sich hierbei um gängige Marker von Neuroblastom-Gewebe handelt, betrachten wir ihren Nachweis als Beweis für das Vorhandensein repräsentativen Gewebes.

Eine wichtige Rolle im Rahmen des Färbeprozesses spielt der verwendete Antikörper für L1-CAM. Daher stellt dieser Arbeitsschritt eine weitere mögliche Fehlerquelle dar. Wir verwenden den kommerziell erhältlichen monoklonalen Maus-IgG1-Antikörper UJ 127.11. Dieser Primär-Antikörper erkennt die Ektodomäne von L1-CAM, so dass diese spezifische Bindung zusammen mit jeweils durchgeführten Kontrollproben auf gesundem Gewebe die Gültigkeit unserer Ergebnisse rechtfertigen mag. In den zitierten Studien zu Ovar- und Uterus- sowie neuroendokrinen Pankeastumoren und dem Malignen Melanom wurde UJ 127.11 ebenfalls verwendet (Fogel et al. 2003, Fogel et al. 2003, Kaifi et al. 1996).

Als zentrales Medium der vorliegenden Studie kann der Tissue Microarray betrachtet werden. In keiner der zum Vergleich herangezogenen Studien wurden die Tumorproben mit Hilfe dieser Methode untersucht. Dies wirft die Frage auf, ob unsere Ergebnisse überhaupt mit bereits publizierten Daten verglichen werden können. Doch die 1998 erstmalig veröffentlichte Idee der Tissue Microarrays hat sich in den vergangenen Jahren unter der Leitung von Prof. Dr. G Sauter in unserem Institut für Pathologie als äußerst effiziente und verlässliche Methode zur Aufbereitung einer großen Gewebeanzahl etabliert. Parallele Schnitte der Tissue Arrays erlauben die simultane Analyse der Gewebeproben hinsichtlich DNA- und RNA-Gehalt sowie Proteinexpression (Theillet et al. 1998, Kononen et al. 1998). Letzteres kommt in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

Als eventuelle Schwachstelle mag lediglich unsere geringe Fallzahl von 62 Patienten erscheinen. Dies ist sicherlich keine ausreichende Grundlage für eine endgültige Aussage bezüglich der Rolle von L1-CAM für Neuroblastom-Patienten. Nach den vorliegenden

Ergebnissen interessiert insbesondere in dem kritischen Patientenkollektiv der MRG und HRG der L1-CAM-Status. Die generell günstige Prognose beim Neuroblastom stellt jedoch insofern ein Hindernis dar, als Rezidive und Todesfälle verhältnismäßig selten auftreten und somit wenige Patientendaten für Analysen zur Verfügung stehen. Da die durchgeführten SPSS-Analysen aber auch für unser zahlenmäßig kleines Patientenkollektiv signifikante Ergebnisse liefern, können wir dennoch von validen, reproduzierbaren Resultaten ausgehen. Schlussfolgernd bleibt der klare Trend der besseren Prognose für L1-CAM-exprimierende Neuroblastom-Patienten.

4.4 L1-CAM als Prognosemarker beim Neuroblastom

Entgegen unserer ursprünglichen Erwartung korreliert die Expression von L1-CAM auf Neuroblastomen signifikant mit einem längeren Event Free und Overall Survival. L1-CAM ist damit kein Marker für einen ungünstigen klinischen Verlauf wie anfänglich vermutet, sondern besitzt offensichtlich eine günstige prognostische Aussagekraft. Hinsichtlich dieser Ergebnisse könnte sich L1-CAM als neuer Prognosemarker beim Neuroblastom eignen, der mit hoher statistischer Signifikanz einen günstigen klinischen Verlauf indiziert.

Doch besteht überhaupt Bedarf nach einem weiteren diagnostischen Parameter? Die Basis für das therapeutische Design maligner Tumorerkrankungen sind Prognosemarker, mittels derer sowohl Morbidität als auch Mortalität auf das geringst mögliche Ausmaß reduziert werden sollen. Wie eingangs erwähnt zählen Chromosomenabnormalitäten,

Katecholaminabbauprodukte sowie die Tyrosinkinasen A, B und C zu den Standardparametern beim Neuroblastom. Basierend auf ihrem Nachweis werden unter weiterer Berücksichtigung der Tumorhistologie und dem INSS-Stadium die Patienten in unterschiedliche Therapiearme stratifiziert. Je ungünstiger die Prognose ist, desto intensiver werden die Patienten behandelt. Obwohl sowohl Heilungschancen als auch Rezidivquoten aufgrund der angewandten Therapiemodalitäten chirurgische Exstirpation, Bestrahlung, Chemotherapie und autologe Stammzelltransplantation mittlerweile deutlich günstiger ausfallen, bleibt die Suche nach ergänzenden Prognosemarkern aktuell. Trotz der Vielzahl bislang identifizierter Marker bleibt die Risikoeinstufung von Neuroblastom-Patienten eine große Herausforderung. Die Spannbreite

der vorhandenen Therapieoptionen wächst mit zunehmenden wissenschaftlichen Erkenntnissen, damit nimmt jedoch auch die Anzahl möglicher akuter unerwünschter Arzneimittelwirkungen als auch Langzeitkomplikationen stetig zu. Besonders für Patienten im Kindesalter, deren Körper in vielerlei Hinsicht vulnerabler als Erwachsene reagieren, ist dieser Aspekt nicht zu verachten. Aus diesem Grund ist es von außerordentlicher Bedeutung, für dieses Patientenkontingent eine möglichst eindeutige Definition für ein niedriges Risiko zu erzielen (Evans et al., 2005).

