

Vorgelegt am Institut für Neuropathologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Institutsdirektor: Prof. Dr. med. M. Glatzel

Histomorphologie und Antigenexpression von supra-  
und infratentoriellen pädiatrischen pilozytischen  
Astrozytomen

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:  
**Meike Stefanie Kern**  
aus Berlin

Hamburg 2017

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

**22.09.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**

**Prof. Dr. Christian Hagel**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:**

**PD Dr. Uwe Kordes**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Gang der Untersuchung und Aufgabenabgrenzung</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Pilozytische Astrozytome</b>	<b>4</b>
3.1	Definition	4
3.2	Epidemiologie	4
3.3	Symptome und klinische Befunde	5
3.4	Bildgebung	6
3.5	Makroskopie	7
3.6	Histopathologie	8
3.7	Genetik	12
3.8	Immunhistochemie	14
3.9	Metastasierung	15
3.10	Prognose und prädiktive Faktoren	16
3.11	Therapie	17
<b>4</b>	<b>Untersuchte Antigene</b>	<b>20</b>
4.1	Das zytoplasmatische Antigen Matriline-2	20
4.2	Nukleäre Antigene	21
4.2.1	NR2E1	21
4.2.2	Pax-3	24
<b>5</b>	<b>Material</b>	<b>26</b>
5.1	Patientenkollektiv und Tumorgewebe	26
5.2	Reagenzien und Antikörper	27
5.3	Laborgeräte	28
5.4	Verbrauchsmaterialien	29
5.5	Lösungen	29
<b>6</b>	<b>Methoden</b>	<b>30</b>
6.1	Schnittherstellung	30
6.2	H.E. Färbung (Histochemie)	30

6.3	Immunhistochemie.....	31
6.3.1	Testung der Vorbehandlungen und Verdünnungen .....	31
6.4	Fixation der gefärbten Schnitte .....	31
6.5	Evaluation und Statistik .....	32
6.5.1	Histomorphologische Evaluation der H.E. Schnitte .....	32
6.5.2	Immunhistochemische Evaluation.....	33
6.5.3	Klinische Variablen .....	35
6.5.4	Statistische Methoden .....	35
<b>7</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
7.1	Ergebnisse der Auswertungen des Patientenkollektivs .....	38
7.2	Ergebnisse der morphologischen Auswertungen und Korrelationsanalysen .....	40
7.2.1	Endothelproliferate .....	40
7.2.2	Gefäßfibrosen.....	42
7.2.3	Lymphozyteninfiltrate.....	43
7.2.4	Mineralisate .....	44
7.2.5	Mitosen, Nekrosen und Pleomorphie .....	46
7.2.6	Rosenthalfasern .....	47
7.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertungen und Korrelationsanalysen .....	49
7.3.1	Matrilin-2.....	49
7.3.2	NR2E1 .....	55
7.3.3	Pax-3.....	57
7.4	Statistischer Vergleich der klinischen Parameter untereinander.....	58
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
8.1	Inwieweit zeigen PA unterschiedlicher Lokalisationen differenzielle Ausprägungen bezüglich klinischer Faktoren, morphologischer Merkmale und immunhistochemischer Marker?.....	62
8.2	Inwieweit unterscheiden sich PA von Kindern unterschiedlichen Alters? .....	67
8.3	Morphologische und immunhistochemische Untersuchung.....	70
8.3.1	Inwieweit haben die untersuchten morphologischen und immunhistochemischen Variablen einen prognostischen Wert? .....	70

8.3.2	Korrelationen der morphologischen und immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse untereinander.....	72
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Summary .....</b>	<b>74</b>
<b>11</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>12</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>13</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>14</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>15</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>82</b>
<b>16</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>83</b>
<b>17</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>84</b>
17.1	Legende für Tab. 23 in Kapitel 17.2 .....	84
17.2	Auswertungs- und Berechnungsgrundlage .....	85
17.3	Tabelle zu den genetischen Veränderungen bei PA .....	88
<b>18</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>89</b>



# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

---

Pilozytische Astrozytome (PA) sind bei Kindern von 0-19 Jahren mit 19,7% die häufigsten Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) (Tibbetts et al. 2009). PA gelten als gutartige Neoplasien, entsprechen dem WHO-Grad I (I°) und Patienten können durch eine radikale operative Tumorentfernung geheilt werden. Bei subtotal operierten Tumoren zeigen sich hingegen höhere Rezidiv- und niedrigere Überlebensraten. Bislang existieren für die Routinediagnostik keine histologischen oder immunhistochemischen (IHC) Marker mit prognostischer oder therapeutischer Relevanz (Collins et al. 2016). Aufgrund der relativen Häufigkeit in ihrem Auftreten bei Patienten in den ersten beiden Lebensdekaden (Koeller und Rushing 2004) sowie der für einen Low Grade Tumor verschlechterten Prognose bei sehr jungen Patienten (Gajjar et al. 1997), ergibt sich eine besondere Relevanz, diese ausgemachte Lücke in der Forschung genauer zu betrachten. In dieser Arbeit wurde sich daher mit der Antigenexpression der IHC-Marker Matrilin-2, NR2E1 (*nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1*) und Pax-3 (*paired box 3*) sowie sechs Histomorphologien befasst. Dabei wurden PA unterschiedlicher Lokalisationen und von Kindern verschiedenen Alters hinsichtlich histologischer und immunhistochemischer Merkmale vor dem Hintergrund folgender drei Fragestellungen verglichen.

1. Inwieweit zeigen PA unterschiedlicher Lokalisationen differenzielle Ausprägungen bezüglich klinischer Faktoren, morphologischer Merkmale und immunhistochemischer Marker?

Dieser Fragestellung liegt die Annahme zugrunde, dass Tumore verschiedener Lokalisationen aus unterschiedlichen Ursprungszellen entstehen und dadurch eine differenzielle Antigenexpression (Sharma et al. 2007) oder Morphologien aufweisen bzw. sich bezüglich der Rezidivneigung oder auch des Alters, in dem sie auftreten, unterscheiden.

2. Inwieweit unterscheiden sich PA von Kindern unterschiedlichen Alters?

Möglicherweise haben sich in der Kindheit manifestierende PA andere Ursprungszellen, als PA Jugendlicher. Dies könnte ebenfalls mit einer differenziellen Bildung bestimmter Morphologien und Antigene einhergehen. Auch ein möglicher

Zusammenhang zwischen dem Rezidivieren und dem Alter, in dem ein PA erstmalig diagnostiziert wird, könnte klinische Entscheidungen beeinflussen.

3. Inwieweit haben die untersuchten morphologischen und immun-histochemischen Variablen einen prognostischen Wert?

Die dritte Fragestellung bezieht sich auf die Prognose pilozytischer Astrozytome. Viele bei anderen Tumorentitäten prognostisch aussagekräftige Antikörper, wie z.B. der Proliferationsindex Ki-67 oder die Mutation im Tumorsuppressorgen p53, haben bei PA keine Bedeutung (Collins et al. 2016). Im Falle von Ki-67 ist die Färbung aufgrund der sehr niedrigen Proliferationsrate dieser WHO I° Tumore nur selten positiv und bei PA ist meist keine p53 Mutation vorhanden. Daher wird in dieser Arbeit untersucht, ob die im Folgenden betrachteten Histomorphologien oder IHC-Marker eine klinische Relevanz für die Prognose haben, sodass diese nicht nur die Therapieentscheidung beeinflussen könnten, sondern auch Zielstruktur für therapeutische Maßnahmen wären.

## 2 Gang der Untersuchung und Aufgabenabgrenzung

---

Gegenstand der vorliegenden Forschungsarbeit bilden operativ entfernte Tumorproben von PA pädiatrischer Patienten im Alter von 1-18 Jahren, die in der Zeit von 1984 bis 2012 am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) operiert wurden.

Die verwendeten klinischen Daten stammen aus dem Archiv der Neuropathologie und der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des UKE. Für das vorliegende Patientenkollektiv sind keine Angaben für die Überlebenszeitspannen vorhanden, wie z.B. das Überleben ohne Auftreten von Events (*event free survival*, EFS), das progressionsfreie Überleben (*progression free survival*, PFS) und das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS). Als vergleichbare Variable wurden daher das Auftreten von Events und der Rezidivstatus ausgewertet. In den Rezidivstatus fließen nur Rezidive ein, die operiert wurden und von denen Tumormaterial vorhanden war. Kam es zum Tumorprogress, Auftreten eines Rezidivs, einer Metastase, oder eines Sekundärmalignoms und erfolgte keine Tumoroperation oder verstarb der Patient, wurde dieses Ereignis als Event dokumentiert.

### 3 Pilozytische Astrozytome

---

Im Folgenden wird eine Einführung über den verwendeten Gegenstand „pilozytische Astrozytome“ gegeben. Als Literatur wird, sofern nicht anders vermerkt, Collins et al. (2016), Kammler et al. (2009), Koeller und Rushing (2004) sowie Scheithauer et al. (2007) verwendet.

#### 3.1 Definition

PA sind umschriebene, meist verdrängend wachsende und histologisch gering proliferative Gliome und entsprechen histologisch dem WHO I°. Diese häufig zellarmen Tumore haben histopathologisch ein biphasisches Wachstumsmuster und bilden sowohl makroskopisch als auch histologisch sichtbare Zysten. Eine vollständige Resektion dieses zumeist bei Kindern auftretenden Tumors erfolgt in kurativer Absicht und resultiert meist in einem exzellenten Langzeitüberleben.

PA treten zum Großteil im Kleinhirn und den Mittellinienstrukturen des Großhirns auf und PA der Sehbahn sind vielfach mit der genetischen Erkrankung Neurofibromatose 1 (Morbus Recklinghausen, NF1)<sup>1</sup> assoziiert. Weitere genetische Veränderungen pilozytischer Astrozytome finden sich in Mutationen unterschiedlicher Proteine, die mit dem MAPK-Signalweg (*mitogen-activating protein kinase*) assoziiert sind.

#### 3.2 Epidemiologie

Das pilozytische Astrozytom ist das häufigste Gliom im Kindes- und Jugendalter und tritt mit einer Inzidenz von 0,84 pro 100 000 Menschen pro Jahr auf. PA machen über 5% aller Gliome aus und entstehen zu etwa 75% in den ersten beiden Lebensdekaden. Bei der Betrachtung der Altersgruppe 0-14 Jahre machen PA 17,6% aller primären Hirntumore, fast ein Drittel aller Gliome und 85% aller zerebellären Astrozytome aus. Sie haben, aufgrund ihrer Häufigkeit bei pädiatrischen Patienten mit einer intrakraniellen Neoplasie, eine hohe klinische Relevanz.

Mit einer 10-Jahres Überlebensrate von bis zu 94% haben Patienten aller Altersgruppen mit PA eine sehr gute Prognose und das beste Outcome aller Patienten

---

<sup>1</sup> NF1 ist eine autosomal dominant und monogen vererbte Erkrankung, die zu den neurokutanen Erkrankungen (Phakomatosen) gezählt wird, da sie vor allem die Haut und das Nervensystem betrifft (Ater et al. 2016).

mit intrakraniellen Tumoren. Durch eine vollständige chirurgische Exzision können Patienten geheilt werden.

PA können im gesamten ZNS auftreten, entstehen dabei meist in der Mittellinie, vornehmlich im Kleinhirn (45%), in der Sehbahn (22%) und im Hirnstamm (15%).<sup>2</sup> Bei 40-70% aller sehbahnassoziierten PA (*optic pathway glioma*, OPG) liegt die Grunderkrankung NF1 vor.

### **3.3 Symptome und klinische Befunde**

Die durch PA hervorgerufenen klinischen Symptome sind unspezifisch und entsprechen denen einer zerebralen bzw. spinalen Raumforderung. Sie sind abhängig vom Alter des Patienten, der Größe und Lokalisation der Tumormasse und davon, ob durch eine mechanische Liquorabflussbehinderung ein Hydrocephalus vorliegt (Murray et al. 2011). Die soliden Tumorteile pilozytischer Astrozytome wachsen langsam, bilden aber Zysten, die schneller größenprogredient sind als die solide Tumormasse und durch eine Verdrängung wichtiger Hirnstrukturen zu einer Verlegung der Liquorzirkulation führen können (Rutkowski et al. 2014).

Meist bestehen die Symptome über Monate. Bei 80% der Kleinhirntumore treten aufgrund eines erhöhten intrakraniellen Drucks (ICP, *intracranial pressure*) progrediente Kopfschmerzen auf. Ein erhöhter ICP geht bei 84% der Patienten mit PA mit einem Papillenödem einher und ist bedingt durch eine ventrikuläre Obstruktion, die Obstruktion des Liquorabflusses oder durch das zunehmende Volumen der Tumormasse. Weitere Symptome, die häufig bei PA des Kleinhirns auftreten, sind Übelkeit und Erbrechen (zu 75%) sowie Gangstörungen (zu 70%). Etwa die Hälfte der Patienten entwickelt einen Nystagmus, der durch eine hohe Frequenz und niedrige Amplitude gekennzeichnet ist und mit nickenden Kopfbewegungen einhergehen kann. Im Säuglingsalter tritt durch einen erhöhten ICP bei noch nicht verknöcherten Schädelsuturen zu 14% eine Makrozephalie auf. Im Kindesalter können psychomotorische Entwicklungsverzögerungen ein Warnsignal für die Erkrankung an einem Hirntumor sei. Epileptische Anfälle sind dagegen selten und weisen auf einen Tumorbefall der grauen Substanz der Kortexareale im Großhirn hin. Auch endokrinologische Fehlregulationen werden mit zunehmendem Tumorwachstum, vor

---

<sup>2</sup> Der Hypothalamus, der Thalamus, seltener die Großhirnhemisphären und der Spinalkanal sind ebenfalls mögliche Ursprungslokalisationen.

allem in hypothalamischer Lokalisation, durch Auswirkungen auf die Adeno- und Neurohypophyse häufiger. So kann es z.B. zu Störungen des Natriumhaushalts<sup>3</sup> mit entsprechender Symptomatik kommen, außerdem zu einer Pubertas tarda oder präcox mit frühzeitigem Epiphysenschluss sowie zu einer primären oder sekundären Amenorrhoe. Fokale Defizite können Hinweise auf die Lokalisation der Läsion geben<sup>4</sup>.

### **3.4 Bildgebung**

Bildgebend stellen sich zu 96% gut umschriebene, runde oder ovale Tumore dar, mit klarer Begrenzung zum umgebenden Hirnparenchym. Selten zeigt sich bereits bildmorphologisch ein infiltratives Wachstum, welches aber in 64% der Fälle histologisch nachweisbar ist. In der Magnetresonanztomographie (MRT) erscheinen PA in der T1-Wichtung meist hypo- bis isodens im Vergleich zu normalem Hirngewebe und in der T2-Wichtung imponieren zystische Areale hyperdens und solide Tumoranteile, aufgrund der häufig mikrozystischen Beschaffenheit, meist heterogen. Aufgrund des langsamen Wachstums manifestiert sich ein vasogenes Ödem, das sich in der T2-Wichtung ebenfalls hyperdens darstellt, im Vergleich zu stark proliferativen High Grade Gliomen (WHO III°-IV°) nur selten. NF1-assoziierte OPG und OPG von nicht NF1-Patienten weisen Unterschiede in der Bildgebung auf. So betreffen NF1-assoziierte PA etwa gleich häufig den N. opticus und das Chiasma, beschränken sich in ihrer Ausdehnung ausschließlich auf die Sehbahn und sind normalerweise nicht zystisch. Nicht-NF1-assoziierte OPG stellen sich aufgrund der zystischen Anteile in der MRT-Untersuchung dagegen häufig heterogen dar. Sie betreffen zumeist das Chiasma und sind nicht auf die Sehbahn begrenzt, sondern infiltrieren häufig das umgebende Hirngewebe. In der Computertomographie (CT) weisen PA selten Mineralisate auf und reichern intravenös appliziertes Kontrastmittel (KM) aufgrund der meist starken Vaskularisation zu 94% an. Das gleiche gilt häufig für die Zystenwände.

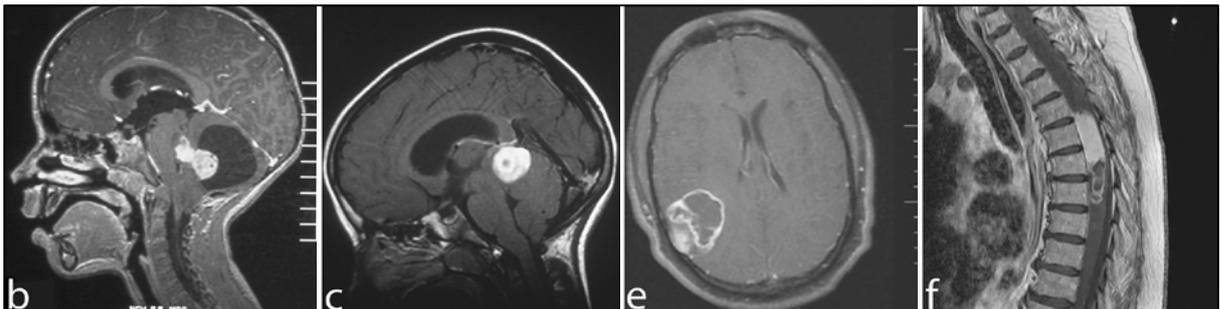
---

<sup>3</sup> Z.B. durch zentralen Diabetes insipidus und ein zerebrales Natriumverlustsyndrom.

<sup>4</sup> Beispielsweise kann sich eine intraorbitale Läsion durch eine Proptosis oculi bemerkbar machen und bei Tumorbefall des Nervus opticus (N. opticus) treten meist monokuläre Störungen auf. Kommt es dabei zur ipsilateralen Erblindung ist die Diagnose einfacher zu stellen als bei ebenfalls auftretenden Visusminderungen und Gesichtsfeldausfällen, welche oft über einen langen Zeitraum gut kompensiert werden und schwer messbar sind. Retrochiasmatische und hypothalamische Läsionen verursachen hingegen kaum Sehstörungen. Läsionen des Thalamus können durch fokale neurologische Defizite auffallen, wie z.B. einer Hemiparese bei Kompression der Capsula interna. Spinale Läsionen verursachen unspezifische Symptome einer lokalen Rückenmarksverdrängung.

Koeller und Rushing (2004) beschreiben vier vorherrschende Darstellungen pilozytischer Astrozytome in der Bildgebung, die sich z.T. in den MRT-Bildern aus Abb.1 wiederfinden.

1. Bei 46% stellt sich ein zystisches PA mit KM aufnehmender Zystenwand (vgl. Abb.1, Bilder e und f) und einem stark KM positiven randständigen Tumorknoten dar.
2. Zu 21% bestehen PA aus einem ebenso stark KM positiven, in der Zyste randständigen Tumorknoten, allerdings ohne KM Anreicherung der Zystenwand (vgl. Abb.1, Bild b).
3. Eine überwiegend solide Tumormasse mit multiplen, sehr kleinen zystischen Anteilen oder ohne zystische Formationen (vgl. Abb.1, Bild c) findet sich in 17% der Fälle.
4. Eine Raumforderung mit einer zentralen, KM-negativen Nekrose zeigt sich in 16% der Fälle. Letztere bildgebende Darstellung kann leicht zur Verwechslung mit High Grade Gliomen führen.



**Abbildung 1 – PA mit charakteristischer Darstellung im MRT**

Alle vier Abbildungen zeigen kontrastmittelaufnehmende und histologisch bestätigte PA. Quelle der Bilder und der Erklärungen: Collins et al. (2015).

**(b)** Zystischer Tumor des Kleinhirns mit solidem randständigem Tumorknoten;

**(c)** dorsal-exophytisches PA des Mittelhirns;

**(e)** ein peripherer solider Tumor des rechten Parietallappens mit zystischem Anteil. Die Zystenwand ist stark KM positiv;

**(f)** ein großer, umschriebener, intramedullärer, spinaler Tumor mit zystischer Komponente.

### 3.5 Makroskopie

Die meisten PA imponieren makroskopisch als weiche, gräuliche und knotige Tumore und sind gut vom umgebenden gesunden Gewebe abgrenzbar.

Der makroskopische Aspekt pilozytischer Astrozytome kann mit der Lokalisation variieren. So sind Tumore des Kleinhirns und der Großhirnhemisphären meist gut abgrenzbar, wachsen verdrängend und bestehen zumeist aus einer großen Zyste mit einem kleineren randständigen Tumorknoten (vgl. Abb.2, links). PA des Hypothalamus und des Chiasmata dagegen werden häufig später erkannt, da sie erst bei fortgeschrittener Größe symptomatisch werden. Somit sind Tumore dieser Lokalisationen meist groß, weich und durchzogen von vielen kleinen, teils nur mikroskopisch sichtbaren Zysten und chronische Exemplare können makroskopisch sichtbare Mineralisate bilden. Tritt ein PA im Sehnerv auf, kann es diesen umhüllen und infiltrieren und so zu einer fusiformen Verbreiterung desselben führen (vgl. Abb.2, rechts). PA der Sehnerven weisen teilweise eine Ausdehnung in die Leptomeningen auf.



**Abbildung 2 – Makroskopie pilozytischer Astrozytome**

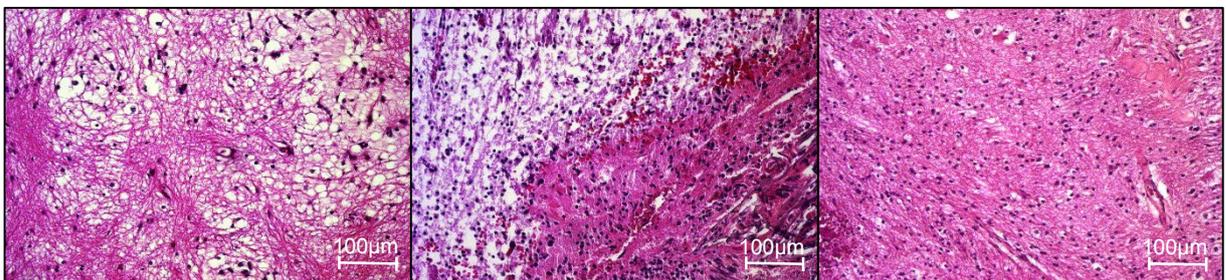
**Links:** Großes, zystisches PA des Kleinhirns. Das PA ist als typischer solider Randknoten zu erkennen. Quelle: Greenfield et al. (2002). **Rechts:** PA des N. opticus mit fusiformer Verbreiterung. Quelle: PO (2014).

### **3.6 Histopathologie**

Die Diagnosestellung pilozytischer Astrozytome und deren Abgrenzung von anderen Tumorentitäten obliegt trotz ausgiebiger genetischer Forschung weiterhin der histopathologischen Beurteilung (Collins et al. 2015).

PA weisen eine niedrige bis moderate Zellzahl mit biphasischem Wachstumsmuster auf. Dieses zeichnet sich einerseits durch einen retikulären Anteil mit multipolaren Zellen aus und andererseits durch einen fibrillären Anteil aus bipolaren Zellen, wobei im Normalfall eine der beiden Komponenten dominiert. Fibrilläre Areale sind kompakt, faserreich und geprägt von Zellen mit langen bipolaren Ausläufern, die sich über ein

ganzes mikroskopisches Sichtfeld ausdehnen können (vgl. Abb.3). Diese Bereiche bilden in den astrozytären Fortsätzen häufig sogenannte Rosenthalfasern, hell eosinophile, plumpe längliche Strukturen. Bei den retikulären Anteilen pilozytischer Astrozytome dominiert ein lockeres, mikrozystisches Gewebe mit multipolaren Zellen, die einen kleinen Zellkörper und kurze, spinnennetzartige Fortsätze haben (vgl. Abb.3). Diese Areale sind fibrillenarm und dadurch nur schwach GFAP positiv und teilweise assoziiert mit Proteinballen. Das biphasische Wachstumsmuster ist vor allem bei PA des Kleinhirns ausgeprägt. Eine mikroskopische Infiltration über mehrere Millimeter ins angrenzende Hirnparenchym ist am häufigsten bei Tumoren des N. opticus und Chiasma opticum zu beobachten.



**Abbildung 3 – Histopathologie pilozytischer Astrozytome**

**Links** (l.): Retikuläres Wachstumsmuster mit mikrozystischen Anteilen. **Mitte**: Biphasisches Wachstumsmuster in benachbarten Arealen, l. oben retikuläres, r. unten fibrilläres Areal. **Rechts** (r.): Fibrilläres Wachstumsmuster. Quelle: eigene Bilder.

Hyperchromasie und pleomorphe Nuclei, Endothelproliferate, durch Gefäßthrombosen entstandene, landkartenartige Nekrosen, eine Infiltration der Leptomeningen und selten auch Mitosen sind mit der Diagnose des PA vereinbar und kein Zeichen für Malignität.<sup>5</sup> Dennoch können diese histologischen Merkmale zu einer Verwechslung mit einem malignen Glioblastoma multiforme (GBM) führen. Auch Gefäßfibrosen und perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate sind keine ungewöhnlichen Befunde bei PA. Selten infiltrieren PA auch gesundes Hirngewebe, sodass Neuronen von der Tumormasse umschlossen werden. Das Vorhandensein von Neuronen im Tumorgebiet (dieses kommt v.a. bei zerebellären Exemplaren vor) kann zu einer Verwechslung mit Gangliogliomen führen.

Wichtig ist die Abgrenzung pilozytischer Astrozytome von dem schneller wachsenden pilomyxoiden Astrozytom (PMA), einer Unterform des PA mit monomorpher Histologie und Fehlen von Rosenthalfasern. Das PMA ist meist chiasmatisch-hypothalamisch

<sup>5</sup> Diese Histomorphologien gelten als Malignitätskriterien, weil sie bei High Grade Gliomen mit einer verschlechterten Prognose einhergehen.

lokalisiert, geht mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Rezidivrate einher. Es betrifft v.a. Kinder unter 2 Jahren.

Die große histomorphologische Variabilität pilozytischer Astrozytome und der Mangel an spezifischen immunhistochemischen, zytogenetischen oder molekularen Markern erschweren z.T. die Diagnosestellung.

Um die für PA typischen, jedoch nicht spezifischen histomorphologischen Strukturen zu veranschaulichen, werden sie nachfolgend näher beschrieben.

### *1 Endothelproliferate*

Diese Neovaskularisation ist im Tumorgewebe und in Zystenwänden häufig nachweisbar. Es wird davon ausgegangen, dass Mediatoren in der Zystenflüssigkeit die Bildung von Endothelproliferaten (EP) anregen. Umgekehrt spielen EP eine Rolle bei der Zystenbildung (Leung et al. 1997), u.a. durch die ultrastrukturell nachgewiesene Fenestration des Endothels, die möglicherweise den Flüssigkeitsaustritt aus dem Gefäßsystem begünstigt. Bei PA entstehen EP aufgrund der Produktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) durch Astrozyten und sind im Gegensatz zu EP bei GBM nicht mit Malignität assoziiert.

### *2 Gefäßfibrosen*

Gefäßfibrosen werden bei PA als regressive Veränderungen gewertet und VEGF spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung dieser (Leung et al. 1997).<sup>6</sup>

---

<sup>6</sup> Einer Studie von Leung et al. (1997) nach, hängt das Auftreten von Endothelproliferaten und Gefäßfibrosen mit einer Zystenbildung zusammen. VEGF wirkt mitogen und chemotaktisch auf Endothelzellen und induziert eine Hyperpermeabilität der Gefäße. Die Autoren nehmen an, dass das Tumorstadium zu einem steigenden Gewebedruck und dadurch zu einer Hypoxie des Gewebes führt. Dieser Prozess führt zur partiellen Degeneration der Tumorzellen und zu einem fortschreitenden Ersatz der Tumormatrix Flüssigkeit und homogenes hyalines, eosinophiles Material, welches entweder zu einer festen hyalinen Masse wird oder, zusammen mit der Flüssigkeit, eine frühzeitige Zystenbildung bewirkt. Die vitalen Tumorzellen induzieren aufgrund der Hypoxie die Expression von VEGF, wodurch es zu einer ungerichteten Proliferation von Endothelien (Endothelproliferate) und zu einer Permeabilitätssteigerung der Gefäße kommt. Beides bedingt eine Ansammlung von interstitieller Flüssigkeit und die perivaskuläre Ablagerung von Fibrin, wodurch es zu einer hyalinen Verdickung von Gefäßwänden (Gefäßfibrosen) kommt. Diese Hülle, die die Blutgefäße umgibt, erschwert den Gasaustausch und auch der steigende Gewebedruck aufgrund der Extravasation von Flüssigkeit führt zu einer zunehmenden Hypoxie, sodass es in diesem circulus vitiosus wiederum zu einer gesteigerten Produktion von VEGF kommt. VEGF induziert abermals die Extravasation von Flüssigkeit, was bei längerem Bestehen des Tumors in der Bildung großer Zysten resultiert (Leung et al. 1997).

### *3 Lymphozyteninfiltrate*

Perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate können ein Zeichen regressiver Veränderungen sein und sind häufig in PA anzutreffen.

### *4 Mineralisate*

Mineralisate sind unspezifische und selten auftretende morphologische Korrelate regressiver Veränderungen. Sie sind bei PA des N. opticus, in hypothalamischen, in thalamischen Tumoren oder in kortikal gelegenen zerebralen Tumoren zu finden. Die Tumorzellen pilozytischer Astrozytome produzieren VEGF, ein Wachstumsfaktor der die ungerichtete Proliferation von Endothelzellen bewirkt, sodass daraus Endothelien mit unzureichender Funktionsfähigkeit resultieren (Leung et al. 1997). Es wird angenommen, dass es bei einer Leckage des Endothels zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke kommt, die mit der Bildung von Mineralisaten einhergehen kann (Keller et al. 2013<sup>7</sup>).

Laut einer Publikation von Tibbetts et al. (2009) sind Mineralisate mit einem erniedrigten EFS assoziiert.

### *5 Mitosen*

Mitosen sind in bis zu 30% der Fälle bei PA nachweisbar und nicht mit erhöhter Malignität assoziiert. Allerdings ist eine maligne Transformation zu einem anaplastischen PA möglich, das u.a. durch einen erhöhten Mitoseindex<sup>8</sup> gekennzeichnet ist.

### *6 Landkartenartige Nekrosen*

Landkartenartige Nekrosen sind regressive Veränderungen pilozytischer Astrozytome, die aus der Thrombosierung von Gefäßen resultieren. Im Gegensatz zu Nekrosen mit Pseudopalisadenformationen, wie sie im GBM anzutreffen sind, sind sie kein Zeichen erhöhter Malignität. Einer Studie von Tibbetts et al. (2009) nach sind landkartenartige Nekrosen mit einem erniedrigten EFS assoziiert.

