

Institut für Pathologie und Neuropathologie aus dem Departement für
Diagnostische Labormedizin der Universität Tübingen
Abteilung Neuropathologie

**Die Expression von Cofilin und seine Analyse
in höhergradigen adulten und pädiatrischen
Gehirntumoren**

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

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

**vorgelegt von
Atici, Eva Alexandra, geb. Dieterich**

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Schittenhelm
2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Honegger

Tag der Disputation: 24.08.2017

Widmung

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Allgemeine Einführung zu den Tumoren des Zentralen Nervensystems und Embryonalen Tumoren	9
1.2. Einteilung, Klassifikation und Inzidenz von Glioblastomen, anaplastischen Astrozytomen sowie den embryonalen Tumoren Medulloblastom /PNET	11
1.2.1. Das Anaplastische Astrozytom (WHO Grad III).....	13
1.2.1.1. Genetische Aspekte der Anaplastischen Astrozytome	15
1.2.1.2. Therapie und Prognose	16
1.2.2. Glioblastome (WHO Grad IV)	17
1.2.2.1. Genetische Aspekte der Glioblastome.....	19
1.2.2.2. Therapie und Prognose	21
1.2.3. Medulloblastome/ ZNS-PNET (Primitive Neuroektodermale Tumoren) ...	22
1.2.3.1. Genetische Aspekte der Medulloblastome.....	24
1.2.3.2. Therapie und Prognose	26
1.2.4. Ependymome	27
1.3. Mögliche Aspekte des Wachstum und der Proliferation in höhermalignen hirneignen Tumoren und die Rolle der Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorgenese	28
1.4. Die Bedeutung der Extrazellulärmatrix im ZNS	28
1.4.1. Die Bindegewebszellen	29
1.5. Das Zytoskelett	29
1.5.1. Mikrotubuli.....	29
1.5.2. Intermediärfilament.....	30
1.5.3. Mikro- oder Aktinfilamente	30
1.5.3.1. ADF/ Cofilin	31
1.6. Ziel und Fragestellung	34
2. Patientenauswahl, Material, Methoden und Statistik	35
2.1. Patientenkollektiv	35
2.1.1. Zusammensetzung der Patientenauswahl	35
2.1.1.1. Entscheidung zur Aufnahme des Patientenfalls für die Herstellung der TMAs mittels Alter, Geschlecht,WHO-Kriterien, Primär- und Rezidivtumor und histologischem Befund	37
2.1.1.2. Zusammensetzung der Datensätze.....	37
2.2. Material & Methoden	41
2.2.1. Herstellung der Paraffinblöcke.....	41
2.2.2. Herstellung der Paraffinschnitte	41

2.2.3. HE-Routinefärbung	41
2.2.4. Tissue Microarray	42
2.2.4.1. Technik und Herstellung	42
2.2.5. Immunhistochemie	44
2.2.5.1. Theorie und Bedeutung	44
2.2.5.2. Prinzip der immunhistochemischen Färbungen	44
2.2.5.3. Verwendete Materialien der Immunhistochemie	46
2.2.5.4. Immunhistochemische Färbungen der TMAs mittels der Ventana-Automaten mit dem iView-Verfahren	47
2.2.6. Lichtmikroskopische Beurteilung und automatische Bildanalyse	49
2.2.6.1. Einscannen der Slides und maschinelle Auswertung der TMAs	52
2.3. Statistik	54
2.3.1. Allgemeine Statistik	54
2.3.2. Korrelationsanalysen	54
2.3.3. Überlebensanalysen	54
3. Auswertung und Ergebnis	55
3.1. Manuelle Auswertung der Cofilin Expression	55
3.1.1. Einfaktorielle Analysen der Cofilin Mittelwerte und dem Geschlecht und Alter	57
3.1.1.1. Allgemeine Alters- und Geschlechtsverteilung in den verschiedenen Tumorentitäten und den WHO Graden I bis IV	57
3.1.2. Einfaktorielle Analysen der Cofilin Mittelwerte und dem WHO Grad	62
3.1.3. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und der Diagnose	63
3.1.4. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und Lokalisation	64
3.1.4.1. Allgemeine Verteilung der Tumorlokalisationen nach dem Alter, dem Geschlecht, den jeweiligen Tumorentitäten und dem WHO Grad	64
3.1.5. Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit dem HistoScore (Definens)	68
3.1.6. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem IDH1 Status (0=nichtmutiert, 1=mutiert)	72
3.1.7. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und den p53 Prozentwerten	76
3.1.7.1. Allgemeine Verteilung von p53 nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität, der Tumorlokalisation und dem WHO-Grad	76
3.1.8. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem Wilms-Tumor1-Score bzw. Wilms-Tumor1-Status	78
3.1.8.1. Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit dem WT1-Status und WT1-Score	84
3.1.9. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem Proliferationsindex MIB-1	84

3.1.9.1. Allgemeine Verteilung des MIB-1-Proliferationsindex nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad	84
3.1.10. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem MGMT-Methylierungsstatus	86
3.1.10.1. Allgemeine Verteilung von MGMT nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad.....	86
3.1.11. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte im Vergleich der Primärtumore und Rezidive	88
3.1.11.1. Allgemeine Verteilung der Primär- und Rezidivtumore nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad.....	88
3.1.12. Überlebensanalysen mittels Kaplan-Maier-Analyse	90
4. Diskussion.....	91
4.1. Betrachtung der Ergebnisse der Allgemeinen Verteilungsanalysen ohne Cofilin Expression	91
4.2. Betrachtung der Ergebnisse der Allgemeinen Verteilungsanalysen mit der Cofilin Expression	93
4.3. Vergleich der Cofilin Expression in ZNS-Tumoren und anderen Neoplasien.....	94
4.4. Cofilin Expression und andere tumorassoziierte Faktoren	97
4.4.1. WT1 Protein und MIB-1 Proliferationsindex	97
4.4.2. MGMT-Methylierungsstatus.....	99
4.4.3. IDH1	100
4.4.4. p53	101
4.4.5. Die Rolle des Cofilin Proteins in der zukünftigen Tumorthherapie	101
4.5. Cofilin Protein als diagnostischer und prognostischer Faktor	103
5. Zusammenfassung	105
6. Literaturverzeichnis	107
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	117
8. Anhang.....	118
8.1. Tabellen	118
8.2. Danksagung.....	119

Abkürzungsverzeichnis

AA	anaplastisches Astrozytom
Abb.	Abbildung
ADF	Aktin depolymerisierender Faktor
bzw.	Beziehungsweise
CSF	Cerebrospinal fluid/Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
F	Female/weiblich
GBM	Glioblastom
GFAP	Glial fibrillary acid protein
HE	Hämatoxylin-Eosin
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1 (cytosolisch)
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2 (mitochondrial)
Ig	Immunglobulin
LOH	Loss of heterozygosity
M	Male/männlich
MGMT	Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MIB	Made in Borstel: Proliferationsmarker in der histologischen Beurteilung
MPNST	Malignant peripheral nerve sheath tumor
MRT	Magnetresonanztomographie
p-Wert	probability (Signifikanzwert)
p53	Tumorprotein 53
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
SHH	Sonic Hedgehog Signalweg
TMA	Tissue Microarray
TP53	Gen des Tumorproteins 53 (lokalisiert auf Chromosom 17)
WHO	World Health Organisation

WNT	Signalprotein, Wnt setzt sich zusammen aus Wg für Wingless und Int-1
WT	Wilms Tumor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung zu den Tumoren des Zentralen Nervensystems und Embryonalen Tumoren

Neoplasien des Zentralen Nervensystems können als gutartige und bösartige Geschwülste im Gehirn vorkommen. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den hirneigenen Tumoren, den neuroepithelialen Tumoren, die definiert sind als raumfordernde intrakranielle Neoplasien und ihren Ursprung in dem Neuroepithel haben (Masuhr, 2007). Die größte Untergruppe bilden die Gliome, welche wiederum nach dem vorherrschenden Zelltyp weiter unterteilt werden in Astrozytome einschließlich Glioblastome, Oligodendrogliome, Ependymome sowie Mischtumoren mit oligodendroglialem oder astrozytärem Ursprung (Schneider, 2010) (Kleihues, 1993).

Gliome gehen ihrerseits aus Gliazellen hervor, dem Stützgewebe der Nervenzellen, die wie die daraus abgeleiteten Tumoren in unterschiedliche Typen unterteilt werden. So werden diese „Stütz- und Haltezellen“, die Gliazellen, im zentralen Nervensystem in Mikroglia, Makroglia, Ependymzellen und Plexusepithel unterteilt, wobei die Astrozyten und Oligodendrozyten zu den Makroglia zählen. Die Makroglia unterstützen die Neuronenfunktion, wobei die Astrozyten hierbei eine Nährstoffversorgung der Neuronen gewährleisten sowie eine Stützfunktion und zusätzlich auch eine Beeinflussung der neuronalen Signalverarbeitung übernehmen.

Die Oligodendrozyten hingegen haben die Aufgabe, die Signalweiterleitung der Neuronen über große Distanzen durch die Ausbildung von Markscheiden zu ermöglichen.

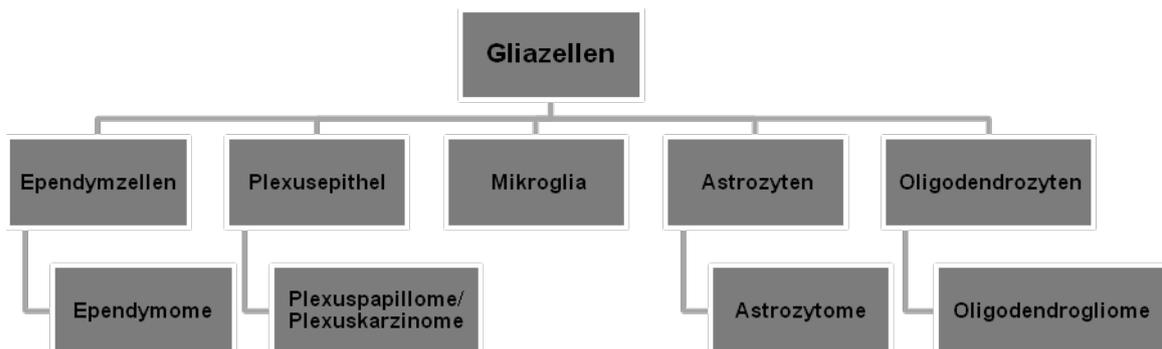


Abbildung 1: Eigene vereinfachte Darstellung zur Gliederung der Gliazellen und davon abgeleiteten Tumoren im ZNS.

Als Besonderheit der bösartigen Neoplasien bzw. Tumoren des Zentralen Nervensystem gilt, im Gegensatz zu tumorösen Erkrankungen aller Organe, dass die Tendenz zur hämatogenen Metastasierung bis auf wenige Ausnahmen nicht vorkommt. Allerdings ist eine über die Liquorwege vorkommende Metastasierung bei Medulloblastomen und Ependymomen zu beobachten (Scheurlen, 1989) (Buchmann, 1959). Die bedeutendste Bedrohung der Gliome liegt in dem diffusen infiltrativen und schnellen Wachstum und der damit verbundenen früher oder später in Erscheinung tretenden sog. Hirndruckzeichen bzw. die je nach Lokalisation der Raumforderung zu Tage tretenden Symptome.

Im Folgenden geht diese Arbeit auf die anaplastischen Astrozytome, die hochmalignen Glioblastome und die pädiatrischen Medulloblastome/PNET mit Fokus auf Entstehung (Kleihues, 2007) und aktuelle wissenschaftlichen „Neuerkenntnisse“ zu Therapieoptionen sowie die Untersuchung mit dem Schwerpunkt auf die Expression des Proteins Cofilin ein. Die genauere Betrachtung von ADF/Cofilin erfolgt unter Punkt 1.5.3.1.

1.2. Einteilung, Klassifikation und Inzidenz von Glioblastomen, anaplastischen Astrozytomen sowie den embryonalen Tumoren Medulloblastom /PNET

Für die Hirntumoren existiert eine Reihe von Klassifikationssystemen. Es kann eine Einordnung nach der Lokalisation des Tumors (Bucy, 1968) (Jansen, 1998), dem Alter der betroffenen Patienten (Giannini, 1997) oder der Histologie (Kleihues, 1993) (Ringertz, 1950) (Bailey, 1930) (Daumas-Duport, 1988) erfolgen. Jede dieser Einordnung macht auf ihre Weise Sinn, da beispielsweise die Tumorlokalisation sowohl die Operabilität bestimmt als auch die in Frage kommenden Tumorarten einschränkt. Die Einordnung nach dem Patientenalter zeigt, dass primäre Gehirntumoren bei Erwachsenen vor allem als mittel- bis hochgradig maligne Gliome auftreten, während bei Kindern an erster Stelle meist niedrig- bis mittelgradige maligne Gliome stehen, gefolgt von den Medulloblastomen, die ihre bevorzugte Lokalisation überwiegend im Kleinhirn haben (Levin, 1997).

Das am häufigsten und auch gängigste verwendet Klassifikationssystem stellt die WHO-Klassifikation in der revidierten Fassung von 2016 (Louis, 2016) dar. Sie beschreibt vier Grade von Malignität und ist aus dem sogenannten St. Anne/Mayo-System (Daumas-Duport, 2000) hervorgegangen, welches sich wiederum auf der Histogenese der Tumoren beruft und somit eine Zuteilung mit dem dominierenden Zelltyp oder mit den Merkmalen des histopathologisch vorherrschenden Zelltyps ermöglicht. Es stellt damit eine Malignitätsskala dar, welche die unterschiedlichen Histologien und Biologien der Tumoren vergleicht (Kleihues, 2007). Durch das histologische Grading lässt sich das pathobiologische Verhalten der Tumore deskriptiv vorhersagen und die Therapiewahl und -möglichkeiten werden entsprechend angepasst bzw. empfohlen (Kleihues, 2007). Im Folgenden erfolgt eine tabellarische Darstellung der vier WHO Grade und ihrer zugehörigen hirneigenen Tumoren der Gruppe der astrozytären Tumoren sowie der embryonalen und ependymalen Tumoren zur Vervollständigung.

Astrozytäre Tumoren				
	I	II	III	IV
Subependymale Riesenzellastrozytome	.			
Pilozytische Astrozytome	.			
Diffuse Astrozytome		.		
Pleomorphe Xantho-Astrozytome		.		
Anaplastische Astrozytome			.	
Glioblastome				.
Riesenzell-Glioblastome				.
Gliosarkome				.

Tabelle 1: Darstellung der Astrozytären Tumoren (Quelle: Kleihues P, Louis DN, "WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", 2007).

Embryonale und ependymale Tumoren				
	I	II	III	IV
Medulloblastome				▪
CNS (Primitive neuroektodermale Tumore (PNET))				▪
Atypischer Teratoid/Rhabdoidtumor (AT/RT)				▪
Ependymom		▪		
Anaplastisches Ependymom			▪	

Tabelle 2: Darstellung der Embryonalen Tumoren: Kleihues P, Louis DN, "WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", 2007.

Zu den Tumorentitäten des WHO Grad I und WHO Grad II werden in dieser Arbeit keine genaueren Betrachtungen und Erläuterungen aufgeführt, da sich die Untersuchungen in dieser wissenschaftlichen Arbeit auf die höhermalignen ZNS-Tumoren konzentriert.

1.2.1. Das Anaplastische Astrozytom (WHO Grad III)

An diffus infiltrierenden, anaplastischen Astrozytomen (mit den Glioblastomen (GBM) zu 'höhergradigem Gliom' zusammengefasst) erkranken vor allem Erwachsene mit einem mittleren Erkrankungsalter von 45 Jahren. Männer sind in Registern (CBTRUS, 2011) und Studien (Ohgaki, 2005) immer etwas

häufiger betroffen als Frauen. Das Marklager der Hemisphären repräsentiert den bevorzugten Lokalisationsort der Anaplastischen Astrozytome (AA).

AAs können entweder de novo entstehen oder sie entwickeln sich aus niedriggradigen Gliomen. Das diffuse Astrozytom (WHO Grad II) stellt sich gewöhnlich als „Ausgangstumor des anaplastischen Astrozytoms“ dar (Kleihues, 2007), welches sich dann im weiteren Verlauf von ca. zwei Jahren häufig zum sekundären GBM differenziert.

Histopathologisch sind als Diagnosemerkmale eine höhere Mitoseaktivität, eine erhöhte Zelldichte (Kleihues, 2007), Atypien und signifikante Zellproliferationen in der WHO definiert, so dass eine doch manchmal schwierige Abgrenzung zum diffusen Astrozytom WHO-Grad II erfolgen kann (Kleihues, 2007). Des Weiteren kann zur Differentialdiagnostik das Kriterium berücksichtigt werden, dass bei AAs oft Zellkerneinschlüsse und Zytoplasmaveränderungen auftreten können (Kleihues, 2007). Wie die GBMs zeichnen sich die AAs durch eine schnelle Infiltration und raschen Wachstum aus und stellen 4 % aller bösartigen Hirntumoren dar (Percy, 1990).

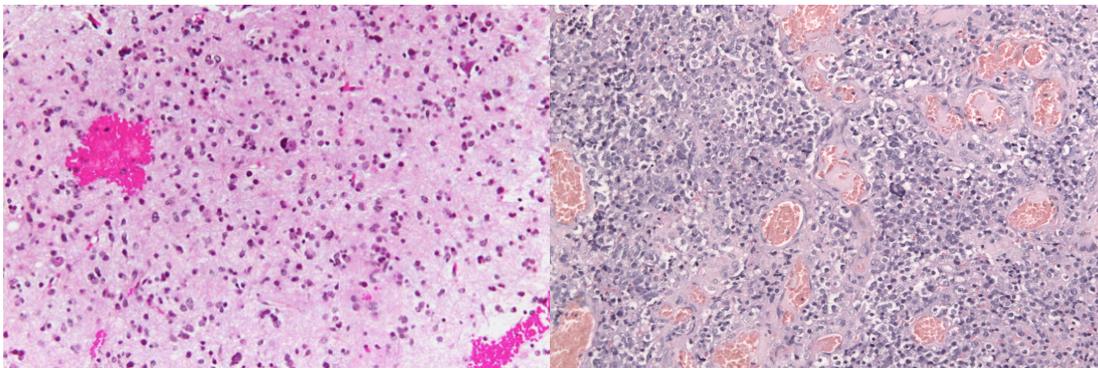


Abbildung 2: Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung eines Anaplastischen Astrozytoms (links) und eines Glioblastoms (rechts) mit Gefäßproliferaten.

Die Gliomatosis cerebri stellt eine sehr seltene Sonderform des AAs dar und zeichnet sich durch extensive diffuse Ausbreitung infra- und supratentoriell in mindestens 3 Hirnlappen aus, so dass in drastischen Fällen kein Tumorausgangstumor lokalisiert werden kann (Whistle, 1998). Das mediane Überleben liegt hier bei 14,5 Monaten (Tailibert, 2006). Da genetisch keine

Unterschiede zwischen zu den Anaplastischen Astrozytomen bestehen, ist die Gliomatosis cerebri seit 2016 in der WHO Klassifikation keine eigenständige Entität mehr (Louis, 2007).

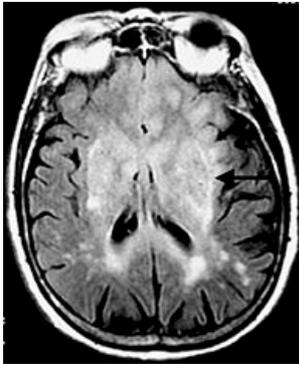


Abbildung 3: Gliomatosis cerebri: Kernspin T2-gewichtet, mit dem Bild einer Gliomatosis cerebri beider Hemisphären (Quelle: Duron et al. 2008, Lizenziert unter Creative Commons 2.0).

1.2.1.1. Genetische Aspekte der Anaplastischen Astrozytome

Wichtige und bedeutsame genetische Veränderungen der AAs und der diffusen Astrozytome stellen die Punktmutationen der Isocitratdehydrogenase (IDH)1 und/oder IDH2 dar, wobei die IDH1- Mutationen in 59-88% der diffusen Astrozytome und zu 50-78% bei den AAs sowie zu 50-88% bei den daraus entwickelten sekundären GBMs auftraten (Hartmann, 2009). Die IDH1-Mutation bzw. das Vorhandensein der Mutation begünstigt die Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit (Hartmann, 2010). Die IDH2-Mutation konnte lediglich in 1-7% der Fälle sowohl bei den diffusen als auch bei den AAs nachgewiesen werden, in den sekundären GBMs erfolgte keine Bestätigung. (Bourne, 2010). Zudem zeigten sich TP53-Mutationen, die in 72% der Fälle beobachtet werden konnten (Ohgaki, 2009) und chromosomale Verluste auf 17p und 10. Die Loss of heterozygosity (LOH) auf Chromosom 17p und 10 ließ sich überwiegend in höhergradigen Astrozytomen in 60-75% der Fälle nachweisen (James, 1989), die LOH 17p in 30-35% aller Astrozytome. Die EGFR-Genamplifikation (EpidermalGrowthFactorReceptor) wurde in 40% der höhergradigen Astrozytome identifiziert (Wong, 1987).

Zusätzlich ist eine Hypermethylierung des Promotors des DNA-Reparaturenzyms O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ein günstiger Prognosefaktor, da diese Patienten durch ein verbessertes Ansprechen auf die Chemotherapie eine bessere Überlebenszeit vorweisen können (Stupp, 2005).

Der am häufigsten verwendete diagnostische Routinemarker sowohl in diffusen als auch in AAs ist das Saure Gliafaserprotein (GFAP), das insbesondere im Zytoplasma als Hauptbestandteil der Intermediärfilamente von Astrozyten bzw. in Gliazellen des ZNS zu finden ist (Kleihues 2007, Schittenhelm, 2008). Des Weiteren konnte ein signifikant häufigeres Auftreten von WT1 in den Tumorzellen von AAs im Vergleich zu niedriggradigen Gliomen nachgewiesen werden (Schittenhelm, 2008). Das Wilms Tumor Protein 1 kann somit als unterstützender Marker für die höhergradigen astrozytären Tumoren verwendet werden.

1.2.1.2. Therapie und Prognose

Bei den AAs besteht die Therapie erster Wahl immer aus einer Operation mit dem Bestreben einer kompletten Tumorresektion und/oder einer Serienbiopsie zur Diagnosesicherung. Auch bei einem Tumorrezidiv sollte über eine erneute Operation beraten werden, um den Patienten günstigere Bedingungen für die adjuvanten Therapieoptionen zu ermöglichen und gegebenenfalls neue oder wieder in Erscheinung tretende neurologische Störungen erträglicher zu machen. Des Weiteren erfolgt eine individuell speziell angepasste Standard-Strahlen- und Chemotherapie, die erheblich zur Lebensqualitätsverbesserung beiträgt (Stupp 2005, Südwestdeutsches Tumorzentrum, 2006).

1.2.2. Glioblastome (WHO Grad IV)

Das Glioblastom, früher auch 'Glioblastoma multiforme' (GBM) genannt, ist der häufigste primäre Gehirntumor mit 12-15% aller intrakraniellen Neubildungen. Des Weiteren stellt das GBM 60-75% der Tumoren mit astrozytärem Ursprung dar (Kleihues 2007) (Ohgaki 2005), laut Central Brain Tumor Registry of the United States 2011 sogar zwischen 75-85%.

Die Inzidenz liegt in den meisten nordeuropäischen Ländern und Nordamerika zwischen 3-4 Neuerkrankungen/100000 pro Jahr (Lantos, 2002). Es finden sich länderspezifische Schwankungen: So liegt die Erkrankungsrate in den USA bei 2.96 Erkrankungsfälle auf 100000 Einwohner pro Jahr (CBTRUS, 2006), die in der Schweiz durchgeführte „Population-based Study“ zeigte jedoch 3.55 Erkrankungsfälle auf 100000 Einwohner pro Jahr (Ohgaki, 2005a). Die Tumore werden typischerweise zwischen dem 45. und dem 75. Lebensjahr beobachtet, mit einem medianen Erkrankungsalter von 61.3 Jahren (Lantos, 2002). Auch bei den GBMs sind Männer wieder häufiger betroffen als Frauen (USA: M:F=1.26:1; Schweiz: M:F = 1.28:1) (Ohgaki, 2005).

Das GBM ist hauptsächlich in der subkortikalen weißen Substanz der Hemisphären lokalisiert und manifestiert sich in 90-95% der Fälle sehr schnell „de novo“, ohne erkennbare vorherige Läsionen oder krankhafte Gewebsveränderungen als primäres Glioblastom (Kleihues, 2007).

Die sekundären Glioblastome entwickeln sich langsam in einem normalerweise vier bis acht Jahre (Spannbreite 1 bis 10 Jahre) dauernden Prozess aus diffusen Astrozytomen WHO Grad II oder aus AAs WHO Grad III, machen jedoch lediglich ungefähr 5% der GBMs aus (Ohgaki, 1999) (Ohgaki, 2005) (Ohgaki, 2007). Die diffusen Astrozytome wiederum zeigen die klare Tendenz, sich in einem sechs bis acht Jahre dauernden Prozess zu höhergradigen Tumoren zu differenzieren. Das Patientenklintel des sekundären GBMs ist ein deutlich jüngeres (mittleres Alter 45 Jahre). Die Progression eines diffusen Astrozytoms WHO Grad II zum Glioblastom kann einen Zeitraum von einem Jahr bis zu über zehn Jahren einnehmen (Ohgaki 1999), im Mittel beträgt der Zeitraum vier-fünf Jahre (Ohgaki, 2005).

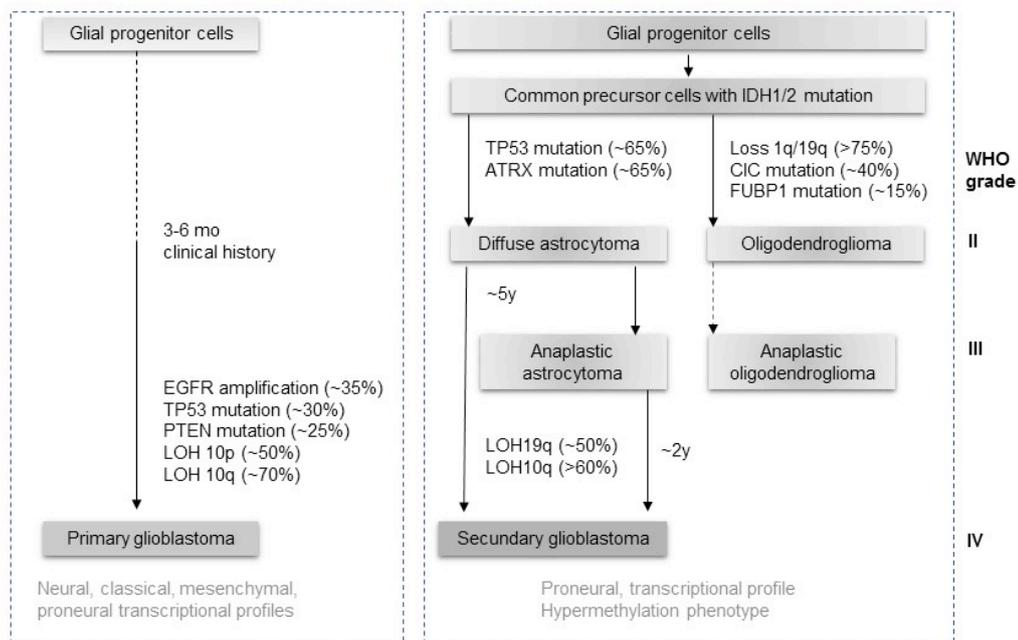


Abbildung 4: Genetische Signalwege der primären und sekundären Glioblastome (Modifiziert nach: Genetic pathways to primary and secondary Glioblastoma, Hiroko Ohgaki H, Kleihues P, Clin Cancer Res 2013;19:764-772.).

Bei einer Studie von 987 GBM-Patienten am Züricher Universitätsklinikum waren die Hauptlokalisationsorte der GBM mit 31% der Temporal-, mit 24% der Parietal-, mit 23% der Frontal- und mit 16% der Occipitallappen. Des Weiteren zeigten sich häufig typischerweise Kombinationen mit fronto-temporalem Befall und einer Tumordinfiltration, die sich in den angrenzenden Kortex erstreckt und sich durch eine Infiltration des Corpus callosum manifestiert. Diese Überschreitung der Mittellinie bedingt eine Ausbreitung in die kontralaterale Hemisphäre (Lee, 1997). Aufgrund der genannten Symmetrie werden diese daraus resultierenden Tumoren auch als „Schmetterlingsgliome“ bezeichnet, stellen aber mit weniger als 10% einen kleinen Anteil der GBMs dar (Linz, 2003).

Bezirke mit und ohne Nekrose oder auch Blutungen sind häufige makroskopische Befunde des GBM.

Histopathologische Charakteristika zeigen sich intranukleären Atypien, Zellpleomorphismus und einem irregulärem Wachstumsmuster mit mikrovaskulärer Proliferation und Pseudopallisaden im Randbereich von

Nekrosen, einem hoch variablen zytologischen Bild (Burger, 1995) (Nelson, 1983).

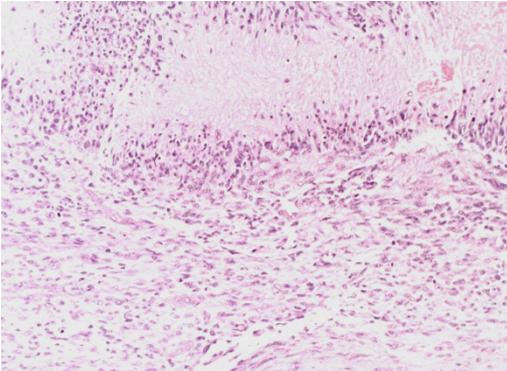


Abbildung 5: Glioblastom (HE-Färbung mit strichförmiger Nekrose in der oberen Hälfte).

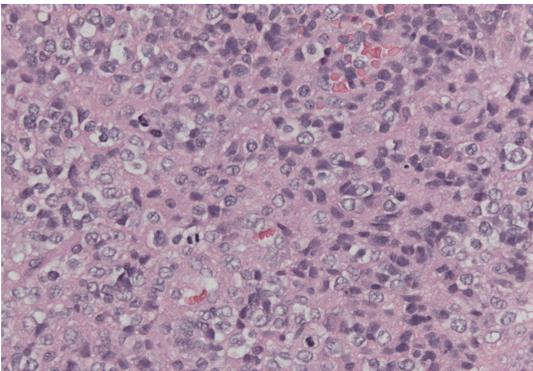


Abbildung 6: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III (HE-Färbung mit Mitosen).

Eine eindeutige Aussage über die Herkunft des Zelltyps der GBMs kann bis heute nicht getroffen werden (Bruner et al., 1994). Das Vorhandensein von GFAP, dem glial fibrillary acidic protein, einem Zytoplasmprotein, das als Hauptbestandteil von Gliazellen überwiegend in reifen Astrozyten im ZNS zu finden ist, spricht jedoch für eine astrozytäre Herkunft. Das GFAP stellt aber auch eine wichtige Komponente der Zytoskelettentwicklung der anderen Glia und in Astrozyten dar und lässt daher nur den sicheren Rückschluss zu, dass es sich um ein Gliom bzw. einen glialen Tumor handelt (Middeldorp, 2011).

1.2.2.1. Genetische Aspekte der Glioblastome

Schon im Jahre 1940 erkannte der deutsche Pathologe Hans-Joachim Scherer, dass es nicht nur eine Form von Glioblastomen gibt, sondern eine primäre und

eine sekundäre Form – aus niedriggradigen Vorläufern entstehend und daraus resultierend ein unterschiedlich langes Überleben bedeutet (Linz, 2003) (Scherer, 1940).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Genetik der GBMs schwer fassbar ist und sich nicht eine einzelne Mutation nachweisen lässt, sondern verschiedene wiederkehrende Muster mit Punktmutationen, Deletionen und Amplifikationen. Diese Vorgänge implizieren im Folgenden eine Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

In mehreren Studien durch Von Deimling konnte schon recht früh darlegt werden, dass zumindest zwei genetische GBM-Grundtypen existieren, die sich in verschiedenster Art voneinander differenzieren. Bezeichnend für die Typ I-Tumoren (der De novo-Typ) war ein Fehlen von Abschnitten auf Chromosom 10. Desweiteren konnten Mutationen der Chromosomen 9 oder 12 nachgewiesen werden (von Deimling 1993).

Ebenso scheint das wesentliche Merkmal auf einer Vermehrung des Gens auf Chromosom 7 für den Rezeptor des endothelialen Wachstumsfaktors (EGFR) zu beruhen. Diese wichtigen Erkenntnisse ließen dann neue Rückschlüsse auf die Einleitung und Auslösung der Tumorentstehung zu, denn das Fehlen von Chromosom 10 und die gezielte Vermehrung des EGFR-Gens sind bei GBMs viel häufiger als bei niedriggradigen Astrozytomen nachzuweisen (Rasheed, 1991).