Das Ziel aktueller Studien über Prognosefaktoren bleibt somit, die Genauigkeit der Prognose zu erhöhen und eine damit noch besser angepasste Therapie für jeden individuellen Fall anzuwenden. Für die besprochenen Tumoren des Erwachsenenalters, bei denen L1-CAM einen ungünstigen klinischen Verlauf prognostiziert, stellt sein Nachweis eine andere Bedeutung dar, als beim Neuroblastom. Da diese Tumoren oft erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt werden, kann ein frühzeitiger Nachweis des Moleküls zu geringeren Mortalitäten führen. Den möglichen Nutzen beim Neuroblastom könnte ein anderer Grund darstellen. Wie 5 unserer Fälle zeigen, kann der Nachweis von L1-CAM als günstigem Prognosemarker ergänzend zu den bislang üblichen Patienten in günstigere Risikogruppen einstufen. Demzufolge fielen sie auch in einen anderen Therapiearm, der eine abgeschwächte Therapie bedeuten würde. Ein Teil unserer Ergebnisse zeigt, dass einige Patienten durch den Nachweis von L1-CAM auf ihrem Tumorgewebe in günstigere Risikogruppen eingestuft werden könnten, als es mit den bisherigen Prognosemarkern der Fall ist. Dessen Konsequenz wäre bezüglich des Therapiestufenschemas eine weniger aggressive Therapie, z.B. eine mildere oder keine Chemotherapie, wenn z.B. eine Tumorexstirpation allein als kurativ anzusehen ist. Damit einher ginge somit das geringere Risiko akuter oder chronischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen, wie z.B. Zytostatika-induziertes Erbrechen, Immunsuppression oder Chemotherapie-induzierter Zweitneoplasien.

Die Ergebnisse unserer Studie stellen sicher kein endgültiges Resultat bezüglich der Bedeutung von L1-CAM für Neuroblastome dar. Vielmehr mögen sie einen ersten und möglicherweise wichtigen Schritt für die Erforschung dieses Zelladhäsionsmoleküles als prognostischen Serumparameter für Neuroblastom-Patienten darstellen. Zukünftige Studien könnten an unsere Ergebnisse anschließen und im Hinblick auf folgende Themenbereiche konzipiert werden: Ein wichtiges Ziel sollte zunächst eine größere Fallzahl sein. Mit Hilfe dieses Kriteriums sollte ein besonderes Augenmerk auf HRG-Patienten gerichtet werden, um weiterführende Kenntnisse

für das Zusammenspiel zwischen MYCN-Amplifikation und L1-CAM-Expression zu gewinnen. Denn dieses Ergebnis unserer Arbeit könnte den wichtigsten Aspekt für die Etablierung von L1-CAM als Prognosemarker darstellen.

Des Weiteren sollten künftige Arbeiten auf das Erforschen der Rolle von L1-CAM für die Tumorbilogie ausgerichtet sein. Aktuell in unserer Abteilung laufende Studien untersuchen die L1-CAM-Expression auf Neuroblastom-Gewebe auf molekularbiologischer Ebene. So mögen beispielsweise auf Polymerasekettenreaktion basierende Resultate fundierte Aussagen auf diesem Gebiet liefern.

Wir vermuten, dass die durch unsere Arbeit gezeigte Korrelation zwischen L1-CAM-Expression und einem günstigen klinischen Verlauf von Neuroblastom-Patienten mit dem Reifegrad der Tumorzellen zu erklären ist. Diese These gilt es nun zu verfolgen. Gegenstand folgender Arbeiten könnte somit der Wilms-Tumor sein, der wie das Neuroblastom ein embryonaler Tumor des Kindesalters ist. Ließe sich L1-CAM in ähnlich konzipierten Studien auf Wilms-Tumor-Gewebe nachweisen, ist ein ähnliches Resultat hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft zu erwarten, im Falle der Richtigkeit unserer Hypothese.

Die Ergebnisse solcher Studien mag man mit großem Interesse erwarten und forcieren, um das Spektrum diagnostischer Mittel im Rahmen der Neuroblastom-Behandlung zu erweitern. Somit könnte den betroffenen Patienten eine noch besser angepasste Therapie zugute kommen, welche damit die Langzeitergebnisse optimieren würde.

4.5 Immuntherapie als mögliche neue Therapiemodalität bei Neuroblastom-Patienten; potentielle Rolle von L1-CAM

Während Chemotherapie, chirurgische Exzision, Radiotherapie sowie autologe Stammzelltransplantation in vielen Fällen erfolgreiche Therapiemodalitäten für Neuroblastom-Patienten darstellen, erfordert die ungünstige Prognose von Patienten mit disseminierter Tumorerkrankung, welche häufiger zu Rezidiven neigt, alternative Therapieverfahren. In diesem Zusammenhang wird insbesondere die Immuntherapie als potentielle weitere Therapiesäule diskutiert. Zwar scheint diese für Patienten mit großen Tumormassen ungeeignet,

hingegen könnten Patienten im minimal residual disease-Stadium bis hin zur kompletten lebenslangen Tumorfreiheit profitieren (Raffaghello et al. 2003).