---

<sup>7</sup> Keller et al. (2013) bezogen ihre Untersuchungen nicht auf Mineralisate in Hirntumoren, sondern untersuchten u.a. idiopathische Mineralisate der Basalganglien. Vom Grundprinzip ist aber eine Vergleichbarkeit gegeben.

<sup>8</sup> Definiert durch > 4 Mitosen pro zehn hochauflösende Gesichtsfelder.

### *7 Pleomorphie*

Im Allgemeinen wird die Pleomorphie als Malignitätskriterium angesehen und beschreibt bei der histologischen Betrachtung ein heterogenes Bild der Zellen und Zellkerne. Die Pleomorphie beinhaltet die Beurteilung der Form und Größe der Zellen und Zellkerne, bei der z.B. eine zugunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation auffallen kann. Außerdem können die Zellkerne hyperchrom erscheinen.

### *8 Proteinballen*

Proteinballen sind rundliche Aggregate aus degenerativen Anteilen von Astrozyten. Sie befinden sich innerhalb astrozytärer Fortsätze, deuten auf ein langsames Wachstum sowie einen niedrigen WHO Grad hin und sind mit einer guten Prognose assoziiert. Sie sind charakteristisch, aber nicht spezifisch für PA, und sind häufig in anderen glialen oder glioneuronalen Neoplasien sowie in reaktiven nicht tumorösen Läsionen zu finden.

### *9 Rosenthalfasern*

Rosenthalfasern sind stark eosinophile, amorphe, meist korkenzieherförmige intrazytoplasmatische Fibrillen, die aus alpha-B-Krystallin bestehen sowie randständig GFAP positive Strukturen aufweisen können. Rosenthalfasern kommen vorwiegend in kompakten, fibrillären Anteilen der PA vor. Sie gelten nicht als spezifisch für PA oder andere Neoplasien und sind auch kein notwendiges Kriterium zur Diagnosestellung von PA. Rosenthalfasern werden auch bei anderen langsam fortschreitenden Prozessen gebildet, wie z.B. bei Gliose, in Gangliogliomen oder bei chronisch reaktiver Gliose.

## **3.7 Genetik**

PA weisen unterschiedliche genetische Veränderungen auf, die Teile des MAPK-Signalwegs aktivierend beeinflussen. Die am häufigsten nachgewiesenen Mutationen sind Fusionsmutationen mit BRAF und Mutationen des NF1 Gens. Weiterhin umfassen diese genetischen Veränderungen die zu etwa 5% auftretende V600E Mutation, außerdem die seltenen Mutationen und Fusionen des FGFR1-Gens sowie Fusionen von Genen der NTRK-Familie, sehr selten KRAS Mutationen und Fusionen des RAF1-

Gens mit SRGAP3.<sup>9</sup> Weitere Mutationen, die v.a. bei Tumoren von Jugendlichen und Erwachsenen nachgewiesen wurden, sind Polysomien der Chromosome 5, 6, 7, 11 und 15.

Die bei PA nachweislich häufigste genetische Veränderung betrifft mit über 70% das BRAF-Gen, wobei die N-terminale regulatorische Einheit des BRAF durch die N-terminale Domäne eines anderen Gens ersetzt wird. Die BRAF-Kinase-Einheit bleibt somit erhalten, ist durch den Wegfall der regulatorischen Einheit unkontrolliert und aktiviert somit fortlaufend den MAP-Kinase-Signalweg. Die N-terminale Fusion mit KIAA1549 ist die häufigste Fusionsmutation mit BRAF und der Nachweis einer BRAF-KIAA1549-Fusion unterstützt in Zusammenschau mit histomorphologischen Befunden die Diagnose eines PA. Ist sie jedoch nicht nachweisbar, ist ein PA nicht auszuschließen, da auch andere, den MAPK-Signalweg beeinflussende Mutationen vorliegen können.

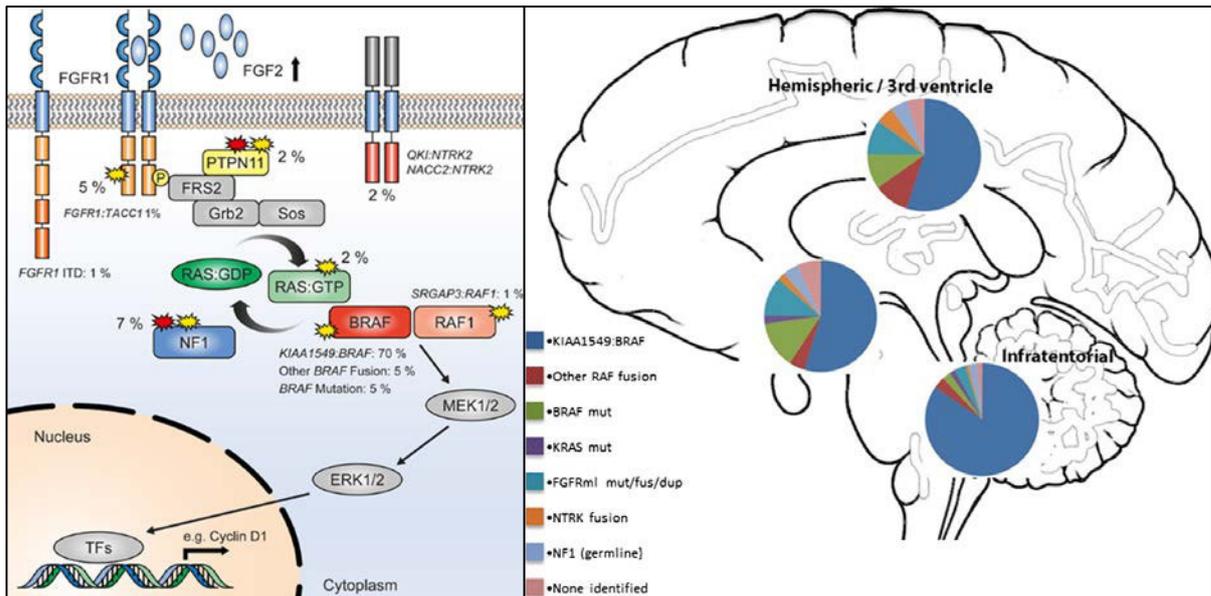
PA sind zu etwa 8% mit NF1-assoziiert. NF1 ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die bei Neugeborenen mit einer Inzidenz von etwa 1:3.000 auftritt. Etwa bei der Hälfte aller Fälle handelt es sich um eine de-novo-Mutation. NF1 geht mit einfachen oder multiplen Gendefekten im NF1-Gen auf dem Chromosom 17 einher. Dieses kodiert das Protein Neurofibromin und fungiert im MAPK-Signalweg als GAP (GTPase-aktivierendes Protein) für RAS (Rat sarcoma), sodass ein Verlust von NF1, wie es bei NF1-assoziierten PA der Fall ist, zu einer Aktivierung des RAS führt (Bollag et al. 1996, Helfferich et al. 2016).

Eine TP53 Mutation kommt bei PA sehr selten vor und hat im Gegensatz zu vielen anderen Gliomen (z.B. dem diffusen Astrozytom) keinen Einfluss auf die Entwicklung pilozytischer Astrozytome.

Die Auswirkungen der aufgeführten Mutationen auf die einzelnen Reaktionsschritte des MAPK-Signalwegs werden in der schematischen Abbildung (vgl. Abb.4, links) auf zellulärer Ebene dargestellt. Die schematische Darstellung eines Gehirns zeigt die lokalisationsabhängigen Häufigkeiten der unterschiedlichen, den MAPK-Signalweg von PA betreffenden Mutationen.

---

<sup>9</sup> Die wichtigsten Mutationen und deren Inzidenzen sind in tabellarischer Form mit einer Erklärung der jeweiligen Mutation und der diagnostischen Relevanz in Kap. 17.3 aufgelistet (Quelle: Collins et al. 2015).



**Abbildung 4 – Der MAPK-Signalweg**

**Links:** Illustration der Komponenten des MAPK-Signalwegs auf zellulärer Ebene mit Angaben der ungefähren Inzidenzen (in % der untersuchten PA) der unterschiedlichen Mutationen bei PA. Quelle: Collins et al. (2015). **Rechts:** Zusammenfassung der Häufigkeiten der verschiedenen den MAPK-Signalweg betreffenden Mutationen in Abhängigkeit von der Lokalisation. Diesen Tortendiagrammen liegt die von Zhang et al. (2013) durchgeführte Untersuchung an einem Kollektiv von 188 Patienten mit PA zugrunde. Dort ist zu entnehmen, dass die Fusionsmutation KIAA1549:BRAF mit etwa 90% vor allem bei zerebellären Tumoren vorkommt. FGFR1 Mutationen sind hauptsächlich in Tumoren der Mittellinie nachweisbar, während die BRAF Mutation und Fusionsmutationen der NTRK-Familie häufiger supratentoriell nachweisbar waren. Quelle: Collins et al. (2015). \*Beschriftung nach der in Collins et al. (2016) veröffentlichten Abbildung durch Meike Kern hinzugefügt.

Die WHO-Klassifikation zentralnervöser Tumore aus dem Jahr 2007 beschreibt das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Matrilin-2-Protein als Unterscheidungsmerkmal sporadisch auftretender, aggressiverer PA von meist indolenten NF1 assoziierten Tumoren.

### 3.8 Immunhistochemie

PA sind gut differenzierte Gliome astrozytären Ursprungs und zeigen immunhistochemisch eine starke Expression von GFAP, S100 und OLIG2. Da bei PA eine aktivierende genetische Veränderung des MAPK-Signalwegs nachweisbar ist (vgl. Kap. 3.7), zeigt eine IHC Färbung der phosphorylierten MAPK bei PA durchgängig Positivität. Weiterhin kann Synaptophysin, welches vor allem bei ganglion neuronalen Tumoren nachweisbar ist, eine partielle oder schwache Reaktivität zeigen. In der Regel werden solide PA von gesunden Axonen des anliegenden und durch das PA verdrängten ZNS umgeben. Axone exprimieren das immunhistochemisch nachweisbare Neurofilamentprotein (NFP).

Zum Ausschluss eines PA kann z.B. die Bestimmung des R132H-mutierten IDH1 Proteins erfolgen, da PA im Gegensatz zu diffusen Gliomen ausnahmslos keine Reaktivität bei dieser Färbung zeigen. Die Negativität eines Tumors für diese Mutation ist jedoch nicht gleichbedeutend mit der Diagnose eines PA, da auch pädiatrische diffuse astrozytäre Tumore negativ für die IDH1 Mutation sein können und bisher nicht alle IDH1-Mutationsvarianten immunhistochemisch nachweisbar sind.

### **3.9 Metastasierung**

PA metastasieren selten. In solchen Fällen sind meist bereits bei Diagnosestellung des Primärtumors, der in solchen Fällen vorwiegend im Hypothalamus lokalisiert ist, Metastasen nachweisbar. Die Proliferationsrate ist auch im Falle einer Metastasierung niedrig, sodass die Bestimmung des Ki-67-Index bei PA keinen Hinweis auf das atypische Verhalten einer Metastasierung gibt. Eine Metastasierung ist bei PA kein Zeichen aggressiven Wachstums. Sowohl Primärtumor als auch Metastasen wachsen meist langsam, können asymptomatisch sein und die tumorbedingte Mortalität ist trotz Metastasierung meist nicht erhöht. Damit sind auch ohne eine adjuvante Therapie gute Ergebnisse des Gesamtüberlebens gegeben.

Bei einer z.Z. der Primäroperation bestehenden leptomeningealen Dissemination haben Patienten ein verschlechtertes Outcome gegenüber Fällen einer lokalisierten leptomeningealen Infiltration (Collins et al. 2015). Eine liquorigene Metastasierung ins ZNS ist mit Prävalenz von 2-12% selten, tritt vorrangig innerhalb von drei Jahren nach Erstdiagnose auf und ist nicht notwendigerweise mit einer verschlechterten Prognose assoziiert. Drei Faktoren sind mit einer erhöhten Rate von Fernmetastasen assoziiert:

1. PA des Hypothalamus weisen, vermutlich aufgrund der lokalen Proximität zum ventrikulären System, am ehesten Fernmetastasen auf. Als weitere Erklärung wird von Koeller und Rushing angeführt, dass bei den entsprechenden Untersuchungen möglicherweise keine Unterscheidung zwischen PA und der aggressiveren pilomyxoiden Unterform (PMA) von PA, die primär in der Region des Hypothalamus auftritt, durchgeführt wurde.
2. Eine subtotale Resektion von PA.
3. Das Alter. PA von Kleinkindern unter vier Jahren z.Z. der Erstdiagnose zeigen häufiger Fernmetastasen als ältere Kinder.

### **3.10 Prognose und prädiktive Faktoren**

Mit einem 5- und 10-Jahres OS von über 95% und einer 20-Jahres Überlebensrate von 79% nach chirurgischer Intervention und ohne (neo-)adjuvante Therapie, ist die Prognose pilozytischer Astrozytome sehr gut. Im Normalfall bleibt der WHO Grad über Jahrzehnte stabil. Die langen Überlebenszeiten resultieren womöglich aus dem langsamen und statt infiltrierendem meist verdrängendem Wachstum und auch aus den verbesserten Techniken und Instrumenten der Neurochirurgie.<sup>10</sup>

Manche PA sind dem Operationsziel einer makroskopisch vollständigen Resektion aufgrund der Größe und Lokalisation nicht zugänglich. In diesen Fällen wird eine subtotale Resektion durchgeführt. Diese verschlechtert das PFS, u.a. aufgrund von Lokalrezidiven, um etwa 10 Prozentpunkte. Die meisten Rezidive treten innerhalb der ersten vier Jahre nach initialer OP auf.

Die Lokalisation und das Ausmaß der Resektion des Primärtumors, der neurologische Status des Patienten und der NF1-Status haben einen Einfluss auf die Prognose. Patienten mit einem guten neurologischen Status bei Diagnosestellung, einer Neurofibromatose Typ 1 und einem PA, bei dem eine makroskopisch komplette Resektion durchführbar ist, haben mit einem 5-Jahres OS von 99% eine sehr gute Prognose (Ater et al. 2016). Die Lokalisation in der Sehbahn ist bei NF1-Patienten mit sehr guten und bei nicht-NF1-Patienten mit besonders schlechten Überlebensraten assoziiert. So leiden insbesondere nicht-NF1-Patienten mit einem PA der Sehbahn häufiger an rezidivierenden Tumoren, als solche mit Tumoren anderer Lokalisationen und als NF1-Patienten. Sie haben darüber hinaus mit 86% ein schlechteres 5-Jahres OS (Ater et al. 2016). Bei zusätzlicher Infiltration des Hypothalamus haben die Patienten eine besonders schlechte Prognose. Allerdings gehören die infiltrierend wachsenden PA der Sehbahn, die in die Statistiken einbezogen wurden, möglicherweise zur pilomyxoiden Unterform (vgl. Kap. 3.6) von PA. Ein weiterer die Prognose beeinflussender Faktor könnte das Kindesalter sein. Allerdings herrscht über die Richtung und Wirkung des Zusammenhangs Uneinigkeit in der Forschung. Während Stokland et al. (2010) jüngeren Kindern gegenüber älteren ein vermindertes PFS zuschreiben, können Fisher et al. (2008) keinen altersspezifischen Unterschied

---

<sup>10</sup> Das 10-Jahres-Überleben vor 1970 betrug 70% und nach 1970 bereits etwa 90%.

feststellen. Gnekow et al. (2012) fanden sogar ein besseres PFS bei Kindern unter elf Jahren im Vergleich zu elf bis 16-jährigen.

Eine maligne Transformation mit entsprechender Histologie<sup>11</sup> und klinisch aggressivem Verhalten ist extrem selten. Das PA wird dann als anaplastisches (malignes) pilozytisches Astrozytom bezeichnet. Es wird angenommen, dass die Radiotherapie ein Faktor sein könnte, der eine Entartung der Tumorzellen begünstigt und damit auf lange Sicht das Outcome verschlechtert.

Eine Besonderheit von PA ist die selten auftretende spontane Remission (Piccirilli et al. 2006). Diese betrifft vorrangig NF1-erkrankte Kinder und Patienten mit OPG, mit PA des Diencephalons und der Tectalregion. Mögliche Erklärungsansätze für die spontane Remission sind eine postoperative Apoptose der Tumorzellen oder eine Thrombose der den Tumor versorgenden Gefäße und dadurch eine Infarzierung des Tumorgewebes. Außerdem könnte eine gegen die Tumorzellen gerichtete Reaktion des körpereigenen Immunsystems ursächlich sein.

### **3.11 Therapie**

Die Therapie hängt von der Lokalisation und Größe des Tumors sowie vom Alter des Patienten ab. Eine chirurgische Tumorexstirpation ist die Therapie der Wahl, ggf. wird sie durch eine Radio- oder Chemotherapie ergänzt.

Die leitliniengerechte Therapie zerebellärer PA ist die chirurgische Exstirpation des PA mit dem Ziel der vollständigen Entfernung der Tumormasse und mit einer Sicherung von Tumorgewebe zur histologischen Untersuchung. Außerdem, wenn notwendig, mit einer Wiederherstellung der Liquorpassage durch das Einbringen eines Shunts und damit symptomatischen Therapie eines Hydrocephalus. Eine weitere Option stellt die Punktion einer Zyste mit dem Ziel der Druckentlastung dar.

Bezüglich der Resektion von Zysten gibt es unterschiedliche Ansätze. So kann z.B. die Zystenwand belassen und ausschließlich das Tumorgewebe entfernt werden, Biopsien genommen, oder auch die gesamte Zyste entfernt werden. Die vollständige

---

<sup>11</sup> Histologische Korrelate für Malignität eines Tumors sind z.B. ein erhöhter Mitoseindex, Hyperzellularität, Endothelproliferate oder pseudopalisadenbildende Nekrosen.

Entfernung der Zystenwand war nicht mit einem verbesserten Überleben assoziiert (Palma und Guidetti 1985 in Koeller und Rushing 2004).

Tumorrezidive werden ebenfalls möglichst operativ entfernt. Sind sie aufgrund der Lokalisation, Ausdehnung oder Dissemination inoperabel, wird eine Radio- oder Chemotherapie empfohlen.

Bei Tumoren der Sehbahn wird in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Tumors, bereits vorhandenen Schäden sowie des NF1-Status<sup>12</sup> entschieden, ob eine primäre Operation, eine adjuvante Strahlentherapie oder eine watch and wait Strategie, die mit klinischen und bildgebenden Follow-up Untersuchungen einhergeht, indiziert ist. Aufgrund der radiologisch meist sehr eindeutigen Darstellung von PA ist eine histologische Verifikation der Diagnose nicht zwingend erforderlich.

Insgesamt ist das postoperative Outcome gut. Selten werden anhaltende, den Patienten einschränkende neurologische Defizite beobachtet und nur in wenigen Fällen zeigen sich aufgrund tumor- oder operationsbedingter Verletzungen subtile kognitive und adaptive Defizite. Der Karnowsky-Index<sup>12</sup> liegt postoperativ bei über 80% der Patienten bei über 90 Punkten, d.h. sie sind zu normaler Aktivität fähig und haben nur minimale Symptome ihrer Erkrankung. Die Therapieentscheidung bei PA ist vor allem bei operativ schwer zugänglichen Tumoren und bei NF1-erkrankten Kindern besonders erschwert, da Patienten mit PA in seltenen Fällen Tumorremissionen zeigen.

Eine weitere Therapieoption stellt v.a. für Kinder bis zum fünften Lebensjahr und NF1-Patienten die Chemotherapie dar. Diese ist bei Tumorprogression, neurologischen Ausfällen durch einen postoperativ verbliebenen Resttumor und um eine Radiotherapie hinauszuzögern indiziert. Die Chemotherapie, z.B. bestehend aus einer Kombination aus Platinderivaten und Vincristin, kann bei unvollständiger Resektion postoperativ oder bei jüngeren Kindern mit Tumoren der Mittellinie neoadjuvant durchgeführt werden. Vor allem bei NF1-assoziierten PA zeigt die wöchentliche Verabreichung einer Kombination aus Carboplatin und Vincristin gute Resultate (Ater et al. 2016). PA sprechen meistens erst nach mehreren Monaten auf die Therapie an.

---

<sup>12</sup> Der Karnowsky-Index dient der Quantifizierung der Beeinträchtigung eines Patienten durch seine Erkrankung. Er reicht von 0 Punkte = Tod bis 100 Punkte = keinerlei Beschwerden oder Hinweise auf die Erkrankung (Kumar und Kalra 2008).

Ursächlich hierfür könnte die für PA charakteristische langsame Wachstumsgeschwindigkeit sein.

Auch die Radiotherapie ist eine Option für Patienten über acht Jahren mit einem klinisch vermuteten oder bildgebend verifizierten inoperablen PA bzw. Tumorrezidiv oder -progress. Allerdings ist eine Abwägung zwischen Nutzen und Spätfolgen der Therapie durchzuführen, da die Strahlentherapie mit maligner Transformation pilozytischer Astrozytome in Verbindung gebracht wird. Diese Folgeschäden sind aufgrund der sehr guten Langzeitprognose auch metastasierter PA von großer Bedeutung und daher zu vermeiden. Eine NF1-Mutation stellt aufgrund des erhöhten Risikos vaskulärer Komplikationen eine relative Kontraindikation für die Bestrahlungstherapie dar. Strahlensensible Areale wie das Chiasma und der Pons limitieren die Strahlendosis auf insgesamt 54 bis 59,4 Gray. Das Ziel der Bestrahlung ist die lokale Tumorkontrolle sowie den Tumorprogress zu stoppen.

## 4 Untersuchte Antigene

---

Ein Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Antigene durch immunhistochemische Detektion auf ihr Vorkommen in PA bei Kindern unterschiedlichen Alters und auf ihre differenzielle Expression in verschiedenen Tumorlokalisationen zu überprüfen. Darüber hinaus war von Interesse ein Antigen zu finden, dessen Bestimmung einen prognostischen Wert und somit eine mögliche klinische Relevanz hat.

Die hier untersuchten drei Marker zeigten bereits in anderen Studien zu PA in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation eine unterschiedliche Expression (Sharma et al. 2006 und 2007).

### 4.1 Das zytoplasmatische Antigen Matrilin-2

Humanes Matrilin-2 ist ein oligomeres Protein, das faserartige Netzwerke in den extrazellulären Matrices unterschiedlicher Gewebe bildet. Der humane Matrilin-2 Vorläufer wird von einer 4,0-Kilobasen (kb) mRNA (*messenger ribonucleic acid*) kodiert, besteht aus 956 Aminosäuren (Muratoglu et al. 2000) und hat ein molekulares Gewicht von 107 kDA (SCB 2016). Matrilin-2 beinhaltet fünf von Willebrand Faktor A Domänen und es gibt zwei Transkriptvarianten des Matrilin-2-Gens (MATN2), die für unterschiedliche Isoformen des Matrilin-2-Proteins kodieren. Das MATN2 wurde via Fluoreszenz in situ Hybridisierung auf dem langen Arm des Chromosoms 8 (8q22) lokalisiert (NCBI 2016a).

Eine spezifische Funktion von Matrilin-2 wurde noch nicht festgestellt (NCBI 2016a), es gibt jedoch Hinweise darauf, dass prämyelinisierende Schwannzellen während der normalen Entwicklung Matrilin-2 exprimieren, und dass Matrilin-2 einen Einfluss auf das Verhalten von Gliazellen und Neuronen in vitro hat. Dort dient Matrilin-2 als Substrat für axonales Wachstum und Zellmigration und wird für die effektive neuronale Regeneration benötigt. So konnte Matrilin-2 in peripheren Nervenläsionen, in Spinalganglien, die sich in frühen Entwicklungsstadien befanden, sowie in Dura- und Pia mater des ZNS nachgewiesen werden. Auch im Endoneurium von sich entwickelnden Spinalnerven und von Nerven des peripheren Nervensystems (PNS) wird Matrilin-2 gebildet. Diese Ergebnisse resultierten aus Untersuchungen von Zellkulturen und Experimenten an Mäusen (Malin et al. 2009).

Sharma et al. (2006) führten Untersuchungen an 86 sporadischen und zehn NF1-assoziierten PA durch. Es wurde eine Assoziation von einer erhöhten Matrilin-2-Expression und einem aggressiven Verhalten von PA gefunden sowie eine Korrelation zwischen hoher Expression und supratentorieller Lokalisation. Die vier rezidivierenden PA der zitierten Studie zeigten bereits zum Zeitpunkt der ersten Operation eine erhöhte Matrilin-2-Expression. Aus ihren Ergebnissen schließen Sharma et al., dass Matrilin-2 ein spezifischer und klinisch relevanter Biomarker für die Unterscheidung zwischen indolenten und klinisch aggressiven PA ist und eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese und Progression von PA spielt (Sharma et al. 2006). In der WHO-Klassifikation für Tumore des ZNS findet Matrilin-2 ebenfalls als bei sporadischen PA überexprimiertes Antigen Erwähnung (Scheithauer et al. 2007).

## **4.2 Nukleäre Antigene**

### **4.2.1 NR2E1**

Das NR2E1-Gen<sup>13</sup> (nuclear receptor subfamily 2 group E member 1) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 6 (6q21) lokalisiert (NCBI 2016b) und kodiert einen aus 385 Aminosäuren bestehenden Orphanrezeptor (*orphan nuclear receptor tailless*) mit einer Molekülmasse von 42589 Da (GC 2016a).

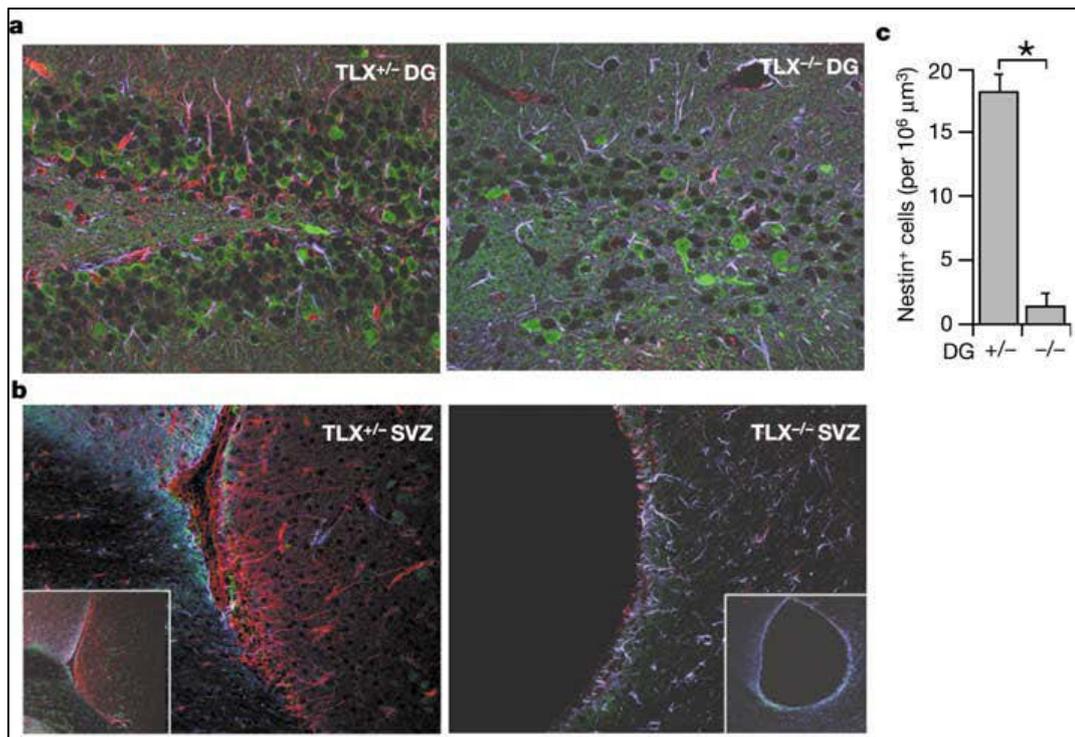
Während der embryonalen Entwicklung wird NR2E1 im sich entwickelnden Vorderhirn exprimiert und im adulten Gehirn zeigen insbesondere die periventrikulären neuronalen Stammzellen (*neuronal stem cells*, NSC) Positivität für NR2E1. Der Neokortex embryonaler Gehirne von NR2E1-Knockout-Mäusen weist eine beträchtliche Verschmälerung auf. Außerdem sind in der Keimzone (Germinationszone; *germinal zone*) eine verminderte Expression von Nestin (ein Marker für neuronale Vorläuferzellen) und eine verminderte Zellproliferation evident. Die Zellzyklusanalyse hat verlängerte Zellzyklen und eine häufigere Zellzyklus-Terminierung, also den Eintritt in die G0 Phase, bei embryologischen Gehirnen von NR2E1-losen Mäusen ergeben. Dies weist darauf hin, dass NR2E1 eine wichtige Rolle für NSCs des sich entwickelnden Gehirns spielt.

Qu und Shi (2009) verglichen die Gehirne adulter NR2E1-heterozygoter (TLX<sup>+/-</sup>) Mäuse mit den Gehirnen adulter NR2E1-loser (TLX<sup>-/-</sup>) Mäuse. Bei der in vitro

---

<sup>13</sup> Synonyme für NR2E1 sind TLX, TLL und XTLL.

Untersuchung der isolierten Neuronen konnte festgestellt werden, dass NSCs von TLX<sup>-/-</sup> Mäusen im Gegensatz zu den heterozygoten Tieren keine Fähigkeit zur Proliferation zeigten. Somit besteht Grund zur Annahme, dass NR2E1 für den Erhalt neuronaler Stammzellen im undifferenzierten und selbst-erneuerbaren Zustand essentiell ist. Im gesunden adulten Gehirn wird NR2E1 in den beiden Bereichen exprimiert, in denen die Neurogenese durch NSCs stattfindet: in der subventrikulären Zone (SVZ) und dem Gyrus dentatus (*dentate gyrus*, DG) des Hippocampus (Qu und Shi 2009). Abbildung 5 zeigt immunhistochemische Bilder des DG (Bild a) und der SVZ (Bild b) adulter Mäuse mit einer bei TLX-losen Mäusen im Vergleich zu den TLX<sup>+/-</sup> Tieren auffällig verminderten Nestinexpression (rot). Diese lässt darauf schließen, dass die Dichte neuronaler Vorläuferzellen in den Arealen adulter Neurogenese bei TLX<sup>-/-</sup> Mäusen vermindert ist. Das Balkendiagramm (c) zeigt die signifikant verminderte Anzahl Nestin-positiver Zellen im DG (pro 10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>) bei TLX-Knockout-Mäusen im Vergleich zu heterozygoten Tieren. Außerdem weisen TLX<sup>-/-</sup> Tiere eine gesteigerte Expression des gliazellspezifischen Astrozytenmarkers GFAP (blau) auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass dort eine vermehrte Differenzierung zu Gliazellen stattfindet, und dass die TLX-Rezeptor-abhängige Unterdrückung der GFAP Transkription für die Erhaltung des undifferenzierten Zustandes neuronaler Stammzellen wichtig ist (Shi et al. 2004).