Die Typ-II-Tumoren, die sich typischerweise aus einer Progression zum GBM weiterentwickeln, zeigen sowohl oft eine Deletion auf 17p, dem distalen kurzen Arm von Chromosom 17 als auch zusätzlich Punktmutationen des TP53, dem Tumorsuppressorgen (Stemmer-Rachamimov, 1997), auch „Guardian of the Genome“ genannt, da TP53 als das zentrale Element in der Koordinierung des Zellzyklus wichtige Funktionen übernimmt wie z.B. das Erkennen von genetischen Schäden und damit eine Steuerung der Apoptose übernimmt.

Nicht zu vernachlässigen sind darüber hinaus die Punktmutationen im IDH1/2 Gen (Yan 2009). Diese Veränderungen, vor allem im IDH 1 Gen, seltener im IDH 2 Gen, sind größtenteils in sekundären GBMs und in diffusen, astrozytären

und oligoastrozytären Tumoren zu finden. Bei den primären GBMs tragen lediglich ~5% diese IDH1- Mutationen (Hartman, 2009) (Schittenhelm, 2011). Anaplastische diffuse Gliome ohne IDH-Mutation, der sogenannte Wildtyp, haben mit einem medianen Gesamtüberleben von weniger 2 bis 3 Jahre, die schlechtesten Prognose, während der Verlauf bei IDH-mutierten Glioblastomen deutlich besser ist (Weller, 2016). Die neue WHO Klassifikation unterteilt daher seit 2016 AA und Glioblastome in IDH-mutiert und IDH-Wildtyp (Louis 2016).

1.2.2.2. Therapie und Prognose

Der prognostisch ausschlaggebendste Faktor und damit das oberste Ziel ist die Operation und damit die angestrebte mikrochirurgisch komplette Tumoresektion der schrankengestörten Tumoranteile. Bestimmte diagnostischen Kriterien wie rasche Rückbildung der neurologischen Defizite, junger Patient, Erstresektion länger als 1 Jahr zurückliegend, kann eventuell eine Resektion eines Rezidivtumors angestrebt werden (Anton, 2012).

Des Weiteren ist die Strahlentherapie neben der Operation die wichtigste Therapiemaßnahme bei Glioblastompatienten (Brandes, 2003, Hegi 2005).

Zusätzlich zur Strahlentherapie empfiehlt sich eine Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen wie Temozolomid, da darüber ein längeres Überleben nachgewiesen werden konnte (Hegi, 2005). Die 2-Jahresüberlebensrate stieg in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus der Tumoren von 10% auf 26% (Südwestdeutsches Tumorzentrum-Comprehensive Cancer Center Tübingen, Therapieempfehlungen 2006).

Weltweit wird an der Verbesserung der Therapie bzw. an weiteren Behandlungsoptionen geforscht und doch bleibt das GBM unheilbar (Grossman, 1998). Mehrere Studien (Anton, 2012) belegen, dass die mittlere Überlebenszeit in den letzten vier Jahrzehnten von 12.1 auf 14.6 Monate mit der Standardtherapie aus Operation, Strahlen und Chemotherapie gesteigert werden konnte, was angesichts des Zeitrahmens als minimaler Erfolg zu bewerten ist.

Aufgrund ihrer sehr invasiven Struktur können GBMs nicht völlig reseziert werden (Moliterno, 2012) und trotz kombinierter Radio-/Chemotherapien

überleben weniger als die Hälfte der Patienten 12 Monate (Adamson, 2009). Dabei spielt das Erkrankungsalter eine entscheidende Rolle, da das höhere Alter den signifikantesten negativen Prognosefaktor darstellt (Ulutin, 2006). Im Gegensatz zu den primären GBMs weisen die sekundären GBMs oftmals eine IDH1/2-Mutation auf, welche aufgrund des anderen molekulargenetischen Gesamtprofils wiederum für einen begünstigenden prognostischen Faktor für das Überleben darstellt (Hartmann, 2010).

1.2.3. Medulloblastome/ ZNS-PNET (Primitive Neuroektodermale Tumoren)

Bei der Gruppe der sogenannten primitiv neuroektodermalen Tumoren, dem PNETs, handelt es sich um den am häufigsten auftretenden bösartigen, invasiv wachsenden Embryontumor. 85% der Tumoren gehen vom Kleinhirn aus und werden anhand ihres genetischen und immunhistochemischen Bildes als Medulloblastome (Frühwald, 2011) oder AT/RTs klassifiziert (Rutkowski, 2006). Im Großhirn lokalisierte embryonale Tumore werden als supratentorielle ZNS-PNETs oder als Embryonal tumor with mulilayered rosettes (ETMR) zusammengefasst (Dubuc, 2010) (Wesseling, 2014). Gemeinsam ist ihnen der WHO Grad IV. Bei 75% der Kinder mit malignem Hirntumor befindet sich der Ursprungswachstumsort in der Vermis, verbreitet sich von dort ausgehend bis zum 4. Ventrikel (Massimo, 2010) und trägt den Namen Medulloblastom (de Haas, 2007).

Leider scheint das Medulloblastom eine angeborene Tendenz innezuhaben, über den Liquor-Weg (Cerebrospinal fluid) zu metastasieren; hier hat sich das Stadieneinteilungssystem nach Chang etabliert (Frühwald, 2011). Es finden sich häufig typische zerebelläre Befunde wie die Ataxie, ein Intentionstremor oder morgendliches Erbrechen, Kopfweh und Lethargie.

Modifizierte Stadieneinteilung für ZNS-Tumoren (ursprünglich nur für Medulloblastome nach Chang)	
Tumorgrösse/- ausdehnung	Metastasierung
T1 Durchmesser kleiner 3 cm, begrenzt auf Kleinhirnwurm, Dach des IV. Ventrikels oder Kleinhirnhemisphäre	M0 kein Hinweis für Metastasen M1 Nachweis von Tumorzellen im Liquor
T2 Durchmesser grösser gleich 3 cm, dringt in Nachbarstrukturen ein oder füllt den IV. Ventrikel teilweise aus	M2 makroskopische Metastasen im Subarachnoidalraum oder den supratentoriellen Ventrikeln
T3a) dringt in 2 Nachbarstrukturen ein oder füllt den IV. Ventrikel vollständig aus	M3 makroskopische Metastasen im spinalen Subarachnoidalraum
T3b) zusätzliche Hirnstammfiltration/ Boden des IV. Ventrikels	M4 Metastasen ausserhalb des ZNS
T4 Ausdehnung bis ins Mittelhirn/III. Ventrikel oder oberes Hirnmark	

Abbildung 7: ZNS-Tumoren bei Kindern und Erwachsenen
(Quelle modifiziert nach: Frühwald M C, Rutkowski S.: „Tumors of the Central Nervous System in Children and Adolescents“, Dtsch Arztebl Int 2011; 108(22): 390-7; DOI: 10.3238/arztebl.2011.0390.)

ZNS-Tumoren stellen, nach den hämatologischen Neoplasien, die zweithäufigste Krebserkrankung bei Kindern dar und bleiben die durch Krebs verursachte häufigste Todesursache in der Kindheit (Northcott, 2012). Die jährliche Erkrankungsrate bei Kindern unter 15 Jahren liegt derzeit bei 0.5 Fälle auf 100000 Kinder (CBTRUS, 1995). Der Erkrankungsgipfel liegt bei 7 Jahren, meist zwischen 2 und 9 Jahren, und 70% der Medulloblastome zeigen sich bei Patienten jünger als 16 Jahre (Arseni, 1981). Bei Erwachsenen zeigen sich die Medulloblastome zwischen 21-40 Jahren (Giordana, 1999). 65% der Fälle sind männlich.

Die histologische Einteilung sieht folgende Subtypen des Medulloblastoms vor:

1. das klassische Medulloblastom (auf genetischer Ebene meist WNT-oder Gruppe 3, 4 Subtyp)
2. das desmoplastische / noduläre Medulloblastom (meist SHH-Subtyp)
3. das großzellige / anaplastische Medulloblastom (SHH-Subtyp)

Des Weiteren können die Medulloblastome aufgrund ihres genetischen Profils in vier Subtypen unterteilt werden: In den WNT-Subtyp, den SHH-Subtyp (Sonic Hedgehog) sowie in Gruppe 3 und Gruppe 4 (Northcott, 2012).

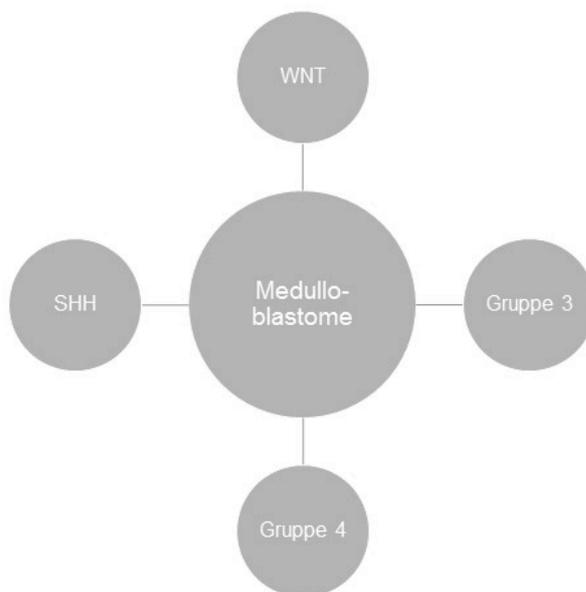


Abbildung 8: Darstellung der einzelnen Typen von Medulloblastomen.

1.2.3.1. Genetische Aspekte der Medulloblastome

Ein erstmaliger p53-Mutationsnachweis in einem Medulloblastom erfolgte in den frühen Neunziger Jahren (Ohgaki, 1991). Für eine Prognose bzw. Therapiestrategie sind sowohl klinisch-diagnostische Faktoren wie das Erkrankungsalter, das Vorhandensein von Metastasen, die operative Resektion als auch die histologische Einteilung wichtig und ausschlaggebend.

Im klassischen Medulloblastom liegt die häufigste Veränderung im Isochromosom 17q (i17q) (Schlegel, 1998). Diese Veränderung findet sich bevorzugt in der Gruppe 4 der Medulloblastome.

In desmoplastischen Medulloblastomen entdeckte man häufig Mutationen im PTCH Tumorsuppressorgen. Das Protein patched homolog 1 ist ein Protein der Patched Familie und stellt kodiert den Rezeptor für den Sonic hedgehog Signalweg dar; seine Gene funktionieren als ein Tumorsuppressorgen (Pietsch, 1997).

Fast 40 % der Medulloblastom-Patienten weisen einen WNT- oder SHH-Typ auf (Melton, 2011). Das WNT- und SHH- Medulloblastom erhielten ihre Namen aufgrund des Signalweges, welcher Richtungsweisend für die Rolle in der Pathogenese ist.

Der WNT-Subtyp hat gegenwärtig die beste Prognose von allen Untertypen. Mit einer über 95%igen Chance überleben diese Patienten (Gajjar, 2006). Betroffen sind vor allem Kinder, seltener Erwachsene. Medulloblastome weisen somatische Mutationen von CTNNB1 auf. Das CTNNB1-Protoonkogen, das durch Mutationen stabilisiert wird, aktiviert den WNT/ β -Catenin-Signalweg (Gajjar, 2006) und gehört somit zur WNT-Subtypgruppe (Clifford, 2006). Histopathologisch erscheinen Medulloblastome vom WNT-Typ meist als klassische Medulloblastome.

Betroffen in der SHH-Subgruppe sind Kleinkinder (mit desmoplastischem/nodulärem Medulloblastom) und Erwachsene (mit klassischem oder großzelligem/anaplastischem Medulloblastom). Hier konnten Keimbahnmutationen mit Beeinflussung von PTCH1 oder SUFU nachgewiesen werden, die in der Entwicklung der SHH-Medulloblastome eine große Rolle spielen (Brugieres, 2010). Zu der Biologie bzw. Pathologie der Subtypen der Gruppe 3 und Gruppe 4 ist leider noch wenig bekannt (Taylor, 2012), jedoch weisen die Gruppe 3-Medulloblastome die schlechteste Prognose auf (Cho, 2011): 50 % der Fälle haben bei Erstdiagnose bereits Metastasen in der Bildgebung (Kool, 2012). Des Weiteren ließ sich eine erhöhte Amplifikation der MYC-

Protoonkogene in der Gruppe 3-Medulloblastome nachweisen (Cho, 2011) (Northcott, 2011).

Die Prognose für die an der Gruppe 4-Medulloblastomen erkrankten Kinder ist die der SHH-Subgruppe gleichzusetzen, bei den Erwachsenen hingegen ist diese als sehr schlecht einzustufen. Bei diesem Subtyp erfolgte ein Nachweis des Isochromosoms 17q sowie der Verlust einer X-Chromosom-Kopie bei Frauen (Kool, 2012).

1.2.3.2. Therapie und Prognose

Auch bei den Medulloblastomen/PNET hat sich eine Kombinationstherapie aus Operation, Chemo- und Strahlentherapie etabliert. Als Therapie der Wahl erfolgt hier ebenso die mikrochirurgische Operation mit möglichst kompletter Tumorentfernung; auch bei Rezidiven sollte eine erneute Operation in Betracht gezogen werden.

Bei Kindern erfolgt die Bestrahlung nach dem sogenannten HIT 2000-Protokoll mit hyperfraktionierter Bestrahlung der Neuroachse. Die Ansprechrate von 60-70% kennzeichnet das Medulloblastom als einen relativ Chemotherapie-sensibler Hirntumor (Rutkowski, 2006).

Der Erkrankungsverlauf ist abhängig von mehreren Faktoren wie der Tumorgroße, dem Ausmaß der möglichen Tumorrezeption, einer eventuellen Absiedlung von Tumorzellen entlang der Liquorwege und dem Patientenalter. Ebenso spielt die histopathologische Bestimmung bzw. Differenzierung eine prognostische Rolle für den Verlauf der Erkrankung. So haben beispielsweise Patienten mit einem desmoplastischen Medulloblastom eine günstigere Prognose als andere Medulloblastom-Subtypen.

Laut einer klinischen Studie konnte eine 66 %ige 5-Jahres-Überlebensrate bei Kindern mit der Diagnose Medulloblastomen durch alleinige Chemotherapie erzielt werden sowie eine 5-Jahres-Überlebensrate von 93 %, bedingt durch eine totale Tumorentfernung. Bei nicht möglicher, inkompletter Tumorentfernung betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 56%, die Fälle mit einer Metastasierung von malignen Tumorzellen entlang der Liquorwege jedoch lediglich 38 % (Rutkowski, 2005).

Eine Rezidivneigung konnte bei einem Drittel der Patienten ca. 1,5 Jahren nach Diagnosestellung nachgewiesen werden (Rutkowski, 2006).

1.2.4. Ependymome

Die Ependymome repräsentieren 5-10% der intrakraniellen Neubildungen bei Kindern und kennzeichnen einen typischen Tumor des Kindesalters mit dem charakteristischen namensgebenden Bezug zum Ventrikel und dem Rückenmark. Auch bei Erwachsenen können Ependymome auftreten. Die Klassifizierung erfolgt durch die WHO.

Die WHO-Klassifizierung der Ependymome

- WHO Grad I: Myxopapilläres Ependymom und Subependymom: jeweils gutartiger Tumor, wobei der myxopapilläre Ependymom ein oft bei erwachsenen auftretender Tumor ist
- WHO Grad II: Ependymom: Tumor mit langsamem Wachstumstendenz im Ventrikel oder Rückenmarkbereich
- WHO Grad III: Anaplastisches Ependymom: Häufig pädiatrischer Tumor mit schnellem Wachstum aufgrund gesteigerter Mitoserate und erhöhter Zelldichte

In der neuen WHO 2016 Klassifikation werden WHO Grad II und III Ependymome zusätzlich noch aufgrund ihres genetischen Profils in RELA-Fusion-positive Ependymome weiter unterteilt (Louis 2016). Diese treten supratentoriell und vor allem bei Kindern auf.

Die Prognose der Ependymome ist abhängig von der Resektabilität des Tumors. Ist eine totale Resektion möglich, ist die Rezidivfreiheit annähernd bei 100%. Oft jedoch ist eine komplette Tumorentfernung aufgrund der Lokalisation und Infiltration nicht möglich, so dass zwar eine Verbesserung der Krankheitssymptomatik erreicht werden kann, jedoch postoperativ eine Strahlen- und/oder Chemotherapie notwendig wird. (Pollack 1995)

1.3. Mögliche Aspekte des Wachstum und der Proliferation in höhermalignen hirneigenen Tumoren und die Rolle der Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorgenese

Bei den Gliomen und embryonalen Tumoren handelt es sich um schnell wachsende, diffus infiltrierende Gehirntumore, d.h. um eine Zellansammlung, die sich der Wachstumskontrolle und –regulation entzogen hat. Bei der Ursachenforschung für den Verlust der Wachstumskontrolle stößt man schnell auf Mutationen in bestimmten Genen, die bleibende Veränderungen im Erbgut verursachen und eng involviert in Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zellen sind (Benjamin, 2003).

Entscheidend ist, dass die mutierte DNA zu veränderten Proteinen führt, welche wiederum das biologische Verhalten der Zelle maßgeblich beeinflusst. So sind an der Motilität von Zellen zahlreiche Proteine als Bestandteil des Zytoskeletts der Zelle involviert und interagieren durch bestimmte Rezeptoren, den Integrinen mit dem Extrazellulärmatrix. Alle diese Bestandteile zeigen bei hirneigenen Tumoren oft Veränderungen in ihrem Expressionsverhalten.

1.4. Die Bedeutung der Extrazellulärmatrix im ZNS

Die Extra- oder Interzellulärschubstanz der Zellen stellt das Stütz- und Bindegewebe zwischen den Zellverbänden und den einzelnen Zellen dar. Sie füllt sozusagen die Zwischenräume der Zellen auf, wodurch eine Vermittlung zwischen den Zellen stattfinden kann (Poeggel, 2005). Die Aufgabe der extrazellulären Matrix besteht in der Einflussnahme auf Stabilität, Beweglichkeit und Form von Zellen und Geweben. Die Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix ist je nach Gewebefunktion anders zusammengesetzt, d.h. Fibroblasten bilden das Bindegewebe und Osteoblasten führen zur Knochenbildung. Sie setzt sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammen, die im Folgenden kurz erläutert werden.

1.4.1. Die Bindegewebszellen

Zur Vervollständigung sollten die Bindegewebszellen erwähnt werden, welche die Funktion der Matrixproduktion übernehmen. Hier sind die Fibroblasten und Fibrozyten die Hauptvertreter der Bindegewebszellen. Jedoch umfasst die Familie der Bindegewebszellen auch z.B. im Knochengewebe vorkommende Osteozyten oder die glatten Muskelzellen in Arterienwänden. Die von den Bindegewebszellen gebildete Extrazellulärmatrix setzt sich aus aufgeführten Bestandteilen zusammen: Die Faserproteine Kollagen und Elastin, die Glykosaminoglykane Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Heparansulfat und zuletzt die Glykoproteine Fibronectin und Laminin.

1.5. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett stellt ein Gerüst verschiedener Proteine dar und dient sowohl als Stütz- als auch als Bewegungsapparat, indem es die Aufgaben zur Erhaltung und Änderung der Zellgestalt, Zellbewegungen, Transporte und die Zellmembranstabilisierung übernimmt. Es besteht aus drei verschiedenen Haupttypen von Fasern, dünnen Proteinfäden, auch Filamente genannt, die über Adapterproteine untereinander und mit der Extrazellulärmatrix kommunizieren.

1.5.1. Mikrotubuli

Mikrotubuli dienen der dynamischen Zellstabilisation, gewährleisten intrazellulär mit ihren Motorproteinen Dynein und Kinesin längere Transportvorgänge und sind zusätzlich für die Bewegungen bzw. Befestigung der Organellen zuständig. In Axonen und Dendriten sorgen die Mikrotubuli innerhalb der neuronalen Fortsätze für den zytoplasmatischen Fluss. (Horn, 2009).

1.5.2. Intermediärfilament

Die Hauptfunktion der Intermediärfilamente besteht im mechanischen Halt der Zelle. Diese Filamente des Zytoskeletts sind in ihrer Eigenschaft stabiler als die beiden anderen Zytoskelettbestandteile, weswegen die Intermediärfilamente häufiger bzw. vermehrt in mechanisch beanspruchteren Zellen zu finden sind. Es handelt sich hierbei um lange Faserproteine. Eine Einteilung in Gruppen beschreibt wie folgt drei im Zytoplasma befindliche Intermediärfilamente und eine Gruppe, die Lamine, die an der Kernlamina anhaften:

1. Keratin-Filamente, auch Zytokeratine genannt, welche v.a. in Epithelzellen zu finden sind.
2. Vimentin-Filamente, die als Bausteine für die Intermediärfilamente für z.B. Endothelzellen oder Leukozyten gelten.
3. Neurofilamente, die in diversen Nervenzellen zu finden sind, jedoch bevorzugt in den Axonen. NF-L, NF-M und NF-H gelten als die drei Hauptvertreter der Neurofilamente.
4. Gruppe der Lamine, welche an der Innenseite der Kernlamina anhaften und dort ein Geflecht von Intermediärfilamenten bilden, an welchen wiederum die Chromosomen ihren Anheftungsort finden.

Intermediärfilamente weisen erhebliche Unterschiede in ihrer gewebespezifischen Beschaffenheit auf, so dass dadurch eine Gewebetypencharakterisierung möglich wird, die in der Tumordiagnostik eine hilfreiche Unterstützung in der Differenzierung zwischen epithelialen, mesenchymalen oder neuronalen Dys- bzw. Neoplasien darstellt.

1.5.3. Mikro- oder Aktinfilamente

Mikro- oder Aktinfilamente bilden ein das Zytosol durchspannendes Fasernetzwerk. Den höchsten Anteil hat das Protein Aktin, welches v.a. für die Zellstabilität verantwortlich ist. Dieses in Eukaryonten am häufigsten vorkommende Protein ist in zwei Formen vorhanden, dem globulärem Monomer G-Aktin und dem F-Aktin, einem Polymer aus G-Aktin, die beide in einem Gleichgewicht im Zytosol vorherrschen. Die Entstehung der Aktinfilamente

beruht auf der Polymerisation, d. h. einer Aneinanderkettung von monomerem G-Aktin zu einem Polymer aus F-Aktin, bis auf diese Weise ein dreidimensionales Netzwerk entsteht. Da F-Aktin eine Polarität aufweist, wird hier vom Plus-Ende gesprochen, wo die Polymerisation überwiegt, während am Minus-Ende die Depolymerisation stattfindet. Dieser sogenannte „Tretmühlenmechanismus“ entsteht durch den stetigen Auf- und Abbau bzw. die Polymerisation und Depolymerisation des Aktinfilaments, wodurch die Hauptaufgabe der Aktinfilamente, nämlich die Bewegungsfunktion der Zelle in Kooperation mit dem Myosin, die Erhaltung der Zellform und die Zellmembranverbindung sowie eine schnelle Formveränderung gesichert wird. Diese Verbindung entsteht durch Zellkontakte, welche über Adhäsionsmoleküle an die Proteine der Zielkontakte verankert werden. (Horn, 2009). Ein Hauptvertreter dieser Aufgabe stellt das α -Aktinin dar.

Es existieren eine Reihe von Aktin-bindende Proteinen mit einer Vielfalt an Aufgaben und Funktionen:

1. Fimbrin und Villin, deren Aufgabe in der Bündelung der Aktinfilamente liegt.
2. Profilin übernimmt die Wachstumskontrolle der Aktinfilamente.
3. Vinculin und α -Aktinin sorgen für eine Verknüpfung der Aktinfilamente an der Zellmembran.
4. Spektrin und Ankyrinübernehmen die Befestigung der Aktinfilamente an der Zellmembran.
5. Cofilin ermöglicht die Beschleunigung des Abbaus von F-Aktin.

1.5.3.1. ADF/ Cofilin

Das Cofilin ist mit ungefähr 19kDa ein kleines Eiweiß, das in der Lage ist, Aktin Filamente und Monomere, sowohl F-Aktin als auch G-Aktin, zu binden (Wang, 2007) bzw. abzubauen. Es ist mit 70% Sequenzübereinstimmung der ADF und der Familie ADF/Cofilin zugehörig (McGough, 1997).

Erstmals wurden die Aktin-bindenden Proteine der Aktindepolymerisierender Faktor/Cofilin-Familie vor dreißig Jahren beschrieben. ADF/Cofilin sind Regulatoren der Aktindynamik in den normalen Zellen. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass in zellulären Stresssituationen der Cofilin-Wildtyp Komplexe mit Aktin bilden kann, die wiederum die Zellfunktion beeinflussen können. (Bamburg, 2012).

Es existieren drei Gene, das

1. CFL 1, welches Cofilin 1 kodiert (Nicht-Muskel-Cofilin).
2. CFL 2, welches Cofilin 2 kodiert (im Muskel vorkommendes Cofilin) und
3. DSTN, welches Destrin/ADF kodiert.

Der Cofilin-Signalweg entpuppte sich als Schlüsselrolle in der Bildung von freien Aktin Filamenten als Ergebnis einer Aktin-Formung durch Polymerisation bzw. Depolymerisation. Diese Filamentmodellierung wird essentiell während der Formation der wegfindenden Strukturen und wird für die Chemotaxis, die Zelleinwanderung und die Tumorzellinvasion verwendet.

Zudem ist die Aktivität des Cofilins in bösartige, invasive Eigenschaften von Tumorzellen verwickelt. Die Wirkung von ADF/Cofilin in der Aktindynamik sind unterschiedlich, ihre Regulation sehr komplex und in dieser Komplexität noch nicht vollständig erforscht.

In Tumorzellen von GBMs konnte allerdings bewiesen werden, dass die Beweglichkeit der Tumorzellen von der intrazellulären Cofilin-Expression auf konzentrationsabhängige Weise reguliert wird (Celestial, 2005), denn das invasive Verhalten der Tumorzellen wurde zeitweise der dysregulierten Zellorganisation zugeschrieben. Eine Reduktion von Cofilin in Gliom-Zellkulturen geht mit einem erhöhten Ansprechen auf Strahlentherapie einher (Du, 2015). In Transkriptionsstudien von Glioblastomen konnte gezeigt werden, dass Bestandteile der Cofilin-Signalkaskade aufreguliert sind. Bei den Mamma-Karzinomen, unter Miteinbezug des Cofilin-Signalweges, zeigen neuere Erkenntnisse, dass die Metastasierungseigenschaft ein angeborenes und nicht später erworbenes Ereignis darstellt (Park, 2014). Ebenso konnte regelmäßig

ein Muster in der Genexpressionsveränderung beobachtet werden, angehäuft im Cofilin-Signalweg von Brusttumoren oder von ihm abtrünnige Zellen (Wang, 2007).

1.6. Ziel und Fragestellung

In der Therapie der Hirntumore stellt die OP mit nachfolgender Radiochemotherapie die Therapie der Wahl dar. Jedoch ist leider oft mit dem diffusen und meist verheerenden infiltrativen Wachstum, durch den Befall angrenzender Strukturen, eine kurative Vollresektion des Tumors nicht im Bereich des Möglichen. Hierdurch steigt die Rezidivrate, welche wiederum einen prognostisch negativen und ungünstigen Faktor darstellt. Insofern sind Aktin-bindende Proteine für die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen von großer Bedeutung.

Da die Datenbasis in der Literatur zur Cofilin- Expression in Hirntumoren sehr spärlich ist (Celestial 2005, Yan 2012), war das Ziel dieser Arbeit der Nachweis bzw. die Analyse der Expressionsverteilung von Cofilin in den einzelnen vorgestellten Tumorentitäten im ZNS sowie die Untersuchung eines eventuell vorhandenen tumorspezifischen Expressionsmusters und den für die Wissenschaft möglichen Nutzen bzw. Gewinn von Cofilin als potentieller Biomarker. Die Analyse erfolgte unter der Verwendung von bereits vorhandenen, sowie der Herstellung von eigenen Tissue Microarrays um eine ausreichende Anzahl von Tumoren studieren zu können.

Die Einteilung und Quantifizierung der Cofilin-Expression soll nach Antikörper-Etablierung anhand einer zuvor festgelegten Intensitätsskala erfolgen.

Weitere Primärziele dieser Arbeit war die Untersuchung hinsichtlich eines möglichen Zusammenhang der Cofilin-Expression mit dem Patientenalter und -geschlecht, der histologischen Tumoreinteilung bzw. dem WHO-Grad der jeweiligen Tumorentität und den unterschiedlichen Lokalisationen der Tumore. Des Weiteren war die Frage zu analysieren, ob Cofilin zukünftig eventuell als prognostischer Malignitätsfaktor in der Diagnostik eingesetzt werden könnte und/oder eine Aussage über die Aggressivität des Tumors und seines Wachstums getroffen werden kann.

2. Patientenauswahl, Material, Methoden und Statistik

2.1. Patientenkollektiv

2.1.1. Zusammensetzung der Patientenauswahl

Die Auswahl der glialen Tumoren-Gewebeproben für die Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs) für die GBMs erfolgte anhand Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe, bei der hirneigene Tumoren bereits tabellarisch zusammengefasst waren (Rauscher, 2012), sowie mittels direkter Suche aus dem digitalen Befundarchiv (pas.net, Nexus AG, Villingen-Schwenningen) des Tübinger Institutes für Pathologie und Neuropathologie. Durch uneingeschränkten Zugriff auf die bereits vorhandenen TMAs der bereits früher untersuchten Tumorentitäten der AAs und der Medulloblastome bestand das Hauptaugenmerk auf der Herstellung neuer TMAs für die GBM-Fälle, um die Fallzahlen in diesem Kollektiv zu erhöhen. Die damit verbundene, bevorstehenden Aufgabe, die richtige bzw. die Aussage bekräftigende Auswahl des Glioblastom-Patientenkollektiv zu treffen, unterlag dabei bestimmten Auswahlkriterien, welche unter 2.1.1.1. beschrieben werden. Die ausgewählten GBM-Gewebeproben wurden in einem Zeitraum der Jahre 2007 bis 2011 entnommen und als formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Blöcke im Tübinger Gewebearchiv verwahrt.

En bloc konnten, unter Einbezug der bereits vorhandenen pseudonymisierten Datensätze, 414 GBM-Fälle ausgewählt werden, von denen 231 Paraffingewebeblöcke bereits einer anderen TMA-Herstellung/Stanze unterzogen worden waren und daher für die aktuelle TMA-Konstruktion ausgeschlossen wurden.

Anhand von vorhandenen Datensätzen, wie Diagnose, WHO Grad, Alter, Geschlecht, Primär- oder Rezidivtumor, Überlebensdaten etc. sowie der visuellen Kontrolle der Tumorblöcke auf ausreichenden Materialgehalt konnte die weitere Auswahl von 92 Fällen für die Eigenherstellung zweier GBM-TMAs getroffen werden.

Somit bestand das Ausgangs- und Untersuchungsmaterial letztlich aus 92 GBM-Fällen zur selbstständigen Herstellung von zwei TMA-Blöcken, wobei in zwei der Patientenfälle statt der üblichen zwei Stenzen vier Stenzen durchgeführt wurden, um die potentielle Heterogenität der Antikörper besser beurteilen bzw. einteilen zu können (siehe 2.2.2).

Die Studienzustimmung bzw. die Befugnisse zur Verwendung der Paraffingewebeblöcke erfolgt durch die Ethikkommission des Tübinger Universitätsklinikums (Nr.573/2011BO)

Zusätzlich konnten die pseudonymisierten Daten aus entsprechenden Vorarbeiten mit bereits auf TMAs gestanzte 81 AAs und 56 Medulloblastome/PNETs in die Gesamttabelle übernommen werden. Sie wurden für diese vorliegende Arbeit ebenfalls noch einer Cofilin-Färbung unterzogen.

Somit lagen für die Cofilinfärbungen und deren statistische Auswertung insgesamt folgende Tumorentitäten vor:

- WHO Grad IV: Für die Tumoren der Gruppe mit WHO Grad IV konnten 314 GBM (75%), 88 Medulloblastome (21%) und 22 PNET (5%) erfasst werden, so dass entsprechend eine Gesamtzahl von 424 Gehirntumoren des WHO Grad IV zur Auswertung vorlag. Die GBM machten damit einen Anteil von 74,1% der bösartigsten Tumorentitäten aus.
- WHO Grad III: Für den WHO Grad III konnte eine Gesamtzahl von 179 Tumoren untersucht werden, wobei 94 anaplastische Astrozytome (52%), 40 anaplastische Oligodendrogliome (22%) und 45 anaplastische Ependymome (25%) erfasst wurden.
- WHO Grad II: Mit einer Gesamtzahl von 211 verkörperten die Oligodendrogliome mit 86 (38,9 %), die Ependymome mit 97 (45,9 %) und die Astrozytome mit 28 (15,2 %) die Tumorfälle mit einem WHO Grad II.