Als Bindungspartner und Zielantigene der hierbei verwendeten Antikörper sind spezieller Gegenstand der Forschung Neuroblastom-assoziierte Antigene ebenso wie Angiogenesefaktoren. Die eingesetzten nativen Antikörper wirken antineoplastisch über Aktivierung von Antikörper-abhängiger zellulärer oder Komplement-abhängiger Zytotoxizität sowie durch Modulation von Rezeptorfunktionen.

VEGF (vascular endothelial growth factor) spielt eine fundamentale Rolle in der Tumorangiogenese und ist konsekutiv ein wichtiges antiangiogenetisches Therapieziel. Bavituzumab ist ein humaner monoklonaler anti-VEGF Antikörper, der über dessen Blockade zu einer vorübergehenden günstigen Veränderung der intratumoralen Vaskularisierung führt. Die folglich zu beobachtende Reduktion des Tumorwachstums sowie eine verbesserte Wirksamkeit applizierter Chemotherapie ohne zusätzliche Toxizität setzen Hoffnung in Bavituzumab als mögliche ergänzende Therapieform (Segerström et al. 2006, Dickson et al. 2007).

Eine weitere Option, Neuroblastomwachstum und –metastasierung zu inhibieren, stellt der monoklonale anti GD2-Antikörper 14G2a dar. GD2 ist ein membranäres Disialogangliosid, welches spezifisch auf der Oberfläche neuroektodermaler Tumoren exprimiert wird. Eine Aktivierung der Komplementkaskade und Granulozyten-vermittelte Tumorzelllyse scheint bei diesem Vorgang eine essentielle Rolle zu spielen (Raffaghello et al. 2003). Die Annahme, dass simultan applizierte Zytokine einen noch besseren therapeutischen Effekt von anti-GD2-Antikörpern bewirken, führte zur Entwicklung von Hybridproteinen, welche aus einer Fusion der Gene für Zytokine oder Chemokine an die DNA der Antikörper entstehen. Diese auch als SIPs (small immuno-proteins) bezeichneten Moleküle scheinen in der Lage zu sein, lokale Abwehrmechanismen zu aktivieren, was zum Untergang von Neuroblastom-Zellen führt. Natürliche Killerzellen sowie T-Zellen sind an diesem Prozess der unspezifischen Immunmechanismen wesentlich beteiligt. Es wird diskutiert, ob Infusionen Natürlicher Killerzellen Tumorzellen, welche resistent gegenüber Hochdosischemo- und autologer Stammzelltherapie sind, erfolgreich bekämpfen können. Des Weiteren könnten sie über die Entstehung von zytotoxischen Gedächtnis-T-Lymphozyten zu lebenslanger Immunität gegenüber eventuellen Tumorrezidiven führen (Zeng et al. 2007, Castriconi et al. 2007). Eine zentrale Rolle spielen des Weiteren IL-2, IL-12 sowie IL-18 (Bestagno et al. 2003).

Die Bedeutung dieser Interleukine wird unterstrichen durch die Beobachtung, dass genetisch manipulierte Fibroblasten, die jene Zytokine sezernieren, nach subkutaner Injektion bei Mäusen zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum und ebenfalls zu einem Immungedächtnis führen (Barker et al. 2007).

N-CAM - wie L1-CAM ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Familie – wird in nahezu 100% auf Neuroblastomgewebe exprimiert und korreliert ebenfalls mit verminderter Tumoraggressivität und Metastasierungstendenz. Dieser hohe Expressionsgrad macht N-CAM ebenso wie GD2 zu einem attraktiven Antigenziel im Rahmen der Tumorummuntherapie mittels Antikörper. Aktuell ist huN901-DM1 hierbei ein viel versprechendes Immuntoxin, dessen therapeutische Effektivität nun in klinischen Studien erprobt wird. Als Wirkmechanismus wird eine Internalisierung des N-CAM / Immuntoxin-Komplexes in die Zielzellen diskutiert, worauf die intrazelluläre Toxinfreisetzung mit anschließendem Zelltod folgt (Jensen et al. 2007).

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Verwandtschaft zwischen N-CAM und L1-CAM könnte das von uns untersuchte L1-CAM in ferner Zukunft ebenfalls als Ziel einer Antikörper-basierten Immuntherapie fungieren. In diesem Zusammenhang ist jedoch zunächst eine genauere Analyse der L1-CAM-Expression auf Neuroblastomgewebe sowie der Bedeutung von Immuntherapie unerlässlich.