**Abbildung 5 – Verminderung der Nestinexpression und Erhöhung der GFAP-Expression bei TLX-Knockout Mäusen.**

**a)** Koronal geschnittener DG (dentate gyrus, Gyrus dentatus) von TLX<sup>+/-</sup> und TLX<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit Nestin (rot), Calbindin (grün) und GFAP (blau) gefärbt. **b)** Koronale Schnitte der subventrikulären Zone (SVZ) von TLX<sup>+/-</sup> und TLX<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit Nestin (rot), Calbindin (grün) und GFAP (blau) gefärbt. **c)** Bestimmung Nestin-positiver Zellen im DG von TLX<sup>+/-</sup> und TLX<sup>-/-</sup> Mäusen (\* $P < 0,01$ ; T-Test). Quelle: Shi et al. (2004).

NR2E1-Knockout-Mäuse sind lebensfähig und wirken bei der Geburt auf den ersten Blick gesund (Qu und Shi 2009). Adulte NR2E1-Knockout-Mäuse haben signifikant verschmälerte zerebrale Hemisphären und gravierende Retinopathien. Auch die Verhaltensmuster dieser Mäuse sind auffällig. So zeigen TLX<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Aggressivität, ein vermindertes Paarungsverhalten, eine spät manifestierende Epilepsie und eine eingeschränkte Lernfähigkeit (Qu und Shi 2009).

Die Rolle von NR2E1 in Hirntumoren ist noch nicht endgültig erforscht. Park et al. (2010) fanden in ihrer Studie eine Überexpression von NR2E1 in unterschiedlichen Zelllinien von Gliomen und in Gliom-Stammzellen von GBM und eine Korrelation mit einer verschlechterten Prognose der Gliompatienten. Eine ektopische Expression von NR2E1 (z.B. durch Ink4a/Arf<sup>-/-</sup> Astrozyten) beschleunigte die Zellproliferation und Tumorbildung in vitro. Dies deutet darauf hin, dass NR2E1 in die Entstehung von Gliom-Stammzellen involviert und dadurch eine potenzielle therapeutische Zielstruktur für diese Gliome sein könnte (Park et al. 2010).

In einer Studie von Sharma et al. aus dem Jahr 2007 wurden 41 PA bezüglich der Quantität von NR2E1-positiven Zellen evaluiert. Tumorproben, bei denen weniger als 5% der Zellen mit NR2E1 gefärbt waren, wurden als negativ gewertet. Zeigte sich über 75% des Tumorpräparats gefärbt, wurde es als positiv für NR2E1 gewertet. Alle 41 PA konnten einer der beiden Einteilungen zugeordnet werden. Sowohl bei den PA als auch bei den untersuchten Ependymomen konnte supratentoriell eine erhöhte NR2E1-Expression im Vergleich zu Tumoren der Fossa posterior festgestellt werden. Dieser Unterschied konnte auch für andere Antigene nachgewiesen werden. Sharma et al. (2007) folgern daraus, dass sich gliale Stammzellen nicht nur in Abhängigkeit von der jeweiligen Hirnregion bezüglich ihres Genexpressionsmusters unterscheiden, sondern auch je nach Lokalisation spezifische biologische Eigenschaften haben, die möglicherweise für die Tumorentstehung von Bedeutung sind. Ferner könne ein gemeinsames Genexpressionsmuster von Astrozytomen und Ependymomen darauf hindeuten, dass diese histologisch unterschiedlichen Hirntumore eine gemeinsame Ursprungszelle haben (Sharma et al. 2007).

#### **4.2.2 Pax-3**

Das PAX3-Gen (*Paired Box Gene 3*) kodiert für das aus 479 Aminosäuren bestehende Paired box protein (Pax-3), welches eine Molekülmasse von 52968 Da hat (GC 2016b). PAX3 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q35) lokalisiert (NCBI 2016c). Es ist eins von neun Entwicklungskontrollgenen der paired box (PAX) Familie, die für nukleäre Transkriptionsfaktoren kodieren (Chen et al. 2012). Typischerweise beinhalten PAX-Proteine eine paired box Domäne (*paired box domain*) und eine paired-type Homöodomäne (*paired-type homeodomain*) und spielen eine wichtige Rolle in der fetalen Entwicklung (NCBI 2016c).

Während der frühen Entwicklung ist Pax-3 in die Regionalisierung des Gehirns und die Ausbildung einer dorso-ventralen Polarität des Rückenmarks involviert. So zeigt sich bei sechs Wochen alten humanen Embryos eine starke Pax-3-Expression an der Grenze zwischen Mesencephalon und Rhombencephalon sowie in den dorsalen Anteilen der ventrikulären Zone der Medulla oblongata (Terzić und Saraga-Babić 1999). Pax-3 wird im dorsalen Neuralrohr und der Neuralleiste gebildet (Chen et al. 2012). Weiter ist es in den Verschluss des Neuralrohrs, die Entwicklung der Neuralleiste und die Differenzierung von Neuronen des PNS involviert. Außerdem

sorgt Pax-3 für den Erhalt myogener Vorläuferzellen, die sowohl in Skelettmuskelzellen als auch in glatte Muskelzellen differenzieren können. Bei adulten Mäusen ist Pax-3 in die regenerative Myogenese involviert (Ichi et al. 2011), im adulten humanen Gehirn dagegen nicht nachweisbar (Chen et al. 2012).

Eine persistierende Expression von Pax-3 in kranialen Neuralleistenzellen kann zu okulären Defekten, Gaumenspalten und perinataler Letalität bei Mäusen führen (Chen et al. 2012). Homozygote PAX3 defiziente Mäuse (PAX3<sup>-/-</sup>) haben dagegen Neuralrohrdefekte und multiple Defizite, die auf eine fehlerhafte Entwicklung der Neuralleiste hindeuten. So weisen sie u.a. angeborene Herzfehler und defiziente oder absente periphere Ganglien<sup>14</sup> auf (Chi und Epstein 2002).

Beim Menschen resultiert eine Mutation des PAX3-Gens im Waardenburg Syndrom mit Fehlentwicklungen von Augen und Nase sowie Taubheit und Pigmentierungsstörungen (Terzić und Saraga-Babić 1999). Außerdem wurde Pax-3 bereits in verschiedenen Tumoren nachgewiesen. So unterdrückt Pax-3 die Apoptose von Melanomzellen (Chi und Epstein 2002) und wird auch in Rhabdomyosarkomen und High Grade Gliomen exprimiert. Aus der Untersuchung von Chen et al. (2012) resultiert das Pax-3-Protein als ein intrinsischer Regulator für das progressive Wachstum von Gliomzellen und ist bei Gliompatienten mit einem erniedrigten krankheitsbedingten Überleben assoziiert (Chen et al. 2012). In ihrer in vitro Studie zeigten Liu et al. (2011), dass Pax-3 an den GFAP Promoter bindet und die Expression von GFAP sowie die Differenzierung von Astrozyten aus NSC negativ reguliert. D.h. bei zunehmender Pax-3-Expression differenzieren weniger NSCs zu Astrozyten. Sharma et al. (2007) konnten in der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Untersuchung außerdem eine erhöhte Expression von PAX3 bei PA der Fossa posterior im Vergleich zu supratentoriell lokalisierten PA nachweisen.

---

<sup>14</sup> Ein Beispiel für fehlende periphere Ganglien bei PAX3<sup>-/-</sup> Mäusen ist der Morbus Hirschsprung (Chi und Epstein 2002).

## 5 Material

---

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe, Materialien, Chemikalien und Reagenzien sowie Lösungen beschrieben.

### 5.1 *Patientenkollektiv und Tumorgewebe*

Im Archiv des Instituts für Neuropathologie des UKE waren insgesamt Tumorproben von 179 Fällen pilozytischer Astrozytome vorhanden. Diese verteilten sich auf die Jahre 1981 bis 2012. Von jedem Fall wurde für die vorliegende Arbeit eine Tumorprobe ausgewählt, davon histologische Schnitte angefertigt (vgl. Kap. 6.1) und diese mit H.E. gefärbt (vgl. Kap. 6.2), um die Tumorentität zu überprüfen. Weiter wurde festgestellt, ob eine ausreichende Menge des Tumorgewebes für die weitere Evaluation vorhanden war. Alle Tumorproben, von denen nicht ausreichend Tumormaterial vorhanden oder kein Tumorgewebe nachweisbar war bzw. bei denen die Diagnose eines PA nicht sicher verifiziert werden konnte, wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Zuletzt wurden Tumorproben der Patienten exkludiert, die zur Zeit der Tumoroperation 19 Jahre oder älter waren. Für die Studie blieben 91 Tumorproben pädiatrischer Patienten im Alter von 1-18 Jahren übrig. Diese hatten ein mittleres Alter von 9,6 Jahren und mit einem Anteil von 56% waren weibliche Patienten gegenüber männlichen etwas überrepräsentiert. Aufgrund einer Rezidivierung waren 7 Patienten doppelt im Patientenkollektiv vorhanden, da von beiden Tumoroperationen Tumormaterial vorhanden war. Die verbliebenen Tumorproben wurden nach histomorphologischen Kriterien ausgewertet (vgl. Kap. 6.5.1).

Für die Evaluation einer möglichen prognostischen Relevanz der untersuchten Faktoren stellte Herr PD Dr. med. U. Kordes aus der Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des UKE klinische Informationen bezüglich des Auftretens von *events* (Ereignissen) zur Verfügung. Zu diesen zählten im vorliegenden Patientenkollektiv die Tumorprogression, das Auftreten eines Rezidivs, einer Metastase, eines Sekundärmalignoms oder auch der Tod eines Patienten.

## 5.2 Reagenzien und Antikörper

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Studie verwendeten Reagenzien in Tab.1 aufgelistet. Eine Übersicht zu den Antikörpern findet sich in Tab. 2.

**Tabelle 1 – Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge**

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Amplifier A (~ 4 µg/mL)	Ventana Roche	253-2122
Amplifier B (~ 5 µg/mL)	Ventana Roche	253-2123
Antibody Diluent Reagent Solution	Invitrogen	00.3218
Bluing Reagent (0,1 M Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,5 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Ventana Roche	760-2037
CC1 (ready-to-use)	Ventana Roche	950-124 2L
CC2 (ready-to-use)	Ventana Roche	950-123
DAB (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma	D5637
Eosin	Merck	1.15935.0100
Essigsäure konz.	Sigma Aldrich	27225-1L-R
Eukitt	Kindler	
Ethanol 50%, 70%, 80%	Eigene Verdünnung von 100% Ethanol mit Aqua dest.	
Ethanol 96%, 100%	Apotheke UKE	
EZ Prep(tm) Konzentrat	Ventana Roche	950-120 2L
Glas Mounting Medium	Sakura	1408
Goat Serum (Ziegen Serum)	DAKO	X0907
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Perhydrol)	Merck	1.07209
Hämalaun nach Mayer	Merck	1.09249.0500
Hämatoxylin nach Harris	Roth	x903.1
HCl	Merck	1.00316.1000
Hematoxylin (≤ 48%)	Ventana Roche	760-2021
Histofine Simple Stain Max PO	Nichirei Bioscience	414154 F
LCS (ready-to-use)	Ventana Roche	650-010 2L
Phloxin B	Sigma Aldrich	2759-256
Protease 1 (~ 0,38 mg/ml)	Ventana Roche	760-2018
Reaction buffer (Konzentrat)	Ventana Roche	950-300 2L
SSC (Konzentrat)	Ventana Roche	950-110 2L
Tris ohne Triton	Roth	
TBS-Pufferfertigmischung	DAKO	S1968
Triton X100	Serva	37238
Ultraview Universal DAB Detection Kit - 25ml ultraView Universal DAB Chromogen - 25ml ultraView Universal DAB Copper - 25ml ultraView Universal DAB H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - 25ml ultraView Universal DAB Inhibitor - 25ml ultraView Universal HRP Multimer	Ventana Roche	760 500
Xylol	Th. Geyer	326.2500

**Tabelle 2 – Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen**

Antikörper	Matrilin-2	NR2E1/ TLX	PAX3
Hersteller- bezeichnung	Matrilin-2 (H-65) rabbit polyclonal IgG	NR2E1 Rabbit anti- Human Polyclonal (N- Terminus) Antibody	PAX3 Rabbit anti-Human Polyclonal (C-Terminus) Antibody
Hersteller	Santa Cruz Biotechnology, INC.	LifeSpan BioSciences, Inc.	LifeSpan BioSciences, Inc.
Bestellnummer	sc-66959	LS-A2516	LS-B1554
Chargen Nr.	LOT A0108	LOT 40596	LOT 22407
Vorbehandlung	Citratpuffer mit 30 min Einwirkzeit	Citratpuffer mit 30 min Einwirkzeit	Citratpuffer mit 30 min Einwirkzeit
Verdünnung	1:50	1:500	1:500

### 5.3 Laborgeräte

In Tabelle 3 findet sich eine Auflistung der verwendeten Laborgeräte mit dem jeweiligen Hersteller und der Funktion in alphabetischer Reihenfolge.

**Tabelle 3 – Laborgeräte mit dazugehörigen Herstellern und Funktionen**

Gerät	Hersteller	Funktion und Typ
Glaseindeckautomat	Laica	Automatische Applikation von Kleber und Abdeckung des Präparates mit einem Deckglas. Typ: CV5030
Heizbad	GFL	Zum Glätten der histologischen Schnitte
Heizschrank	Heraeus Instruments	Zum Abtropfen des Paraffins von den Objektträgern vor der H.E. Färbung. Typ B6
Klingen	Feather R 35	Zur Verwendung im Microtom
Kühlplatte	Laica	Kühlung der Paraffinblöcke vor dem Schneiden am Mikrotom. Typ: EG1150C
Microtom	Laica	Schneiden der Paraffinblöcke. Typ: SM2000R
Mehrsichtiges Mikroskop	Olympus Corporation	Zur Beurteilung histologischer Schnitte. Model: U-MDO10R3
Pipetten	Eppendorf	Pipettieren kleiner Mengen unterschiedlicher Flüssigkeiten. Größen: 20µl, 100µl, 1000µl
Ventana Systems	Roche Tissue Diagnostics	Vollautomatische immunhistochemische Färbung der histologischen Schnitte. Typ: BenchMark XT/LT (Serien-Nr.:714005)

## 5.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

**Tabelle 4 – Verbrauchsmaterialien mit dazugehörigen Erklärungen und Herstellern**

Verbrauchsmaterialien		
Material	Beschreibung	Hersteller
Deckgläser	24 x 50mm	Marienfeld Laboratory Glassware
Eppendorf Tubes	Pipettenspitzen	Eppendorf
Hochtransparentes Zeichenpapier	Pergamentpapier	Hahnemühle
Tissue Tek	Zur Fixation d. Deckglases	Sakura
Klingen	Für das Microtom	Feather Microtome Blades R35
Objektträger	SuperFrost/ Plus Objektträger; No. 2409/1	Hecht Assistent

## 5.5 Lösungen

Nachfolgend werden die Lösungen aufgeführt, die für die H.E. Färbung (vgl. Tab. 5) und für die immunhistochemischen Färbungen in der Ventana verwendet wurden (vgl. Tab. 6).

**Tabelle 5 – Lösungen für die H.E. Färbung**

Bezeichnung	Lösungen
HCL-Wasser-Gemisch	4ml HCL 25%ig in 500ml Aqua destillata (aqua dest., destilliertes Wasser)
Stammlösungen	3g Eosin in 300ml Aqua dest. (Lösung A)
	0,5g Phloxin B in 50ml Aqua dest. (Lösung B)
Gebrauchslösung	50ml Lösung A + 5ml Lösung B + 390ml 96% Alkohol + 2ml konzentrierte Essigsäure

**Tabelle 6 – Lösungen für die Ventana**

Bezeichnung	Lösung
Diluent	10ml AB Diluent (Antibody Diluent Reagent Solution) + 9ml Tris ohne Triton + 1ml Ziegenserum
EZ Prep	18 Liter Aqua dest.+ 2 Liter EZ Konzentrat
Reaction buffer	18 Liter Aqua dest. + 2 Liter Reaction buffer
2xSSC	10 Liter Aqua dest. + 2 Liter 2 x SSC Konzentrat

## 6 Methoden

---

### 6.1 Schnittherstellung

Die postoperativ in Formalin fixierten und daraufhin in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden auf der Kühlplatte auf 4°C gekühlt, um das Paraffin besser schneiden zu können. Danach wurden mit einem Microtom histologische Schnitte von 3µm Dicke angefertigt. Anschließend wurden die in kaltem Wasser aufgefangenen Schnitte in einem Wasserbad bei 56°C gestreckt und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Die Objektträger mit dem Tumorschnitt wurden mit feuchtem Pergamentpapier fest angedrückt und geglättet.

### 6.2 H.E. Färbung (Histochemie)

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte der H.E. Färbung und deren Durchführung.

**Tabelle 7 – Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Arbeitsschritt	Durchführung	Zeit
Deparaffinierung	Heizschrank bei 60°C	30 Min.
	Xylol-Bad	30 Sek.
Rehydratation	Absteigende Ethanolreihe 2 x 100%, 2 x 96%, 80%, 70%, 50%	jeweils 2 Min.
	Aqua dest.	2 Min.
H.E. Färbung	Hämatoxylin nach Härris (frisch filtriert)	5 Min.
	In Wasser abspülen	5 Sek.
	Differenzieren in HCL-Wasser-Gemisch	
	Bläuen in fließendem Leitungswasser	5 Min.
	Alkohol 70%	1 Min.
	Eosin Gebrauchslösung	1 Min.
	Nicht gebundenen Farbstoff in 100%igem Alkohol in drei Küvetten ausspülen	1 Min.
	Xylol in drei Küvetten	2 Min.

## **6.3 Immunhistochemie**

### **6.3.1 Testung der Vorbehandlungen und Verdünnungen**

Die verwendeten Antikörper wurden zunächst für den Färbeautomaten (Ventana) validiert.

Für Matrilin-2 ist bekannt, dass es regelhaft in der Basalmembran und im Hautanhangsgebilde (wie Gefäßwänden und Haarfollikeln) vorkommt (Piecha et al. 2002). Es wurde daher als Positivkontrolle für die Validierung des Matrilin-2-Antikörpers ein Hautpräparat verwendet. Da für NR2E1 und Pax-3 das Vorkommen in Tumoren bekannt ist, wurden als Kontrollpräparate für NR2E1 ein Glioblastom (vgl. Liu et al. 2010) und für Pax-3 ein malignes Melanom gewählt (vgl. Bartlett et al. 2015).

Für jedes Gewebe wurde der dazugehörige Antikörper jeweils in den Verdünnungen 1:50, 1:200 und 1:500 getestet. Hierbei wurde der Antikörper in Diluent für die Ventana verdünnt. Für jede der drei Verdünnungen wurden fünf verschiedene Vorbehandlungen getestet (T. CC1m, T. CC1mA, T. CC1Std, T. CC1StdA und T. CC2m)<sup>15</sup>. Ein sechster Schnitt wurde ohne Vorbehandlung (T. oV) in den unterschiedlichen Verdünnungen des Antikörpers gefärbt.

Die besten Resultate für Matrilin-2, NR2E1 und Pax-3 ergaben sich aus der Vorbehandlung mit Citratpuffer mit 30 min Einwirkzeit (T. CC1m).

## **6.4 Fixation der gefärbten Schnitte**

Um das Gewebe nach der H.E. Färbung bzw. nach der Färbung in der Ventana für die Fixation wieder zu entwässern, wurden die Objektträger mit den histologischen Schnitten für jeweils 30 Sekunden sukzessive in Alkohol mit steigender Konzentration (50%, 70%, 80%, 2x 96%, 2x 100%) getränkt. Anschließend wurde der Alkohol durch

---

<sup>15</sup> T. oV = ohne Vorbehandlung

T. CC1m = Citratpuffer mit 30min Einwirkzeit

T. CC1mA = Citratpuffer mit 30min Einwirkzeit mit Amplifizierung

T. CC1Std = Citratpuffer mit einer Stunde Einwirkzeit

T. CC1StdA = Citratpuffer mit einer Stunde Einwirkzeit mit Amplifizierung

T. CC2m = EDTApuffer mit 30min Einwirkzeit

ein zweiminütiges Xylol-Bad aus dem Gewebe verdrängt und die histologischen Schnitte getrocknet, bevor sie mit Deckgläsern versehen wurden.

## **6.5 Evaluation und Statistik**

Im Folgenden werden die Kriterien der histomorphologischen (vgl. Kap. 6.5.1) und immunhistochemischen Evaluationen (vgl. Kap. 6.5.2) beschrieben. Weiterhin wird ein Überblick über die untersuchten klinischen Faktoren (vgl. Kap. 6.5.3) sowie die verwendeten statistischen Analysen (vgl. Kap. 6.5.4) gegeben.

### **6.5.1 Histomorphologische Evaluation der H.E. Schnitte**

Die morphologische Evaluation der H.E. gefärbten Tumorpräparate erfolgte durch Prof. Dr. Christian Hagel (C.H.) und die Verfasserin (Meike Kern, M.K.) parallel an einem mehrsichtigen Mikroskop. Jedes untersuchte histologische Präparat wurde nach den im Folgenden angeführten Kriterien auf das Vorkommen der jeweiligen Histomorphologien untersucht. Die Reihenfolge der untersuchten Präparate war zufällig und unterlag keiner bestimmten Ordnung.

#### *Gefäßsystem assoziierte Veränderungen*

Die Untersuchung von Endothelproliferaten wurde semiquantitativ ausgewertet und entsprechend folgender Graduierung eingeteilt:

- (0) keine vorhanden
- (1) vereinzelt vorhanden
- (2) einige vorhanden
- (3) viele vorhanden.

Gefäßfibrosen und Lymphozyteninfiltrate wurden dichotom nach denselben Kriterien ausgewertet: je nachdem ob Gefäßfibrosen oder Lymphozyteninfiltrate im Tumorpräparat zu erkennen waren, galt der Tumor als

- (0) negativ für die jeweilige Morphologie
- (1) positiv für die jeweilige Morphologie.

### *Tumorassoziierte Morphologien*

Je nachdem ob Mineralisate im Tumorpräparat vorhanden waren, galt der entsprechende Tumor als

- (0) negativ für Mineralisate
- (1) positiv für Mineralisate.

Die drei Parameter Mitosen, Nekrosen und Pleomorphie wurden in der Auswertung als eine Variable zusammengefasst, da sie bei PA insgesamt sehr selten auftreten und im Allgemeinen als Malignitätskriterien bei Tumoren angesehen werden. Es musste demnach nur eines dieser drei Kriterien vorhanden sein, damit der Tumor als positiv (1) zu codieren war. Waren dagegen weder Mitosen, Nekrosen noch pleomorphe Veränderungen zu verzeichnen, wurde der Tumor als negativ (0) gewertet.

Das Vorhandensein von Rosenthalfasern wurde semiquantitativ ausgewertet und entsprechend folgender Graduierung eingeteilt:

- (0) keine vorhanden
- (1) vereinzelt vorhanden
- (2) einige vorhanden
- (3) viele vorhanden.

### **6.5.2 Immunhistochemische Evaluation**

Die immunhistochemisch mit Matrilin-2, NR2E1 und Pax-3 gefärbten Schnitte wurden semiquantitativ nach dem im Folgenden angeführten Modus 1 ausgewertet. Matrilin-2 nimmt dabei eine gesonderte Stellung ein, da Sharma et al. (2006) eine Assoziation von einer erhöhten Matrilin-2-Expression mit einer verschlechterten Prognose der Patienten fanden. Diese war in der vorliegenden Untersuchung von besonderem Interesse. Da Sharma et al. (2006) in ihrer Publikation nicht offenlegen, nach welchem Modus sie Matrilin-2 ausgewertet haben, wurde Matrilin-2 zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Sharma et al. in der vorliegenden Studie mittels folgender drei Auswertungsmodi durchgeführt.

- 1) Auswertungsmodus 1: Durchschnittliche Färbeintensität, Graduierung 0 bis 3. Dieser Modus wird standardmäßig im Institut für Neuropathologie des UKE bei der immunhistochemischen Evaluation angewandt (Hagel et al. 2013). Es wird

dabei die durchschnittliche Färbung des gesamten Präparats beurteilt. Die Auswertung wurde semiquantitativ nach folgenden Kriterien unterschieden:

- (0) keine Färbung
- (1) geringe Färbung des gesamten Präparats oder starke Färbung sehr kleiner Areale
- (2) mittelstarke Färbung des gesamten Präparats oder starke Färbung mittelgroßer Areale
- (3) starke Färbung des gesamten oder eines Großteils des Präparats.

War bspw. die Hälfte des Präparats negativ für Matrilin-2 (0) und die andere Hälfte mittelstark (2) gefärbt, ergab sich eine geringe Färbung (1) des gesamten Präparats.

2) Auswertungsmodus 2: Anzahl positiver Zellen, Graduierung 0 und 1.

War weniger als 5% des Präparats angefärbt, so wurde es als 0, war mehr als 75% des Präparats positiv für den Antikörper, wurde es als 1 bewertet. Lag die prozentuale Färbung des Tumors in der Mittelkategorie dazwischen, so konnte das Präparat keinem Wert zugeordnet werden und es wurde von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte quantitativ und unabhängig von der Färbeintensität. Sie wurde in Anlehnung an den bei Sharma et al. (2007) angewandte Auswertungsmodus durchgeführt.

3) Auswertungsmodus 3: Stärkste Faser, Graduierung 0 bis 3.

Bei diesem Auswertungsmodus wurden die am stärksten gefärbten Fasern als Bewertungsgrundlage genommen. Es liegt dabei die Annahme zugrunde, dass die Proteinexpression eines kleinen Areals eine Auswirkung auf den gesamten Tumor haben kann. Somit wurde die stärkste Intensität der Antigenexpression auch sehr kleiner Tumoreale berücksichtigt. Dies geschah unabhängig von der Färbung des restlichen Tumorgewebes. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ nach folgendem Modus:

- (0) Keine Färbung
- (1) am stärksten positive Fasern waren gering gefärbt
- (2) am stärksten gefärbte Fasern waren mittelstark gefärbt
- (3) am stärksten positive Fasern waren stark gefärbt.

Demnach wurde z.B. ein zum Großteil Antikörper-negativer Tumor mit (3) bewertet, sofern ein sehr stark gefärbtes Areal vorlag.

Im Gegensatz zu Matrilin-2 wurden die anderen beiden in dieser Studie untersuchten Marker NR2E1 und Pax-3 ausschließlich nach Modus 1) ausgewertet.

### **6.5.3 Klinische Variablen**

Als klinische Variablen wurden für die Untersuchungen der vorliegenden Studie folgende Parameter einbezogen: Alter, Geschlecht, Lokalisation der Tumore, Events, Primärtumore ohne Rezidive, Primärtumore mit Rezidiven und Rezidive.

Zur Vereinfachung wurden die sieben detaillierten Lokalisationsangaben der Datenbank (vgl. Kap. 7.1 Abb. 7) in drei Gruppen zusammengefasst: supratentorielle PA, PA der Fossa posterior und spinale PA.

In Anlehnung an die Untersuchung von Gnekow et al. (2012) (vgl. Kap. 8.2) wurde die Variable Alter zusätzlich auch für die zwei Altersgruppen 1-10 und 11-18 Jahre betrachtet. Dies diente der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit anderen Studien (vgl. u.a. Gajjar et al. 1997, Gnekow et al. 2012).

### **6.5.4 Statistische Methoden**

Die statistischen Auswertungen wurden unter der Beratung durch Hrn. H. Pinnschmidt aus dem UKE, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, durchgeführt. Sie haben explorativen Charakter und sind aufgrund der relativ kleinen Stichprobe nicht als bestätigend anzusehen.

Als orientierende statistische Methode für ordinalskalierte Daten wurde eine nichtparametrische Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b durchgeführt. Für das Alter wurde eine parametrische Rangkorrelation nach Spearman gerechnet. Die Analyse nach Spearman nutzt die Differenz zwischen den Rängen während Kendall-Tau-b den Unterschied in den Rängen bei intervallskalierten Daten berechnet.

Die Berechnungen nach Kendall-Tau-b korrelierten alle Wertepaare untereinander und die Berechnungen nach Spearman korrelierten das Alter mit allen anderen Variablen. Bei beiden statistischen Verfahren wurden ausschließlich Primärtumore des Patientenkollektivs als Grundgesamtheit gerechnet (n=75), um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Rezidive wurden entsprechend nicht inkludiert. Alle Berechnungen zur Lokalisation beinhalteten insgesamt 74 Fälle, da zur Lokalisation eines Primärtumors in der Datenbank keine Angabe vorhanden war.

Für spezifische Vergleiche zweier Gruppen mit mehreren Variablen und Test der Homogenität der Varianzen wurde eine einfaktorielle ANOVA als parametrische Methode gerechnet. Dabei wurden folgende drei Analysen durchgeführt:

- 1) Alle Primärtumore, die im Verlauf rezidierten, wurden gegen die nicht-rezidivierenden Primärtumore ausgewertet und die Ausprägungen aller Variablen verglichen. Dabei wurde sich ausschließlich auf Primärtumore bezogen, um festzustellen, ob bestimmte Variablen bei rezidivierenden im Vergleich zu nicht rezidivierenden Primärtumoren eine andere Ausprägung haben.
- 2) Aufgrund des aktuellen Forschungsstands (vgl. Tibbetts et al. 2009) wurden in der zweiten Auswertung PA der Sehbahn gegen PA aller anderen Lokalisationen ausgewertet und bezüglich der Ausprägung aller Variablen verglichen. Hierbei wurden ausschließlich nicht-rezidivierende Primärtumore und Primärtumore, die im Verlauf rezidiert sind, in die Berechnungen inkludiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten.
- 3) In der dritten Analyse wurden die nicht-rezidivierenden-Primärtumore gegen die Rezidive ausgewertet und die Ausprägung aller Variablen verglichen. Die Analyse diente der Evaluation, ob es einen Unterschied zwischen Rezidiven und Primärtumoren bezüglich der Nachweisbarkeit bestimmter Morphologien oder Antigene gibt.