2.1.1.1. Entscheidung zur Aufnahme des Patientenfalls für die Herstellung der TMAs mittels Alter, Geschlecht, WHO-Kriterien, Primär- und Rezidivtumor und histologischem Befund

Der endgültige Entschluss zur Aufnahme eines Falls für den TMA wurde anhand bestimmter Kriterien wie die WHO-Klassifizierung und/oder Primär- und Rezidivtumor und der histopathologischen Diagnosesicherung seitens der Neuropathologen der Universität Tübingen gefasst. Aber auch die Qualität bzw. die Quantität des zu entnehmenden Probematerials aus dem ausgewählten Paraffinblock stellte ein Aufnahmekriterium dar. Anhand der histopathologischen Kontrolle der Gewebeproben wurden nur Fälle mit sicheren Kriterien für ein GBM WHO Grad IV ausgewählt (astrozytäre Tumormorphologie, Vorhandensein von Gefäßproliferaten und/oder Nekrosen). Durch archivarische Recherche wurde im letzten Schritt die Auswahl des Patientenfalls nach Prüfung der Präsenzbestimmter Patientendaten wie populationstypische Verteilung der Tumoren auf beide Geschlechter, typisches Erkrankungsalter (50.-70. Lebensjahr) und Primär- oder Rezidivtumor (maximal 25%), Lokalisation (zerebral), Beobachtungszeitraum (wenn möglich Follow-up länger als 1 Jahr) etc. endgültig getroffen.

Für die neu konstruierte TMA-Stanze wurden 55 Männer und 37 Frauen entsprechend einem Geschlechterverhältnis 1:1,41 ausgewählt, welches der Erkrankungsrelation mit 1:1,26 sehr nahe kommt (Kleihues, 2007).

2.1.1.2. Zusammensetzung der Datensätze

Die verwendeten pseudonymisierten Datensätze setzen sich aus unterschiedlichen Kriterien zusammen wie die genaue histologische Diagnose, welche wiederum in eine Klassifikation und genaue histologische Diagnose unterteilt wurde. Zusätzlich wurden epidemiologische Daten, wie Alter und Geschlecht, sofern nicht vorhanden, in der jeweiligen Spalte nachgetragen.

Der WHO Grad ist der durch World Health Organisation festgelegte Schweregrad des Tumorgewebes und entspricht damit einer histologisch gesicherten Diagnose. Zulässige Werte sind WHO Grad I bis WHO Grad IV.

Die Proliferationsrate (MIB1 Proliferationsindex) wird zwischen 0-100% angegeben und wurde aus der Datentabelle von Rauscher 2012 bzw. aus den Originalbefunden der Fälle entnommen. Der MIB1 Antikörper dient als Proliferationsmarker zur Anfärbung des Proteins Ki67 und wird nukleär exprimiert. Hierzu werden in der Regel mindestens 1000 Zellkerne ausgezählt. Die Aufgabe des Proliferationsindex besteht in der Vorhersage, wie hoch die Zellwachstumsrate ist, d.h. je weniger positive MIB1-positive Zellen desto geringer die Proliferationsrate und damit das Tumorwachstum.

Falls vorhanden, wurden die Untersuchungsdaten von WT1 Protein aus der Routine in eigenen Spalten erfasst. Das Wilms Tumor Protein 1 wurde mit 0 = nicht vorhanden und 1 = vorhanden protokolliert. Des Weiteren wurde in einer separaten Spalte der semiquantitative WT1 Score von 0-4 für die GBMs vermerkt, da dieser einen signifikanten Zusammenhang mit dem Malignitätsgrad bei den Astrozytomen aufweist (Schittenhelm, 2009), wobei Score 0 definitionsgemäß keine WT1-Expression zeigt. Score 1 wurde bei vereinzeltm Auftreten von angefärbten Zellen vergeben, Score 2 bei bis zu 20% positiver WT1-Färbung. Mit dem Score 3 konnte dementsprechend mit 21-50% augenscheinlich erfassbare gefärbte neuronale Zellen belegt werden und Score 4 wurde bei einem über 50%igem Anteil an Zellfärbung vergeben.

Die Protein-p53-Bestimmung wurde in Prozent (0-100%) der nukleär positiven Zellkerne bezogen auf die Gesamtanzahl aller Tumorzellkerne ermittelt. Sowohl ein Mutationsbedingte Inaktivierung von p53 als auch eine anormale p53-Überexpression in GBMs sind beschrieben (Nagpal, 2006). Auch muss erwähnt werden, dass bei einer nachgewiesenen Überexpression von p53 nicht zwingend eine Mutation im p53-Gen vorliegt und stellt somit einen Indikator für das Vorliegen einer Mutation dar. Hauptsächlich wird die Überexpression von p53 als Indikator zur Differenzierung bei Tumoren astrozytären Ursprungs gewertet werden.

Die Bestimmung des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Status wurde aus den Befunden in pas.net erhoben und wurde in U = unmethyliert und M = methyliert festgehalten. Eine molekularpathologische Bestimmung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus erfolgte durch eine methylierungsspezifische PCR an der aus den Tumoren extrahierte DNA (Quillien 2012). Die Hypermethylierung des MGMT bzw. seines Promotors kann ein günstiger Prognosefaktor für das Ansprechen auf die Chemotherapie mit Temozolomid darstellen und ist mit einem längeren Tumorüberleben assoziiert (Hegi, 2005). Mehrere Studien konnten belegen, dass die Resonserate einer chemotherapeutischen Therapie von GBMs, basierend auf DNA-alkylierenden Substanzen, wie beispielsweise Temozolomid, eine Assoziation mit dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors aufweist. Die Ermittlung des MGMT-Promotor- Methylierungsstatus erfolgte durch die Methylierungs-spezifischen PCR (MSP) oder eine Pyrosequenzierung des MGMT-Promotors. Für beide Verfahren werden Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Tumorgewebsproben benötigt.

Der IDH1-Status wurde aus den Befunden in pas.net erhoben und erfolgte anhand einer immunhistochemischen Färbung für die häufigste IDH-Mutation, gefolgt von einer Sequenzierung bei negativem immunhistochemischen Befund und wurde bei den GBM-Fällen und den AAs durchgeführt. Eine Punktmutation auf Codon 132 im IDH1-Gen bei Tumoren mit astrozytärem, oligodendroglialem oderoligoastrozytärem Ursprung sowie sekundären GBM ist in über 70% der Fälle nachweisbar (Hartmann, 2009). Die Punktmutation steht bei den GBMs und AAs in Korrelation mit einer Prognoseverbesserung und einem jüngeren Alter der Patienten (Schittenhelm, 2011). Diese Mutation findet sich jedoch nachweislich nur in ca. 5% der primären GBMs (Yan, 2009). Der IDH1-Status wurde somit definiert mit 0 = negativ und 1 = positiv (Mutation vorhanden).

Weitere Informationen sowohl zu der Tumorlokalisierung, dem Operationstermin, Chemotherapiebeginn und/oder Bestrahlungstherapie als auch dem gesamten

bekanntem Beobachtungszeitraum des Patientenkollektivs wurden anhand des Tübinger Aktenarchivs in Erfahrung gebracht und protokolliert.

Der Censor wurde mit (0) zum letzten Zeitpunkt noch am Leben, bzw. (1) bekannter Todeszeitpunkt kodiert.

Zur Bestimmung von Primärtumoren bzw. Rezidiven(P/R) standen ebenfalls die Informationen aus dem Befundsystem zur Verfügung, gegebenenfalls unterstützt durch eine weitere Recherche in den beteiligten Kliniken (Neurologie/Neurochirurgie).

Die Daten zu „Time to event“ wurden aus den vorhandenen Patientendaten erhoben. Dabei stellte der Operationstermin oder falls nicht bekannt der Eingang der zu untersuchenden Tumorprobe im Neuropathologischen Institut das jeweilige Beginndatum des errechneten Beobachtungszeitraums dar. Das „Date of last seen“ wurde bei bekanntem Todesdatum oder dem letzten vorhanden Patientenkontakt vergeben. Somit konnte ein Zeitraum der errechneten Tage festgestellt werden.

Für den Cofilin Score wurden drei Bestimmungen vorgenommen: die maschinell bestimmte Cofilinbestimmung, die visuelle Einteilung in Cofilin Score 0-3 durch zwei Beobachter sowie der daraus bestimmte Cofilin Mittelwert. Eine detaillierte Beschreibung dieser Datenerhebungen findet sich unter dem Punkt „Auswertung“.

Für die Kaplan-Maier-Überlebensanalyse wurde aus den Cofilin Mittelwerten ein neuer Datensatz mit high-expressers und low-expressers erstellt. Die Werte für die low-expressers wurden definiert von Cofilin Score 0 bis 1,9, ab einem Cofilin Score von 2,0 bis 3,0 wurde ein high-expresser vergeben.

2.2. Material & Methoden

2.2.1. Herstellung der Paraffinblöcke

Nach der operativen Gewebeentnahme wurden die vom Operateur entnommenen Präparate zur Konservierung in Formalin (4%) fixiert. Nach mindestens zwölf Stunden Fixierung konnte mittels einer Alkoholreihe mit aufsteigendem Alkoholgehalt von zweimal 70%, 80% und 95% eine Entwässerung vorgenommen werden, die mit einem Chloroform-Alkoholgemisch (100%) nochmals verbessert wurde. Nun konnte eine Paraffineinbettung der Gewebeproben erfolgen, durch die ein Gewebeblock entsteht.

2.2.2. Herstellung der Paraffinschnitte

Mit dem zur Verfügung stehenden Mikrotom HM 355 S (Walldorf, Deutschland) konnten im nächsten Schritt vom Paraffinblock mit einer Dicke von 3 µm Schnitte hergestellt werden, welche daraufhin auf leere Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen wurden. Als weitere Maßnahme erfolgte eine Trocknung im Wärmeschrank mit 55°C.

Bevor die histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgen konnten, war eine Entparaffinierung der Schnitte notwendig, die gewöhnlicher Weise in den Färbemaschinen automatisiert stattfindet.

Es wurden bei den Anfärbungen sogenannte Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt, um die Qualität und Spezifität der Färbeverfahren kontrollieren zu können.

2.2.3. HE-Routinefärbung

Um eine Haematoxylin-Eosin-Färbung durchführen zu können, werden folgende Materialien benötigt:

- Aqua dest.

- 70%, 96% und 100% Ethanol
- Xylol (3 unterschiedlich hoch dosierte Xylollösungen)
- Mayers Hämalaunlösung
- 0,1% wässriges Erythrosin B
- Deckglasfixierung mit HICO-MIC/Eukitt

Die Haematoxylin-Eosin-Färbung gehört heute zu den gebräuchlichsten Standard- und Übersichtsfärbungen in der Pathologie. Ihre Aufgabe besteht darin, das vom Patienten entnommene suspekta Gewebe in Hinblick auf z.B. den Differenzierungsgrad der Probe oder auch zelluläre Strukturen genauer interpretieren zu können. Doch im ersten Arbeitsschritt der Färbemethode sollte eine Entparaffinierung der Schnitte erfolgen. Hierzu wird zunächst eine Spülung mit Aqua dest. durchgeführt, in einer aufsteigenden Ethanol-Waschstraße mit 70%, 96% und zweimaliger 100%iger Alkohollösung für fünf Minuten belassen, um dann eine Weiterbehandlung in drei unterschiedlich hoch dosierten Xylollösungen mit einer Bearbeitungszeit von jeweils zehn Minuten. Nun ist die Entparaffinierung erfolgt und die Schnitte verbringen zur Kernfärbung eine Minute in Haematoxylin-Lösung, um daraufhin zehn Minuten ausgewaschen zu werden. Die Gegenfärbung mit 0,1% Erythrosin B- Lösung über eine Einwirkzeit von einer Minute, die Entwässerung in der Ethanol und Xylolstrasse und die Deckglasfixierung mit HICO-MIC/Eukitt stellen die letzten Arbeitsschritte dieser Färbemethode dar. Nach erfolgter Färbung mit dem Farbstoff Hämatoxylin und im zweiten Schritt mit Erythrosin B ist eine explizite Unterscheidung von morphologischen Gewebeanteilen möglich.

2.2.4. Tissue Microarray

2.2.4.1. Technik und Herstellung

Die Tissue Microarray Technik wurde in den 1990er Jahren mit dem Ziel entwickelt, eine weniger zeitintensive und billigere Methode zur Hand zu haben, um die sehr zeitaufwendigen Gewebeuntersuchungen mit In-situ-Methoden, wie FISH, umgehen zu können und somit eine effiziente Darstellung, Bearbeitung

und Interpretation einer großen Anzahl von Tumoren zu ermöglichen. (Kononen, 1998).

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Tissue Microarrays von GBMs angefertigt. Um eine bestmögliche Auswahl an Materialien bzw. Tumorgewebe zu treffen, wurde durch eine lichtmikroskopische Beurteilung bei bereits vorhandenen HE-Schnitten von GBM-Patienten eine Vorauswahl des zu übertragenden Tumorareals getroffen.

Um die tumorzellreichen Bereiche zu einem späteren Zeitpunkt auf dem Objektträger wieder zu erkennen, wurde eine Markierung auf selbigen durchgeführt. Im nächsten Schritt konnte somit die gewünschte Stanze aus dem zur Verfügung stehenden Donorblock durch die vorhandene Markierung übertragen und auf selbigem markiert werden. Für den ersten TMA-Block wurden 98 Stenzen durchgeführt, für den 2. Block neunzig Stenzen.

Für die TMA-Herstellung wurde der Manual Tissue Microarrayer (Model MTA-1 der Firma Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA) und zwei neue Paraffinblöcke ohne Luftschlüsse verwendet.

Zur Herstellung der TMAs wurde nach der Methode von Kononen (Kononen, 1998) im ersten Arbeitsgang eine kleine Lochstanze mit 10 mm Durchmesser durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Gewebeentnahme bzw. Gewebestanze aus dem Tumor-Donorblock und als letzter Arbeitsschritt konnte die Füllung der leeren Lochstanze auf dem Akzeptorblock mit dem Stanzzylinder erfolgen. Somit entstand, in einem Abstand von 2mm zur nächsten Gewebestanze, durch Wiederholung der einzelnen Arbeitsschritte der TMA-Block.

Um ein möglichst exaktes Stanzen der Löcher und genaues Einbringen der Tumorgewebeproben zu gewährleisten, wurden nachjustierbare Mikrometerschrauben des Manual Tissue Microarrayer eingesetzt, die zur Fixierung des Akzeptorblocks erforderlich waren.

Um die minimalen Hohlräume zwischen den Lochstanzen und den eingebrachten Gewebestenzen zu versiegeln, wurden die TMAs im Brutschrank bei 39°C für 5 Minuten erwärmt und gleich nach Entnahme aus dem Brutschrank mit einem Objektträger gerade und glatt gedrückt um ein

Herausgleiten der Gewebestanden beim Schneiden mit dem Mikrotom zu verhindern (Schwab, 2011).

2.2.5. Immunhistochemie

2.2.5.1. Theorie und Bedeutung

Mit der Immunhistochemie hat sich ein Verfahren zur Sichtbarmachung bzw. Darstellung und zum Nachweis von bestimmten Antigenen im histologischen Präparat etabliert. Antigene Strukturen können sowohl ubiquitär als auch spezifisch für bestimmte Reifestadien auf Zelloberflächen bzw. im Zellkompartiment auftreten, so dass das immunhistochemische Verfahren eine Zuweisung der detektierten Signale zu bestimmten Zellen erlaubt.

Dazu werden die Antikörper auf die Schnittpräparate aufgebracht, die nun bestimmte Areale auf der Antigenoberfläche, sogenannte Epitope, erkennen. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion ist sehr anfällig, so dass Inkubationszeit, Temperatur, Konzentration oder der pH-Wert konstant gehalten werden müssen.

Bei dem Primärantikörper spricht man von dem Antikörper, welcher eine starke Bindung mit dem gesuchten Epitop eingeht. Ganz allgemein werden die Antikörper gebundener Marker dazu benutzt, das Epitop des Antigens darzustellen und erkennbar zu machen. Diese Marker können farbstoffgekoppelte Enzyme, Radionuklide oder auch Edelmetalle sein. Handelt es sich bei dem Antikörper-Marker um einen Fluoreszenzfarbstoff, wird das Verfahren auch Immunfluoreszenz genannt.

2.2.5.2. Prinzip der immunhistochemischen Färbungen

In den Färbemethoden haben sich weitgehend zwei Vorgehen zur Detektion bewährt.

Die Direkte Methode

Bei der sogenannten Direkten Methode wird der Primärantikörper direkt

markiert, dieser bindet sich an das Antigen im Zielgewebe und spürt es somit auf. Der Vorteil dieser Methode besteht in dem zeitsparenden Aspekt des Vorgehens sowie der Tatsache, dass nur ein Antikörper von Nöten ist und selten unspezifische Bindungen eingegangen werden. Voraussetzung hierbei ist jedoch das ausreichende Vorhandensein von Antigenen.

Die Indirekte Methode

Bei dem indirekten Vorgehen wird das Antigen von einem nicht markierten Antikörper einer anderen Spezies (üblicherweise Maus oder Kaninchen) gebunden, im Folgenden von einem zweiten speziesspezifischen, aber dann markiertem Antikörper gebunden und dient somit der Antigendetektion.

Vorteil bei dieser Herangehensweise ist das notwendige Vorhandensein von nur einem markierten Antikörper, was eine Kostensenkung bedeutet, jedoch sind hier oft unspezifische Bindungen zu beobachten.

Bei einer geringen Anzahl an Epitopen und einer damit resultierenden Signalschwächung kann die sogenannte dreistufige Methode angewendet werden, die einen dritten, auch markierten Antikörper zufügt, welcher an den sekundären Antikörper bindet und dadurch eine Signalverstärkung erreicht. Diese Methode ist heute zugunsten spezieller Amplifikationsschritte mittels Polymeren in den Hintergrund getreten.

Avidin/Streptavidin-Methode

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte Avidin/Streptavidin-Biotin-Methode angewandt, welche sowohl in der Biochemie als auch in der Immunologie und Molekularbiologie eine breite Anwendung findet. Streptavidin wird dabei aus einer Bakterienspezies des *Streptomyces avidinii* gewonnen, einem Protein, welches aus vier Untereinheiten besteht (Hassan, 2006). An jede dieser vier Untereinheiten bindet ein Vitaminmolekül des Biotins mit sehr hoher Bindungskraft bzw. Affinität. Das Biotin, oder Vitamin H oder B₇, stellt einen wichtigen Cofaktor bzw. -enzym in Hinblick auf Eiweiß-, Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel dar, da dieses für die Funktion der Carboxylase-Enzyme unersetzbar ist.

PAP-Methode

Zur Vervollständigung soll an dieser Stelle noch die sogenannte die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode kurz erwähnt und vorgestellt werden. Die PAP-Methode findet in der heutigen Immunhistochemie seltener Anwendung, stellte jedoch früher die Methode 1. Wahl dar. Bei dieser indirekten Methode bindet ein unkonjugierter AK an eine antigene Determinante, woraufhin ein Sekundärantikörper an den primären AK bindet. Der PAP-Komplex, bestehend aus Peroxidase und einem AK, welcher wiederum gegen die Peroxidase gerichtet ist, und einem Maus-AK als tertiärer AK, der nun gegen Kaninchen gerichtet ist, bindet folgend an den sekundären AK.

2.2.5.3. Verwendete Materialien der Immunhistochemie

Zunächst erfolgt eine Nennung des für diese Arbeit verwendeten Antikörpers, welcher für die immunhistochemischen Färbungen notwendig war, sowie eine Auflistung der erforderlichen Substanzen.

Antikörper

Zur immunhistochemischen Färbung der Präparate wurde folgender Cofilin-Antikörper als Primärantikörper benutzt:

- Anti-Cofilin antibody
Klon: AB42824
Spezifität: polyklonaler anti-human Antikörper
Herkunft: Kaninchen
Verdünnung: 1:1000
Reagiert mit: Ratte und Mensch
Quelle: ab42824, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Aliquotiert und gelagert bei -20°C

Die zuvor bestellten Antikörper wurden zunächst einer Testreihe unterzogen, die sich durch eine Verdünnung von 1:1000 durch ein kontrastreiches Signal ohne störende Hintergrundfärbung auszeichnete. Da hierbei auch die

Färbeintensität des Präparates am erfolgreichsten erreicht wurde, wurde diese Verdünnung für alle weiteren Proben so titiert.

Substanzen für Immunhistochemie

Folgende Substanzen wurden für die immunhistochemischen Färbungen in den Ventana-Färbeautomaten verwendet (alle von Ventana, Strassbourg, France):

- EZPrep CC Volume Adjust,
- Cell Conditioner Nr.1
- I-VIEW INHIBITOR
- BLOCKER A (Avidin (Hühnereiweiß))
- BLOCKER B (Freies Biotin)
- I-VIEW BIOTIN Ig: Sekundärer biotinylierter Ig-Antikörper, affinitätsgereinigtes Ziege-Anti-Maus IgG und IgM sowie Ziege-Anti-Kaninchen IgG, jeweils <200yg/ml in einem Phosphatpuffer mit einem Konservierungsstoff.
- I-VIEW SA-HRP: Konjugierte Meerrettich-Peroxidase-Lösung mit einem Proteinstabilisator und einem Konservierungsstoff.
- I-VIEW DAB: Diaminbenzidin, 2g/l in stabilisierender Lösung mit einem Konservierungsstoff.
- I-VIEW H₂O₂ 0,04 bis 0.08% Wasserstoffperoxid in einer stabilisierenden Lösung I.
- I-VIEW COPPER Kupfersulfat 5g/l in einer Pufferlösung mit einem Konservierungsstoff.
- COUNTERSTAIN 1: Hämaalaun zur Gegenfärbung der Zellkerne .

2.2.5.4. Immunhistochemische Färbungen der TMAs mittels der Ventana-Automaten mit dem iView-Verfahren

Um eine Entparaffinierung der am Mikrotom hergestellten Schnitte zu erreichen, erfolgte zunächst im Ventana-Automaten ein Aufheizen des Objektträgers bis

75°C, eine darauffolgende Inkubation von vier Minuten, daraufhin die Zugabe einer Pufferlösung (EZ Prep Vol.) zur Optimierung des pH-Wertes und eine erneute Inkubation von vier Minuten mit anschließender Waschung des Präparates. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Erhitzens, Inkubierens und Waschens fand eine Erhitzung auf 76°C statt mit einem Ausgleich des Deparaffinierungsvolumens und dem Aufbringen eines Coverslips zum Flüssigkeitsausgleich. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur für zwei Minuten auf 42°C erhöht.

Nun wurde ein EDTA-Puffer (Cell Conditioner Nr.1) gemeinsam mit dem Coverslip auf den gewaschenen Objektträger aufgetragen, gefolgt von einer weiteren Inkubation, diesmal für acht Minuten bei 95°C, wobei dieser Arbeitsschritt noch zweimal wiederholt wurde. Der EDTA-Puffer dient der Antigen-Demaskierung, da die Gewebefixierung mit Formaldehyd die Antigenität des Gewebes herabsetzt.

Im nächsten Schritt wurde eine weitere 4-minütige Inkubation durchgeführt mit Auftragung des Coverslips.

Schließlich wurde noch viermalig Cell Conditioner Nr.1 mit jeweils anschließender Inkubation von vier Minuten aufgetragen, um dann wieder EZPrep CC Volume Adjust hinzuzufügen, erneut Cell Conditioner Nr.1 aufzutragen und die Inkubation und Waschung auszuführen.

Nach erfolgter Waschung wurde ein Tropfen I-VIEW INHIBITOR hinzugefügt, es erfolgte eine erneute Waschung und darauf folgend eine Volumen Anpassung.

Per Handauftrag mittels Pipette erfolgte dann das Hinzufügen des Primärantikörpers (100µl verdünnte Lösung) mit anschließender 32-minütiger Inkubation.

Es erfolgte nun ein Tropfen BLOCKER A, eine Waschung und Volumen Anpassung, des Weiteren ein Tropfen BLOCKER B mit vierminütiger Inkubation. Als biotinylierter Sekundärantikörper wurde ein Tropfen I-VIEW BIOTIN Ig hinzugefügt und acht Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Objektträger zweimalig gewaschen, um daraufhin mit einem Tropfen I-VIEW SA-HRP weiterbehandelt zu werden. Nach weiteren Waschungen wurden

jeweils ein Tropfen I-VIEW DAB und ein Tropfen I-VIEW H₂O₂, hinzugefügt. Nun konnte ein Tropfen I-VIEW COPPER, eine Inkubation und Waschung plus Coverslip und die Zugabe von einem Tropfen COUNTERSTAIN 1 erfolgen. Dies stellt die Gegenfärbung dar. Als letzten Arbeitsschritt im Automaten erfolgt eine letzte Waschung des Objektträgers, um zusätzlich von Hand unter fließendem Wasser gereinigt zu werden. Um das überschüssige Wasser zu entziehen, erfolgte eine Waschung in aufsteigender Alkoholstrasse und Xylol. Wie bereits erwähnt, wurde die Spezifität der Methode auch bei den Färbungen mittels der Ventana-Automaten durch Negativ- und eine Positivkontrolle überprüft.

Negativ- und Positivkontrolle

Als Negativkontrolle wurde Skelettmuskel, als Positivkontrolle eine Her2/neu positive zerebelläre Metastase eines Mammakarzinoms nach Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.

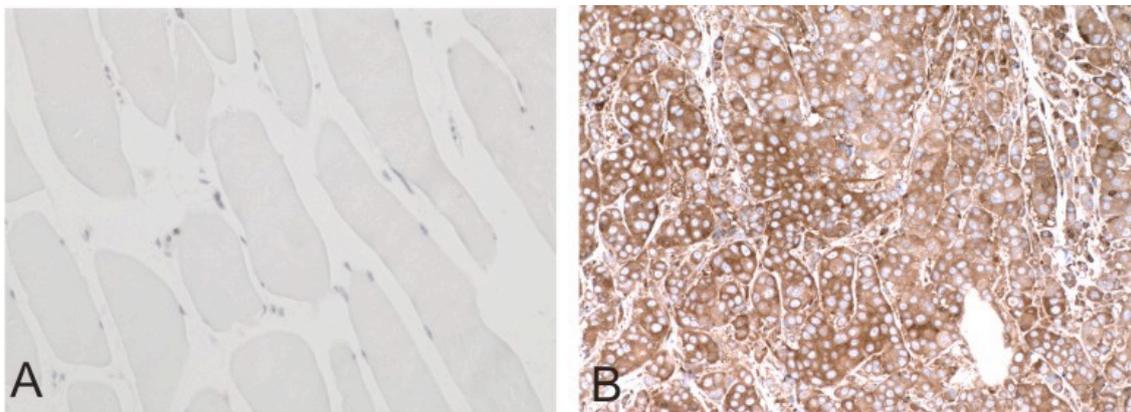


Abbildung 9: Immunhistochemie. Negativkontrolle (A): Skelettmuskulatur, Positivkontrolle (B): Mammakarzinom mit kräftiger Expression von Cofilin (Score 3).

2.2.6. Lichtmikroskopische Beurteilung und automatische Bildanalyse

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen auf den hergestellten TMAs konnten anhand des Lichtmikroskops Olympus-VANOX-AHBT3-Lichtmikroskop (Hamburg, Deutschland) erfasst werden. Die Stenzen wurden dabei in zweifacher, zehnfacher oder zwanzigfacher Vergrößerung begutachtet und fallweise ausgewertet.

Durch die lasergesteuerte Digitalkamera ProgRes10, Jenoptik (Jena, Deutschland) erfolgten mit einer Auflösung von fünf Megapixel die Aufnahmen der in dieser Arbeit gezeigten Fotografien.

Zur Bilderbearbeitung wurde die Bilddatenbank Image Access (Glattbrugg, Schweiz) zu Hilfe genommen, um eventuelle Nachkontrastierungen oder Farb- und Helligkeitsnuancen zu verfeinern. Die Speicherung der in Eigenproduktion angefertigten Fotos erfolgte als JPEG- Dateien nach erfolgter Nach- bzw. Aufbesserung.

Eine Festlegung der vierstufigen Cofilin Scores fand anhand der visuellen Beurteilung der Färbungsintensität bzw. -homogenität entsprechend dem in der Pathologie häufig verwendeten Quickscore (Detre, 1995) statt. Somit konnte bei einer kräftigen homogenen Färbung des Präparates ein Cofilin Score von 3, bei mäßiger Färbung ein Cofilin Score von 2 und bei nur leichter Präparate-Anfärbung ein Cofilin Score von 1 vergeben werden. Bei heterogenen Proben mit gleich verteilter, fokal starker und fokal schwacher Expression wurde der Cofilin Score 2 vergeben.

Um eine bessere und qualitativ höhere Reproduzierbarkeit bzw. Objektivität zu erreichen, wurden zwei Observer eingesetzt, die unabhängig voneinander die visuelle Einteilung der histologischen Cofilin Scores vornahmen, ohne Kenntnisse von pseudonymisierten Tumoren, um keiner Beeinflussung zu unterliegen. Diese zwei Observer waren zum einen die Verfasserin dieser Arbeit sowie ihr Doktorvater, OA Prof. Dr. Jens Schittenhelm, Neuropathologe an der Universität Tübingen. Daraus folgernd wurde ein Cofilin Mittelwert für jeden einzelnen Fall bestimmt. Tabellarisch wurden zum Teil auch Dezimalwerte von 0,5 oder auch 1,5 dokumentiert, welche dadurch zustande kamen, dass von jedem Patientenfall zwei Stenzen angefertigt wurden und diese teilweise verschiedene Färbungsintensitäten erkennen ließen. Somit ergab sich bei einem Fall mit Cofilin Score 1 in der ersten und Cofilin Score 2 in der anderen Stanze ein Mittelwert von 1,5.

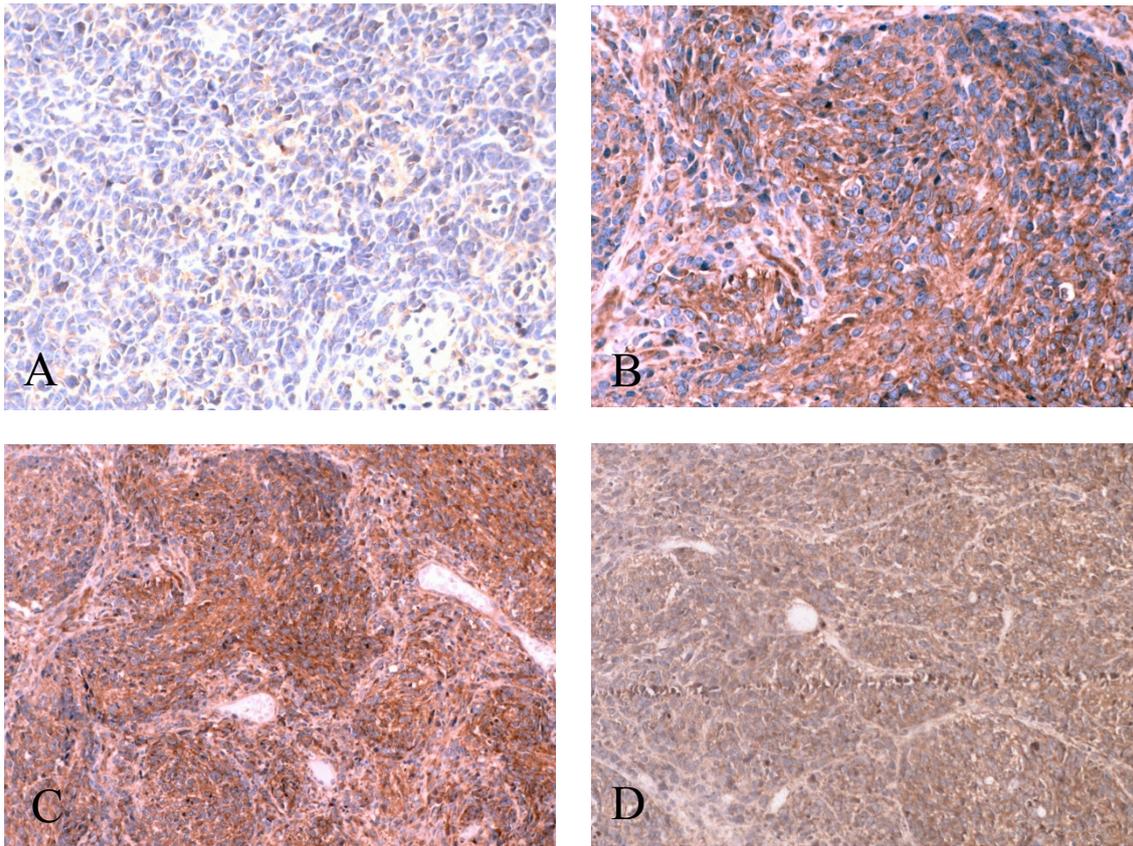


Abbildung 10: Immunhistochemie. Beispielpräparate zur Visualisierung der verschiedenen Cofilin Scores 1-3; Cofilin Score 1 (A) Cofilin-Score 2 (B) Cofilin Score 3 (C) Cofilin Score 3 (D).