5 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor des Kindesalters, dessen Ursprung entartete Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems sind. Es stellt 8-10 % aller kindlichen Krebserkrankungen dar und ist für 15 % der onkologischen Sterbefälle in dieser Altersgruppe verantwortlich. Die aktuelle Herausforderung an Forschung auf diesem Gebiet ist, die Risikoeinschätzung der betroffenen Patienten zu optimieren, um ihnen darauf basierend eine optimale Therapie zuführen zu können. Denn besonders die Prognose von Hochrisikopatienten bleibt trotz fortschrittlicher Therapieverfahren weiterhin unerfreulich. In diesem Zusammenhang sind Prognosemarker essentielle Mittel für Risikogruppenstratifizierung, Therapiedesign und damit den klinischen Verlauf der Patienten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Expression von L1-CAM auf Neuroblastomgewebe von 62 Patienten mittels immunhistochemischer Färbemethoden. Die zugehörigen klinischen Daten wurden statistisch analysiert. Unter Verwendung von Kaplan Meier Analysen untersuchten wir anschließend die Korrelation zwischen L1-CAM-Expression und klinischem Verlauf der Neuroblastom-Patienten. L1-CAM ist ein Marker des embryonalen Nervensystems und wird zusätzlich auf einer Vielzahl maligner Tumoren neuroektodermalen Ursprungs exprimiert.

Unsere Resultate demonstrieren, dass L1-CAM-positive Patienten zu einer besseren Risikogruppe gehören sowie signifikant längere Überlebenszeiten aufweisen verglichen mit L1-CAM-negativen Patienten. Wir meinen, diese Ergebnisse mit der Embryologie des untersuchten Tumors erklären zu können. L1-CAM als Marker des sich entwickelnden Nervensystems könnte somit reifere neuroblastische Zellen identifizieren und ist deshalb mit einer geringeren Tumoraggressivität assoziiert.

L1-CAM könnte daher zukünftig ein günstiger Marker mit einem hohen spezifischen prognostischen Wert für Neuroblastom-Patienten darstellen.

Literaturverzeichnis

Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronc P, Debiec H (2005) The L1 Cell Adhesion Molecule Is Induced in Renal Cancer Cells and Correlates with Metastasis in Clear Cell Carcinomas *Clin Cancer Res* 11:1190-1197

Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, et al. (2003) Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification *J Clin Oncol* 21(11):2077-2084

Ambros PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, Ladenstein R, Fink FM, Horcher E, Printz G, Mutz I, Schilling F, Urban C, Gadner H (1995) Regression and Progression in Neuroblastoma. Does Genetics Predict Tumor Behaviour? *Eur J Cancer* 31A(4):510-515

Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM (2005) Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma *N Engl J Med* 353(21):2243-2253

Barker SE, Grosse SM, Siapati EK, Kritz A, Kinnon C, Thrasher AJ, Hart SL (2007) Immunotherapy for neuroblastoma using syngeneic fibroblasts transfected with IL-2 and IL-12 *Brit J Cancer* 97:210-217

Beckwith JB, Martin RF (1968) Observations on the histopathology of neuroblastomas *J Pediatr Surg* 30:289-294

Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P (1999) Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule *J Cell Sci* 112:2667-75

Bestagno M, Occhino M, Corrias MV, Burrone O, Pistoia V (2003) Recombinant antibodies in the immunotherapy of neuroblastoma: perspectives of new developments *Cancer Lett* 197:193-198

Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson ADJ, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F (1999) Gain of Chromosome Arm 17q and Adverse Outcome in Patients with Neuroblastoma *N Engl J Med* 340(25):1954-1961

Brodeur GM (1995) Molecular Basis for Heterogeneity in Human Neuroblastomas *Eur J Cancer* 31A(4):505-510

Brodeur GM (1998) Clinical and biological aspects of neuroblastoma in Vogelstein B, Kinzler KW (eds): The Genetic Basis of Human Cancer. New York, NY, McGrawHill 691-711

Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology, Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001:895-937

Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, et al. (1997) Biology and genetics of human neuroblastoma *J Pediatr Hematol Oncol* 19:93-1001

Brodeur GM, Nakagawara A, Yamashiro DJ et al. (1997) Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastoma *J Neurooncol* 31:49-55

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NLT, Castel V, Castleberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, Kaneko M, Kemshead J, Lampert F, Lee REJ, Look AT, Pearson ADJ, Philip T, Roald B, Sawada T, Seeger RC, Tsuchida Y, Voute PA (1993) Revisions of the International Criteria For Neuroblastoma Diagnosis, Staging and Response to Treatment *J Clin Oncology* 11(8):1466-1477

Brodt P (1991) Adhesion mechanisms in lymphatic metastasis *Cancer and Metastasis Review* 17:23-32

Brümmendorf T, Kenwrick S, Rathjen FG (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations *Curr Opin Neurobiol* 8:87-97

Carachi R (2002) Perspectives on neuroblastoma *Pediatr Surg Int* 18:299-305

Caron H, van Sluis P, De Kraker J, Bökkering J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voûte PA, Versteeg R (1996) Allelic Loss of Chromosome 1p as a Predictor of Unfavorable Outcome in Patients with Neuroblastoma *N Engl J Med* 334(4):225-230

Castleberry RP (1999) Predicting outcome in neuroblastoma *N Engl J Med* 340 (25):1992-1993

Castleberry RP, Pritchard J, Ambros P, Berthold F, Brodeur GM, Castel V, Cohn SL, De Bernardi B, Dicks-Mireaux C, Frappaz D, Haase GM, Haber M, Jones DR, Joshi VV, Kaneko M, Kemshead JT, Kogner P, Lee REJ, Matthay KK, Michon JM, Monclair R, Roald BR, Seeger RC, Shaw PJ, Simada H, Shuster JJ (1997) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG): a Preliminary Report *Eur J Cancer* 33(12):2113-2116