Als letzte Auswertung wurde ein T-Test von gepaarten Stichproben durchgeführt. Der Primärtumor und sein dazugehöriges Rezidiv wurden bezüglich ihrer Ausprägung der Morphologien und IHC-Marker verglichen. Dabei wurde getestet, ob ein Unterschied in der Expression bestimmter Antigene bzw. der Bildung einzelner Morphologien zwischen dem Rezidiv und dem Primärtumor desselben Patienten vorliegt.

## 7 Ergebnisse

---

Nachfolgend werden die Resultate der morphologischen und immunhistochemischen Auswertungen und die Ergebnisse der Korrelationsanalysen dieser in Zusammenschau mit den korrelierenden klinischen Faktoren aufgeführt.

Es wurden dabei die Zusammenhänge der im Folgenden benannten 17 Variablen ausgewertet. Es wurden die folgenden acht klinischen Faktoren betrachtet: Alter, Geschlecht, Lokalisation, OPG als spezifische Lokalisation, Events, Primärtumore ohne Rezidive, Primärtumore mit Rezidiven und Rezidive. Die sechs morphologischen Kriterien Endothelproliferate, Gefäßfibrosen, Lymphozyteninfiltrate, Mineralisate, Mitosen, Nekrosen oder Pleomorphie (die letzten drei als eine Variable<sup>16</sup>) und Rosenthalfasern sowie die drei immunhistochemischen Färbungen von Matrilin-2, NR2E1 und Pax-3.

Neben den Histogrammen, welche die lokalisationsabhängige Ausprägung der morphologischen und immunhistochemischen Variablen darstellen, wird jeder dieser Variablen zur Veranschaulichung beispielhaft ein histologisches Bild angefügt. Weiterhin findet sich in den Fällen ordinalskaliertter Variablen ein Diagramm der Medianwerte für die Auswertungsergebnisse mit dem 95%igen Konfidenzintervall (CI). Für die folgenden Berechnungen der lokalisationsabhängigen Unterschiede wurden zwei Tumorproben exkludiert, für die in der Datenbank keine Angabe zur Lokalisation vorhanden war. Damit ergibt sich für das betrachtete Patientenkollektiv bei lokalisationsabhängigen Auswertungen und Ergebnisdarstellungen eine Grundgesamtheit von 89 Fällen. Lokalisationsunabhängige Berechnungen inkludieren mit 91 Fällen das gesamte Patientenkollektiv.

Es wurden insgesamt sechs Korrelationsanalysen durchgeführt (vgl. Kap. 6.5.4). Die Resultate werden nachfolgend den einzelnen Unterpunkten zugeordnet, welche die morphologischen und immunhistochemischen Auswertungsergebnisse darlegen. Die Korrelationen klinischer Faktoren untereinander werden am Ende gesondert betrachtet. Auf weitere bereits zuvor erwähnte Korrelationen wird im Fließtext ein

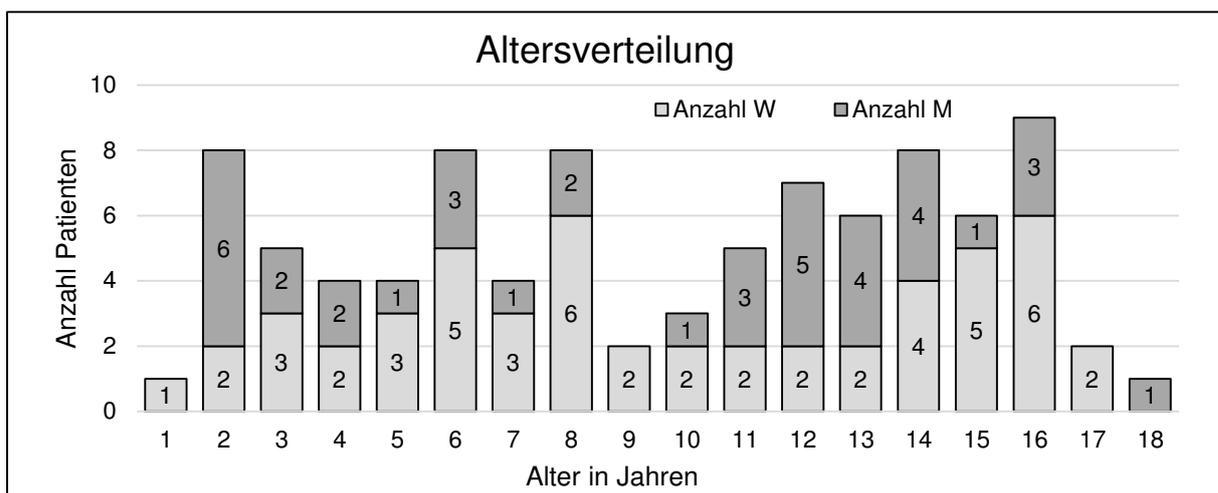
---

<sup>16</sup> Vgl. Kap. 6.5.1.

kurzer Verweis gegeben. Es erfolgt ausschließlich eine Darstellung auf dem 95%igen Konfidenzintervall signifikanter Zusammenhänge.

### 7.1 Ergebnisse der Auswertungen des Patientenkollektivs

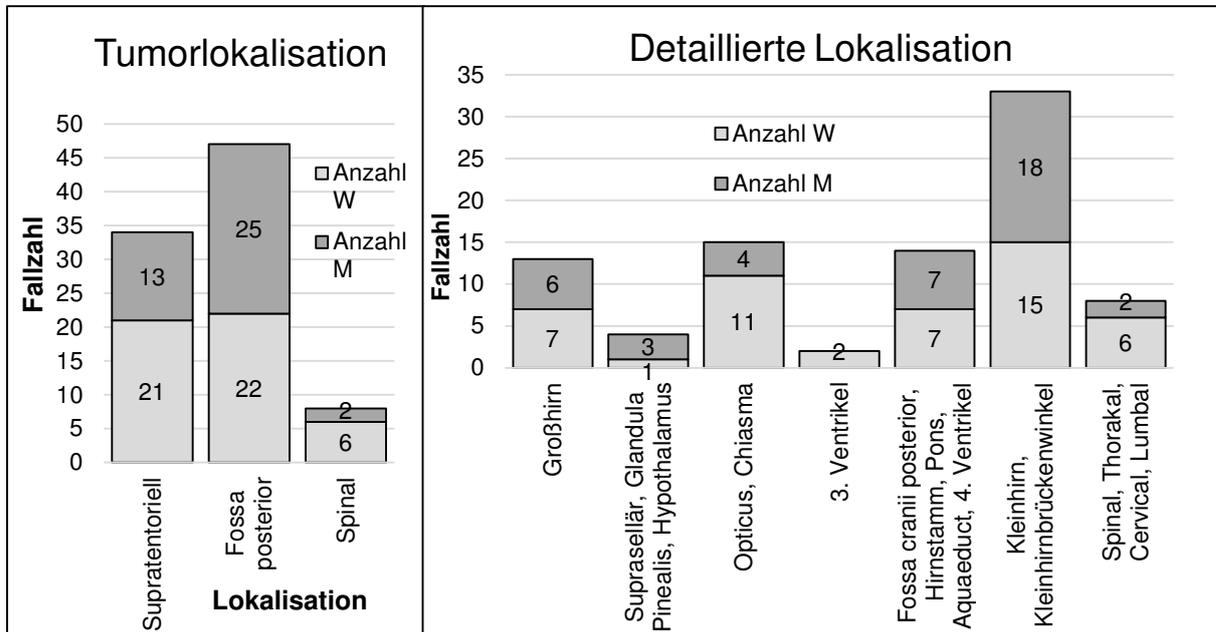
Bei der Betrachtung der Altersverteilung im Patientenkollektiv (vgl. Abb. 6) wird ersichtlich, dass es am oberen und unteren Ende der Skala nur wenig oder auch keine Fälle gab. So wurden keine Tumorproben von Kindern unter einem Jahr untersucht, und jeweils nur ein Fall im Alter von einem und von 18 Jahren sowie zwei Fälle im Alter von 17 Jahren. In den Altersstufen von zwei bis 16 Jahren fanden sich hingegen jeweils mindestens zwei und höchstens neun Patienten desselben Alters, mit Ausnahme des 9. Lebensjahrs. Dort waren nur zwei Patienten im vorliegenden Patientenkollektiv vorhanden.



**Abbildung 6 – Altersverteilung des untersuchten Patientenkollektivs**

Aus Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass die Lokalisation in der Fossa posterior bei dem Patientenkollektiv prädominierte (52,8%) und dort die Aufteilung von männlichen Patienten zu weiblichen mit 25:22 nahezu ausgeglichen war. Von den 38,2% der supratentoriell lokalisierten Tumore waren hingegen 64,7% von weiblichen Patienten (vgl. Abb. 7 links). Die spinalen Tumore bildeten mit zwei männlichen und vier weiblichen Patienten die kleinste Gruppe. Bei der Betrachtung der detaillierten Lokalisationen fällt auf, dass PA entsprechend der WHO-Klassifikation (Collins et al. 2016) zum Großteil in den Strukturen der Mittellinie entstanden sind (vgl. Abb. 7 rechts). Mit 37,1% waren die Lokalisationen im Kleinhirn und Kleinhirnbrückenwinkel die häufigsten. 16,9% der Tumore waren mit der Sehbahn (Chiasma, N. opticus) assoziiert. Weitere 15,7% der Tumore traten im Hirnstammbereich auf (Fossa cranii

posterior, Hirnstamm, Pons, Aquaeduct und 4. Ventrikel) und 14,6% der Tumore im Großhirn. Von den 15 im Chiasma und N. opticus lokalisierten Tumoren stammten 73,3% von weiblichen Patienten. 80% davon traten bei Kindern unter zehn Jahren auf.



**Abbildung 7 – Tumorlokalisation**

**Links:** Lokalisation gegliedert nach supratentorieller und spinaler Lage, bzw. Lokalisation in der Fossa posterior. **Rechts:** Detaillierte Lokalisationsangaben des untersuchten Patientenkollektivs; X-Achse: Lokalisation.

In dem Patientenkollektiv war ungefähr ein Viertel<sup>17</sup> der Tumore rekurrent. Bei 38,5% aller Tumore war ein Event dokumentiert und bei 9,3% aller Primärtumore wurde das dazugehörige Rezidivpräparat desselben Patienten ebenfalls untersucht. Insgesamt waren 16 der 91 Tumorpräparate Rezidivtumore. Dies entspricht 17,6% des gesamten Kollektivs. Weiterhin fällt auf, dass 69,6% aller rezidivierenden Tumore bei weiblichen Patienten auftraten (vgl. Tab. 8 (1) und (2)).

**Tabelle 8 – Rezidivverteilung der Tumorproben**

Rezidivstatus	Anzahl gesamt	Anzahl W	Anzahl M	Alter ≤10 Jahre	Alter >10 Jahre
(1) Primärtumore ohne Rezidiv	68	35	33	30	38
(2) Primärtumore mit Rezidiv	7	5	2	6	1
(3) Rezidive ohne Primärtumor	16	11	5	11	5

Die Analyse der klinischen Daten zeigt, dass in der Gruppe der Primärtumore ohne Rezidiv (1) ein Großteil der Patienten (58,8%) zur Zeit der Tumoroperation über zehn

<sup>17</sup> Darin enthalten sind die in Tab. 8 unter (2) aufgelisteten Primärtumore, die im Verlauf rezidivierend waren sowie die unter (3) aufgelisteten Rezidive.

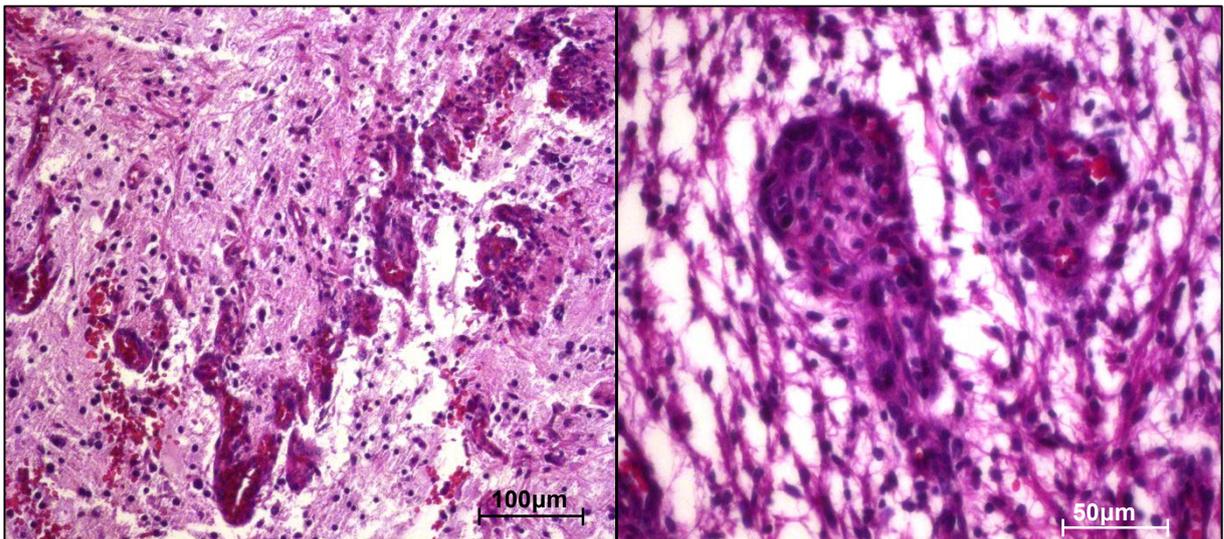
Jahre alt war. Im Gegensatz dazu waren die Patienten in der Gruppe der Primärtumore mit Rezidiv (2) zu 85,7% und in der Gruppe der Rezidive ohne Primärtumor (3) zu 64,7% zehn Jahre alt oder jünger (vgl. Tab. 8).<sup>18</sup>

## **7.2 Ergebnisse der morphologischen Auswertungen und Korrelationsanalysen**

Im Folgenden werden zunächst die drei gefäßassoziierten und dann die drei tumorassoziierten Morphologien jeweils in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

### **7.2.1 Endothelproliferate**

Abbildung 8 zeigt zwei histologische Bilder von Endothelproliferaten.



**Abbildung 8 – Endothelproliferate**

**Links:** Endothelproliferate in H.E. (40-fache Vergrößerung). Quelle: Eigene Bilder.

**Rechts:** Endothelproliferate in H.E. (100-fache Vergrößerung). Quelle: Eigene Bilder.

Abbildung 9 beinhaltet ein Histogramm mit der lokalisationsabhängigen Darstellung der Ausprägung von Endothelproliferaten (links) und das dazugehörige Medianwertdiagramm.

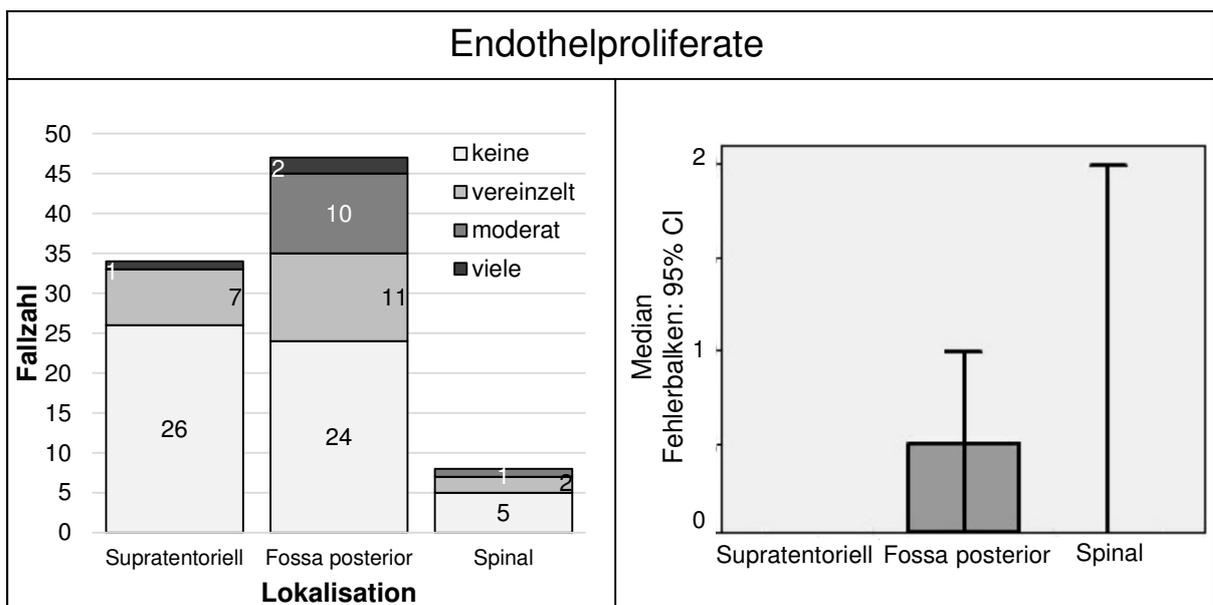
Die überwiegende Zahl der supratentoriellen und spinalen Fälle wies keine Endothelproliferate auf. Von den acht supratentoriellen Tumoren mit dieser Morphologie waren bei einem viele und bei sieben Fällen vereinzelt Endothelproliferate

---

<sup>18</sup> Die Einteilung von Altersgruppen erfolgte in Anlehnung an die von Gnekow et al. (2012) durchgeführte Untersuchung zu LGG, bei der für Kinder im Alter von elf Jahren und älter ein verschlechtertes Gesamtüberleben festgestellt wurde.

nachweisbar. Bei den drei spinalen Fällen war bei einem Tumor eine moderate Anzahl und bei zwei waren vereinzelt Endothelproliferate zu erkennen. Entsprechend der insgesamt niedrigen Anzahl von Tumorproben, die diese Morphologie aufwiesen, wurde der Medianwert für beide Lokalisationen zu null berechnet. Das 95%ige CI supratentorieller Tumore lag mit 0 im Medianwert, während es bei spinalen Tumoren einen Wert zwischen 0 und 2 annahm. Somit mussten zum Erreichen des 95%igen CI aufgrund der großen Schwankungsbreite alle spinalen Fälle berücksichtigt werden.

Die Gruppe der Tumore der Fossa posterior stellte mit 47 Tumoren die meisten Fälle im untersuchten Patientenkollektiv. Hier wies ein größerer Anteil der Fälle eine moderate Anzahl (n=10) oder viele (n=2) Endothelproliferate auf, während bei n=11 Tumoren vereinzelt Endothelproliferate vorhanden waren. Damit war hier eine gleichmäßigere Verteilung gegeben als bei den anderen Lokalisationen (vgl. Abb. 9). Diesem Histogramm entsprechend wurde ein Medianwert von 0,5 berechnet, mit einem 95%igen CI zwischen 0 und 1.



**Abbildung 9 – Histogramm und Medianwertdiagramm der lokalisationsabhängigen Auswertung der Endothelproliferate**

Tabellen 9 und 10 zeigen alle Ergebnisse der unterschiedlichen Korrelationsanalysen auf Signifikanzniveau von 5%.

Den in Tab. 9 aufgeführten Ergebnissen der Korrelationsanalyse von 74 Fällen nach Kendall-Tau-b ist zu entnehmen, dass zwischen Endothelproliferaten und der Tumorlokalisierung ein signifikanter Zusammenhang besteht ( $P=0,041$ ). Aus dem

Korrelationskoeffizienten von  $r=0,220$  ist abzuleiten, dass bei zunehmend kaudaler Lokalisation die Anzahl nachweisbarer Endothelproliferate anstieg. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Medianwert von 0,5 bei Tumoren der Fossa posterior.

**Tabelle 9 – Korrelation von Endothelproliferaten mit der Lokalisation (Kendall-Tau-b)**

		Supratentoriell (0), Fossa posterior (1), spinal (2)
Endothelproliferate (0-3)	Korrelationskoeffizient	0,220
	Sig. (2-seitig)	0,041
	Anzahl der Fälle	74

Weiterhin wurden bei der statistischen Analyse nach ANOVA elf Primärtumoren der Sehbahn (OPG) gegen 63 Fälle aller anderen Lokalisationen ausgewertet. Dabei resultierten die in Tab. 10 aufgeführten Ergebnisse. Es ergab sich mit einem Wert von 0,18 für OPG, im Gegensatz zu einem Wert von 0,63 für alle anderen Lokalisationen, ein verminderter Mittelwert. OPG wiesen demnach im Vergleich zu PA aller anderen Lokalisationen eine signifikant verminderte Anzahl von Endothelproliferaten auf ( $P=0,002$ ).

**Tabelle 10 – Korrelation von Endothelproliferaten mit OPG vs. andere Lokalisationen (ANOVA)**

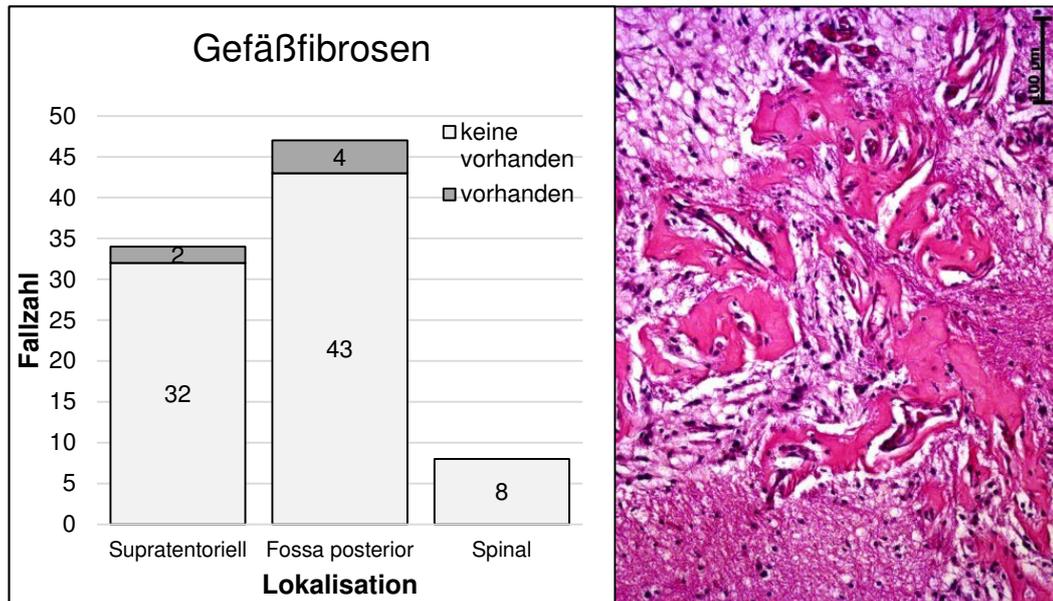
	Gegenübergestellte Variablen	Anzahl der Fälle	Mittelwert	Signifikanz
Endothelproliferate (Menge, 0-3)	Andere	63	0,63	0,002
	OPG	11	0,18	

### 7.2.2 Gefäßfibrosen

Abbildung 10 zeigt ein Histogramm der lokalisationsabhängig dargestellten Gefäßfibrosen. Daneben befindet sich eine histologische Abbildung dieser in der H.E. Färbung.

Dem Histogramm ist zu entnehmen, dass die überwiegende Anzahl der Tumore keine Gefäßfibrosen aufwies. Bei der Betrachtung aller 91 Fälle, konnten insgesamt bei sieben Gewebeproben Gefäßfibrosen nachgewiesen werden. Von den sechs im

Histogramm aufgeführten Tumorproben mit Gefäßfibrosen befanden sich vier in der Fossa posterior und zwei supratentoriell (vgl. Abb. 10).<sup>19</sup>



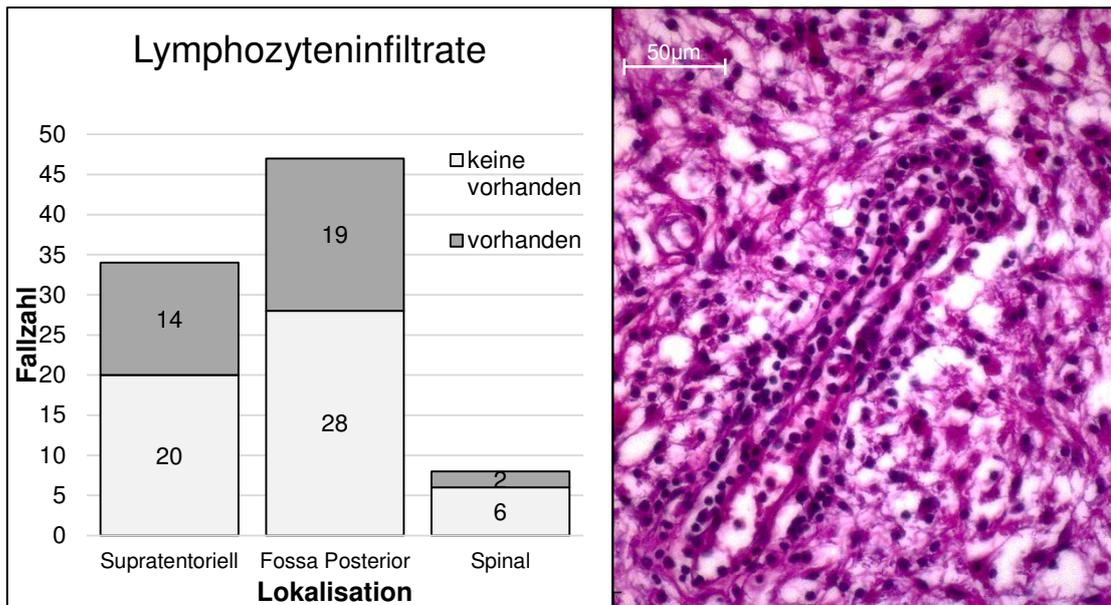
**Abbildung 10 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Histologie (40-fache Vergrößerung) von Gefäßfibrosen.** Quelle: Eigene Bilder.

Es ergab sich weder bei der Analyse nach Kendall-Tau-b, Spearman und beim T-Test, noch bei den Analysen mit ANOVA eine signifikante Korrelation von den Gefäßfibrosen mit einer der anderen Variablen.

### 7.2.3 Lymphozyteninfiltrate

Das Histogramm in Abb. 11 zeigt lokalisationsabhängig das Vorhandensein von Lymphozyteninfiltraten sowie eine histomorphologische Abbildung derselben in der H.E. Färbung.

<sup>19</sup> Zur Verminderung der Fallzahl bei der lokalisationsabhängigen Betrachtung siehe Einleitung der Ergebnisse, Kap. 7.



**Abbildung 11 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Histologie (100-fache Vergrößerung) von Lymphozyteninfiltraten.**

In der Mitte des Bildes befindet sich ein längliches Blutgefäß mit perivaskulär infiltrierenden Lymphozyten. Quelle: Eigene Bilder.

Lymphozyteninfiltrate waren bei 35 der 91 untersuchten Gewebeproben vorhanden. Sie waren damit die am häufigsten auftretende Tumor-assoziierte Veränderung.

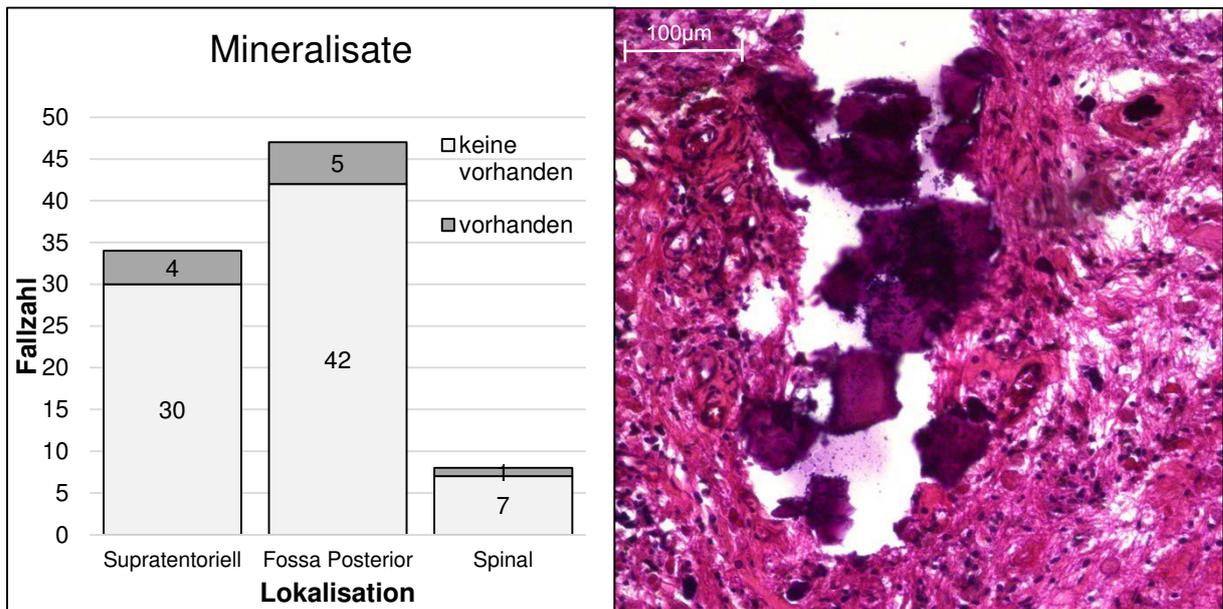
In der genaueren Betrachtung lassen sich bei supratentoriellen Tumoren 14 und bei Tumoren der Fossa posterior 19 Fälle mit Lymphozyteninfiltraten nachweisen. Bei spinalen Tumoren waren es zwei von acht Fällen.

Bei der statistischen Auswertung ergab sich weder bei der Analyse nach Kendall-Tau-b, Spearman und beim T-Test, noch bei den Analysen mit ANOVA eine signifikante Korrelation von Lymphozyteninfiltraten mit einer der anderen Variablen.

#### 7.2.4 Mineralisate

Abbildung 12 zeigt in einem Histogramm die lokalisationsabhängige Darstellung der Auswertungen von Mineralisaten sowie eine histologische Abbildung dieser in der H.E. Färbung.

Dem Histogramm ist zu entnehmen, dass mit 10 der 91 Gewebeproben die überwiegende Anzahl der Tumore keine Mineralisate aufwies. Die meisten fanden sich supratentoriell (n=5) und in der Fossa posterior (n=4), hingegen waren Mineralisate nur bei einem spinalen Tumor nachweisbar.