2.2.6.1. Einscannen der Slides und maschinelle Auswertung der TMAs

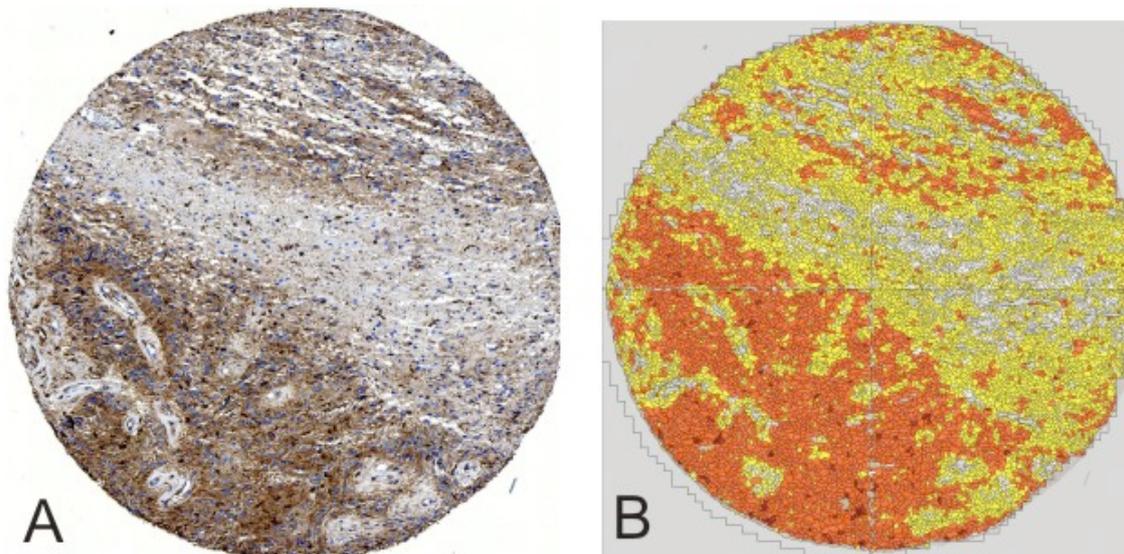


Abbildung 11: Immunhistochemie für Cofilin auf einer TMA-Stanze eines Glioblastoms (A). Korrespondierendes Auswertungsbild durch Definiens Tissue Studio (B): Weiße Areale wurden bei der maschinellen Auswertung als negativ (Score 0), gelbe als schwach positiv (Score 1), orangene Felder als mäßig positiv (Score 2) und weinrote Felder als stark positiv (Score 3) ausgewertet.

Parallel zur manuellen Auswertung wurden die Schnitte zur Erfassung der Heterogenität einer weiteren quantitativen Auswertung der Anfärbungen mit Hilfe des Programmes Definiens Architect XD 1.2 (Parsippany, New Jersey, USA) unterzogen. Für diese maschinelle Auswertung der TMA-Slides erfolgte zunächst ein Einscannen der TMA-Schnitte im Pathologischen Institut Tübingen mit einem Mirax Scanner (Firma Zeiss, Deutschland). Die digitalen Daten konnten im nächsten Schritt auf einer externen Festplatte gespeichert und gesichert werden, um von dort aus an eine Workstation im Neuropathologischen Institut Tübingen transferiert in das Computerprogramm importiert zu werden.

Diese Bearbeitung erfolgte manuell, die nachfolgende, durch benutzerdefinierte Einstellungen vorgenommene Auswertung der selbsthergestellten TMAs beanspruchte aufgrund der großen Datenmenge mehrere Stunden. In der Regel lagen die Datensätze am nächsten Tag vor und wurden für die statistische Weiterbearbeitung in Excel exportiert.

Hierbei erfolgte eine Zuordnung mithilfe einer Rastereinstellung der gescannten TMAs, um so die Position der einzelnen auszuwertenden und zu

untersuchenden Stenzen zu koordinieren. Der Software wurde an dieser Stelle eine individuelle Benutzereinstellung zur Auswertung vorgegeben. Unter Anderem wurden die Kriterien „Cell Classification“, „Initialize Cellular Analysis“ und „Membranes and cells“ eingestellt. Beispielsweise wurden bei der „Cell Classification“ Grenz- bzw. Schwellenwerte im Sinne einer Kalibrierung für die verschiedenen Stufen der Färbeintensitäten der Stenzen festgelegt, so dass bei der Auswertungen die Färbestufen nicht gefärbt, schwach gefärbt, mittelmäßig gefärbt und stark homogen gefärbt entsprechend der Cofilinscores 0-3 von der manuellen Auswertung erfasst werden konnten. Durch „Membranes and cells“ erfolgte maschinell die Definierung von Zellstrukturen innerhalb des Gewebes. Anhand der Software Definiens Architect XD 1.2 wurde im nächsten Schritt der sogenannte „Histoscore“ für die statistische Auswertung der Slides benutzt. Die Berechnung des „Histoscores“ wird als die Summe der Prozentzahl der gefärbten Zellen definiert, wobei hier die schwach gefärbten Zellen einen einfachen Prozentsatz, die mäßig gefärbten Zellen einen zweifachen und die stark gefärbten Zellen einen dreifachen Prozentsatz erhalten. Somit würde sich ein Maximalwert von 300 bei stark homogener Färbung ergeben. Diese Methode wurde bereits in Vorarbeiten erfolgreich validiert (Schittenhelm, 2013).

2.3. Statistik

2.3.1. Allgemeine Statistik

Die Durchführung und damit verbundenen Auswertung der statistischen Analyse erfolgte mit Hilfe von JMP 9.0 (SAS Institute INC, Cary, NC, USA). Die Darstellung der einzelnen Werte erfolgte graphisch mittels Verteilungstabellen (Excel, Microsoft, Redmond, USA).

2.3.2. Korrelationsanalysen

Für die Korrelationen des manuell erhobenen Cofilin Scores bzw. der computerermittelten HistoScores mit dem Alter, der Proliferationsrate (MIB-1) und der nukleären Expression von p53 wurden univariate Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Die Vergleiche der einzelnen Mittelwerte dieser Gruppen erfolgten mit dem Student-t Test. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.

Für die Korrelationen des Cofilin Scores mit Geschlecht, Tumorlokalisation, IDH1-Mutationsstatus, MGMT-Methylierungsstatus, dem Primär- bzw. Rezidivtumorstatus bei den einzelnen Entitäten wurde die Statistik anhand von Kontingenztafeln und Pearson's Chi quadrat Test durchgeführt. Die Übereinstimmung der Interrater-Reliabilität zwischen beiden Auswertern wurde mit Hilfe der Methode von Cohens' Kappa durchgeführt (Cohen, 1960).

2.3.3. Überlebensanalysen

Die Überlebensanalysen erfolgten mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan, 1958). Hierzu wurden die manuellen Cofilindaten anhand der Färbeintensität in schwach exprimierende (Cofilin Score 0 bis 1.9 kombiniert) und in stark exprimierende Tumoren (Score 2.0 bis 3.0 kombiniert) aufgeteilt.

3. Auswertung und Ergebnis

Es konnten erfolgreich TMA Blöcke mit vitalem Tumorgewebe hergestellt werden. Für die hier vorliegende Arbeit wurden 188 HE-gefärbte Objektträger mit zuvor histopathologisch gesichertem Tumorgewebe mit Glioblastomen WHO Grad IV untersucht und die korrespondierenden Paraffinblöcke zur Herstellung von zwei TMA-Blöcken verwendet. Für den ersten TMA-Block wurden 98 Stenzen mit vitalen Tumoranteilen angefertigt, für den zweiten Block neunzig Stenzen.

Um die Qualität der diagnostisch gesicherten Tumoren bzw. die Heterogenität der Tumoren überprüfen zu können, wurden in vier Fällen statt der üblichen zwei Probestanzen vier Stenzen von einem Tumor hergestellt.

3.1. Manuelle Auswertung der Cofilin Expression

Die Auswertung der Präparatefärbungen mit Cofilin erfolgte, wie bereits beschrieben, mikroskopisch visuell (n= 541) und maschinell segmentbasiert (n=504). Bei der Begutachtung der Färbungen ließ sich erkennen, dass es sich um zytoplasmatische Expressionen der Proteine in den Tumorparenchym handelt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Zellkerne keine Färbung erfuhren, die Tumorgefäßproliferate dagegen ebenfalls mit dem Zytoplasma durch das Cofilin, den Antikörper, angefärbt waren. Von allen Tumorentitäten zusammen war in 83 Fällen keine Expression nachweisbar, entsprechend einem Cofilin Score von 0, was einem Prozentsatz von 15,34% bei einer Gesamtfallzahl von n=541 entspricht. Somit konnten von 541 untersuchten Proben 458 als positiv (Score 1 oder höher) bewertet werden (Tabelle 3).

	COFILIN SCORE							Fallzahl n
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	
GBM	22	14	72	26	98	17	25	n= 278
AA	5	2	16	2	31	3	13	n= 72
Astrozytom	28	2	29	2	11	0	2	n=74
Medulloblastome	19	2	23	8	13	0	5	n= 70
Ependymome	7	5	12	5	3	0	0	n= 32
PNET	2	0	3	3	1	3	3	n= 15

Tabelle 3: Auflistung der Cofilin Scores der manuellen Auswertung von immunhistochemischen Färbungen nach Tumorentitäten.

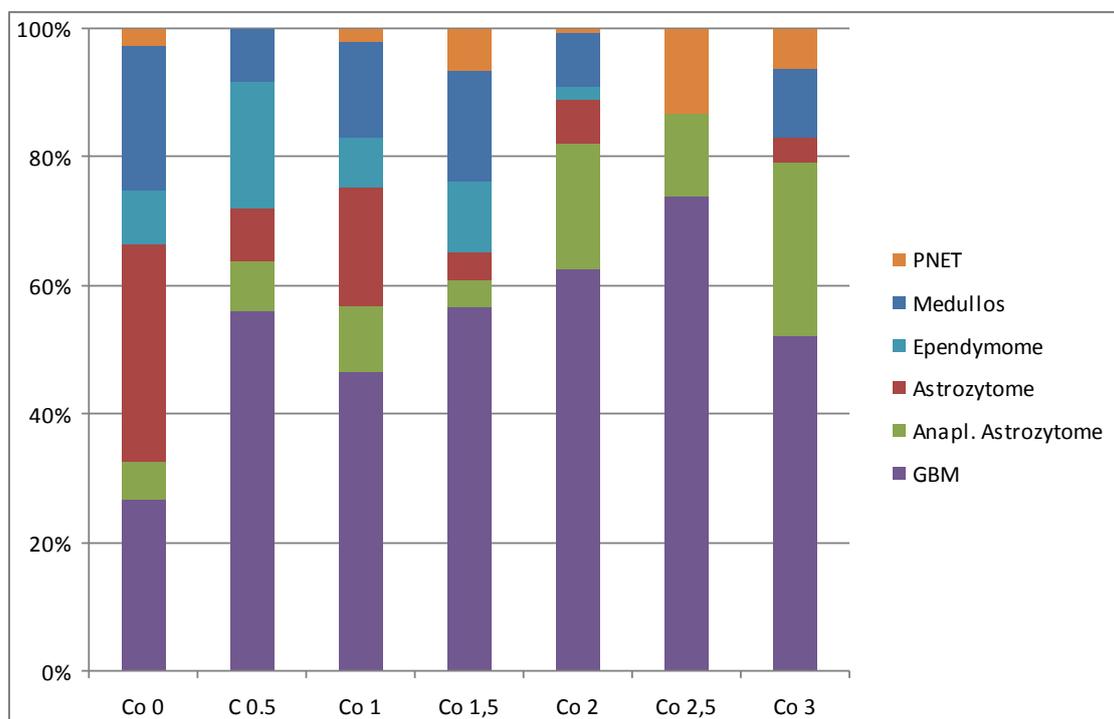


Diagramm 1: Verteilung der Cofilin Scores in den einzelnen Tumorentitäten.

Im Folgenden werden die jeweiligen erstellten Daten und Analysen vorgestellt, um dann mit den Cofilin Mittelwerten interpretiert und analytisch besprochen zu werden.

3.1.1 Einfaktorielle Analysen der Cofilin Mittelwerte und dem Geschlecht und Alter

3.1.1.1. Allgemeine Alters- und Geschlechtsverteilung in den verschiedenen Tumorentitäten und den WHO Graden I bis IV

Das Alterskollektiv zum Zeitpunkt der Diagnose wurde wie folgt ausgewählt:

In der allgemeinen Altersstatistik ohne Berücksichtigung der Tumorentität konnte den männlichen Patientenproben mit $n=268$ eine Erkrankungsaltersspanne vom 1. bis zum 82. Lebensjahr verzeichnet werden. Bei den Frauen mit $n=182$ erkrankte die jüngste Patientin mit zwei Jahren, 88 Jahre stellte das höchste Erstdiagnosealter dar. Details hierzu finden sich in Tabelle 4.

Bei den altersdokumentierten 154 GBM-Patientenfällen mit einem Geschlechterverhältnis M:F: 92:62 = 1,5:1 erkrankte der jüngste Patient mit zwanzig Jahren, der älteste mit 88 Jahren. Im Gegensatz zu den anderen Tumorentitäten zeigte sich eine Signifikanz im Geschlechterverhältnis ($p<.0001$). Die männlichen Proben zeigten mit $n=154$ ein mittleres Erkrankungsalter von 56,9 Jahren (95%-es KI 54,8-59,0 Jahre), die Frauen mit $n=101$ ein mittleres Alter von 64,2 Jahren (95%-iges KI 64,2-66,9 Jahre). Somit konnte die Aussage getroffen werden, dass in dem vorliegenden Kollektiv Männer signifikant früher an einem GBM erkranken als Frauen.

Von den AA-Fällen wurden 88 Patientenproben mit einem Geschlechterverhältnis von M:F=1,6:1 in die Statistik aufgenommen. Die gemeinsame Erkrankungsaltersspanne der AAs erstreckte sich von 19 bis 76 Jahren. Bei den ausgewerteten 54 männlichen Fällen wurde ein mittleres Erkrankungsalter von 45,4 Jahren, bei den Frauen von 48,4 Jahren ermittelt werden. Es fanden sich keine signifikanten Altersunterschiede zwischen den Geschlechtern.

Zu den 86 Medulloblastom-Patienten mit einer Geschlechterverteilung von M:F=1,9:1 konnte eine hohe Alterserkrankungsspanne erfasst werden; der jüngste Medulloblastom-Patient erkrankte mit lediglich einem Lebensjahr, der älteste Patientenfall mit Medulloblastom wurde mit 70 Jahren diagnostiziert.

Von den zwanzig PNET-Patientenproben betrug das älteste Erkrankungsalter 78 Jahre, der jüngste PNET-Patient war mit gerade mal drei Jahren erkrankt. Für die Geschlechterverteilung konnten zwei weibliche und 18 männliche PNET-Stanzen in die Berechnung einbezogen werden, so dass sich ein Geschlechterverhältnis M:F : 18:2 = 9:1 ergab.

	Alter (Mean(Range))	Anzahl Stanzen N (total / Cofilin gefärbt)	m/f Geschlecht	Anzahl Stanzen Prim/Rezidiv P/R
GBM	60(20-88)	314 / 290	92/62	253/44
AA	41(19-76)	94 / 72	27/17	--
Medulloblastom	21(1-70)	88 / 70	28/13	--
Ependymome	42(2-82)	97 / 30	23/26	88/8
Astrozytom	43(23-77)	82 / 73	21/17	--
Oligodendrogliom	42(27-61)	32 / 0	11/5	13/6
Anaplast. Oligodendrogliom	43 (38-49)	40 / 0	5/15	11/17
Anaplast. Ependymom	38 (32-45)	45 / 0	14/8	23/19
Subependymom	56(44-75)	16 / 2	6/3	12/4
PNET	42(2-78)	22 / 15	9/1	--

Tabelle 4: Einzelne Tumorentitäten mit Alters- und Geschlechterverteilung, Anzahl der hergestellten Stanzen mit Angabe der gefärbten Cofilin Stanzen sowie der Primär- und Rezidiverkrankungen.

Zum Verständnis soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass sich sämtliche weiteren Berechnungen, Analysen und Angaben auf die Anzahl der vorhandenen und dokumentierten Patientenproben beziehen und nicht auf die Patientenfälle, da bei der TMA Herstellung zur Erfassung möglicher Heterogenitäten meist zwei Probestanzen von einem Patienten durchgeführt wurden.

Unter Miteinbezug aller Tumorentitäten konnte nun folgende Geschlechterverteilung auf die verschiedenen Tumorarten gezeigt werden:

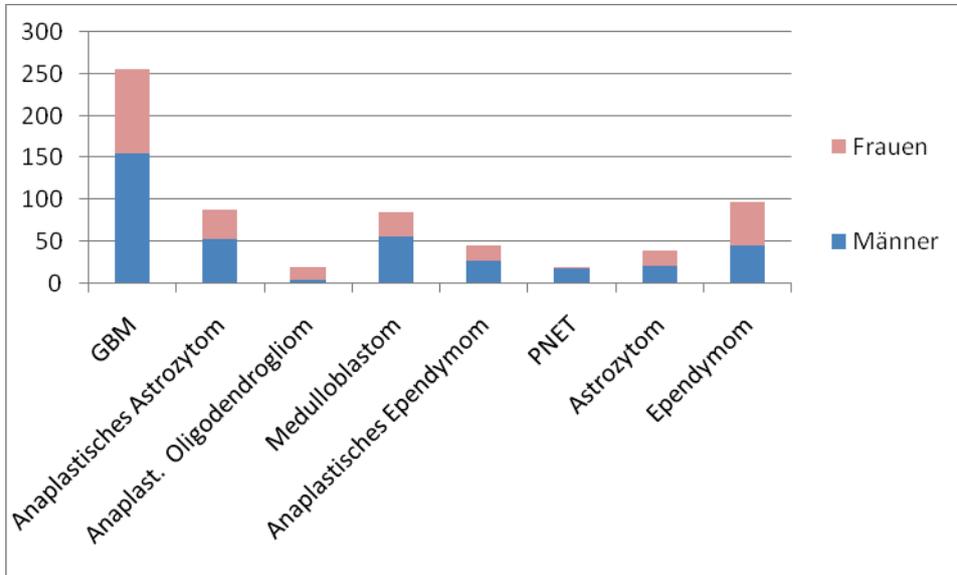


Diagramm 2: Balkendiagramm zur Geschlechterverteilung der einzelnen Tumorentitäten (GBM= Glioblastom, AA: Anaplastisches Astrozytom, PNET: Primitiv neuroektodermaler Tumor).

Bei der Zusammenfassung der WHO Grade zeigte sich, dass männliche Proben in Grad II und Grad IV Proben überrepräsentiert sind. Diese Daten stehen im Einklang mit der erwarteten epidemiologischen Verteilung.

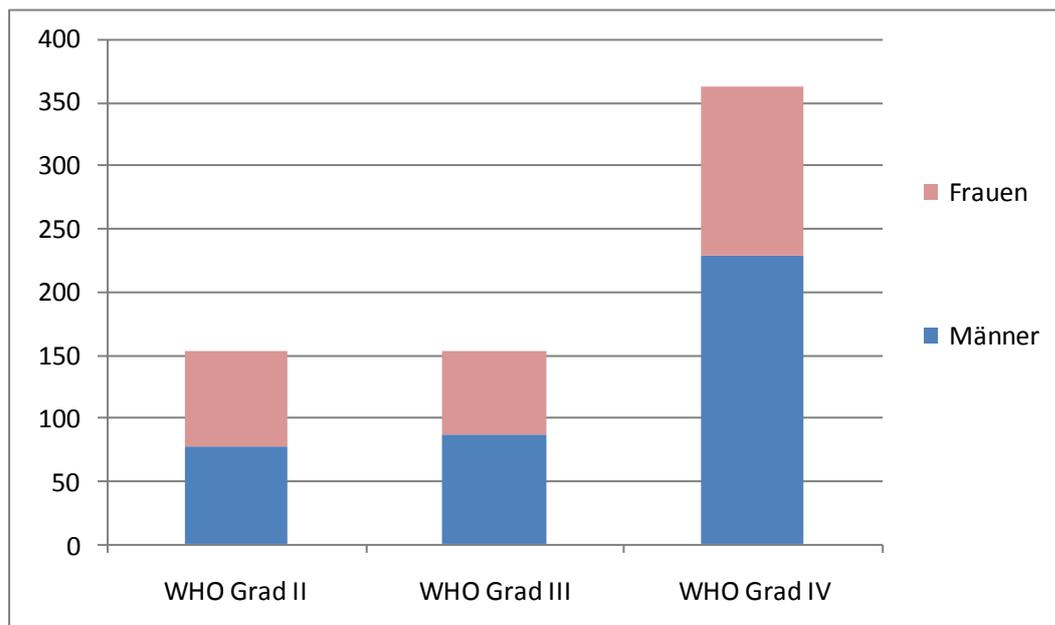


Diagramm 3: Balkendiagramm der einzelnen WHO Grade und der Geschlechterverteilung.

Korrelationsanalyse der Cofilin Mittelwerte und dem Geschlecht

In der nachfolgenden Einzelanalyse, getrennt nach den verschiedenen Tumorentitäten, wurden ebenfalls keine signifikanten Resultate beobachtet (Siehe Tabelle 5).

	Cofilin Mittel (95%KI) Männer	Cofilin Mittel (95%KI) Frauen	Signifikanzniveau
Glioblastom	1.82 (1.69-1.94)	1.74 (1.58-1.90)	p= 0.48
Anaplastisches Astrozytom	1.89 (0.64-2.14)	1.54 (1.21-1.87)	p= 0.093
Medulloblastom	1.20 (0.93-1.47)	0.90 (0.56-1.24)	p= 0.17
Astrozytom	0.73 (0.39-1.06)	0.88 (0.51-1.24)	p= 0.54
Ependymom	0.91 (0.61-1.23)	0.83 (0.49-1.18)	p=0.70

Tabelle 5: Verteilung der Cofilin Scores nach Geschlecht.

Da für die PNET-Cofilin-Probenfärbungen nur männliche Probanden ausgewertet wurden, konnte in dieser Diagnosegruppe kein Geschlechterverhältnis ermittelt werden.

Für die Cofilin Mittelwerte standen, in Korrelation gesetzt mit dem Geschlecht, die Datensätze von 158 weiblichen und 264 männlichen Proben zur statistischen Berechnung mittels Einfaktorieller Varianzanalyse zur Verfügung.

Einfaktorielle Analyse von Cofilin Mittel nach dem Geschlecht

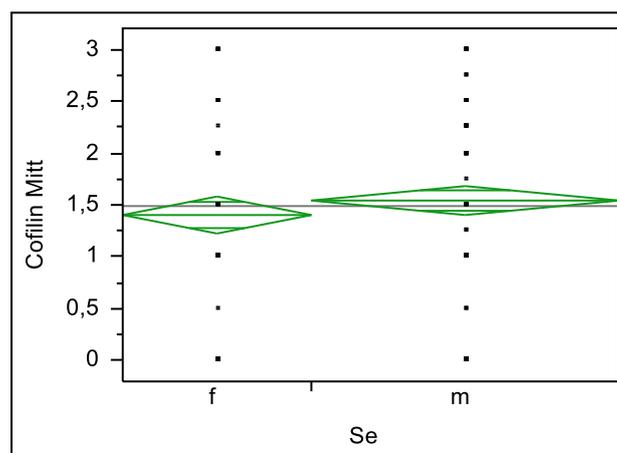


Abbildung 13: Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerten aller Datensätze und dem Geschlecht.

Bei den Mittelwerten beider Geschlechter konnte somit mit $p= 0.081$ keine Signifikanz (bei den Männern Mittel: 1.63, 95%-es Konfidenzintervall 1.53-1.74, bei den Frauen Mittel: 1.48 (95%-es KI:1.34-1.61)) dargestellt werden. Hierbei wurden aufgrund der unterschiedlichen Resultate die Daten aller Stanzten berücksichtigt. Somit besteht keine geschlechterabhängige Korrelation mit den Cofilin Mittelwert.

Korrelationsanalyse der Cofilin Mittelwerte und dem Alter

Bei der Betrachtung der Zusammenhänge zwischen dem Erkrankungsalter und den Cofilin Mittelwerten konnte bei den 420 Patientenfällen ein signifikanter Zusammenhang ($p<0.0001$) zwischen steigenden Cofilin Mittelwerten und steigendem Alter gezeigt werden.

Sowohl bei den 290 GBM-Proben als auch bei den 70 Medulloblastomen und den 73 AAs mit Cofilin Färbungen konnte in der Subgruppenanalyse nach Auftrennung keine Signifikanz mit der Alterskorrelation nachgewiesen werden. Eine signifikante positive Korrelation mit dem Alter fand sich nur in 30 Ependymomen ($p=0.0092$). Damit gilt, dass die Cofilin Expression mit Ausnahme der Ependymome in keiner Korrelation mit der Diagnose und dem Erkrankungsalter steht.

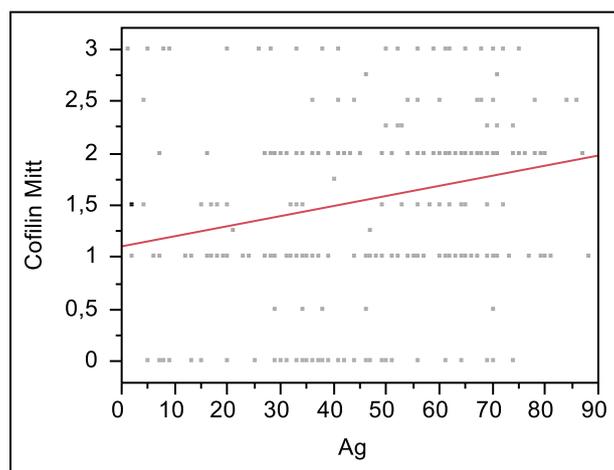


Abbildung 14: Die Bivariate Anpassung der Cofilin Mittelwerte aller Tumorproben und dem Erkrankungsalter zeigt eine signifikante Korrelation ($p<0.0001$).

3.1.2. Einfaktorielle Analysen der Cofilin Mittelwerte und dem WHO Grad

Allgemeine Altersverteilung bei Erstdiagnose nach dem WHO Grad

Zur Darstellung der allgemeinen Betrachtung des Erkrankungsalters in Korrelation mit den WHO Graden der verschiedenen, bereits vorgestellten Tumorentitäten dient folgendes Diagramm:

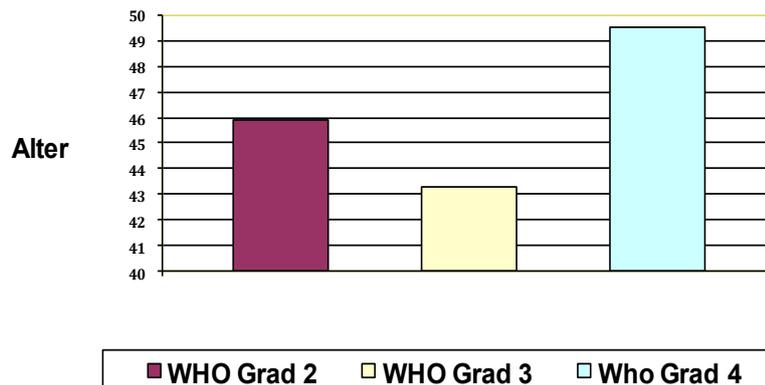


Diagramm 4: Diagramm mit Verteilung des mittleren Erkrankungsalters nach WHO-Grad.

Für den WHO Grad I wurden keine immunhistochemischen Cofilin Anfärbungen durchgeführt, daher werden sie hier nicht weiteraufgeführt.

Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit den WHO Graden II bis IV

Bei der einfaktoriellen Analyse der Cofilin Mittelwerte mit den einzelnen WHO Graden zeigt sich, dass bei einer Fallzahl von $n=72$ bei den WHO Grad II-Proben, $n=73$ Patientenproben des WHO Grades III und bei $n=375$ WHO Grad IV im Vergleich zwischen WHO Grad II und WHO Grad III sowie WHO Grad IV ein höchst signifikanter Expressionsunterschied ($p<.0001$) besteht. Zwischen den höhergradigen Tumoren (WHO Grad III und IV) bestanden keine signifikanten Expressionsunterschiede (Tabelle 6).

	Fallzahl n	Cofilin-Mittel (95%KI)
WHO II	72	0.76 (0.57-0.96)
WHO III	73	1.76 (1.56-1.96)
WHO IV	375	1.56 (1.48-1.65)

Tabelle 6: Einfaktorielle Analyse von Cofilin Mittel nach den WHO Graden II bis IV.

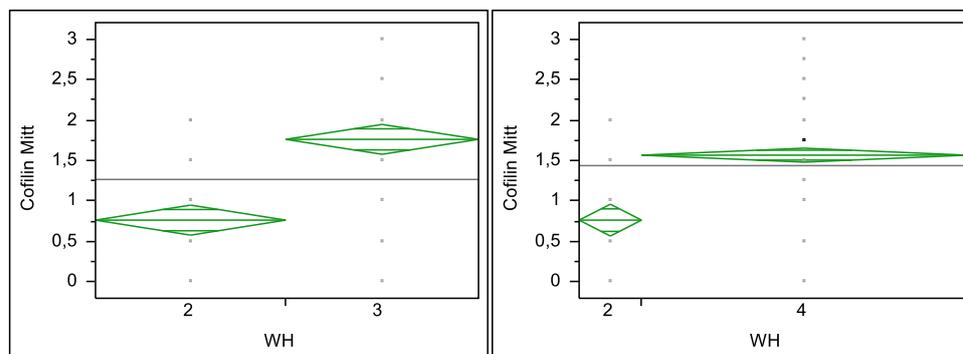


Abbildung 15 und 16: Einfaktorielle Analysen der Cofilin Mittelwerte und WHO Graden zeigen signifikant höhere Werte in WHO Grad III und IV Tumoren (beide $p > 0.0001$)

3.1.3. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und der Diagnose

Aufgrund der Expressionsunterschiede zwischen den WHO Graden erfolgte eine Subgruppenanalyse nach Diagnosefällen.

Mit 73 AAs und 290 GBM-Fällen konnte bei der Analyse der Cofilin Mittelwerte und der Diagnosen für diese beiden Entitäten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich bei der Gegenüberstellung von Medulloblastom mit PNET konnte in PNETs eine signifikante Expression ($p = 0.018$, siehe Tabelle 7) ermittelt werden.

Unter Einbezug der einzelnen Tumorentitäten mit dem WHO Grad IV, ergo GBMs, Medulloblastome und PNETs, und dem WHO Grad II mit den Cofilin Färbung der Astrozytome konnte mit einer Signifikanz von $p < 0.0001$ eine Erhöhung der Cofilinwerte mit zunehmendem Malignitätsgrad assoziiert werden.

Im Vergleich der Diagnosegruppen Astrozytom (WHO Grad II) versus anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III) mit den Cofilin Mittelwerten konnte bei den höhermalignen AAs ein Cofilin Mittelwert von 1.76 in Korrelation mit dem Astrozytom-Cofilin-Mittelwert von 0.76 ein höchst signifikanter Unterschied

($p < .0001$) bestimmt und damit eine Abhängigkeit der höhermalignen Tumore mit höherer Cofilin Expression nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Astrozytome und Ependymome konnte kein signifikanter Unterschied der Cofilin-Mittelwerte ermittelt werden ($p = 0.58$).

Unter Miteinbezug des Geschlechts konnte in keinen Entitäten mit den Cofilin Mittelwerten eine Signifikanz im Geschlechterverhältnis ermittelt werden.

	Fallzahl n	Cofilin Mittelwert
GBM	290	1.67 (1.57-1.76)
Medulloblastom	70	1.12 (0.92-1.31)
PNET	15	1.73 (1.31-2.15)
AA	73	1.76 (1.58-1.94)
Astrozytom	72	0.72 (0.57-0.96)
Ependymom	32	0.87 (0.63-1.11)

Tabelle 7: Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte nach Diagnosen.

3.1.4. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und Lokalisation

3.1.4.1. Allgemeine Verteilung der Tumorlokalisationen nach dem Alter, dem Geschlecht, den jeweiligen Tumorentitäten und dem WHO Grad

Um einen Zusammenhang zwischen den Lokalisationen und den Parametern Alter, Geschlecht, Tumorentität und WHO Grad zu ermitteln, wurden Einfaktorielle Analysen in Bezug auf Alter und WHO Grad durchgeführt. Bei der Korrelationsanalyse ergab sich mit $n = 488$ untersuchten Tumoren ein hochsignifikanter Anstieg des Alters mit dem WHO Grad (p -Wert von < 0.00001).