Castriconi R, Dondero A, Cilli M, Ognio E, Pezzolo A, De Giovanni B, Gambini C, Pistoia V, Moretta L, Moretta A, Corrias MV (2007) Human NK cell infusions prolong survival of metastatic human neuroblastoma-bearing NOD/scid mice *Cancer Immunol Immunother* 56:1733-1742

Chan HSL, Gallie BL, DeBoer G, Haddad G, Ikegaki N, Dimitroulakos J, Yeger H, Ling V (1997) MYCN Protein Expression as a Predictor of Neuroblastoma Prognosis *Clin Cancer Res* 3:1699-1706

Cohn SL, Tweddle DA (2004) MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its “clinical debut” *Eur J Cancer* 40:2639-2642

Conte M, De Bernardi B, Milanaccio C, Michelazzi A, Rizzo A, Montobbio G, Parodi S, Haupt R (2005) Malignant neuroblastic tumors in adolescents *Cancer Lett* 228:271-274

D’Angio GJ, Evans AE, Koop CE (1971) Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis *Lancet* 1:1046-1049

De Bernardi B (2005) Why does neuroblastoma attract us so much? *Cancer Lett* 228:3-4

Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, Fraga CH, Ng CYG, Rajasekaran S, Hagedorn NL, McCarville MB, Stewart CF, Davidoff AM (2007) Bevacizumab-Induced Transient Remodeling of the Vasculature in Neuroblastoma Xenografts Result in Improved Delivery and Efficacy of Systematically Administered Chemotherapy *Clin Cancer Res* 13(13):3942-3950

Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SR (2002) Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family *J Cell Biol* 157:1105-1112

Escobar MA, Grosfeld JL, Powell RL, West KW, Scherer LR, Fallon RJ, Rescorla FJ (2006) Long-term outcome in patients with stage IV neuroblastoma *J Ped Surg* 41:377-381

Evans AE, D'Angio GJ (2005) Age at Diagnosis and Prognosis in Children With Neuroblastoma *J Clin Oncol* 23(27):6443-6444

Evans AE, D'Angio GJ, Propert K et al. (1987) Prognostic factors in neuroblastoma. *Cancer* 59:1853-1859

Evans AE, Gerson J, Schaufel L (1976) Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 44:49-54

Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck , Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P (2003) L1 expression is a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas *Lancet* 362:869-875

Fogel M, Mechttersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W, Reichrath J, Georg T, Altevogt P, Gutwein P (2003) L1 adhesion molecule (CD171) in development and progression of human malignant melanoma *Cancer Lett* 189:237-247

Fong CT, Dracopoli NC, White PS, et al. (1989) Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3753-3757

Grosfeld JL (2000) Risk-based Management of Solid Tumors in Children *Am J Surg* 180:322-327

Gutwein P, Oleszewski M, Mechttersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P (2000) Role of Scr Kinases in the ADAM-mediated Release of L1-Adhesion Molecule from Human Tumor Cells *J Biol Chem* 275(20):15490-15497

Haas D, Ablin AR, Miller C, Zoger S, Matthay KK (1988) Complete Pathologic Maturation and Regression of Stage IVS Neuroblastoma Without Treatment *Cancer* 62:818-825

Hase T, Ohta S, Tani T, Mizukuro T, Mekata E, Naitoh H, Shimadera S, Fujino S, Taga T (2002) Outcome in infants with neuroblastoma detected by mass screening and surgically treated in Shiga Prefecture, Japan: what is the role of surgery? *Pediatr Surg Int* 18:289-294

Hortsch M (1996) The L1 family of Neural Cell Adhesion Molecules: Old Proteins Performing New Tricks *Neuron* 17:587-593

Hughes M, Marsden HB, Palmer MK (1974) Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging *Cancer* 34:1706-1711

Jensen M, Nerthold B (2007), Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer *Cancer Lett* 258: 9-21

Johnsen JJ, Lindskog M, Ponthan F, Pettersen I, Elfmann L, Orrego A, Sveinbjörnsson B, Kogner P (2005) NSAIDs in neuroblastoma therapy *Cancer Lett* 228:195-201

Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R et al. (1994) X-linked spastic paraplegia(SPG1), MASA-syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene *Nat Genet* 7:402-407

Kaifi JT, Zinnkann U, Yekebas EF, Schurr P, Reichelt U, Wachowiak R, Fiegel HC, Petri S, Schachner M, Izbicki JR (2006) L1 is a potential marker for poorly-differentiated pancreatic neuroendocrine carcinoma *World J Gastroenterol* 12(1):94-98

Khanna C, Helman LJ (2006) Molecular approaches in pediatric oncology *Annu Rev Med* 57:83-97

Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, Sakurada K, Tomiyama A, Noguchi A, Momoi T, Toyoda Y, Kigasawa H, Nishi T, Shirouzu M, Yokoyama S, Tanaka Y, Kuchino Y (2002) Increased Ras Expression and Caspase-Independent Neuroblastoma Cell Death: Possible Mechanism of Spontaneous Neuroblastoma Regression *J Natl Cancer Inst* 94 (5):358-368

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch JM, Sauter G & Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens *Nat Med* 4(7):844-847