**Abbildung 12 – Lokalisation und Histomorphologie (40-fache Vergrößerung) der Mineralisate in pilozytischen Astrozytomen.** Quelle: eigene Bilder.

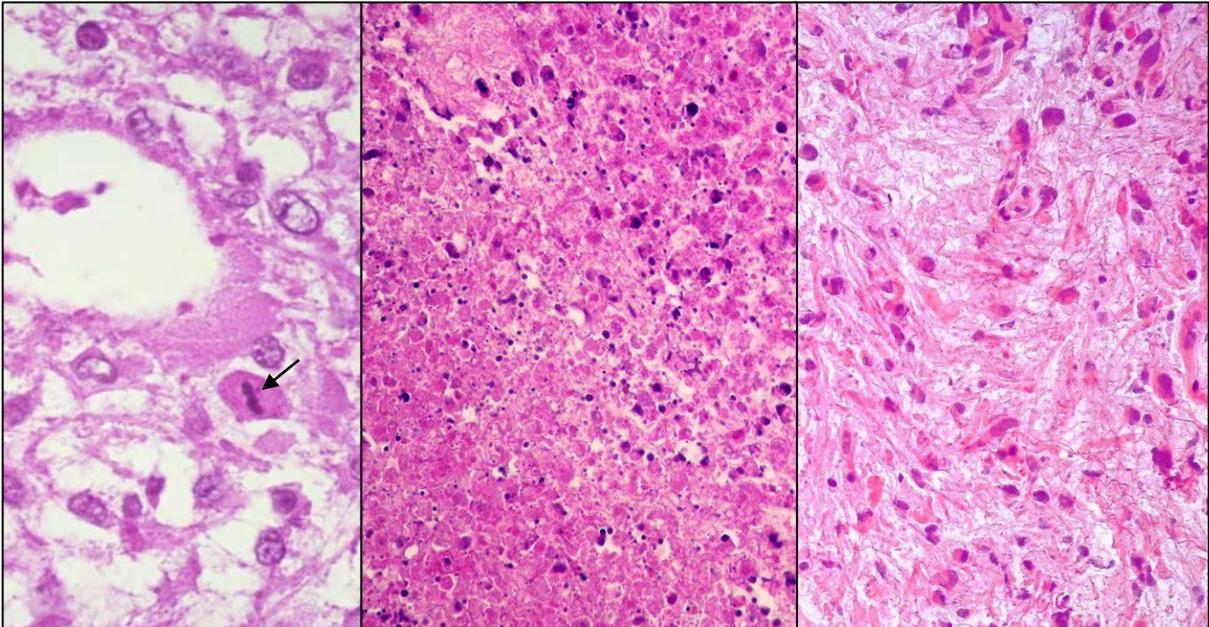
In Tabelle 11 sind alle Ergebnisse der unterschiedlichen Korrelationsanalysen dargestellt, die auf einem 5%igen Signifikanzniveau signifikant waren. Aus der Korrelationsanalyse von 74 Fällen nach ANOVA resultierte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mineralisaten und der Lokalisation. Hierbei wurden elf OPG gegen 63 Fälle aller anderen Lokalisationen ausgewertet. OPG wiesen im Vergleich zu PA aller anderen Lokalisationen keine und damit signifikant seltener Mineralisate auf ( $P=0,002$ ).

**Tabelle 11 – Korrelation von Mineralisaten mit OPG vs. andere Lokalisationen (ANOVA)**

	Gegenübergestellte Variablen	Anzahl der Fälle	Mittelwert	Signifikanz
Mineralisate (0=keine vorhanden, 1=vorhanden)	Andere	63	0,14	0,002
	OPG	11	0,00	

## 7.2.5 Mitosen, Nekrosen und Pleomorphie

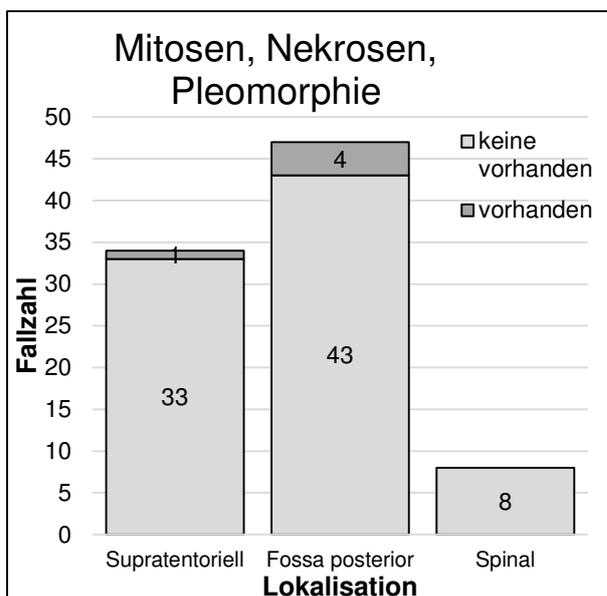
Abbildung 13 zeigt das histologische Korrelat der drei untersuchten Morphologien Mitosen (links), Nekrosen (rechts) und Pleomorphie (rechts).



**Abbildung 13 - Mitosen, Nekrosen, Pleomorphie**

**Links:** Mitose (Pfeil). **Mitte:** Nekrose. **Rechts:** Pleomorphie. Quelle der Bilder: Institut für Neuropathologie, UKE.

Das Histogramm in Abb. 14 stellt die Ergebnisse der Auswertung der in Abb. 13 histologisch dargestellten Morphologien lokalisationsbezogen dar. Fünf der 91 PA wiesen eine der drei Morphologien auf und wurden demnach als positiv bewertet. Vier davon fanden sich in der Fossa posterior und eine supratentoriell. Keiner der spinalen Tumore wies eine dieser Morphologien auf.



**Abbildung 14 – Lokalisation von Tumoren mit Mitosen, Nekrosen oder erhöhter Pleomorphie**

Den in Tab. 12 dargestellten Ergebnissen der Korrelationsanalyse von 74 Fällen nach ANOVA ist zu entnehmen, dass keines der elf OPG Mitosen, Nekrosen oder eine erhöhte Pleomorphie aufwies, wohingegen dies in den 63 PAs anderer Lokalisationen beobachtet wurde. OPG wiesen damit im Vergleich zu PA aller anderen Lokalisationen signifikant seltener Mitosen, Nekrosen und pleomorpe Zellen auf ( $P=0,039$ ).

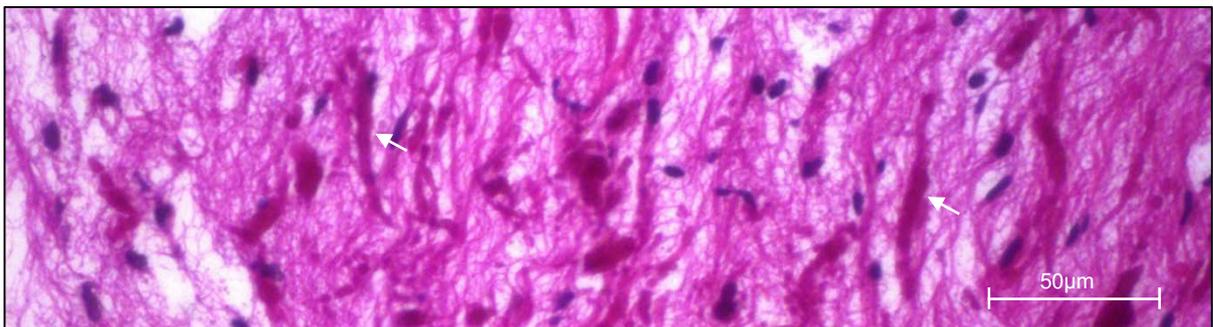
**Table 12 – Korrelation von Mitosen, Nekrosen und Pleomorphie mit OPG vs. andere Lokalisationen (ANOVA)**

	Gegenübergestellte Variablen	Anzahl der Fälle	Mittelwert	Signifikanz
Mitosen, Nekrosen, Pleomorphie (0=keine vorhanden, 1=vorhanden)	Andere	63	0,08	0,039
	OPG	11	0,00	

Auf dem 5%igen Signifikanzniveau ergaben sich keine weiteren Korrelationen mit den hier beschriebenen Morphologien.

### 7.2.6 Rosenthalfasern

Abbildung 15 zeigt ein histologisches Bild von Rosenthalfasern in der H.E. Färbung.



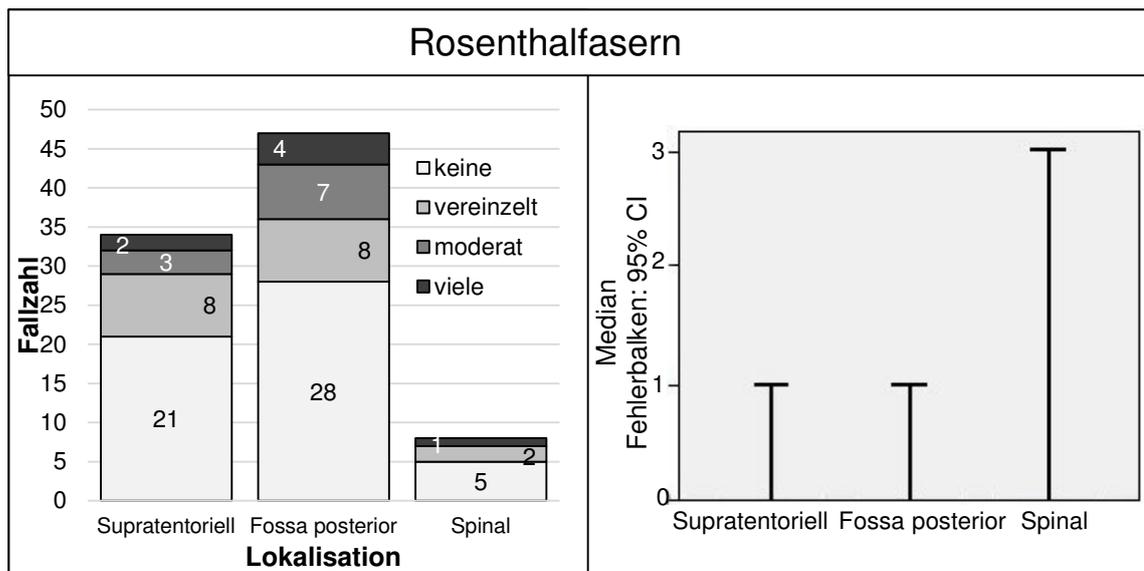
**Abbildung 15 - Rosenthalfasern (100-fache Vergrößerung).** Quelle: Eigene Bilder.

Das Histogramm in Abb. 16 stellt die Auswertungen von Rosenthalfasern lokalisationsabhängig dar (links) und auf der rechten Seite befindet sich das dazugehörige Medianwertdiagramm mit dem  $\pm 95\%$ igen CI.

Dem Histogramm ist zu entnehmen, dass die überwiegende Anzahl der Tumorproben keine Rosenthalfasern aufwies. Supratentoriell waren bei 13 Fällen Rosenthalfasern nachweisbar, davon bei zwei Fällen viele, drei wiesen eine moderate Anzahl auf und bei acht Fällen waren Rosenthalfasern vereinzelt vorhanden. In der Fossa posterior konnte diese Morphologie insgesamt bei 19 Tumoren identifiziert werden. Vier davon hatten viele, sieben eine moderate Anzahl und acht vereinzelt Rosenthalfasern. Drei

spinale Tumore waren positiv für Rosenthalfasern. Ein Fall zeigte viele davon, während zwei Fälle diese Morphologie vereinzelt aufwiesen.

Entsprechend der über alle Tumorproben insgesamt niedrigen Anzahl von Rosenthalfasern wurde der Medianwert aller Lokalisationen zu null berechnet. Das 95%ige CI supratentorieller Tumore und der Tumorproben der Fossa posterior lag für beide Lokalisationen zwischen 0 und 1. Lediglich das Konfidenzintervall für spinale Tumore zeigte eine große Schwankungsbreite und lag zwischen 0 und 3.



**Abbildung 16 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Medianwertdiagramm der Auswertungen der Rosenthalfasern.**

Die in Tab. 13 dargestellten Ergebnisse der Korrelationsanalyse von 75 Fällen nach Kendall-Tau-b zeigen die Zusammenhänge zwischen Rosenthalfasern und den IHC-Markern Matrilin-2 und NR2E1.

Nach dem Auswertungsmodus 1 für Matrilin-2 ergibt sich aus dem Wert des Korrelationskoeffizienten ( $r=0,255$ ), dass mit einer hohen Zahl von Rosenthalfasern in einem Tumorpräparat eine erhöhte immunhistochemische Nachweisbarkeit von Matrilin-2 einherging ( $P=0,016$ ). Dieselbe Schlussfolgerung lässt sich auch aus den Ergebnissen der Untersuchung von Matrilin-2 nach dem Auswertungsmodus 3 ziehen. Dort lag der Korrelationskoeffizient bei  $r=0,330$  und die Signifikanz  $P$  bei  $0,001$ .<sup>20</sup>

Bei der Analyse zu NR2E1 und Rosenthalfasern konnte ebenfalls ein Zusammenhang festgestellt werden. Aus dem Korrelationskoeffizienten von  $r=-0,233$  ist abzuleiten,

<sup>20</sup> Auswertungsmodus 2 zeigte keine signifikanten Korrelationen mit der untersuchten Variable.

dass NR2E1 bei zunehmender Bildung von Rosenthalfasern weniger stark exprimiert wurde ( $P=0,025$ ) (vgl. Tab. 13).

**Tabelle 13 – Korrelationen von Rosenthalfasern (Kendall-Tau-b)**

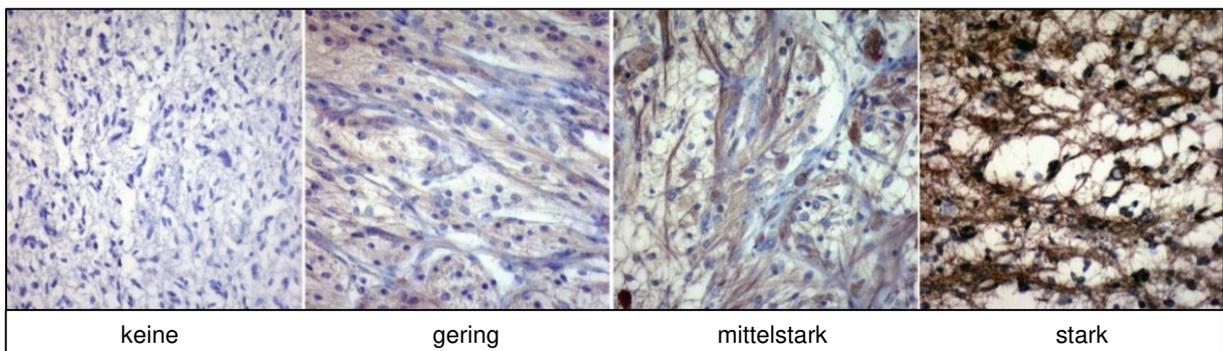
		Matrilin-2, Auswertungs- modus 1	Matrilin-2, Auswertungs- modus 3	NR2E1
Rosenthalfasern (0-3)	Korrelationskoeffizient	0,255	0,330	-0,233
	Sig. (2-seitig)	0,016	0,001	0,025
	Anzahl der Fälle	75	75	75

Auf dem 5%igen Signifikanzniveau ergaben sich für die hier besprochenen Rosenthalfasern keine weiteren Korrelationen.

### **7.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertungen und Korrelationsanalysen**

#### **7.3.1 Matrilin-2**

In Abbildung 17 sind vier histologische Bilder von Matrilin-2 gefärbten pilozytischen Astrozytomen zu sehen. Diese sind Beispiele für die unterschiedlichen, von links nach rechts zunehmenden Färbeintensitäten von Matrilin-2 nach den Kriterien des Auswertungsmodus 1.

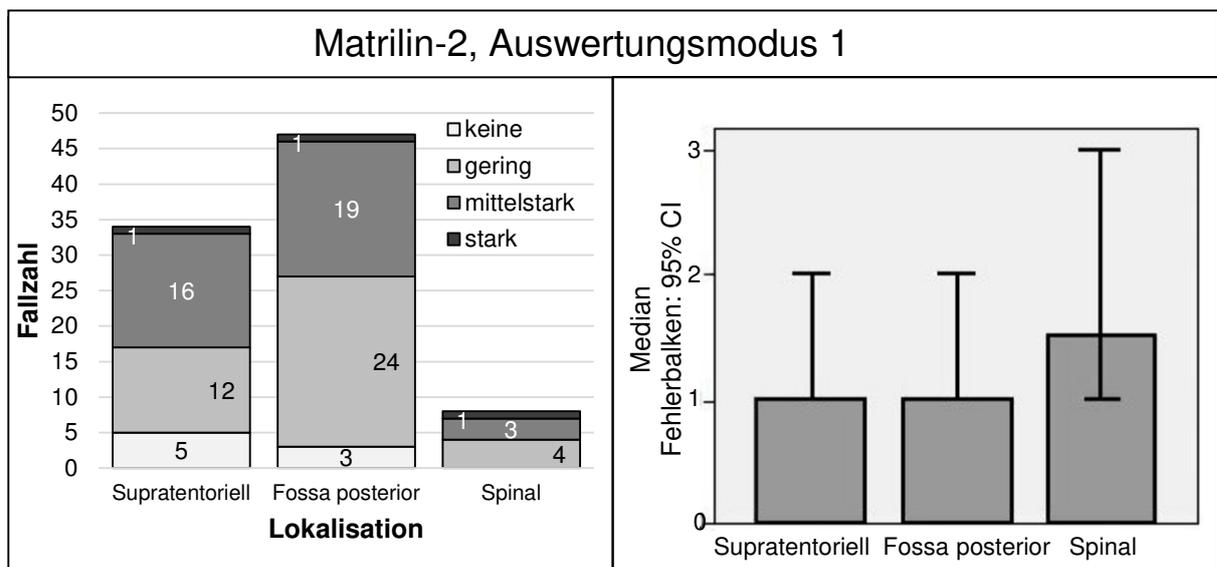


**Abbildung 17 – Matrilin-2 gefärbte PA als Beispiel für die Graduierungen nach Auswertungsmodus 1. Quelle: eigene Bilder.**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Auswertungsmodi jeweils separat behandelt. Die Histogramme zeigen die lokalisationsabhängige Färbeintensität von Matrilin-2. Jedem Histogramm hängt das dazugehörige Medianwertdiagramm an, welches auch das 95%ige CI angibt. Die Auswertungsmodi 1 und 3 enthalten dabei ordinalskalierte Werte, während das Histogramm von Auswertungsmodus 2 dichotome Auswertungen beinhaltet.

Aus dem Histogramm in Abb. 18 ist zu entnehmen, dass bei der Auswertung nach Modus 1 nur wenige Tumorproben keine Färbung mit Matrilin-2 aufwiesen (vgl. Abb. 17). Unabhängig von der Lokalisation wiesen die meisten Präparate eine geringe bis mittelstarke Färbeintensität auf. Dabei war nur einer der 34 supratentoriellen Tumore stark mit Matrilin-2 gefärbt. In 16 Fällen zeigte sich eine mittelstarke und in 12 Fällen eine geringe Färbung. Fünf Tumore waren negativ für Matrilin-2. Auch bei den 47 Tumoren der Fossa posterior war nur ein PA stark positiv für Matrilin-2, 19 waren mittelstark und 24 gering gefärbt. Drei Tumore aus der Fossa posterior waren negativ für diesen IHC-Marker. Von den insgesamt acht spinalen Tumoren war einer stark, drei mittelstark und vier gering positiv für Matrilin-2.

Entsprechend der Häufigkeitsverteilung der Färbung wurde der Medianwert für die supratentoriellen PA und PA der Fossa posterior bei 1 berechnet und das 95%ige CI der Tumorproben dieser beiden Lokalisationen lag zwischen 1 und 2. Der Medianwert spinaler Tumore hingegen war mit 1,5 etwas höher. Das 95%ige CI lag zwischen 1 und 3 und hatte somit eine große Schwankungsbreite.

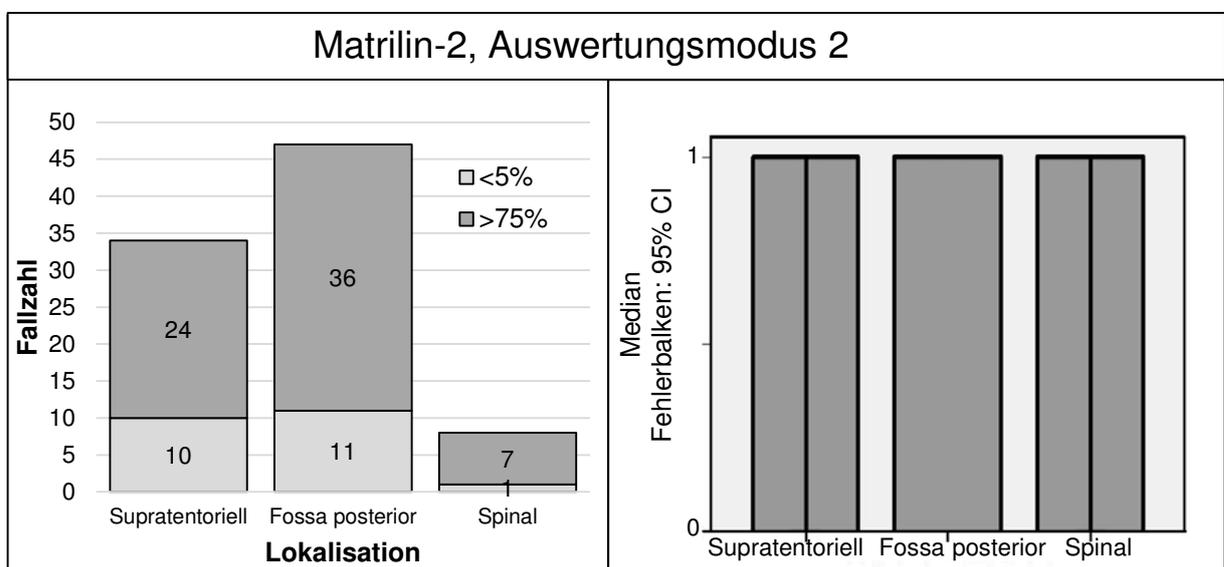


**Abbildung 18 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Medianwertdiagramm von Matrilin-2 (Auswertungsmodus 1)**

Nach Auswertungsmodus 2 galten PA mit einer Färbung mit Matrilin-2 von unter 5% als negativ für diesen Marker, war das histologische Präparat zu 75% oder mehr gefärbt, galt der Tumor als positiv. Alle Präparate konnten einem Wert zugeordnet werden, da kein Wert in die Mittelkategorie fiel. Dem Histogramm (vgl. Abb. 19) ist zu entnehmen, dass bei supratentorieller Lokalisation zehn Tumore negativ und 24 Tumore positiv für Matrilin-2 waren. Das Verhältnis von positiv und negativ deklarierten

Tumoren in der Fossa posterior und bei spinalen Tumoren war noch deutlicher zugunsten der positiven Ausprägung verschoben. In der Fossa posterior kamen auf elf für Matrilin-2 negative Tumore 36 Fälle von positiv bewerteten Tumorschnitten. Bei spinalen Tumoren waren sieben Tumore positiv und nur ein Tumor negativ für diesen IHC-Marker.

Da in jeder der drei Gruppen der Großteil der ausgewerteten Tumorproben zu über 75% mit Matrilin-2 gefärbt war, wurden die Medianwerte bei allen Lokalisationen zu 1 berechnet. Das 95%ige CI lag bei supratentoriellen und spinalen Tumoren zwischen 0 und 1, während es bei Tumoren der Fossa posterior mit einem Wert von 1 im Median lag.

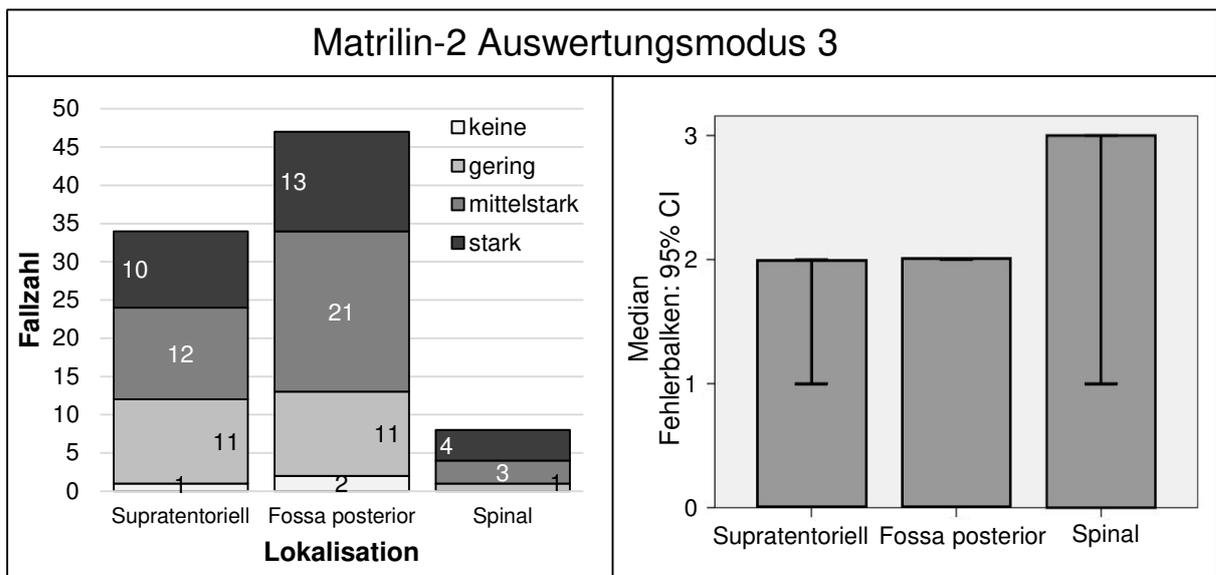


**Abbildung 19 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Medianwertdiagramm von Matrilin-2 (Auswertungsmodus 2)**

Dem Histogramm zum Auswertungsmodus 3 (Abb. 20) ist zu entnehmen, dass mit insgesamt drei Fällen sehr wenige Tumore keine Färbung mit Matrilin-2 zeigten. Einer davon befand sich supratentoriell, die anderen beiden in der Fossa posterior. Hingegen waren alle acht spinalen Tumore gefärbt. So war ein Tumor gering, drei waren mittelstark und vier stark mit Matrilin-2 gefärbt. Bei den supratentoriellen Tumoren zeigte sich dagegen bei den für Matrilin-2 positiven Fällen eine nahezu ausgeglichene Verteilung. Es waren 11 Tumorproben gering, 12 mittelstark und 10 stark gefärbt. Im Gegensatz dazu war die Verteilung der Matrilin-2 positiven Fälle in der Fossa posterior zugunsten der Kategorie „mittelstark gefärbt“ verschoben. Dort

waren mit 21 mittelstark gefärbten Proben etwa genauso viele Tumore vorhanden, wie in den Kategorien „gering“ (n=11) und „stark“ (n=13) zusammen.

Die Medianwerte supratentorieller Tumore und PA der Fossa posterior lagen bei 2. Das 95%ige CI lag für supratentorielle PA zwischen 1 und 2, bei Tumoren der Fossa posterior lag es mit einem Wert von 2 im Median. Für spinale Tumore hingegen errechnete sich mit einem Wert von 3 ein höherer Median. Das CI lag zwischen 1 und 3.



**Abbildung 20 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Medianwertdiagramm von Matrilin-2 (Auswertungsmodus 3)**

Die Ergebnisse der drei Auswertungsmodi unterscheiden sich sowohl bezüglich der Häufigkeitsverteilung der Färbungsintensitäten, als auch bei den Medianwerten und deren Konfidenzintervallen. So liegen die Medianwerte bei Auswertungsmodus 2 in der maximalen Ausprägung, während sie im Auswertungsmodus 1 und 3 mit den Werten 2 bis 3 und den Werten 1 bis 1,5 eher in der mittleren Ausprägung liegen. Auch weist der Auswertungsmodus 3 in der Häufigkeitsverteilung der Färbungsintensitäten häufiger eine starke Färbung mit Matrilin-2 auf, als bspw. Modus 1. Die Unterschiede in den Ergebnissen der Auswertungsmodi sind unter anderem dadurch zu begründen, dass sie einerseits dichotom und andererseits ordinalskaliert ausgewertet wurden. Außerdem wiesen die Auswertungsmodi unterschiedliche Kriterien für die Färbung auf. Die größten Differenzen zeigten sich zwischen Auswertungsmodus 2 und 3. So mussten bei Modus 2 mindestens 75% des gesamten Tumormaterials angefärbt sein,

damit der Tumor als positiv gewertet wurde. Im Gegensatz dazu musste bei Auswertungsmodus 3 nur eine Faser gefärbt sein, um den Tumor als positiv zu werten.

Trotz der unterschiedlichen Kriterien in den drei Auswertungsmodus und der damit verbundenen Diskrepanz in ihren Ergebnissen, korrelieren sie auf einem Signifikanzniveau von  $P=0,000$  untereinander (vgl. Tab. 14). Der Korrelationskoeffizient bei der Korrelation von Auswertungsmodus 1 und 2 beträgt  $r=0,433$ , bei Auswertungsmodus 1 und 3 nimmt er  $r=0,567$  an und bei Auswertungsmodus 2 und 3 resultiert ein Korrelationskoeffizient von  $r=0,486$ . Damit kann angenommen werden, dass die drei Auswertungsmodi allesamt für weitere Untersuchungen, trotz unterschiedlicher Vorgehensweisen, gleichermaßen geeignet sind.

**Tabelle 14 – Korrelationen der Auswertungsmodi von Matrilin-2 untereinander (Kendall-Tau-b)**

		Matrilin-2, Auswertungs- modus 1	Matrilin-2, Auswertungs- modus 2	Matrilin-2, Auswertungs- modus 3
Matrilin-2, Auswertungs- modus 1	Korrelationskoeffizient	1,000		
	Sig. (2-seitig)			
	Anzahl der Fälle	75		
Matrilin-2, Auswertungs- modus 2	Korrelationskoeffizient	0,433	1,000	
	Sig. (2-seitig)	0,000		
	Anzahl der Fälle	75	75	
Matrilin-2, Auswertungs- modus 3	Korrelationskoeffizient	0,567	0,486	1,000
	Sig. (2-seitig)	0,000	0,000	
	Anzahl der Fälle	75	75	75

In Tab. 15 sind der Vollständigkeit halber alle Ergebnisse der Korrelationsanalysen aufgeführt, die nicht signifikanten Ergebnisse werden im Folgenden jedoch nicht besprochen.