Bei der Geschlechterverteilung in den dokumentierten und bekannten Tumorlokalisationen konnte in der Kontingenzanalyse mit $n = 489$ und einem Pearson-Wert von 0.0363 ein signifikanter Zusammenhang mit der Tumorlokalisation berechnet werden. Folgendes Diagramm dient zur Veranschaulichung der Verteilung:

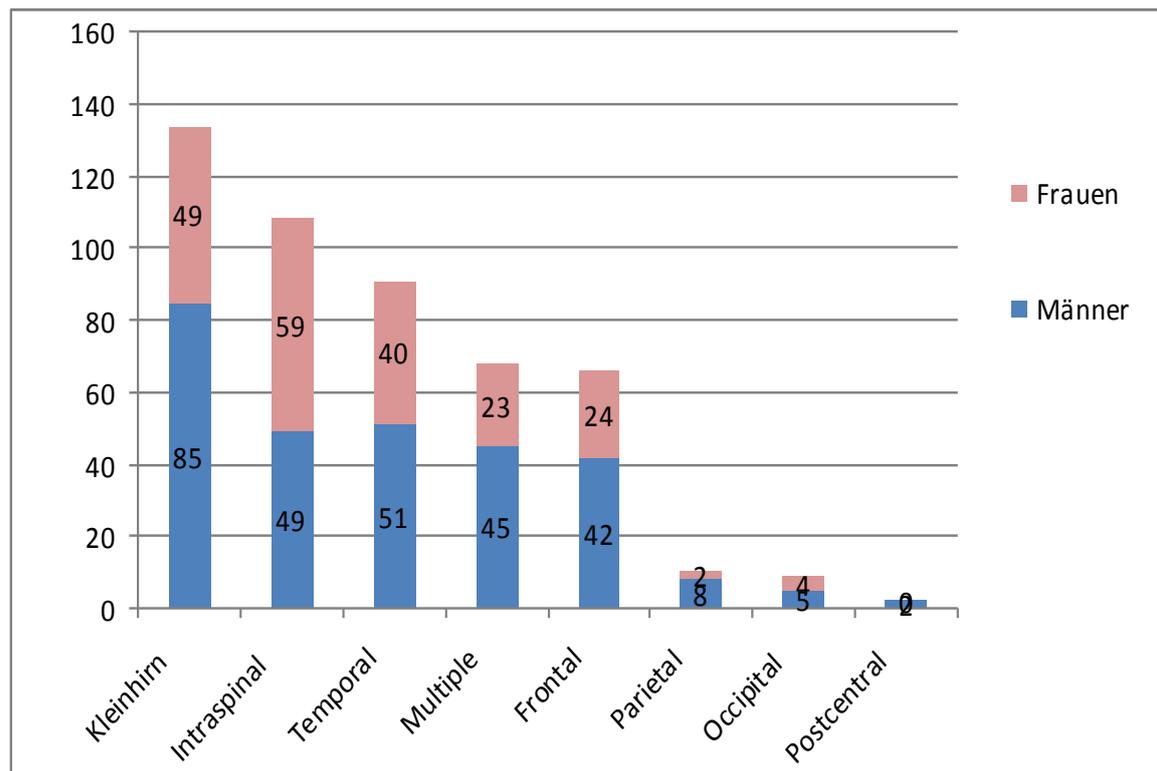


Diagramm 5: Geschlechterverteilung in Tumorlokalisationen.

Mittels Kontingenzanalyse konnte auch ein signifikanter Zusammenhang (p-Wert von <0.0001) für die Tumorlokalisation und die Diagnose berechnet werden.

In der Ermittlung der Tumorlokalisationen ergab sich für alle Tumorentitäten mit WHO Grad I bis IV das Kleinhirn mit 27% bei $n=489$ als häufigste Lokalisation, wobei hier die Medulloblastome mit $n=76$ einen Prozentsatz von 76% erreichten, während die GBMs mit $n=2$ lediglich 1% der cerebellären Tumoren repräsentierte. Die größte GBM- Fallzahl mit $n=70$ konnte bei den Tumoren mit Sitz im Temporallappen (77%) dokumentiert und erfasst werden.

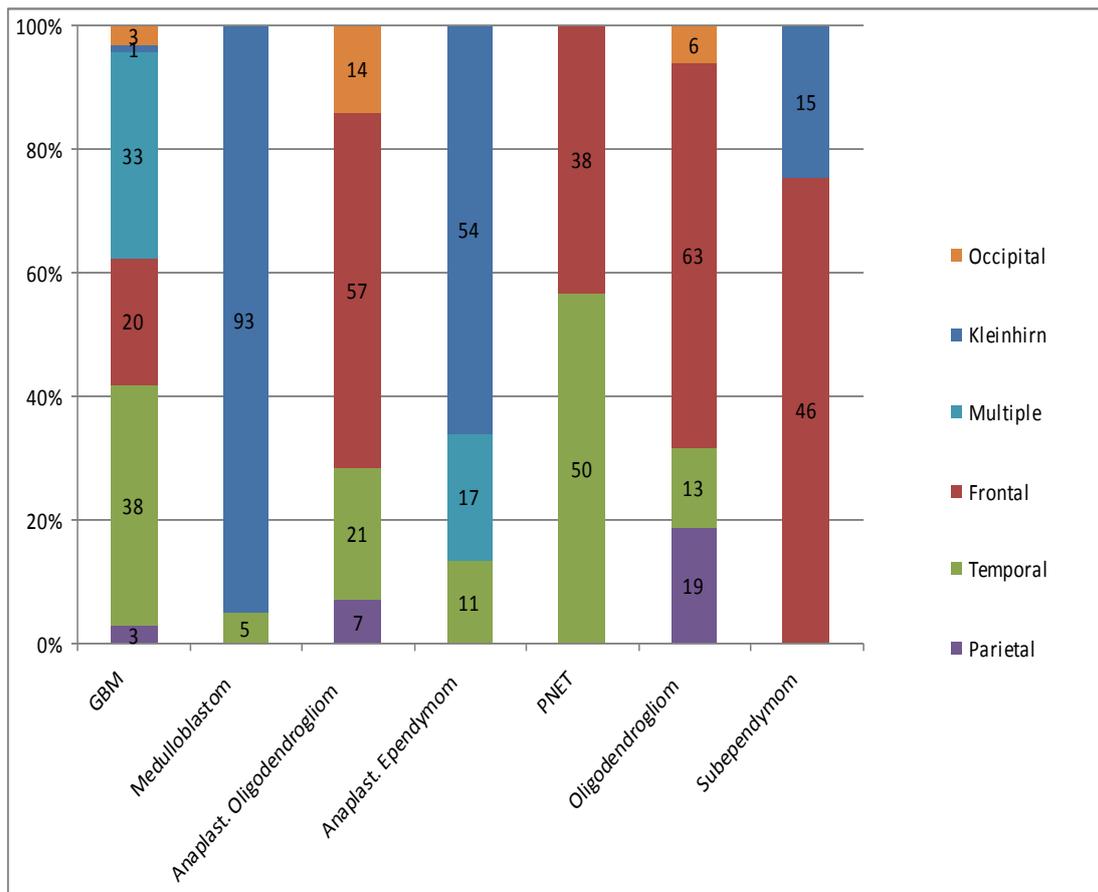


Diagramm 6: Zuteilung der Tumorentitäten zu den Lokalisationen in Prozent.

Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte und den Tumorlokalisationen

In der Korrelation mit den Cofilin Mittelwerten und der Tumorlokalisation konnte mit $p < 0.0001$ bei einer Fallzahl von $n=240$ ein höchstsignifikantes Ergebnis errechnet werden. Die geringste Cofilin-Expression wurde in spinalen Tumoren beobachtet, die höchste Expression im Occipitallappen.

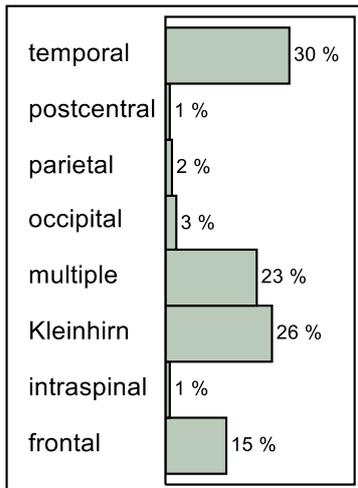


Abbildung 17: Verteilung der GBM-Proben in Prozent, die zur Korrelation der Cofilin Mittelwerte verwendet wurden.

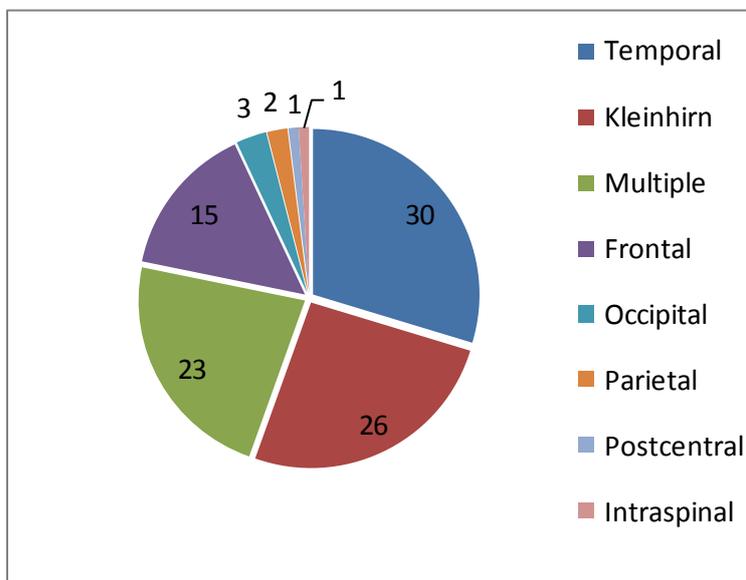


Diagramm 7: Tortendiagramm Verteilung der GBM auf die einzelnen Lokalisationen.

Lokalisation	Cofilin Mittelwert mit 95%-KI
Temporal	1.85 (1.67-2.03)
Kleinhirn	1.10 (0.91-1.30)
Multiple	1.85 (1.64-2.06)
Frontal	1.96 (1.70-2.22)
Occipital	2.50 (1.87-3.13)
Parietal	1.50 (0.72-2.28)
Postcentral	2.00 (0.90-3.10)
Intraspinal	0.50 (-0.60-1.60)

Tabelle 8: Cofilin Mittelwerte mit 95%-em KI in den Lokalisationen.

3.1.5. Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit dem HistoScore (Definiens)

In den nachfolgenden Analysen wurden die mit dem Definiens-System automatisiert ermittelten Cofilinwerte (HistoScore) für die Analysen verwendet.

Allgemeine Verteilung des HistoScores nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad

Bei der Betrachtung der Altersverteilung konnte mit 602 berücksichtigten Datensätzen die Aussage getroffen werden, dass ein höchstsignifikanter Zusammenhang zwischen dem steigendem Cofilin HistoScore und dem fortschreitendem Alter besteht ($p = <0.0001$). Im Gegensatz dazu konnte bei der einfaktoriellen Analyse nach Geschlechtertrennung keine Signifikanz gezeigt werden, so dass das Geschlecht in Hinsicht auf den HistoScore keinerlei Zusammenhangsinterpretation erlaubt.

Die durchgeführte einfaktorielle Analyse von HistoScore nach Diagnose bzw. den einzelnen Tumorentitäten wiederum konnte mit $p = <0.0001$ einen höchst signifikanten Anstieg des HistoScores nachweisen. Mit einer Gesamtzahl von $n = 794$ wurden auch die Patientenproben mit WHO Grad I und Grad II klassifizierten und diagnostizierten Tumore miteinbezogen.

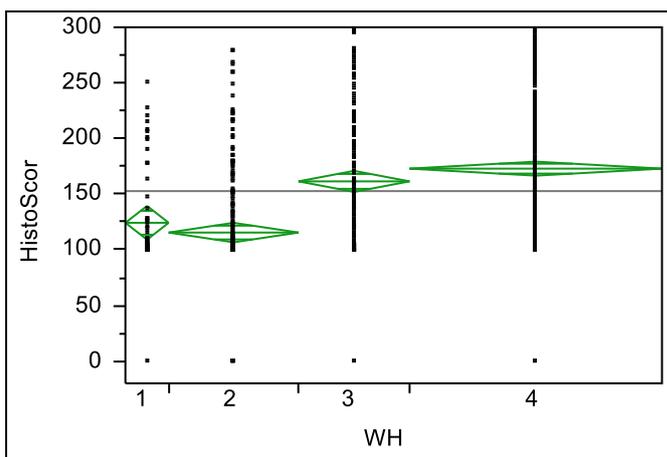


Abbildung 18: Einfaktorielle Analyse von Cofilin- HistoScore nach WHO Grad I bis IV

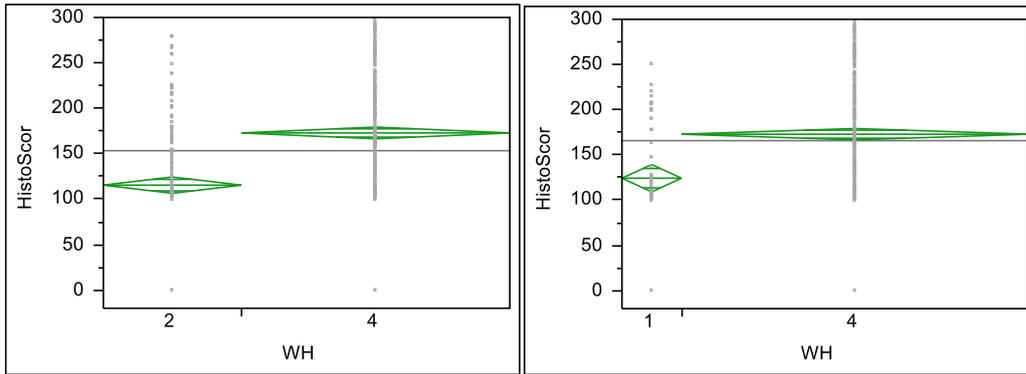


Abbildung 19 und 20: Einfaktorielle Analyse von Cofilin-HistoScore im direkten Vergleich (links: WHO Grad II und IV, rechts WHO Grad I und IV).

Nach Ausschluss der niedrigmaligneren Tumorentitäten, nur noch unter Miteinbezug der WHO Grade III Tumore AA, die anaplastischen Ependymome und die Anaplastischen Oligodendrogliome und die zum WHO Grad IV gehörigen Tumore mit GBM, den Medulloblastomen und den PNETs (mit n=504) konnte ebenfalls ein höchstsignifikanter Zusammenhang mit dem steigendem WHO Grad gezeigt werden.

In der Subgruppenanalyse der einzelnen Tumorentitäten kristallisierten sich zwei Gruppen heraus, in welchen sich die AAs, die GBMs und die anaplastischen Oligodendrogliome im hochgradigen HistoScore Bereich (high-expresser) mit Mittelwerten von 173 bis 191 und sich die Astrozytome, die anaplastischen Ependymome und die PNETs mit gemessenen Mittelwerten von 94 bis 122 bewegten (low-expresser).

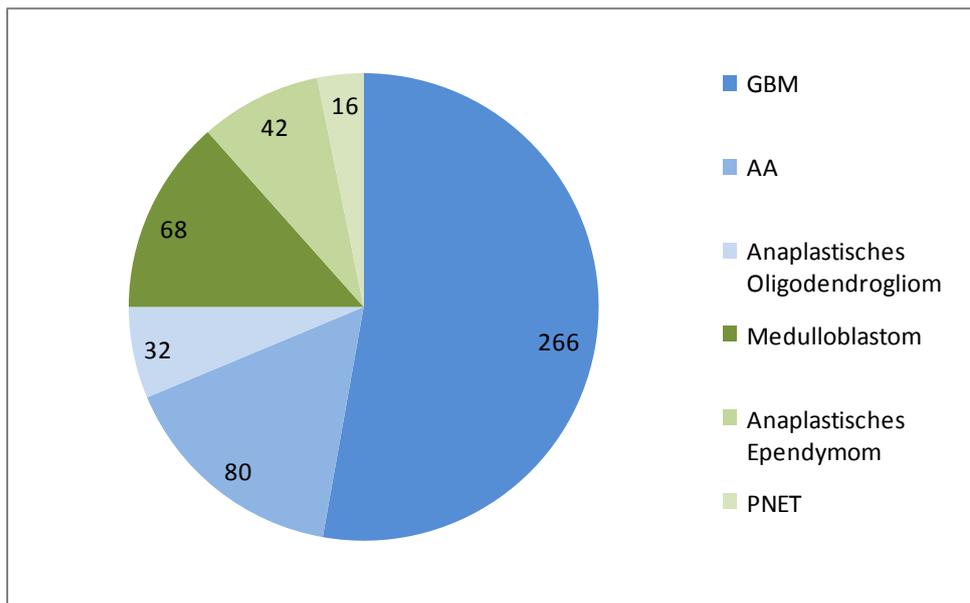


Diagramm 8: Verteilung der Cofilin-HistoScore-Patientenproben mit Angabe der Tumorentitäten.

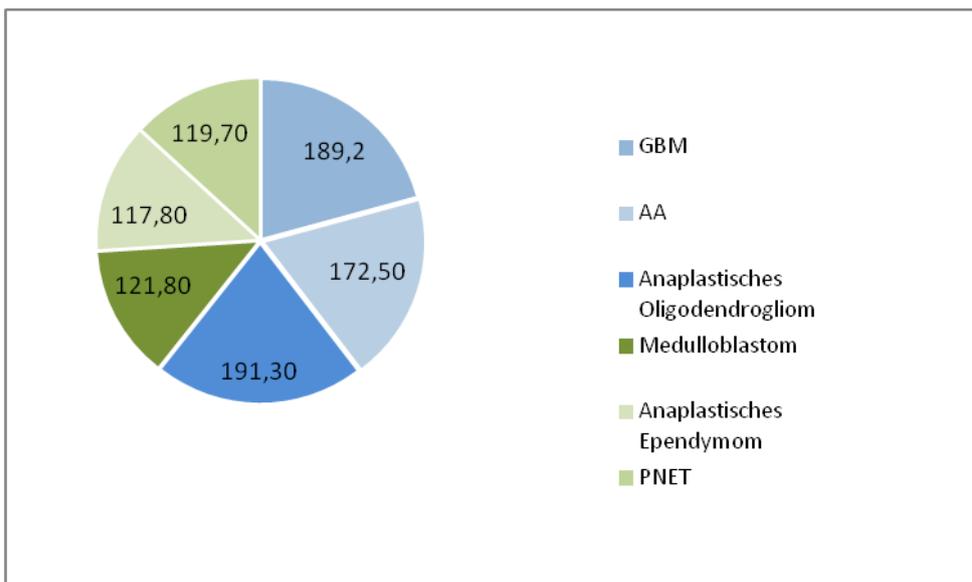


Diagramm 9: Mittelwerte des HistoScores in einzelnen Tumorentitäten mit Herauskrystallisierung zweier Gruppen (high-expressers: GBM, AA, AO und low-expressers (PNET, AE, Medulloblastom)).

Für die einzelnen Tumorentitäten wurden Subanalysen durchgeführt. Eine Liste der sortierten Expressions-Differenzen findet sich im Anhang. Die Ergebnisse der direkten paarweisen Vergleiche sind in der nachfolgenden Tabelle erfasst. Zur Veranschaulichung wurden die signifikanten Paare mit einem Punkt versehen, die entsprechenden p-Werte finden sich in der dazugehörigen Tabelle.

	Anaplastisches Oligodendrogliom	Gioblastom	anaplastisches Astrozytom	Medulloblastom	PNET	Anaplastisches Ependymom	Astrozytom
Anaplastisches Oligodendrogliom			
Gioblastom		
anaplastisches Astrozytom	
Medulloblastom
PNET
Anaplastisches Ependymom
Astrozytom	

Tabelle 9: Grafische Darstellung der Subanalysen und ihrer Signifikanzen.

		p-Wert
GBM	AA	0.021
GBM	Medulloblastom	<.0001
GBM	Astrozytom	<.0001
GBM	Anaplast. Ependymom	<.0001
GBM	PNET	<.0001
GBM	Anaplast. Oligodendrogliom	0.8452
AA	Medulloblastom	<.0001
AA	Astrozytom	<.0001
AA	Anaplast. Ependymom	<.0001
AA	PNET	0.0007
Medulloblastom	PNET	0.8934
Medulloblastom	Anaplast. Ependymom	0.7181
Medulloblastom	Astrozytom	0.0035
Anaplast. Oligodendrogliom	AA	0.1134
Anaplast. Oligodendrogliom	Astrozytom	<.0001
Anaplast. Oligodendrogliom	PNET	<.0001
Anaplast. Oligodendrogliom	Medulloblastom	<.0001
Anaplast. Oligodendrogliom	Anaplast. Ependymom	<.0001
PNET	Astrozytom	0.1022
PNET	Anaplast. Ependymom	0.9089
Anaplast. Ependymom	Astrozytom	0.0303

Tabelle 10: Auflistung der dazugehörigen p-Werte der Subanalyse der Tumorentitäten.

Korrelationsanalysen des HistoScore nach WT1 Status und WT1 Score

In den Korrelationsanalysen von HistoScore nach WT1Score bzw. Status konnte keine Signifikanz ermittelt werden.

Korrelationsanalysen der manuellen Cofilin Mittelwerte mit dem HistoScore

Mit einer Fallzahl von n=484 registrierten Patientenproben mit dokumentierten und maschinell bestimmten HistoScores konnte die Aussage getroffen werden, dass eine höchst signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Auswertungsmethoden besteht.

Bivariate Anpassung von dem HistoScore nach dem Cofilin Mittel

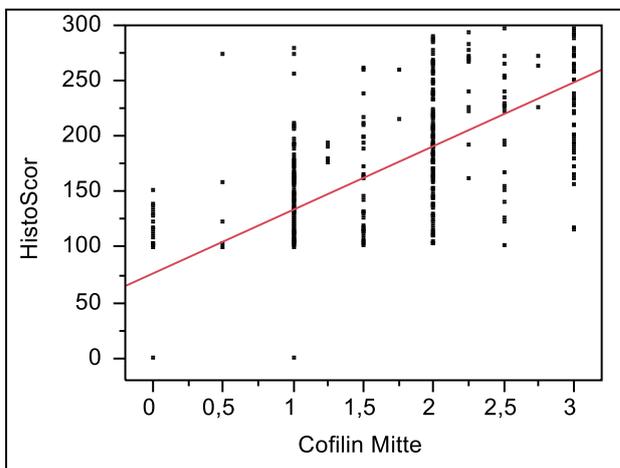


Abbildung 21: Darstellung zur Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen den Cofilin Mittelwerten und dem automatisiert ermitteltem HistoScore.

3.1.6. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem IDH1 Status (0=nichtmutiert, 1=mutiert)

Allgemeine Verteilungen der IDH1-Mutation nach dem Alter

Bei der statischen Analyse der Altersverteilung mit positivem bzw. negativem IDH1-Status zeigte sich bei allen Tumorarten, dass die Patienten mit mutiertem IDH1-Status ein niedrigeres Erkrankungsalter aufwiesen als die unmutierten registrierten Fälle. Bei den GBM erkrankten die Patienten mit IDH1-Mutation im Durchschnitt im Alter von 41,6 Jahren, während hingegen die IDH Wildtyp Patientenproben im Schnitt mit 61,3 Jahren erkrankten. Auch bei den AAs lag

das Durchschnittserkrankungsalter bei den mutationslosen Patienten bei 54,9 Jahren, während die Mutationsträger mit 38,3 Jahren ein frühes Erstdiagnosealter vorwiesen. Bei den Oligodendrogliomen die durch eine IDH-Mutation definiert sind, wurde daher auf einen Vergleich mit IDH-negativen Proben verzichtet.

Allgemeine Verteilungen der IDH1-Mutation nach der Tumorentität

Insgesamt konnten 364 Präparate in die Untersuchung auf eine IDH1-Mutation einbezogen werden, wobei die GBMs die Gruppe mit der größten Fallzahl von 253 Patientenproben darstellte und mit den Oligodendrogliome die kleinste Gruppe mit n= 15 erfasst wurde. Ependymome zeigten keine IDH1-Mutation.

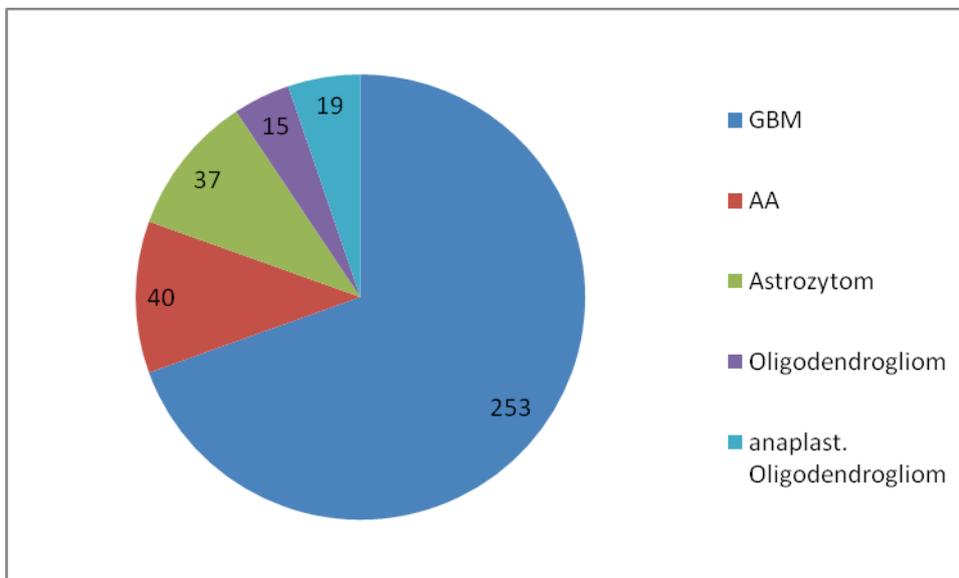


Diagramm 10: Tortendiagramm zur Veranschaulichung der untersuchten Fälle mit einer IDH1-Mutation in den einzelnen Tumorarten.

Die IDH1-Bestimmung wurde mit 0= negativer Status festgelegt, d.h. Wildtyp und 1= positiver Status, d.h. Nachweis einer Mutation im Gen der Isocitratdehydrogenase. Zusammenfassend wiesen 85 Präparate einen positiven Befund auf, die IDH1 Analyse in 279 Fällen wurde negativ befundet.

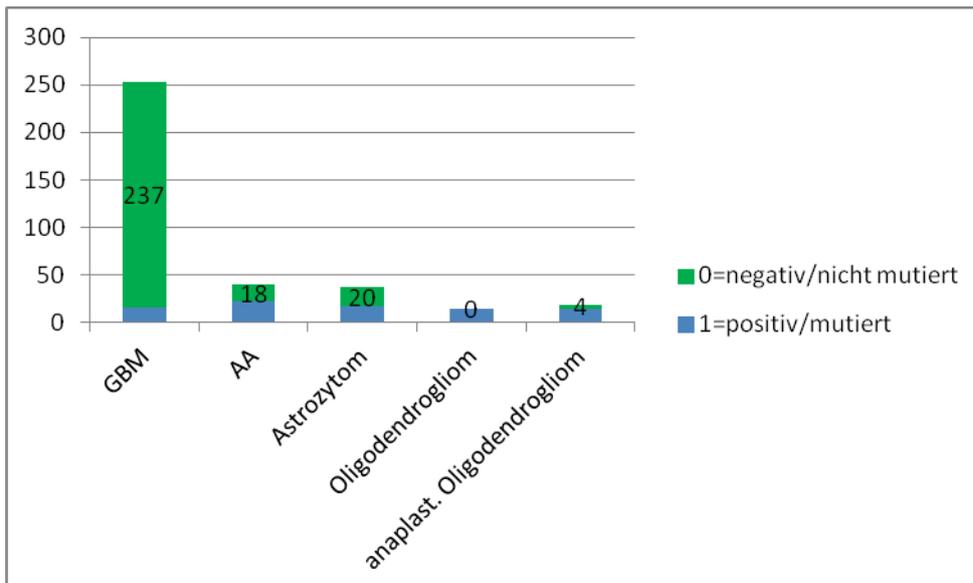


Diagramm 11: Verteilung des IDH1-Status in den Tumorentitäten.

Bei den GBM konnten von 253 Patientenproben 16 Proben positiv (6%) auf die IDH1-Mutation getestet werden, bei den Astrozytomen konnten von 37 Fällen 17 positive Proben (46%) nachgewiesen werden. Die vierzig AA-Patienten zeigten in 22 Fällen (55%), die anaplastischen Oligodendrogliome in 15 von insgesamt 19 getesteten Präparaten einen positiven Mutationsstatus (79%).

Allgemeine Verteilungen der IDH1-Mutation nach der Tumorentität und dem Alter

In den hier durchgeführten Analysen wurde die IDH1-Mutation mit dem Patientenalter und den einzelnen Diagnosen erfasst.

Sowohl bei den GBMs, den AAs und den Astrozytomen konnten signifikante bis höchst signifikante Werte ermittelt werden.

Am deutlichsten und damit signifikantesten war der p-Wert bei den GBM- Fällen mit $<.0001$, gefolgt von den AA-Proben mit $p= 0.0011$. Auch die Astrozytome konnten mit $p= 0.0026$ eine hohe Signifikanz erreichen.

Diagnose	Fallzahl n	Mittleres Erkrankungsalter		Signifikanz
		IDH1 =0	IDH1=1	
GBM	253	61,3	41,6	<.001
AA	40	54,9	38,3	0.001
Astrozytom anaplast.	37	50,6	36,2	0.026
Oligodendrogliom	19	53	46,2	0.35

Tabelle 11: Tumorentitäten mit Fallzahlen mit Bezug zur IDH1-Mutation.

Allgemeine Verteilungen der IDH1-Mutation nach dem Geschlecht und der Tumorentität

In den Korrelationsanalysen konnte in keiner Tumorentität eine Korrelation und/oder Signifikanz in Bezug auf die IDH1-Mutation und der Geschlechterverteilung nachgewiesen werden. Die p-Werte in den verschiedenen Tumorarten schwankten zwischen 0.41 bis 0.94.

Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit dem IDH1-Status

Zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen den Cofilin-Mittelwerten und dem IDH1-Status wurden auch hier eine einfaktorielle Analysen erstellt. Hierbei zeigt sich in der allgemeinen Betrachtung der Fallzahl n=301 eine hohe Signifikanz von $p=0.029$ zwischen den mutierten und nicht mutierten Fällen und den Cofilin-Mittelwerten. Für die unmutierten Fälle mit $n=254$ konnte ein Cofilin Mittelwert von 1,68 (95%-es KI: 1,57-1,78) bestimmt werden, für die IDH1-mutierten Fälle, konnte mit $n=47$ ein Cofilin Mittelwert von 1,38 ermittelt werden (95%-es KI: 1,14-1,63) und die Aussage getroffen werden, dass die unmutierten IDH1-Status-Proben einen signifikant höheren Cofilin Mittelwert aufwiesen. Es erfolgte wiederum eine Subgruppenanalyse nach der Diagnose. Im Falle der AAs konnte eine hohe Signifikanz von $p=0.019$, bei den GBMs knapp keine Signifikanz mit $p=0.06$ und bei den Astrozytomen keine Signifikanz ($p=0.21$) ermittelt werden.

Bei dem direkten Vergleich von den beiden Diagnosen GBM und AA zeigte sich in dem Zusammenhang des IDH1-Status und den Cofilin Mittelwerten kein signifikanter Expressionsunterschied.

3.1.7. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und den p53 Prozentwerten

3.1.7.1. Allgemeine Verteilung von p53 nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität, der Tumorlokalisierung und dem WHO-Grad

Zur Ermittlung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den p53-Werten in Prozent und der Altersverteilung konnte mittels Bivariater Analyse keine Signifikanz für das Gesamtkollektiv festgestellt werden ($p=0.3331$, $n= 418$).

Bezüglich der Geschlechterverteilung mit dokumentierten p53-Werten konnte ebenso mit $p=0.5591$ kein signifikanter Zusammenhang erkannt werden. Die Verteilung betrug mit $n=324$ ein Verhältnis von M:F :62:38 in %.

Mit Hilfe der einfaktoriellen Analyse nach Diagnose bzw. Tumorentität konnte ein sehr signifikantes Ergebnis im Vergleich der einzelnen Tumorarten gezeigt werden.

Bei der Ermittlung der Tumorlokalisierung mit einer dokumentierten p53-Expression im Tumor konnte mit der Fallzahl von $n=301$ ein signifikantes Resultat dokumentiert werden.