Kowitz A, Kadmon G, Verschueren H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M, Schachner M, Schirmacher V, Altevogt P (1993) Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis *Clin Exp Metastasis* 11:419-429

Kushner BH, Cheung NV (2005) Neuroblastoma – from Genetic Profiles to Clinical Challenge *N Engl J Med* 353(21):2215-2217

Lindner J, Rathjen FG, Schachner M (1983): L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum *Nature* 305:427-439

London WB, Boni L, Simon T, Berthold F, Twist C, Schmidt ML, Castleberry RP, Matthay KK, Cohn SL, De Bernardi B (2005) The role of age in neuroblastoma risk stratification: the German, Italian, and children's oncology group perspectives *Cancer Lett* 228:257-266

London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL (2005) Evidence for an Age Cutoff Greater Than 365 Days for Neuroblastoma Risk Group Stratification in the Children's Oncology Group *J Clin Oncol* 23(27):6459-6465

Losty P, Quinn F, Breatnach F, O'Meara A, Fitzgerald RJ (1993) Neuroblastoma - a surgical perspective *Eur J Surg Onc* 19:33-36

Maris JM, Matthay KK (1999) Molecular Biology of Neuroblastoma *J Clin Oncol* 17 (7):2264-2279

Maris JM, White PS, Beltinger CP et al. (1995) Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma *Cancer Res* 55:4664-4669

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-*cis*-retinoid acid *N Engl J Med* 341(16):1165-1173

McCluskey AG, Boyd M, Gaze MN, Mairs RJ (2005) [131 I]MIBG and topotecan: A rationale for combination therapy for neuroblastoma *Cancer Lett* 228:221-227

Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, et al. (2001) Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins *J Cell Biol* 155:661-73

Miyahara R, Tanaka F, Nakagawa T, Matsuoka K, Isii K, Wada H (2001) Expression of Neural Cell Adhesion Molecules (Polysialylated Form of Neural Cell Adhesion Molecule and L1-Cell

Adhesion Molecule) on Resected Small Cell Lung Cancer Specimens: In Relation to Proliferation State *J Surg Oncol* 77:49-54

Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin *Nature* 334:701-703

Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Atar CG, Cantor AB, Brodeur GM (1993) Association between High Levels of Expression of the Trk Gene and Favorable Outcome in Human Neuroblastoma *N Engl J Med* 328(12):847-854

Nayeem N, Siletti S, Yang X, et al. (1999) A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1 *J Cell Sci* 112:4739-49

Neuroblastoma 2004 Trial Protocol For Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Version 1.00 from Sep 1st, 2004, Principal Investigator: Prof. Dr. Frank Berthold; Dept. Ped. Oncology and Hematology; Children's Hospital, University of Cologne, Germany

Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, Atkinson JB, Selch M, Gerbing RB, Stram DO, Lukens J (2000) Favorable Biology and Outcome of Stage IV-S Neuroblastoma With Supportive Care or Minimal Therapy: A Children's Cancer Group Study *J Clin Oncol* 18(3):477-486

Ohnishi T, Matsumura H, Izumoto S, Hiraga S, Hayakawa T (1998) A Novel Model of Glioma Cell Invasion Using Organotypic Brain Slice Culture *Cancer Res* 58:2935-2940

Oppedal BR, Storm-Mathisen I, Lie SO, et al. (1988) Histopathologic prognostic factors in neuroblastoma. Clinical, histopathologic immunohistochemical features and DNA ploidy in relation to prognosis *Cancer* 72:772-779

Ota K, Shimizu K. (1980) Committee on the histological classification of childhood tumors. In Society JP, ed. *Histological Classification and Atlas of Tumors in Infancy and Childhood*. Tokyo, Kanahara

Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB et al. (2000) Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a Children's Cancer Group study *J Clin Oncol* 18:18-26

Pritchard J, Hickman JA (1994) Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet* 344:369-370

Raffaghello L, Marimpietri D, Pagnan G, Pastorino F, Cosimo E, Brignole C, Ponzoni M, Montaldo PG (2003) Anti-GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse *Cancer Lett* 197:205-209

Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytochemical and biochemical characterization of a new neural cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion *EMBO J* 3:1-10

Riley RD, Heney D, Jones DR, Sutton AJ, Lambert PC, Abrams KR, Young B, Wailoo AJ, Burchill SA (2004) A Systematic Review of Molecular and Biological Tumor Markers in Neuroblastoma *Clin Cancer Res* 10:4-12

Roald B.: Neuroblastoma. In: Souhami RL, Tannock I, Hohenberger, Hohenberger P, Horiot JC (Eds.): Oxford Textbook of Oncology, Volume 2, 2nd Edition. Oxford, UK, Oxford University Press, 2001:2601-2610

Rosenthal A, Jouet M, Kenwrick S (1992) Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus *Nat Genet* 2:107-112

Sadler TS. Zentralnervensystem. In: Sadler TS (Ed). Medizinische Embryologie, 9. Auflage. Stuttgart New York: Thieme. 1998:423-426

Sano H, Bonadio J, Gerbing RB, London WB, Matthay KK, Lukens JN, Shimada H (2006) International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age *Eur J Cancer* 42:1113-1119

Schachner M (1997) Neural recognition molecules and synaptic plasticity *Curr Opin Cell Biol* 9:627-634