Den in Tab. 15 dargestellten Ergebnissen der Korrelationsanalyse von 75 Fällen nach Kendall-Tau-b ist zu entnehmen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Matrilin-2-Expression und dem Geschlecht sowie dem Aufkommen von Rosenthalfasern gibt.

Aus dem Auswertungsmodus 1 ergibt sich durch den Wert des Korrelationskoeffizienten ( $r=-0,265$ ), dass bei weiblichen Patienten eine vermehrte Matrilin-2-Expression nachweisbar war ( $P=0,018$ ). Auf die Korrelation von Matrilin-2

(Auswertungsmodus 1 und 3) mit den Rosenthalfasern wird im Kap. 7.2.6 näher eingegangen.

Bei der Analyse zu Matrilin-2 und Pax-3 von 74 Fällen konnte ebenfalls ein Zusammenhang festgestellt werden. Aus dem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,226$  ist abzuleiten, dass bei einer vermehrten Matrilin-2-Expression auch mehr Pax-3 gebildet wurde ( $P=0,037$ ). Dieselbe Schlussfolgerung lässt sich auch aus den Ergebnissen des Auswertungsmodus 2 ziehen. Dort lag der Korrelationskoeffizient bei  $r=0,245$  auf einem Signifikanzniveau von  $P=0,029$ .

**Tabelle 15 – Korrelation von Matrilin-2 (Kendall-Tau-b)**

		Geschlecht	Rosenthalfasern	Pax-3 <sup>21</sup>
Matrilin-2, Auswertungsmodus 1	Korrelationskoeffizient	-0,265	0,255	0,226
	Sig. (2-seitig)	0,018	0,016	0,037
	Anzahl der Fälle	75	75	74
Matrilin-2, Auswertungsmodus 2	Korrelationskoeffizient	-0,196	0,085	0,245
	Sig. (2-seitig)	0,092	0,438	0,029
	Anzahl der Fälle	75	75	74
Matrilin-2, Auswertungsmodus 3	Korrelationskoeffizient	-0,192	0,330	0,074
	Sig. (2-seitig)	0,080	0,001	0,485
	Anzahl der Fälle	75	75	74

Weiterhin wurden bei der statistischen Analyse nach ANOVA elf OPG gegen 63 Fälle aller anderen Lokalisationen ausgewertet und die Ergebnisse in Tab. 16 aufgeführt. Es ergab sich mit einem Wert von 0,91 für OPG ein erhöhter Mittelwert, im Gegensatz zu dem Wert von 0,75 für alle anderen Lokalisationen. OPG wiesen im Vergleich zu PA aller anderen Lokalisationen damit innerhalb des Auswertungsmodus 2 eine signifikant erhöhte Matrilin-2-Expression auf ( $P=0,004$ ).

**Tabelle 16 – Korrelation von Matrilin-2 (Modus 2) und OPG vs. andere Lokalisationen (ANOVA)**

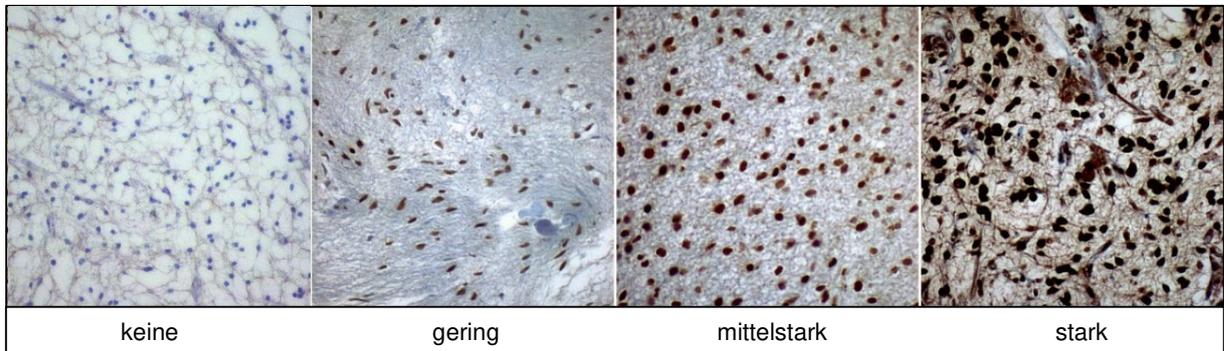
	Gegenübergestellte Variablen	Anzahl der Fälle	Mittelwert	Signifikanz
Matrilin-2, Auswertungsmodus 2	Andere	63	0,75	0,004
	OPG	11	0,91	

Es ergaben sich für Matrilin-2 keine weiteren signifikanten Korrelationen.

<sup>21</sup> Für einen Fall des Patientenkollektivs fehlt die Auswertung von Pax-3, daher ist hier nur eine verringerte Fallzahl von 74 Fällen vorhanden.

### 7.3.2 NR2E1

Abbildung 21 zeigt vier histologische Bilder von NR2E1-gefärbten PA. Diese sind Beispiele für die unterschiedliche Expression von NR2E1.



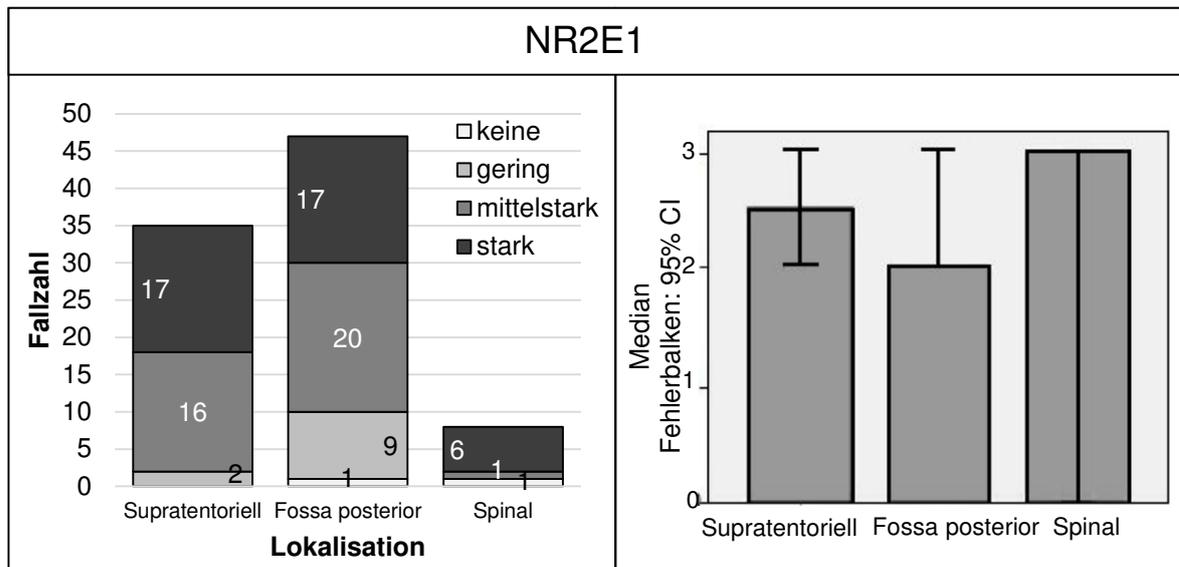
**Abbildung 21 – Beispiele unterschiedlich starker Expression von NR2E1 in pilozytischen Astrozytomen.** Quelle: Eigene Bilder.

Das Histogramm in Abb. 22 stellt die lokalisationsabhängige Färbintensität von NR2E1 im ausgewerteten Patientenkollektiv dar. Die dazugehörigen Medianwerte werden ebenfalls lokalisationsabhängig in einem Balkendiagramm mit dem dazugehörigen 95%igen CI aufgeführt.

Dem Histogramm ist zu entnehmen, dass nur wenige Tumorproben negativ für NR2E1 waren und die meisten unabhängig von der Lokalisation eine mittelstarke bis starke Färbung aufwiesen. So überwogen bei den supratentoriellen Tumoren die 16 stark und 16 mittelstark gefärbten Tumore, während nur zwei Fälle NR2E1 gering exprimierten. Kein Tumor dieser Lokalisation zeigte Negativität für NR2E1. Tumore der Fossa posterior zeigten überwiegend eine starke (n=17) und mittelstarke (n=20) Färbung, allerdings war hier auch bei neun Tumoren eine geringe Färbung nachweisbar. Ein Tumorschnitt war negativ für NR2E1. Bei spinal lokalisierten Tumoren überwog klar die starke Färbung mit NR2E1 (n=6), während jeweils ein Fall eine mittelstarke und keine Färbung mit diesen IHC-Marker zeigte.

Entsprechend der Häufigkeitsverteilung der Färbung der meisten Tumore wurde der Medianwert für supratentorielle Tumore bei 2,5 berechnet. Das 95%ige CI lag zwischen 2 und 3 (vgl. Abb. 22). PA der Fossa posterior wiesen zum größten Anteil eine mittelstarke und viele eine starke Färbung auf, wodurch auf einem 95%igen CI von 2 bis 3 ein Medianwert von 2 berechnet wurde. Da spinale PA fast ausschließlich stark mit NR2E1 gefärbt waren, wurde ein Medianwert von 3 berechnet. Das Konfidenzintervall zeigte mit einem Wert zwischen 0 und 3 eine große

Schwankungsbreite, es mussten also für ein 95%iges CI alle spinalen Fälle berücksichtigt werden.



**Abbildung 22 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Medianwertdiagramm von NR2E1**

Den Ergebnissen der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b ist zu entnehmen, dass es einen Zusammenhang zwischen den IHC-Markern NR2E1 und Pax-3 gibt. Aus dem Wert des Korrelationskoeffizienten mit  $r=0,282$  ergibt sich, dass bei einer erhöhten immunhistochemischen Nachweisbarkeit von NR2E1 ebenfalls eine vermehrte Expression von Pax-3 nachgewiesen werden konnte ( $P=0,008$ ). Hierbei wurden 74 Fälle ausgewertet. Auf die Korrelation zwischen NR2E1 und den Rosenthalfasern wird in Kap. 7.2.6 näher eingegangen.

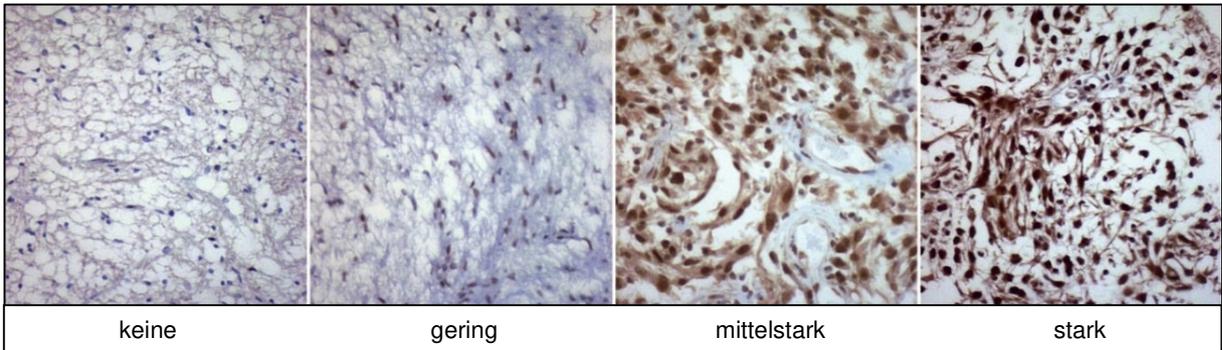
**Tabelle 17 – Korrelation von NR2E1 (Kendall-Tau-b)**

		Rosenthalfasern	Pax-3
NR2E1	Korrelationskoeffizient	-0,233	0,282
	Sig. (2-seitig)	0,025	0,008
	Anzahl der Fälle	75	74

Es ergaben sich bei den statistischen Analysen der Auswertungen von NR2E1 keine weiteren signifikanten Korrelationen.

### 7.3.3 Pax-3

Die vier histologischen Abbildungen (vgl. Abb. 23) von Pax-3 gefärbten PA geben Beispiele für die unterschiedlichen Färbeintensitäten dieses IHC-Markers.



**Abbildung 23 – Beispiele unterschiedlich starker Pax-3-Expression in pilozytischen Astrozytomen.** Quelle: Eigene Bilder.

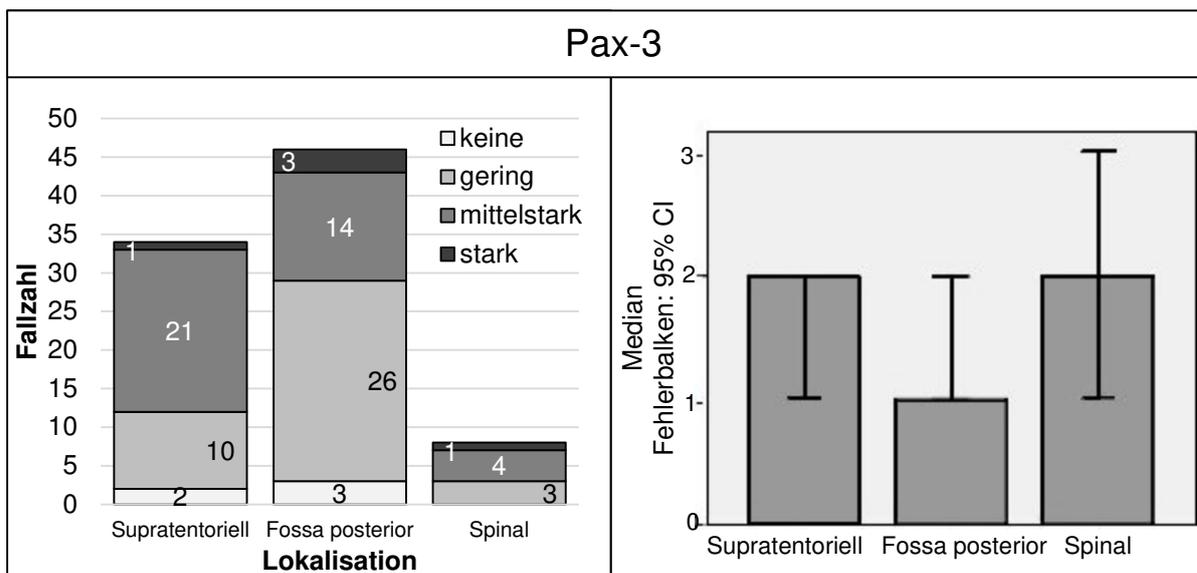
Das Histogramm in Abb. 24 stellt die Auswertungen von Pax-3 im ausgewerteten Patientenkollektiv lokalisationsabhängig dar<sup>22</sup>. Daneben bildet ein Balkendiagramm die lokalisationsabhängig berechneten Medianwerte mit dem dazugehörigen 95%igen CI ab.

Insgesamt waren nur wenige Tumorproben negativ für Pax-3, die meisten Tumorschnitte waren unabhängig von der Lokalisation gering bis mittelstark gefärbt (vgl. Histogramm in Abb. 24). Bei supratentoriellen Tumoren war die mittelstark gefärbte Rubrik mit 21 Fällen am häufigsten vertreten. Weiter waren zehn Fälle gering gefärbt, zwei zeigten Negativität für Pax-3 und nur ein Fall war stark angefärbt. Bei Tumoren der Fossa posterior war die Rubrik der gering gefärbten Tumore am größten (n=26), etwa halb so viele Tumore waren mittelstark gefärbt (n=14) und die stark gefärbten Tumore sowie die Tumore, die negativ für Pax-3 waren, bildeten mit jeweils drei Tumoren die kleinsten Gruppen.

Mit einem 95%igen CI von 1 bis 2 wurde der Medianwert für supratentorielle Tumore bei 2 berechnet. PA der Fossa posterior wiesen zum Großteil eine geringe Färbung auf, wodurch sich ein Medianwert von 1 ergab, mit einem CI von 1 bis 2. Der Medianwert spinaler Tumore errechnete sich bei 2 und spinale Tumore wiesen mit

<sup>22</sup> Für einen Primärtumor des Patientenkollektivs fehlt die Auswertung von Pax-3. Damit verringert sich hier die Fallzahl auf insgesamt 88 statt 89 PA, von denen die Lokalisationsangabe vorhanden war.

einem CI von 1 bis 3 die größte Schwankungsbreite auf. Entsprechend mussten auch hier für ein 95%iges CI alle spinalen Fälle berücksichtigt werden.



**Abbildung 24 – Lokalisationsabhängiges Histogramm und Medianwertdiagramm von Pax-3**

Den Ergebnissen der Korrelationsanalyse von 74 Fällen nach Kendall-Tau-b (vgl. Tab. 18) ist zu entnehmen, dass es einen Zusammenhang zwischen Pax-3 und den IHC-Markern Matrilin-2 sowie NR2E1 gibt (vgl. Kap. 7.3.1 bzw. 7.3.2).

**Tabelle 18 – Korrelation von Pax-3 (Kendall-Tau-b)**

		Matrilin-2 Auswertungsmodus 1	Matrilin-2 Auswertungsmodus 2	NR2E1
Pax-3	Korrelationskoeffizient	0,226	0,282	0,282
	Sig. (2-seitig)	0,037	0,008	0,008
	Anzahl der Fälle	74	74	74

Bei den unterschiedlichen Korrelationsanalysen resultierten keine weiteren signifikanten Zusammenhänge mit Pax-3.

#### **7.4 Statistischer Vergleich der klinischen Parameter untereinander**

Für den Vergleich der klinischen Parameter untereinander, erfolgte eine Analyse des Alters nach Spearman sowie die Korrelation aller Parameter untereinander via Kendall-Tau-b. Weiterhin wurden drei Berechnungen nach ANOVA und ein T-Test durchgeführt.

Die Analyse nach Spearman berücksichtigte ausschließlich die 75 Primärtumore des vorliegenden Patientenkollektivs (vgl. Tab. 19). In dieser Gruppe ergab sich bei einem

Korrelationskoeffizienten von  $r=-0,270$ , dass mit zunehmendem Alter der Kinder weniger häufig Events auftreten ( $P=0,019$ ).

**Tabelle 19 – Korrelation des Alters (Spearman)**

		Events
Alter	Korrelationskoeffizient	-0,270
	Sig. (2-seitig)	0,019
	Anzahl der Fälle	75

Bei der Korrelationsanalyse aller klinischen Faktoren nach Kendall-Tau-b resultierten keine signifikanten Ergebnisse.

Bei der ersten Analyse nach ANOVA (vgl. Tab. 20) erfolgte eine Gegenüberstellung der Primärtumore, die im Verlauf nicht rezidierten ( $n=68$ ), und der Primärtumoren, von denen ein Rezidiv im vorliegenden Patientenkollektiv vorhanden war ( $n=7$ ).

Das mittlere Alter von Patienten mit einem Primärtumor mit einem Rezidiv im Verlauf betrug 4,86 Jahre. Im Gegensatz dazu errechnete sich ein Mittelwert von 10,35 Jahren bei Patienten, die im Verlauf kein Rezidiv erlitten. Rezidivierende Primärtumore sind demnach häufiger bei jüngeren Kindern aufgetreten, hingegen waren Kinder mit nicht-rezidivierenden Tumoren im Mittel älter ( $P=0,05$ ).

Weiterhin zeigte sich mit einem Mittelwert von 0,43 bei PA, die im Verlauf rezidierten, gegenüber einem Wert von 0,12 bei Primärtumoren ohne Rezidiv, dass rezidivierende Primärtumore häufiger in der Sehbahn auftraten als andere. Es ergab sich ein Signifikanzniveau von  $P=0,029$ .

**Tabelle 20 – Korrelationen bei der Gegenüberstellung von Primärtumoren vs. Primärtumoren, die im Verlauf rezidiert sind (ANOVA)**

Variable	Gegenübergestellte Variablen	Anzahl der Fälle	Mittelwert	Signifikanz
Alter (1-18 Jahre)	Primärtumor	68	10,35	0,05
	Primärtumor mit Rezidiv im Verlauf	7	4,86	
OPG (1) vs. andere (0)	Primärtumor	67	0,12	0,029
	Primärtumor mit Rezidiv im Verlauf	7	0,43	

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der zweiten, nach ANOVA durchgeführten statistischen Analyse aufgeführt. Sie zeigt die Gegenüberstellung von PA der Sehbahn und PA aller anderen Lokalisationen. Hierfür wurden erneut ausschließlich Primärtumore, die im Verlauf nicht rezidierten, und Primärtumore, die später

rezidierten, untersucht. Bei den Untersuchungen des vorliegenden Patientenkollektivs unterschieden sich PA der Sehbahn von Tumoren anderer Lokalisationen. So waren OPG mit einem Mittelwert von 1,36 im Gegensatz zu PA anderer Lokalisationen (Mittelwert 1,49) vermehrt bei weiblichen Patienten aufgetreten ( $P=0,032$ ). Der Vergleich der Mittelwerte von 0,27 bei OPG und 0,06 bei PA aller anderen Lokalisationen zeigt darüberhinaus ein signifikant häufigeres Rezidivieren von OPG gegenüber PA anderer Lokalisationen. Dieser Zusammenhang lag auf einem Signifikanzniveau von  $P=0,000$ .

Es wurde eine zusätzliche Auswertung der Variable Alter nach den zwei Altersgruppen 1-10 und 11-18 Jahre durchgeführt. Dort zeigte sich für OPG mit einem Mittelwert von 0,18 gegenüber allen anderen Lokalisationen mit einem Mittelwert von 0,59, dass bei Kindern der Altersgruppe 1-10 signifikant häufiger OPGs auftraten, während ältere Kinder mit einer höheren Wahrscheinlichkeit PA anderen Lokalisationen bekamen ( $P=0,000$ ).<sup>23</sup>

**Tabelle 21 – Korrelationen bei der Gegenüberstellung von OPG vs. andere Lokalisationen (ANOVA)**

Variable	Gegenübergestellte Variablen	Anzahl der Fälle	Mittelwert	Signifikanz
Alter gruppiert (1 bis 10 = 0; 11 bis 18 Jahre = 1)	OPG	63	0,59	0,000
	Andere	11	0,18	
Alter gruppiert (1 bis 10 = 0; 11 bis 18 Jahre = 1)	OPG	63	1,49	0,032
	Andere	11	1,36	
Alter gruppiert (1 bis 10 = 0; 11 bis 18 Jahre = 1)	OPG	63	0,06	0,000
	Andere	11	0,27	

In der dritten statistischen Analyse nach ANOVA wurden nicht rezidivierende Primärtumore ( $n=68$ ) und die Rezidive ohne Primärtumor ( $n=16$ ) des Patientenkollektivs gegenübergestellt. Hierbei resultierten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse der letzten statistischen Analyse klinischer Faktoren. Im untersuchten Patientenkollektiv war bei sieben Patienten sowohl der Primärtumor, als auch das Tumormaterial der Rezidivoperation desselben Patienten vorhanden. Auch diese Tumorpaaire wurden auf alle Morphologien und immunhistochemischen

<sup>23</sup> Auf die Korrelationen von OPG mit morphologischen Auswertungen wird in den entsprechenden Kapiteln der Morphologien eingegangen (vgl. Kap. 7.2). Die Korrelation mit Matrilin-2 wird in Kapitel 7.3.1 erläutert.

Variablen geprüft und dann in einem T-Test gegenübergestellt. Dies diente der Evaluation, ob sich bestimmte Variablen bei dem jeweiligen Rezidiv anders als beim Primärtumor ausprägen. Abgesehen davon, dass die Patienten bei der Rezidivoperation älter waren als z.Z. der Primärtumoroperation ( $P=0,011$ ), waren keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Ausprägungen zwischen der Gruppe der Primärtumore und der Gruppe der Rezidive nachweisbar. Bei der Operation des Primärtumors war der Mittelwert des Alters 4,86, während er bei der Rezidivoperation bei 6,71 lag.

**Tabelle 22 – Primärtumor-Rezidiv-Paare (T-Test)**

Variable	Gepaarte Variablen	Anzahl der Fälle	Mittelwert	Signifikanz
Alter	Primärtumor	7	4,86	0,011
	Rezidiv des Primärtumors	7	6,71	

## 8 Diskussion

---

In diesem Abschnitt werden die in Kapitel 7 dargestellten empirischen Ergebnisse vor dem Hintergrund der eingangs dargelegten Fragestellungen besprochen.

Da in der vorliegenden Untersuchung keine klinischen Angaben zu den Zeitspannen des EFS, PFS und OS vorhanden waren, konnte eine prognostische Relevanz nur aus dem Auftreten von Rezidiven und Events hergeleitet werden. Das Auftreten von Rezidiven oder anderen Events wurde mit einer schlechten Prognose gleichgestellt.

### **8.1 Inwieweit zeigen PA unterschiedlicher Lokalisationen differenzielle Ausprägungen bezüglich klinischer Faktoren, morphologischer Merkmale und immunhistochemischer Marker?**

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass PA der Sehbahn sich von PA anderer Lokalisationen bezüglich klinischer Faktoren, Morphologien und der Matriline-2-Expression unterscheiden. Dieser Befund deckt sich größtenteils mit wissenschaftlichen Untersuchungen zu dieser Thematik und die einzelnen Zusammenhänge werden im Folgenden näher erläutert. Nachfolgend werden zentrale Ergebnisse zur besseren Übersicht in sieben separaten Unterpunkten diskutiert.

1.) Als erstes Ergebnis der vorliegenden Studie kann herausgestellt werden, dass Primärtumore der Sehbahn im untersuchten pädiatrischen Patientenkollektiv signifikant häufiger rezidierten als PA anderer Lokalisationen.

Dieses Forschungsergebnis ist deckungsgleich mit den Resultaten anderer wissenschaftlicher Studien. So resultierte in der Untersuchung von Tibbetts et al. (2009) zu PA von nicht-NF1-Patienten ebenfalls eine signifikante Korrelation der Lokalisation in der Sehbahn mit dem EFS. Dabei wiesen OPGs von Patienten im Alter zwischen 0,4 und 25 Jahren ein schlechteres EFS im Vergleich zu infratentoriellen PA auf ( $P=0,0296$ ).

Gnekow et al. (2012) untersuchten ebenfalls das EFS. Sie betrachteten dabei mit 996 LGG der WHO Grade I° und II° ein großes Patientenkollektiv mit insgesamt 700 PA. Bei den 996 pädiatrischen Patienten im Alter von unter 17 Jahren traten insgesamt 514 Events auf. Auch hier war das Risiko für das Auftreten eines Events bei

hypothalamisch-chiasmatischen Tumoren gegenüber Tumoren aller anderen Lokalisationen um das 2,91-fache erhöht (Hazard ratio (HR); 95%iges CI: 2,35–3,69).

Auch Fernández et al. (2003) untersuchten das Überleben pädiatrischer Patienten. Deren Patientenkollektiv beinhaltete Patienten im Alter von unter 18 Jahren mit 58 PA und 20 PMA. Sie fanden mit einem in Abhängigkeit von der Lokalisation verschlechterten PFS der Patienten ( $P < 0,001$ ) ein ähnliches Ergebnis, wie es in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnte. Bei beiden Untersuchungen wiesen Tumore des N. opticus und des Chiasmas dabei die schlechteste Prognose bzw. in der vorliegenden Studie die höchste Rezidivrate auf<sup>24</sup>. In der Untersuchung von Fernández et al. war bei keinem der OPG eine vollständige Resektion möglich und es kam in 11 der 18 Fälle zum erneuten Wachstum des Tumorrastes (Fernández et al. 2003).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Ergebnisse von Fernández et al. (2003), Tibbetts et al. (2009) und Gnekow et al. (2012) bestätigt. Tibbetts et al. und Gnekow et al. verwendeten das EFS als Referenzgröße, welches weniger spezifisch ist als das PFS, wie es von Fernández et al. verwendet wurde.

Dieses Ergebnis ist aber möglicherweise zu relativieren, da PA der Sehbahn aufgrund der Gefahr der Beschädigung visueller Funktionen nach Kammler et al. (2009) insbesondere dann operiert werden, wenn eine Infiltration des umgebenden Gewebes oder eine ipsilaterale Erblindung vorliegt. Entsprechend werden vor allem OPGs mit einem extensiven Wachstum, welches im Allgemeinen mit einer verschlechterten Prognose assoziiert ist (Collins et al. 2016), operativ versorgt. Zudem können sie bei noch vorhandener Sehfähigkeit unter Schonung der Nervenbahnen möglicherweise nicht vollständig entfernt werden. Fernández et al. (2003) beschreiben in ihrer Untersuchung dieses Problem und führen die Signifikanz der Zusammenhänge darauf zurück, dass bei keinem der 18 von ihnen untersuchten OPG eine vollständige operative Entfernung erreicht wurde. Aufgrund der fehlenden klinischen Daten zum Operationsausmaß konnte für das Patientenkollektiv der vorliegenden Untersuchung keine Aussage über den Einfluss dieses Effekts getroffen werden.

---

<sup>24</sup> Eine erhöhte Rezidivrate geht meist mit einer Prognoseverschlechterung einher (vgl. Koeller und Rushing 2004).

Ein weiterer Faktor von großer Relevanz ist die Operabilität eines Tumors. So lagen im Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit ausschließlich operable Primärtumore und Rezidive vor. War ein Rezidiv inoperabel, dann war auch keine Information über das Rezidivieren des Primärtumors in der Datenbank vorhanden und es konnte nicht in der Statistik der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt werden. Dass auch die oben benannten wissenschaftlichen Untersuchungen zu den gleichen Ergebnissen gekommen sind, spricht allerdings für eine Beständigkeit dieses Resultats über verschiedene Studienansätze und Patientenkollektive hinweg und somit für die Stabilität dieses Zusammenhangs.

2.) Als zweites Resultat der vorliegenden Untersuchung kann der Zusammenhang zwischen der Lokalisation der PA in der Sehbahn und dem Geschlecht angeführt werden. Das signifikant häufigere Vorkommen von OPG bei Mädchen wurde bereits von Koeller und Rushing (2004) beschrieben. Ihrer Statistik zufolge sind weibliche Patienten etwa doppelt so häufig von PA der Sehbahn betroffen wie männliche. Allerdings bezog sich dieses Resultat nur auf NF1-assoziierte PA. Collins et al. 2016 dagegen geben an, dass es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei pilozytischen Astrozytomen gibt.<sup>25</sup>

3.) Wie bereits das Medianwertdiagramm zu den Endothelproliferaten vermuten ließ, sind diese signifikant häufiger infratentoriell als supratentoriell aufgetreten. Außerdem wurden bei OPGs weniger Endothelproliferate, Mineralisate, Mitosen, Nekrosen und pleomorphe Zellen nachgewiesen als bei PA aller anderen Lokalisationen.