Lokalisation mit Fallzahl n	p53 in %-Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Intraspinal 83	0.91	0	4.25
Temporal 67	11.97	8.25	15.69
Multiple 66	10.78	7.03	14.53
Kleinhirn 41	0.79	0	5.54
Frontal 34	8.53	3.31	13.75
Occipital 6	10.33	0	22.76
Parietal 4	0.34	0	15.554

Tabelle 12: Darstellung der p53-Werte mit Konfidenzintervall für die Tumorlokalisierungen.

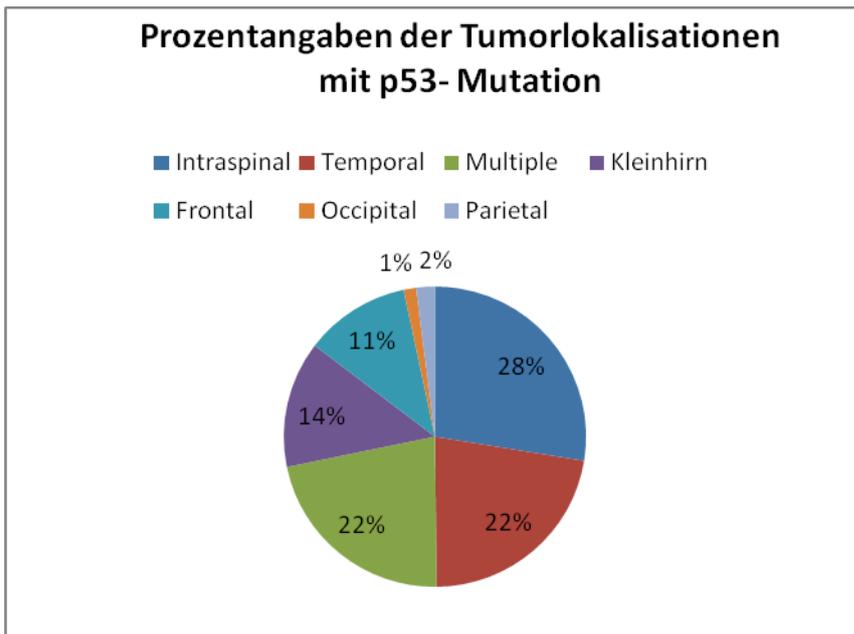


Diagramm 12: Diagramm mit prozentualen Angaben der Tumorlokalisation mit p53-Nachweis.

Bei einer durchgeführten einfaktoriellen Analyse nach dem WHO Grad und p53 in% konnte mit einem p-Wert von $<.0001$ ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden.

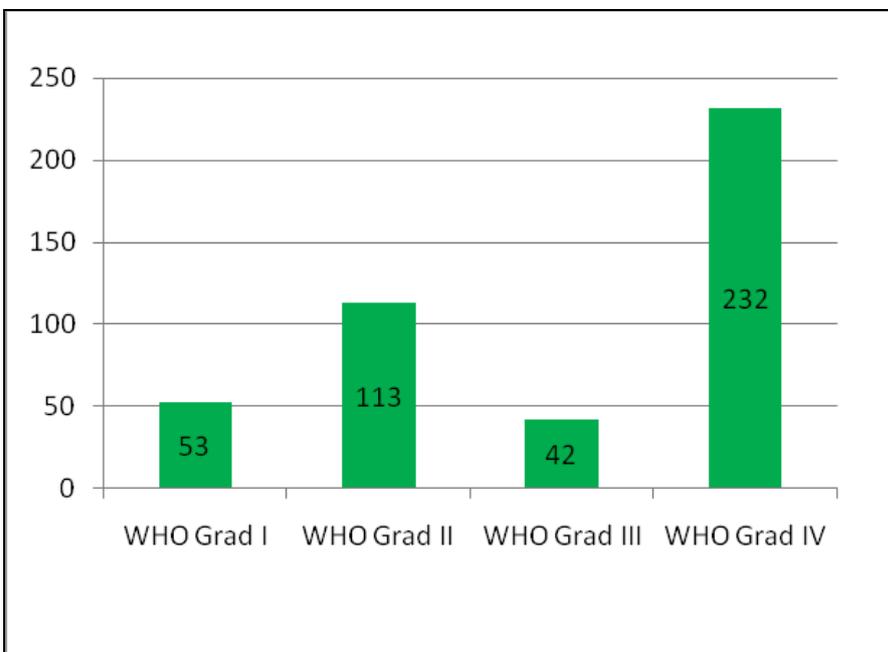


Diagramm 13: Verteilung der Proben mit den WHO Grade I bis IV mit einem vorhandenen p53-Datensatz.

WHO Grad	Fallzahl n	p53%- Mittelwert
WHO Grad I	53	1.15
WHO Grad II	113	0.50
WHO Grad III	42	7.99
WHO Grad IV	232	7.01

Tabelle 13: Übersicht der WHO Fallzahlen und den p53%-Mittelwerten.

Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit dem p53 in Prozent

Hierbei konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden zwischen steigenden Cofilin Mittelwerten und dem Prozentsatz der p53 exprimierenden Tumorzellkernen.

3.1.8. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem Wilms-Tumor1-Score bzw. Wilms-Tumor1-Status

Allgemeine Verteilung der WT1-positiven Tumoren mittels WT1-Status und WT1-Score nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad

Für die Analysen des WT1-Status und des WT1-Scores konnten 235 Patientenproben erfasst und für die statistischen Vergleiche mit Cofilin verwendet werden, welche sich aus 195 GBM-Proben und 39 AA-Proben zusammensetzen. Lediglich für eine Astrozytom-WHO II-Probe lag der WT-Status vor, welcher daher aus der statistischen-Analyse entfernt wurde. Des Weiteren konnte keine WT-1 Expression in den übrigen niedrigmaligneren Entitäten festgestellt werden, so dass keine weiteren statistischen Berechnungen in diesen Gruppen erfolgten.

Verteilung des WT1-Status nach Alter, Geschlecht und Tumorentität:

Allgemein konnten für die Bestimmung des WT1-Status 234 Proben für die statistische Erfassung verwendet werden.

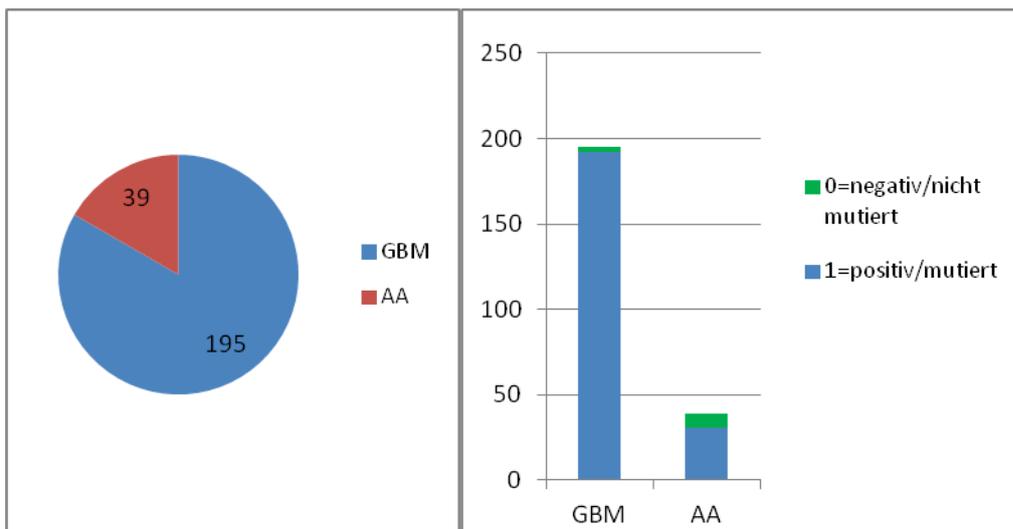


Diagramm 14: Anzahl der getesteten Proben und der mutierten und nicht mutierendokumentierten Fälle (WT1-Status).

Das Diagramm zeigt, dass von den für die Statistik zur Verfügung stehenden AA insgesamt 39 bezüglich ihres WT1-Status untersucht wurden und 31 davon mit dem Status 1 = positiv und 8 AAs mit dem negativen WT1-Status 0 erfasst werden konnten.

Bei den GBM konnten 195 Proben untersucht werden mit folgendem Ergebnis: 192 Proben konnten mit dem Status 1=positiv ermittelt werden mit lediglich 3 negativen Status 0.

Mit einem Geschlechterverhältnis von M:F = 1,5:1 wurden 142 Proben von männlichen Patienten und 92 Proben von weiblichen Patienten registriert. Von den 92 Frauen konnten 86 positive und sechs negative WT1-Statuserhebungen erfolgen. Folglich waren 93.5% der weiblichen Proben positiv (Status 1). Bei den Männern konnten von den 142 Proben 137 mit dem positiven WT1-Status erkannt werden und ausschließlich zwei Proben mit dem Status 0 identifiziert werden. Somit waren die Proben der männlichen Patienten zu 96,48% positiv im Hinblick auf den WT1-Status. In der Verteilungsanalyse ergab sich hiermit keine Signifikanz zwischen den beiden Geschlechtern.

Bei der Kontingenzanalyse konnten 15 weibliche Patientenproben, mit elf positiven WT1-Status 1 und vier negativen Fällen, und 24 männliche Patientenproben, mit zwanzig positiven Status 1 und vier negativen Proben, erfasst werden

Bei der GBM-Kontingenzanalyse nach dem Geschlecht konnten insgesamt 194 Proben hinsichtlich des WT1-Status erfasst werden. Hierbei ergab sich folgendes Zahlenverhältnis:

Diagnose	Fallzahl	Frauen		Männer	
		WT1-Status		WT1-Status	
		Status 0	Status 1	Status 0	Status 1
GBM	194	2	74	1	117
AA	39	4	11	4	20

Tabelle 14: Tabellarische Übersicht WT1-Status im Geschlechterverhältnis.

Anhand von Kontingenzanalysen konnte des Weiteren kein Zusammenhang zwischen der WT1-Protein-Verteilung in Bezug auf das Geschlecht in einer der beiden Diagnosegruppe GBMs oder AAs nachgewiesen werden.

Jedoch zeigte sich bei den weiblichen Proben zu 97,4% ein positiver WT1-Status, bei den Männern konnte sogar zu 99,2 % der positive Status 1 gezeigt werden.

Beiden AAs konnte erfasst werden, dass die männlichen Proben zu 88,33 % Status 1, die weiblichen Proben zu 73,33 % positiv getestet wurden.

Bei der Erfassung des Erkrankungsalters (der Mittelwert lag bei 42,3 Lebensjahren) des WT-Status konnte bei einer Fallzahl von 223 und positivem Status der jüngste Patient mit 19 Lebensjahren und der älteste Patient mit 87 registriert werden. Beim negativen Status 0 wurde das jüngste Erkrankungsalter mit einer Probe von einem dreißigjährigen Patient erfasst, das älteste mit siebzig Jahren bei einer Gesamtanzahl von $n = 11$.

WT1-Status nach dem WHO Grad

Für die analytische Erfassung des Zusammenhangs zwischen dem WT1-Status und den WHO Graden wurde eine Einfaktorielle Analyse durchgeführt. Ein positiver WT-1 Status war in WHO IV signifikant häufiger ($p=0.0014$). Da für den WT1-Status lediglich die GBMs und AAs erfasst wurden, ist die Analyse identisch für die Vergleiche von WHO Grade III und IV.

Allgemeine Verteilung des WT1-Status nach der Tumorlokalisation

Mittels einer Kontingenzanalyse konnte keinerlei Aussage bezüglich des WT1-Status und der Tumorlokalisation getroffen werden. Lediglich zwei der frontal sitzenden Tumoren hatten den WT1-Status 0, die verbliebenen 176 Fälle trugen den positiven WT1-Status 1 und wurden am häufigsten im temporalen Bereich diagnostiziert, gefolgt von multiplen und frontalen Tumorlokalisationen.

Verteilung des WT1-Score nach dem Alter

Bei der Altersverteilung der 274 WT1-Score-untersuchten Proben bzw. 187 Patientenfällen zeigten die Datensätze folgende Verteilungen:

	Fallzahl Patienten	Mittleres Alter (Streubreite)
WT1-Scores 0-4	187	38,3 (1-82)
WT1-Score 0	12	45,8 (30-70)
WT1-Score 1	18	48,2 (20-76)
WT1-Score 2	54	56,8 (30-88)
WT1-Score 3	47	56,3 (19-84)
WT1-Score 4	56	63,1 (33-80)

Tabelle 15: Veranschaulichung der steigenden WT1-Scores mit dem durchschnittlichen steigenden Erkrankungsalter.

Durch die einfaktorielle Analyse von Alter nach dem steigenden WT1-Score konnte ein höchst signifikantes Ergebnis ermittelt werden mit $p=0.0002$. Bei dem direkten Vergleich der WT-Scores 3 und 4 (d.h. Tumoren mit weniger als 50% positiven bzw. mehr als 50% positiven Zellen) konnte mit einem p-Wert von 0.0105 ein signifikanter Zusammenhang mit dem Alter erwiesen werden, ebenso im Vergleich des WT1-Score 2 und 4 mit einem p-Wert von 0.0144. Für den Vergleich der WT1-Score 0 und 4 ($p<.0001$) und WT1-Score 1 und 4 ($p=0.0001$) erzielte die Analyse einen hochsignifikanten Zusammenhang.

Für den WT1-Score 0 im Vergleich mit WT1-Score 2 und 3 konnte ein signifikantes Ergebnis ermittelt werden mit p-Werten von 0.0282 und 0.0390.

Beim Vergleich von WT1-Score 1 und 2 konnte ebenso wie bei Vergleich von WT1-Score 1 und WT1-Score 3 keine Signifikanz erkannt werden. Bei

Miteinbezug der Diagnose konnte sowohl für die AAs ($p=0.24$) und den GBMs mit der Wahrscheinlichkeit von $p=0.063$ keine Signifikanz erfasst werden.

WT1-Scores im Altersvergleich		p-Wert
WT1-Score 0	WT1-Score 1	0.7268
WT1-Score 0	WT1-Score 2	0.0282
WT1-Score 0	WT1-Score 3	0.0390
WT1-Score 0	WT1-Score 4	<.0001
WT1-Score 1	WT1-Score 2	0.0565
WT1-Score 1	WT1-Score 3	0.0798
WT1-Score 1	WT1-Score 4	0.0001
WT1-Score 2	WT1-Score 3	0.8730
WT1-Score 2	WT1-Score 4	0.0105
WT1-Score 3	WT1-Score 4	0.0105

Tabelle 16: Einzelne p-Werte der WT1-Scores im Altersvergleich.

Einfaktorielle Analyse des WT1-Score nach dem Geschlecht und der Tumorentität

Bei der Einfaktoriellen Analyse des WT1-Scores und dem Geschlecht konnten bei den GBM von den 239 untersuchten Patientenproben 143 Männern und 96 Proben Frauen zugeordnet werden. Bei einem Score Mittelwert von 2.93 bei Männern und 3.00 bei Frauen konnte hier keine Signifikanz ($p= 0.64$) festgestellt werden. Im Falle der AAs konnte 39 Fälle genutzt werden, wobei hier 15 weibliche und 24 männliche Proben in die Berechnung einfließen. Der WT1-Score lag für Frauen bei 0.73 und bei Männer bei 0.83, somit ergab auch die Begutachtung der AAs kein signifikanter Unterschied.

Zur Veranschaulichung der WT1-Scoreverteilung bei den GBM und AAs dienen die folgenden Diagramme:

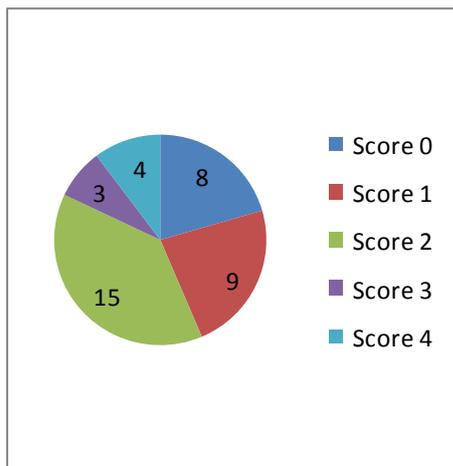


Diagramm 15 : WT1-Score Verteilung der AAs.

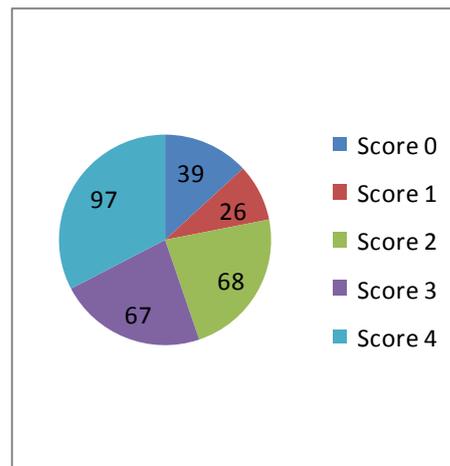


Diagramm 16: WT1-Score Verteilung der GBMs.

Einfaktorielle Analyse des WT1-Score nach dem WHO Grad

Bei der statischen Auswertung bzw. der Gegenüberstellung der WHO Grad II bis IV wurde der WHO Grad II aufgrund nur eines mit dem WT1-Score untersuchten Fall von dem Vergleich ausgeschlossen, da hiermit keine repräsentable Aussage getroffen werden konnte. Mit Hilfe der Einfaktoriellen Analyse konnte durch Vergleiche der WHO Grade III und IV miteinander folgende Daten ermittelt werden:

Die WHO Grade III und IV weisen mit einem p-Wert von 0.0014 einen höchst signifikanten Unterschied auf, so dass die Interpretation der Analyse die Aussage erlaubt, dass mit steigendem WHO Grad eine gleichzeitige Erhöhung des WT1-Scores einhergeht.

Zusammenhang des WT-1-Scores und dem p53 in %

Um eine Aussage bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem WT1-Score und dem p 53 in % treffen zu können, wurde eine Einfaktorielle Analyse durchgeführt, welche mit $p = 0.315$ keine signifikanten Resultate ergab.

Zusammenhang und Einfaktorielle Analyse des WT-1-Scores und dem MGMT-Status und dem IDH1-Status

Auch hier zeigte sich bei den statistischen Analysen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den WT1-Score und dem MGMT- und dem IDH1-Status.

3.1.8.1. Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit dem WT1-Status und WT1-Score

Zur Bestimmung der Cofilin Mittelwerten im Zusammenhang mit dem WT1-Status sowie den –Scores wurden Bivariate Analysen erstellt.

Bei Betrachtung des WT1-Scores des Gesamtkollektives zeigte sich in der allgemeinen Betrachtung mit der Probenanzahl 307 eine höchst signifikante Korrelation ($p < 0.0001$) zwischen den WT1-Score 0 bis 4 und den Cofilin-Mittelwerten. Während hingegen bei Ermittlung der Zusammenhänge zwischen dem WT1-Score und den Cofilin Mittelwerten unter Miteinbezug der Diagnose AA keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte, zeigt sich bei alleiniger Begutachtung der GBM-Patientenproben wiederum ein klares hochsignifikantes Ergebnis ($p < 0.0001$). Damit konnte die Aussage getroffen werden, dass mit steigenden Cofilin Mittelwerten auch eine Erhöhung der WT1-Scores einhergeht.

Im Falle der statistischen Ermittlung der Zusammenhänge der Cofilin-Mittelwerte und dem WT1-Status konnten keine signifikanten Zusammenhänge errechnet werden. Jedoch bei Miteinbezug der beiden Diagnosen GBM und AA zeigte sich in dem Zusammenhang eine signifikante Korrelation des WT1-Status und der Cofilin Mittelwerten.

Bei Miteinbezug der Diagnosen in der Bivariaten Analyse von Cofilin Mittelwerten und WT1-Score zeigt sich bei den AAs keine Signifikanz, während bei den GBMs mit $p < 0.0001$ eine höchste Signifikanz ermittelt werden konnte.

3.1.9. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem Proliferationsindex MIB-1

3.1.9.1. Allgemeine Verteilung des MIB-1-Proliferationsindex nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad

Von den MIB1 in Prozent konnten 294 Patientenfällen für eine Altersanalyse herangezogen werden. Hier ergab sich mit $p = 0.0008$ ein hoch signifikanter Zusammenhang der beiden Faktoren.

Bei der Verteilungsanalyse nach Geschlecht konnten 450 Patientenproben mit 197 weiblichen und 253 männlichen Proben erfasst werden, für die ein MIB-1 Datensatz vorhanden war, es ließ sich jedoch mit $p=0.239$ keinerlei signifikanter Zusammenhang mit dem Geschlecht nachweisen.

Einfaktorielle Analyse von MIB 1 in Prozent nach Diagnose

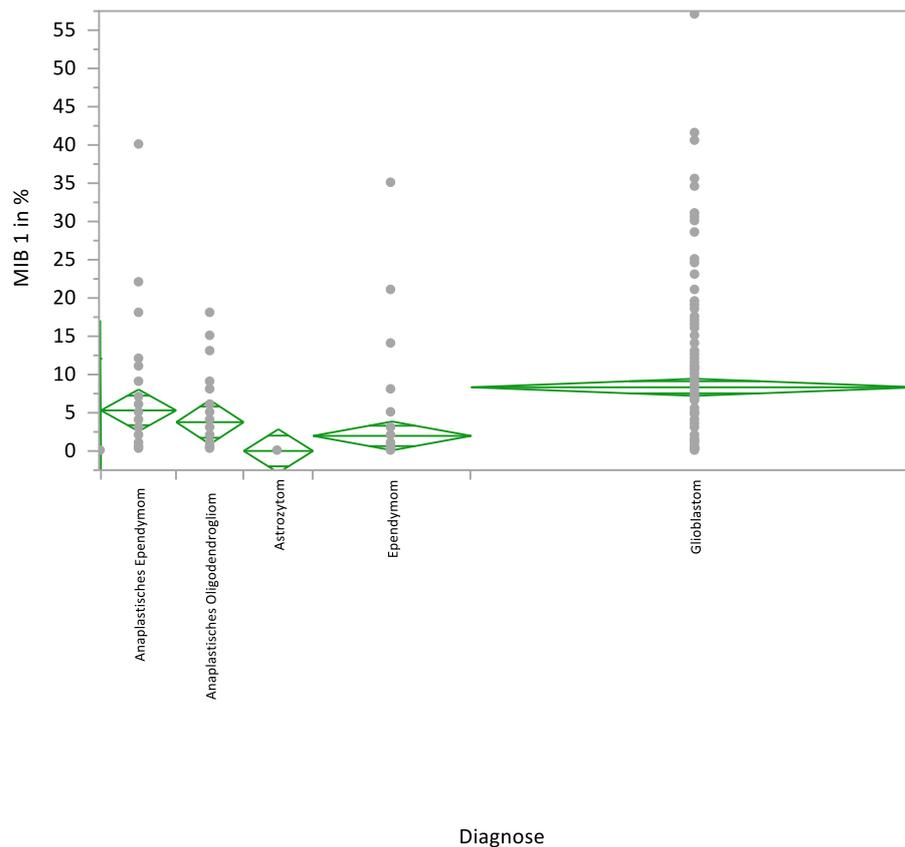


Abbildung 22: Darstellung der MIB1-Proliferationsindex in Prozent in den verschiedenen Tumorentitäten.

Für die Einfaktorielle Analyse von MIB1 in Prozent nach den WHO Graden III und IV konnte ebenfalls eine höchste Signifikanz nachgewiesen werden, ein steigender MIB1-Wert entspricht einem ebenso steigendem WHO Grad. Die Aussage, dass der MIB1-Proliferationsindex einen Nachweis für die Wachstumsaktivität der Tumorzellen darstellt und in der heutigen immunhistochemischen Diagnostik dem Routinestandard entspricht, gilt dadurch, in Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen, bestätigt.

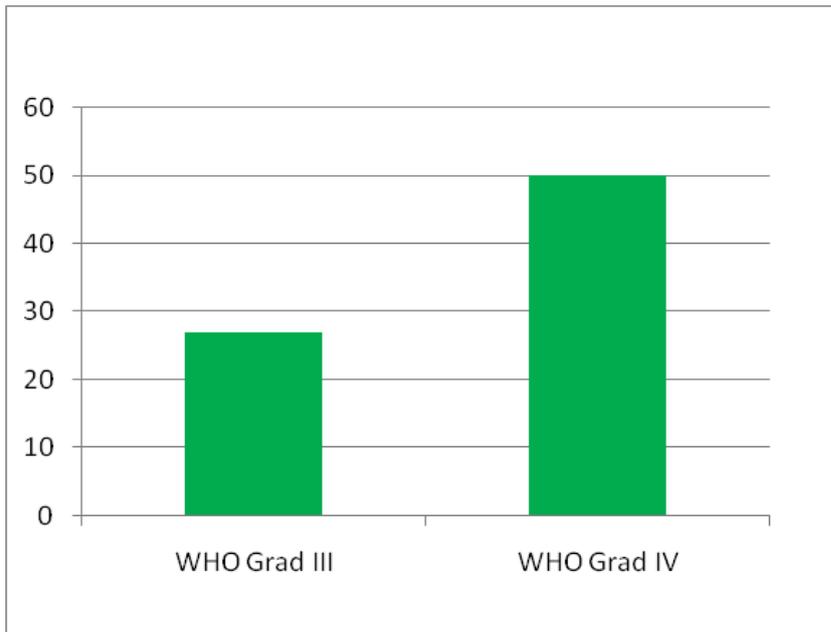


Diagramm 17: Verteilung der WHO Grade III und IV in Prozent bezogen auf den mittleren MIB-1 Proliferationsindex in Prozent.

Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte mit dem MIB1-Proliferationsindex in Prozent

Um eine aussagekräftige Angabe der Wahrscheinlichkeit einer Signifikanz zwischen den Cofilin Mittelwerten und dem MIB-1 Index treffen zu können, wurde auf die einfaktorielle Analyse zurückgegriffen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine höchst signifikante Assoziation zwischen den steigenden Cofilin Mittelwerten bzw. den MIB-1 Werten besteht ($p < .0001$; $n=251$).

3.1.10. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte und dem MGMT-Methylierungsstatus

3.1.10.1. Allgemeine Verteilung von MGMT nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad

Um einen Verbindung zwischen dem Erkrankungsalter und dem MGMT Status nachzuweisen, wurde die einfaktorielle Analyse benutzt, welche bei der Berechnung des Zusammenhangs zwischen dem Alter des methylierten bzw. unmethylierten Status keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen konnte. Bei der Geschlechterverteilung mittels Kontingenzanalyse konnten 32 weibliche und 48 männliche Patientenproben mit untersuchtem und dokumentiertem

MGMT Status einbezogen werden, womit sich ein Geschlechterverhältnis von M:F=1,5:1 ergab.

Häufigkeiten	MGMT M	MGMT U	
F	24	8	32
M	16	32	48
	40	40	80

Tabelle 17: Verteilung des MGMT Status auf geschlechterabhängige Patientenproben (M: methyliert, U: unmethyliert).

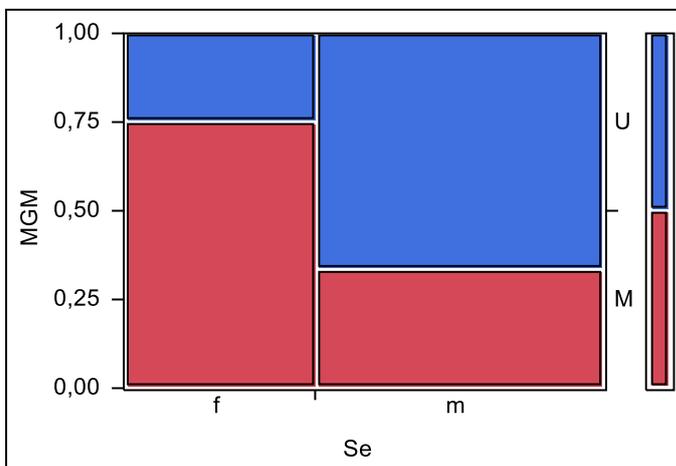


Abbildung 23: Kontingenztabelle von MGMT Status nach Geschlecht.

Wie aus den Analysen ersichtlich konnte bei der Geschlechterverteilung ein signifikantes ($p=0.003$) Ergebnis ermittelt werden. Die Frauen zeigten in 75% einen methylierten Status, während hingegen die Männer mit nur 33,3 % diesen Status vorwiesen.

Da der MGMT-Status in dieser Arbeit lediglich von den GBMs untersucht wurde, konnte nur für die GBMs bzw. den WHO Grad IV die entsprechenden Analysen durchgeführt werden.

Durch eine Einfaktorielle Analyse nach Alter und MGMT-Status konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Methylierungsstatus erhoben werden ($p=0.2501$).

3.1.11. Einfaktorielle Analyse der Cofilin Mittelwerte im Vergleich der Primärtumore und Rezidive

3.1.11.1. Allgemeine Verteilung der Primär- und Rezidivtumore nach dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorentität und dem WHO Grad

Durch eine Einfaktorielle Analyse von Alter nach Primär/Rezidivtumor konnte mit $n=465$ und einem p -Wert von $<.0001$ ein signifikanter Unterschied errechnet werden. Es zeigte sich ein mittleres Erkrankungsalter von 54,5 Jahren bei der Ersterkrankung, während hingegen bei den Rezidiven ein Erkrankungsalter bei Diagnose eines Rezidives bei 43,6 Jahren lag.

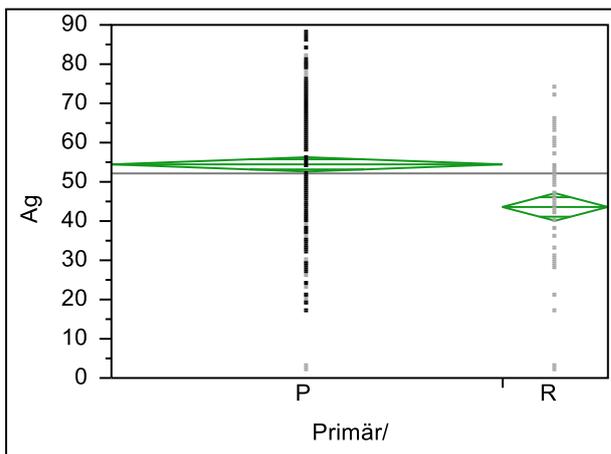


Abbildung 24: Einfaktorielle Analyse der Primär- und Rezidivtumoren und dem Erkrankungsalter.

Bei der Analyse der Geschlechterverteilung der Primär/Rezidivtumoren konnte, trotz einer kleineren Anzahl, mit einem $p= 0.001$ signifikant häufiger Anteil an männlichen Fällen berechnet werden.

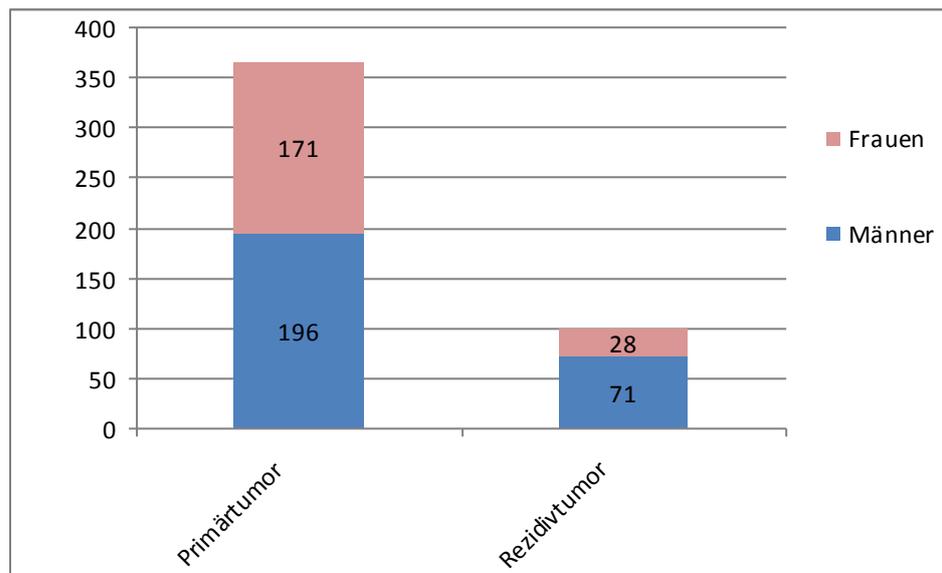


Diagramm 18: Verteilung der Geschlechter auf die Primär- und Rezidivkrankungen.

Eine Analyse zur Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen den WHO Graden und den Primär- und Rezidivkrankungen ergab keine signifikanten Unterschiede.