SchaeferAW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, RapoportI, Kirchhausen T, Beach CM, Landreth G, Lemmon SK, Lemmon V (2002) L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outsid-in signalling by L1 *J Cell Biol* 157:1223-1232

Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, van Limpt V, Sieverts H, Kuhfittig-Kulle S, Pfeiffer P, Versteeg R, Eggert A (2005) Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma *Cancer Lett* 228:143-153

Schwab M (2004) MYCN in neuronal tumors *Cancer Lett* 204:179-187

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor *Nature* 305:245-248

Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G, Trent J (1984) Chromosomal localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc *Nature* 308:288-291

Segerström L, Fuchs D, Bäckmann U, Holmquist K, Christofferson R, Azarbayjani F (2006) The Anti-VEGF Antibody Bevacizumab Potently Reduces the Growth Rate of High-Risk Neuroblastoma Xenografts *Ped Res* 60(5):576-581

Selig RA, Madafiglio J, Haber M, Norris MD, White L, Stewart BW (1993) Ferritin Production and Desferrioxamine Cytotoxicity in Human Neuroblastoma Cell Lines *Anticancer Res* 13:721-726

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbig RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP (1999) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System) *Cancer* 86(2): 364-372

Shimada H, Chatten J, Newton WA, et al. (1984) Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of sub-types of ganglionueroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 73:405-416

Shimada H, Nakagawa A, Peters J, Wang H, Wakamatsu PK, Lukens JN, Matthay KK, Siegel SE, Seeger RC (2004) TrkA Expression Peripheral Neuroblastic Tumors – Prognostic Significance and Biological Relevance *Cancer* 101(8):1873-1881

Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F (2003) Deletions in Chromosome Arms 3p and 11q Are New Prognostic Markers in Localized and 4s Neuroblastomas *Clin Cancer Res* 9:52-58

Theillet C (1998) Full speed ahead for tumor screening *Nat Med* 4(7):767-768

Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002) Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malginant melanoma *Eur J Cancer* 38:1708-1716

Vasudevan SA, Nuchtern JG, Shohet JM (2005) Gene Profiling of High Risk Neuroblastoma *World J Surg* 29:317-324

Vitali R, Cesi V, Nicotra MR, McDowell HP, Donfrancesco A, Mannarino O, Natali PG, Raschellà G, Dominici C (2003) c-kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited *in vitro* by STI-571 *Int J Cancer* 106:147-152

Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AM, Siu CH (2001) Involvement of integrin $\alpha(v)\beta(3)$ and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells *Mol Biol Cell* 12:2699-710

Walsh FS, Doherty P (1997) Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunglobulin Superfamily: Role in Axon Growth and Guidance *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:425-456

Weinstein JL, Katzenstein Hm, Cohn SL (2003) Advances in the Diagnosis and Treatment of Neurolastoma *Oncologist* 8:278-292

Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994) Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM and N-cadherin *Neuron* 13:583-594

Wong EV, Kenwrick S, Willems P, Lemmon V (1995) Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation *Trens Neurosci* 18:168-172

Yamashiro DJ, Liu XG, Nakagawara A, Okegaki N, McGregor LM, Baylin SB, Brodeur GM (1997) Expression and Function of Trk-C in Favorable Human Neuroblastomas *Eur J Cancer* 33(12):2054-2057

Zeng Y, Huebener N, Fest S, Weixler S, Schroeder U, Gaedicke G, Xiang R, Schramm A, Eggert A, Reisfeld RA, Lode HN (2007) Fractalkine (CX3CL1)- and Interleukin-2-Enriched Neuroblastoma Microenvironment Induces Eradication of Metastases by T Cells and Natural Killer Cells *Cancer Res* 67(5):2331-2338

Zhang X, Davis JQ, Carpenter S, Bennett V (1998) Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin *J Cell Biol* 273:30785-30794

Danksagung

Für die Vergabe des Themas und stetige Betreuung bedanke ich mich bei meinem Doktorvater und ständigem Förderer Herrn Priv. Doz. D. Kluth. Insbesondere für zahlreiche beratende und motivierende Gespräche bin ich außerordentlich dankbar.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Henning Fiegel danke ich herzlich für beispiellose und unermüdliche Betreuung und Unterstützung während der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Frau Beate Roth für hervorragende technische Unterstützung sowie äußerst freundschaftliche Zusammenarbeit, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. R. Erttmann für die freundliche Verfügungsstellung der Daten und eine erfolgreiche Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei Herrn Prof. W. Lambrecht.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Annika Krickhahn
Geburtsdatum	29.10.1980
Geburtsort	Neumünster
Familienstand	ledig, keine Kinder
Adresse	Am Welfenplatz 8, 30161 Hannover annakrickhahn@web.de

Schulausbildung

08/1987 – 06/1991	Grundschule, Timm-Kröger-Schule, Neumünster
08/1991 – 06/2000	Gymnasium, Klaus-Groth-Schule, Neumünster
06/2000	Abitur

Hochschulausbildung

SS 2001 – WS 2004	Vorklinisches Studium an der Universität Hamburg
04/2004	Physikum
SS 2004 – WS 2008	Klinisches Studium an der Universität Hamburg
Mai 2008	Staatsexamen