Das Auftreten von Endothelproliferaten speziell in der Fossa posterior war bisher nicht wissenschaftlich nachgewiesen. Von der Erkenntnis ausgehend, dass die Bildung von Endothelproliferaten durch Mediatoren aus der Flüssigkeit von Zysten, wie sie in PA häufig auftreten, gefördert wird (Leung et al. 1997; Koeller und Rushing 2004; Scheithauer et al. 2007), ist möglicherweise die Lokalisation von Zysten der entscheidende Faktor bei der Bildung von Endothelproliferaten (Leung et al. 1997). Zum Beispiel wiesen in der Untersuchung von Fernández et al. (2003) 69% der zerebellären PA die typische Darstellung einer Zyste mit randständigem Tumorknoten auf, während bei PA der Sehbahn in den meisten Fällen keine Zysten nachweisbar

---

<sup>25</sup> Auf das Ergebnis der Korrelation vom Alter mit OPGs wird in Kapitel 8.2 eingegangen.

waren (88,9%<sup>26</sup>). In dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit waren bei 38,2% der Tumore Endothelproliferate aufgetreten, davon 67,6% in der Fossa posterior, dem Ort, an dem nach Fernández et al. (2003) am häufigsten zystische PA auftreten. In der histomorphologischen Auswertung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorproben wurden allerdings ausschließlich die soliden Anteile pilozytischer Astrozytome untersucht, sodass bei diesem pädiatrischen Patientenkollektiv keine Aussage über das Vorkommen von Endothelproliferaten in zystischen Tumoren getroffen werden konnte. Ob es zwischen dem Auftreten von Zysten und der Bildung von Endothelproliferaten in der Fossa posterior einen Zusammenhang gibt, müsste eine klinische Forschung in Kombination mit einer histomorphologischen Untersuchung herausstellen.

4.) Als ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass bei insgesamt 11% der Tumorpräparate des Patientenkollektivs Mineralisate und in 5,5% der Fälle Mitosen, Nekrosen oder Pleomorphien nachweisbar waren. OPG wiesen bei den Auswertungen signifikant weniger dieser Morphologien auf, als PA anderer Lokalisationen.

Dieser Zusammenhang steht den Ergebnissen der WHO-Klassifikation zentralnervöser Tumore (Scheithauer et al. 2007) entgegen. Scheithauer et al. erklären darin, dass Mineralisate bei PA nur vereinzelt und vor allem supratentoriell auftreten. Dies gilt speziell für Tumore des N. opticus, hypothalamische bzw. thalamische PA oder für oberflächlich gelegene PA der Großhirnhemisphären (Scheithauer et al. 2007). Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte durch die unterschiedlichen Patientenkollektive erklärt werden. Möglicherweise wurden bei Scheithauer et al. auch PA erwachsener Patienten untersucht. Zudem finden die von Scheithauer et al. (2007) aufgeführten Zusammenhänge in der aktuellen WHO-Klassifikation (Collins et al. 2016) keine Erwähnung mehr. Aufgrund der niedrigen Fallzahl der OPGs ist die Aussagekraft der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kritisch zu sehen.

5.) Ein weiterer lokalisationsabhängiger Zusammenhang zeigte sich im Vergleich von OPG und PA anderer Lokalisationen bezüglich der Expression des IHC-

---

<sup>26</sup> Eigene Berechnung. Aus den publizierten Daten geht hervor, dass zwei der 18 im N. opticus und Chiasma lokalisierten PA zystisch waren.

Markers Matrilin-2. OPG, die in der vorliegenden Untersuchung zu der supratentoriellen Lokalisation zählten, wiesen dabei eine stärkere Expression von Matrilin-2 auf als PA anderer Lokalisationen. Dieses Ergebnis findet sich tendenziell auch bei der Studie von Sharma et al. (2006). So fand diese Forschungsgruppe bei der Untersuchung von Matrilin-2 in Abhängigkeit von der Lokalisation an 96 PA aller Altersgruppen einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und Matrilin-2. Es korrelierte die supratentorielle Lokalisation mit einer erhöhten Expression von Matrilin-2 ( $P=0,02$ ).<sup>27</sup>

6.) Bei den ebenfalls untersuchten IHC-Markern für die Proteine NR2E1 und Pax-3 ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge mit der Lokalisation. Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung von Sharma et al. (2007) für die beiden Proteine lokalisationsabhängige Expressionsunterschiede. Diese Forschungsgruppe führte Genanalysen an 41 PA von Patienten aller Altersgruppen durch und fand eine erhöhte NR2E1-Expression bei supratentoriellen PA im Vergleich zu Tumoren der Fossa posterior ( $P=0,041$ ) und eine erhöhte Pax-3-Expression in der Fossa posterior im Vergleich zu supratentoriellen Neoplasien ( $P=0,02$ ). Diese Ergebnisse sind mit der Tatsache kongruent, dass NR2E1 im sich entwickelnden Vorderhirn und Pax-3 im sich entwickelnden Hinterhirn eine wichtige Rolle spielen (Sharma et al. 2007). Sie konnten jedoch in der vorliegenden immunhistochemischen Untersuchung an einem pädiatrischen Patientenkollektiv mit mehr als doppelt so vielen Patienten nicht bestätigt werden. Auch Chen et al. (2012) fanden in ihrer Untersuchung von Pax-3 an 57 Tumorproben, von denen 22,8%<sup>28</sup> PA waren, keinen Zusammenhang zwischen der Pax-3-Expression und dem Geschlecht, dem Alter und der Tumorlokalisierung (Chen et al. 2012).

7.) Eine Beobachtung, die Raum für weitere Forschung eröffnet, betrifft die durchgehend große Schwankungsbreite des Konfidenzintervalls bei den Medianwerten spinaler Tumore. Um mit 95%iger Sicherheit den wahren Medianwert zu erhalten, mussten bei den spinalen Fällen alle Ausprägungsintensitäten eingeschlossen werden. Dies galt sowohl für die Endothelproliferate und Rosenthalfasern, als auch für die drei IHC-Marker. Ursächlich für die große Streuung

---

<sup>27</sup> Die supratentorielle Lokalisation beinhaltete in der Untersuchung von Sharma et al. (2006) im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit nur die Lokalisation im Thalamus, dritten Ventrikel, Frontallappen und Parietallappen.

<sup>28</sup> Eigene Berechnung.

könnte die sehr geringe Fallzahl spinaler Tumore (n=7) sein. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass sich spinale PA aufgrund ihres Wachstums und der Expression immunhistochemisch nachweisbarer Marker in eine zervikale, eine thorakale und eine lumbale Region einteilen lassen. Demnach wird die Einteilung in supratentorielle PA, PA der Fossa posterior und spinale PA dem Verhaltensmuster pilozytischer Astrozytome möglicherweise nicht gerecht. Dies wurde bereits für die gesonderte Stellung von PA der Sehbahn gezeigt. Im hier untersuchten Patientenkollektiv waren die Lokalisationsangaben der spinalen Tumore allerdings nicht differenziert genug und die Fallzahl zu gering, um diesen Zusammenhang näher untersuchen zu können.

## **8.2 Inwieweit unterscheiden sich PA von Kindern unterschiedlichen Alters?**

Bei der altersabhängigen Untersuchung des vorliegenden pädiatrischen Patientenkollektivs resultierten keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Alter und den immunhistochemischen oder den morphologischen Auswertungen. Dies war sowohl bei den Primärtumoren, als auch in der Gruppe der Rezidive der Fall. Nachfolgend werden zentrale Ergebnisse zur besseren Übersicht in drei separaten Unterpunkten diskutiert.

1.) Das Alter resultierte klar als prognostischer Faktor, da es nicht nur mit dem Auftreten von Events, sondern auch mit dem Rezidivieren der Primärtumore korrelierte. So rezidierten die Primärtumore bei Patienten mit zunehmendem Alter signifikant seltener und es traten auch mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit Events auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln das durch andere Studien gezeichnete Bild wieder. So konnten Gajjar et al. (1997) bei der Untersuchung 76 pädiatrischer PA und 66 anderer LGG von Kindern im Alter von 1-19 Jahren ein verschlechtertes 4-jahres-PFS bei Kindern unter 5 Jahren ( $53\% \pm 8\%$ ) im Vergleich zu dem PFS älterer Kinder ( $77\% \pm 5\%$ ) feststellen. Auch Stokland et al. (2010) untersuchten ein pädiatrisches Patientenkollektiv und setzten die Altersgrenze bei 16 Jahren, wobei mit 63,7% der 639 Tumoren ein Großteil der untersuchten Tumorproben PA waren. Gemessen am PFS resultierte ein erhöhtes Risiko für eine Tumorprogression bei Kindern im Alter von

1-5 Jahren (angepasstes HR: 1,74; 95% CI: 1,11–2,73). Außerdem wiesen in dieser Studie Patienten unter einem Jahr ein gegenüber anderen Altersgruppen vermindertes OS auf ( $P < 0,001$ ) (Stokland et al. 2010).

Fernández et al. (2003) fanden in ihrer Studie mit 80 Patienten, davon 58 PA von Kindern im Alter von 0-18 Jahren, keinen Zusammenhang zwischen dem Alter und dem PFS. Auch Fisher et al. (2008) und Tibbetts et al. (2009) fanden bei ihren Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Dabei prüften Fisher et al. das PFS und OS von 278 Patienten im Alter von 0-21 Jahren, davon 135 PA. Tibbetts et al. untersuchten mit 107 Patienten im Alter von 0-25 Jahren mit zentralnervösen PA ein ähnliches Patientenkollektiv auf das EFS wie die vorliegende Studie. Sie fanden wie auch Fernández et al. und Fisher et al. keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Tumorpatienten und dem EFS.

Zu einem gegenteiligen Ergebnis kamen Gnekow et al. (2012). Sie sind die erste Forschungsgruppe, die bei der Untersuchung von pädiatrischen Patienten (0-16 Jahre) das Alter von über zehn Jahren als negativen prognostischen Faktor nachweisen konnten. Bei der Gegenüberstellung von Patienten im Alter von 1-4 Jahren mit Patienten im Alter von über 10 Jahren resultierte ein verringertes OS der älteren Kinder ( $P = 0,002$ ). Für das EFS war dieser Zusammenhang nicht signifikant (Gnekow et al. 2012). Die Untersuchung von Gnekow et al. beinhaltet eine Erprobung von Chemotherapeutika.

Insgesamt ist in der Wissenschaft umstritten, welchen Einfluss das Alter auf die Prognose pädiatrischer Patienten mit PA hat, weil verschiedene (u.a. oben benannte) Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Für die Vergleichbarkeit der Studien und ihrer Ergebnisse untereinander ist allerdings zu beachten, dass es über die verschiedenen Studien hinweg große Unterschiede in der untersuchten Altersspanne, der Einteilung der Patienten in Altersgruppen, der Art und Anzahl der untersuchten Tumore oder auch in der Wahl des Patientenkollektivs gab. In der Auswahl der Verlaufparameter fand sich ebenfalls keine Einheitlichkeit. Interessanterweise bedeuteten unterschiedliche Studiendesigns hier aber nicht zwangsläufig auch verschiedene Ergebnisse. So sind Tibbetts et al. (2009) bzgl. der untersuchten Tumorentität, der Patientenzahl und des Altersdurchschnitts der vorliegenden Studie sehr ähnlich, fanden aber keinen Zusammenhang zwischen Alter

und dem EFS. Auf der anderen Seite unterscheidet sich die Studie von Stokland et al. (2010) in vielen Punkten von der vorliegenden Studie, weil sie zu 36,3% andere LGG untersuchten, vier Altersgruppen bildeten und mit einer Altersspanne von 1-16 Jahren ein jüngeres und mit 639 Fällen ein größeres Patientenkollektiv untersuchten. Dennoch weist diese Studie auf einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Alter und OS hin, wie ihn die vorliegende Untersuchung aufzeigt.

2.) Ein weiterer Unterschied zwischen PA jüngerer Kinder im Vergleich zu PA älterer Kinder war im vorliegenden Patientenkollektiv die Lokalisation. So traten OPG signifikant häufiger in der Altersgruppe von 1-10 Jahren auf, als bei Kindern zwischen 11 und 18 Jahren.

Bei einer Untersuchung von Stokland et al. (2010) resultierten ebenfalls Altersunterschiede bei den unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen. So waren chiasmatische und hypothalamische Tumore häufiger bei jüngeren Kindern aufgetreten, während Neoplasien der Großhirnhemisphären vornehmlich bei Kindern der älteren Altersgruppen auftraten (Altersgruppen: <1, 1 – 5, 5 – 10, und ≥11 Jahre;  $P=0,001$ ). Zerebelläre Tumore zeigten eine bimodale Altersverteilung. Auch Koeller und Rushing (2004) geben in ihrer Studie an, dass bei nicht-NF1-Patienten nahezu alle PA der Sehbahn vor dem 12. Lebensjahr auftreten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigen damit die Resultate der Studien von Koeller und Rushing (2004) und von Stokland et al. (2010). Die drei Studien zeigen an pädiatrischen Patientenkollektiven mit ausschließlich PA, dass jüngere Patienten häufiger Tumore des Chiasmas und N. opticus aufweisen. Dieses Resultat fügt sich in den Rahmen, dass jüngere Kinder häufiger im Verlauf Tumorrezidive entwickeln (vgl. Unterpunkt 1. dieses Kapitels), und dass PA der Sehbahn ebenfalls häufiger im Verlauf rezidivieren (vgl. Kap. 8.1, Unterpunkt 1.), sofern sie nicht NF1-assoziiert sind (Koeller und Rushing 2004).

3.) In dem pädiatrischen Patientenkollektiv der vorliegenden Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen Endothelproliferaten oder anderen Morphologien mit dem Alter nachgewiesen werden. Malik et al. (2006) wiesen dagegen in einer Untersuchung von 120 PA von Patienten im Alter von 0-81 Jahren besonders bei Patienten über 12 Jahren eine vermehrte Bildung von Endothelproliferaten nach ( $P=0,011$ ). Dass der Vergleich zwischen Tumoren von Kindern einerseits und von

jugendlichen, erwachsenen und geriatrischen Patienten andererseits erfolgte, schränkt die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Untersuchung, in der ausschließlich pädiatrische Patienten untersucht wurden, ein. Die Betrachtung von unterschiedlichen Altersspannen könnte damit zur Diskrepanz in den Ergebnissen geführt haben. Eine Untersuchung der Endothelproliferate an einem größeren pädiatrischen Patientenkollektiv könnte hier Aufschluss geben.

### **8.3 Morphologische und immunhistochemische Untersuchung**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der morphologischen und immunhistochemischen Untersuchungen hinsichtlich ihrer prognostischen Werte und der Zusammenhänge untereinander aufgeführt.

#### **8.3.1 Inwieweit haben die untersuchten morphologischen und immunhistochemischen Variablen einen prognostischen Wert?**

Nachfolgend werden zentrale Ergebnisse zur besseren Übersicht in drei separaten Unterpunkten diskutiert.

1.) Bei keiner der untersuchten Morphologien resultierte ein prognostischer Wert bzw. eine Korrelation mit rezidivierenden Primärtumoren, mit den Rezidiven oder den Events. Auch im direkten Vergleich unterschieden sich weder die rezidivierenden Primärtumore von den nicht-rezidivierenden Primärtumoren noch die Rezidive von den Primärtumoren in der histochemischen Nachweisbarkeit der untersuchten Morphologien (vgl. Kap. 6.5.4: Analyse 1 und 3). Auch die Gegenüberstellung der Ergebnisse der morphologischen Evaluation des Rezidivs und des Primärtumors desselben Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede (vgl. Kap. 6.5.4, T-Test).

Zu anderen Ergebnissen kamen Tibbetts et al. (2009). Sie untersuchten PA pädiatrischer Patienten u.a. auf das Vorkommen der in der vorliegenden Studie ebenfalls untersuchten Morphologien. Bei ihnen waren Gefäßfibrosen ( $P=0,008$ ), Mineralisate ( $P=0,016$ ) und Nekrosen ( $P=0,033$ ) jeweils mit einem verminderten EFS assoziiert, während Endothelproliferate und Rosenthalfasern keine signifikanten Korrelationen zeigten. Tibbetts et al. führten in ihrer Diskussion an, dass diese drei mit dem EFS korrelierenden Morphologien Zeichen degenerativen und chronischen Wachstums sind und fanden für diese Ergebnisse keine Erklärung (Tibbetts et al. 2009).

2.) Weiterhin gab es bei den statistischen Analysen der Auswertungen der IHC-Marker im vorliegenden Patientenkollektiv keinen Anhalt für die Assoziation von diesen mit dem als prognoseverschlechternd angesehenen Auftreten von Rezidiven und Events, bzw. mit den rezidivierenden Primärtumoren.

Dagegen war eine erhöhte Matrilin-2-Expression bei der Untersuchung 96 pilozytischer Astrozytome, von denen zehn NF1-assoziiert waren, in einer Studie von Sharma et al. (2006) mit aggressivem Verhalten assoziiert. Dieses wurde daran bemessen, dass alle rezidivierenden sporadischen PA und alle PA von Patienten, die z.Z. der letzten Follow-up-Untersuchung verstorben waren, eine erhöhte Matrilin-2-Expression aufwiesen. Weiterhin wies dort ein NF1-assoziiertes PA des Chiasma opticum ein ungewöhnlich aggressives Verhalten sowie eine erhöhte Matrilin-2-Expression auf. Zudem war die Matrilin-2-Expression bei NF1-assoziierten PA, welche normalerweise mit einem benignen Verlauf assoziiert werden (vgl. Koeller und Rushing 2004), in der Studie von Sharma et al. (2006) signifikant vermindert ( $P=0,008$ ). Die Divergenz der Resultate zwischen der Untersuchung von Sharma et al. (2006) und der vorliegenden Studie könnte in der unterschiedlich hohen Fallzahl rezidivierender Tumore bzw. der Tumore mit Events begründet sein. So wurden in der vorliegenden Untersuchung mit 23 rezidivierenden Tumoren<sup>29</sup> eine im Vergleich zu den vier Tumoren bei Sharma et al. (2006) größere Stichprobe untersucht. Weiterhin wies etwa die Hälfte aller Fälle der vorliegenden Untersuchung ( $n=35$ ) Events auf, wohingegen es bei Sharma et al. insgesamt fünf Fälle waren. Ein weiterer Grund für die divergierenden Ergebnisse könnte die Altersverteilung sein. Dies ist allerdings nicht sicher festzustellen, da Sharma et al. (2006) keine Angaben zum Alter der Patienten ihres Kollektivs machen. Sharma et al. (2006) folgern, dass Matrilin-2 in die Pathogenese oder Progression von PA involviert ist. Außerdem halten sie Matrilin-2 für den ersten für sporadische PA spezifischen molekularen Marker und spekulieren, dass dieses immunhistochemisch nachweisbare Antigen möglicherweise der erste klinisch relevante Biomarker für PA ist. Matrilin-2 war im vorliegenden Patientenkollektiv bei PA der Sehbahn vermehrt nachweisbar, die ihrerseits häufiger rezidivierten als PA aller anderen Lokalisationen. Ein direkter Zusammenhang

---

<sup>29</sup> Zu den 23 rezidivierenden Tumoren zählten die Primärtumore, die im Verlauf rezidiviert sind ( $n=7$ ) und die Rezidive ( $n=16$ ).

zwischen einer erhöhten Matrilin-2-Expression und dem Auftreten von Rezidiven oder Events war jedoch nicht vorhanden.

3.) Die nukleären Antigene NR2E1 und Pax-3 werden nachweislich von High Grade Gliomen exprimiert und sind dort mit einem verminderten EFS assoziiert (vgl. Park et al. 2010 für NR2E1 und Chen et al. 2012 für Pax-3). Eine ähnliche Beobachtung konnte an dem vorliegenden pädiatrischen Patientenkollektiv mit PA, bei denen es sich um Low Grade Gliome handelt, nicht bestätigt werden.

### **8.3.2 Korrelationen der morphologischen und immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse untereinander**

Nachfolgend werden zentrale Ergebnisse zur besseren Übersicht in zwei separaten Unterpunkten diskutiert.

1.) Bei der Korrelationsanalyse der IHC-Marker untereinander zeigte sich sowohl bei einer erhöhten Matrilin-2-Expression als auch bei einer vermehrten Nachweisbarkeit von NR2E1 eine erhöhte Expression von Pax-3. Die Koexpression von Matrilin-2 und Pax-3 wurde bisher von keiner anderen Forschungsgruppe untersucht. Die gleichzeitige Expression von NR2E1 und Pax-3 bei PA wurde dagegen von Sharma et al. (2007) untersucht und sie fanden gegenteilige Ergebnisse. Dort war NR2E1 bei supratentoriellen PA signifikant stärker exprimiert als bei infratentoriell lokalisierten PA. Und umgekehrt war Pax-3 bei PA der Fossa posterior signifikant stärker exprimiert als supratentoriell. Wie in Kap. 4.2.1 und 4.2.2 dargestellt, reflektieren die Zusammenhänge von Sharma et al. (2007) die embryologische Entwicklung des ZNS. Dass diese beiden Antigene in der vorliegenden Untersuchung koexprimiert wurden, könnte z.B. durch die geringe Fallzahl oder die selektive Auswahl pädiatrischer Patienten bedingt sein.

2.) Es gab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den verschiedenen histomorphologischen Parametern. Als einzige Morphologie korrelierten Rosenthalfasern mit IHC-Markern. Hier ergab sich, dass Rosenthalfasern bei erhöhter Matrilin-2-Expression vermehrt zu finden waren, während weniger Rosenthalfasern mit einer starken Expression von NR2E1 assoziiert waren. Dieser Zusammenhang wurde bislang in keiner anderen wissenschaftlichen Untersuchung nachgewiesen.

## 9 Zusammenfassung

---

In der vorliegenden Arbeit wurden pilozytische Astrozytome (PA) von 91 pädiatrischen Patienten im Alter von 1-18 Jahren auf die Expression der immunhistochemischen Antigene Matrilin-2, NR2E1 und Pax-3 sowie auf sechs für PA typische histomorphologische Parameter untersucht. Die Tumorproben waren in Paraffin eingebettet und stammten aus dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Die Auswertung der immunhistochemischen und histomorphologischen Parameter zeigte keine prognostische Relevanz. Es resultierten aber lokalisationsabhängige Unterschiede. So zeigte sich eine unterschiedliche Expression von Endothelproliferaten, Mineralisaten, Nekrosen, Mitosen und Pleomorphie sowie des immunhistochemisch nachgewiesenen Matrilin-2 bei PA der Sehbahn (OPG). Außerdem war eine vermehrte Bildung von Endothelproliferaten in der Fossa posterior nachweisbar. Lymphozyteninfiltrate waren mit Positivität in 38,5% der Fälle die häufigste tumorassoziierte Veränderung, wiesen jedoch keine signifikanten Korrelationen auf.

Bei einem vermehrten Nachweis von Rosenthalfasern zeigte sich auch eine erhöhte Matrilin-2-Expression sowie eine verringerte Expression von NR2E1. Sowohl eine Überexpression von Matrilin-2 als auch von NR2E1 waren mit einer erhöhten Pax-3-Expression assoziiert.

Die Lokalisation in der Sehbahn und das Alter konnten als einzige prognostisch relevante Parameter ausgemacht werden. So rezidierten OPG häufiger als Tumore anderer Lokalisationen und Kinder mit rezidivierenden Tumoren waren im Mittel jünger als Kinder mit nicht rezidivierenden Tumoren. Für dieses Ergebnis konnte der Anspruch auf den Erhalt der Sehfähigkeit die Ursache sein, denn die Schonung des Sehnervs geht möglicherweise mit einer unvollständigen Tumorentfernung einher.

Im Gegensatz zu intrakraniellen PA zeigten die untersuchten Parameter bei der Medianwertauswertung spinaler Tumore eine auffällig große Streuung. Diese könnte auf unterschiedliche Ursprungszellen zervikaler, thorakaler und lumbaler PA hindeuten. Die Untersuchung einer größeren Kohorte spinaler PA könnte hier Aufschluss geben.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse der immunhistochemischen und histomorphologischen Auswertungen der vorliegenden Untersuchung keine Hinweise auf neue Parameter mit prognostischem Wert.

## 10 Summary

---

The aim of the present study was to examine the immunohistochemical expression of matrilin-2, NR2E1, Pax-3 and six histomorphological parameters in pilocytic astrocytoma (PA). The cohort comprised a set of 91 PA from paediatric patients (age 1-18 years). The study was performed on paraffin embedded tumour material, which was drawn from the archive of the department of Neuropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf.

Immunohistochemical and histomorphological variables were observed at different frequencies depending on the tumour location: endothelial proliferation/ glomeruloid vasculature, calcification, infarct-like necrosis, mitosis, pleomorphic cells and the matrilin-2 were rarely found in optic pathway glioma (OPG) compared to other locations. In addition, endothelial proliferation/ glomeruloid vasculature was found to be more prevalent in posterior fossa lesions. Intra-tumoural lymphocytic infiltrates did not correlate with any other variable, although this morphology was the most frequently observed parameter with 38.5% positive cases.

Pilocytic astrocytoma showed a co-expression of Rosenthal fibres and matrilin-2, while there was a negative correlation between Rosenthal fibres and NR2E1. The two immunohistochemical markers NR2E1 and matrilin-2 both were associated with an elevated expression of Pax-3.

Correlating the histomorphological and immunohistochemical parameters with follow-up data the established prognostic value of localisation in the optic pathway and the patients' age was confirmed in the present study. The mean age of children with recurrent PA was significantly lower than the mean age of children without a relapse. Furthermore, OPG showed a significantly higher recurrence rate than tumours of all other locations. This might be explained by the therapeutic concept in OPG, which implies that if gross total resection cannot be acquired without visual loss, subtotal resection or a wait and watch strategy should be considered.

Compared to intracranial PA the assessed parameters showed a considerably higher variation in spinal tumours possibly suggesting differences in the cellular origin of cervical, thoracic and lumbar PA. This observation may be a subject for further investigations on larger cohorts of spinal tumours.

# 11 Abbildungsverzeichnis

---

ABBILDUNG 1 – PA MIT CHARAKTERISTISCHER DARSTELLUNG IM MRT .....	7
ABBILDUNG 2 – MAKROSKOPIE PILOZYTISCHER ASTROZYTOME .....	8
ABBILDUNG 3 – HISTOPATHOLOGIE PILOZYTISCHER ASTROZYTOME.....	9
ABBILDUNG 4 – DER MAPK-SIGNALWEG .....	14
ABBILDUNG 5 – VERMINDERUNG DER NESTINEXPRESSION UND ERHÖHUNG DER GFAP-EXPRESSION BEI TLX-KNOCKOUT MÄUSEN. 23	
ABBILDUNG 6 – ALTERSVERTEILUNG DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS .....	38
ABBILDUNG 7 – TUMORLOKALISATION .....	39
ABBILDUNG 8 – ENDOTHELPROLIFERATE .....	40
ABBILDUNG 9 – HISTOGRAMM UND MEDIANWERTDIAGRAMM DER LOKALISATIONSABHÄNGIGEN AUSWERTUNG DER ENDOTHELPROLIFERATE .....	41
ABBILDUNG 10 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND HISTOLOGIE VON GEFÄßFIBROSEN .....	43
ABBILDUNG 11 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND HISTOLOGIE VON LYMPHOZYTENINFILTRATEN. ....	44
ABBILDUNG 12 – LOKALISATION UND HISTOMORPHOLOGIE DER MINERALISATE IN PILOZYTISCHEN ASTROZYTOMEN .....	45
ABBILDUNG 13 - MITOSEN, NEKROSEN, PLEOMORPHIE .....	46
ABBILDUNG 14 – LOKALISATION VON TUMOREN MIT MITOSEN, NEKROSEN ODER ERHÖHTER PLEOMORPHIE .....	46
ABBILDUNG 15 - ROSENTHALFASERN) .....	47
ABBILDUNG 16 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND MEDIANWERTDIAGRAMM DER AUSWERTUNGEN DER ROSENTHALFASERN .....	48
ABBILDUNG 17 – MATRILIN-2 GEFÄRBTE PA ALS BEISPIEL FÜR DIE GRADUIERUNGEN NACH AUSWERTUNGSMODUS 1 .....	49
ABBILDUNG 18 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND MEDIANWERTDIAGRAMM VON MATRILIN-2 (AUSWERTUNGSMODUS 1) .....	50
ABBILDUNG 19 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND MEDIANWERTDIAGRAMM VON MATRILIN-2 (AUSWERTUNGSMODUS 2) .....	51
ABBILDUNG 20 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND MEDIANWERTDIAGRAMM VON MATRILIN-2 (AUSWERTUNGSMODUS 3) .....	52
ABBILDUNG 21 – BEISPIELE UNTERSCHIEDLICH STARKER EXPRESSION VON NR2E1 IN PILOZYTISCHEN ASTROZYTOMEN .....	55
ABBILDUNG 22 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND MEDIANWERTDIAGRAMM VON NR2E1 .....	56
ABBILDUNG 23 – BEISPIELE UNTERSCHIEDLICH STARKER PAX-3-EXPRESSION IN PILOZYTISCHEN ASTROZYTOMEN .....	57
ABBILDUNG 24 – LOKALISATIONSABHÄNGIGES HISTOGRAMM UND MEDIANWERTDIAGRAMM VON PAX-3 .....	58

## 12 Tabellenverzeichnis

---

TABELLE 1 – REAGENZIEN IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE .....	27
TABELLE 2 – ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN.....	28
TABELLE 3 – LABORGERÄTE MIT DAZUGEHÖRIGEN HERSTELLERN UND FUNKTIONEN .....	28
TABELLE 4 – VERBRAUCHSMATERIALIEN MIT DAZUGEHÖRIGEN ERKLÄRUNGEN UND HERSTELLERN.....	29
TABELLE 5 – LÖSUNGEN FÜR DIE H.E. FÄRBUNG .....	29
TABELLE 6 – LÖSUNGEN FÜR DIE VENTANA.....	29
TABELLE 7 – ABLAUF DER HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG .....	30
TABELLE 8 – REZIDIVVERTEILUNG DER TUMORPROBEN .....	39
TABELLE 9 – KORRELATION VON ENDOTHELPROLIFERATEN MIT DER LOKALISATION (KENDALL-TAU-B).....	42
TABELLE 10 – KORRELATION VON ENDOTHELPROLIFERATEN MIT OPG VS. ANDERE LOKALISATIONEN (ANOVA) .....	42
TABELLE 11 – KORRELATION VON MINERALISATEN MIT OPG VS. ANDERE LOKALISATIONEN (ANOVA).....	45
TABELLE 12 – KORRELATION VON MITOSEN, NEKROSEN UND PLEOMORPHIE MIT OPG VS. ANDERE LOKALISATIONEN (ANOVA).....	47
TABELLE 13 – KORRELATIONEN VON ROSENTHALFASERN (KENDALL-TAU-B) .....	49
TABELLE 14 – KORRELATIONEN DER AUSWERTUNGSMODI VON MATRILIN-2 UNTEREINANDER (KENDALL-TAU-B) .....	53
TABELLE 15 – KORRELATION VON MATRILIN-2 (KENDALL-TAU-B) .....	54
TABELLE 16 – KORRELATION VON MATRILIN-2 (MODUS 2) UND OPG VS. ANDERE LOKALISATIONEN (ANOVA) .....	54
TABELLE 17 – KORRELATION VON NR2E1 (KENDALL-TAU-B) .....	56
TABELLE 18 – KORRELATION VON PAX-3 (KENDALL-TAU-B) .....	58
TABELLE 19 – KORRELATION DES ALTERS (SPEARMAN) .....	59
TABELLE 20 – KORRELATIONEN BEI DER GEGENÜBERSTELLUNG VON PRIMÄRTUMOREN VS. PRIMÄRTUMOREN, DIE IM VERLAUF REZIDIERT SIND (ANOVA) .....	59
TABELLE 21 – KORRELATIONEN BEI DER GEGENÜBERSTELLUNG VON OPG VS. ANDERE LOKALISATIONEN (ANOVA) .....	60
TABELLE 22 – PRIMÄRTUMOR-REZIDIV-PAARE (T-TEST).....	61
TABELLE 23 – AUSWERTUNGS- UND BERECHNUNGSGRUNDLAGE .....	85
TABELLE 24 – DEN MAPK-SIGNALWEG BETREFFENDE GENETISCHE VERÄNDERUNGEN IN PA UND DEREN DIAGNOSTISCHE RELEVANZ	88

## 13 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Bspw.	beispielsweise
C.H.	Prof. Dr. Christian Hagel, stellv. Institutsdirektor des Instituts für Neuropathologie am UKE
CI	Konfidenzintervall ( <i>confidence interval</i> )
CCT	Kraniale Computertomographie ( <i>cranial computer tomography</i> )
CT	Computertomographie
DG	Gyrus dentatus ( <i>dentate gyrus</i> , Teil des Hippocampus)
EFS	Überleben ohne Auftreten von Vorkommnissen, wie Metastasen, Rezidiv oder Tod ( <i>event-free survival</i> )
GBM	Glioblastoma multiforme, WHO Grad IV Tumor
GFAP	Saures Gliafaserprotein ( <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
ICP	Intrakranieller Druck ( <i>intracranial pressure</i> )
IHC	Immunhistochemie, immunhistochemisch
k.A.	Keine Angabe
Kap.	Kapitel
Ki-67	Ki: Kiel
KM	Kontrastmittel
MATN2	Matrillin-2
M.K.	Meike Kern, Autorin der vorliegenden Arbeit
MRT	Magnetresonanztomographie, Kernspintomographie
N.	Nervus
NFP	Neurofilamentprotein
NR2E1	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group E Member 1
NSC	Neuronale Stammzellen ( <i>Neuronal Stem Cells</i> )
OPG	Gliome der Sehbahn ( <i>optic pathway glioma</i> )
P	2-seitiges Signifikanzniveau (als Dezimalzahl)
p53	Tumorsuppressorgen
PA	Pilozytisches Astrozytom/ pilozytische Astrozytome
PAX3	Paired Box Gene 3
Pax-3	Protein des Paired Box Gene 3
PFS	Progressionsfreies Überleben ( <i>progression free survival</i> )
PMA	Pilomyxoides Astrozytom ( <i>pilomyxoid astrocytoma</i> )
PMID	Pubmed ID
PNS	Peripheres Nervensystem
r	Korrelationskoeffizient
SVZ	Subventrikuläre Zone
TLX	Orphan Nuclear Receptor Tailless
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
ZNS	zentrales Nervensystem

## 14 Literaturverzeichnis

---

- Ater, J. L.; Xia, C.; Mazewski, C. M.; Booth, T. N.; Freyer, David R.; Packer, R. J. et al. (2016): Nonrandomized comparison of neurofibromatosis type 1 and non-neurofibromatosis type 1 children who received carboplatin and vincristine for progressive low-grade glioma: A report from the Children's Oncology Group. In: *Cancer* 122 (12), S. 1928–1936.
- Bartlett, D.; Boyle, G. M.; Ziman, M.; Medic, S. (2015): Mechanisms contributing to differential regulation of PAX3 downstream target genes in normal human epidermal melanocytes versus melanoma cells. In: *PloS one* 10 (4), e0124154.
- Bollag, G.; Clapp, D. W.; Shih, S.; Adler, F.; Zhang, Y. Y.; Thompson, P. (1996): Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. In: *Nat Genetics* 12 (2), S. 144–8.
- Chen, J.; Xia, L.; Wu, X.; Xu, L.; Nie, D.; Shi, J. et al. (2012): Clinical significance and prognostic value of PAX3 expression in human glioma. In: *J. Mol. Neurosci.* 47 (1), S. 52–58.
- Chi, N.; Epstein, J. A. (2002): Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. In: *Trends in genetics : TIG* 18 (1), S. 41–47.
- Collins, V. P.; Jones, D. T. W.; Giannini, C. (2015): Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. In: *Acta neuropathologica* 129 (6), S. 775–788.
- Collins, V.P.; Tihan, T.; VandenBerg, S.R.; Burger, P.C.; Hawkins, C.; Jones, D.; Giannini, C.; Rodriguez, F.; Figarella-Branger, D. (2016) Pilocytic Astrocytoma. In: WHO classification of tumours of the central nervous system. Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K. (Hg.). Revised 4th edition. Lyon: International Agency For Research On Cancer (World Health Organization classification of tumours). S. 80–88.
- Fernández, C.; Figarella-Branger, D.; Girard, N.; Bouvier-Labit, C.; Gouvernet, J.; Paz Paredes, A.; Lena, G. (2003): Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors--a retrospective study of 80 cases. In: *Neurosurgery* 53 (3), 544-53; discussion 554-5.
- Fisher, P. G.; Tihan, T.; Goldthwaite, P. T.; Wharam, M. D.; Carson, B. S.; Weingart, J. D. et al. (2008): Outcome analysis of childhood low-grade astrocytomas. In: *Pediatric blood & cancer* 51 (2), S. 245–250.
- Gajjar, A.; Sanford, R. A.; Heideman, R.; Jenkins, J. J.; Walter, A.; Li, Y. et al. (1997): Low-grade astrocytoma: a decade of experience at St. Jude Children's Research Hospital. In: *J. Clin. Oncol.* 15 (8), S. 2792–2799.
- Gnekow, A. K.; Falkenstein, F.; Hornstein, S. v.; Zwiener, I.; Berkefeld, S.; Bison, B. et al. (2012): Long-term follow-up of the multicenter, multidisciplinary treatment study HIT-LGG-1996 for low-grade glioma in children and adolescents of the German Speaking Society of Pediatric Oncology and Hematology. In: *Neuro-oncology* 14 (10), S. 1265–1284.
- Hagel, C.; Treszl, A.; Fehlert, J.; Harder, J.; Haxthausen, F. v.; Kern, M. et al. (2013): Supra- and infratentorial pediatric ependymomas differ significantly in NeuN, p75 and GFAP expression. In: *J. Neurooncol.*

- Helfferrich, J.; Nijmeijer, R.; Brouwer, O. F.; Boon, M.; Fock, A.; Hoving, E. W. et al. (2016): Neurofibromatosis type 1 associated low grade gliomas: A comparison with sporadic low grade gliomas. In: *Critical reviews in oncology/hematology*.
- Ichi, S.; Boshnjaku, V.; Shen, Y.-W.; Mania-Farnell, B.; Ahlgren, S.; Sapru, S. et al. (2011): Role of Pax3 acetylation in the regulation of Hes1 and Neurog2. In: *Mol. Biol. Cell* 22 (4), S. 503–512.
- Kammler, G.; Kordes, U.; Hornung, D.; Linhart, D.; Hagel, C.; Rössler, J. (2009): 13.2 Pilozytische Astrozytome. In: *Neuropädiatrie – Evidenzbasierte Therapie*. Korinthenberg, R.; Panteliadis, C. P.; Hagel, C., 1. Auflage: Urban & Fischer, München, S. 219–222.
- Keller, A.; Westenberger, A.; Sobrido, M. J.; García-Murias, M.; Domingo, A.; Sears, R. L. et al. (2013): Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. In: *Nat. Genet.* 45 (9), S. 1077–1082.
- Koeller, K. K.; Rushing, E. J. (2004): From the archives of the AFIP: pilocytic astrocytoma: radiologic-pathologic correlation. In: *Radiographics* 24 (6), S. 1693–1708.
- Kumar, R.; Kalra, S. K. (2008): Pediatric brain stem lesions: introduction of a scoring system for clinical evaluation and their treatment analysis. In: *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 24 (4), S. 467–475.
- Leung, S. Y.; Chan, A. S.; Wong, M. P.; Yuen, S. T.; Cheung, N.; Chung, L. P. (1997): Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pilocytic astrocytoma. In: *The American journal of surgical pathology* 21 (8), S. 941–950.
- Liu, H.-K.; Wang, Y.; Belz, T.; Bock, D.; Takacs, A.; Radlwimmer, B. et al. (2010): The nuclear receptor tailless induces long-term neural stem cell expansion and brain tumor initiation. In: *Genes Dev.* 24 (7), S. 683–695.
- Liu, Y.; Zhu, H.; Liu, M.; Du, J.; Qian, Y.; Wang, Y. et al. (2011): Downregulation of Pax3 expression correlates with acquired GFAP expression during NSC differentiation towards astrocytes. In: *FEBS Lett.* 585 (7), S. 1014–1020.
- Malik, A.; Deb, P.; Sharma, M. C.; Sarkar, C. (2006): Neuropathological spectrum of pilocytic astrocytoma: an Indian series of 120 cases. In: *Pathol. Oncol. Res.* 12 (3), S. 164–171.
- Malin, D.; Sonnenberg-Riethmacher, E.; Guseva, D.; Wagener, R.; Aszódi, A.; Irintchev, A. et al. (2009): The extracellular-matrix protein matrilin 2 participates in peripheral nerve regeneration. In: *J. Cell. Sci.* 122 (Pt 7), S. 995–1004.
- Muratoglu, S.; Krysan, K.; Balázs, M.; Sheng, H.; Zákány, R.; Módis, L. et al. (2000): Primary structure of human matrilin-2, chromosome location of the MATN2 gene and conservation of an AT-AC intron in matrilin genes. In: *Cytogenet. Cell Genet.* 90 (3-4), S. 323–327.
- Packer, R. J.; Ater, J.; Allen, J.; Phillips, P.; Geyer, R.; Nicholson, H. S. et al. (1997): Carboplatin and vincristine chemotherapy for children with newly diagnosed progressive low-grade gliomas. In: *Journal of neurosurgery* 86 (5), S. 747–754.
- Palma, L.; Guidetti, B. (1985): Cystic pilocytic astrocytomas of the cerebral hemispheres. Surgical experience with 51 cases and long-term results. In: *Journal of neurosurgery* 62 (6), S. 811–815.

- Park, H.-J.; Kim, J.-K.; Jeon, H.-M.; Oh, S.-Y.; Kim, S.-H.; Nam, D.-H.; Kim, H. (2010): The neural stem cell fate determinant TLX promotes tumorigenesis and genesis of cells resembling glioma stem cells. In: *Mol. Cells* 30 (5), S. 403–408.
- Piccirilli, M.; Lenzi, J.; Delfinis, C.; Trasimeni, G.; Salvati, M.; Raco, A. (2006): Spontaneous regression of optic pathways gliomas in three patients with neurofibromatosis type I and critical review of the literature. In: *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 22 (10), S. 1332–1337.
- Piecha, D.; Hartmann, K.; Kobbe, B.; Haase, I.; Mauch, C.; Krieg, T.; Paulsson, M. (2002): Expression of matrilin-2 in human skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 119 (1), S. 38–43.
- Qu, Q.; Shi, Y. (2009): Neural stem cells in the developing and adult brains. In: *J. Cell. Physiol.* 221 (1), S. 5–9.
- Rutkowski, S.; Hornung, D.; Kordes, U.; Kammler, G.; Hagel, C.; Löbel, U.; Ebinger, M.; Rössler, J.; Resch, A.; Linhart, D. (2014): 2 Neuroonkologie. In: *Neuropädiatrie – Evidenzbasierte Therapie*. Korinthenberg, R.; Panteliadis, C. P.; Hagel, C., 2. Auflage, Urban & Fischer, München, S. 277–304.
- Scheithauer, B.W.; Hawkins, C.; Tihan, T.; VandenBerg, S.R., Burger, P.C. (2007) Pilocytic Astrocytoma. In: WHO classification of tumours of the central nervous system. Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K., 4. Aufl. Geneva, Switzerland: Distributed by WHO Press, World Health Organization (World Health Organization classification of tumours), S. 14–21.
- Sharma, M. K.; Watson, M. A.; Lyman, M.; Perry, A.; Aldape, K. D.; Deák, F.; Gutmann, D. H. (2006): Matrilin-2 expression distinguishes clinically relevant subsets of pilocytic astrocytoma. In: *Neurology* 66 (1), S. 127–130.
- Sharma, M. K.; Mansur, D. B.; Reifenberger, G.; Perry, A.; Leonard, J. R.; Aldape, K. D. et al. (2007): Distinct genetic signatures among pilocytic astrocytomas relate to their brain region origin. In: *Cancer Res.* 67 (3), S. 890–900.
- Shi, Y.; Chichung Lie, D.; Taupin, P.; Nakashima, K.; Ray, J.; Yu, R. T. et al. (2004): Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. In: *Nature* 427 (6969), S. 78–83.
- Stokland, T.; Liu, J.-F.; Ironside, J. W.; Ellison, D. W.; Taylor, R.; Robinson, K. J. et al. (2010): A multivariate analysis of factors determining tumor progression in childhood low-grade glioma: a population-based cohort study (CCLG CNS9702). In: *Neuro-oncology* 12 (12), S. 1257–1268.
- Terzic, J.; Saraga-Babic, M. (1999): Expression pattern of PAX3 and PAX6 genes during human embryogenesis. In: *The International journal of developmental biology* 43 (6), S. 501–508.
- Tibbetts, K. M.; Emnett, R. J.; Gao, F.; Perry, A.; Gutmann, D. H.; Leonard, J. R. (2009): Histopathologic predictors of pilocytic astrocytoma event-free survival. In: *Acta Neuropathol.* 117 (6), S. 657–665.
- Zhang, J.; Wu, G.; Miller, C. P.; Tatevossian, R. G.; Dalton, J. D.; Tang, B. et al. (2013): Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. In: *Nature genetics* 45 (6), S. 602–612.

### Internetquellen:

1. PO (2014): Titel: Optic nerve tumor (fig 10e). In: Pilocytic Astrocytoma-grade I. Online verfügbar unter:  
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/cnstumorpilocyticastrocytoma.html>.  
Stand: 19. März 2017
2. SCB (2016): SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.; data sheet of Matrilin-2 H-65; Stand: 18. Aug. 2016
3. NCBI (2016a): Titel: MATN2 matrilin 2 [*Homo sapiens* (human)]. Online verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4147>. Stand: 08. Aug. 2016
4. NCBI (2016b): Titel: NR2E1 nuclear receptor subfamily 2 group E member 1 [*Homo sapiens* (human)]; online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7101>. Stand: 08. Aug. 2016
5. NCBI (2016c): Titel: PAX3 paired box 3 [*Homo sapiens* (human)]; online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5077#general-protein-info>. Stand: 13. Aug. 2016
6. GC (2016a): Gene Cards, Human Gene Database. Titel: NR2E1 Gene (Protein Coding); online verfügbar unter: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NR2E1>. Stand 18. Aug. 2016
7. GC (2016b): Gene Cards, Human Gene Database. Titel: PAX3 Gene (Protein coding); online verfügbar unter: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=pax3>. Stand 20. Aug. 2016

## 15 Danksagung

---

Mein herzlicher Dank gilt

- meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Hagel für die gute Betreuung, Motivation, viel Geduld und Zeit.
- Adrian Moldovan und Christoph Pennig für die Durchsicht der Arbeit und Unterstützung in vielen anderen Belangen.
- Meinen Eltern Katrin und AeiSo Kern für den Feinschliff.
- Herrn Prof. Dr. Glatzel für das positive Interesse an der Arbeit und die Überlassung der Proben.
- Herrn PD Dr. med. U. Kordes für das Bereitstellen der Patienteninformationen.
- Frau Kendra Richter und Sandra Deutsch für die praktische Einweisung und Unterstützung im Labor.
- Hannelore Junkar-Polzin und Ulrike Rumpf für die Unterstützung auch nach Abschluss der praktischen Phase.
- Frau Williams für ihre organisatorische Unterstützung und Öffnung aller notwendigen Türen.

## 16 Lebenslauf

---

### Meike Stefanie Kern

Paretzer Str. 4  
10713 Berlin  
(+49) 176 97646467  
[MS.Kern@gmail.com](mailto:MS.Kern@gmail.com)

---

#### PERSÖNLICHE DATEN

---

**Geburtsdatum:** 21. Januar 1990  
**Geburtsort:** Berlin  
**Familienstand:** Ledig  
**Nationalität:** Deutsch

---

#### SCHULISCHE UND UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

---

1996 – 1998	<b>Asselbachschule, Troisdorf-Spich</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Grundschule</li></ul>
1998 – 2000	<b>Grundschule, Stuhr-Varrel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Grundschule</li></ul>
2000 – 2002	<b>Lise-Meitner-Schule (KGS), Stuhr-Moordeich</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Orientierungsstufe</li></ul>
08 – 12/2005	<b>Schüleraustausch Deutsche Schule, Guatemala Stadt</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Teilnahme am spanischsprachigen Unterricht</li></ul>
2002 – 2009 06/2009	<b>Kreis-Gesamtschule Stuhr-Brinkum</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Bilinguales und naturwissenschaftliches Abitur</li></ul>
10/2009 – 10/2011 09/2011	<b>Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE)</b> <b>Studium der Humanmedizin (Abschlussnote: 2,16)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Vorklinik</li><li>• Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)</li></ul>
10/2011 – 11/2015 10/2014 11/2015	<ul style="list-style-type: none"><li>• Klinikum</li><li>• Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)</li><li>• Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)</li></ul>
12/2015	<b>Sprachreise nach Ecuador, Quito</b>
01/2016 – 05/2016	<b>Sprachreise nach Neuseeland und Australien</b>
09/2012 – 03/2017	<b>Bearbeitung der Dissertation</b>
12/2016 – dato	<b>Tätigkeit als Assistenzärztin der Anästhesie im St. Gertrauden Krankenhaus, Berlin</b>

## 17 Anhang

---

### **17.1 Legende für Tab. 23 in Kapitel 17.2**

Es folgt eine tabellarische Auflistung aller klinischen, histomorphologischen und immunhistochemischen Daten.

Für die Tabellen gilt folgende Legende:

- 1.) Geschlecht:
  - 1 Weiblich
  - 2 Männlich
- 2.) Detaillierte Lokalisation
  - 0 Großhirn (Seitenventrikel, Thalamus, Fissura Sylvii, temporal, occipital, occipitotemporal, parietal, Insel, Stammganglien)
  - 1 Suprasellär, pinealis, Hypothalamus
  - 2 N. opticus, Chiasma
  - 3 Dritter Ventrikel
  - 4 Hintere Schädelgrube, Hirnstamm, Pons, Aquädukt, vierter Ventrikel
  - 5 Kleinhirn, Kleinhirnbrückenwinkel
  - 6 Spinal, thorakal, cervical, lumbal
- 3.) Rezidivstatus
  - 0 Primärtumor ohne Rezidiv
  - 1 Primärtumor, der im Verlauf rezidiert ist
  - 2 Rezidiv ohne Primärtumor
- 4.) Events
  - 1 Keine Events im Verlauf dokumentiert
  - 2 Mindestens ein Event, wie die Progression, die Bildung eines Rezidivs, einer Metastase, oder eines Sekundärmalignoms oder der Tod, wurde im Verlauf dokumentiert.
- 5.) Vorhandensein von Endothelproliferaten und Rosenthalfasern
  - 0 Keine vorhanden
  - 1 Wenige vorhanden
  - 2 Einige vorhanden
  - 3 Viele vorhanden
- 6.) Vorhandensein der anderen Morphologien
  - 0 Keine vorhanden
  - 1 Vorhanden
- 7.) Färbeintensität (Immunhistochemie)

- 0 Keine Färbung
- 1 Geringe Färbung
- 2 Mittelstarke Färbung
- 3 Starke Färbung

## 17.2 Auswertungs- und Berechnungsgrundlage

Tabelle 23 beinhaltet alle Daten der morphologischen und immunhistochemischen Auswertungen sowie die klinischen Daten des vorliegenden Patientenkollektivs. Sie bildet die Berechnungsgrundlage aller Ergebnisse.

**Tabelle 23 – Auswertungs- und Berechnungsgrundlage**

Block-Nr.	Alter	Geschlecht	Lokalisation detailliert	Rezidivstatus	Vorkommnisse	Endothelproliferate	Gefäßfibrosen	Lymphozyteninfiltrate	Mineralisate	Nekrosen/ Mitosen/ Pleomorphie	Rosenthalfasern	Matriilin-2 Auswertungsmodus 1	Matriilin-2 Auswertungsmodus 2	Matriilin-2 Auswertungsmodus 3	NR2E1 Auswertungsmodus 1	Pax-3 Auswertungsmodus 1
0001	16	1	5	0	1	1	0	0	0	0	2	2	1	3	3	2
0023	16	1	2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2
0029	6	1	6	1	2	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2
0037	4	2	5	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	3	1
0039	14	1	6	0	1	0	0	0	0	0	3	1	1	2	0	1
0044	5	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
0059	15	2	2	0	1	1	1	1	0	0	0	2	1	2	3	2
0063	12	1	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
0077	16	2	5	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0	2	3	1
0092	16	1	4	0	1	1	0	0	1	0	1	2	1	2	3	1
0095	13	2	5	0	1	0	0	0	0	1	2	1	1	2	3	1
0100	6	2	5	0	1	2	1	0	0	0	0	1	1	2	3	2
0117	16	2	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	2
0130	14	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	3	3	2
0135	4	1	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	2	2
0138	8	1	2	0	1	0	0	1	0	0	2	1	1	2	2	1
0142	8	1	2	0	2	0	0	1	0	0	0	2	1	2	3	1
0145	8	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	1
0156	11	2	4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	1
0165	1	2	5	0	1	2	0	1	0	0	0	1	1	2	3	1
0168	8	1	6	0	1	1	0	0	0	0	1	2	1	3	3	2
0180	5	1	2	2	2	0	0	1	1	0	1	0	0	1	2	1
0198	7	1	5	2	2	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2
0203	3	2	5	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	2	2	1
0208	14	2	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	1

Block-Nr.	Alter	Geschlecht	Lokalisation detailliert	Rezidivstatus	Vorkommisse	Endothelproliferate	Gefäßfibrosen	Lymphozyteninfiltrate	Mineralisate	Nekrosen/ Mitosen/ Pleomorphie	Rosenthalfasern	Matrilin-2 Auswertungsmodus 1	Matrilin-2 Auswertungsmodus 2	Matrilin-2 Auswertungsmodus 3	NR2E1 Auswertungsmodus 1	Pax-3 Auswertungsmodus 1
0210	11	2	5	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	
0213	6	1	2	2	2	1	0	1	0	0	3	2	1	3	2	1
0214	13	1	5	0	1	1	0	1	1	0	0	2	1	3	2	1
0222	2	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2
0236	11	2	5	0	2	0	0	1	0	0	1	2	1	3	3	3
0248	7	1	6	2	2	2	0	0	0	0	0	3	1	3	3	1
0251	14	2	1	0	1	3	0	0	0	1	0	2	1	2	2	2
0296	6	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	1
0303	14	1	5	0	1	2	0	0	0	0	3	3	1	3	2	1
0312	3	2	5	0	2	1	0	1	0	0	0	2	1	2	2	1
0314	12	2	1	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	1	2	2
0321	5	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	3	3	1
0323	12	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0
0367	2	1	2	1	2	1	0	1	0	0	0	1	1	1	2	2
0387	18	2	4	0	1	0	1	0	0	0	1	2	1	2	2	1
0389	14	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	2	3	2
0390	14	2	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	2
0396	2	2	5	0	1	2	0	0	0	0	0	1	1	2	3	2
0417	12	1	5	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
0428	6	1	4	1	2	1	0	1	0	0	0	2	0	1	2	1
0431	8	1	5	0	1	2	0	0	0	0	0	1	1	2	2	0
0438	8	1	4	2	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
0444	2	2	6	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	3
0471	2	2	4	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	3	3
0480	10	2	5	0	1	0	0	1	0	0	2	2	1	2	1	1
0499	6	1	5	0	2	1	0	1	0	0	0	1	1	2	2	1
0500	15	1	6	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	3	3	1
0503	12	2	4	0	1	0	0	1	0	0	2	2	1	2	3	3
0505	2	2	4	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	3	1
0520	14	2	4	0	1	0	0	1	0	0	3	1	1	1	2	2
0539	16	1	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1
0542	13	2	5	0	1	1	0	1	0	0	2	2	1	3	1	1
0552	15	1	6	0	1	1	0	1	0	0	0	2	1	3	3	2
0564	12	2	5	0	1	0	0	0	0	0	3	2	1	3	1	1
0569	2	2	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2
0578	11	1	4	1	2	3	0	0	0	1	1	2	1	2	2	2
0579	9	1	2	0	2	0	0	0	0	0	3	2	1	3	3	2
0582	15	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2
0612	13	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	3	3	2
0627	7	1	4	0	2	0	0	0	0	1	0	2	1	1	3	2

Block-Nr.	Alter	Geschlecht	Lokalisation detailliert	Rezidivstatus	Vorkommnisse	Endothelproliferate	Gefäßfibrosen	Lymphozyteninfiltrate	Mineralisate	Nekrosen/ Mitosen/ Pleomorphie	Rosenthalfasern	Matriilin-2 Auswertungsmodus 1	Matriilin-2 Auswertungsmodus 2	Matriilin-2 Auswertungsmodus 3	NR2E1 Auswertungsmodus 1	Pax-3 Auswertungsmodus 1
0636	7	2	5	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	1
0637a	6	2	4	2	2	1	0	1	0	0	0	2	1	3	2	1
0637b	8	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	2
0643	15	1	2	2	2	1	1	0	0	0	2	2	1	3	2	1
0687	13	2	6	0	2	0	0	0	1	0	1	1	1	2	3	2
0715	8	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	2	1	3	3	2
0717	6	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2	1	3	3	2
0760	4	2	2	1	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	0
0807	12	2	5	2	2	0	0	0	0	0	0	2	1	3	2	1
0829	17	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	2	3	2
0847	3	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	2	1	2	2	2
0872	16	2	0	0	2	0	0	1	1	0	0	1	1	2	2	1
0878	17	1	5	0	1	0	1	1	1	0	3	2	1	3	2	2
0889	15	1	5	2	2	2	0	1	0	0	1	2	1	3	2	1
0904	2	1	4	0	2	2	0	0	0	0	1	1	1	3	2	1
0954	13	1	5	0	1	2	1	0	0	1	0	2	1	2	3	2
1017	9	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2
1025	5	1	5	0	1	3	0	1	0	0	2	1	1	3	1	2
1178	10	1		2	2	0	1	0	0	0	0	2	1	3	3	2
1240	3	1	5	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	2	2
1326	16	1	1	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	2	1	1
1355	11	1	3	2	2	1	0	0	0	0	0	2	1	3	3	2
1397	4	1	4	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	2
1480	3	1	2	1	2	0	0	1	0	0	1	3	1	3	2	2
1527	16	1	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1573	10	1		0	2	0	0	0	0	0	2	2	1	2	2	1

### 17.3 Tabelle zu den genetischen Veränderungen bei PA

Tabelle 24 ist eine Zusammenfassung der in Kapitel 3.7 aufgeführten genetischen Veränderungen bei PA.

**Tabelle 24 – Den MAPK-Signalweg betreffende genetische Veränderungen in PA und deren diagnostische Relevanz. Quelle: Collins et al. (2016).**

Gen	Veränderung	% der Tumore	Diagnostischer Nutzen
(1) BRAF und KIAA1549	Tandem Duplikation, die im KIAA1549-BRAF Fusionsproteinen mündet. Alle haben eine BRAF Kinase Domäne und die N-terminale regulierende BRAF Domäne ist durch das N-terminale Ende von KIAA1549 ersetzt.	>70%	Weitverbreitet in PA, v.a. in PA des Kleinhirns; selten bei anderen Tumorarten.
(2) BRAF und verschiedene andere Gene	Deletionen oder Translokationen führen zu BRAF-Fusionsproteinen; bei allen bleibt die BRAF Kinase Domäne erhalten und die N-terminale regulatorische Einheit wird durch die N-terminale Domäne des anderen Gens ersetzt.	~5%	Treten bei PA auf; extrem selten bei anderen Tumorentitäten.
(3) BRAF	V600E Mutation	~5%	V.a. in supratentoriellen PA, aber auch in Gangliogliomen, pleomorphen Xanthoastrozytomen und dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumoren.
(4) NF1	Verlust des Wildtyps und vererbte Mutation.	~8%	Typische Keimbahnmutation; stark assoziiert mit PA der Sehbahn.
(5) FGFR1	Mutation	<5%	V.a. bei PA der Mittellinie; Häufigkeit in anderen Tumorarten nicht untersucht.
(6) FGFR1	Fusionen und interne Tandemmutationen	<5%	Selten bei PA und anderen LGG.
(7) NTRK Familie	Fusionen	~2%	Selten bei PA; Häufigkeit in anderen Tumorarten nicht untersucht.
(8) KRAS	Mutation	Einzelfälle	
(9) RAF1	Fusionen mit ähnlichen Konsequenzen wie bei BRAF Fusionen, z.B. Verlust der regulatorischen Einheit und Ersatz durch das N-terminale Ende von SGRAP3.	Einzelfälle	

## **18 Eidesstattliche Erklärung**

---

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....