Die Verteilung der Primär- und Rezidivkrankungen stellt folgendes Balkendiagramm dar:

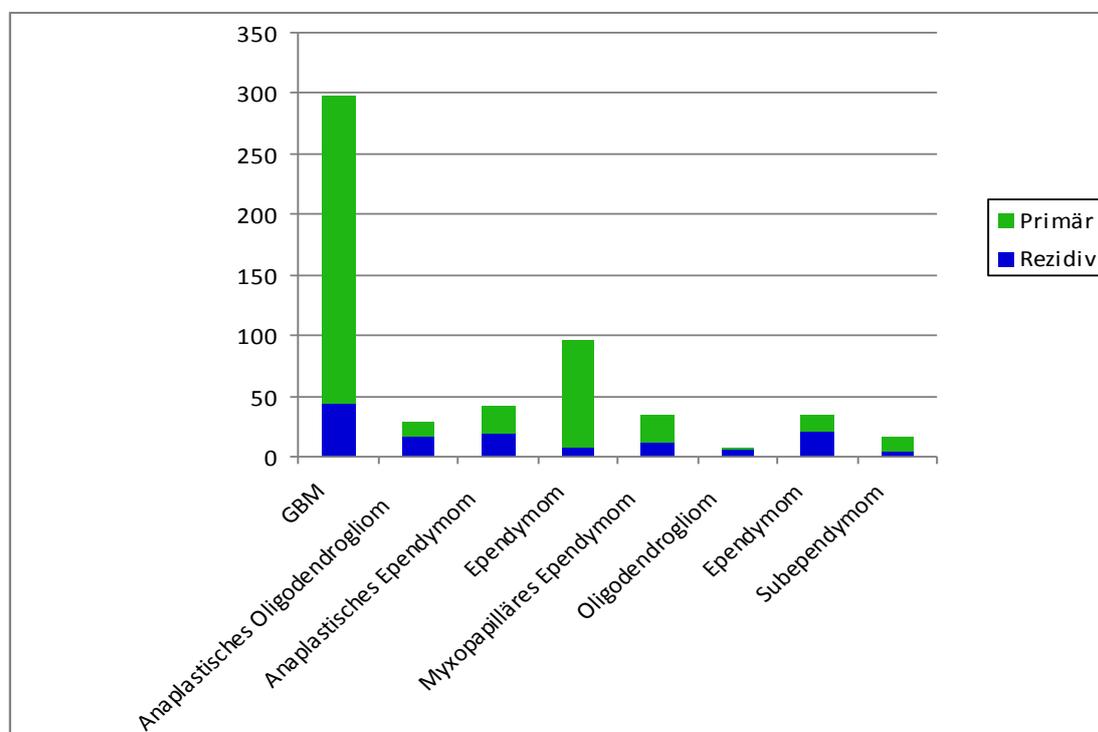


Diagramm 19: Verteilung der Primär- bzw. Rezidivtumore in den Tumorentitäten.

Korrelationsanalysen der Cofilin Mittelwerte und den Primär- bzw. Rezidivtumoren

Bei dieser Analyse konnte keinerlei Signifikanz erkannt oder ein Zusammenhang zwischen den beiden Parameter errechnet werden, so dass die Aussage getroffen werden kann, dass zwischen den Cofilin Mittelwerten in Primär- und Rezidivtumor keinerlei Unterschiede bestehen.

3.1.12. Überlebensanalysen mittels Kaplan-Maier-Analyse

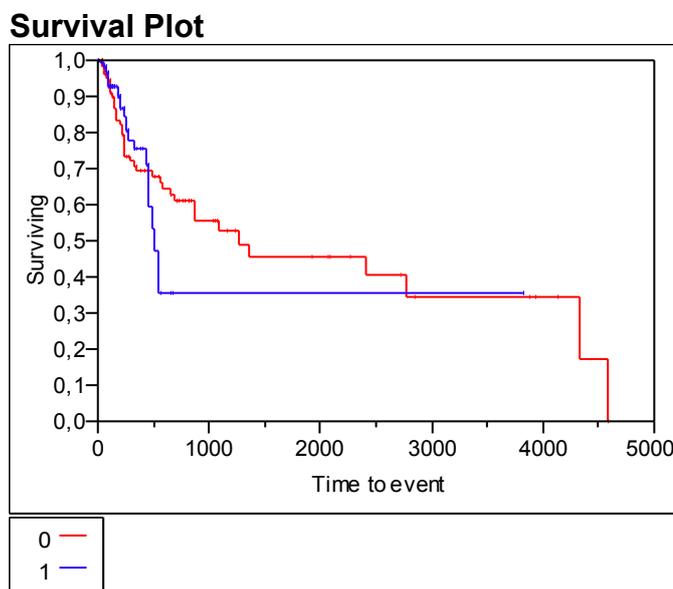


Abbildung 25: Kaplan-Maier-Überlebensanalyse: 0: low expressors, 1:high expressors.

Die Kaplan-Maier-Überlebensanalyse konnte durch die Datenreihe mit den low expressors und den high expressors sowie der „Time to event“-Datenreihe erstellt werden. Zum Ausdruck dieser Analyse kam eine mediane Überlebenszeit von 1272 Tagen (687-4326) bei den low expressors und eine mittlere Überlebenszeit von 508 Tage (585-2779) bei den high expressors.

Sowohl nach Log-Rank-Test (Prob>ChiSq 0.7269) als auch den Wilcoxon-Test (Prob>ChiSq 0.5721) konnte zwischen den beiden Gruppen keine Signifikanz beobachtet werden, so dass die Cofilin Überexpression als prognostischer Faktor nicht bestätigt wird bzw. keine klinische Relevanz belegt.

4. Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der immunhistochemischen Untersuchung einer Expression von Cofilin in hirneigenen Tumoren und die Korrelation dieser Daten mit klinisch relevanten Parametern.

Für die erhobenen Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit erfolgt nun die Interpretation selbiger mit Vergleich anderer Studien unter Begutachtung der in der jeweiligen Studie verwendeten Methoden.

Durch die erfolgreiche Herstellung von zwei TMA mit 198 GBM-Patientenproben konnte eine ausreichend hohe Fallzahl für die Cofilin Färbungen erreicht werden, welche statistisch nach einer visuellen Beurteilung durch einen entsprechenden Score erfasst wurden. Dieser Mittelwert wurde aus den Datensätzen von zwei Observern berechnet.

4.1. Betrachtung der Ergebnisse der Allgemeinen Verteilungsanalysen ohne Cofilin Expression

Bei der Betrachtung der Verteilung des Erkrankungsalters mit den verschiedenen Tumorentitäten und WHO Graden konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Alter auch die Malignität der Tumore zunahm. Dies ist durch die Literatur ebenfalls belegt (Burger, 2002).

Um die Ergebnisse der Analysen bei den GBM-Fällen bezüglich Alter und Geschlecht zu bestätigen, konnten übereinstimmende Resultate in der Literatur gefunden werden (Habberstad, 2012). Die Signifikanz im Geschlechterverhältnis konnte mit einem Geschlechterverhältnis der GBM-Patienten M:F: 1,5 :1 belegt werden, Habberstad et al mit einem Verhältnis M:F: 1,3:1. Auch Ohgaki et al. konnte mit ihren Ergebnissen und Zahlen belegen, dass bei den GBMs die Männer häufiger betroffen sind als die Frauen (USA: M:F=1.26:1; Schweiz: M:F = 1.28:1) (Ohgaki, 2005). Damit wird deutlich, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Datensätze weitgehend der in der Literatur bekannten Verteilung entspricht und somit als repräsentativ für eine GBM-Kohorte gelten kann.

Die AAs wiesen ein Geschlechterverhältnis von M:F:1,6:1 auf, die Medulloblastome M:F: 1,9:1, welches wiederum in der Gesamtbeobachtung mit Beobachtungen und Resultaten anderer Literatur verifiziert werden konnte (Ohgaki, 2005a). Für ein Geschlechterverhältnis anderer Tumorentitäten werden auf Vergleiche mit der Literatur verzichtet, da das Kollektiv entweder zu klein war oder keine repräsentative Geschlechterverteilung vorlag.

Bei der Ermittlung der Tumorlokalisationen konnte für alle Tumorentitäten zusammen das Kleinhirn als häufigste Lokalisation ermittelt werden. Die größte Vertretungsgruppen im Kleinhirn bildeten erwartungsgemäß die Medulloblastome mit einer Fallzahl von n=76 und resultierende 57%, gefolgt von den Ependymomen. Zerebelläre GBMs sind auch im hier untersuchten Kollektiv selten (Takahashi, 2014) und in den hier durchgeführten Analysen hatten die GBMs mit n=70 und somit 77% den höchsten Anteil im temporalem. Laut CBTRUS sind 54% aller malignen Tumore im Frontallappen lokalisiert (mit 23%), gefolgt vom Temporallappen (mit 17%) und nachfolgend mit 10% im Parietallappen (CBTRUS 2011). Die Abweichung der vorliegenden Daten könnte durch die hier recht häufig vorkommende Lokalisationseinteilung „multiple“ begründet werden, da hier aufgrund von diffuser Infiltration keine genauere Ursprungslokalisation mehr ausgemacht werden konnte. Gestützt wird diese Aussage auch durch die Tumorentitäten GBMs, die in der multiplen Lokalisation mit n=60 einen Anteil von 91% erhielten und in den einzelnen Verteilungsanalysen sowohl bei der frontalen Lokalisation, als auch bei der temporalen und parietalen Lokalisationen jeweils den größten Prozentanteil aufwiesen.

Da unser Gesamtkollektiv hinsichtlich Alter, Geschlecht und Lokalisation weitgehend übereinstimmt mit den bekannten Daten z.B von CBTRUS, können die Datenreihen des Cofilin-Projektes als repräsentativ und übertragbar angesehen werden.

4.2. Betrachtung der Ergebnisse der Allgemeinen Verteilungsanalysen mit der Cofilin Expression

Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, daß Cofilin in astrozytären Tumoren exprimiert wird und ist damit im Einklang mit bisherigen Publikationen an Zellkulturen und humanem Gewebe die ebenfalls über eine Expression von Cofilin in Gliomen berichteten (Celestial, 2005, Nagai, 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Cofilin in Ependymomen, PNET und Medulloblastomen vorkommt. Bis auf den Nachweis, daß Cofilin in einer Medulloblastom-Zelllinie exprimiert wird (Gruber-Opilitz, 2009) existierten hierzu bislang keine Daten.

Für die verschiedenen Tumorentitäten konnte wie bereits erwähnt in den Einzelanalysen, getrennt nach Geschlecht, keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Somit ergaben sich keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Cofilin Expression, auch Müller et al. (2011) konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede für Cofilin in Bronchialkarzinomen ermitteln.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem steigenden Erkrankungsalter und den steigenden Cofilin Mittelwerten besteht. Hingegen konnten Müller et al. (2011) keine altersspezifischen Unterschiede für Cofilin in Bronchialkarzinomen ermitteln.

Bei der Analyse der Tumorlokalisierung der einzelnen Tumore mit Cofilin Expression konnten 30% im temporalen Bereich beobachtet werden, gefolgt von 26% mit Sitz im Kleinhirn. Wie bereits bei der Kontingenzanalyse nach Lokalisation ohne Berücksichtigung der Cofilin Expression könnte diese Verschiebung der Tumorlokalisationen durch die Einteilung „multiple“ Lokalisation erklärt werden, wobei für die Tumorlokalisationen mit Cofilin Überexpression in der Referenzliteratur bislang keine Daten vorliegen.

4.3. Vergleich der Cofilin Expression in ZNS-Tumoren und anderen Neoplasien

In unseren Korrelationsanalysen konnte gezeigt werden, dass mit einer Zunahme des WHO Grades bzw. in den jeweiligen höhergradig maligner werdenden Tumorentitäten eine Erhöhung der Cofilin Expression stattgefunden hat. In einer Arbeit von Nagai et al. konnte 2014 eine ansteigende Cofilin Expression mit den ansteigenden WHO Graden in 49 malignen Astrozytomen gezeigt werden (Nagai, 2014). Diese Beobachtung wird weiter durch die von Yap et al. gemachten Beobachtungen gestützt. In diesem Review über die Motilität der Tumorzellen in GBMs konnte gezeigt werden, dass die Beweglichkeit der Krebszellen von der intrazellulären Konzentration des Cofilins moduliert wird. Da der Cofilin Signalweg eine große Bedeutung in der Aktivierung der Zellmobilität hat, könnte dies somit ein Beweis sein, dass durch die Beeinflussung des Zytoskeletts, durch das überexprimierte Cofilin, die Invasivität und damit die Proliferation des Zellwachstums vorangetrieben wird (Yap, 2005). Im Einklang mit unseren Daten konnte in funktionellen Studien mit Astrozytom-Zellkulturen gezeigt werden, dass ein siRNA knockdown von Cofilin die Migration und Invasion dieser Zellen hemmt (Nagai, 2011). Weiter konnte in dieser Arbeit von Nagai et al. bei den Astrozytomen mit steigender Malignität eine steigende Cofilin Konzentration gezeigt werden. Dabei wurde die Rolle des Cofilin Signalweges bei der Migration und Invasion von Astrozytomen untersucht, jedoch konnte kein repräsentatives Gesamtkollektiv herausgearbeitet werden. Wie in dem hier untersuchten Patientenkollektiv wurden auch in Nagais Arbeit mittels TMA die immunhistochemischen Cofilin Anfärbungen vorgenommen. Im Gegensatz zu den TMAs in Selbstproduktion wurden bei Nagai die TMA kommerziell erworben und beinhalteten lediglich 55 Tumorstanzen mit astrozytären Tumorproben und fünf Stanzen mit Normalhirnpräparat im Gegensatz zu den hier erstellten Datensätzen mit 314 GBM-, 94 AA-, 88 Medulloblastom- und 82 Astrozytom-Stanzen. Eine Antikörperkonzentration bzw. Verdünnung von Cofilin wurde nicht angegeben. Weitere immunhistochemische Arbeiten mit Cofilin an humanen Hirntumoren sind derzeit nicht bekannt.

Da Mitglieder der ADF/Cofilin-Familie schon lange in Verdacht stehen, die Zellbeweglichkeit zu unterstützen, erforschten Celestial et al. den Einfluss von Cofilin in der human GBMzelllinie U373MG. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Cofilin Überexpression in U373MG GBM-Zellen ihre Motilität erhöhen ohne Auswirkung auf die Zellmorphologie oder die Zellgröße. Des Weiteren konnte die intrazelluläre Cofilin Konzentration mit der Zellfortbewegungsrate in Zusammenhang gebracht werden (Celestial, 2005). Mit dem in der aktuellen Arbeit erbrachten Nachweis einer Cofilin Expression in den Tumorproben könnte dieser Ansatz in vivo und in vitro weiter verfolgt werden.

Bei Studien des Cofilin Signalweges in Mamma-Karzinomen zeigen neuere Erkenntnisse, dass die Metastasierungseigenschaft ein angeborenes und nicht später erworbenes Ereignis darstellt. Diese Erkenntnis ist damit wegweisend für eine neue Theorie der Metastasengeneses. Bei der Interpretation dieser Daten konnte, im Zusammenhang mit diesen neuen Theoriemodellen, dem Cofilin-Signalweg eine große Bedeutung in der Metastasenentstehung zugeschrieben werden. Die Studien zeigen, dass die Gesamtaktivität des Cofilin Signalweges den invasiven und metastatischen Phänotyp der Tumorzellen bestimmt. Somit können mit diesen Ergebnissen die Überlegungen angestellt werden, dass Inhibitoren, die an den Ende des Cofilin Signalweges angreifen, einen therapeutischen Vorteil bzw. Benefit im Kampf gegen die Metastasenentstehung darstellen. Ebenso konnte ein Muster in der Genexpressionsveränderung regelmäßig beobachtet werden, welches gehäuft im Cofilin Signalweg von Brusttumoren oder von ihm abtrünnige Zellen auftritt (Wang, 2007). Diese Daten sind im Einklang mit der bei uns beobachteten zunehmenden Cofilin Expression in Verbindung mit der höheren Tumordignität. Zur weiteren Unterstützung der Aussage, dass Cofilin eine Überexpression bei höhergradigen Tumoren erfährt, konnten auch erwartungsgemäß repräsentative Arbeiten zu weiteren Tumorarten wie den Mammatumoren gefunden werden. So stellte Wang et al. mit einer Arbeit 2006 dar, dass sich zum Cofilin-Aktivitätsstatus bzw. der LIMK1 ein direkter Zusammenhang zwischen Invasion, Intravasation und Metastasierung bei Mammakarzinomen finden ließ. Die LIM Kinase 1 gehört zu den Serin-Threonin-Proteinkinasen und hat die Aufgabe,

über eine Phosphorylierung von Cofilin eine Stabilisierung der Aktinfilamente zu erreichen; Cofilin stellt ein Substrat dieser LIMK1 dar, so dass das Cofilin seine Aufgabe bei der Zellmigration durch Polymerisation und Depolymerisation leisten kann. Somit konnte die Aussage getroffen werden, dass eine LIMK1-vermittelte Erhöhung oder Erniedrigung des Cofilin Signalweges zu einer gesteigerten oder verringerten Motilität und Metastasierung von Tumorzellen führt (Wang, 2006). Auch zu den GBMs machte Park et al. 2014 die Beobachtung, dass bei einer Genexpressionsanalyse die LIMK1/Cofilin Proteine in diesen Signalweg involviert sind (Park, 2014).

Weitere Literatur konnte im Zusammenhang mit Ovarialkarzinom, ebenfalls mit einer Hochregulation von LIMK1, gefunden werden. Hier konnte eine erhöhte Zellproliferationsrate und Metastasierung bei einer gleichzeitigen Erhöhung von Cofilin beobachtet werden (Chen, 2014). Dabei sei erwähnt, dass die erhöhte Zellproliferation widersprüchlich zu der Untersuchung von Bravo-Cadero 2013 steht, in der gezeigt werden konnte, dass zwar die Kontraktilität, jedoch nicht die Zellproliferation erhöht waren. Somit könnte die Vermutung geäußert werden, dass diese beobachtete Zellproliferation durch andere onkogene Faktoren oder nicht untersuchte Mutationen entstanden sind.

In einer weiteren Arbeit über Prostatakarzinome (Collazo, 2014) wurde die Frage nach der Cofilin Steuerung bei der Zellinvasion und Metastasierung auf TGF- β aufgeworfen, welches unter anderem die Zellproliferation und -differenzierung beeinflusst und eine antiinflammatorische Wirkung besitzt. Hier konnte festgestellt werden, dass mit Cofilin eine Korrelation mit einer Metastasierung sowohl im Mausmodell als auch in menschlichen Prostatakarzinomen besteht. Schlussfolgerung war, dass sich die Cofilin Expression signifikant in bereits metastasierten Karzinomen erhöhte und die Reaktionen auf TGF- α vereint, die für eine invasive Krebszellmigration und eine Metastasierung notwendig sind.

Zu den Adenokarzinomen des Colons konnte ebenso gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus des Cofilins einen Faktor darstellt, der die Organisation des Zytoskeletts und der Migrationsfähigkeiten von Kolon-Adenokarzinom LS180-Zellen beeinflusst (Popow-Wozniak, 2012).

Auch bei Blasenkrebs sei erhöhte Expression und Phosphorylierung von Cofilin bei der Entstehung und Invasivität der Tumorzellen von Bedeutung (Chung, 2013).

In der Dermatologischen Onkologie konnten zu Untersuchungen von K1735-murinen Melanomzellen festgestellt werden, dass Cofilin, zusammen mit dem in dieser Studie miteinbezogenen $\alpha\beta 3$ -Integrin, die K1735-Melanom- Zellinvasion mitbeeinflusst (Dang, 2006).

Zusammenfassend konnte somit festgestellt werden, dass die Cofilin Expression einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Metastasierung, die Motilität und die Kontraktilität der Tumorzelle zu haben scheint, in Hinsicht auf die Zellproliferation jedoch widersprüchliche Ergebnisse zeigt. Die hier gewonnenen Daten legen nahe, dass dieselben Annahmen für auch für Gliome getroffen werden können.

4.4. Cofilin Expression und andere tumorassoziierte Faktoren

4.4.1. WT1 Protein und MIB-1 Proliferationsindex

Durch die hier ermittelten signifikanten positiven Korrelationen der WT1-Expression und den Cofilin Mittelwerten konnte die Aussage der Vorarbeiten von Schittenhelm et al. gestützt werden, dass die WT1-Expression ein häufigeres Phänomen in neuroepithelialen Tumoren darstellt und mit steigender Malignität der Tumore auch eine Erhöhung des WT1 Scores einhergeht. Vermutlich beruht dieses Phänomen auf der Beteiligung des WT1 Proteins an der Zellproliferation und seiner onkogenen Rolle in der Zellproliferation von Gliomen (Kijima, 2014), welches durch eine nachweisbare Korrelation mit dem MIB-1 Proliferationsindex gestützt wird. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß eine forcierte Überexpression von WT-1 in Karzinomzellen eine morphologische Änderung von Tumorzellen und damit auch zu einer veränderten Cofilin-Expression führt (Jomgeow, 2006). Als eher unwahrscheinlich lässt sich diskutieren, ob WT1 als Tumorsuppressor wirkt, wogegen aber auch die nicht vorhandene und nachgewiesene Assoziation mit dem p53 spricht, obwohl diese beiden Proteine miteinander funktionell

interagieren (Maheswaran, 1993). In einer Arbeit mittels Proteomanalyse über Kolorektale Karzinome konnte ebenfalls der direkte Einfluss des Cofilins auf den MIB-1 Proliferationsindex beobachtet werden (Stierum, 2003).

Stützend zu diesen Annahmen konnte in einer weiteren Publikation über die Expression von WT1 in GBMs und Medulloblastomen gezeigt werden, dass von 51 GBM-Proben 48 eine positive Färbung auf WT1 zeigten, während hingegen bei den Medulloblastomen keine Expression nachweisbar war und somit die wichtige Rolle des WT1 in der GBM-spezifischen Tumorgenese gesehen werden muss (Nakahara, 2004). In dieser Arbeit konnten z.B. die GBMs in über 50% der Fälle einem WT1-Score von 3 und 4 zugeordnet werden. Dieses Resultat konnte durch einen signifikanten Zusammenhang mit dem Proliferationsmarker MIB-1 gestützt werden und dadurch die Annahme, dass WT1 ebenfalls an der onkogenen Zellproliferation mitwirkt, noch unterstrichen werden kann.

Die Frage „Was passiert bei einer Cofilin Überexpression?“ wurde in einer Studie 2005 untersucht, bei der in einen Tetracyclin-induzierten Genexpressionsvektor Fremd-DNA übertragen wurde in Form von Cofilin cDNA, welcher wiederum in menschliche Lungenzellkarzinomzellen transfiziert wurde. Die Folgen davon konnten durch Analysen und mikroskopischen Untersuchungen ermittelt werden: Es resultierten eine Destabilisierung von Aktinfilamenten und morphologische Umwandlung. Bei den vorgenommenen Messungen zur Wachstumsrate konnte nun gezeigt werden, dass die Zellproliferation in Zellen mit Cofilin Überexpression verzögert war. Ungefähr 90% dieser Zellen verharrten in der G1 Phase des Zellzyklus (Lee, 2005). Die G1-Phase der Interphase in der Mitose ist durch ein starkes Wachstum und eine Steigerung der Proteinsynthese gekennzeichnet. Im Einklang mit früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Störungen im Aktinfilament, die z.B. durch Drogen verursacht wurden, eine Arretierung in der G1-Phase als Folge aufwiesen. Somit wäre die Aussage bestätigt, dass Zellen mit überexprimierten Cofilin kein erhöhtes Zellwachstum aufweisen, da auch hier eine „Störung“ vorliegt und sich daraus keine erhöhte Zellproliferation durch das Verharren in der G1-Phase ergibt. Dies könnte daran liegen, dass Cofilin zwar die Aktinfilamente trennt,

jedoch die Depolymerisation nicht verbessert und darüber hinaus das Cofilin an der Unterstützung der Kontraktilität der Zellen beteiligt ist. Hierzu passt auch die Beobachtung in dieser Arbeit, daß die Cofilin-Expression unabhängig von der MIB-1 Proliferationsrate ist. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass Cofilin eine zentrale Kontrollfunktion in der Aktindynamik einnimmt, der Einfluss auf den Zellzyklus jedoch eher gering ist (Bravo-Cordero et al., 2014).

4.4.2. MGMT-Methylierungsstatus

Des Weiteren konnten die vorliegenden Ergebnisse für den bei Gliomen therapeutisch und prognostisch relevanten MGMT Promotormethylierungsstatus einen signifikanten Zusammenhang mit unmethyliertem MGMT Promotor und der Expressionsaufregulation von Cofilin zeigen. In einer Studie über bösartige Hirnstammgliome von 2014 wurden klinisch-pathologische Parameter untersucht, u.a. auch die Immunreaktion des MGMT-Status, mit dem Ergebnis, dass die Mehrheit der untersuchten AAs und GBMs dieses Protein aufwies, was für einen unmethylierten Promotorstatus spricht (Babu, 2014). In einer systematischen Arbeit und Metaanalyse von 2013 konnte die Aussage bestätigt werden, dass GBM-Patienten mit einem positiven MGMT-Promotormethylierungsstatus sowohl ein längeres Gesamtüberleben als auch einen Vorteil in Hinsicht auf das progressionsfreie Überleben aufwiesen (Chen, 2013, Stupp, 2009). Diese Erkenntnis stützt wiederum die malignitätsassoziierte Rolle von Cofilin, da höhere Mittelwerte selbiger bei den unmethylierten Tumorproben in der aktuellen Arbeit nachgewiesen werden konnten. Es scheint auch hier einen klaren Zusammenhang zu geben, da ein nicht zu vernachlässigender Aspekt zeigt, dass eine Cofilin Erhöhung immer gedeckt wird mit signifikanten Ergebnissen von prädiktiv negativen Parametern und Faktoren. Die Bedeutung des MGMT-Methylierungsstatus konnte ausreichend als prädiktiver Marker z.B. auch in Hinsicht auf ein Ansprechen auf die Temozolomid-Therapie, identifiziert werden (Nagane, 2012).

4.4.3. IDH1

Bei den Analysen des IDH1 Status mit Tumorentität und Alter konnte eine signifikante Assoziation mit den AAs, den GBMs und den Astrozytomen gezeigt werden, ohne jedoch eine Geschlechterabhängigkeit erkennen zu können. Damit stehen die Daten im Einklang mit den Beobachtungen anderer Arbeiten (Yan, 2009). Im Zusammenhang mit der IDH1-Mutationsstatus zeigte sich, dass GBM Patienten mit mutierten IDH1 Status mit 41,6 Jahren ein niedrigeres Erkrankungsalter aufwiesen als unmutierte Patientenfälle (61,3 Jahre). Auch bei den AAs konnte diese Beobachtung gemacht werden, während hingegen bei den Oligodendrogliomen keine Signifikanz ermittelt werden konnte, was auch damit zusammenhängt, dass nahezu alle Oligodendrogliome eine solche IDH1 Mutation aufweisen. Da IDH2 in der aktuellen Arbeit nicht analysiert wurde, ist davon auszugehen, daß die negativen Oligodendrogliome an dieser Stelle mutiert sind. Entsprechend dem jüngeren Erkrankungsalters bei den Patienten mit der IDH1 Mutation im Tumor ein längeres postoperatives Überleben nachgewiesen werden (Kloosterhof, 2011). Im Ergebnis ist die IDH1 Mutation einfach mit einem günstigerem genetischen Profil (G-CIMP Phänotyp) des Tumors vergesellschaftet. Therapeutische Lösungsansätze zielen darauf ab, eher die Verhinderung der Mutation bzw. seine dadurch aktivierten Signalkaskaden zu blockieren (Deng, 2014). Die Annahme, dass die IDH1R132 Mutation durch die onkometabolische Wirkung die Tumorgenese fördert, könnte auch zeitgleich eine Erklärung des jungen Erkrankungsalters darstellen (Zhao, 2009).

In der Betrachtung des IDH1-Mutationsstatus mit den Cofilin Mittelwerten ergab sich ein höchstsignifikanter Zusammenhang zwischen IDH1 Wildtyp und erhöhter Cofilin-Expression. Da bislang keinerlei Studien zu diesem Zusammenhang existieren, kann lediglich hier durch die oben aufgeführten Argumente vermutet werden dass eine gesteigerte Cofilin-Expression ähnlich wie die unmutierten IDH1-Tumore ebenfalls einen prognostischen ungünstigen Faktor darstellt.

4.4.4. p53

Der Tumorsuppressor p53 zeigte in unseren Analysen keine signifikanten Zusammenhänge bezüglich des Patientenalters und dem Geschlecht. Bei Analysen mit den WHO Graden konnte jedoch ein signifikanter Anstieg gezeigt werden, ebenso bei den Tumorentitäten. Damit liegen die Resultate im Einklang mit bisherigen Publikationen (Reifenberger, 1996). Bei einer Untersuchung von p53-mutierten GBMs wurde die Frage zur Lokalisation gestellt, welche zum Resultat hatte, dass die p53 mutierten GBM-Patienten insbesondere und bevorzugt in die Frontallappenregion mit Verlängerung in die lateralen Ventrikel wachsen (Zhang, 2014). In unseren Ergebnissen konnten in Tumoren aus dem Frontallappen keine höheren p53-Expressionswerte beobachtet werden, jedoch haben die Tumore mit einer „multiplen“ Lokalisation und einer hohen Fallzahl zum Teil vermutlich auch ihren Ursprungsort frontal. In der aktuellen Arbeit konnte keinerlei Korrelation mit den Cofilin Mittelwerten ermittelt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Expression von Cofilin unabhängig von p53 ist.

4.4.5. Die Rolle des Cofilin Proteins in der zukünftigen Tumorthherapie

Wie in zahlreichen Publikationen bereits erwähnt, gestaltet sich die erfolgreiche Therapie der hirneignen Tumore, v.a. der GBMs, seit Jahrzehnten sehr schwierig, da selbst mit operativer Komplettresektion und einer Kombinationstherapie aus Strahlen-plus Chemotherapie das Überleben bei über 50% der Betroffenen lediglich ca.12 Monate beträgt (Adamson, 2009). Experimentelle Ergebnisse legen nahe, dass Cofilin die Beweglichkeit von Tumorzellen erhöht (Yan, 2012) und mit den Daten der aktuellen Arbeit, die eine Expressionszunahme von Cofilin mit der Dignität des Tumors und einen Zusammenhang mit der proliferativen Aktivität des Tumors zeigen, kann Cofilin als potentieller Biomarker für eine Entwicklung besserer Therapieansätze in Betracht gezogen werden.

Durch die erzielten Ergebnisse der Arbeit kann die Aussage getroffen werden, dass eine Hemmung des Cofilin Signalweges eine mögliche Option darstellen

könnte, das invasive Wachstum von glialen Tumoren einzudämmen. 2011 formulierte Nagai et al. ebenso, dass dies ein neues therapeutisches Ziel im Kampf gegen die hochmalignen Hirntumore sein könnte. Auch bei Wang et al. 2007 wurde bei einer Studie über den Cofilin Signalweg die Aussage getroffen, dass es ein therapeutischer Ansatz wäre, Inhibitoren am Ende des Cofilin Signalweges bei der Bekämpfung der Metastasierung einzusetzen und somit daraus ein therapeutisches Benefit resultieren würde.

Des Weiteren zeigen Arbeiten über LIMK1 und Cofilin (Park, 2014), dass der Cofilin Signalweg in GBMs im Gegensatz zu normalen Hirngewebe hochreguliert ist. Somit konnte die Aussage getroffen werden, dass auch eine potentielle Verwendung von LIMK-Inhibitoren als weiteres Target der Cofilin-Signalkaskade eine wegweisende Option wäre im Kampf gegen des invasive und diffuse Wachstum der GBMs.

In einer Dissertation über Plattenepithelkarzinome des Ösophagus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Cofilin in der Tumorgenese eine große und wichtige Rolle einnimmt und diese Erkenntnis sowohl für die Diagnose als auch die Prognose dieser Speiseröhrenkarzinome Auswirkungen auf zielgerichtete Therapien haben sollte (Wang, 2010).

Weitere Erkenntnisse zu Cofilin-Inhibitoren waren, dass JG6, ein Oligosaccharid, die Metastasierung von Mammakarzinomen durch Unterdrückung der Cofilinexpression durch Besetzung der Cofilinbindungsstelle bewirken kann (Huang, 2014).

Des Weiteren sollte erwähnt werden, dass eine WT1-Immuntherapie als innovativer Ansatz in der Bekämpfung der GBMs betrachtet wird, jedoch genaue Prognosen zu dem Einfluss auf die Cofilin-Kaskade, bislang fehlen (Chiba, 2010).

4.5. Cofilin Protein als diagnostischer und prognostischer Faktor

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse hinsichtlich der steigenden Expression von Cofilin in den WHO Graden II bis IV, der Assoziation mit einem unmethyliertem MGMT Promotor und mit IDH1 Wildtypstatus des Tumors zeigt sich eine mögliche prognostische Relevanz von Cofilin als Immunhistochemie-Marker, da eine Cofilinexpressionszunahme mit einem aggressiven und malignerem Verhalten der Tumorentitäten korreliert.

Bei Erkutlu, 2013 konnte ebenfalls bei GBM-Patientenproben ein signifikanter prognostischer Zusammenhang zwischen dem übermäßigen Vorhandensein von Cofilin (betreffend als Rho-Kinase-Signalweg relevantes Gen) und dem Überleben der Patienten festgestellt werden.

Mit dem Studie von Cofilin im Plasma konnte bei Patienten mit Lungenkarzinomen bewiesen werden, dass im Vergleich zu Stadium II-Patienten, Patienten mit dem fortgeschrittenem Stadium III und IV einen signifikant höheren Cofilin-Spiegel aufwiesen (Nan, 2013). In einer weiteren untersuchenden Arbeit über kleinzellige Lungenkarzinome (Becker, 2014) konnte die Aussage getroffen werden, dass hohe Cofilin-1 Konzentrationen ein genauer Prognosefaktor darstellt bzw. eine Vorhersage über das Nichtansprechen auf eine Cisplatin-Chemotherapie ermöglicht.

Ebenso konnte bei anderen Karzinomarten wie Ovarialkarzinomen gezeigt werden, dass ein Nachweis von Cofilin die Entwicklung von Ovarialkarzinomen voraussagen konnte und somit in das weitere Progressionsverhalten des Tumors mit einbezogen werden kann (Zhou, 2012) (Nishimura, 2011).

Somit kann generell gesagt werden, dass Cofilin einen Anhalt für die Prognose des Patienten über das mögliche Wachstum des Tumors bieten kann. Demensprechend kann eine gute Aussage zur Malignität der Gehirntumore getroffen und in Kombination mit anderen Malignitätsmarkern die Darstellung gefestigt werden.

Cofilin konnte, neben Arp3, ebenfalls ein Protein bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts, als Biomarker sowohl für eine Metastasierung als auch für eine schlechte Prognose bei Plattenzellkarzinomen/adenosquamösen Karzinomen und Adenokarzinomen der Gallenblase dargestellt werden, da eine Assoziation

mit dem Ausmaß des Tumors und hohen TNM-Stadien gezeigt werden konnte (Yang, 2013).

In Hinsicht auf das Gesamtüberleben und damit die Prognose kann in dieser Arbeit Cofilin nicht als prognostischer Faktor betrachtet werden, da die Berechnung der Überlebenszeit durch die Kaplan-Maier-Analyse bzw. der jeweiligen Cofilin Mittelwerte keine ausreichende Signifikanz in Hinsicht auf visuelle Beurteilung bzw. Differenzierung aufweist. Jedoch kann Cofilin als möglicher diagnostischer Faktor (z.B. hohe Cofilin-Expression in einem niedriggradigem Gliom als Indikator für einen unterdiagnostizierten Fall) berücksichtigt werden, sollte jedoch in prospektiven Studien überprüft werden.

5. Zusammenfassung

Das Cofilin stellt ein physiologisch vorhandenes Protein der ADF/Cofilin Familie des Zytoskeletts dar. Das Verständnis der Funktion bezieht sich nach heutigem Stand auf die Aufgabe in der Aktindynamik. Durch die Erkenntnis einer Überexpression in malignen Zellen wird ein Einfluss auf die Tumorzellmotilität angenommen. Eine erhöhte Cofilin Expression konnte sowohl in diversen Karzinomarten wie dem Mammakarzinom oder dem Lungenkarzinom, aber auch einzelnen hirneigenen Tumoren nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war, Aufschluss zu erhalten, ob Cofilin einen prognostisch und diagnostisch wichtigen Faktor in Hirntumoren darstellt.

In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung und Ermittlung der Cofilinexpression mittels Immunhistochemie in den am häufigsten auftretenden Tumoren des zentralen Nervensystems, den GBMs, sowie der AAs, Medulloblastome, PNETs und Ependymomen anhand eines großen Patientenkollektivs mit n=794. .

Für die Schnitte der Cofilin Anfärbungen der GBMs wurden selbstständig zwei sogenannte TMAs mit 188 Stenzen hergestellt, für die weiteren Tumorentitäten wurden bereits vorhandene TMAs verwendet und der Cofilin Färbung unterzogen.

Die Gesamtzahl der auswertbaren Stenzen betrug bei den GBMs n=314 mit 290 Cofilin Anfärbungen, 94 AAs mit 72 Cofilin Anfärbungen, 88 Medulloblastome bei siebenzig Cofilin Anfärbungen, 45 Ependymome mit 32 Cofilin-Anfärbungen und 82 Astrozytomen mit 73 erreichten Cofilin Anfärbungen und PNETs mit n= 22 mit 15 Cofilin Anfärbungen.

Nach der Erhebung und der Erfassung der tabellarisch angelegten Datenreihen konnten die analytischen Untersuchungen auf signifikante Zusammenhänge zwischen den Cofilin Mittelwerten und den einzelnen klinisch relevanten Parametern wie Tumorentität, Alter, Geschlecht, WHO Grad, Primär/Rezidivstatus MGMT Promotorstatus, IDH1 Mutationsstatus, der p53-

Expression, dem WT1 Protein und dem MIB-1 Proliferationsindex durchgeführt werden.

Es zeigte sich für die einzelnen Tumore eine mit der Malignität zunehmende Cofilin-Expression mit niedrigsten Werten im Astrozytom WHO II und höchsten Werten in Glioblastomen WHO Grad IV, Eine Zunahme der Cofilinexpression war signifikant mit zunehmendem Alter, unmethyliertem MGMT-Promotor, IDH1 Wildtyp des Tumors, erhöhtem WT1 score des Tumors assoziiert. Keine Expressionsunterschiede fanden sich für das Geschlecht, Primär/Rezidivstatus des Tumors, der MIB-1 Proliferatiun und der p-53 Expression. Trotz des Zusammenhanges mit den o.g. prognostisch ungünstigen Faktoren war das mittlere Gesamtüberleben von Patienten mit hoher Cofilin-Expression nicht signifikant verschieden von denen mit geringer Expression.

Die Daten der Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass die erhöhte Cofilin-Expression in Hirntumoren ein malignitätsassoziierter Faktor ist und möglicherweise das invasive Verhalten beeinflusst, aber keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorphroliferation und das Gesamtüberleben aufweist.

6. Literaturverzeichnis

Adamson C, Kanu OO, Metha AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD (2009) Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we going. *Expert Op in Investig Drugs*. Aug;18(8):1061-83.

Agaoglu FY, Aya, Kebudi R, Gorgun O, Darendeliler E (2005) Ependymal tumors in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. Sep;45(3): 298-303.

Anton K, Baehring JM, Mayer T (2012) Glioblastoma multiforme:overview of current treatment and future perspectives. *Hematol Oncol Clin North Am*. Aug; 26 (4):825-53.

Arseni, C, Ciurea AV (1981) Statistical survey of 276 cases of medulloblastoma (1935-1978). *Acta Neurochir* 57:159-162.

Babu R, Kranz PG, Agarwal V, McLendon RE, Thomas S, Friedmann AH, Bigner DD, Adamson C (2014) Malignant brainstem gliomas in adults: clinicopathological characteristics and prognostic factors. *J Neurooncol*. Aug;119(1):177-85.

Bailey P, Cushing H (1930) *Die Gewebeverschiedenheit der Gliome*. Fischer, Jena.

Becker M1, De Bastiani MA, Müller CB, Markoski MM, Castro MA, Klamt F (2014) High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas. *Tumour Biol*. Feb;35(2):1233-8.

Benjamin R, Capparella J, Brown A (2003) Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics. Massachusetts General Hospital, Brain Tumor Center, Boston, Massachusetts 02114, USA. *Cancer J*. Mar-Apr;9(2):82-90.

Bourne T, Schiff D (2010) Update on molecular findings, management and outcome in low-grade gliomas. *NatRev Neurol*.Vol.6,No.12, pp695-701.

Brandes AA (2003) State-of-the-art traetment of high-grade brain tumors. *Semin Oncol*.Dec;30(6 Suppl 19):4-9.

Bravo-Cordero J, Magalhaes M, Eddy RJ, Condeelis J (2013) Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nar Rev Mol Cell Biol*. Jul:14(7).

Brugieres L (2010) Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations. *J.Med.Genet*.47, 142-144.

Bruner JM (1994) Neuropathology of malignant gliomas. *Semin. Oncol.*, 21, 126-38.

Buchmann E, Zülch KJ (1959) Zur Frage der postoperativen Überlebensdauer und der Feinmetastasierung beim Medulloblastom des Kleinhirns. *Acta Neurochirurgica*, Volume 7, Issue 3, pp263-273.

Bucy PC, Tieman PW (1968) Astrocytomas of the cerebellum - a study of a series of patients operated upon over 28 years ago. *Arch. Neurol.*, 18, 14-9.

Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS (2002) *The Brain-Tumours*. Surgical pathology of the Nervous System and its Coverings 4:161.

Burger PC (1995) Revising the World Health Organization (WHO) Blue Book--'Histological typing of tumours of the central nervous system. *J Neurooncol.* 24(1):3-7.

CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States (2006) Statistical report table. <http://www.cbtrugs.org>. (Zugriff 12.02.2014)

CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States (2011) Statistical report table. <http://www.cbtrugs.org>. (Zugriff 15.02.2014)

CBTRUS: Central brain tumor registry of the United States (1995) First annual report. <http://www.cbtrugs.org>. (Zugriff 15.02.2014)

Celestial T Yap, Simpson I, Pratt T, Price DJ, Maciver SK (2005) The Motility of glioblastoma Tumour Cells is Modulated by intracellular Cofilin Expression in a Concentration-dependent Manner. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 60:153-165.

Chen P, Zeng M, Zhao Y, Fang X (2014) Upregulation of Limk1 caused by microRNA-138 loss aggravates the metastasis of ovarian cancer by activation of Limk1/cofilin signaling. *Oncol Rep.*Nov;32(5):2070-6.

Chen Y, HW, Shao H, Zhang Yu F, Zhou Y (2013) MGMT promoter methylation and glioblastoma prognosis: a systematic review and metaanalysis. *Arch med Res.* May;44(4):281-90.

Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Rabo C, Oka Y, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T (2010) Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients. *Brain Tumor Pathol.* Apr;27(1):29-34.

Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, Lau CC, Olson JM, Gilbertson RJ, Gajjar A, Delattre O, Kool M, Ligon K, Meyerson M, Mesirov JP, Pomeroy SL (2011) Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J.Clin.Oncol.* 29, 1424-1430.

Chung H, Kim B, Jung SH, Won KJ, Jiang X, Lee CK, Lim SD, Yang SK, Song KH, Kim HS (2013) Does phosphorylation of cofilin affect the progression of human bladder cancer? *BMC Cancer.* Feb 1;13:45.

Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, Ellison DW (2006) Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular subgroup of medulloblastomas associated with a favourable prognosis. *Cell Cycle* 5, 2666-2670.

Cohen J (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement.*20, 37-46.

Collazo J, Zhu B, Larkin S, Martin SK, Pu H, Horbinski C, Koochekpour S, Kyprianou J (2014) Cofilin drives cell-invasive and metastatic responses to TGF- β in prostate cancer. *Cancer Res.* Apr 15;74(8):2362-73.

Dang D, Bamburg JR, Ramos D (2006) α 3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. *Exp Cell Res.* Feb 15;312(4):468-77.

Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C (2000) Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications. *Ann Pathol.* Oct;20(5):413-28.

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*, 62, 2152-65.

De Haas TG, Kool M (2007) Clinicopathological features of medulloblastoma: an overview with an emphasis on molecular biology. *Clin Neuropathol.* May-Jun;26(3):93-110.

Deng G, Shen J, Yin M, McManus J, Mathieu M, Gee P, He T, Shi C, Bedel O, McLean LR, Le-Strat F, Zhang Y, Marquette JP, Gao Q, Zhang B, Rak A, Hoffmann D, Rooney E, Vassort A, Englaro W, Li Y, Patel V, Adrian F, Gross S, Wiederschain D, Cheng H, Licht S (2014) Selective Inhibition of Muta nt Isocitrate Dehydrogenase 1 (IDH1) via Disruption of a metal binding Network by an allosteric small molecule. *J Biol Chem.* Nov 12.

Detre S, SaclaniJotti G, Dowsett M (1995) 1A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Clin Pathol.* Sep;48(9):876-8.

Du HO, Chen L, Wang Y, Wang LJ, Yan H, Liu HY, Xiao H (2015) Increases in radiosensitivity with the downregulation of cofilin-1 in U-251 human glioma cells. *Mol Med Rep.* May;11(5):3354-60.

Dubuc AM, Northcott PA, Mack S, Witt H, Pfister S, Taylor MD (2010) The genetics of pediatric brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep.* May;10(3):215-23.

Duron E, Lazareth A, Gaubert JY, Raso C, Hanon O, Rigaud AS (2008) Gliomatosis cerebri presenting as rapidly progressive dementia and parkinsonism in an elderly woman: a case report. *Journal of Medical Case Reports.* 2, 53.

Erkutlu I1, Cigiloglu A, Kalender ME, Alptekin M, Demiryurek AT, Suner A, Ozkaya E, Ulasli M, Camci C (2013) Correlation between Rho-kinase pathway gene expressions and development and progression of glioblastoma multiforme. *Tumour Biol.* Apr;34(2):1139-44.

Frühwald MC, Rutkowski S (2011) Tumors of the central nervous system in children and adolescents. *Dtsch. Arztebl.Int.* Jun;108(22):390-7.

Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, Kellie S, Kun LE, Merchant TE, Woo S, Wheeler G, Ahern V, Krasin MJ, Fouladi M, Broniscer A, Krance R, Hale GA, Stewart CF, Dauser R, Sanford RA, Fuller C, Lau C, Boyett JM, Wallace D, Gilbertson RJ (2006) Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St. Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 7, 813-820.

Giannini C, Scheithauer BW (1997) Classification and grading of low-grade astrocytic tumors in children. *Brain Pathol.*, 7, 785-98.

Giordana MT, Schiffer P, Lanote M, Girardi P, Chio A (1999) Epidemiology of adult medulloblastoma. *Intj Cancer* 80; 689-692.

Grossman SA, Fisher JD, Piantadosi S, Brem H (1998) The new approaches to brain tumor therapy (NABTT) CNS consortium: Organization, objectives and activities. *Cancer Control*, 5, 107-114.

Gruber-Olipitz M, Ströbel T, Kang SU, John JP, Grotzer MA, Slavc I, Lubec G (2009) Neutrophin 3/TrkC-regulated proteins in the human medulloblastoma cell line DAOY. *Electrophoresis*. Feb;30(3):540-9.

Habberstad AH, Lind-Labndström T, Sundstrom S, Torp SH (2012) Primary human glioblastomas-prognostic value of clinical and histopathological parameters. *Clin Neuropathol. Sep-Oct;31(5):361-8.*

Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A (2010) Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. Dec;120(6):707-18.

Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. Oct;(118(4):469-74.

Hassan YI, Zempleni J (2006) Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. In: *J. Nutr.* 136(7); Jul: S. 1763-5.

Hegi ME, Dserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. Mar 10;352(10):997-1003.

Horn F (2009) *Biochemie des Menschen.*, 4. Auflage, S.442-44, Thieme Verlag Stuttgart.

Huang X, Sun D, Pan Q, Wen W, Chen Y, Xin X, Huang M, Ding, J, Geng M (2014) JG6, a novel marine-derived oligosaccharide, suppresses breast cancer metastasis via binding to cofilin. *Oncotarget*. Jun 15;5(11):3568-78.

James CD, Carlom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavene WK (1989) Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr;86(8):2858-62.

Jansen O (1998) Supratentorielle Hirntumoren. URL: <http://www.thieme.de/abstracts/roefo/kongress98/rk/rk11.htm>.

Jomgeow T, Oji Y, Tsuji N, Ikeda Y, Ito K, Tsuda A, Nakazawa T, Tatsumi N, Sakaguchi N, Takashima S, Shirakata T, Nishida S, Hoson N, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Itoh K, Sugiyama H (2006) Wilms tumor gene WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform induces morphological changes and promotes cell migration and invasion in vitro. *Cancer Sci*. Apr;97(4):259-70.

Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J.Amer. Statist. Assn.* 53 (282):457-481.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* Jul;3(3):255-68.

Kleihues P (2007) Klassifikation, Grading und genetisches Profil der Gliome. *Onkologie* 5/07 S.5-9.

Kloosterhof NK; Bralten LBC, Dubbink HJ, French PJ, van den Bent MJ (2011) Isocitrat dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma?. *Lancet Oncol.* : 12(1):83-91.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schrami P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays für highoutput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* ;4:844-7.

Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D, Clifford SC, Pietsch T, von Bueren AO, Rutkowski S, McCabe M, Collins VP, Bäcklund ML, Haberler C, Bourdeaut F, Delattre O, Doz F, Ellison DW, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma:an international meta-analysis of transcritome, genetic aberrations, and clinical data of WNT,SHH, Group3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.*123, 473-484.

Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P (2002) *Tumours of the Nervous System.* Oxford University Press:London.

Lee TT, Manzano GR (1997) Third ventricular Glioblastoma multiforme: case report. *Neurosurg Rev* 20:291-294.

Lee YJ, Keng PC (2005) Studying the effects of actin cytoskeletal destabilization on cell cycle by cofilin overexpression. *Mol Biotechnol.* Sep;31(1):1-10.

Levin VA, Leibel SA, Gutin PH (1997) *Neoplasms of the central nervous system, in Cancer: Principle & Ptactice of Oncology.* DeVita, VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia, 2022-82.

Linz U (2003) Ein neues Therapieschema für Glioblastoma multifome, Ergebnis einer Analyse heutiger Behandlungskonzepte sowie der Biologie und Genetik des Tumors Institut für Kernphysik82. *MedizinischeDissertationsschrift, Aachen, RWTH.*

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, August, Volume 114, Issue 2, pp97-109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.*Jun:131(6):803-20.

Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Hill DE, Haber DA (1993) Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, Jun 1;90(11):5100-4.

Massimino M, Giangaspero F, Garrè ML, Gandola L, Poggi G, Biassoni V, Gatta G, Rutkowski S (2010) Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. Jul;79(1):65-83.

Masuhr KF, Neuman M (2007) *Duale Reihe Neurologie*. 6. Auflage, Thieme, S. 310.
McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A (1997) Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138 (4): 771–81.

Melton C (2011) Medulloblastoma subtypes are different diseases. March 11. URL: <http://www.onclive.com/publications/obtn/2010/december-2010/medulloblastoma-subtypes-are-different-diseases>. (Zugriff 22.08.2014)

Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. Mar;93(3):421-43.

Molitero JA, Patel TR, Piepmeier JM (2012) Neurosurgical approach. *Cancer J*. 2012 Jan-Feb;18(1):20-5.

Müller CB, de Barros RL, Castro MA, Lopes FM, Meurer RT, Roehe A, Mazzini G, Ulbrich-Kulczynski JM, Dal-Pizzol F, Fernandes MC, Moreira JC, Xavier LL, Klamt F (2011) Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. *J Cancer Res Clin Oncol*. Sep;137(9):1309-16.

Nagai S, Moreno O, Smith CA, Ivanchuk S, Romagnuolo R, Golbourn B, Weeks A, Seol HJ, Rutka JT (2011) Role of the cofilin activity cycle in astrocytoma migration and invasion. *Genes Cancer*. Sep;2(9):859-69.

Nagane M (2012) Genetic alterations and biomarkers for glioma. *Brain Nerve*. May;64(5):537-48.

Nagpal J, Jamoona A, Gulati ND, Mohan A, Braun A, Murali R, Jhanwar-Uniyal M (2006) Revisiting the role of p53 in primary and secondary glioblastomas. *Anticancer Res*. Nov-Dec;26(6C):4633-9.

Nelson JS, Tsukada Y, Schoenfeld D, Fulling K, Lamarche J, Peress N (1983) Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial, astrocytic gliomas. *Cancer*. Aug 1;52(3):550-4.

Nishimura S, Tsuda H, Kataoka F, Arao T, Nomura H, Chiyoda T, Susumu N, Nishio K, Aoki D (2011) Overexpression of Cofilin 1 can predict progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer receiving standard therapy. *Hum Pathol*. Apr;42(4):516-21.

Northcott PA, Dubuc AM, Pfister S, Taylor MD (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother*. Jul;12(7):871-84.

Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD (2011) Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J. Clin. Oncol.* 29, 1408-1414.

Ohgaki H, Eibl RH, Wiestler OD, Yasargil MG, Newcomb EW, Kleihues P (1991) p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Research* Nov 15;51(22):6202-6205.

Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, Biernat W, von Deimling A, Yasargil MG, Yonekawa Y, Kleihues P (1999) A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol* 97: 525-532.

Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, Vpl.170.5, May S. 1445-1453.

Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109:93-108.

Ohgaki H., Kleihues P (2005a) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J NeuropatholExpNeurol* 64: 479-489.

Park JB, Agnihotri S, Golbourn B, Bertrand KC, Luck A, Sabha N, Smith CA, Byron S, Zadeh G, Croul S, Berens M, Rutka JT (2014) Transcriptional profiling of GBM invasion genes identifies effective inhibitors of the LIM kinase-Cofilin pathway. *Oncotarget*. Sep 5.

Percy C, Van Holten V, Muir C (Hersg.) (1990) International Classification of diseases for Oncology. 2nd ed. World Health Organisation, Genf, Schweiz.

Pietsch T, Koch A, Wiestler OD (1997) Molecular genetic studies in medulloblastomas: evidence for tumor suppressor genes at the chromosomal regions 1q31-32 and 17p13. *Klin Padiatr.* Jul-Aug;209(4):150-5.

Poeggel G (2005) *Biologie*. Thieme Verlag, S.36, Stuttgart.

Pllack IF, Gerszten PC, Martinez AJ, Lo KH, Shultz B, Albright AL, Janoskv J, Deutsch M (1995) Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors. *Neurosurgery*. Oct;37(4):655-66; discussion 666-7.

Popow-Woźniak A1, Mazur AJ, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M, Nowak D (2012) Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochem Cell Biol.* Nov;138(5):725-36.

Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussière M, Lesimple T, Chinot O, Wager M, Honnorat J, Saikali S, Fina F, Sanson M, Figarella-Branger D (2012) Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer*. Sep 1;118(17):4201-11.

Rasheed BKA, Bigner SH (1991) Genetic alterations in glioma and medulloblastoma. *Cancer Metastasis Rev.* Dec;10(4):289-99.

Rauscher J (2012) Expressionsanalyse von WT1 in Hirntumoren. Eine retrospektive Studie. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.

Ringertz N (1950) Grading of gliomas. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 27, 51-64.

Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, Ottensmeier H, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Graf N, Emser A, Pietsch T, Wolff JE, Kortmann RD, Kuehl J (2005) Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *NEngl J Med.*; 352:978-86.

Rutkowski S, Gnekow A., Fleischhack G. Wagner S, Calaminus G, Wolff J, Müller H, Sörensen N, Faldum a, Tatagiba M, Pietsch t, Warmuth-Metz M, Kortmann R (2006) Hirntumore bei Kindern und Jugendlichen. *Onkologie* 12:533-545.

Scherer HJ (1940) Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am. J. Cancer*, 40, 159-99.

Scheurlen W, Kühl J (1998) Current diagnostic and therapeutic management of CNS metastasis in childhood primitive neuroectodermal tumours and ependymomas. *J Neurooncol.* Jun-Jul;38(2-3):181-5.

Schittenhelm J, Beschorner R, Simon P, Tabatabai G, Herrmann C, Schlaszus H, Capper D, Weller M, Meyermann R, Mittelbronn M (2009) Diagnostic value of WT1 in neuroepithelial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* Feb;35(1):69-81.

Schittenhelm J, Mittelbronn M, Meyermann R, Melms A, Tatgiba M, Capper D (2011) Confirmation of R132H mutation of isocitrate dehydrogenase 1 as an independent prognostic factor in anaplastic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* Nov;122(5):651-2.

Schittenhelm J, Schwab EI, Sperveslage J, Tatagiba M, Meyermann R, Fend F, Goodman SL, Sipos B (2013) Longitudinal expression analysis of α v integrins in human gliomas reveals upregulation of integrin α v β 3 as a negative prognostic factor. *J Neuropathol Exp Neurol.* Mar;72(3):194-210.

Schlegel U (1998) *Neuroonkologie*. S. 35, 1. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
Schneider T, Mawrin, C, Scherlach C, Skalej M, Frisching R (2010) Gliomas in adults. *Ärzteblatt Int* ,107(45) ;799-808.

Schwab E (2011) Immunhistochemische Expressionsanalyse von Hirntumorgewebe mit Integrin alpha-v-beta spezifischen Antikörpern und ihren Liganden. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.

Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN (1997) Histopathologic and immunohistochemical prognostic Factors in malignant gliomas. *Curr Opin Oncol.* May;9(3):230-4.

Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, Ouatas T, Pluk H, Jespersen S, Vogels J, Verhoeckx K, Groten J, van Ommen B (2003) Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. *Biochim Biophys Acta.* Aug 21;1650(1-2):73-91.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Lancet Oncol.* May;10(5):459-66

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* Mar 10;352(10):987-96.

Südwestdeutsches Tumorzentrum (2006) Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. URL: http://www.medizin.uni-tuebingen.de/Patienten/Zentren/Tumorzentrum+CCC+T%C3%BCbingen_Stuttgart/Tumorspezifische+Zentren/Zentrum+f%C3%BCr+Neuroonkologie.html. (Zugriff 22.10.2014)

Tailibert S, Chodkiewicz C, Laigle-Donadey F, Napolitano M, Cartalat-Carel S, Sanson M (2006) Gliomatosis cerebri: a review of 296 cases from the ANOCEF database and the literature. *J Neurooncol.* Jan;76(2):201-5.

Taylor M.D., Northcott P.A., Korshunov A, Remke M, Cho Y-J, Clifford S.C., Eberhart G.G., Parsons D.W., Rutkowski S, Gajjar A, Ellison D.W., Lichter P., Gilbertson R.J., Pomeroy S.L., Kool M, Pfister S. M (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* April; 123(4):465-472.

Ulutin C, Fayda M, Aksu G, Cetinayak O, Kuzhan O, Ors F, Beyzadeoglu M (2006) Primary glioblastoma multiforme in younger patients: a single-institution experience. *Tumori.* Sep-Oct;92(5):407-11.

von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN (1993). Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.* Jan;3(1):19-26.

Wang W, Eddy R, Condeelis J (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer.* Jun;7(6):429-40.

Wang W, Mouneimne G, Sidani M, Wyckoff J, Chen X, Makris A, Goswami S, Bresnick AR, Condeelis JS (2006) The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol.* May 8;173(3):395-404.

Wang WS, Zhong HJ, Xiao DW, Huang X, Liao LD, Xie ZF, Xu XE, Shen ZY, Xu LY, Li EM (2010) The expression of CFL1 and N-WASP in esophageal squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathological features. *Dis Esophagus.* Aug;23(6):512-21.

Weller M, Reifenberger G, Tonn J, Wick W (2016) Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie. Perspektiven der Onkologie 1/2016 Deutsches Ärzteblatt.

Wessling P (2014) Embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR): signed, sealed, delivered. *Acta neuropathol.* Aug;128(2):305-8.

Whiestle OD, Schmidt MC (1998) Neuropathologie maligner Gliome. *Onkologe.* 4: 580-588, Springer-Verlag, Berlin.

Wong AJ1, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct;84(19):6899-903.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bidner DD (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* Feb 19;360(8):765-73.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* Feb 19;360(8):765-73.

Yan H, Yang K, Zou YJ, Xiao H, Zhang WB, Liu HB (2012) Over-expression of Cofilin-1 and phosphoglycerate kinase 1 in astrocytomas involved in pathogenesis of radioresistance. *CNS Neurosci Ther.* Sep;18(9):729-36.

Yang ZL, Miao X, Xiong L, Zou Q, Yuan Y, Li J, Liang L, Chen M, Chen S (2013) CFL1 und Arp3 are biomarkers for metastasis and poor prognosis of squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinomas of gallbladder. *Cancer Invest.* Feb;31(2):132-9.

Yap CT, Simpson TI, Pratt T, Price DJ, Maciver SK (2005) The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in concentration-modulated manner. *Cell Motil Cytoskeleton.* Mar;60(3):153-65.

Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y (2009) Glioma derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 alpha. *Science* :324:261-5.

Zhou J, Wang Y, Fei J, Zhang W (2012) Expression of Cofilin 1 is positively correlated with the differentiation of human epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett* Dec;4(6):1187-1190.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. J. Schittenhelm durchgeführt.

Die Konzeption der Studie sowie der Betreuung und Korrekturlesen des Manuskripts erfolgte durch Prof. Dr. J. Schittenhelm.

Sämtliche Versuche bzw. immunhistochemischen Färbungen erfolgten im Labor des Institutes für Neuropathologie mit Unterstützung durch Kathrin Trautmann.

Die Digitalisierung der Fotografien wurden, nach selbstständigem Fotografieren und Bearbeiten mit dem Olympus-VANOX-AHBT-3-Lichtmikroskop und der ProgRes10, Jenaoptik, durch Frau G. Albrecht zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Prof. Dr. J. Schittenhelm mittels JMP 9.0 (SAS Institute INC, Cary, NC, USA).

Ich versichere das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.02.2017

Eva Atici

8. Anhang

8.1. Tabellen

Liste der sortierten	Differenzen	KI unten	KI oben	p-Wert
Anaplastisches Oligodendrogliom	Astrozytom	73,6823	120,3161	<,0001
Glioblastom	Astrozytom	80,6305	109,2339	<,0001
anaplastisches Astrozytom	Astrozytom	60,569	95,9169	<,0001
Anaplastisches Oligodendrogliom	Anaplastisches Ependymom	47,4332	99,5579	<,0001
Anaplastisches Oligodendrogliom	PNET	37,5856	105,6019	<,0001
Glioblastom	Anaplastisches Ependymom	52,9866	89,8705	<,0001
Glioblastom	PNET	40,9364	98,1172	<,0001
Anaplastisches Oligodendrogliom	Medulloblastom	45,6767	93,2976	<,0001
Glioblastom	Medulloblastom	52,3272	82,5131	<,0001
anaplastisches Astrozytom	Anaplastisches Ependymom	33,5748	75,9037	<,0001
anaplastisches Astrozytom	PNET	22,4197	83,2553	0,0007
anaplastisches Astrozytom	Medulloblastom	32,4108	69,051	<,0001
Medulloblastom	Astrozytom	9,0844	45,9398	0,0035
PNET	Astrozytom	-5,0773	55,8882	0,1022
Anaplastisches Ependymom	Astrozytom	2,246	44,7613	0,0303
Anaplastisches Oligodendrogliom	anaplastisches Astrozytom	-4,4757	41,9882	0,1134
Glioblastom	anaplastisches Astrozytom	2,5265	30,8521	0,021
Medulloblastom	Anaplastisches Ependymom	-17,7895	25,8063	0,7181
Medulloblastom	PNET	-28,7552	32,9685	0,8934
Anaplastisches Oligodendrogliom	Glioblastom	-18,7151	22,8491	0,8452
PNET	Anaplastisches Ependymom	-30,7289	34,5325	0,9089

Tabelle 18: Liste der sortierten Differenzen bzw. Subanalyse der Tumorentitäten.

8.2. Danksagung

Die im folgenden Text benannten lieben Menschen und Wegbegleiter danke ich von Herzen bei der Hilfe und Anfertigung dieser Arbeit:

- Professor Dr. Jens Schittenhelm für ALLES. Für die exzellente Betreuung, seine Geduld und Hilfestellung bei Fragen, sein Glaube an mich und seine stetige Motivation. Ich wünsche ihm und seiner Familie nur das allerbeste für die Zukunft.
- Dem Team des Neuropathologischen Instituts Tübingen für die unglaubliche Unterstützung bei der Laborarbeit, dem Beantworten und Klären von Fragen und dem Erstellen und Digitalisieren von Fotografien. Ein großes Danke an Frau K. Trautmann und Frau G. Albrecht.
- Meinen lieben, wunderbaren Eltern, die mir diese Studium ermöglicht haben und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Danke Mama für Deine Geduld, Motivation, Liebe und Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Danke Papa, da oben im Himmel, für Dein Beschützen und Wachen über mich.
- Meinem liebsten Ehemann Ferdi, der immer mit Rat und Tat an meiner Seite stand , unablässig stützende und helfende Arme bot und nie den an Glauben an mich verlor, sowie meinen unglaublichen Kindern Noah und Neela, die toll mitgemacht haben.
- Meinen wertvollen Freunden für ihr Verständnis, mit besonderem Dank an Jessica Reza für das Korrekturlesen, die Unterstützung beim Design und die unfassbaren Lachattacken.