Dissertation

Seit 04/2005	„Korrelation von L1-CAM Expression im Neuroblastom mit klinischem Überleben“ Kinderklinik Universitätsklinik Hamburg Eppendorf, Abteilung für Kinderchirurgie Unter der Leitung von Priv- Doz. Dr. D. Kluth
--------------	---

Klinische Erfahrungen

07/2004 – 08/2004	Famulatur: Klinik und Poliklinik für Kinderkardiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. J. Weil
07/2005 – 08/2005	Famulatur: Gemeinschaftspraxis für Radiologie unter der Leitung von Dres. med. P. Dose und A. Schröder
06/2006 – 07/2006	Famulatur: Department of Paediatric Surgery, University of Liverpool, Alder Hey Children's Hospital, Liverpool, United Kingdom unter der Leitung von Prof. PD Losty, M.D.
07/2006 – 08/2006	Famulatur: Klinik und Poliklinik für Kinderherzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg GmbH unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. R. Cesnjevar
04/2007 – 07/2007	1. Tertial des Praktischen Jahres, Kantonsspital Graubünden, Abteilung für Chirurgie, Chur, Schweiz unter der Leitung von Prof. Dr. M. Furrer

07/2007 – 11/2007

2. Tertial des Praktischen Jahres, Department of Paediatric Surgery, University of Liverpool, Alder Children's Hospital, Liverpool, United Kingdom unter der Leitung von Prof. PD Losty, M.D. sowie

Department of General Pediatric Surgery and Pediatric Surgical Oncology, Hospital nacional de niños, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica unter der Leitung von Dra. Sonia Salas-Valverde, M.D.

11/2007 – 03/2008

3. Tertial des Praktischen Jahres, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg, Abteilung für Innere Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. D. Müller-Wieland

Beurfserfahrung

01.09.2008 – 31.07.2009

Assistenzärztin in der Klinik für Kinderchirurgie, Medizinische Hochschule Hannover
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Benno Ure

Seit 01.08.2009

Assistenzärztin in der Abteilung für Kinderchirurgie, Kinderkrankenhaus Altona /
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Leitende Ärztin: Frau Dr. Katharina Wenke

Publikationen

„Lack of Thy1 (CD 90) expression in neuroblastoma is correlated with impaired survival”, Fiegel HC, Kaifi JT, Quaas A, Varol E, Krickhahn A, Metzger R, Sauter G, Till H, Izbicki RJ, Erttmann R, Kluth D, Pediatric Surgery International, 2008 Jan, 24(1):101-5

“L1 is associated with favourable outcome in neuroblastoma in contrats to adult tumors”, Wachowiak R, Fiegel HC, Kaifi JT, Quaas A, Krickhahn A, Schurr PG, Erttmann R, Schachner M, Kluth D, Sauter G, Izbicki JR, Annals of Surgical Oncology, 2007 Dec; 14(12):3575-80

“L1 expression in neuroblastoma is correlated with a better clinical outcome –preliminary results”, Fiegel HC, Kaifi JT, Quaas A, Krickhahn A, Glüer S, Schurr PG, Ure B, Schachner M, Erttmann R, Sauter G, Izbicki RJ, Kluth D, Euopean Surgery, Vol.38, Suppl.No.208, April 2006

“L1 expression in neuroblastoma is correlated with a better patient's survival – preliminary results”, Krickhahn A, Kaifi JT, Quaas A, Glüer S, Schurr PG, Ure B, Schachner M, Sauter G, Izbicki JR, Lambrecht W, Erttmann R, Kluth D, Fiegel HC, Klinische Pädiatrie, 218:185-200 (2006)

Präsentationen

“Fehlende Thy1 (CD 90) Expression in Neuroblastomen korreliert negativ mit Überleben”, H Fiegel, J Kaifi, A Quaas, E Varol, A Krickhahn, R Metzger, G Sauter, H Till, J Izbicki, R Erttmann, D Kluth; 45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie, 13.-16.September 2007, Nürnberg, Vortrag

„Complications of herniotomy performed by general and paediatric surgeons – a meta-analysis“, PJ Farrelly, ME Ba'ath, A Krickhahn, EC Jesudason, PD Losty; 54th Annual BAPS International Congress, 17-20 Juli 2007, Edinburgh, UK, Vortrag

“L1 expression in neuroblastoma is correlated with a better clinical outcome – preliminary results”, H Fiegel, JT Kaifi, A Quaas, A Krickhahn, S Glüer, PG Schurr, B Ure, M Schachner, R Erttmann, G.Sauter, JR Izbicki, DKluth; 35th International Meeting of Paediatric Surgery, Obergurgl, 27.-29.März 2006, Vortrag

“L1 expression in neuroblastoma is correlated with a better patient's survival – preliminary results”, Krickhahn A, Kaifi JT, Quaas A, Glüer S, Schurr PG, Ure B, Schachner M, Sauter G, Izbicki JR, Lambrecht W, Erttmann R, Kluth D, Fiegel HC; XIX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 31.Mai-03.Juni 2006, Wilsede, Vortrag

Sonstiges

Sprachen

Englisch: sehr gute Kenntnisse (Academic IELTS 02/2008 8,0 / 9,0)
Latein
Spanisch: einfache Kenntnisse

Hamburg, Oktober 2009

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegeben Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: