

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie

**Korrelation zwischen genetischen Mutationen und
klinischem Verlauf der Langerhanszell-Histiozytose des
Kindesalters und deren Spätfolgen**

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

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

vorgelegt von

Schneckenburger, Priscilla Ruth

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Staebler

Tag der Disputation: 08.11.2017

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| LCH | Langerhanszell-Histiozytose |
| GPOH | Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie |
| ZNS | zentrales Nervensystem |
| CD207 | Langerin |
| U0126 | MEK-Inhibitor |
| BRAF | B-Rapidly-Accelerated Fibrosarcoma-Gen |
| MAPK | Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase |
| MAP2K1 | Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinase |
| MEK | MAPK/ERK-Kinase |
| ERK | Extracellular-signal-regulated-kinases |
| RAS | Rat sarcoma-G-Protein |
| GPT | Guanintriphosphat |
| GDP | Guanindiphosphat |
| p16 | Tumorsuppressorprotein p16 |
| p21 | Tumorsuppressorprotein p21 |
| OS | Gesamtüberleben (overall survival) |
| MB | Million Basen |
| PAS.net | Elektronisches Verzeichnis aller histopathologischer Proben und Befunde des Institutes für Allgemeine Pathologie, Tübingen |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| % | Prozent |
| VE1 | Anti-BRAFV600E-Antikörper |
| FFPE | formalin-fixiertes-paraffin-eingebettetes Gewebe |
| µm | Mikrometer |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| °C | Grad Celcius |
| bp | Basenpaare |

| | |
|--------------------|--|
| mM | Millimolar |
| μM | Mikromolar |
| U | Unit |
| ng | Nanogramm |
| μl | Mikroliter |
| g | Gramm |
| ml | Milliliter |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| dNTP | Didesoxynukleotidtriphosphate |
| ddH ₂ O | Destilliertes Wasser (H ₂ O) |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| ISH-med | Elektronisches Aktenarchiv des Universitätsklinikums Tübingen |
| bzw. | beziehungsweise |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung..... | 1 |
| 1.1 | Langerhanszell-Histiozytose als dendritische Neoplasie | 1 |
| 1.1.1 | Epidemiologie..... | 1 |
| 1.1.2 | Klinisches Erscheinungsbild..... | 1 |
| 1.1.3 | Klinische und radiologische Diagnosestellung..... | 3 |
| 1.1.4 | Histopathologische Identifizierung zur Diagnosestellung | 3 |
| 1.1.5 | Verschiedene Ansätze zur Therapie | 5 |
| 1.1.6 | Auftreten von Spätfolgen..... | 6 |
| 1.2 | Tumorgenese | 7 |
| 1.2.1 | Rolle des ERK-Signalwegs in der Pathogenese der LCH und anderen Tumorerkrankungen..... | 7 |
| 1.2.2 | Weitere Modelle zur Pathogenese | 10 |
| 1.3 | Das Tumorsuppressorprotein p16 ^{INK4A} | 11 |
| 1.4 | Risikofaktoren für klinischen Verlauf und Spätfolgen..... | 13 |
| 1.4.1 | Bekannte Risikofaktoren für das Auftreten und den Verlauf der kindlichen LCH | 13 |
| 1.4.2 | Risikofaktoren für das Auftreten von Spätfolgen | 15 |
| 1.5 | Zielsetzung und zusammengefasste Fragestellung..... | 15 |
| 2 | Material und Methoden | 17 |
| 2.1 | Material..... | 17 |
| 2.1.1 | Chemikalien und Reagenzien..... | 17 |
| 2.1.2 | Antikörper | 17 |
| 2.1.3 | Kits | 17 |
| 2.1.4 | Enzyme | 18 |
| 2.1.5 | Primer..... | 18 |
| 2.1.6 | Verbrauchsmaterialien | 19 |
| 2.1.7 | Geräte | 20 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.1.8 | Software | 21 |
| 2.1.9 | Hersteller | 21 |
| 2.2 | Auswahlkriterien des Patientenkollektivs | 23 |
| 2.3 | Immunhistochemische Klassifizierung | 23 |
| 2.3.1 | Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung..... | 23 |
| 2.3.2 | S100-Färbung | 24 |
| 2.3.3 | CD1a-Färbung..... | 24 |
| 2.3.4 | Nachweis der Expression von p16INK4a | 24 |
| 2.3.5 | Nachweis einer <i>BRAF</i> ^{V600E} Mutation | 25 |
| 2.4 | Molekularpathologische Analysen | 25 |
| 2.4.1 | DNA-Extraktion aus FFPE Gewebe | 25 |
| 2.4.2 | Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA | 26 |
| 2.4.3 | Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese | 27 |
| 2.4.4 | Mutationsanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sanger Sequenzierung..... | 28 |
| 2.5 | Recherche der klinischen Daten..... | 34 |
| 2.5.1 | Ethikvotum..... | 34 |
| 2.5.2 | Recherche im ISH-med-Programm des UKT | 35 |
| 2.5.3 | Definition der klinischen Parameter..... | 36 |
| 2.6 | Einholung aktueller Daten zu Folgeschäden und erblicher Belastung anhand eines Fragebogens | 39 |
| 2.6.1 | Ermittlung der Patientenadressen | 39 |
| 2.6.2 | Inhalt und Gütekriterien des Fragebogens | 40 |
| 2.6.3 | Auswertung des Fragebogens..... | 42 |
| 2.7 | Statistische Verfahren..... | 42 |
| 3 | Ergebnisse..... | 43 |
| 3.1 | Zusammensetzung des Kollektivs | 43 |
| 3.2 | Retrospektive Analyse der klinischen Präsentation, Behandlung und Langzeitverlauf der LCH | 45 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.1 | Beschreibung des Patientenkollektivs | 45 |
| 3.2.2 | Beschreibung der Inzidenz der verschiedenen Verlaufsparemeter | 46 |
| 3.2.3 | Analyse möglicher Risikofaktoren und prädiktiver Faktoren für Präsentation und Verlauf der LCH..... | 52 |
| 3.3 | Identifizierung genetischer Alterationen im Gewebe von LCH- Patienten | 61 |
| 3.3.1 | Ergebnisse der histologischen Analysen der Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung und der Marker S100 und CD1a | 61 |
| 3.3.2 | Ergebnisse der PCR zur Amplifizierbarkeit der DNA..... | 62 |
| 3.3.3 | <i>BRAF</i> -Mutationsanalyse..... | 63 |
| 3.3.4 | <i>MAP2K1</i> -Mutationsanalyse | 65 |
| 3.3.5 | p16 ^{INK4a} -Immunhistochemie | 67 |
| 3.4 | Korrelation identifizierter Mutationen mit dem klinischen Verlauf..... | 68 |
| 3.4.1 | Geschlecht und Mutationen..... | 69 |
| 3.4.2 | Alter und Mutation | 70 |
| 3.4.3 | Befall und Mutationen..... | 71 |
| 3.4.4 | Rezidive und Mutationen | 74 |
| 3.4.5 | Korrelation zwischen den einzelnen Mutationen und dem Auftreten von Spätfolgen | 76 |
| 4 | Diskussion | 77 |
| 4.1 | Retrospektive Analyse zeigt Risikofaktoren für einen schweren LCH- Verlauf und den Wandel in der Therapie über die letzten 30 Jahre | 77 |
| 4.1.1 | Vergleich der Inzidenz klinischer Merkmale im retrospektiven Kollektiv..... | 77 |
| 4.1.2 | Ermittelte klinisch-prognostische Parameter aus der retrospektiven Analyse | 79 |
| 4.1.3 | Diskussion des Wandels der Diagnostik und Therapie der LCH über die letzten 30 Jahre | 81 |
| 4.2 | Korrelationsanalyse zeigt Zusammenhang zwischen Mutation und dem Alter, dem Befallort und dem Rezidivrisiko | 84 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.2.1 | Korrelationsanalyse von MAP2K1-Mutationen und klinischer Präsentation | 85 |
| 4.2.2 | Bedeutung von <i>BRAF</i> -Mutationen hinsichtlich klinischer Präsentation | 87 |
| 4.3 | Die Häufigkeit von Spätfolgen hinsichtlich des Alters, Stadiums und Verlaufs der kindlichen LCH | 90 |
| 4.3.1 | Inzidenzvergleich und Stellenwert der erhobenen Spätfolgen..... | 90 |
| 4.3.2 | Diskussion der Einfluss- und Risikofaktoren für das Auftreten von Spätfolgen | 95 |
| 4.3.3 | Diskussion der Notwendigkeit einer systemischen Nachsorge..... | 98 |
| 4.4 | Ausblick auf mögliche Konsequenzen für Therapie und Prophylaxe ... | 99 |
| 4.4.1 | Anwendbarkeit und Relevanz der verwendeten Antikörper p16 und VE1 | 99 |
| 4.4.2 | Bedeutung prädiktiver molekularer Marker für die Therapie der LCH | 101 |
| 5 | Zusammenfassung | 104 |
| 6 | Verzeichnisse | 106 |
| 6.1 | Abbildungsverzeichnis | 106 |
| 6.2 | Tabellenverzeichnis | 108 |
| 6.3 | Literaturverzeichnis..... | 109 |
| 7 | Erklärung zum Eigenanteil | 115 |
| 8 | Danksagung..... | 117 |
| 9 | Anhang | 119 |

1 Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

1.1 Langerhanszell-Histiozytose als dendritische Neoplasie

Das Krankheitsbild der Langerhanszell-Histiozytose, oder kurz LCH, ist charakterisiert durch ihr vielgestaltiges Erscheinungsbild. Dies beschränkt sich keineswegs auf die histologische Präsentation, sondern erstreckt sich von der Namensgebung über die klinische Präsentation bis hin zu den verschiedensten pathogenetischen Erklärungsmodellen. So ist die Langerhanszell-Histiozytose unter anderem auch unter den Begriffen „Histiozytosis X“, „eosinophiles Granulom“, „Hand-Schüller-Christian-Krankheit“ und „Abt-Letterer-Siwe-Krankheit“ bekannt.

1.1.1 Epidemiologie

Die Langerhanszell-Histiozytose ist eine seltene Erkrankung, die bei Kindern mit einer Inzidenzrate von 4-6/10⁶ Kindern pro Jahr liegt. Dabei nimmt die Inzidenz mit dem Alter ab, sodass sie bei Kindern unter einem Jahr bei 9-15/10⁶ pro Jahr [1, 2] liegt, bei über Zehnjährigen aber unter 2/10⁶ pro Jahr [2]. Sie tritt bei Jungen häufiger als bei Mädchen auf mit einer Ratio männlich/weiblich von 1,2-1,8:1 [1, 3, 4].

1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die klinische Präsentation der Langerhanszell-Histiozytose ist sehr vielfältig und reicht von einem Hautausschlag bis hin zu einem Multiorganbefall. Dies führte in der Vergangenheit zu den unterschiedlichsten Bezeichnungen. Als „Eosinophiles Granulom“ wird der häufig auftretende unifokale Knochenbefall bezeichnet, ein multifokaler Befall als „Hand-Schüller-Christian-Krankheit“ und ein aggressiver Verlauf mit Befall innerer Organe bei Kleinkindern ist als „Abt-Letterer-Siwe-Krankheit“ bekannt. Seit eine klonale Genese vermutet wurde kam der Begriff „Histiozytosis X“ hinzu. Der selbstlimitierende Hautbefall bei Kleinkindern wird als „Hashimoto-Pritzker“ bezeichnet. All diese Befunde fallen unter den

Sammelbegriff der Langerhanszell-Histiozytose [5-7]. Laut S1-Leitlinien von 2013 wird heutzutage das Erkrankungsbild aber grundsätzlich als LCH beschrieben, welche man in zwei Stadien teilen kann: unisystemische und multisystemische LCH [4]. Die unisystemische LCH kann wiederum uni- oder multifokal im gleichen Organsystem auftreten. Bei der multisystemischen LCH wird noch weiter differenziert, ob zusätzlich ein Befall der sogenannten Risikoorgane Leber, Milz oder hämatopoetisches System vorliegt. Sind diese Organe betroffen, liegt eine deutlich höhere Komplikationsrate vor und damit eine schlechtere Prognose. Insgesamt gilt für die LCH, dass verschiedenste Organsysteme alleine oder in Kombination betroffen sein können. Das typische Erscheinungsbild ist die Bildung granulomatöser Läsionen mit starker infiltrativ-entzündlicher Begleitreaktion. Allein die Hautbefunde fallen dabei aus dem Muster. Sie weisen typischerweise isolierte Papeln, aber auch generalisierte Dermatosen auf, werden oft zunächst als Exanthem fehldiagnostiziert und sind sehr variabel und unspezifisch [4]. Laut S1-Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) konzentriert sich der Organbefall bei 75-80 % der Patienten auf die Knochen, bei 33 % der Patienten ist nur oder zusätzlich die Haut befallen und bei einem knappen Viertel der Patienten die Hypophyse. Weitere häufig betroffene Organe sind mit jeweils 5-15 % die Lunge oder Leber, Milz und/oder das hämatopoetische System. Häufig sind zudem Lymphknoten befallen (5-10 %) und selten das zentrale Nervensystem (ZNS, 2-4 %). Weitere seltene Befunde sind ein Befall der Augen und Ohren und der Mundschleimhaut [2-4]. Je nach betroffenen Organen kann man die LCH noch weiter in die oben beschriebenen Unterformen einteilen. Der Morbus Hashimoto-Pritzker ist dabei separat zu erwähnen. Diese kongenital auftretende, milde, rein kutane Variante der LCH ist stets selbstlimitierend und heilt immer spontan ohne Rezidive ab. Die Morphologie des Hashimoto-Pritzker präsentiert sich allerdings mit den gleichen Efferenzen wie die aggressivere kutane Form der LCH und ist rein durch eine mildere Ausprägung, teilweise Laborparameter aber vor allem Verlaufskontrollen abzugrenzen. Die Histologie entspricht der der LCH [8].

1.1.3 Klinische und radiologische Diagnosestellung

Für die Diagnosestellung der LCH ist bei der Anamnese und körperlichen Untersuchung besonders auf (wiederkehrende) Schmerzen, Schwellungen, Ausschläge, Veränderungen im Trinkverhalten, Luftnot oder Auffälligkeiten in der Entwicklung und dem Wachstum zu achten. Um die Krankheitsaktivität einschätzen zu können, wird eine Basislabordiagnostik gemacht, dazu zählt ein komplettes Blutbild, Gesamtprotein, Leberenzyme, sowie Kreatinin und Elektrolyte, außerdem wird die Blutgerinnung untersucht. Bei spezifischen Beschwerden können weitere Parameter hinzugezogen werden, es gibt jedoch bisher keinen spezifischen Laborparameter, der die Krankheitsaktivität präzise widerspiegelt.

Als bildgebende Diagnostik ist nach neusten Leitlinien ein Röntgenthorax, eine Abdomen-Sonographie mit Fokus auf Leber, Milz und abdominelle Lymphknoten und eine Bildgebung des Skelettes Standard. Für letzteres ist ein Skelett-Röntgen empfohlen, es kann dafür jedoch auch je nach Risikokonstellation eine Magnetresonanztomographie, eine Computertomographie oder eine Szintigraphie verwendet werden. Dabei ist jedoch die jeweilige Strahlenbelastung abzuwägen [4, 9].

1.1.4 Histopathologische Identifizierung zur Diagnosestellung

Das histologische Korrelat der LCH ist eine Proliferation von Langerhans-Zell-ähnlichen LCH-Zellen. Diese LCH-Zellen zeigen eine phänotypisch enge Verwandtschaft zu unreifen interdigitierenden dendritischen Zellen der Epidermis, den sogenannten Langerhanszellen. Die Langerhanszellen der Haut sind spezialisierte dendritische Zellen der Mukosa und Haut, welche nach Aktivierung zur Antigenpräsentation in die Lymphknoten wandern, wo sie zur T-Zell-Aktivierung führen (Abbildung 1).

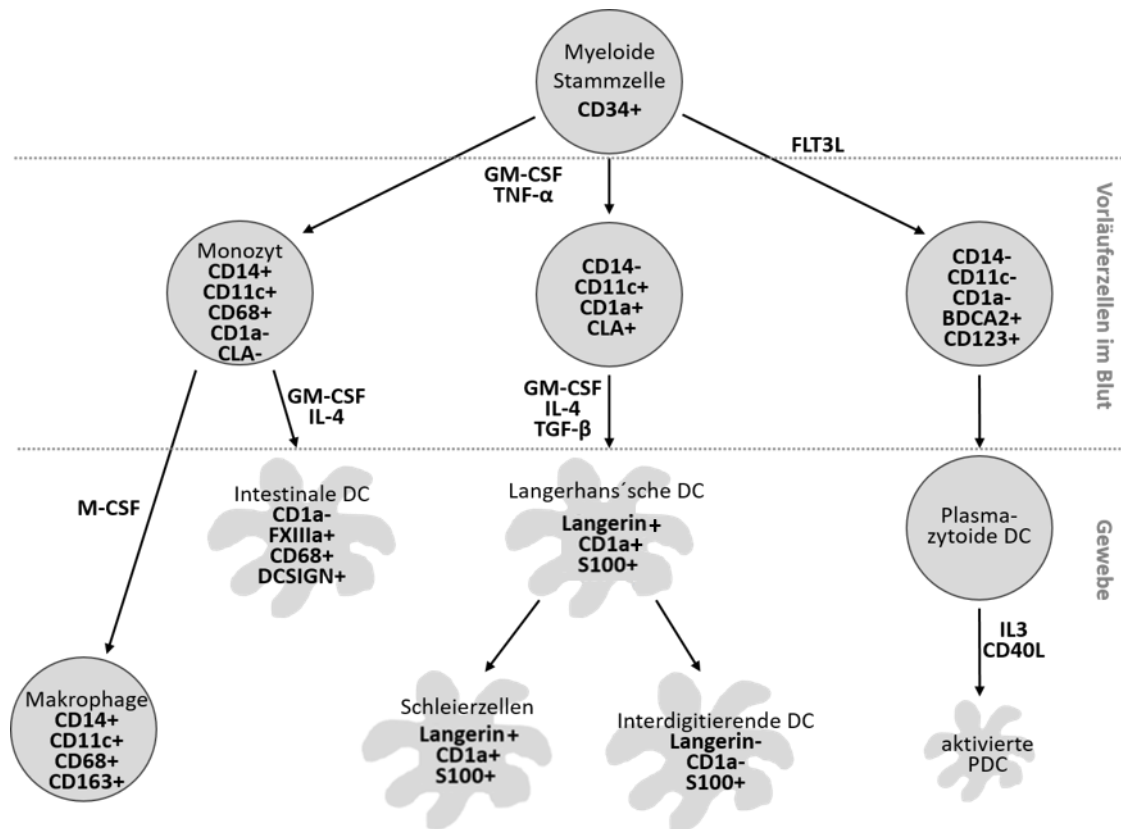


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung der dendritischen Langerhanszellen (Graphik modifiziert nach Swerdlow et al., 2008 [7])

Aus einer myeloide Vorläuferzelle gehen Monozyten und dendritische Zellen hervor, welche sich unter Einwirkung verschiedener Zytokine weiterentwickeln. DC = dendritische Zelle, + positive Expression, - negative Expression

Die LCH-Zellen zeigen charakteristisch viel Zytoplasma, außerdem ovale, eingekerbte oder gefaltete Kerne mit feinem Chromatin und einem unauffälligen Nukleolus. Im umgebenden Gewebe ist eine inflammatorische Infiltration und Granulome mit zahlreichen eosinophilen Granulozyten, sowie Lymphozyten und auch mehrkernige Riesenzellen aus akkumulierten LCH-Zellen typisch für das Erscheinungsbild (Abbildung 2) [4]. Die LCH-Zellen exprimieren neben dem Oberflächenmarker S100 noch CD1a und CD207 (Langerin), welche pathognomonisch für die LCH sind. Früher wurde zur Diagnostik anstatt der immunhistochemischen Langerin-Expression elektronenmikroskopisch auch die aus akkumuliertem Langerin bestehenden Birbeck-Granula verwendet [4, 6, 7].

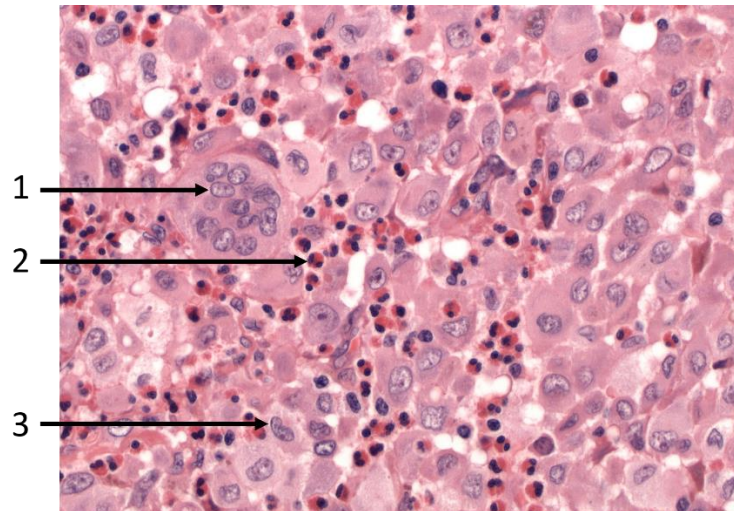


Abbildung 2: Histopathologisches Bild der LCH

Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 400-facher Vergrößerung. Histopathologisches Bild einer LCH mit zahlreichen eosinophilen Granulozyten (2), Riesenzellen (1) und Langerhanszellen (3)

1.1.5 Verschiedene Ansätze zur Therapie

Je nach Status und Lokalisation der LCH gibt es verschiedene Therapieansätze. Die Therapie des Hashimoto-Pritzker ist meist ein Vorgehen nach dem Schema „watch-and-wait“. Es findet ein Screening auf Befall anderer Organe statt und eine regelmäßige sonographische Kontrolle, ggf. wird eine Lokalthherapie mit Steroiden gegeben. Auch bei unifokalem Knochenbefall und isoliertem Befall der Lunge wird laut S1-Leitlinie eine „watch-and-wait“-Therapie empfohlen [4]. Bei unifokalen Knochenläsionen von bis zu 2 cm, welche nicht zum Risikobefall zählen, wird eine komplette chirurgische Ausräumung bei der Biopsie empfohlen [9]. Die Behandlung eines Lungenbefalls ist jedoch komplex und kann in manchen Fällen auch eine systemische Chemotherapie mit Vinblastin, Prednisolon, 6-Mercaptopurin, Cytarabin und Cladribin bis hin zur Transplantation erfordern. Eine systemische Chemotherapie kann bei multifokalem Befall erfolgen bzw. beim Befall von sog. „special sites“, zu welchen beispielsweise die kraniofazialen Knochen, Wirbelkörper mit intraspinaler Weichteilkomponente, Augen und Ohren sowie das zentrale Nervensystem zählt. Bei Multiorganbefall sollte auf jeden Fall eine systemische Therapie erfolgen. Die Histiocyte Society führt große Studien zur Verbesserung der Therapie durch und

empfiehlt zunächst eine Induktions-Therapie mit Prednisolon und Vinblastin für sechs Wochen, danach sollte eine Evaluation des Therapie-Ansprechens erfolgen. Falls keine Besserung oder eine Progression aufgetreten sein sollte, wird eine Wiederholung der Induktionstherapie empfohlen. Die anschließende Erhaltungstherapie soll die Rezidivrate verringern. Sie besteht meist aus Prednisolon in Kombination mit Vinblastin und im Fall eines Risikoorgan-Befalls 6-Mercaptopurin [4, 9-11]. Eine second-line Therapie mit beispielsweise Cladribin und Cytarabin [9, 12] oder eine Stammzelltransplantation [13, 14] wird bei komplizierten Verläufen empfohlen. Dazu zählt ein Befall des hämatopoetischen Systems, ein Leber-Befall mit Leberfunktionsstörungen oder das Auftreten mehrerer Rezidive. Eine Radiotherapie wird aufgrund der Spätfolgen und der Gefahr eines strahlungsinduzierten Zweittumors nicht mehr empfohlen [4, 13]. Bei Befall der Hypophyse ist nur beim Auftreten von neurologischen Symptomen eine systemische Chemotherapie vorgesehen [9]. Mit der Entdeckung von *BRAF*- und *MAP2K1*-Mutationen bei vielen LCH-Patienten wurde zunächst in der Zellkultur mit *BRAF*- und *MAP2K1*-mutierten Zellen mögliche Anti-Körper-Therapien, welche direkt an den mutierten Proteinen angreift und eine Überaktivierung des Signalwegs verhindern soll, ausgetestet. Dabei wurden sowohl Mutationsträger als auch Wildtypträger mit dem *BRAF*-Inhibitor Vemurafenib und dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt. Bei den *BRAF*-Mutationsträgern wurde die Signalwegaktivierung durch Vemurafenib am stärksten gesenkt, bei den *MAP2K*-Mutationsträgern dagegen durch U0126. Bei den Fällen mit Wildtyp-DNA sah man dagegen keine vergleichbare Reduktion der Signalwegaktivierung [15]. Es folgten bisher einzelne Berichte über erfolgreiche, wenn auch nebenwirkungsreiche, Therapieversuche mit Verumafenib [16, 17].

1.1.6 Auftreten von Spätfolgen

Laut S1-Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie ist besonders in den empfohlenen Nachuntersuchungen auf Spätfolgen der LCH zu achten. Bekannt sind dabei bei 22 % bis 75 % der Fälle das Auftreten eines Diabetes insipidus oder auch der Mangel weiterer Hypophysenhormonen wie

einem Wachstumshormonmangel, zudem orthopädische Probleme, Hörminderung, Zahnprobleme, seltener neurologische, pulmonale oder Leber-Probleme. Auch auf das Auftreten von Zweitmalignomen ist zu achten. Die Spätfolgen der LCH wurden bisher in nur wenigen Studien untersucht [18-21].

1.2 Tumorgenese

1.2.1 Rolle des ERK-Signalwegs in der Pathogenese der LCH und anderen Tumorerkrankungen

Es gibt verschiedene Thesen über die Tumorgenese der Langerhanszell-Histiozytose. Lange Zeit wurde von einem chronisch-entzündlichen Geschehen ausgegangen, bis 1994 Willman et al. und Yu et al. über X-Chromosomen-Inaktivierungs-Assays bei LCH-Läsionen ein klonales Inaktivierungsmuster beobachteten und die Hypothese einer klonalen Proliferation aufstellten [5, 22]. 2010 entdeckten schließlich Badalian-Verly et al. die ersten Mutationen im B-Rapidly-Accelerated-Fibrosarcoma-Gen, kurz *BRAF*, und bestätigten damit die Hypothese einer neoplastisch-proliferativen Genese der LCH [23]. Es folgten weitere Studien, welche zusätzlich noch andere Mutationen des ERK-Signalwegs untersuchten. Dabei zeigte sich eine *BRAF*^{V600E}-Mutation (c.1799T>A: Adenin statt Thymin) in circa der Hälfte aller kindlichen LCH-Fälle und bei den Trägern mit *BRAF*-Wildtyp außerdem *MAP2K1*-Mutationen in ungefähr einem Viertel der Fälle bei der kindlichen LCH. Laut Zeng et al. findet man bei Erwachsenen jedoch deutlich seltener Mutationen des ERK-Signalwegs [24].

Diesen Ergebnissen zufolge wird eine Überaktivierung des RAF-MAP-ERK-Signalwegs als Hauptfaktor der Pathogenese der LCH angesehen [15]. Dieser ERK-Signalweg gehört zu den Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-Signalwegen, welche in allen Eukaryoten vorkommen. Er ist von zentraler Bedeutung für die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Die MAPK-Signalwege bestehen im Kern aus 3 Kinasen; die MAP-Kinase-Kinase-Kinase, die die MAP-Kinase-Kinase aktiviert, welche wiederum die MAP-Kinase aktiviert. Im Falle des ERK-Signalweges entsprechen diese drei Kinasen in gleicher Reihenfolge den Serin-/Threonin-Tyrosinkinasen RAF oder MAP3K, MEK oder

MAP2K1 (kurz für **MAPK/ERK-Kinase**) und ERK oder MAPK (kurz für engl. **extracellular signal-regulated kinases**) extra (Abbildung 3).

ERK-Signalweg

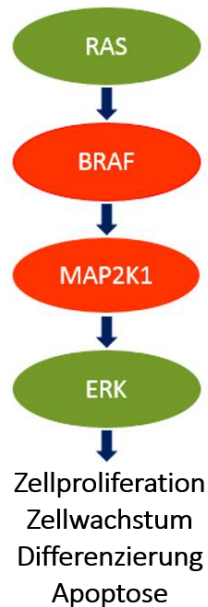


Abbildung 3: ERK-Signalweg

Schematische Darstellung des ERK-Signalwegs: das G-Protein RAS (Rat sarcoma) aktiviert die Tyrosinkinase BRAF „(b-rapidly accelerated fibrosarcoma)“, welche wiederum die Tyrosinkinase MAP2K1 (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinase-1) aktiviert. Von dieser wird dann ERK („extracellular signal-regulated kinases“) aktiviert. ERK interagiert mit vielen weiteren Signalwegen und induziert unter anderem die Zellproliferation, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Apoptose.

Am Anfang des Signalweges steht ein zellulärer Wachstums- und Differenzierungsfaktor-Rezeptor. Diese Rezeptor-Tyrosinkinase kann durch verschiedenste Hormone aktiviert werden, wie beispielsweise Wachstums- und Differenzierungshormone. Über Verbindungsproteine wird dadurch ein Austausch des an G-Protein RAS (von **Rat sarcoma**) gebundenen GDP mit GTP bewirkt, wodurch RAS aktiviert wird. Das aktivierte RAS bindet an eine RAF-Kinase. Davon gibt es mehrere Isoformen, u.a. ARAF, BRAF und CRAF (auch RAF1 genannt), wobei in den meisten Zellen hauptsächlich RAF1 exprimiert wird. Die Serin-Threonin-spezifische RAF1-Kinase unterliegt wiederum einer

Autoregulation, indem sie sich selbst inhibieren kann. Erst wenn dieses negative Feedback unterbrochen wird, kann eine Aktivierung erfolgen. RAF bindet dann an die nächste Kinase im Signalweg, was der MEK entspricht. Letztgenannte kann in zwei Subtypen unterteilt werden, welche sich aber nach bisherigen Erkenntnissen funktionell nicht unterscheiden. RAF kann sowohl MEK1 als auch MEK2 phosphorylieren, welche dadurch aktiviert werden. MEK ist eine spezifische Threonin-Tyrosin-Kinase und phosphoryliert weiter ERK, welches wiederum aus den Subtypen ERK1 und ERK2 besteht. ERK selbst interagiert mit über 50 Substraten, unter anderem auch Transkriptionsfaktoren und führt letztendlich zur Transkription der DNA [25].

Chakraborty et al. konnten in einem 3D-Modell zeigen, dass die *BRAF^{V600E}*- und die gefundenen *MAP2K1*-Mutationen zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 führen. In der durchflusszytometrischen Analyse von aus LCH-Läsionen isolierter CD207+ Zellen konnte dies bestätigt werden. Interessanterweise sah man jedoch auch bei der *BRAF*- und *MAP2K1*-Wildtyp-DNA zum Teil eine gesteigerte ERK1-Expression, trotz normal regulierter MEK1-Expression [15]. Dies lässt schließen, dass bei der LCH weitere, bisher unbekannte zelluläre Mechanismen und Mutationen unabhängig von MEK zu einer Expressionssteigerung von ERK führen.

Die mutationsbedingte Überaktivierung des ERK-Signalwegs ist ein häufiges Prinzip bei Karzinomen. So findet man *BRAF*-Mutationen mit der häufigsten Variante der *BRAF^{V600E}* laut COSMIC Datenbank unter anderem beim malignen Melanom, papillären Schilddrüsen-Karzinom, papillären Kraniopharyngeom, serratierten Kolonpolyp und weiteren Tumoren (Zugriff: 20.04.2017,[26]).

Seltener als *BRAF*-Mutationen, jedoch auch in der Tumorgenese mehrerer Tumore bekannt, sind *MAP2K1*-Mutationen, welche sich oft bei malignen Melanomen, bei Magen-Karzinomen, Haarzell-Leukämien, Endometrium-Karzinomen und Hämangioblastomen finden. Hier sind Punktmutationen typisch. Deletionen finden sich fast ausschließlich an zwei Hotspot-Regionen in Exon zwei und drei. In diesen Hotspot-Regionen sind auch die meisten Mutationen bei der LCH beschrieben (Zugriff: 20.04.2017,[27]).

1.2.2 Weitere Modelle zur Pathogenese

Obgleich die vorherrschende Entstehungstheorie der LCH auf den oben aufgeführten Mutationen im ERK-Signalweg beruht, so gibt es immer wieder weitere mögliche Modelle zur Pathogenese der LCH. Diese haben ihre Berechtigung hinsichtlich der Tatsache, dass bisher trotz Whole-Exome-Sequenzierung oder Next Generation Sequencing Cancer Panels nicht bei jedem LCH-Patienten Mutationen gefunden wurden. Auch die genaue Entstehung der entzündlichen Komponente, sowie die Vielfalt verschiedener Befalls- und Verlaufsmuster sind noch nicht hinreichend erklärt [15, 28, 29]. Deshalb wurden immer wieder weitere Untersuchungen und Hypothesen neben den klassisch neoplastisch-proliferativen Mutationsanalysen durchgeführt und aufgestellt. West et al. untersuchten mittels Durchflusszytometrie LCH-Läsionen. Sie führten mit der Entdeckung von nicht-klonalen CD1a-exprimierenden T-Zellen in LCH-Läsionen zu weiteren immunologischen Überlegungen: Bei sechs untersuchten Patienten wurden T-Zellen in mehreren Stadien gefunden, welche CD1a exprimierten. Es wurde die Hypothese einer reaktiven immunologischen Reaktion auf eine fehlerhafte CD1a-Expression auf der Oberfläche von Langerhans-Zellen und eines damit verbundenen CD1a-Überangebots aufgestellt. Dadurch könnten T-Zellen zur Antigenexpression von CD1a induziert werden [30]. Mehrfach wurde der Einfluss von Zytokinen und Chemokinen auf die Entwicklung der LCH untersucht, so auch beispielsweise in einer Arbeit von De Filippi et al. aus dem Jahr 2006. Dabei wurden verschiedene mit Zytokin-Signalwegen assoziierten SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) untersucht und die Hypothese aufgestellt, dass je nach genetischer Varianten der Interleukin 4 (IL-4) und Interferon- γ regulierenden Signalwege eine Anfälligkeit für einen multistystemischen Befall vorliegen kann [31].

Gerade die mehrfach beobachtete gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine, aber auch die verschiedenen Verläufe, unabhängig des Mutationsstatus, führten Murakami et al. zur Theorie einer viral getriggerten Pathogenese [32]. Sie untersuchten die Expression des Merkelzell-Polyomavirus bei LCH-Patienten. Bei Patienten mit Risiko-Organbefall konnte das Virus bereits in dendritischen Vorläuferzellen des Blutes, bei Patienten ohne Risikoorgan

dagegen nur im befallenen Gewebe nachgewiesen werden. Dies führte zur Hypothese einer reaktiven Immunreaktion auf Polyomavirus mit zugrundeliegendem und verstärkendem onkogenem Potenzial durch ERK-Signalweg-Mutationen. Während dendritische Wildtyp-Zellen eine Polyomavirus-Infektion fast unbemerkt bekämpfen, so gibt es bei mutierten Langerhans-Zellen oder Vorläuferzellen eine reaktive Störung, welche zur Proliferation der Langerhans-Zellen und zum Interleukin-1a-abhängigen Zytokinsturm führt. Je nach Immunstatus gegen Merkelzell-Polyomavirus und je nachdem, ob sich die Mutation und Infektion in Vorläuferzellen oder nur in lokalen Langerhans-Zellen abspielt, führt dieser Zytokinsturm zu unterschiedlichen Verläufen und Organbefall der LCH [32-34]. Nach diesem Modell könnte ein zukünftiger Angriffspunkt in der LCH-Therapie dann auch in einer Interleukin-1-Rezeptor-Blockade bestehen.

1.3 Das Tumorsuppressorprotein p16^{INK4A}

Einen weiteren Ansatz zur Vereinigung der Dichotomie zwischen neoplastischem und entzündlichem Geschehen stellten Cavalli et al. sowie Cangi et al. in dem Modell der oncogene-induced senescence (OIS) vor [35, 36]. Dieses Modell wurde von Cavalli et al. im Zusammenhang der Erdheim-Chester Erkrankung mit den dort häufig präsenten *BRAF*^{V600E}-Mutationen aufgestellt. Die Theorie geht davon aus, dass das Protoonkogen *BRAF*^{V600E}, falls keine weiteren protoonkogene Mutationen vorliegen, einen protektiven Mechanismus induziert. Wenn ein bestimmtes isoliertes Onkogen aktiviert ist, kann es durch die Expression des Zyklus-Inhibitors p16^{INK4A} und p21 zum Zellzyklus-Arrest führen, die einer Elimination früh-neoplastischer Zellen aus dem proliferativen Pool dient. Zu diesem protektiven Mechanismus gehört neben der Expression des Tumorsuppressorproteins p16 auch die reaktive Ausschüttung proinflammatorischer Chemokine und Zytokine. Dadurch kommt es im Bereich der *BRAF*-mutierten Zellen zu einer lokalen Inflammation, welche wiederum zur Inhibition des Wachstums der neoplastisch veränderten Zellen führt [35, 36] (Abbildung 4). Für die LCH gibt es bislang zwei Studien, die das

Expressionsmuster des Tumorsuppressorproteins p16^{INK4A} untersucht haben. Sowohl Kim et al. (2010) als auch Chilosi et al. (2013) entdeckten in der Mehrzahl der Proben die Expression des Zellzyklusinhibitors p16. Während von Kim et al. eine Tendenz zu einer stärkeren p16-Expression bei Risikoorgan-Befall beschrieben wurde, so lag bei Chilosi et al. gerade bei allen fünf Risikoorgan-Fällen keine p16-Expression vor. Dies führte Letztere zu der Hypothese eines Zusammenhangs zwischen einer fehlenden oder geringeren zellzyklushemmenden p16-Expression und Hochrisiko-Verläufen [37, 38]. Eine solche Korrelation würde die Expression von p16 zu einem möglichen Marker für Hochrisiko-Fälle machen und wäre damit für die Diagnostik und Prognose der LCH bedeutend.

All die genannten Studien verdeutlichen, dass die Pathogenese der LCH noch nicht im Detail erforscht ist und trotz der Entdeckung der somatischen ERK-Signalweg-Mutationen noch verschiedenste Erklärungsmodelle zur Entstehung und unterschiedlichen Ausprägung der LCH kursieren.

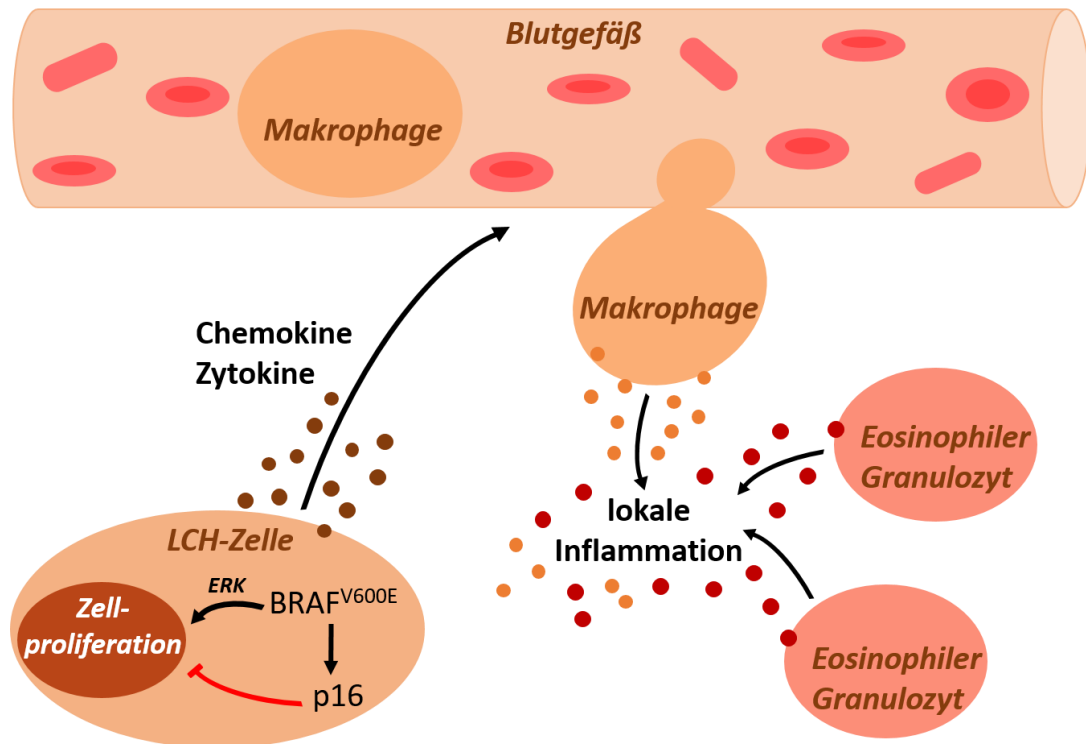


Abbildung 4: Darstellung des Modells der oncogenen induced senescence (OIS) bei $BRAF^{V600E}$ -mutierten Zellen (Grafik modifiziert nach Cavalli et al., 2014 [36])

In mutierten Zellen führt die mutierte $BRAF^{V600E}$ über Aktivierung des ERK-Signalweges zur Zellproliferation. Gleichzeitig werden Signalwege der oncogenen induced senescence (OIS) aktiviert. Diese führen unter anderem über das Tumorsuppressorprotein p16 zum Zellzyklusarrest und beenden damit die Zellproliferation. Es kommt außerdem zur Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen, welche Entzündungszellen anlocken. Durch Makrophagen und eosinophile Granulozyten kommt es zur lokalen Inflammation durch Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Signalstoffe.

1.4 Risikofaktoren für klinischen Verlauf und Spätfolgen

1.4.1 Bekannte Risikofaktoren für das Auftreten und den Verlauf der kindlichen LCH

Da die exakte Pathogenese der Langerhanszell-Histiozytose noch nicht geklärt ist, ist die Ermittlung von Risikofaktoren für das Auftreten dieser Erkrankung von besonderem klinischem Interesse. Wenige Zwillingsstudien und eine Fall-Kontroll-Studie von Venkatramani et al. deuteten auf eine mögliche erbliche Komponente hin, da die LCH beispielsweise zeitgleich und an der gleichen Lokalisation bei beiden Zwillingen auftrat oder bei LCH-Fällen eine erhöhte familiäre Tumorbelastung im Vergleich zu den Kontrollfällen vorlag [39, 40].

Venkatramani et al. untersuchten zudem noch weitere Einflussfaktoren, wie die familiäre Belastung mit Schilddrüsenerkrankungen, Rauchern in der Familie, Schwierigkeiten der Mutter während der Schwangerschaft und Pestizid-Exposition. Dabei konnten jedoch keine Zusammenhänge mit dem Auftreten der LCH erkannt werden. Nur die Rate an Infektionen im Kleinkindalter war bei LCH-Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Zudem arbeiteten die Eltern erkrankter Kinder häufiger mit Metall, Granit oder Holz [40].

Es sind jedoch nicht nur wenige Risikofaktoren für das Auftreten der LCH bekannt, auch gibt es bisher nur sehr eingeschränkt prognostische Parameter für deren unterschiedliche Verläufe. Laut S1-Leitlinie und LCH-I und LCH-II-Studie gelten inzwischen als negative prognostische Faktoren für das Auftreten von Rezidiven und das Gesamtüberleben der Befall der Risikoorgane Leber, Milz und Knochenmark, zudem ein Erkrankungsalter von unter zwei Jahren und ein schlechtes Ansprechen in den ersten sechs Wochen der Therapie [3, 4, 10, 11, 19, 41]. Yagci et al. gaben zudem erhöhte Akute-Phase-Proteine in der laborchemischen Untersuchung als negative prognostische Marker für das Gesamtüberleben an [3]. Zwischen den unterschiedlichen ERK-Signalweg-Mutationsträgern und den Wildtypträgern in der molekularbiologischen Untersuchung konnte bisher kein Unterschied im klinischen Erscheinungsbild gefunden werden. Berres et al. untersuchten das Blut von Patienten mit *BRAF^{V600E}*-positiven Langerhans-Zellen und konnten neben den Mutationen in den LCH-Läsionen zusätzlich *BRAF^{V600E}*-Mutationen in unreifen dendritischen Vorläuferzellen in Blut (CD11+ und CD14+ Monozyten) und Knochenmark (CD34+ myeloide Stammzellen) nachweisen. Dabei hatten alle Patienten mit Risikoorgan-Befall, bei denen *BRAF^{V600E}*-Mutationen in der LCH-Läsion gefunden wurden, auch *BRAF^{V600E}*-Mutationen in zirkulierenden Vorläuferzellen. Dies deutet darauf hin, dass somatische Mutationen in hämatogenen Progenitorzellen zu einer LCH mit Risikoorgan-Befall führen, während somatische Mutationen in ausgereiften gewebegebundenen dendritischen Zellen zu einem mildereren Verlauf führen [41]. Chakraborty et al. führten Mutationsanalysen von fünf Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und während eines Rückfalls durch und entdeckten, dass bei Rezidiven keine

Neumutationen gefunden wurden. Dabei bewerteten sie das Vorkommen von nur wenigen Mutationen im Vergleich zu anderen pädiatrischen Malignomen (0,03 Mutationen pro MB) als typisch für eine myeloproliferative Neoplasie. Außerdem konnte weder eine Korrelation der Mutationen mit dem Schweregrad der Erkrankung noch mit dem OS (overall survival, Gesamtüberleben) gezeigt werden. Daraus schlossen sie, dass die Zahl der Neumutationen für den Krankheitsverlauf nicht entscheidend ist, was für andere myeloproliferative Neoplasien wiederum eher untypisch sei [15].

1.4.2 Risikofaktoren für das Auftreten von Spätfolgen

Da es bisher wenige Studien über Spätfolgen bei der LCH gibt, konnten bisher auch nur wenige Risikofaktoren für deren Auftreten ermittelt werden. Zu diesen zählt die Bestrahlungstherapie, welche heutzutage auch deswegen obsolet ist. Ein weiterer Risikofaktor ist eine vorausgegangene medikamentöse Behandlung mit VP16/Etoposid. Beide Behandlungen stehen im Zusammenhang mit Zweitmalignomen bei LCH-Patienten. Minkov et al. stellten zudem einen Zusammenhang zwischen Rezidiven und Spätfolgen fest [42]. Spätfolgen der LCH werden laut Nanduri et al. zudem am stärksten von dem Ort des Befalls beeinflusst [21]. Es konnten also bisher noch wenige kausale Zusammenhänge zum Auftreten von Spätfolgen hergestellt werden.

1.5 Zielsetzung und zusammengefasste Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über die klinische Präsentation, Diagnostik und Therapie von 55 kindlichen LCH-Patienten, welche von 1981 bis 2014 in der Universitätskinderklinik Tübingen behandelt wurden, geben. Neben klinischen Risikofaktoren waren dabei auch molekulare Risikofaktoren von Interesse. Dafür wurden die archivierten Proben von 37 Patienten auf die Expression des Suppressorproteins p16, der vorbeschriebenen *BRAF*-Mutationen sowie *MAP2K1*-Mutationen untersucht und sodann mit den klinischen Verläufen korreliert. Um auch einen möglichen Einfluss der Mutationen und klinischer Faktoren auf das Auftreten von Spätfolgen zu ermitteln, wurden zudem

von 46 Patienten Fragebögen zu Spätfolgen und der familiären Tumorbelastung eingeholt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Xylol | VWR |
| Ethanol, 96-100%ig | Merck KGaA |
| LE Agarose | Biozym Scientific GmbH |
| 1xTBE-Puffer aus | |
| - TRIS 0,089 M | Sigma Aldrich |
| - Borsäure 0,089M | Merck |
| EDTA-Na ₂ 0,002M | AppliChem |
| Gel-Red™ Nucleid Acid Stain | Biotium |
| GeneRuler™, 100bp DNA-ladder | Fermentas |
| Mineraloil | Beckman Coulter |
| dNTPs | Fermentas |
| DMSO | Roche |
| PCR Grade Nucleotide Mix | Roche |
| Sample Loading Solution (SLS) | Beckman Coulter |
| Agencourt® CleanSEQ | Beckman Coulter |
| Agencourt® AMPure XP | Beckman Coulter |

2.1.2 Antikörper

| | |
|----------------------------------|-------|
| Monoclonal Mouse Anti-Human CD1a | Dako |
| Polyclonal Rabbit Anti-S100 | Dako |
| CINtec® p16 | Roche |
| BRAF V600E (VE-1) | DCS |

2.1.3 Kits

| | |
|-----------------------------|--------|
| QIAamp®DNA FFPE Tissue Kit | Qiagen |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen |

| | |
|--------------------------------|-------------------------|
| GenomeLab DTCS-Quick Start Kit | Beckman Coulter |
| OptiView DAB IHC Detection Kit | Ventana Medical Systems |
| iVIEW DAB Detection Kit | Ventana Medical Systems |

2.1.4 Enzyme

| | |
|---|--------------------------|
| Proteinase K | Qiagen |
| RNAse A | Qiagen |
| AmpliTaq Gold DNA Polymerase | Thermo Fisher Scientific |
| - 10x Puffer II (ohne MgCl ₂) | |
| - 25 mM MgCl ₂ | |
| Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase | Thermo Fisher Scientific |
| - 5x Puffer II (mit 7,5 mM MgCl ₂) | |
| Fast Start High Fidelity Polymerase | Roche |
| - 10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer without MgCl ₂ | |
| - 25 mM MgCl ₂ | |
| - DMSO (100%) | |

2.1.5 Primer

(LNA designt und hergestellt von Tibmol-biol, ansonsten alle hergestellt von Sigma Aldrich)

Primer M13

| | |
|---------|--------------------|
| Forward | TGTAAAACGACGGCCAGT |
| Reverse | CAGGAAACAGCTATGAC |

Primer Fluidigm

| | |
|---------|------------------------|
| Forward | ACACTGACGACATGGTTCTACA |
| Reverse | TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT |

Primer zur Prüfung der Amplifizierbarkeit der DNA [43]

| | |
|--|----------------------|
| Der 200 µl Mix enthielt 2x 5 µl AF4/X3 + 8x 2,5 µl (andere Primer) + 170 µl ddH ₂ O | |
| AF4/X3U | GGAGCAGCATTCCATCCAGC |
| AF4/X3L | CATCCATGGGCCGGACATAA |

| | |
|-----------------------|---|
| AF4/X11U | CCGCAGCAAGCAACGAACC |
| AF4/X11L | GCTTTCCTCTGGCGGCTCC |
| PLZF/X1U | TGCGATGTGGTCATCATGGTG |
| PLZF/X1L | CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC |
| RAG1/X2U | TGTTGACTCGATCCACCCCA |
| RAG1/X2L | TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA |
| TBXAS1/X9U | GCCCGACATTCTGCAAGTCC |
| TBXAS1/X9L | GGTGTTGCCGGAAGGGTT |
| Primer MAP2K1* | <i>(selbst designt mit Onlinetool Primer 3)</i> |
| MAP2K1_Ex2_M13_F | TGTA AACGACGGCCAGTTGACTTG TGCTCCCCACTTT |
| MAP2K1_Ex2_M13_R | CAGGAAACAGCTATGACGTCCCCAG GCTTCTAAGTACC |
| MAP2K1_A_M13_R | CAGGAAACAGCTATGACCACACCGC CATTGCCAG |
| MAP2K1_A_M13_F | TGTA AACGACGGCCAGTCAGAAGC AGAAGGTGGGAGA |
| MAP2K1_Ex3_M13_F | TGTA AACGACGGCCAGTTCATCCC TTCCTCCCTCTTT |
| MAP2K1_Ex3_M13_R | CAGGAAACAGCTATGACCTCTTAAG GCCATTGCTCCA |
| Primer BRAF* | <i>(von Roche designt)</i> |
| CS1_BRAF_E15-01F | ACACTGACGACATGGTTCTACATGC TTGCTCTGATAGGAAAATG |
| CS2_BRAF_E15-01R | TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCTG ATGGGACCCACTCCAT |
| BRAF LNA | 5'-TAGCTACAGTGAAATCTC-3' |

*) sequenzspezifischer Teil: normale Schriftdicke, **M13** oder **Fluidigm-Primer**: **fett gedruckt**

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

| Material | Gerät/System | Hersteller |
|-----------------|------------------|----------------|
| Objektträger | Superfrost® Plus | R. Langenbrick |
| | Objektträger | |
| Reaktionsgefäße | 2 ml, 1,5 ml | Sarstedt |
| | Reaktionsgefäße | |

| | | |
|-----------------|---|---|
| | 0,2 ml Multiply®-µStrip pro 8-strip | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. |
| Pipetten | Pipetman Gilson Eppendorf | Gilson Eppendorf |
| Pipettenspitzen | Safe Seal Tips Sapphire Pipette Tips | Biozym Scientific GmbH, Biotech Trading GmbH Greiner Bio-One GmbH |

2.1.7 Geräte

| | | |
|-----------------|---|---|
| Zentrifugen | Biozym Sproud Biofuge fresco COMBI-SPIN FVL-2400 Minizentrifuge Minicentrifuge Microfuge®16 Centrifuge | Heathrow Scientific® LLC Heraeus PEQLAB Biotechnologie GmbH neoLab National LABNET CO. Beckman Coulter Brea |
| Vortexer | Vibrationsschüttler Mixer UZUSIO VTX-3000L Vortex-2-Genie® | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG LMS CO. Scientific Industries, Inc. Bohemia |
| Thermoschüttler | Thriller®Thermo- Inkubationsmischer | PEQLAB, Biotechnologie GmbH |

| | | |
|---------------------------------------|--|---|
| Conzentrator | Eppendorf Concentrator 5301 | Eppendorf |
| Thermocycler Spectrometer | Thermocycler ABI 9700 Nano Drop 2000 | Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific |
| Sicherheitswerkbank | HERAsafe® | Thermo Scientific/Dharmacon |
| Geldokumentationssystem | Quantum Geldokumentationssystem | PEQLAB Biotechnologie GmbH |
| Power Supply Elektrophorese-System | Netzteil Electrophoresis Systems PerfectBlue Breitformat- Gelsystem | Pharmacia LKB Owl Separation Systems Inc. PEQLAB Biotechnologie GmbH |

2.1.8 Software

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| GenomeLab GeXP | Beckman Coulter |
| Genetic Analysis System | Brea |
| GenomeLab GeXP | Beckman Coulter |
| Software 10.2 | Brea |
| BioCapt | PEQLAB Biotechnologie GmbH |
| Nexus/PAS-NET | NEXUS AG |
| i.s.h.med | Cerner Corporation |

2.1.9 Hersteller

| | |
|----------------------|------------------------|
| AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Beckman Coulter Brea | CA, USA |
| Biotium | Hayward, CA, USA |

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Biozym Biotech Trading GmbH | Wien, Österreich |
| Biozym Scientific GmbH | Hess. Oldendorf, Deutschland |
| Cerner Corporation | North Kansas City, MO, USA |
| Dako | Santa Clara, CA, USA |
| DCS Innovative Diagnostik-Systeme | Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf | Köln/Wesseling, Deutschland |
| Fermentas | Burlington, Kanada |
| Gilson | Middleton, WI, USA |
| Greiner Bio-One GmbH | Frickenhausen, Deutschland |
| Heathrow Scientific® LLC | Illinois, USA |
| Heidolph Instruments GmbH & Co. KG | Schwabach, Deutschland |
| Heraeus | Hanau, Deutschland |
| LMS CO. | Tokyo, Japan |
| Merck KGaA | Darmstadt, Deutschland |
| National LABNET CO. | Woodbridge, NJ, USA |
| neoLab | Heidelberg, Deutschland |
| NEXUS AG | Frankfurt am Main, Deutschland |
| Owl Separation Systems Inc. | Portsmouth, NH, USA |
| PEQLAB Biotechnologie GmbH | Erlangen, Deutschland |
| Pharmacia LKB | Singapur, Singapur |
| R.Langenbrick | Emmendingen, Deutschland |
| Roche | Basel, Schweiz |
| Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. | Nümbrecht, Deutschland |
| Scientific Industries, Inc. Bohemia | NY, USA |
| Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| Thermo Scientific/Dharmacon | Lafayette, CO, USA |
| TIB MOLBIOL | Berlin, Deutschland |
| Ventana Medical Systems, Inc. | Oro Valley, AZ, USA |
| VWR | Darmstadt, Deutschland |

2.2 Auswahlkriterien des Patientenkollektivs

Zur Auswahl der LCH-Fälle lag ein Patientenregister der Kinderklinik Tübingen vor, welches alle dort vorgestellten LCH-Patienten von 1981 an bis Februar 2014 mit Geburtsdatum, Geschlecht und zum Teil Rezidivdatum erfasst. Zu den Einschlusskriterien für die retrospektive Subgruppe zählte das Vorhandensein von Altakten über den Verlauf der LCH in Papierform oder digital und/oder die Information über Spätfolgen durch einen dazu ausgefüllten Fragebogen.

Zur histologischen und molekularpathologischen Analyse wurde anhand des Patientenregisters der Kinderklinik das institutseigene System der Pathologie (PAS.net) durchsucht. Darin sind alle histologischen Befunde und Proben verzeichnet.

2.3 Immunhistochemische Klassifizierung

Alle HE- und immunhistochemischen Färbungen wurden von zwei Pathologen des Institutes für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie Tübingen überprüft. Der aktuelle Standard zur pathologischen Diagnostik der LCH ist laut S1-Leitlinie der Nachweis des für die pathologischen Langerhans-Zellen spezifischen CD1a-Antigens und/oder von Langerin (CD207) [4, 7]. Die Alternative zu letzterem ist der elektronenmikroskopische Nachweis von Bierbeck-Granula. Alle 37 aufgefundenen Paraffin-Blöcke wurden geschnitten und immunhistochemische Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin, S100- und CD1a-Antikörpern angefertigt.

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

Zur Sicherung der Diagnose der LCH wurde zunächst von allen Fällen eine HE-Färbung gemacht. Es wurde dabei auf eine Vermehrung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, aber vor allem dem Vorkommen von LCH-Zellen und Riesenzellen geachtet. Zudem wurden die Tumorareale für die spätere molekulare Analyse markiert.

2.3.2 S100-Färbung

Es wurde von allen Fällen eine S100 Färbung mit Polyclonal Rabbit Anti-S100 (Dako) in einer 1:8000-Verdünnung mit dem OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.) nach Hersteller-Angaben gemacht. In der Auswertung wurde zwischen S100 positiven und negativen Proben unterschieden. Dies entspricht dem Vorkommen von Protein S100 exprimierenden Zellen, welche in der Färbung braun dargestellt wurden.

2.3.3 CD1a-Färbung

Als spezifischste Immunfärbung zählt die CD1a-Färbung, durch welche das Oberflächenprotein CD1a anfärbt wird. Dafür wurde der Monoclonal Mouse Anti-Human CD1a-Antikörper (Dako) in einer 1:50-Verdünnung mit dem iVIEW DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.) nach Hersteller-Angaben verwendet. In der Auswertung wurde zwischen CD1a positiven und negativen Proben unterschieden.

2.3.4 Nachweis der Expression von p16INK4a

Die p16-Immunfärbung wurde mit dem CINtec® p16 in der Ausgangsverdünnung (Roche) und dem OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird die Antigenbindung über eine Biotin-Streptavidin vermittelte enzymatische Reaktion durch Umwandlung von Chromogen in ein bräunliches Substrat sichtbar gemacht. Zur Auswertung der Expression des Tumorsuppressorproteins p16 wurde zur Orientierung ein Score erstellt, welcher sich aus der Intensität und der Menge der p16 positiven Zellen zusammensetzt. Bei der Intensität gab es vier Unterteilungen von null bis drei, dabei steht null für keine Färbung des Schnitts. Eins, zwei und drei steht für eine schwache, mittlere und starke Anfärbung mit dem Antikörper. Bei der Quantität gab es vier Unterteilungen, dabei steht null für eine Anfärbung von kleiner fünf Prozent der im Schnitt vorkommenden Langerhans-Zellen, weiter steht eins für 5-24 %, zwei für 25-50 %, drei für 50-75 % und vier für 75-100 %

angefärbte LCH-Zellen. Der verwendete Score setzt sich aus der Multiplikation der beiden Werte zusammen. Dabei wurde je nach Intensität und Menge eine Einteilung in die Gruppen schwache (Score-Wert 0-4), mittelstarke (Score-Wert 5-8) und starke Expression (Score-Wert 9-12) vorgenommen.

2.3.5 Nachweis einer *BRAF*^{V600E} Mutation

Für die immunhistochemische Detektion einer *BRAF*^{V600E} Mutation wurde der BRAF V600E (VE-1)-Antikörper (DCS) in einer 1:50-Verdünnung mit dem OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde bewertet, ob die dendritischen LCH-Zellen braun verfärbt waren, d.h. ob *BRAF* mutiert war. Die drei Bewertungskategorien waren positiv, unklar bewertbar und negativ.

2.4 Molekularpathologische Analysen

2.4.1 DNA-Extraktion aus FFPE Gewebe

Die Gewebeproben waren Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) im Archiv gelagert. Zunächst wurden die zu dissezierenden Areale auf den HE-Schnitten so ausgewählt und markiert, dass ein Tumorgehalt größer 30 % erreicht wurde. Die DNA-Extraktion aus FFPE-Material wurde mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Entparaffinierung der Proben wurden dabei zunächst je nach Tumorgehalt und –größe 2-25 Paraffinschnitte a 5 µm Dicke angefertigt, diese auf Objektträger aufgezogen und zweimalig in Xylol (VWR) getaucht und zur Verdampfung des Xylols luftgetrocknet. Sodann wurden die vorher markierten Tumorareale mit einem Skalpell makrodisseziert und in 100%iges Ethanol (Merck KGaA) überführt, die Ansätze mittels Vortex gemischt, bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das restliche Ethanol bei 30°C im Thermoschüttler verdampft. Das Pellet wurde dann in ATL-Puffer (Qiagen) resuspendiert und die Ansätze nach Hinzufügen von Proteinase K (Qiagen) mittels Vortex gemischt. Nach Inkubation im Thermoschüttler über Nacht wurde

RNAse A (Qiagen) hinzugefügt. Es folgte eine Aufreinigung des Lysats über ein Säulchen (Qiagen), an dessen Membran die DNA gebunden bleibt, während die weiteren Bestandteile des Lysats mit mehreren Waschschrritten entfernt werden. Dafür wurde der AW1 und AW2 Puffer (Qiagen) nach den Herstellerangaben von Qiagen verwendet. Anschließend wurden die Säulchen mit 13000rpm zentrifugiert um die Membran zu trocknen. Die DNA wurde mit ATE-Puffer (Qiagen) eluiert. Die Konzentration der in der Elution vorhandenen DNA wurde mit einem Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen.

2.4.2 Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA

Durch die Formalinfixierung der Proben wird die DANN, abhängig von Gewebeart und Alter, unterschiedlich stark fragmentiert. Eine starke Fragmentierung kann laut Fend et al. zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen [44]. Zudem ist bei zu kleinen Fragmenten eine Amplifikation größerer Genabschnitte nicht möglich. Deshalb wurde zur Abschätzung der Amplifizierbarkeit der DNA in einer Multiplex-Kontroll-PCR verschieden lange Genregionen amplifiziert (TBXAS1 (100bp), RAG1 (200 bp), PLZF (300 bp), AF4 Exon 11 (400 bp) und AF4 Exon 3 (600 bp)) (Tabelle 1) nach van Dongen et al [43].

Tabelle 1: Schematische Darstellung des PCR-Programms zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA

| Reagenz | Volumen pro Ansatz [µl] | Endkonzentration/Menge |
|---|-------------------------|--|
| ddH ₂ O | 16,7 | |
| 10x Puffer II (ohne MgCl ₂) | 2,5 | |
| 25 mM MgCl ₂ | 2 | 2 mM |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 0,2 mM |
| Primer Mix | 2 | AFAX3 2,5 µM, alle anderen mit 1,25 µM |
| AmpliTaq Gold DNA Polymerase | 0,3 | 0,06 U/µl |
| DNA-Probe (50 ng/µl) | 1 | 50 ng |
| Gesamtvolumen pro Ansatz | 25 µl | |
| PCR-Programm | | |
| Temperatur in °C | Zeit in Minuten | Zyklen |
| 95 | 7:00 | |
| 95 | 0:45 | } 35 |
| 60 | 0:45 | |
| 72 | 1:30 | |
| 72 | 7:00 | |
| 12 | unendlich | |

2.4.3 Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Es wurde ein zweiprozentiges Agarosegel, bestehend aus 2 g LE-Agarose (Biozym Scientific GmbH) und 100 ml 1x TBE-Puffer verwendet. Als Fluorophor wurden 7 µl Gel-Red™ Nucleid Acid Stain (Biotium) pro 100 ml Gel verwendet, welches in die DNA interkaliert. Dadurch sind die PCR-Produkte unter UV-Licht deutlich als Banden erkennbar. Im Vergleich liefen in jedem Gel 10 µl eines Größenstandards (GeneRuler™ 100bp DNA-ladder) mit, welcher Fragmente mit 100, 200, 300, 400, 600 Basenpaarlänge enthält. Zudem wurden 2 µl Loading Dye (Fermentas) pro Ansatz verwendet. Dies enthält laut Hersteller Glycerol zum Absenken der Probe in die Geltasche und beinhaltet zwei verschieden lange Farbmarker: bromophenol blue (3000–4000 bp) und xylene cyanol FF(200–300 bp), welche

die Migration der DNA im Gel anzeigen. Bei 140 Volt wurde die Elektrophorese 35 Minuten lang durchgeführt. Je nach DNA-Fragment-Länge wandert die Probe im Gel unterschiedlich schnell in Richtung Anode, wobei die kürzeren DNA-Fragmente schneller wandern.

Mit dem Geldokumentationssystem BioCapt (PEQLAB Biotechnologie GmbH), wurden die DNA-Banden unter UV-Licht detektiert und fotografiert. Die Amplifizierbarkeit der DNA wurde anhand der maximal amplifizierten Produktlängen abgeschätzt.

2.4.4 Mutationsanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sanger Sequenzierung

2.4.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der molekulargenetische Nachweis der *BRAF*^{V600E} Mutation erfolgte über eine Amplifikation mittels PCR von 187 bp um das Kodon 600 des *BRAF* Genabschnittes und einer anschließenden Sequenzierung nach Sanger. Es wurden die Primer CS1_BRAF_E15-01F und CS2_BRAF_E15-01R mit Fluidigm-Anhang verwendet. Standardmäßig fand die DNA-Amplifikation durch die Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) statt (Tabelle 2). Bei geringem Tumorzellgehalt wurde zur Anreicherung der mutierten DNA-Stränge die Fast Start High Fidelity Polymerase (Roche) zusammen mit Locked Nucleic Acid (LNA, TIB MOLBIOL) verwendet (Tabelle 3). Die LNA ist ein RNA-Oligonukleotid, welches an die *BRAF*-Wildtypsequenz im Kodon 600 bindet. Das LNA-Molekül hat durch eine zusätzliche Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff eine erhöhte Schmelztemperatur und eine höhere Affinität zum Basenpartner. Die Bindung der LNA an die Wildtyp-DNA wird während der Denaturierungsphase nicht gelöst, wodurch keine Amplifikation der Wildtypsequenz, dafür aber der *BRAF*^{V600E}-mutierten DNA-Stränge verstärkt stattfinden kann.

Zur Analyse der relevanten Regionen in *MAP2K1* wurden die kompletten Exons 2 und 3 sequenziert. Zusätzlich wurde bei einer Probe, welche eine geringe Amplifizierbarkeit gezeigt hatte, das Exon 2 mit den Primern MAP2K1_A_M13_F

und MAP2K1_A_M13_R in zwei kürzeren Teilen analysiert. Die Amplifikation erfolgte mit der Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) (Tabelle 2).

Tabelle 2: PCR zur Mutationsanalyse der Regionen in *BRAF* und *MAP2K1*

| Reagenz | Volumen pro Ansatz [µl] | Endkonzentration/Menge |
|--|-------------------------|--------------------------|
| ddH ₂ O | 17,25 | |
| 5x Puffer II (mit 7,5 mM MgCl ₂) | 2,5 | 1,5 mM MgCl ₂ |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 0,2 mM |
| Für <i>BRAF</i> | | |
| CS1_BRAF_E15-01F | | |
| CS1_BRAF_E15-01R | | |
| Für <i>MAP2K1</i> Exon 2: | | |
| MAP2K1_Ex2_M13_F | 0,5 | 0,2 mM |
| MAP2K1_Ex2_M13_R | 0,5 | 0,2 mM |
| Für <i>MAP2K1</i> Exon 3: | | |
| MAP2K1_Ex3_M13_F | 0,5 | 0,2 mM |
| MAP2K1_Ex3_M13_R | 0,5 | 0,2 mM |
| Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase | 0,25 | 0,02 U/µl |
| LNA | 0,5 | 2 mM |
| DNA-Probe (50 ng/µl) | 1 | 50 ng |
| Gesamtvolumen pro Ansatz | 25 µl | |
| PCR-Programm | | |
| Temperatur in °C | Zeit in Minuten | Zyklen |
| 98 | 0:30 | |
| 98 | 0:10 | 40 |
| 56 | 1:15 | |
| 72 | 0:45 | |
| 72 | 7:00 | |
| 12 | unendlich | |

Tabelle 3: PCR zur Mutationsanalyse von *BRAF* mit LNA bei Proben mit schlechter Amplifizierbarkeit der DNA

| Reagenz | Volumen pro 25 µl-Ansatz [µl] | Endkonzentration/Menge |
|---|-------------------------------|------------------------|
| ddH ₂ O | 13,75 | |
| 10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer without MgCl ₂ | 2,5 | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 4,5 | 4,5 mM |
| DMSO (100%) | 1,25 | 5% |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 0,2 mM |
| Forward Primer | 0,125 | 0,05 µM |
| Reverse Primer | 0,125 | 0,05 µM |
| FastStart High Fidelity Enzyme Blend | 0,25 | 0,05 U/µl |
| LNA | 0,5 | 2mM |
| DNA-Probe (50 ng/µl) | 2 | 100 ng |
| Gesamtvolumen pro Ansatz | 25 µl | |

| PCR-Programm | | |
|------------------|-----------------|--------|
| Temperatur in °C | Zeit in Minuten | Zyklen |
| 50 | 02:00 | |
| 70 | 20:00 | |
| 95 | 10:00 | |
| 95 | 00:15 | } 10 |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 95 | 00:15 | } 2 |
| 80 | 00:30 | |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 95 | 00:15 | } 8 |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 95 | 00:15 | } 2 |
| 80 | 00:30 | |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 95 | 00:15 | } 8 |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 95 | 00:15 | } 2 |
| 80 | 00:30 | |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 95 | 00:15 | } 8 |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 95 | 00:15 | } 5 |
| 80 | 00:30 | |
| 60 | 00:30 | |
| 72 | 01:00 | |
| 12 | unendlich | |

2.4.4.2 **Aufreinigung der PCR-Produkte mit Agencourt®AMPure®XP**

Zur Vorbereitung des PCR-Produktes für die Sequenzierung nach Sanger erfolgte eine Aufreinigung, bei welcher überschüssige Enzyme, Primer und Desoxynukleotide entfernt wurden.

Dafür wurde das AMPure Reagenz von Beckman Coulter verwendet, welches paramagnetische Beads zur Bindung an die negativ geladene DNA enthält. Im ersten Schritt wurde die gleiche Menge PCR-Produkt und AMPure Reagenz in 0,2 ml Reaktionsgefäßen gemischt. Bei einer fünfminütigen Inkubationszeit konnte die DNA an die paramagnetischen Beads binden. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in eine Magnetplatte mit Magnetringen gestellt, sodass sich die Beads durch die magnetische Anziehung am seitlichen Rand der Gefäße ablagern konnten. Der Überstand wurde abgenommen. Nicht verwendete Primer, Enzyme und weitere Restprodukte wurden mit zweimaligem Waschen mit 200 µl 70 % Ethanol (hergestellt aus Ethanol 96–100 %, Merck KGaA) entfernt. Die an die Beads gebundene DNA wurde luftgetrocknet und abhängig von der Bandenstärke in der Gelelektrophorese als Maß für die Menge des PCR-Produktes in 20–40 µl ddH₂O eluiert. Zur Weiterverwendung des aufgereinigten PCR-Produktes wurden die Beads in der Magnetplatte am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt und jeweils nur der Überstand mit der eluierten DNA verwendet.

2.4.4.3 **Sequenzierreaktion nach Sanger**

Für die Kettenabbruchmethoden-Reaktion nach Sanger wurden nun für eine höhere Spezifität zwei Ansätze pro Probe angefertigt: sowohl für die 5´- Leserichtung als auch die 3´-Leserichtung. Es wurde dafür das GenomeLab DTCS-Quick Start Kit von Beckman Coulter verwendet (Tabelle 4). Die darin enthaltenen Forward- bzw. Reverse-Primer binden an den jeweiligen M13 bzw. Fluidigm Primer-Anhang, welcher der primären PCR angefügt wurde. Für jeden PCR-Ansatz wird neben den Primern, dem PCR-Produkt und DNase und RNase freiem Wasser noch DTCS-Mix (Beckman Coulter) hinzugegeben. Dieser enthält neben einer Polymerase und Desoxyribonucleosidtriphosphaten zusätzlich

fluoreszenzmarkierte 2´3´Dideoxynucleosidtriphosphate (ddNTPs). Diese werden von der Polymerase zufällig eingebaut. Durch die oxidierte OH-Gruppe am 3´-Ende der ddNTPs kann keine weitere Nukleotidverbindung bewirkt werden und es kommt an der jeweiligen Stelle zum Kettenabbruch. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Produkte mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs am Ende jedes Stranges.

Tabelle 4: PCR zur Sequenzanalyse nach Sanger

| Reagenz | Volumen pro 25 µl-Ansatz [µl] | Endkonzentration/Menge |
|--|-------------------------------|------------------------|
| ddH ₂ O | 0-3 | |
| GenomeLab DTCS-Quick-Start Kit | 2 | |
| Forward Primer (10 µM) oder Reverse Primer (10 µM) | 0,5 | 0,2 µM |
| Aufgereinigtes PCR-Produkt | 4-7 (je nach Bandenstärke) | 13 ng |
| Gesamtvolumen pro Ansatz | 10 µl | |
| PCR-Programm | | |
| Temperatur in °C | Zeit in Minuten | Zyklen |
| 96 | 0:20 | } 30 |
| 56 | 0:20 | |
| 72 | 4:00 | |
| 12 | unendlich | |

2.4.4.4 **Aufreinigung der Sequenzierreaktion mit Agencourt®CleanSEQ®**

Vor der Sequenzanalyse wurde eine weitere Aufreinigung (Agencourt® CleanSEQ®, Beckman Coulter) vorgenommen. Dabei wurde genau so viel Volumen an Agencourt® CleanSEQ in jeden Ansatz gegeben wie Probevolumen in den PCR-Reaktionsgefäßen vorhanden war, also 10–13 µl. Darin sind ähnlich dem Agencourt®AMPure® XP magnetische Beads enthalten, an die die PCR-Produkte aus der Kettenabbruchreaktion binden. Durch Hinzufügen von 42 µl (85 %) (hergestellt aus Ethanol 96–100 %, Merck KGaA) und Mixen jedes

Ansatzes mit einer Pipette oder optional mit dem Vortexer wurde die Bindungsreaktion optimiert. Es folgte eine Inkubationszeit von drei Minuten, sodann wurden die Ansätze auf eine Magnetplatte gestellt, die Beads hafteten sich am Rand des Reaktionsgefäßes an und alle Nebenbestandteile der CycleSequencing PCR, wie bzw. ungebundene Farbstoffe, Nukleotide, Salze und andere Verunreinigungen wurden mit der Pipette entfernt. Es folgte eine weitere Waschung mit 100 µl Ethanol (85 %) pro Ansatz. Als letzter Schritt wurde dann die gebundene DNA mit 30–40 µl Sample Loading Solution (SLS, Beckman Coulter) Elutionspuffer, je nach DNA-Konzentration, gelöst. Die Proben wurden jeweils mit einem Tropfen Mineraloil (Beckman Coulter) überschichtet, um eine Verdunstung im Sequenzer zu verhindern. Nach dieser letzten Aufreinigung folgte die Sequenzanalyse nach Sanger.

2.4.4.5 Sequenzanalyse mit GenomeLab System Programm

Die Analyse der Kettenabbruch-Reaktion erfolgte mit dem GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter). Dieses Gerät trennt die unterschiedlich langen Fragmente aus jedem Probenansatz mittels Kapillargelelektrophorese und Größe auf. Da jedes der ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, wird aus der Farbabfolge der Produkte der Kapillargelelektrophorese die Basenabfolge elektronisch abgelesen. Für die Auswertung und den Vergleich der Forward- und Reverse-Sequenz wurde das Analyse-Programm GenomeLab GeXP Genetic Analysis System von Beckman Coulter verwendet.

2.5 Recherche der klinischen Daten

2.5.1 Ethikvotum

Für die Studie liegt ein Ethikvotum der Medizinischen Fakultät Tübingen vor (502/2014BO2, Anhang).

2.5.2 Recherche im ISH-med-Programm des UKT

Die Einholung der klinischen Daten und Laborparameter erfolgte über das digitale Aktenarchiv ISH-med des Uniklinikums Tübingens. Es beinhaltet die Befunde aller Patienten seit 2004 in digitaler oder eingescannter Form. Zunächst wurde hier jeder Patient des oben beschriebenen klinikeigenen Patientenregisters der Kinderklinik vorgestellten LCH-Patienten von 1981 bis 2014 gesucht. Über die Suchmaschine des Programms kann ein Patient anhand des Geburtsdatums und/oder des Vor- und/oder Nachnamens ermittelt werden. Sodann wurde selektiert nach Fällen, bei denen im ISH-med noch Akten aufgeführt waren, und solchen, bei welchen aufgrund des langen Zeitraums keine Unterlagen mehr vorlagen.

Es wurde eine Datenbank angelegt, in welche untenstehende, den Krankheitsverlauf der LCH betreffende, Daten eingetragen wurden. Die Daten wurden in digitaler Form aus dem Archiv entnommen. Bei ganz aktuellen oder älteren und teilweise nicht eingescannten Akten musste auf die Papierform zurückgegriffen werden. Dafür wurden die Patientenakten aus dem Aktenarchiv der hämatologischen Ambulanz der Kinderklinik bestellt und gesichtet.

Zur Pseudonymisierung der Patientendaten bekam jeder Patient eine Identifikationsnummer zugeteilt. Der Schlüssel dazu wurde in einem separaten Dokument aufbewahrt. Alle Akten und Dokumente sind nur für Mitarbeiter der Kinderklinik und die an der Promotionsarbeit involvierten Mitarbeiter des Instituts für Pathologie zugänglich, welche alle unter Schweigepflicht stehen.

Für jeden Patienten wurde ein Register angelegt mit den Kategorien „Arztbriefe“, „Verlaufsberichte und -kurven“, „Bildgebung“, „Laborbefunde“ und „pathologische Befunde“. Um eine Möglichkeit zur späteren Überprüfung der Datenbank zu haben, wurden alle Dokumente, aus denen Inhalte für die Datenbank entnommen wurden, ausgedruckt oder kopiert und in dem Patientenregister des jeweiligen Patienten abgeheftet.

2.5.3 Definition der klinischen Parameter

2.5.3.1 *Diagnosestellung*

In allen 37 Fällen mit vorliegendem Paraffin-Material wurde die LCH jeweils anhand einer S100 und CD1a Färbung bestätigt. Diese waren zumeist schon bei Diagnosestellung gemacht worden, die fehlenden wurden noch ergänzt.

Die 55 Patienten zur retrospektiven Analyse wurden bis auf einzelne Ausnahmen alle anhand einer körperlichen Untersuchung, einem Blutbild, einer Bildgebung (Sonographie, Röntgen, Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Szintigraphie oder Kombination daraus) und einer Biopsie diagnostiziert.

2.5.3.2 *Definition der klinischen Verlaufsparemeter*

Bei der Langerhanszell-Histiozytose gibt es zwei prognostisch relevante Stadien: eine monosystemische LCH liegt vor, wenn nur ein Organsystem (in dem Fall meist Knochen, Haut, Hypophyse oder ZNS) betroffen sind, eine multisystemische LCH bedeutet den Befall von mehr als einem Organsystem. Als prognostisch wichtigster Parameter gilt der Befall von ein oder mehreren Risikoorganen, zu welchen nach den neuen S1-Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GOPH) [4] die Leber, Milz und das hämatopoetische System gehören. Dabei sind die Kriterien für einen Befall der Milz definiert als größer drei Zentimeter unter dem Rippenbogen tastbare Milz, welche sonographisch als Splenomegalie bestätigt wird. Für einen Befall der Leber gelten dieselben Kriterien. Neben dem Tastbefund und sonographischer Bestätigung einer Hepatomegalie kann die Diagnose aber auch durch sonographisch oder radiologische Darstellung intrahepatischer nodulärer Herde oder Läsionen erfolgen. Auch eine Leberfunktionsstörung, welche sich im Blutbild zeigt, zählt als Diagnosekriterium. Dazu zählen ein größer dreifach erhöhter Bilirubin-Wert, ein Albumin-Wert kleiner 30 g/dl, eine über das doppelte des Normwertes erhöhte Gamma-Glutamyl-Transferase oder eine Erhöhung der Transaminasen über das dreifache der Norm, das Auftreten von Aszites oder Ödemen. Der Befall des hämatopoetischen Systems liegt vor, falls der Hämoglobinwert unter 10 g/dl und zusätzlich die Thrombozyten-Zahl kleiner

100 000/mm³ betragen. Hier wurde zusätzlich noch eine für einen LCH-Befall des Knochenmarks typische Knochenmarks-Punktion hinzugezählt. Für einen Lungenbefall sprechen laut S1-Richtlinie eine typische computertomographische Bildgebung, in der sich Knötchen und Zysten zeigen, oder eine atypische Raumforderung, welche mittels bronchoalveolärer Lavage oder Biopsie auf eine LCH schließen lässt. Die Kriterien für einen ZNS-Befall sind intrazerebrale Raumforderungen, Zeichen einer Neurodegeneration im Bereich des Nucleus dentatus, dem Cerebellum, oder einer Atrophie, oder eine zum MRT passende neurodegenerative Klinik [4]. Die Sicherung eines Knochenbefalls muss laut S1-Leitlinie radiologisch gesichert werden. Dabei ist zu beachten, dass „alleinige Abnormalitäten am Tc-Knochen-Scan oder Signalalterationen am MRT ohne entsprechende Symptome oder entsprechende Veränderungen am Nativröntgen [] nicht als Läsionen gewertet“ werden [45]. Ein Hautbefall in Form eines Exanthems muss histologisch gesichert werden. Falls von anderen Körperregionen histologisch eine LCH gesichert ist, zählt zum Hautbefall auch das Auftreten von folgenden LCH-typischen Läsionen: „erythematöse und verkrustete Makula, Papeln oder Knötchen mit oder ohne Ulzerationen, Petechien, oder seborrhoische Effloreszenzen“ [4].

Die Therapie wurde nur für den Zeitraum zwischen Erstdiagnose und der Remission bzw. dem ersten Rezidiv ausgewertet. Es gab verschiedene Therapieoptionen, darunter auch „keine Therapie“ nach dem „watch-and-wait“-Prinzip. Hier wurde eine Biopsie oder eine Lokalthherapie mit Steroiden oder lokal angewendeten Chemotherapeutika miteingeschlossen. Weiter gab es die Untergruppen „nur systemische Chemotherapie“, „nur chirurgische Resektion“ der Läsion, „nur Bestrahlung“, sowie allen Kombinationen aus den drei letztgenannten, also „systemische Chemotherapie und Bestrahlung“, „chirurgische Resektion und Bestrahlung“, „chirurgische Resektion und systemische Chemotherapie“ und „chirurgische Resektion, systemische Chemotherapie und Bestrahlung“. Als weitere Therapieoption wurde noch „andere Therapien“ angegeben, unter die beispielsweise eine Stammzelltransplantation fallen würde. Es wurden weiter die verschiedenen

Chemotherapeutika mit dem Ansetzdatum und der Verabreichungsdauer erhoben.

2.5.3.3 *Definition der Laborparameter*

Für die Transversalbeurteilung der verschiedenen Laborparameter, wurde die klinische Subgruppe in vier Altersgruppen unterteilt. Diese wurden so eingeteilt, dass eine möglichst genaue Anpassung an die physiologischen Referenzbereiche im Altersverlauf gegeben war: alle Kinder von 33 Tagen bis kleiner ein Jahr, von einem Jahr bis drei Jahren, von vier bis zwölf Jahren und von größer zwölf Jahren. Dementsprechend wurden für jede Altersgruppe die Normbereiche der einzelnen Blutparameter definiert. Diese wurden für die meisten Laborparameter mit Hilfe der jeweiligen Angaben des Standardwerkes „Labor und Diagnose“ von Lothar Thomas (siebte Auflage, 2008) erstellt [46] (Tabelle 5). Abnahmezeitpunkte waren bei Erstdiagnose der Erkrankung, bei Patienten mit Rezidiven während eines Rezidivs und nach Genesung.

Tabelle 5: Referenzwerte der Laborparameter

Die Patienten wurden in vier Altersgruppen unterteilt. Manche Referenzwerte gelten für mehrere Altersgruppen und wurden hier deshalb spaltenübergreifend dargestellt. Die Einheit des jeweiligen Laborparameters ist der letzten Spalte zu entnehmen.

| | 33 Tag - ≤ 1 Jahr | 1-3 Jahre | >3 - ≤12 Jahre | >12 Jahre | Einheit |
|--------------------------|----------------------------------|---------------|----------------|----------------------------------|---------|
| GOT | ≥ 100 | ≥ 50 | | | U/l |
| GPT | ≥ 65 | ≥ 40 | | | U/l |
| Bilirubin* | ≥ 1,0 | | ≥ 1,2 | | mg/dl |
| Kreatinin* | > 0,4 | > 0,7 | | | mg/dl |
| BSG | m: > 15 w: > 20 | | | | mm/h |
| CRP | ≥ 0,51 | | | | mg/l |
| LDH | m: < 152/> 353 w: < 129/> 373 | < 117/> 286 | | | U/l |
| Ferritin | > 39,9 | > 7,8 | | | µg/l |
| Erythrozyten* | < 3,1/> 5,5 | < 3,7/> 5,3 | < 3,9/> 5,2 | m: < 4,5/> 5,9 w: < 4,0/> 5,0 | Mio/µl |
| Hb* | < 9,0/> 17,9 | < 10,7/> 13,1 | < 11,1/> 14,7 | < 11,8/> 16,8 | g/l |
| MCV* | < 73/> 126 | < 73/> 102 | < 77/> 89 | < 77/> 92 | fl |
| Thrombozyten* | < 140/> 360 | | | | 1000/µl |
| Leukozyten | < 6,5/> 15,0 | < 5,0/> 15,0 | < 4,5/> 12,0 | < 4,5/> 10,5 | 1000/µl |
| Neutrophile Granulozyten | < 1,5/> 9,0 | < 2,0/> 9,0 | < 2,0/> 8,0 | < 2,0/> 7,5 | 1000/µl |
| Eosinophile Granulozyten | > 0,5 | > 0,4 | | > 0,3 | 1000/µl |
| Lymphozyten | < 1,6/> 8,0 | < 1,5/> 7,0 | < 1,2/> 4,5 | < 1,0/> 3,2 | 1000/µl |

2.6 Einholung aktueller Daten zu Folgeschäden und erblicher Belastung anhand eines Fragebogens

2.6.1 Ermittlung der Patientenadressen

Wie bereits oben beschrieben konnten die Adressen von 62 Patienten des Patientenregisters der Kinderklinik Tübingen im klinikeigenen Computersystem ISH-med ermittelt werden, welche alle angeschrieben wurden. Von sieben Patienten lagen keine aktuellen Adressen vor. Diese konnten mit der freundlichen Hilfe von Prof. P. Kaatsch vom Kinderkrebsregister Berlin ermittelt werden. Um

die Rücklaufquote zu erhöhen, wurden manche Patienten zweimal angeschrieben.

2.6.2 Inhalt und Gütekriterien des Fragebogens

Für die prospektive Recherche wurde ein Anschreiben mit Fragebogen verwendet (Anhang). Die Fragestellungen dahinter waren, ob im Verlauf weitere nicht erfasste Rezidive aufgetreten sind, ob und welche Spätfolgen oder Zweitumore bei den Patienten Jahre nach der Erkrankung der LCH auftraten und ob eine familiäre Belastung mit (verwandten) Tumoren bei diesem Kollektiv vorlag. Es wurden dafür selbstentwickelte Fragebögen verwendet, welche vom Studienleiter überprüft und von zwei unabhängigen, nichtinvolvierten Testpersonen vorher probeweise ausgefüllt wurden. Der Fragebogen beinhaltet vier Ja-Nein-Fragen, wobei der Ja-Option mehrere Auswahlmöglichkeiten und ein Feld für freien Text untergeordnet waren. Es wurde bei der Formulierung der Fragen auf eine klare, verständliche Sprache mit ggf. Übersetzung von medizinischen Fachwörtern ins Deutsche geachtet. Die Sätze wurden kurzgehalten und jede Frage enthielt nur eine Fragestellung. Das Testgütekriterium der Durchführungsobjektivität wurde durch eine einheitliche schriftliche Anleitung zum Fragebogen gewahrt. Die Durchführungsbedingungen variierten insofern, dass die meisten der Fragebogen zu Hause, einzelne aber auch auf der hämato-onkologischen Ambulanz der Kinderklinik ausgefüllt wurden. Letzteres war der Fall, wenn bisher keine Rückmeldung erfolgt war und die Patienten beziehungsweise die Erziehungsberechtigten einwilligten. Zur Wahrung der Auswertungsobjektivität wurden größtenteils Multiple-Choice Antworten gewählt. Der Freitext der Fragen war klar definiert mit der Beschreibung „Jahr, Alter, Name der Tumorerkrankung“ dazu. Eine Ausnahme bildete hier die Frage nach möglichen Spätfolgen. Hier wurden neben vier Multiple-Choice-Antwortmöglichkeiten auch für hormonelle und andere Spätfolgen ein Freitext mit der Antwortoption „andere“ Spätfolgen gelassen. Da die ganze Bandbreite der möglichen Spätfolgen erfasst werden sollte, war die offene Fragestellung hier wichtig. Die standardisierte Auswertung wurde hier

erreicht, indem alle erwähnten Spätfolgen des Freitextes zunächst aufgelistet wurden. Falls manche Spätfolgen öfters erwähnt wurden, wurde eine Kategorisierung erstellt. Einzelne Spätfolgen wurden dann in der statistischen Auswertung unter „weitere Spätfolgen“ zusammengefasst. Die Erstellung des Tests erfolgte inhaltlich durch den Studienleiter und auf die Therapie der Langerhanszell-Histiozytose spezialisierten Oberarzt der Hämatologie und Onkologie der Kinderklinik Tübingen, PD Dr. Martin Ebinger, und auf formell-statistischer Ebene durch die Diplom-Statistikerin und wissenschaftlichen Mitarbeiterin des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie des Universitätsklinikums Tübingen. Die anfallenden Kosten beliefen sich lediglich auf Versand- und Materialkosten für die Fragebögen und fielen im Verhältnis zu dem Erkenntnisgewinn verschwindend gering aus, womit das Kriterium der Testökonomie erfüllt wurde. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung, dem daraus resultierenden Wert der vorliegenden Follow-up-Daten und der durch den Fragebogen bezweckten Einschätzung von größtenteils iatrogenen und vermeidbaren Spätfolgen, ist die Nützlichkeit des Fragebogens gegeben. Mit einer Länge von circa fünf Minuten und einem Umfang von vier Fragen, größtenteils Multiple-Choice, wurde das Kriterium der Zumutbarkeit erfüllt. Die Patienten wurden in dem beigelegten Anschreiben darauf hingewiesen, dass das Ausfüllen des Fragebogens freiwillig sei und durch das Nichtausfüllen keine Nachteile für die Patienten entstehen würden. Zudem wurden die Patienten aufgeklärt, dass die Daten in pseudonymisierter Form ausgewertet würden, um neben datenschutzrechtlichen Gründen außerdem den Effekt der sozialen Erwünschtheit geringer zu halten und damit die Unverfälschbarkeit zu gewährleisten [47]. Die Erhebung fand vom 15.11.2014 bis zum 13.03.2015 über einen Zeitraum von fünf Monaten statt, da manche Patienten erst auf die zweite Anfrage hin antworteten. Die in diesem Zeitraum möglicherweise aufgetretenen Spätfolgen sind dabei nicht einheitlich erfasst. Bei einer Mindest-Follow-up-Zeit von einem Jahr und einem Median von 12,5 Jahren sind diese fünf Monate jedoch in Relation gesetzt ein zu vernachlässigender Faktor (Fragebogen siehe Anhang).

2.6.3 Auswertung des Fragebogens

Bei der Auswertung des Fragebogens wurde zunächst als Erhebungsdatum das Datum der Unterschrift des jeweiligen Patienten ausgewertet. Die Multiple-Choice-Antworten wurden als einzelne Kategorien ausgewertet. Dazu zählte „Rezidiv: ja oder nein“; „Spätfolgen: ja oder nein, falls ja: „Diabetes insipidus“, „Wachstumshormon-Mangel“, „orthopädische Probleme“, „Zahnausfall“; „Auftreten einer Krebserkrankung“: „Hautkrebs“, „Hirntumor“, „Augentumor“, „Lebertumor“, „Sarkom/Knochenkrebs“, „Schilddrüsenkrebs“, „Leukämie“, „Lymphdrüsenkrebs/Lymphom“; „Krebserkrankung erstgradig Verwandter“: „Vater/Mutter“, „Geschwister“, „Kinder“. Ein Freitext war wie oben beschrieben meist mit einer eindeutigen Beschreibung („Jahr“, „Alter“, „Tumorart“) klar strukturiert. Ein Freitext ohne Beschreibung war unter der jeweiligen Option „andere“ Spätfolgen oder Tumorarten zu finden. Für die statistische Auswertung wurde hier ab einer doppelten Nennung des Symptoms oder der Tumorart eine neue Kategorie aufgemacht, alle einfach genannten Merkmale fielen unter die Kategorie „weitere“.

Die Follow-up-Zeit des Fragebogens wurde als Zeitspanne vom Datum der Erstdiagnose bis zum Datum des erhobenen Fragebogens berechnet.

Das Gesamt-Überleben der Patienten wurde anhand der Anzahl der erhaltenen Fragebögen ermittelt, die entweder von bevollmächtigten Familienmitgliedern oder Erziehungsberechtigten oder den ehemaligen Patienten selbst ausgefüllt worden waren.

2.7 Statistische Verfahren

Für alle statistischen Analysen wurde die Software Statistical Package and Service Solutions (SPSS) verwendet. Als Test wurde bei Korrelationsanalysen zweier unabhängiger Stichproben der Pearson Chi-Quadrat Test verwendet. Das Signifikanzniveau α wurde bei $\alpha = 0,05$ festgesetzt. Für die Analyse des ereignisfreien Überlebens wurde eine Kaplan-Meyer-Kurve erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Zusammensetzung des Kollektivs

Das Patientenregister umfasste 84 Kinder mit LCH, von 37 davon lagen archivierte Gewebeproben im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen zur experimentellen Analyse vor. Bis auf drei Fälle, waren dazu auch die jeweiligen klinischen Daten verfügbar. Bei 57 der 84 Patienten konnten die Adressen über das klinikeigene Computersystem i.s.h.med (Cerner Corporation) ermittelt werden. Über Prof. P. Kaatsch vom Deutschen Kinderkrebsregister konnten wir von weiteren sieben Patienten aktuelle Adressen bekommen, was eine Gesamtzahl von 64 klinischen Fällen ergab. Zwei Patienten schieden nachträglich aus, da die Einschlusskriterien nicht erfüllt waren und eine LCH nicht sicher bestätigt war. Bei 58 der nun noch 62 Fälle lagen Daten zur Diagnosestellung und Lokalisation der Erkrankung vor, drei der Patienten wurden in einem anderen Zentrum weiterbehandelt und deshalb ausgeschlossen, sodass von insgesamt 55 Patienten komplette klinische Daten zur retrospektiven Analyse vorlagen. Von 50 der 62 angeschriebenen Patienten bekamen wir dann Rückmeldung über die Spätfolgen und die familiäre Tumorbelastung. Dies entspricht einer Rücklaufquote von 81 %. Von vier der Patienten lagen keine klinische Akten vor, sodass in die retrospektive Subgruppe letztendlich 46 der Fälle mit Verlaufsdaten aus den Fragebögen eingeschlossen wurden, von welchen zusätzlich noch Behandlungsdaten aus den Akten vorhanden waren (Abbildung 5). Da die ersten Patienten aus diesem Kollektiv schon 1983 diagnostiziert und behandelt wurden, lagen nicht bei jedem Patienten alle Laborparameter vor. Die ersten Diagnosedaten wurden am 27.12.1983 erhoben. Für immunhistochemische- und molekulare Analysen lagen in Paraffin archivierte Gewebeproben von 39 Patienten vor. Zwei davon erfüllten die Einschlusskriterien der S100- und CD1a-Positivität nicht. Bei drei Patienten lagen klinischen Daten im i.s.h.med-System der Unikliniken Tübingen vor. Sie wurden für die immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen eingeschlossen, sodass das Kollektiv für diese Untersuchungen aus 37 Fällen bestand. Von 34 der Fälle lagen zudem klinische Behandlungsdaten vor.

Aus den verschiedenen Fragestellungen ergaben sich also vier sich überschneidende Auswertungsgruppen (Abbildung 5): für die Mutationsanalysen 37 Fälle, 34 Fälle zur Korrelation zwischen klinischen und experimentellen Daten, 55 Fälle zur rein klinischen Analyse über Behandlungsdaten und schließlich 46 Fälle zur Analyse der Folgeschäden und Korrelation zu klinischen Daten. Ein kompletter Datensatz mit experimentellen, klinischen Behandlungsdaten und klinischen Verlaufsdaten aus dem Fragebogen lag bei 26 Fällen vor.



Abbildung 5: Übersicht über die verschiedenen Subgruppen und deren Zusammensetzung

Damit ergab sich ein Gesamtkollektiv aus 60 Patienten, mit einer Männlich-Weiblich-Ratio von 1,73. Das mediane Alter bei Erstdiagnose betrug 3,5 Jahre mit einer Spanne von 1 Tag (Neugeborene) bis 15,6 Jahre.

Die retrospektive Subgruppe bestand aus 55 Fällen, von welchen die Laborwerte, die diagnostischen und therapeutischen Parameter erhoben wurden. Die Subgruppe beinhaltete 34 Jungen und 20 Mädchen, was einen Männlich-Weiblich-Quotienten von 1,62 ergibt. Das mediane Alter und die Altersspanne entsprachen denen des Gesamtkollektivs. Das Follow-up der Verlaufsdaten lag zwischen 1 Jahr und 30,8 Jahren mit einem Median bei 12,5 Jahren. Die experimentelle Subgruppe bestand aus 37 Patienten, mit einer Männlich-Weiblich-Ratio von 1,47. Die Altersspanne entsprach wiederum der des Gesamtkollektivs mit einem Alter von einem Tag bis 15,6 Jahre, der Altersmedian lag bei 4,3 Jahren (Abbildung 6).

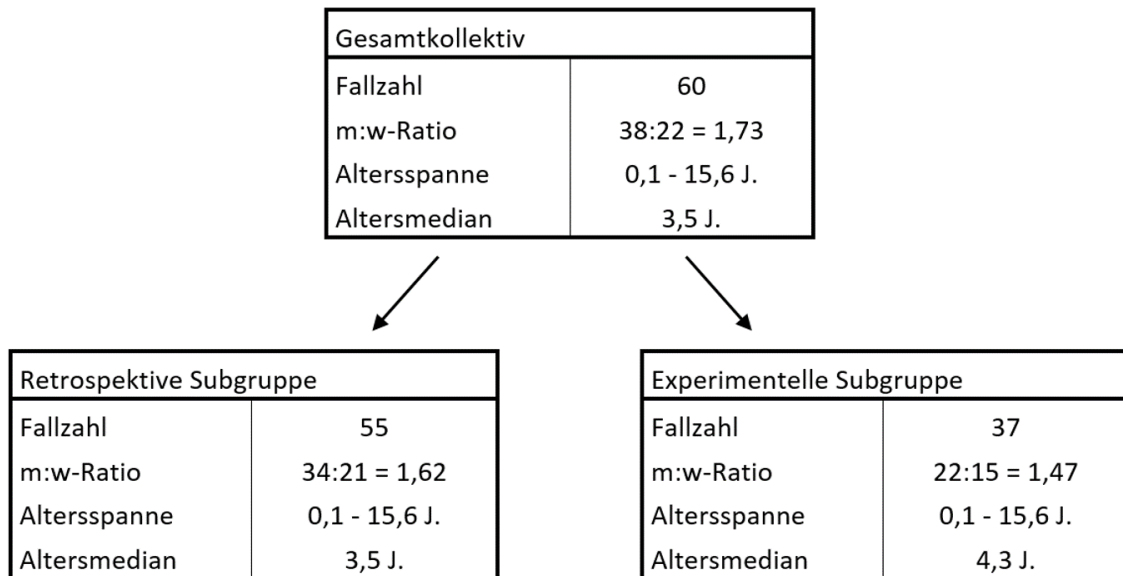


Abbildung 6: Schematische Beschreibung des Gesamtkollektivs und der retrospektiven und experimentellen Subgruppe

3.2 Retrospektive Analyse der klinischen Präsentation, Behandlung und Langzeitverlauf der LCH

3.2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Dabei waren 38 % (21/55) der Patienten bei Diagnosestellung unter zwei Jahren, fast die Hälfte (26/55) waren zwischen zwei und zehn Jahren und nur 15 % (8/55) älter als zehn Jahre. Bei den unter zwei Jahre alten Patienten lag der männlich-weiblich-Quotient sogar bei 2,5. Damit betrug der Anteil der unter zweijährigen Jungen 71 % (Pearson-Chi Quadrat-Test $p=0,345$; nicht signifikant). Bei den älteren Kindern gab es eine weniger hervorstechende männliche Prädominanz (Abbildung 7).

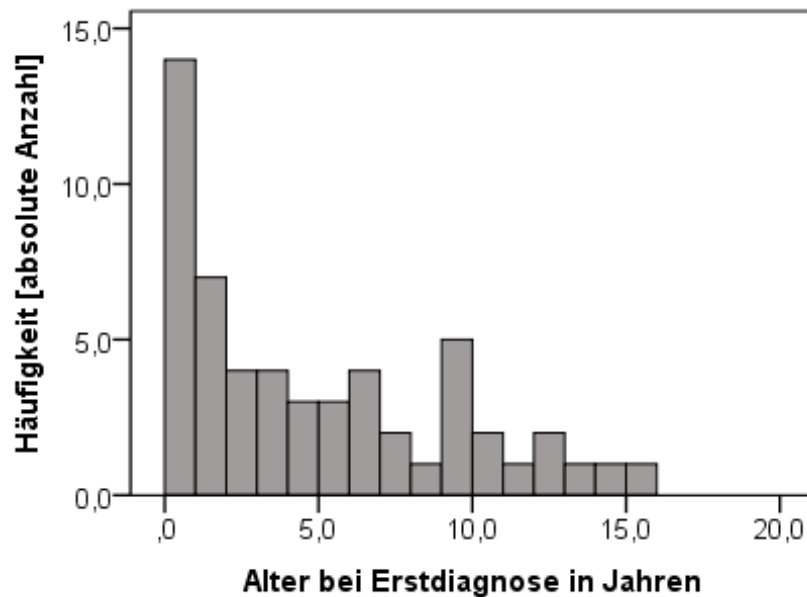


Abbildung 7: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Altersgruppen in Jahren

3.2.2 Beschreibung der Inzidenz der verschiedenen Verlaufsparemeter

Im vorliegenden Kollektiv hatten zwei Drittel (37/55, 67 %) der Fälle eine monosystemische LCH und ein Drittel (18/55, 33 %) eine multisystemische LCH. Von den multisystemischen Fällen hatten wiederum 66 % einen Risikoorgan-Befall.

Insgesamt hatten 38 der 55 Fälle (69 %) bei Erstdiagnose eine oder mehrere Knochenläsionen. Über ein Drittel (19/55) zeigte bei Erstdiagnose einen Hautbefall. Drei Fälle davon (6 %), hatten einen selbstlimitierenden Hashimoto-Pritzker. Das zentrale Nervensystem war bei Erstdiagnose bei keinem der 55 Patienten befallen, aber bei vier Fällen war die Hypophyse involviert. 6/55 der Patienten (11 %) hatten einen Befall der Risikoorgane Leber und/oder Milz. Das hämatopoetische System war gemäß der S1-Kriterien, welche einzig das Blutbild einschließen, bei keinem der Patienten betroffen. Allerdings lag bei einem Patienten eine Knochenmarkspunktion vor, für welche eine Knochenmarksbeteiligung bei LCH beschrieben wurde. Die Lunge war bei 7/55 (13 %) Patienten betroffen. Interessanterweise hatten sechs der sieben Fälle mit

Lungenbefall gleichzeitig einen Hautbefall (Tabelle 6). Ein Fall fiel besonders auf: Im Rahmen von Varizenblutungen des oberen Ösophagus wurde eine LCH mit schwerem Leberbefall festgestellt, welcher als Fibrose, Gallengangs-Proliferation und pseudolobulär zirrhotisch umgebautes Leberparenchym mit entzündlichem Infiltrat beschrieben wurde. Bei diesem Patienten wurde zudem noch eine Beteiligung von Lunge, Milz und Haut diagnostiziert. Die zirrhotische Leberzerstörung war derart progressiv, dass im Verlauf eine Leber-Transplantation durchgeführt werden musste.

In Tabelle 6 ist der Befall der Knochen nochmals genauer analysiert worden. Der häufigste Knochenbefall unter den 38 Fällen war mit 42 % (16/38) am Schädel. Bei 37 % (14/38) war die Wirbelsäule betroffen.

21/55 (38 %) der Fälle hatten mindestens ein Rezidiv. Insgesamt hatten 15/55 (27 %) der Fälle ein Rezidiv, 2/55 (4 %) der Fälle hatten zwei Rezidive und 4/55 (7 %) der Fälle hatten sogar drei oder mehr Rückfälle. Dabei lag bei knapp über der Hälfte (12/21) das gleiche Befallsmuster wie bei Erstdiagnose vor. Bei den restlichen 43 % (9/21) der Patienten waren weitere Organe betroffen. Zwei Patienten hatten bei Erstdiagnose keinen ZNS-Befall, bekamen aber ein Rezidiv im ZNS. Die Hypophyse war in drei Fällen betroffen, ein Hautbefall in zwei Fällen. Zwei Patienten hatten ein Rezidiv mit Lungenbefall und bei einem Patienten war das hämatopoetische System betroffen (Tabelle 6). Die Milz oder Leber waren bei den Rezidiven interessanterweise nicht befallen [48].

Tabelle 6: Beschreibung des klinisch-retrospektiven Kollektivs

| Merkmal | | absolute Anzahl | relative Anzahl in % (n=55) |
|---|----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| Alter | Minimum | 1 Tag | |
| | Maximum | 15,6 Jahre | |
| | Median | 3,5 Jahre | |
| Geschlecht | Männlich | 35 | 64 |
| | Weiblich | 20 | 36 |
| | m:w-Ratio | 1,75 | |
| Altersgruppe | < 2 Jahre | 21 | 38 |
| | m:w-Ratio | 2,5:1 | |
| | 2-10 Jahre | 26 | 47 |
| | m:w-Ratio | 1,4:1 | |
| | > 10 Jahre | 8 | 15 |
| | m:w-Ratio | 1,7:1 | |
| Staging | monosystemisch | 37 | 67 |
| | multisystemisch | 18 | 33 |
| | ohne Risikoorganbefall | 6 | 11 |
| | mit Risikoorganbefall | 12 | 22 |
| Lokalisation | Knochen | 38 | 69 |
| | und Haut | 3 | 6 |
| | und innere Organe | 2 | 4 |
| | und Haut und innere Organe | 4 | 7 |
| | Haut | 19 | 35 |
| | und innere Organe | 7 | 13 |
| | Hashimoto-Pritzger | 3 | 6 |
| | ZNS (ohne Hypophyse) | 0 | |
| | und Haut | 0 | |
| | und innere Organe | 0 | |
| | Hypophyse | 4 | 7 |
| | innere Organe | 6 | 11 |
| | Leber | 4 | 7 |
| | Milz | 4 | 7 |
| | hämatopoetisches System | 1 | 2 |
| | Lunge | 7 | 13 |
| | und Haut | 6 | 11 |
| | und Knochen | 2 | 4 |
| | Knochenbefall | | |
| Schädel | | 16 | 42 |
| Wirbelsäule | | 14 | 37 |
| Extremitäten | 8 | 21 | |
| Rezidive | | | % (n=55) |
| | keinmal | 34 | 62 |
| | einmal | 15 | 27 |
| | zweimal | 2 | 4 |
| dreimal und mehr | 4 | 7 | |
| Organbeteiligung bei den Rezidiven | | | % (n=21) |
| | Knochen | 17 | 81 |
| | Haut | 2 | 10 |
| | Lunge | 2 | 10 |
| | ZNS | 2 | 10 |
| | Hypophyse | 3 | 14 |
| hämatopoetisches System | 1 | 5 | |

3.2.2.1 *Radiologische Diagnostik*

Bei der retrospektiven Analyse wurde auch die bildgebende Diagnostik an der Kinderklinik Tübingen erfasst. Dabei wurden zunächst viele Szintigraphien und Röntenaufnahmen, später mehr und mehr Sonographien und MRT- oder CT-Aufnahmen durchgeführt, entsprechend den jeweils aktuellen Empfehlungen zur Diagnostik der LCH (1.1.3). Insgesamt erfolgte alleine oder in Kombination bei 46/55 (84 %) der Patienten eine Sonographie. Fast ebenso groß war der Anteil an Patienten, die ein MRT oder CT erhielten (40/55, 73 %). Die wegen der hohen Strahlenbelastung heutzutage selten noch angewandte Szintigraphie wurde in der vorliegenden Studie bei 31/55 (56 %) durchgeführt. Relativ gering war dagegen der Anteil an Röntgenuntersuchungen mit 13/55 (24 %) (genaue Zusammensetzung siehe Anhang).

3.2.2.2 *Therapieformen*

Hinsichtlich potenzieller Zusammenhänge mit Spätfolgen, wurden die verschiedenen Behandlungsmethoden bei Erstdiagnose an der Kinderklinik Tübingen von 1983 bis 2014 erhoben (Tabelle 7). Die Kriterien sind einschließlich aufgeführt und Kombinationstherapien wurden hier nicht separat erwähnt. Trotz des benignen Charakters der Erkrankung bekam die Hälfte aller Patienten eine systemische Chemotherapie. Dabei bekamen alle chemotherapierten Patienten Prednisolon, 74 % (20/27) Vinblastin und 51 % (14/27) 6-Mercaptopurin (Tabelle 7). Die mediane Verabreichungszeit dieser drei Medikamente lag zwischen 24 und 38 Wochen. Die längsten Behandlungszeiträume lagen bei Prednisolon mit bis zu 260 Wochen (entspricht 5 Jahren) vor. Des Weiteren wurde je nach Verlauf auch mit Methotrexat (MTX), Ethoposid (VP16), Cladribin (2CDA), Cytarabin (Alexan), Vincristin und Indometacin behandelt. Alle Bestrahlungen sowohl bei Zustand nach Erstdiagnose (neun Fälle, Tabelle 7), als auch nach Auftreten von Rezidiven (weitere zwei Fälle und ein Fall mit Folgebestrahlungen) fanden zwischen 1984 und 2000 statt. Die Therapie bei Rezidiven bestand aus den gleichen

Therapiearten, erwähnenswert war hier einzig ein Fall mit Multiorganbefall und mehreren Rezidiven, bei welchem neben starken Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Metotrexat, noch Stammzellen gegeben wurden.

Tabelle 7: Übersicht über den Anteil der verschiedenen Therapieoptionen in der Behandlung an der Kinderklinik Tübingen

Die Kriterien sind dabei einschließlich aufgeführt. Überlappungen der verschiedenen Therapieformen können vorliegen. Die watch-and-wait-Therapie wurde bei singulärem Haut- oder Knochenbefall angewendet, wenn mit einer Spontanremission zu rechnen war.

| Therapieform | absoluter Anteil | relativer Anteil in % (n=55) |
|--|------------------|---------------------------------|
| systemische Chemotherapie | 27 | 49 |
| Prednisolon | 27 | 49 |
| Vinblastin | 20 | 36 |
| 6-Mercaptopurin | 14 | 25 |
| bioptische Resektion oder chirurgische Sanierung | 19 | 35 |
| Bestrahlung | 9 | 16 |
| watch-and-wait | 9 | 16 |

3.2.2.3 *Beschreibung der Inzidenz von Spätfolgen*

19/46 (41 %) Patienten gaben Spätfolgen durch die LCH oder deren Therapie bedingt an. Davon hatten über 26 % (12/46) des Kollektivs orthopädische Probleme (Rückenschmerzen, Rundrücken, Skoliose, Beckenschiefstand, Knochenbrüche), 4/46 (9 %) litten unter Zahnverlust, 2/46 (4%) Patienten zeigten eine dauerhafte Schädigung des Gehirns (Entwicklungsverzögerung und gestörtes Sozialverhalten, zerebellär bedingte Gehstörung). Sieben Patienten gaben weitere Langzeitprobleme an, wie beispielsweise Augenprobleme (3/46, 7 %, grauer Star, verminderte Sehkraft und Okulomotorik), jeweils ein Patient (1/46; 2%) gab rezidivierende Knochenschmerzen, starke Kopfschmerzen, Rückenschmerzen und Ödeme an. Außerdem wurden von den Patienten folgende Punkte genannt, welche aufgrund eines nicht direkt erkennbaren Zusammenhangs mit der LCH oder einer hohen Prävalenz in der deutschen

Gesamtbevölkerung nicht in die Statistik unter „andere“ aufgenommen wurden: „Immunschwäche“, „schlechte Cholesterinwerte“, „Hautunreinheit“, „Senkfuß“, „Sportprobleme“, „Probleme am Handgelenk“, „Sprunggelenks-OP“, „extreme Schuppen“, Nahrungsmittelallergie, „Zyklusstörung (starke Schmerzen und Ovarialzysten)“ und „viele Muttermale“. Es wurden nur die zum Zeitpunkt der Befragung noch potentiell vorhandenen Spätfolgen und beispielsweise keine therapieanschließenden Beschwerden angegeben. 20 % (9/46) der Patienten gaben hormonelle Spätfolgen an, darunter sechs Fälle mit Wachstumshormon-Mangel, sechs Fälle mit Diabetes insipidus, drei Fälle mit einer Hypothyreose und einer mit Testosteron-Mangel. Nur ein Drittel der neun Patienten mit hormonellen Spätfolgen hatte bei Erstdiagnose einen Hypophysen-Befall. Von den vier Patienten mit Hypophysen-Befall bei Erstdiagnose entwickelten drei mehrfache hormonelle Spätfolgen (Tabelle 8). Keiner der Patienten gab einen Langzeitschaden des Knochenmarks an.

In einem Fall kam es im Alter von 22 Jahren zum Auftreten eines weißen Hautkrebses am Ohr. Der Patient hatte bei Erstdiagnose einen multisystemischen LCH-Befall, der auch die Risikoorgane Leber und Milz betraf, zudem noch Knochen und Hypophyse. Er hatte drei Rezidive und wurde jedes Mal chemo- und radiotherapiert. Dabei waren bereits im Kleinkindalter die Hypophyse, der Schädel und schließlich der ganze Körper bestrahlt worden. Die Gesamtdosis lag dabei bei über 28 Gray.

Tabelle 8: Inzidenz der Spätfolgen bei LCH-Patienten

Übersicht über die relative und absolute Häufigkeit des Auftretens von Spätfolgen bei Langerhanszell-Histiozytose-Patienten des Kindesalters. Die Spätfolgen wurden in einem Fragebogen erhoben bei einer medianen Follow-up-Zeit von 12,5 Jahren.

| Art der Spätfolgen | Anzahl | relative Anzahl (n = 46) |
|-------------------------------------|--------|-----------------------------|
| Spätfolgen gesamt | 19 | 41% |
| orthopädische Spätfolgen | 12 | 26% |
| Zahnverlust | 4 | 9% |
| ZNS-Spätfolgen | 2 | 4% |
| andere Spätfolgen | 7 | 15% |
| hormonelle Spätfolgen gesamt | 9 | 20% |
| Diabetes Insipidus | 6 | 13% |
| GH-Mangel | 6 | 13% |
| Hypothyreose | 3 | 7% |
| Testosteron-Mangel | 1 | 2% |

3.2.3 Analyse möglicher Risikofaktoren und prädiktiver Faktoren für Präsentation und Verlauf der LCH

3.2.3.1 *Analyse potentiell prädiktiver Laborparameter*

Bei 42 der 55 Patienten lagen bei Erstdiagnose Blutwerte vor. Nach den oben beschriebenen S1-Leitlinien hatte keiner der Patienten im vorliegenden Kollektiv eine Beteiligung des hämatopoetischen Systems. Bei keinem der Patienten lag eine Thrombozytopenie $<100\,000/\mu\text{l}$, eine Leukopenie mit Anämie, oder eine Panzytopenie vor. Die Gesamtanalyse aller erhobener Laborparameter ergaben folgende Abweichungen zum Normwert: 5/41 (12 %) der Patienten zeigten einen verminderten Hämoglobin-Wert (Hb), 12/39 (31 %) ein vermindertes mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) und 27/40 (68 %) erhöhte Thrombozyten. Im Differenzialblutbild zeigten 5/35 (13 %) erhöhte eosinophile Granulozyten. Die akute Phase-Proteine betreffend hatten 6/10 (60 %) eine erhöhte Blutsenkung nach einer Stunde (BSG), 15/30 (50 %) ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und 4/26 (15 %) eine erhöhte Laktat-Dehydrogenase (LDH). Der Ferritin-Wert lag

nur in fünf Fällen vor, bei welchen er im Normbereich lag. Leberwerte (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)) und der Kreatinin-Wert für die Nierenfunktion waren gar nicht oder nur in wenigen Fällen auffällig (Anhang).

Für die klinische Ausprägung wurden getestet, ob ein Zusammenhang zwischen den Laborparametern und dem Befallsstatus der LCH, das Vorliegen eines Risikoorgan-Befalls, das Auftreten von Rezidiven oder Spätfolgen vorlag.

Zwischen dem Befallsstatus, also mono- oder multisystemischen Befall, konnte eine signifikante Korrelation bei Patienten mit erhöhtem CRP ($p = 0,013$) festgestellt werden. Dabei zeigten 7/8 der Patienten mit multisystemischem Verlauf einen erhöhten CRP-Wert bei Erstdiagnose. Alle Patienten, bei welchen der Hämoglobin-Wert vermindert war (5/5, $p = 0,000$) oder zu wenige Erythrozyten (3/3, $p = 0,000$) vorlagen, zeigten einen multisystemischen Befall (Anhang). Für alle weiteren akute Phase-Proteine war kein Zusammenhang zu sehen (Tabelle 9). Die beiden Fälle mit erhöhtem GOT und GPT hatten beide einen multisystemischen Verlauf.

Zwischen dem Auftreten von Rezidiven und den Laborparametern ergab eine erhöhte Eosinophile-Zahl eine signifikante Korrelation ($p = 0,041$). Knapp unter dem festgelegten Signifikanzniveau mit $p = 0,053$ lag die Korrelation zwischen dem Auftreten von Rezidiven und einem verminderten MCV (Anhang).

Hinsichtlich des Auftretens von Spätfolgen zeigte sich keine signifikante Korrelation zu den einzelnen Laborparametern.

Tabelle 9: Auflistung der Verteilung ausgewählter Parameter auf das Befallsstadium der LCH bei Erstdiagnose in absoluter und relativer Anzahl

| Laborparameter | | Befallsstadium | | | | |
|----------------|------------|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|--------|
| | | monosystemisch | | multisystemisch | | Gesamt |
| | | Anzahl | Anzahl der Zeilen (%) | Anzahl | Anzahl der Zeilen (%) | Anzahl |
| BSG | normal | 3 | 75,0% | 1 | 25,0% | 4 |
| | erhöht | 4 | 66,7% | 2 | 33,3% | 6 |
| CRP | normal | 14 | 93,3% | 1 | 6,7% | 15 |
| | erhöht | 8 | 53,3% | 7 | 46,7% | 16 |
| LDH | normal | 14 | 63,6% | 8 | 36,4% | 22 |
| | erhöht | 1 | 25,0% | 3 | 75,0% | 4 |
| FERRITIN | normal | 4 | 80,0% | 1 | 20,0% | 5 |
| LEUKOZYTEN | normal | 27 | 73,0% | 10 | 27,0% | 37 |
| | erhöht | 1 | 33,3% | 2 | 66,7% | 3 |
| ERYTHROZYTEN | normal | 27 | 75,0% | 9 | 25,0% | 36 |
| | vermindert | 0 | 0,0% | 3 | 100,0% | 3 |
| HÄMOGLOBIN | normal | 29 | 80,6% | 7 | 19,4% | 36 |
| | vermindert | 0 | 0,0% | 5 | 100,0% | 5 |

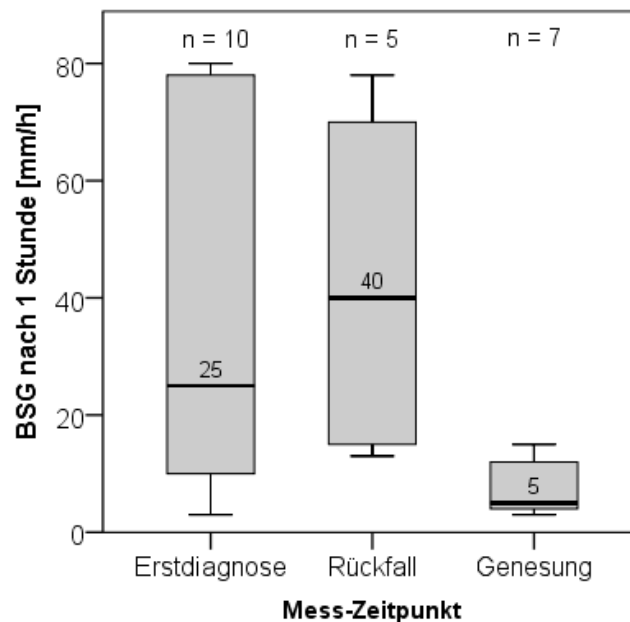
Der Vergleich der Mediane der Entzündungsparameter und Thrombozyten-Zahl im Verlauf der Erkrankung, also zu den Zeitpunkten Erstdiagnose, gegebenenfalls Rückfall und nach Genesung, zeigte bei der LDH und dem Ferritin-Wert keinen deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen Messzeitpunkten. Beim BSG-Wert, dem CRP-Wert, der Leukozyten-Zahl und der Thrombozyten-Zahl waren jedoch bei Erstdiagnose und während eines Rückfalls deutlich erhöhte Werte zu sehen, im Vergleich zum Zeitpunkt der Genesung zu (Tabelle 10).

Tabelle 10: Darstellung des zeitlichen Verlaufs verschiedener Entzündungsparameter

Verhalten der Entzündungsparameter BSG, CRP, LDH, Ferritin, Leukozyten-Zahl und der Thrombozyten-Zahl im Verlauf der LCH-Erkrankungen, analysiert zu den Zeitpunkten der Erstdiagnose, gegebenenfalls des Rückfalls und der Genesung.

| Laborparameter | Einheit | Mess-Zeitpunkt | | | | | |
|----------------|---------|----------------|------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|
| | | Erstdiagnose | | Rückfall | | Genesung | |
| | | Median | Anzahl der Einzelwerte | Median | Anzahl der Einzelwerte | Median | Anzahl der Einzelwerte |
| BSG | mm/1h | 25 | 10 | 40 | 5 | 5 | 7 |
| CRP | mg/l | 0,52 | 30 | 1,24 | 9 | 0,02 | 17 |
| LDH | U/l | 242 | 26 | 211 | 15 | 219 | 21 |
| Ferritin | µg/l | 4,4 | 5 | 7,6 | 1 | 11,2 | 6 |
| Leukozyten | 1000/l | 8560 | 40 | 8135 | 14 | 6500 | 37 |
| Thrombozyten | 1000/l | 421 | 40 | 382 | 14 | 326 | 37 |

Für den BSG-Wert wurde die Verteilung der Werte noch als Boxplot dargestellt, welcher, trotz großer Streuung, das deutlich tiefere Werte-Level bei Genesung darstellt (Abbildung 8).

**Abbildung 8: Darstellung der BSG-Werte zu verschiedenen Zeitpunkten**

Boxplot zur Darstellung der Verteilung der BSG-Werte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, eines Rückfalls oder nach Genesung. Oben angegeben ist die jeweilige Fallzahl.

3.2.3.2 Analyse möglicher Risikofaktoren für den Verlauf der LCH

Die Analyse mit der Fragestellung, ob Geschlecht oder Alter Risikofaktoren für einen schwereren multisystemischen Verlauf darstellen könnten, ergab beim Geschlecht zunächst keinen Zusammenhang. Bei beiden Geschlechtern zeigten jeweils 69 % (24/35 Jungen) bzw. 65 % (13/20 Mädchen) einen monosystemischen und das restliche Drittel jeweils einen multisystemischen Befall. Dagegen schien das Alter eine signifikante Korrelation mit dem Ausprägungsstadium der LCH zu zeigen. So hatten die unter zweijährigen Kinder gegenüber den über zweijährigen ein signifikant erhöhtes Risiko, einen multisystemischen Befall auszuprägen (Pearson Chi-Quadrat $p=0,015$, Abbildung 9, Anhang)

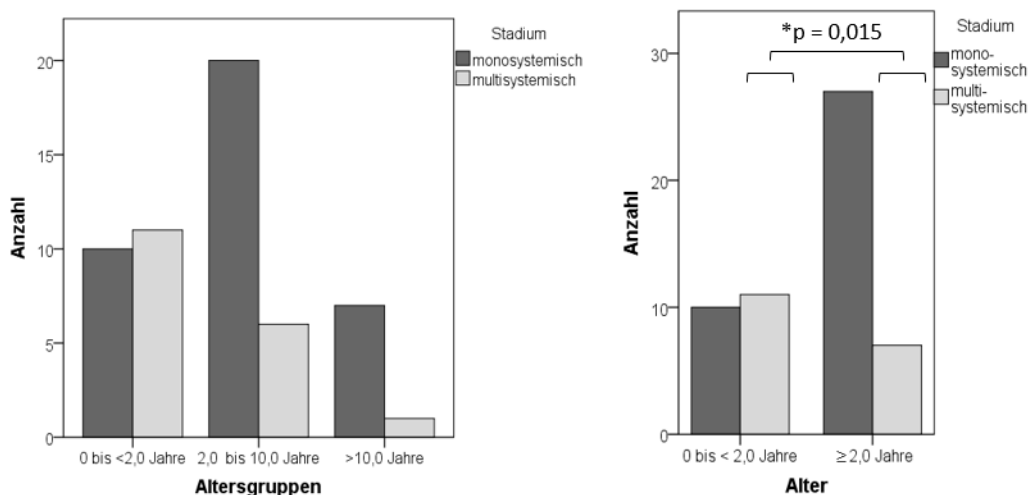


Abbildung 9: Verteilung des LCH-Stadiums auf die verschiedenen Altersgruppen

Das Stadium der LCH korrelierte wiederum mit dem Auftreten von Rezidiven. So hatten die Fälle mit multisystemischem Befall in über der Hälfte der Fälle ein oder mehrere Rezidive, während es bei unisystemischem Befall nicht einmal ein Drittel betraf (Pearson Chi-Quadrat $p = 0,015$, Abbildung 10, Anhang). Auch bei Risikoorganbefall hatten 7/55 (13 %) der Fälle Rezidive, während es ohne Risikoorganbefall nur 14/55 (25 %) waren.

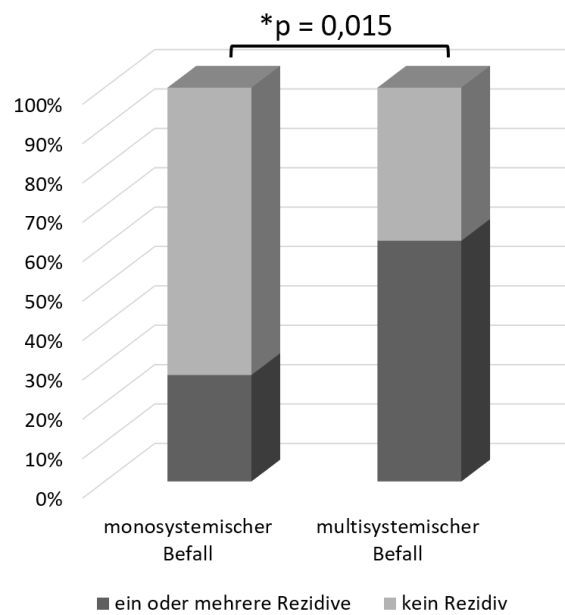


Abbildung 10: Darstellung des prozentualen Anteils der Fälle mit und ohne Rezidive in den Gruppen mit monosystemischem und multisystemischem Befall

3.2.3.3 *Analyse der familiären Tumorbelastung der Patienten*

Um eine mögliche familiäre Häufung maligner und damit das Vorkommen einer hereditären Belastungsvariable zu untersuchen, wurden die Patienten im Fragebogen nach dem Auftreten maligner Tumoren bei erstgradig Verwandten befragt. Dabei wurden in 7/46 (15 %) Fälle das Auftreten von Tumoren bei erstgradig Verwandten angegeben. Es wurden die Tumorentitäten Hautkrebs, Brustkrebs, Nieren-Tumor, Gebärmutterkrebs und Riesenzelltumor jeweils einmal genannt und Prostata-Krebs in zwei Fällen. Die Altersverteilung lag dabei zwischen drei bis 65 Jahre, der Median bei 46 Jahren. Vier der sieben Fälle (57 %) waren jünger als 45 Jahre.

3.2.3.4 Analyse möglicher klinischer Risikofaktoren für die beschriebenen Spätfolgen der LCH

Es wurde des Weiteren das Auftreten von Spätfolgen hinsichtlich des Krankheitsverlaufs und möglicher klinischer Risikofaktoren wie Alter, Stadium, Lokalisation und Auftreten von Rezidiven untersucht (Tabelle 11).

Tabelle 11: Auftreten von Spätfolgen in Abhängigkeit der klinischen Parameter Altersgruppe bei Erstdiagnose, Stadium der LCH, Lokalisation des LCH-Befalls und Auftreten von Rezidiven

Das Kriterium der Lokalisation ist einschließend aufgeführt, mehrere Organe können gleichzeitig betroffen sein.

| | Spätfolgen | | Gesamtsumme | p-Wert |
|--------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|------------|
| | absolute Anzahl | relative Anzahl als Zeilen% | absolute Anzahl | |
| Altersgruppe | 0–<2,0 Jahre | 32 % | 19 | *p = 0,261 |
| | 2,0–10,0 Jahre | 50 % | 20 | |
| | >10,0 Jahre | 43 % | 7 | |
| Stadium | monosystemisch | 32 % | 31 | *p = 0,073 |
| | multisystemisch | 60 % | 15 | |
| Lokalisation | Hypophyse | 75 % | 4 | |
| | Innere Organe | 60 % | 5 | |
| | Knochen | 45 % | 31 | |
| | Haut | 38 % | 16 | |
| | Hashimoto-Pritzker | 0 % | 2 | |
| Rezidive | keine | 19 % | 26 | *p = 0,001 |
| | ein oder mehr | 70 % | 20 | |
| Therapie | watch-and-wait/Biopsie | 25 % | 8 | *p = 0,079 |
| | chirurgische Resektion | 38 % | 16 | |
| | Chemotherapie | 52 % | 23 | |
| | Bestrahlung | 71 % | 7 | |

Die 0–2-jährigen Kinder entwickelten seltener Spätfolgen (6/19) als die älteren Kinder ($p = 0,261$). Bei den 2–10-jährigen traten hingegen in der Hälfte der Fälle (10/20) Spätfolgen auf (Abbildung 11).

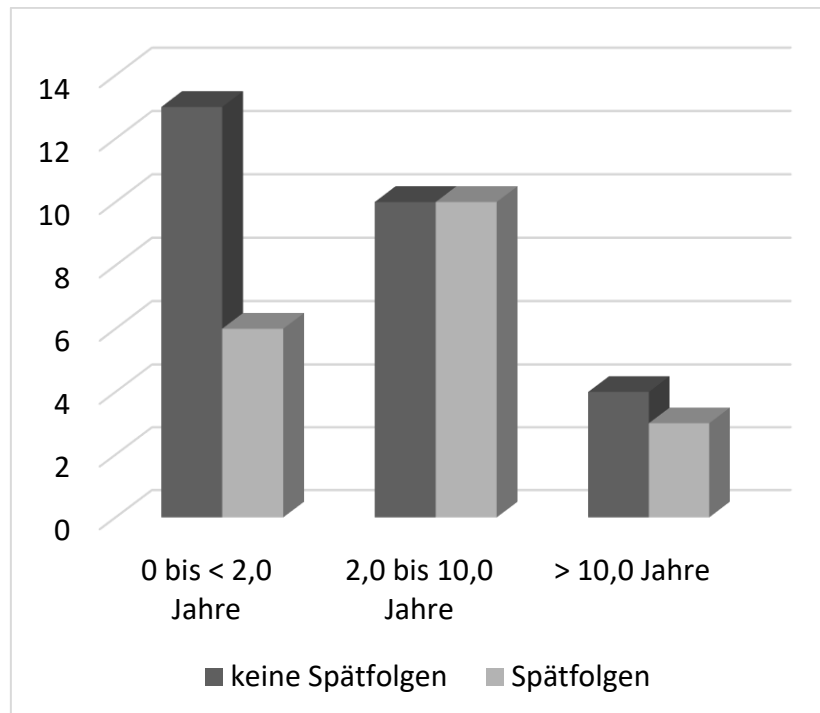


Abbildung 11: Säulendiagramm der Verteilung der Spätfolgen auf die verschiedenen Altersgruppen

Abhängig vom Stadium und der Lokalisation des LCH-Befalls konnten auch deutliche Unterschiede im Auftreten von Spätfolgen beobachtet werden. So war die Anzahl der Patienten mit Spätfolgen bei multisystemischem Verlauf mit 60 % (9/15) doppelt so hoch wie bei monosystemischem Befall, wo nur 32 % (10/31) der Patienten betroffen waren (Pearson Chi-Quadrat Test: $p = 0,073$) (Tabelle 11, Abbildung 12). Auch bei der Lokalisation des LCH-Befalls konnte man hinsichtlich der Spätfolgen ein Gefälle beobachten: 3/4 (75 %) der Patienten mit Hypophysen-Befall gaben Spätfolgen an, bei innerem Organ-Befall waren es 3/5 (60 %), bei Knochenbeteiligung durchschnittliche 45 % (13/19), bei Hautbeteiligung nur noch 38 % (6/16) und bei den Hashimoto-Pritzker-Fällen traten schließlich überhaupt keine Spätfolgen mehr auf (Tabelle 11).

Deutlich zu sehen war auch, dass das Vorkommen von Rezidiven ein erhebliches Risiko für Spätfolgen darstellte. So hatten nur 22 % (6/27) der Patienten ohne Rezidive Spätfolgen, während von den Fällen mit mindestens einem Rezidiv

70 % (14/20) Spätfolgen angaben (Pearson Chi-Quadrat Test: $p=0,001$, signifikant) (Abbildung 12, Anhang).

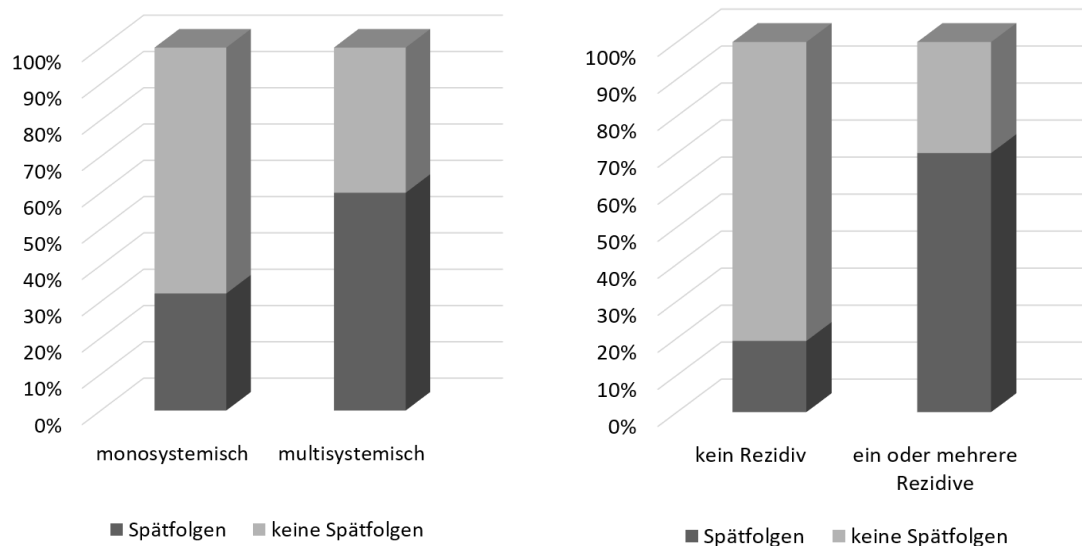


Abbildung 12: Darstellung des prozentualen Anteils der Fälle mit und ohne Spätfolgen: links die Verteilung hinsichtlich monosystemischen und multisystemischen Befalls, rechts hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven

Betrachtete man das Auftreten von Spätfolgen hinsichtlich der erfolgten Therapie bei Erstdiagnose, so traten bei den Patienten, die eine Chemotherapie erhalten hatten, in 52 % (12/23) Spätfolgen auf. Die Patienten, welche eine watch-and-wait Therapie bekommen hatten bzw. nur biopsiert worden waren, entwickelten diese in 25 % (2/8) und die chirurgisch sanierten Fällen zeigten in 38 % (6/16) Spätfolgen (Tabelle 11). Bei den bestrahlten Patienten traten hingegen in 71 % (5/7) Spätfolgen auf (Pearson Chi-Quadrat Test: $p = 0,079$, Anhang), darunter vor allem orthopädische (genaue Spätfolgen siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Schematische Darstellung der Spätfolgen bei bestrahlten Patienten (n=7). Dabei traten auch mehrere Spätfolgen bei einzelnen Patienten auf.

| Spätfolgen | absolute Anzahl | relative Anzahl in % (n=7) |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| orthopädische Spätfolgen | 5 | 71% |
| Hormonell | 2 | 29% |
| Zahnprobleme | 1 | 14% |
| Neurologisch | 0 | 0% |
| Zweitmalignom | 0 | 0% |
| Andere | 3 | 43% |

3.3 Identifizierung genetischer Alterationen im Gewebe von LCH-Patienten

3.3.1 Ergebnisse der histologischen Analysen der Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung und der Marker S100 und CD1a

Bei allen 37 FFPE-Proben konnte man in der HE-Färbung die typische Morphologie der LCH erkennen mit LCH-Zellen, Riesenzellen und einem ausgeprägten Entzündungsinfiltrat mit zahlreichen eosinophilen Granulozyten (Abbildung 13, A und B).

Auch zeigten alle Fälle eine Expression von S100 und CD1a (Abbildung 13, C und D).

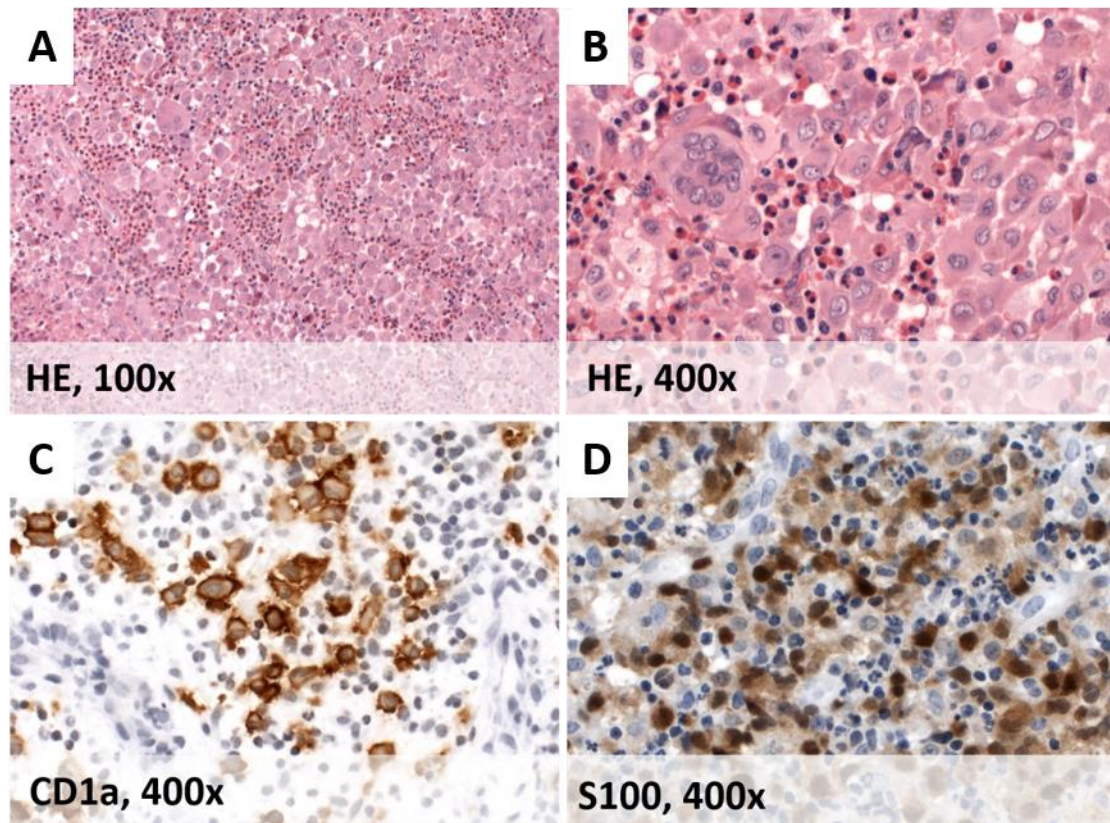


Abbildung 13: Darstellung der histologischen Analysen

A) HE-Färbung in 100-facher Vergrößerung: morphologisches Bild der LCH; B) HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung; C) CD1a-Färbung in 400-facher Vergrößerung: kräftige CD1a-Positivität der LCH-Zellen; D) S100-Färbung in 400-facher Vergrößerung: teils mäßige, teils kräftige S100-Positivität der LCH-Zellen.

3.3.2 Ergebnisse der PCR zur Amplifizierbarkeit der DNA

Bei allen Proben ließ sich die DNA mit Produkten von 200-400 bp amplifizieren (Abbildung 14). In fast allen Proben konnten die zu analysierenden Abschnitte bei der *BRAF*^{FV600E} mit 187 bp, bei Exon 2 der *MAP2K1* mit 301 bp und bei Exon 3 der *MAP2K1* mit 247 bp amplifiziert werden. Eine Ausnahme bildeten zwei Proben, bei welchen das Exon 2 der *MAP2K1* nicht vervielfältigt werden konnte. Deswegen wurden neue Primer designt, um das Exon 2 in zwei kürzeren Teilen zu analysieren (190 bp und 189 bp Länge). Hiermit war eine Analyse der beiden Proben möglich.

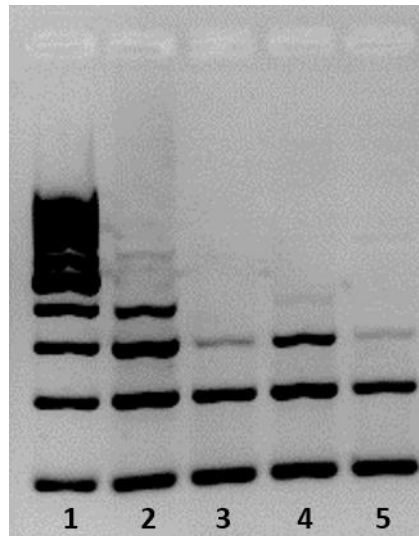


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Banden einer PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung bei 140 Volt und 35 Minuten (Darstellung unter UV-Licht).

In der Spur 1) lief der Größenstandard mit Banden von 100 bis 1000 bp im 100 bp Abstand. Rechts davon liefen die verschiedenen Proben 2-5, welche maximale Produktlängen von 200 bp (3,5), 300 bp (4) und 400 bp (2) aufwiesen.

3.3.3 BRAF-Mutationsanalyse

In allen 37 Fällen wurden immunhistochemische Färbungen mittels des spezifischen Antikörpers für die *BRAF^{V600E}*-Mutation durchgeführt (Abbildung 15). 19/37 (51 %) wurden *BRAF^{V600E}* positiv, 10/37 (27 %) wurden *BRAF^{V600E}* negativ gewertet und bei 8/37 (22 %) Fällen konnte die immunhistochemische Färbung nicht eindeutig bestätigt werden.

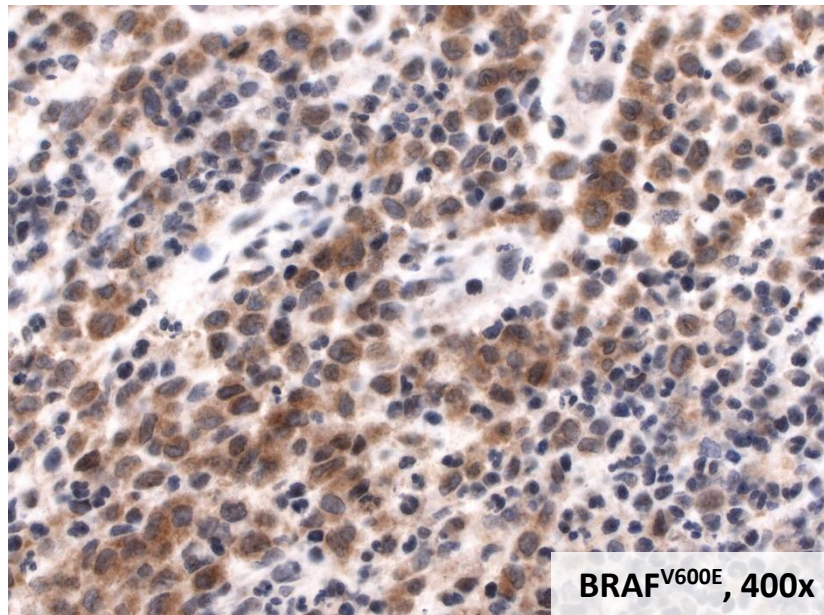


Abbildung 15: Immunhistochemische BRAF^{V600E}-Färbung in 400-facher Vergrößerung

Der VE1-Antikörper bindet spezifisch an das mutierte BRAF^{V600E}-Protein und färbt alle BRAF^{V600E}-exprimierenden Zellen (hier LCH-Zellen) braun an.

Folgend wurden alle acht unklaren und die zehn Wildtyp-Fälle per Sequenzierung nach Sanger analysiert. Es wurden zudem vier immunhistochemisch BRAF^{V600E}-mutierte Fälle zur Qualitätskontrolle sequenziert. In allen acht unklaren Fällen wurden bei der Sequenzierung die Wildtyp-Sequenz identifiziert. Bei zwei der Positivkontrollen bestätigte sich in der Sequenzierung nach Sanger die erwartete BRAF^{V600E}-Mutation. Bei den zwei anderen Positivkontrollen zeigte sich in der Sequenzierung die BRAF-Wildtyp-Sequenz. Die nachfolgende Reevaluation der immunhistochemischen Proben zeigte bei beiden Fällen jedoch nur eine geringe Anfärbung mit dem VE1-Antikörper, welche sodann retrospektiv als unklar gewertet wurde. Einer der in der Immunhistochemie als BRAF-Wildtypträger eingestuft Fälle zeigte bei der Sequenzierung eine BRAF^{V600D}-Mutation [49]. Fasst man die Ergebnisse aus der immunhistochemischen Antikörperfärbung und der molekularen Sequenzierung zusammen, ergibt das bei 19 der 37 (51 %) Fälle den BRAF-Wildtyp im Kodon 600, bei 17 der untersuchten Fälle (46 %) eine BRAF^{V600E}-Mutation und bei einem Fall (3 %) eine BRAF^{V600D}-Mutation (Abbildung 16).

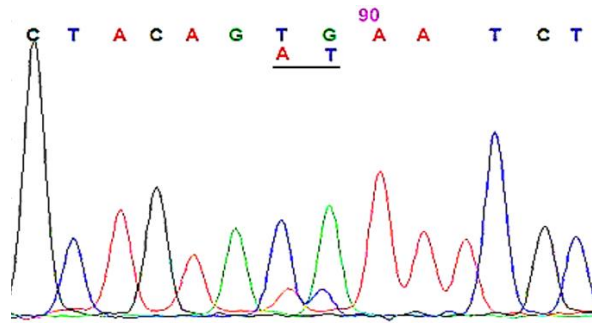


Abbildung 16: Elektropherogramm der Sanger-Sequenz der seltenen *BRAF*^{V600D}-Mutation

Darstellung der *BRAF*-Mutation in Exon 15, p.V600D, c.1799_1800TG>AT. Die Stelle der Basenpaarsubstitution TG zu AT wird durch das Auftreten zwei überlagerter Kurven und damit Basen angezeigt.

3.3.4 *MAP2K1*-Mutationsanalyse

Ausgehend von der Hypothese, dass eine *BRAF*- eine *MAP2K1*-Mutation ausschließt, wurden die Fälle mit *BRAF*-Wildtyp im Kodon 600 in der Immunhistochemie und Sequenzierung auf Mutationen in den *MAP2K1*-Hotspotregionen per Sanger-Sequenzierung untersucht. Neben einer weiteren *BRAF*^{V600E}-positiv sequenzierten Kontrolle wurde der Fall mit der *BRAF*^{V600D}-Mutation zusätzlich analysiert.

Erwartungsgemäß lag bei beiden *BRAF*-mutierten Fällen die *MAP2K1*-Wildtyp-Sequenz in den Hotspotregionen vor. Bei elf der 21 (52 %) molekularpathologisch untersuchten Fälle wurde bei der Sequenzierung der *MAP2K1*-Exons 2 und 3 eine Mutation gefunden. Dabei wurden sieben Mutationen im Exon 2 gefunden. Es handelte sich in allen Fällen um Deletionen in der häufig betroffenen Region des Exons im Bereich der Kodons 57 bis 62 (Abbildung 17). Im Exon 3 der *MAP2K1* wurden vier Mutationen entdeckt, drei davon auch Deletionen, wiederum in einer vorbeschriebenen Hotspot-Region im Bereich der Kodons 101 bis 103 (Tabelle 13).

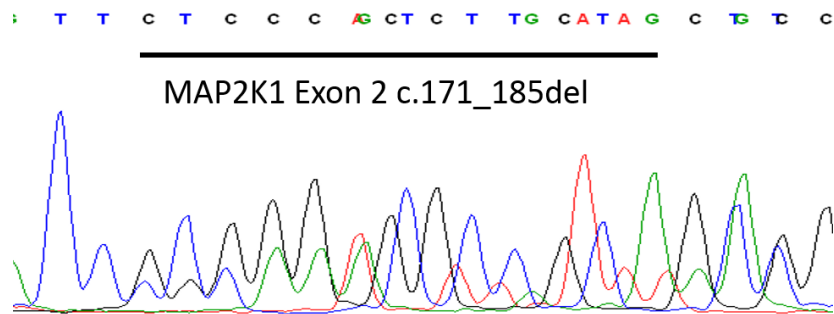


Abbildung 17: Elektropherogramm der Sanger-Sequenz einer typischen Hotspot-in-frame-Deletion des Exon 2 der *MAP2K1*

Der schwarz unterstrichene Bereich zeigt die Region der Deletion an, die sich als Überlagerung mit der Wildtyp-Sequenz darstellt. Die Mutation zeigte sich im Verlust von 15 Basen im Bereich der Kodons 58 bis 62 (c.171-185).

Somit ergaben die Sequenzierungen bei 49 % (18/37) Patienten eine *BRAF*-Mutation im Kodon 600, darunter eine seltene *BRAF^{V600D}*-Mutation. Bei 30 % (11/37) lag eine *MAP2K1*-Mutation in Exon 2 oder Exon 3 vor. Bei den restlichen 22 % (8/37) konnte in den beiden Genabschnitten keine Mutation gefunden werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zusammenfassung über die untersuchten Hotspotregionen in Exon 2 und 3 des *MAP2K1*-Gens und im Kodon 600 des *BRAF*-Gens

| Gen | Absolute Anzahl der Mutationen (Fallzahl 37) | Relative Anzahl der Mutationen in % der 37 Fälle |
|------------------------------|--|--|
| <i>BRAF</i> | 18 | 49% |
| c.1799T>A, p.V600E | 17 | 46% |
| c.1799_1800TG>AT, p.V600D | 1 | 3% |
| <i>MAP2K1</i> | 11 | 30% |
| Exon 2 Gesamt | 7 | 19% |
| c.170_184del, p.Q58_E62del | 3 | |
| c.168_182del, p.K57_G61del | 1 | |
| c.171_185del, p.Q58_E62del | 2 | |
| c.173_187del, p.Q58_E62del | 1 | |
| Exon 3 Gesamt | 4 | 11% |
| c.388 T>C, p.Y130H | 1 | |
| c.302_307del, p.E102_I103del | 1 | |
| c.301_306del, p.L101_E102del | 2 | |

3.3.5 p16^{INK4a}-Immunhistochemie

Immunfärbungen von p16 konnten in 34 Fälle untersucht werden, von denen sowohl FFPE-Proben als auch klinische Daten vorlagen. Die Expressionsanalyse zeigte, dass ein Fall negativ war für das Auftreten des Tumorsuppressorproteins p16^{INK4a}. Die restlichen 33/34 Fälle hatten alle p16^{INK4a} exprimiert. Der unter 2.3.4 beschriebene Score ergab bei 11/33 Proben (33 %) eine schwache, bei sieben Proben (21 %) eine mittelstarke und bei 15 Proben (45 %) eine starke Expression von p16 (Abbildung 18).

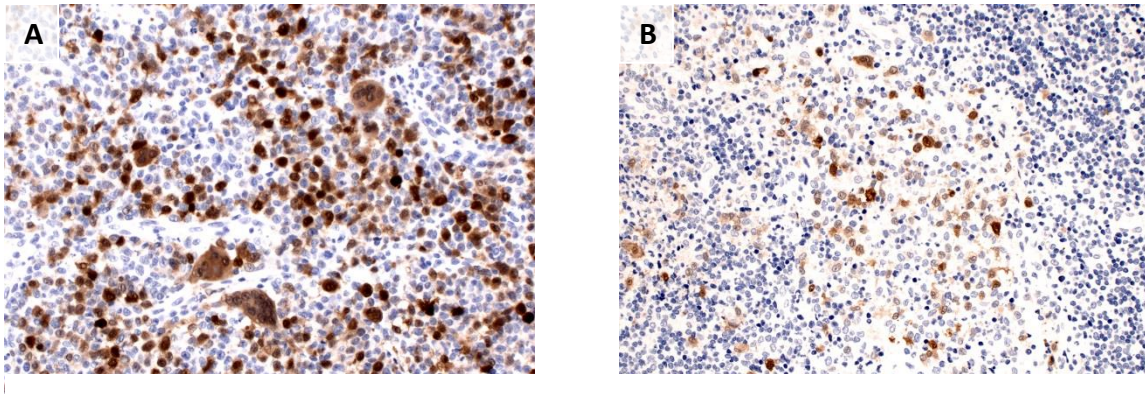


Abbildung 18: p16 INK4a – Immunhistochemie

A: 200-fache Vergrößerung, starke Expression; B: 200-fache Vergrößerung, schwache Expression

Die Hochrisiko Fälle waren dabei zu gleichen Teilen auf die schwach und stark exprimierten Fälle verteilt (Abbildung 19).

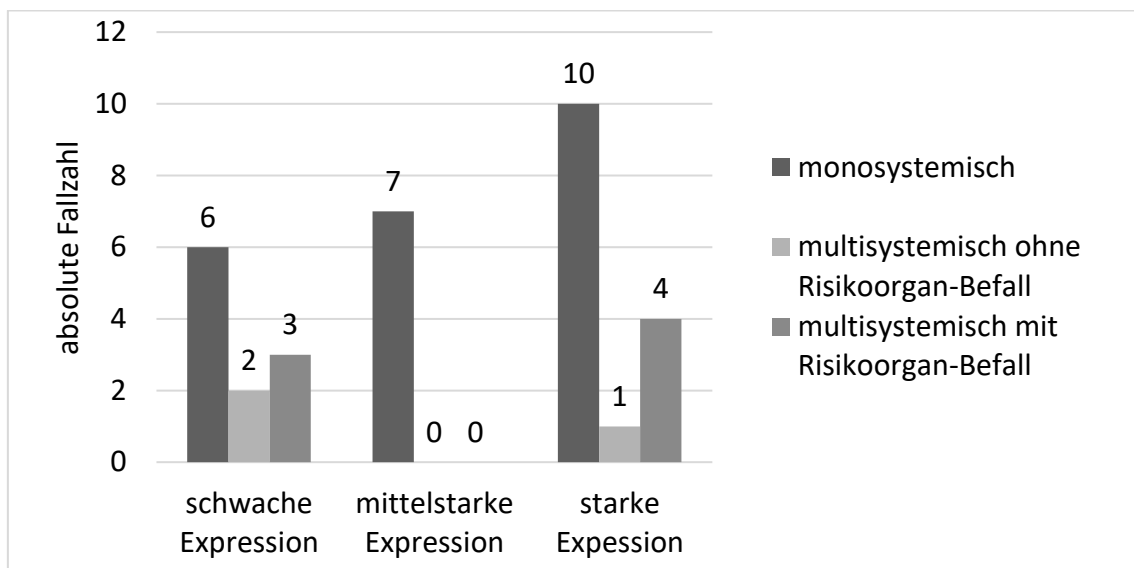


Abbildung 19: Verteilung des Befalls auf die Stufen der p16-Expression (Gesamtfallzahl n=33)

3.4 Korrelation identifizierter Mutationen mit dem klinischen Verlauf

Um eine mögliche prognostische und pathogenetische Aussagekraft der Mutationen zu ermitteln, wurden Zusammenhänge zwischen den einzelnen

Mutationen und dem Geschlecht, dem Alter bei Erstdiagnose, dem Stadium und der Lokalisation der LCH sowie den Rezidiven untersucht. Der Fall mit der *BRAF*^{V600D}-Mutation wurde in der statistischen Auswertung zu den *BRAF*-Mutationsträgern dazugezählt.

Das Kollektiv für die Analyse potentieller Korrelationen beinhaltet 37 Patienten bei denen Alter und Geschlecht bekannt waren. Bei 34 lagen auch Daten zur Lokalisation der LCH vor, welche aus den Akten der Kinderklinik entnommen wurden.

Die Korrelationsberechnungen wurden in einer Zwei-Stufen-Analyse durchgeführt. Dabei wurden zunächst alle Mutationsträger (*BRAF*- und *MAP2K1*-mutierte Fälle) gegen die Wildtypträger (*BRAF* und *MAP2K1*) aufgetragen. Im zweiten Schritt wurden dann die beiden Gene (*BRAF* und *MAP2K1*) der Mutationsträger nochmals separat den Wildtypträgern gegenübergestellt.

3.4.1 Geschlecht und Mutationen

Bei der Geschlechterverteilung in der Gruppe der Mutationsträger konnte eine Tendenz zum männlichen Geschlecht beobachtet werden (17/27, 63 %), welche sich vor allem durch eine erhöhte Rate männlicher *BRAF*-Mutationsträger (12/18, 67 %) erklären lässt. Bei den *MAP2K1*-Mutationsträgern war das Geschlechterverhältnis ausgeglichen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verteilung der Wildtypträger und Mutationsträger auf das Geschlecht

In der letzten Spalte wurden die *p*-Werte des Pearson Chi-Quadrat Testes angegeben, welche jeweils berechnet wurden, indem die Mutationsträger gegen die Wildtypen aufgetragen wurden.

| | Geschlecht | | | | Gesamtsumme | p-Werte |
|-------------------------|------------|--------------------|----------|--------------------|-------------|--------------------------------|
| | männlich | | weiblich | | | |
| | Anzahl | Anzahl als Zeilen% | Anzahl | Anzahl als Zeilen% | Anzahl | Mutations-träger gegen Wildtyp |
| Wildtypträger | 3 | 43% | 4 | 57% | 7 | |
| Mutationsträger | 17 | 63% | 10 | 37% | 27 | 0,34 |
| <i>BRAF</i> -Mutation | 12 | 67% | 6 | 33% | 18 | 0,28 |
| <i>MAP2K1</i> -Mutation | 5 | 56% | 4 | 44% | 9 | 0,61 |
| Gesamtsumme | 20 | 59% | 14 | 41% | 34 | |

3.4.2 Alter und Mutation

Hinsichtlich des Alters fand sich die Mehrzahl der Kinder mit Wildtyp (6/7, 86%) bzw. mit *MAP2K1*-Mutation (7/9, 78%) in der Gruppe der über zweijährigen Kinder. Bei den *BRAF*-Mutationsträgern war dagegen die Mehrzahl der Kinder (10/18, 56 %) unter zwei Jahren. Bei der Untersuchung, ob der *BRAF*-Mutationsträger im Vergleich zu den älteren Kindern gehäuft bei den unter Zweijährigen auftauchten, zeigte sich ein signifikant erhöhtes Auftreten der *BRAF*-Mutationsträger bei den unter Zweijährigen (Chi-Quadrat-Test $p=0,028$, Abbildung 20, Anhang).

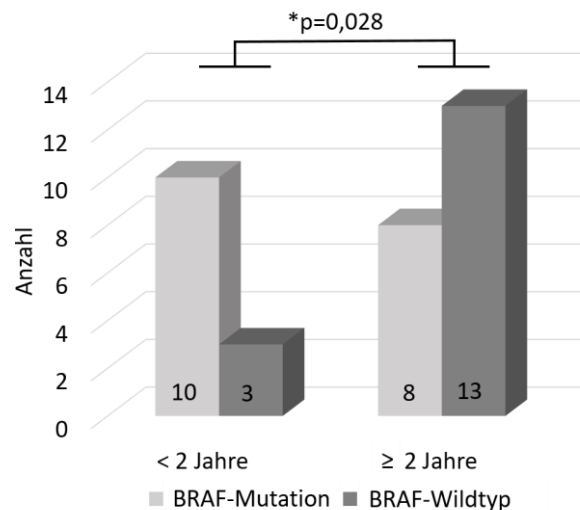


Abbildung 20: Darstellung der Verteilung der *BRAF*-Mutation und *BRAF*-Wildtypen auf die Altersgruppen

*Im Gegensatz zu den älteren Kindern, ist bei den unter Zweijährigen ein signifikant erhöhtes Auftreten von *BRAF*-Mutationsträgern zu beobachten ($p = 0,028$).*

3.4.3 Befall und Mutationen

Die Fragestellung einer prognostischen Aussage der Mutationen hinsichtlich eines monosystemischen oder multisystemischen Befalls ist klinisch von besonderem Interesse. Im vorliegenden Kollektiv konnten hier jedoch keine signifikanten Unterschiede gesehen werden. Die *BRAF*-Mutationsträger zeigten mit 6/18 (33 %) Fälle etwas häufiger einen multisystemischen Befall, als die Wildtypträger mit 2/7 (29 %) und die MAP2K1-Mutationsträger mit 2/9 (22 %, Tabelle 15)

Tabelle 15: Darstellung der Verteilung der Mutationsträger auf die Patienten mit monosystemischem Befall und multisystemischem Befall

| | Monosystemischer Befall | | Multisystemischer Befall | | Gesamtzahl |
|---|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------|
| | Absolute Anzahl | Relative Anzahl als Zeilen% | Absolute Anzahl | Relative Anzahl als Zeilen% | |
| Wildtyp BRAF und MAP2K1 Hotspotregionen | 5 | 71 % | 2 | 29 % | 7 |
| <i>BRAF</i> -Mutationsträger | 12 | 67 % | 6 | 33 % | 18 |
| <i>MAP2K1</i> -Mutationsträger | 7 | 78 % | 2 | 22 % | 9 |
| Gesamtzahl | 24 | | 10 | | 34 |

Betrachtet man den *BRAF*- und *MAP2K1*-Status hinsichtlich des Organbefallsmusters, so findet man bei den Fällen mit Knochenbefall die repräsentative Verteilung von circa der Hälfte der Fälle mit *BRAF*-Mutation, einem Viertel mit *MAP2K1*-Mutation und einem Viertel Wildtypen. Bei allen vier Fällen mit Befall der inneren Organe wurde eine Mutation gefunden, dabei waren drei der vier Fälle *BRAF*^{V600E}-Mutationen (Abbildung 21).

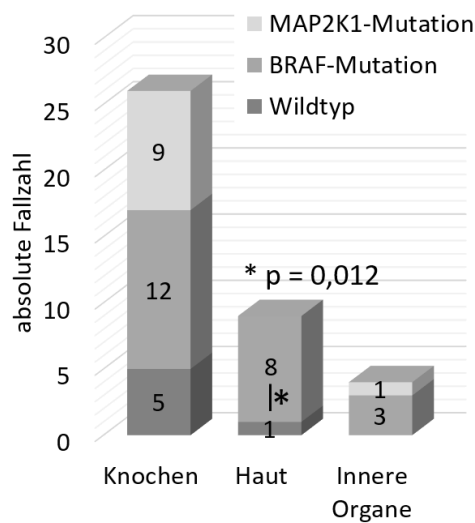


Abbildung 21: Verteilung des Mutationsstatus nach den befallenen Organen

Es ist zu beachten, dass oft mehrere Organe gleichzeitig betroffen waren und Fälle mehrfach vorkommen können, da hier lediglich nach Befallsort aufgetrennt wurde. Während bei den Patienten mit Knochenbefall eine der Gesamtmenge entsprechende Verteilung des Mutationsstatus vorlag, waren alle Fälle mit innerem Organbefall Mutationsträger und 8/9 der Hautfälle trugen eine BRAF-Mutation ($p = 0,012$).

3.4.3.1 Hautbefall und Mutationen

Acht der neun Fälle mit Hautbefall trugen eine $BRAF^{V600E}$ -Mutation, darunter die drei Fälle mit einem Hashimoto-Pritzker. Testete man die BRAF-Mutationsträger und alle BRAF-Wildtypträger (Gesamtzahl $n=34$) auf einen Zusammenhang mit einem Hautbefall, so konnte mit dem Person-Chi-Quadrat-Test ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem BRAF-Mutationsstatus und einem Hautbefall festgestellt werden ($p = 0,012$, Abbildung 21, Anhang).

Die Patienten mit Hautbefall wurden nochmals hinsichtlich des LCH-Stadiums, der einzelnen befallenen Organe, des Mutationsstatus und der Rezidivzahl untersucht. Die Verteilung ähnelte der des Gesamtkollektivs. Einzig herausstechend war hier wie oben bereits beschrieben, dass 7/9 Patienten jünger als zwei Jahren alt waren. Fünf der neun Fälle hatten einen multisystemischen Verlauf (Tabelle 16)

Tabelle 16: Übersicht über das Alter, Stadium und Rezidivzahl der LCH-Fälle mit Hautbeteiligung

| | | kein Hautbefall/ anderer Organbefall | | Hautbefall | |
|--------------|------------------------|---|-----------------------|------------|-----------------------|
| | | Anzahl | Anzahl als Zeilen% | Anzahl | Anzahl als Zeilen% |
| Altersgruppe | 0 bis < 2 Jahre | 6 | 46 % | 7 | 54 % |
| | 2 bis 10 Jahre | 14 | 88 % | 2 | 13 % |
| | >10 Jahre | 5 | 100 % | 0 | 0 % |
| Stadium | monosystemisch | 20 | 83 % | 4 | 17 % |
| | multisystemisch | 5 | 50 % | 5 | 50 % |
| Rezidive | keine | 14 | 74 % | 5 | 26 % |
| | ein oder mehr Rezidive | 11 | 73 % | 4 | 27 % |

Untersuchte man die Patienten mit Hautbefall auf das Rezidivrisiko, so entsprach das Rezidivrisiko dem des Gesamtkollektivs mit 44 % (4/9). Eine Auftrennung nach genauem Befallsmuster ergab bei vier der neun Patienten einen alleinigen Hautbefall, drei der vier hatten einen Hashimoto-Pritzker. Zwei Patienten hatten Haut- und Knochenbefall, bei drei waren Haut und innere Organe betroffen – darunter der einzige Wildtypträger mit Hautbefall. Hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven zeigte sich dabei, dass keiner der drei Hashimoto-Pritzker-Fälle ein Rezidiv hatte.

3.4.4 Rezidive und Mutationen

Es entwickelten nur 2/7 (29 %) der Wildtyp-Fälle ein oder mehrere Rezidive, während es bei den Mutationsträgern 48 % (13/27) waren. Es überwogen hier wiederum die *BRAF*-mutierten Fälle mit einer Rezidivrate von 10/18 (56 %), während es bei den *MAP2K1*-mutierten Fällen nur 33 % (3/9) waren (Abbildung 22).

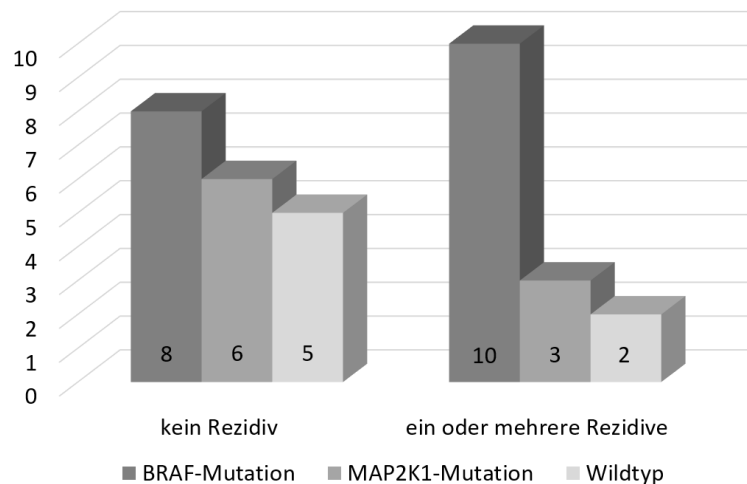


Abbildung 22: Darstellung der Verteilung der *BRAF*- und *MAP2K1*-Mutationsträger, sowie der Wildtypen auf den Rezidiv-Status

*Bei der Mehrzahl der *BRAF*-Mutationsträgern sind Rezidive zu beobachten, während sowohl bei den *MAP2K1*-Mutationsträgern, als auch den Fällen mit Wildtyp-Sequenz über zwei Drittel der Fälle rezidivfrei blieben.*

Aufgrund der vermehrten Rezidive bei *BRAF*-Mutationsträgern wurde noch das rezidivfreie Überleben mit einer Kaplan-Meyer-Kurve analysiert. Dabei konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den *BRAF*-Mutationsträgern und den Wildtypträgern gezeigt werden. Bei den *BRAF*-Mutationsträgern lag nach zwei Jahren die Wahrscheinlichkeit für ein rezidivfreies Überleben bei 72 %, während sie bei den Fällen mit (*BRAF*- und *MAP2K1*-) Wildtyp-DNA noch 100 % betrug (Abbildung 23). Die Prüfung auf Signifikanz ergab sowohl mit dem Log Rank-Test ($p = 0,42$) als auch mit dem Breslow-Test ($p = 0,20$) und dem Tarone-Ware-Test ($p = 0,26$) einen p -Wert über dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05.

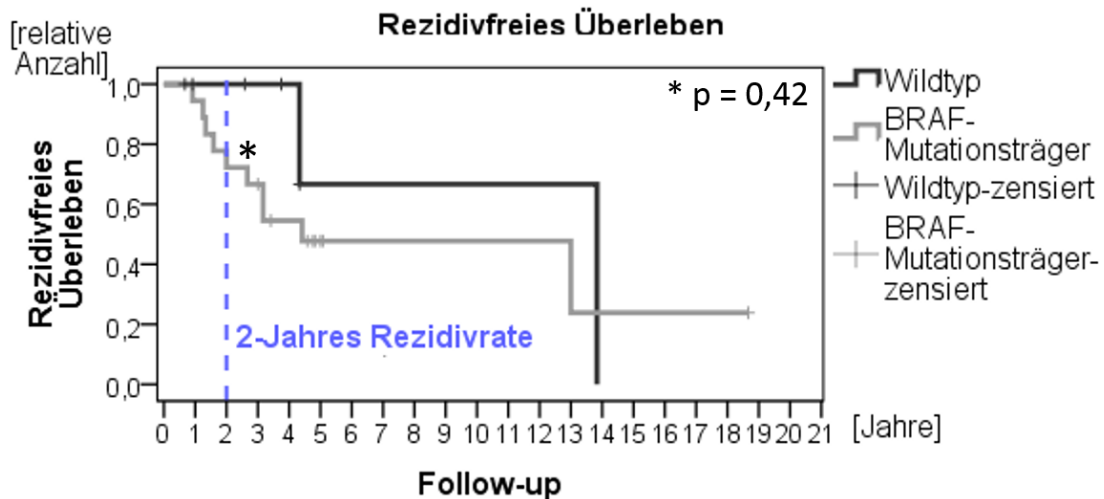


Abbildung 23: Kaplan-Meyer-Kurve des rezidivfreien Überlebens der *BRAF*-Mutationsträger und der Wildtypträger

Die 2-Jahres Rezidivrate beträgt bei den *BRAF*-Mutationsträgern 72 %, während sie bei den Wildtypträgern noch 100 % beträgt. Der *p*-Wert nach dem Log Rank-Test beträgt 0,42.

3.4.5 Korrelation zwischen den einzelnen Mutationen und dem Auftreten von Spätfolgen

Bei den 26 Patienten, von denen sowohl die experimentellen, retrospektiven als auch die Daten über Spätfolgen vorlag, wurde ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Mutationen und Spätfolgen untersucht. Dabei hatten die Fälle mit Wildtyp mit einem Drittel (2/6) etwas seltener Spätfolgen als die Mutationsträger mit 45 % (9/20). Sowohl bei den *BRAF*- (7/16) als auch bei den *MAP2K1*-Mutationsträgern (2/4) war dabei jeweils circa die Hälfte der Fälle von Spätfolgen betroffen (Anhang).

4 Diskussion

4.1 Retrospektive Analyse zeigt Risikofaktoren für einen schweren LCH-Verlauf und den Wandel in der Therapie über die letzten 30 Jahre

4.1.1 Vergleich der Inzidenz klinischer Merkmale im retrospektiven Kollektiv

Die retrospektive Analyse der klinischen Präsentation und des Verlaufes der 55 Kinder mit LCH ergab ähnliche Inzidenzzahlen wie bisher beschrieben. Sowohl in der Verteilung der Stadien, mit zwei Drittel monosystemischem Befall und einem Drittel multisystemischem Befall, als auch in der Präsentation der Lokalisation, mit 69 % Knochenbefall, 35 % Hautbefall, 13 % Lungenbefall und 13% Befall anderer innerer Organe, sowie 7 % Hypophysen-Befall, ähneln die Daten anderen retrospektiven Studien [2-4, 9, 50]. Gerade bei der Inzidenz des Hypophysen-Befalls gibt es jedoch die unterschiedlichsten Daten, die von 9 – 50 % reichen [3, 9, 50]. Im Tübinger Kollektiv war hier also ein eher verminderter Hypophysen-Befall zu verzeichnen. Allerdings kamen im Follow-up von 46 der 55 im Verlauf der Erkrankung noch Fälle hinzu und so zeigten schließlich 9/46 (20 %) der Patienten eine Hypophysen-Beeinträchtigung. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass bei den 9 Patienten mit Spätfolgen an der Hypophyse auch Patienten eingeschlossen wurden, welche eine Schädigung der Hypophyse durch die Kortikosteroid-Therapie erfahren hatten. Der Knochenbefall, aufgeschlüsselt auf die einzelnen betroffenen Manifestationen innerhalb der Fälle mit Knochenbefall, zeigte mit 37 % einen etwas häufigeren Befall der Wirbelsäule, als in größeren Studien beschrieben (Yagci et al.: 10 %, Salotti et al. 15%) [1, 3].

Eine interessante Tendenz konnte im Geschlechterverhältnis beobachtet werden. Hier untersuchten wir nicht nur die durchschnittliche Männlich-Weiblich-Ratio (1,67) sondern analysierten zusätzlich noch das Geschlechterverhältnis in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose. Interessanterweise überwog hier bei den unter Zweijährigen das männliche Geschlecht um den Faktor 3,2 und lag

damit deutlich über den durchschnittlichen Werten von 1,2-1,8. Als einflussender Faktor in die Geschlechterverteilung bei den Kleinkindern ist sicherlich die bekannte deutlichere männliche Dominanz bei den LCH-Befällen mit Hashimoto-Pritzker zu nennen. Da im Kollektiv allerdings nur drei Fälle mit Hashimoto-Pritzker einfließen, würde auch abzüglich dieser drei Fälle der männlich-weibliche Quotient bei $16/6 = 2,7$, und damit erhöht liegen. So unterstützt diese Erkenntnis nicht nur die Hypothese einer männlichen Prädilektion für die LCH, sondern darüber hinaus die Hypothese, dass speziell im Kleinkindalter Jungen häufiger betroffen sind. So könnte bei Diagnosestellung differentialdiagnostisch bei Jungen vermehrt an eine LCH gedacht werden. Allerdings ist bei dieser Fallzahl eine zufällige Verteilung nicht ausgeschlossen. Bei Salotti et al. gab es in einem Kollektiv von 94 Patienten beispielsweise genau eine gegenteilige Verteilung mit mehr Jungen unter den 10-14-jährigen Kindern [1]. Eine Aussage über leichtere oder aggressivere Verläufe bei Jungen oder Mädchen war aus den in dieser Arbeit analysierten Daten nicht ersichtlich. Die LCH-Verläufe und Stadien waren bei beiden Geschlechtern vergleichbar. Trotz intensiver Forschung bleibt es weiter unklar, warum bei der LCH des Kindesalters insgesamt eine männliche Dominanz vorliegt. Bisher wird nur von autosomalen Mutationen bei der LCH ausgegangen. Von hormoneller Seite ist die Diskussion möglicher Ursachen dieser männlichen Prädominanz ebenfalls interessant. Gerade die entzündlich-granulomatöse Komponente der LCH könnte einen möglichen Angriffspunkt für hormonelle Einflüsse bieten. Bei gastroösophagealen Refluxerkrankungen ist beispielsweise auch eine starke männliche Prädominanz zu sehen, welche sich nicht ausschließlich durch unterschiedliche Verhaltens- und Lebensweisen erklären lässt. Hier stellten Asanuma et al. und Masaka et al. beispielsweise die Hypothese eines schützenden anti-inflammatorischen Effekts von Östrogenen durch Inaktivierung von Mastzellen auf [51, 52]. Da die LCH aber inzwischen längst nicht mehr als rein chronisch-entzündliche Erkrankung gilt und zudem speziell bei den Kleinkindern mit niedrigem Sexualhormon-Spiegel die männliche Prädominanz festgestellt werden konnte, ist eine hormonelle Erklärung dieses Phänomens

eher als nebensächlich zu bewerten. Ob hier eventuell auch epigenetische Faktoren eine Rolle spielen könnten muss noch weiter erforscht werden.

4.1.2 Ermittelte klinisch-prognostische Parameter aus der retrospektiven Analyse

Aufgrund des variablen klinischen Erscheinungsbildes der LCH bedarf es vor allem der Etablierung von prognostischen Faktoren. Die retrospektive Analyse ergab keinen Einfluss des Geschlechtes auf den Verlauf, allerdings einen Einfluss des Alters. Die unter Zweijährigen entwickelten signifikant öfter einen multisystemischen Befall einschließlich Risikoorgan-Befall ($p = 0,001$). Dies bestätigen die Daten von Salotti et al. und Yagci et al., welche diesen Zusammenhang bereits beschrieben haben. Auch die Patienten mit Risikoorgan-Befall hatten im vorliegenden Kollektiv häufiger Rezidive, als in der Gruppe ohne Risikoorgan-Befall. Ein Risikoorgan-Befall und das initiale Therapieansprechen waren auch bereits in den LCH-Studien als Risikofaktoren vorbeschrieben worden [1, 3, 10, 11].

Bisher gibt es kaum Studien, welche Laborparameter als mögliche prognostische Marker untersucht haben. Eine Studie präsentierten Bernstrand et al. Sie beschrieben einen erhöhten BSG-Wert bei insgesamt 14/21 (67%) ihrer Patienten, dabei 8/10 (80 %) mit multisystemischen Befall [53]. Diese Daten ähneln den hier erhobenen Daten mit ebenfalls 6/10 (60 %) der Patienten mit erhöhtem BSG und 2/3 (67 %) der Patienten mit multisystemischem Befall. Ein signifikanter Zusammenhang war bei der geringen Fallzahl nicht gegeben. Allerdings konnte im vorliegenden Kollektiv hinsichtlich der Entzündungsparameter beim CRP-Wert ein signifikanter Zusammenhang zum Befallsstadium hergestellt werden. Es korrelierten auch erhöhte Transaminase-Werte, ein verminderter Hämoglobin-Wert und eine niedrige Erythrozyten-Zahl mit einem multisystemischen Verlauf. Da bei multisystemischen Befall auch oft ein Befall der Leber oder des hämatopoetischen Systems vorliegt, welcher sich in diesen Werten widerspiegelt, war dies zu erwarten. Im klinischen Alltag wird der BSG-Wert häufig als Aktivitätsmarker der Erkrankung verwendet. Bereits

1998 gab es dazu von Calming et al. eine Studie, die sowohl BSG als auch Thrombozyten im Krankheitsverlauf untersuchten und dabei erhöhte initiale Werte und nachfolgend ein Absinken der jeweiligen Werte im Verlauf beobachteten. Die BSG wurde folglich als möglicher Aktivitätsmarker der LCH vorgeschlagen, insbesondere als Orientierung für eine Intensivierung oder Reduktion der Therapie beim jeweiligen Patienten [54]. Yagci et al. beschrieben ebenfalls erhöhte akute Phase Proteine als prognostisch negativen Marker. In ihrem Kollektiv lag das Gesamtüberleben bei normalen akute-Phase-Protein-Werten bei 100%, während es bei erhöhter BSG nur 76,6 % und bei erhöhter LDH nur 88,7 % betrug [3]. Anhand der Hypothesen zur prognostischen Aussagekraft von Entzündungsparametern dieser Studien wurde hier nun ebenfalls die Entwicklung der BSG, weiterer Entzündungsparameter und der Thrombozyten im Verlauf der LCH analysiert. Dabei zeigte die BSG, das CRP, die Leukozyten- und Thrombozyten-Zahl bei Erstdiagnose und während eines Rückfalls deutlich erhöhte Werte im Vergleich zum Zeitpunkt nach Eintreten der Genesung. Aus dem Boxplot zu den BSG-Werten geht hervor, dass sich zum Zeitpunkt der Genesung alle Werte unterhalb 16 mm/h verteilten. Bei Erstdiagnose und Rückfall war hingegen eine größere Streuung zu beobachten, wobei die Mehrzahl der Fälle sich bei einer BSG über 15 mm/h einordnete. Unsere Daten bestätigen also die Eignung der BSG als Aktivitätsmarker für die Krankheitsaktivität. Zudem zeigte sich der CRP-Wert, die Leukozyten-Zahl und die Thrombozyten-Zahl als weitere mögliche Verlaufsparemeter. Als Risikofaktor für das Auftreten von Rezidiven zeigte sich eine knapp über dem Signifikanzniveau liegende Korrelation von Rezidiven zu einem vermindertem MCV-Wert mit $p = 0,053$. Dies lässt sich am ehesten als Folge einer langen Entzündungsdauer einordnen. Durch eine chronische Inflammation kann es zur Eisenverwertungsstörung kommen. Dies präsentiert sich in einer mikrozytären Anämie. So kann der niedrige MCV-Wert als Parameter für eine lange Entzündungsdauer interpretiert werden, welche sodann indirekt mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert ist. Eine erhöhte Zahl an Eosinophilen korrelierte ebenfalls mit einer erhöhten Rezidivrate ($p = 0,041$), als weiterer möglicher prognostischer Faktor aus der Reihe der Entzündungsparameter.

Keiner der untersuchten Laborparameter konnte mit einem Auftreten von Spätfolgen in Verbindung gebracht werden, weswegen auch weiterhin kein langfristiger prognostischer Faktor hinsichtlich Spätfolgen existiert.

4.1.3 Diskussion des Wandels der Diagnostik und Therapie der LCH über die letzten 30 Jahre

Da die retrospektive Analyse des klinischen Verlaufs und der Therapie von 55 LCH-Patienten, die in der Kinderklinik Tübingen behandelt wurden, bis auf das Jahr 1981 zurückreichte, konnte auch der Wandel in der Diagnostik und Therapie der LCH über die letzten 30 Jahre beobachtet werden. Laut S1-Richtlinie gehört zum diagnostischen Standard eine Laboruntersuchung mit den unter 2.5.3.2 beschriebenen Parametern und im Bereich der Bildgebung eine Abdomen-Sonographie, ein Thoraxröntgen und eine Beurteilung des Skelettes. Für letztere wird momentan ein Röntgen-Skelettstatus empfohlen. Die Sensitivität, Spezifität, aber auch Narkose- und Strahlenbelastung der MRT und CT werden noch diskutiert und je nach Klinik unterschiedlich bewertet. Im vorliegenden Kollektiv wurde eine sonographische Abklärung nur bei 46/55 (84 %) der Patienten protokolliert. Hier sei erwähnt, dass wahrscheinlich bei allen Patienten eine Sonographie erfolgte, jedoch bei den älteren Akten die genauen diagnostischen Schritte nur schwer zu erheben waren, da die handschriftliche Dokumentation zum Teil nicht verwertbar war oder möglicherweise Dokumente fehlten. Bei 56% der Tübinger LCH-Patienten wurde eine Szintigraphie durchgeführt. Diese wird aufgrund der hohen Strahlenbelastung und der hohen falsch-negativ-Rate laut S1-Richtlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie heute nicht mehr empfohlen [4, 9]. Da obige Daten über den Zeitraum der letzten 30 Jahre erfasst wurden, ist die Rate hier jedoch noch sehr hoch. Die genauere Recherche ergab, dass 30 der Szintigraphien bis 2005 stattfanden und seit 2005 nur noch eine Szintigraphie durchgeführt wurde.

Über den Zeitraum der Datenerhebung zeigten sich Unterschiede im Verlauf der Therapie. So wurden in den achtziger und neunziger Jahren hauptsächlich

Medikamente wie Prednisolon, Vinblastin, Purinethol, aber auch teilweise Methotrexat und Etoposid/VP16 verwendet – letzteres steht inzwischen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Zweitmalignomen. Erst in den letzten 15 Jahren wurden neuere Medikamente wie Cladribin, Cytarabin, Vincristin und Indometacin verwendet. Auch wurden bei schweren, rezidivierenden Fällen früher oft noch vor allem lokale, aber zum Teil auch Ganzkörper-Bestrahlungen durchgeführt. In der Kinderklinik Tübingen wurden von den retrospektiv erfassten Fällen 9/55 (16 %) Patienten bestrahlt, die meisten im Bereich der Hypophyse oder lokal am befallenen Knochen. Dies ist jedoch keine Ausnahme bei derartig weit zurückreichenden Daten. Bereits 1996 wurde von Einzelfällen mit Sekundärtumoren nach Radiatio und Etoposid-Therapie berichtet, wie beispielsweise einem malignes Melanom oder einem Schilddrüsen-Karzinom [13]. Von da an berichteten immer mehr Studien über die Spätfolgen der Bestrahlung bei Kindern. Bald war klar, dass bei dem zunehmend verbesserten Ansprechen der Patienten auf Chemotherapeutika die Risiken einer Bestrahlungstherapie bei der LCH nicht mehr den Nutzen aufwogen. Im vorliegenden Kollektiv konnten wir einen solchen Fall mit der wahrscheinlich therapiebedingten Spätfolge eines weißen Hautkrebsses im jungen Alter von 22 Jahren demonstrieren. In Tübingen fand aus eben diesen Gründen die letzte Bestrahlung einer LCH im Jahr 2000 statt. Eine größere „Single-Center-Studie“ aus Ankara mit Daten von 1972 bis 2005 zeigte ähnliche Zahlen für die Anwendung der Bestrahlung, einzig die Chemotherapie wurde dort häufiger durchgeführt, während in der Kinderklinik Tübingen eher eine „watch-and-wait“-Therapie verfolgt wurde [3]. Vergleicht man die Therapieerfolge hilfsweise mit der Rezidiv-/Überlebensrate so hatten in Tübingen 21/55 (38 %) der Fälle ein oder mehrere Rezidive, in der Ankara-Studie waren es mit 61/217 nur 28 %, allerdings zeigte das Tübinger Kollektiv keine Todesfälle, wohingegen in Ankara 32/217 (15 %) der Patienten starben. Aus dem Vergleich der beiden Studien kann auf eine Tendenz hin zu weniger Rezidiven, aber einer erhöhten Todesrate bei aggressiverer, also häufigerer Chemotherapie, geschlossen werden. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass das Tübinger Kollektiv mit 55 Patienten nur ein Viertel des Ankara-Kollektivs betrug und damit eine zufällige Verteilung stärker

ins Gewicht fällt. Zudem reichen die Daten von Ankara noch sechs Jahre weiter zurück, was bei der ständig verbesserten LCH-Therapie über die Jahre die Therapieergebnisse sicherlich auch mit beeinflusste [3].

Die neuesten Ansätze der letzten drei Jahre in der Therapie der LCH gehen im Sinne der personalisierten Medizin hin zu spezifischen Antikörpertherapien. Hier ist die Entwicklung der Therapie bei malignen Melanomen beispielhaft. Die Entdeckung von *BRAF^{V600E}*-Mutationen bei 40-60 % der malignen Melanome wurde zum Meilenstein in der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien mit BRAF-Inhibitoren. Als man zusätzlich noch die Rolle von MAP2K1-Mutationen im Melanom und deren Einfluss auf das Therapieansprechen entdeckte, konnte die Therapie für das vormals nur sehr begrenzt therapierbare Melanom weiter bedeutend optimiert werden [55, 56].

In den letzten drei Jahren wird bei LCH-Patienten in der klinischen Diagnostik immer häufiger eine *BRAF*- oder *MAP2K1*-Mutation mitbestimmt, um bei besonders aggressiven Verläufen spezifische Kinasehemmer anwenden zu können. Durch eine spezifische Hemmung der durch die *BRAF^{V600E}*-Mutation daueraktivierten Serin-/Threonin-Protein-Kinase BRAF, wird die fälschlicherweise konstitutiv stimulierte Zellproliferation gestoppt. Für die Behandlung von malignen Melanomen mit nachgewiesener *BRAF^{V600E}*-Mutation ist bislang das Medikament Vemurafenib zugelassen. Hier sind als sehr häufige Nebenwirkungen ein Plattenepithelkarzinom der Haut, eine aktinische Keratose und eine Alopezie bekannt. Als häufige Nebenwirkungen zählen hier eine Follikulitis, ein Basalzellkarzinom, eine Arthritis und eine Lähmung des Nervus facialis und als gelegentlich auftretende Nebenwirkungen eine toxisch epidermale Nekrolyse, ein Steven-Johnson-Syndrom, eine periphere Neuropathie, ein retinalen Venenverschluss oder eine Vaskulitis. Bei diesen größtenteils schwerwiegenden Nebenwirkungen ist Zurückhaltung bei der Behandlung der LCH im Kindesalter geboten [57]. Für die Therapie der LCH gibt es bisher nur Einzelfallstudien, welche eine gute Wirksamkeit ohne Resistenzentwicklung, allerdings ebenfalls das Auftreten vor allem dermalen Nebenwirkungen zeigten [16, 17]. Das Modell von Murakami et al., welches eine zentrale Bedeutung von Interleukin-1 in der Entstehung der LCH betont,

beinhaltet gleichzeitig die Idee eines möglichen neuen Therapieansatzes für die LCH, welche am Interleukin-1-Rezeptor ansetzen würde. Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten wie Anakinra, Rilonacept und Canakinumab, welche teilweise bei der Erdheim-Chester-Erkrankung schon getestet wurden und gut verträglich waren, wären dann auch bei der LCH eine mögliche neue Therapieoption [33, 58, 59].

4.2 Korrelationsanalyse zeigt Zusammenhang zwischen Mutation und dem Alter, dem Befallort und dem Rezidivrisiko

Eine der spannendsten Fragen in Bezug auf die LCH-assoziierten Mutationen ist sicherlich, inwieweit diese Mutationen Aussagen über das Stadium und den Verlauf der LCH, aber auch das Therapieansprechen liefern. Die bisherigen Studien von Chakraborty et al. und Berres et al. konnten keinen Zusammenhang zu Alter, Geschlecht oder Lokalisation der LCH herstellen [15, 41]. Berres et al. zeigten aber einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen *BRAF*-mutierter zirkulierender Progenitor-Zellen und einem multisystemischen Verlauf. Sie stellten die Hypothese auf, dass je nachdem auf welcher Ebene die dendritischen Langerhans-Zellen mutiert sind, sich ein multisystemischer Verlauf (bei zirkulierenden Progenitorzellen), ein unisystemischer aber multifokaler Befall (bei lokalen gewebsgebundenen dendritischen Progenitorzellen) und unisystemischer und unifokaler Befall (bei ausdifferenzierten gewebsgebundenen dendritischen Langerhans-Zellen) zeigt [41]. Chakraborty et al. fiel zum ersten Mal eine zwar nicht signifikante, aber erhöhte Rezidivrate bei den *BRAF*-mutierten Fällen auf [15]. Dieser Zusammenhang konnte von Berres et al. in einer größeren Fallstudie mit 100 Fällen statistisch signifikant bestätigt werden. Dabei war die Rezidivrate bei *BRAF*^{V600E}-Mutationsträgern fast doppelt so hoch [41]. Dafür wurden die Wildtypträger und Mutationsträger mit dem Patientenalter, Patientengeschlecht und Stadium, Befallsort und Rezidivrate der LCH korreliert.

Sowohl hinsichtlich des Geschlechts, als auch hinsichtlich des Stadiums konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen den Mutationsträgern und dem Wildtypträger festgestellt werden, was den von Chakraborty et al. vorgestellten Ansatz eines Stadiums abhängig von der Entwicklungsebene der dendritischen Zellen unterstützt.

Doch eine Tendenz hin zu Rezidiven bei *BRAF*-Mutationsträgern, sowie ein signifikant erhöhtes Auftreten von *BRAF*-Mutationen bei unter Zweijährigen, sowie bei Hautbefall konnte festgestellt werden. Keine der bisherigen Studien, welche Mutationen und die zusammenhängende Klinik untersuchten, konnten die hier beschriebenen Zusammenhänge zeigen. Die *MAP2K1*-Mutationen betreffend konnte im vorliegenden Kollektiv kein signifikanter Zusammenhang zu Verlaufsparemtern der LCH festgestellt werden.

4.2.1 Korrelationsanalyse von *MAP2K1*-Mutationen und klinischer Präsentation

Im Kollektiv der Korrelationsanalysen zeigten 9/34 (26 %) der LCH-Patienten eine Mutation in Exon 2 oder 3 der *MAP2K1*, dabei wurden sieben Mutationen im Exon 2 gefunden. Es handelte sich in allen Fällen um Deletionen, von denen vier noch nicht vorbeschrieben sind (Stand 20.04.2017), aber in einer bekannten Hotspot-Region für Mutationen des Exons liegen. Im Exon 3 der *MAP2K1* wurden vier Mutationen gefunden, drei davon auch Deletionen, wiederum in einer vorbeschriebenen Hotspot-Region. Eine bisher nicht vorbeschriebene Punktmutation war auch darunter (Tabelle 17, [60]). Die vorbeschriebenen Hotspot-Regionen kodieren laut Chakraborty et al. in Exon 2 eine negativ regulierende Domäne und auf Exon 3 das katalytische Zentrum der *MAP2K1* [15]. Das Vorkommen von *MAP2K1*-Mutationen ist dabei vergleichbar mit den bisherigen Daten von 27,5% (11/40) und 17,1% (7/41) [15, 28]. Während bei *BRAF*^{V600E}-Mutationen mehrere Zusammenhänge zur klinischen Präsentation gefunden wurden, so zeigte sich bei den *MAP2K1*-Mutationsträgern oft ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei den Wildtypträgern. In manchen Kategorien war die Verteilung der *MAP2K1*-Mutationsträger sogar gegenläufig zu der der

BRAF-Mutationsträger. Während *BRAF*-Mutationsträger beispielsweise oft Hautbefälle zeigten, so hatte kein einziger der *MAP2K1*-Mutationsträger einen Hautbefall. Es zeigte sich beim Auftreten von *MAP2K1*-Mutationen öfter ein unisystemischer Befall. Zudem wurden *BRAF*-Mutationen vor allem bei Kleinkindern gefunden, verteilten sich bei *MAP2K1*-Mutationsträgern dagegen in 7/9 (78 %) auf die über 2-jährigen Kinder. Da die Fallzahl an *MAP2K1*-Mutationsträgern im vorliegenden Kollektiv eher klein ist, sind diese Tendenzen nicht signifikant.

Tabelle 17: Auflistung der einzelnen Mutationen des Exons 2 und Exons 3 der *MAP2K1* und deren bisherige Aufführungen auf der COSMIC Datenbank

Die Mutationen sind auf Basenpaar (c)-Ebene und Protein (p)- Ebene aufgeführt. In den Spalten sind die Anzahl der vorkommenden Fälle im vorliegenden Kollektiv und auf der COSMIC-Datenbank (Zugriff: 20.04.2017). Zusätzlich sind bei den schon vorherbeschriebenen Mutationen das Gewebe, die Anzahl der bisherigen Paper, die die Mutation bei der LCH beschreiben und die Daten des Papers aufgeführt.

| MAP2K1 Exon 2 | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|-------------------------------|--|
| Mutation | Anzahl der Fälle im Kollektiv | vorbeschrieben bei Cosmic | Gewebe | vorbeschrieben Paper über LCH | Paper über LCH; Autor, Jahr |
| c.170_184del, p.Q58_E62del | 3 | 1 mal [61] | LCH | 1 | Chakraborty et al, Blood, 11/2014 [15] |
| c.168_182del, p.K57_G61del | 1 | 1 mal [62] | LCH | 1 | A. Brown et al., Blood, 09/2014 [28] |
| c.171_185del, p.Q58_E62del | 2 | 0 mal [63] | | | |
| c.173_187del, p.Q58_E62del | 1 | 0 mal [64] | | | |
| MAP2K1 Exon 3 | | | | | |
| c.388 T>C, p.Y130H | 1 | 0 mal [65] | | | |
| c.302_307del, p.E102_I103del | 1 | 5 mal, 2 davon bei der LCH [66] | pulmonales Adenokarzinom, Melanom, Hypophysenadenom | 2 | Chakraborty et al, Blood, 11/2014 [15] |
| c.301_306del, p.L101_E102del | 2 | 0 mal [67] | | | |

4.2.2 Bedeutung von *BRAF*-Mutationen hinsichtlich klinischer Präsentation

Die Mutationsanalyse von *BRAF*^{V600E}-Mutationen zeigte in 18/37 Fällen eine *BRAF*^{V600E}-Mutation und in einem Fall eine *BRAF*^{V600D}-Mutation. Diese seltene Variante einer *BRAF*-Mutation ist bei der LCH bisher erst einmal bei einem benignem Hashimoto-Pritzker-Fall vorbeschrieben und Kansal et al. stellten die Hypothese eines möglichen Zusammenhangs zu der Befallsart des Hashimoto-Pritzkers auf [49]. Mit der Entdeckung des Falles im vorliegenden Kollektiv konnte diese Hypothese jedoch entkräftet werden, da dieser sich mit einer singulären Knochenläsion präsentierte, die nach chirurgischer Sanierung (Auslöffeln) ohne weitere Therapie oder Rezidive abheilte.

Unabhängig der LCH ist die *BRAF*^{V600D}-Mutation eine laut COSMIC Datenbank (Stand 20.04.2017) nur 19 Mal vorbeschriebene Mutation und damit sehr selten. Neben dem einen LCH-Fall wird das Vorkommen in COSMIC noch vor allem beim malignen Melanom, in zwei Fällen auch beim Cholangiokarzinom beschrieben [68]. Für die *BRAF*^{V600E}-Mutationen zeigten sich hinsichtlich der klinischen Präsentation interessante Zusammenhänge.

4.2.2.1 *Diskussion eines Zusammenhangs zwischen Mutation und dem Auftreten von Rückfällen*

Es wurde die von Chakraborty et al. und Berres et al. gezeigte Tendenz hin zur erhöhten Rezidivrate bei *BRAF*-Mutationsträgern im vorliegenden Kollektiv nochmals geprüft. Die Ergebnisse waren nicht signifikant ($p = 0,42$), doch zeigten sich immerhin deutliche Unterschiede bei den *BRAF*-Mutationsträgern. So erlitten bei den *BRAF*-Mutationsträgern über die Hälfte der Patienten Rezidive (10/18, 56 %), während es bei den Wildtypträgern (2/7, 29 %) und *MAP2K1*-Mutationsträgern (3/9, 33 %) nur ein Drittel waren. Die Kaplan-Meyer-Kurve über das rezidivfreie Überleben der *BRAF*-Mutationsträger gegenüber den *BRAF*- und *MAP2K1*-Wildtypen zeigte nach 2 Jahren, dass alle Wildtypträger, aber nur 72% der *BRAF*-Mutationsträger noch rezidivfrei waren. In dieser Arbeit konnten wir die Hypothese eines erhöhten Rezidivrisikos bei *BRAF*^{V600E}-Mutationsträgern also

weiter untermauern. Diese Erkenntnis stellt natürlich gerade für die BRAF-Inhibitionstherapie einen bedeutungsschweren Diskussionspunkt dar. Denn wie oben beschrieben, sahen auch Berres et al. und Chakraborty et al. diesen Zusammenhang in ihrem Kollektiven [15, 41]. Diese Erkenntnis ist als starkes Argument für die Behandlung mit BRAF-Inhibitoren zu werten, um die wohl durch die *BRAF*-Mutation vermittelten häufigen Rezidive zu verhindern. Eine BRAF-Inhibition könnte speziell hinsichtlich der Prävention eines Auftretens von Rezidiven eine Behandlungsmöglichkeit darstellen. Da rezidierte Fälle im vorliegenden Kollektiv auch signifikant häufiger Spätfolgen aufzeigten, könnte dies eine schnellere Entscheidung für eine spezifische BRAF-Inhibitionstherapie bei *BRAF*-mutierten Fällen unterstützen.

4.2.2.2 ***Diskussion eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Erkrankungsalter und dem vorliegenden Mutationsmuster***

Während in bisherigen Studien keine Korrelation zwischen Alter und Mutationsstatus aufgezeigt werden konnte, konnte in dieser Arbeit je nach Altersgruppe ein deutlicher Unterschied im Mutationsmuster gezeigt werden. So trugen 10/13 (77 %, signifikant $p = 0,028$) der 0–2-Jährigen eine *BRAF*-Mutation, während die *MAP2K1*-Mutationsträger bei den älteren Kindern relativ überwogen. Trotz nur mittelgroßer Fallzahl unterscheidet sich die Verteilung hier sehr deutlich. Hinsichtlich der Pathogenese der kindlichen LCH drängt sich deshalb die Hypothese eines möglicherweise altersabhängig unterschiedlichen Musters von Treiber-Mutationen auf. Das unterschiedliche Krankheitsverhalten der LCH mit aggressiveren multisystemischen Verläufen bei Kleinkindern würde diese Hypothese unterstützen. Bei anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise Hirntumoren, wurde ein altersabhängiges Mutationsmuster bereits aufgezeigt [69]. Diagnostisch und therapeutisch würde dies zwar in der direkten Anwendung keinen Unterschied machen, da das Stadium der LCH nicht mutationsabhängig zu sein scheint, doch für das Verständnis der Pathogenese der LCH und damit auch der langfristigen Entwicklung neuer Therapien könnte diese Erkenntnis von großer Bedeutung sein.

4.2.2.3 **Diskussion eines möglichen Einflusses einer BRAF-Mutation auf das LCH-Befallsmuster**

Im vorliegenden Kollektiv konnten auch hinsichtlich der Mutationen des ERK-Signalwegs und dem Befallsmuster der LCH signifikante Unterschiede erkannt werden. Während beim Knochenbefall die Verteilung der Wildtyp-, *BRAF*- oder *MAP2K1*-Mutationsträger sich ähnlich dem Gesamtkollektiv verteilte, so trugen bei den Fällen mit Hautbefall 8/9 (89 %, signifikant $p = 0,012$), darunter alle drei Fälle mit Hashimoto-Pritzker, und bei den Fällen mit Befall der inneren Organe 3/4 (75 %) eine *BRAF^{V600E}*-Mutation. Besonders die hohe Zahl an *BRAF*-Mutationsträgern bei Hautbefall war signifikant gegenüber den anderen Lokalisationen und den *BRAF*-Wildtypträgern. Gerade hinsichtlich der entscheidenden Rolle, die die *BRAF^{V600E}*-Mutation in der Pathogenese des malignen Melanoms spielt, sind diese Ergebnisse interessant.

Bislang gibt es erst eine Studie, die speziell bei der adulten LCH mit Hautbefall die *BRAF^{V600E}*-Mutationsrate untersucht hat. Varga et al. zeigten darin in allerdings nur fünf von zehn Fällen das Auftreten einer *BRAF^{V600E}*-Mutation. Dies entspricht der bisher vorbeschriebenen und auch in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Prävalenz der *BRAF*-Mutationen. Allerdings ist auch bei Varga et al. die Fallzahl gering. Vor allem ist zu beachten, dass es sich um erwachsene Patienten handelt. Falls dies auch nicht gleich eine differente Pathogenese bedeuten muss, so sei hier doch berücksichtigt, dass sich das Mutationsmuster altersabhängig unterscheiden kann (3.4.2) und damit eine erhöhte *BRAF^{V600E}*-Mutationsrate mit variierenden Mechanismen bei der kindlichen LCH durchaus möglich ist [70].

Falls ein Zusammenhang zwischen Hautbefall in weiteren Studien mit größerer Fallzahl bestätigt werden kann, stellt sich die Frage, ob bei den Fällen mit Hautbefall zu den inzwischen bekannten noch weitere Pathomechanismen einfließen. Gerade der Morbus Hashimoto-Pritzker als reiner, oft kongenitaler, benigner Hautbefall, präsentiert sich stark divergent und ist oft schwer von einem singulären Hautbefall der LCH abzugrenzen, sodass hier abweichende Entstehungsmechanismen zugrunde liegen könnten. Für Diagnostik und

Therapie wäre dies eine andere Risikostratifizierung für LCH-Patienten mit Hautbefall. Dies könnte beispielsweise eine sofortige diagnostische Abklärung des *BRAF*-Status bei Hautbefall bedeuten und damit therapeutisch weitere Möglichkeiten auf tun. Ein möglicher Ansatz wäre dann beispielsweise ein eigener Behandlungsast in der LCH-Therapie bei Hautbefall, der sich spezifisch an einer möglichen *BRAF*^{V600E}-Inhibition orientiert. Da die Rezidivrate bei der LCH nach wie vor ungefähr 30-50 % beträgt und es noch oft zum Therapieversagen kommt, werden immer wieder spezifischere, verlaufsbezogene Therapien gefordert [41].

4.3 Die Häufigkeit von Spätfolgen hinsichtlich des Alters, Stadiums und Verlaufs der kindlichen LCH

4.3.1 Inzidenzvergleich und Stellenwert der erhobenen Spätfolgen

Bisher wurden nur wenige Studien nach 1995 publiziert, welche die Spätfolgen der LCH untersuchten. Untenstehend wurden im Vergleich zur hier vorliegenden Studie noch vier weitere Studien aufgeführt, darunter zwei noch in den neunziger Jahren und die letzte im Jahr 2006 (Tabelle 18). Eine Stärke dieser Studie im Vergleich zu den bisherigen Studien bildet die lange Follow-up-Zeit mit einem medianen Follow-up von 13 Jahren und einem maximalen Follow-up von 31 Jahren. Im vorliegenden Kollektiv lag das Auftreten von Spätfolgen mit 41 % der Patienten im Bereich der bisher vorbeschriebenen Inzidenz-Zahlen (22 % - 71 %). Zwischen den Studienwerten der einzelnen Spätfolgen konnte man eine große Streuung erkennen. Interessant war, dass keiner der Patienten eine Hörminderung oder Lungenfunktionseinschränkung angab, was in den anderen Studien eine häufige Spätfolge darstellte. Eine mögliche Auswirkung der Hypophysen-Schädigung auf die Sexualhormone mit einem Sexualhormondefizit wurde zuletzt von Willis et al. und Donadieu et al. 1996 beschrieben mit 16 % bzw. 0,3 % der Patienten und lag im vorliegenden Kollektiv auch in einem Fall vor [18-21]. Um einen größeren Einblick in die Tragweite der Folgen der LCH auch auf psychischer Ebene zu erlangen, untersuchten Nanduri et al., ob eine psychische Beeinträchtigung bei 40 ehemaligen LCH-Patienten vorlag. Bei 28 % wurden dabei Verhaltens- und/oder psychische Probleme wie beispielsweise

Depression, antisoziales Verhalten und Schwierigkeiten mit interpersonellen Beziehungen beschrieben. Zusätzlich zeigten sie mit einem Score, welcher die subjektive Einschränkung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität der Patienten abfragte, dass sich über 50 % durch die vorausgegangene Erkrankung in der Lebensqualität eingeschränkt fühlten [21].

Tabelle 18: Auflistung der einzelnen Spätfolgen bei vier ausgewählten Studien über Langzeitfolgen der vergangenen zwanzig Jahre.

Bedeutung der verwendeten Ziffern und Zeichen: - nicht erfasst; 1) \geq Zahl: dieser Wert wurde in der Studie nicht extra erfasst, sondern nur einzelne Werte davon, die sich aber nicht addieren lassen, da Fälle auch doppelt auftauchen können. Somit wurde immer die größere der Zahlen der Untergruppe genommen (beispielsweise bei hormonellem Befall war nur Diabetes insipidus mit 24 % und Wachstumshormonmangel mit 9 % angegeben, so wurde für den Gesamt-Hormonbefall ≥ 24 % angegeben; 2) 0,3 % setzten sich aus 1 Fall zusammen; 3) 1 % setzt sich aus 2 Fällen zusammen.

| Spätfolgen | vorliegen de Studie (2016) | Nanduri et al. (2006) | Haupt et al. (2004) | Willis et al. (1996) | Donadieu et al. (1996) |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Fallzahl [absolut] | 46 | 40 | 182 | 51 | 320 |
| medianes/max. Follow-up [Jahre] | 13 J./31 J | 11 J./23 J. | 8 J./14 J. | 8 J./40 J. | 3 J./ ≥ 10 J. ¹⁾ |
| Spätfolgen gesamt | 41 % | 75 % | 52 % | 71 % | 22 % |
| orthopädisch | 26 % | 60 % | 20 % | 42 % | 3 % |
| Zahnverlust | 9 % | 38 % | 7 % | 30 % | 1 % |
| neurologische/ZNS-Beeinträchtigung | 4 % | 20 % | 11 % | ≥ 14 % ¹⁾ | ≥ 2 % |
| Hörverlust | - | 38 % | 13 % | 16 % | 3 % |
| Augenprobleme | 4 % | - | 8 % | - | 1 % |
| Lungenfunktions-einschränkungen | - | 20 % | 4 % | 8 % | - |
| hormonelle Beeinträchtigung gesamt | 20 % | 50 % | ≥ 24 % ¹⁾ | ≥ 26 % ¹⁾ | ≥ 18 % ¹⁾ |
| Diabetes insipidus | 13 % | 48 % | 24 % | 26 % | 18 % |
| Wachstumshormonmangel | 13 % | 32 % | 9 % | 20 % | 5 % |
| Hypothyreose | 7 % | 13 % | - | 14 % | 3 % |
| Sexualhormon-Mangel | 2 % | - | - | 16 % | 0,3 % ²⁾ |
| Sekundärtumor | - | - | 22 % | 10 % | 1 % ³⁾ |

Drei der Studien zu Spätfolgen beschrieben zudem das Auftreten von Zweitmalignomen bei ehemaligen LCH-Patienten (Tabelle 19). Es wurden folgende Tumorentitäten beschrieben: Akute lymphatische Leukämie (ALL, 3 Fälle), akute myeloische Leukämie (AML, 1 Fall), juvenile chronisch myeloische

Leukämie (juv. CML, 1 Fall), Schilddrüsenkarzinom (1 Fall), benignes Schilddrüsenadenom (1 Fall), benignes mediastinales Teratom (1 Fall), Basalzellkarzinom (1 Fall) und Glioblastom (1 Fall). Bei allen drei ALL-Fällen, sowie dem AML- und juv. CML-Fall, wurde als möglicher Einflussfaktor eine Etoposid/p16-(Hochdosis-)Behandlung angegeben. Das Schilddrüsenkarzinom, das benigne Schilddrüsenadenom und das Basalzellkarzinom standen dagegen in möglichem Zusammenhang mit einer therapiebedingten Strahlenbehandlung im betroffenen Areal. Bei den Fällen mit Glioblastom und benignen mediastinalem Teratom wurden keine möglichen Einflussfaktoren angegeben. Haupt et al. stellten einen Zusammenhang zwischen oft vorausgehenden ALL und Lymphomen und der LCH, außerdem zwischen myeloiden Leukämien, welchen der LCH-Erkrankung manchmal nach Etoposid-/Alkylanzien-/Radiotherapie folgen und soliden Tumoren nach Bestrahlungstherapie der LCH her [9]. Im vorliegenden Kollektiv trat in einem Fall ein weißer Hautkrebs auf. Der Patient hatte bei Erstdiagnose einen multisystemischen LCH-Befall, der auch die Risikoorgane Leber, Milz, Knochen und Hypophyse betraf. Er hatte drei Rezidive und wurde jedes Mal chemo- und radiotherapiert. Dabei wurde zunächst nur die Hypophyse, dann der Schädel und schließlich der ganze Körper bestrahlt. Addiert ergibt das eine Gesamtdosis von über 28 Gray. Zudem erhielt er eine 54-wöchige Chemotherapie mit Etoposid. Dieser weitere Fall unterstützt die Hypothese vom erhöhten Auftreten von Zweitmalignomen bei Zustand nach Bestrahlungs- bzw. Etoposid-Therapie.

Tabelle 19: Auflistung des Vorkommens von Sekundärtumoren in der vorliegenden und vier ausgewählter Studien von den vergangenen 20 Jahren

Bedeutung der verwendeten Ziffern und Zeichen: - = nicht erhoben, ALL= Akute lymphatische Leukämie, SD-Ca = Schilddrüsen-Karzinom, juv. CML= juvenile chronisch myeloische Leukämie, VBL=Vinblastin, PDN=Prednisolon, AML = Akute myeloische Leukämie Es wurden in der Aufzählung die absolute Fallzahl der jeweiligen Studie, zudem die Anzahl, Art und Assoziationen mit den beschriebenen Sekundärtumoren aufgeführt

| Studien | Fallzahl [absolut] | Anzahl Sekundärtumore | Arten Sekundärtumore | Assoziationen mit Sekundärtumor |
|---------------------------|--------------------|-----------------------|--|--|
| Vorliegende Arbeit (2016) | 46 | 1 | 1 weißer Hautkrebs | Ganzkörper-Bestrahlung (> 28 Gy) |
| Nanduri et al. (2006) | 40 | - | - | - |
| Haupt et al. (2004) | 182 | 4 | 3 ALL 1 SD-Ca | 3 ALL: Hochdosis-Etoposid-Behandlung (für 4-9 J.) 1 SD-Ca: 14 J. nach Mediastinal-Radiatio |
| Willis et al. (1996) | 51 | 3 | 1 juv. CML 1 benign. SD-Adenom 1 Basalzell-Ca | 1 juv. CML: Etoposid, VBL, PDN-Chemo 1 SD-Adenom, 1 Basalzell-Ca: Radiatio im betroffenen Areal |
| Donadieu et al. (1996) | 320 | 3 | 1 Glioblastom 1 AML 1 benignes mediastinales Teratom | 1 Glioblastom: - 1 AML: 1200mg/m ² Etoposid-Behandlung 1 benignes mediastinales Teratom: Lungen-LCH |

Insgesamt zeigten sich seit den letzten veröffentlichten Daten von 2006 keine großen Veränderungen in der Art und Häufigkeit von Spätfolgen bei ehemaligen kindlichen LCH-Patienten. Aufgrund immer schonenderer Therapien und dem Verzicht auf die Radiotherapie wäre dies wohl zu erwarten gewesen – bei diesen zum Teil sehr lang zurückreichenden Daten könnte eine solche mögliche Tendenz jedoch erst nach Jahrzehnten erkannt werden. Mit dem zunehmenden Einsatz neuer BRAF- und vielleicht auch bald MAP2K1-Inhibitoren wird sich zeigen, ob sich das Auftreten der Spätfolgen verändern wird, da die bisherigen Präparate sehr viele unerwünschte Nebenwirkungen, vor allem Hautprobleme, mit sich bringen (4.1.3).

4.3.2 Diskussion der Einfluss- und Risikofaktoren für das Auftreten von Spätfolgen

Um mögliche Einflussfaktoren für Spätfolgen in der Erkrankung der LCH aus dem vorliegenden Kollektiv zu ermitteln, wurden Korrelationsanalysen zwischen Spätfolgen, klinischen Verlaufsdaten und dem Mutationsstatus gemacht. Zudem wurde in dem verschickten Fragebogen die familiäre Tumorinzidenz der erstgradig Verwandten erhoben.

Die klinisch-retrospektiven Daten ergaben dabei, dass bei Kleinkindern unter zwei Jahren seltener Spätfolgen auftraten (in 6/19, 32 % der Fälle) als bei den über Zweijährigen (in 13/27, 48 % der Fälle). Dies ist bei dem signifikant erhöhten und aggressiveren Auftreten von Multisystembefall bei Kleinkindern zunächst verwunderlich. Zur Gruppe der unter Zweijährigen zählen allerdings auch zwei Fälle mit benignem und meist mildem Hashimoto-Pritzker, welche auch in vorliegendem Kollektiv keine Spätfolgen aufwiesen. Diese Tendenz hin zu einer erhöhten Zahl von Spätfolgen bei älteren Kindern wurde in bisherigen Studien nicht erwähnt und es bleibt fraglich, ob dies eine zufällige Verteilung im Kollektiv ist, oder ob hier beispielsweise bessere regenerative Mechanismen im Kleinkindalter, trotz schwereren Befalls, eine Rolle spielen [3, 18, 19, 21, 42].

Hinsichtlich des Stadiums entwickelten die Patienten mit multisystemischem Befall doppelt so häufig Spätfolgen (9/15, 60 %) wie diejenigen mit unisystemischem Befall (10/31, 32 %). Dies lässt sich durch die größere Destruktion auf organischer Ebene, als auch einem aggressiveren therapeutischen Vorgehen gut erklären. Erhöhte Zahlen hinsichtlich der Lokalisation gab es bei Patienten mit Hypophysenbefall, von denen 3/4 von Spätfolgen betroffen waren. Auch bei innerem Organbefall zeigten 3/5 Fälle Spätfolgen. Am wenigsten Spätfolgen waren bei den Fällen mit Hautbefall zu verzeichnen. Hier gaben nur in 6/16 (38 %) der Fälle Spätfolgen an, was wiederum obige Erklärungshypothese verstärkter Spätfolgen durch erhöhte Organdestruktion unterstützt. In Übereinstimmung mit bisherigen Studien konnte auch hier kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Spätfolgen und dem betroffenen Organ hergestellt werden. Nanduri et al. beschrieben beispielsweise eine erhöhte Rate an Spätfolgen bei ZNS- und Lungen-Befall [21] und Willis et

al. gaben als größten Einflussfaktor für läsions- oder therapiebedingte Spätfolgen den ursprünglichen Befallsort an [18].

Signifikant erhöht war das Auftreten von Spätfolgen bei Patienten, welche ein oder mehrere Rezidive im Verlauf zeigten (Pearson Chi-Quadrat Test $p = 0,001$). Während nur 22 % (6/27) der Fälle ohne Rezidive Spätfolgen bekamen, so waren es bei den rezidierten Verläufen 70 % (14/20). Im vorliegenden Kollektiv konnte dieses Phänomen, welches bereits von Minkov et al. 2008 beschrieben wurde, noch deutlicher gezeigt werden [42].

Da in einem Kollektiv von 26 Patienten ein gesamter Datensatz von Verlaufsdaten, Spätfolgen und Mutationsstatus vorlag, konnte erstmalig eine Korrelationsanalyse zwischen Mutationsstatus und dem Auftreten von Spätfolgen durchgeführt werden. Dabei wurden zwischen den Wildtyp-, *BRAF*- und *MAP2K1*-Mutationsträgern keine deutlichen Unterschiede ermittelt, da sich die Spätfolgen gleichmäßig verteilten.

In den Fragebögen wurde außerdem die Tumorbelastung der erstgradig Verwandten der ehemaligen LCH-Patienten erhoben. Dabei gaben 7/46 (15 %) der befragten Patienten eine Tumorerkrankung bei Eltern, Geschwistern oder, in einem Fall, dem Kind an. Hierbei wurden die Tumorentitäten Prostatakarzinom, Mammakarzinom, maligner Nierentumor, Hautkrebs, Uteruskarzinom und Riesenzelltumor genannt. Die Prävalenz von Krebserkrankungen in Deutschland beträgt laut dem deutschen Krebsforschungszentrum und Robert-Koch-Institut derzeit 1,6 Millionen Menschen, bei einer Lebenszeitprävalenz von circa 4 %, was 3,2 Millionen entspricht [71]. Zur Ermittlung, ob die obigen Daten der normalen Prävalenz an Krebserkrankten in Deutschland entspricht oder etwa eine erhöhte Prävalenz bei den Familien der LCH-Erkrankten vorliegt, wurde die Gesamtprävalenz von Krebserkrankungen in Deutschland auf die Gesamtprävalenz von Krebserkrankungen pro Familie bzw. pro erstgradig Verwandte berechnet. Da kein Durchschnittswert für die Familiengröße zu ermitteln war, wurde anhand der Kinderrate und der Kinderlosenrate des statistischen Bundesamtes ein Durchschnittswert ermittelt. Rechnet man mit ca. 1,5 Geburten pro Frau, ergibt das eine durchschnittliche Familiengröße von 3,5 Menschen. Die Anzahl an eigenen Kindern muss zur erstgradigen Familie

zugezählt werden, was durchschnittlich weitere 1,5 Personen beinhaltet. Damit läge die durchschnittliche Zahl erstgradig Verwandter in Deutschland bei circa 5 Personen. Das ergäbe für 80 Millionen Deutsche $80/5$ Millionen = 16 Millionen erstgradig Verwandter. Die 3,2 Millionen Deutsche, welche zu Lebzeiten an Krebs erkranken, ergäben dann einen Anteil von (3,2 Mio./16 Mio.) circa 20 % aller Familien. Mit dieser einfachen Berechnung der Gesamtlebenszeitprävalenz von Krebserkrankungen pro deutscher Familie liegt der Wert obiger Patienten mit 15 % sogar noch unter den erwarteten Werten. Venkatramani et al. untersuchten neben weiteren Einflussfaktoren unter anderem auch die Tumorbelastung der Familie. Dabei erhoben sie bei 60 LCH-Patienten und 150 Kontrollen bei erstgradig Verwandten und Großeltern eine Tumorprävalenz von 30 % bei LCH-Patienten und 19 % bei den Kontrollen. Daraus ergab sich eine signifikant erhöhte Tumorbelastung in den Familien der LCH-erkrankten Patienten, welche im vorliegenden Kollektiv nicht bestätigt werden konnte. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eine Berechnung von Vergleichswerten in der Normalbevölkerung sehr fehleranfällig ist und für sichere Aussagewerte eine Fall-Kontroll-Studie erforderlich wäre. Inwieweit also die LCH auch erblich bedingt ist, bleibt weiter eine offene Frage. 1999 gab es dazu eine Studie, welche über das Histiocyte Society Board weltweit acht Zwillingspaare ermittelte, bei welchen mindestens ein Zwilling an LCH erkrankt war. Interessanterweise waren in 4/5 monozygoten Paaren beide Zwillinge an LCH erkrankt und nur 1/3 der dizygoten Paaren. Dabei waren in allen betroffenen Fällen bei beiden Zwillingen die gleichen Organe befallen und die Erkrankung trat auch zur gleichen Zeit auf. Das mediane Erkrankungsalter der betroffenen Paare lag bei 8 Monaten. Da die Fallzahl der Zwillinge auf internationaler Ebene erfolgte, so liegt das Auftreten von 5 Zwillingspaaren, bei welchen beide Zwillinge betroffen sind, im Rahmen der Prävalenz der LCH und die Paare könnten auch durchaus zufällig betroffen sein. Allerdings ist bei den vielen Varianten der Befallsorte der LCH und des möglichen Erkrankungsalters eine auffallende Übereinstimmung bei den Zwillingen zu beobachten, bei welchen genau die gleichen Organe betroffen waren und welche zudem noch in demselben Monat erkrankten [39]. Dies deutet auf eine genetische Komponente hin. Möglicherweise lag bei den Pärchen eine

BRAF- oder *MAP2K1*-Keimbahnmutation vor. Es könnten aber auch andere Keimbahnmutationen vorliegen oder gar epigenetische Faktoren hier einen Einfluss haben. Alles in allem ist diese Studie ein weiterer Beweis für die Lücken, die in der Erforschung der Pathogenese der LCH nach wie vor vorhanden sind. Gleichzeitig zeigt sich hier erneut die Notwendigkeit weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

4.3.3 Diskussion der Notwendigkeit einer systemischen Nachsorge

Die hohe Prävalenz an Spätfolgen, welche zudem, wie Nanduri et al. zeigen konnten, mit einer beeinträchtigten Lebensqualität korrelieren, gibt Anlass zur regelmäßigen Überwachung der LCH-Patienten, um beim Auftreten von Spätfolgen schnellstmöglich intervenieren zu können [21]. Da sich die S1-Leitlinie nicht zur Nachsorge der LCH-Patienten äußert, stellten Haupt et al. 2013 Leitlinien vor, welche auf dem Boden der aktuellen Studienlage die Nachsorge näher klassifizieren. Für alle Patienten ist dabei eine mindestens jährliche Untersuchung bis zum Abschluss des Wachstums vorgesehen. Dabei sind bei allen Patienten vor allem Symptome eines Diabetes insipidus abzufragen, zudem Körpergröße und –gewicht. Weiterhin sollte die Bestimmung der Tanner-Stadien der Pubertätsentwicklung und eine neurologische Abklärung erfolgen. Dazu ist laborchemisch ein großes Blutbild, Blutsenkungsgeschwindigkeit, Leberenzyme und Albumin zu kontrollieren. Je nach Lokalisation der LCH schließen sich dann für das jeweilige Organ weitere Empfehlungen an. Dieses Vorgehen wurde auch in der Kinderklinik Tübingen bisher durchgeführt. Wie aus diesen Daten hervorgeht, wäre es sinnvoll, diese Empfehlung therapieabhängig zu erweitern. Haupt et al. empfehlen bisher bei Bestrahlungstherapie beispielsweise nur, dass der Patient beim Auftreten von Symptomen im Bestrahlungsareal einen Arzt aufsuchen soll [9]. Diese Empfehlung könnte auf eine jährliche hautärztliche Kontrolle für alle bestrahlten Patienten erweitert werden. Für alle p16/Etoposid-therapierten Patienten wäre nach Eintritt in das Erwachsenenalter eine jährliche Kontrolle des Blutbildes aufgrund der damit assoziierten myeloischen Leukämien

empfehlenswert. Beim Screening auf Diabetes insipidus sollte eine langjährige Cortikosteroid-Therapie besonders bedacht werden.

Patienten, welche mit BRAF-Inhibitoren wie Vemurafenib behandelt werden, sollten in den Anfangsjahren nach Therapieende besonders engmaschige Kontrollen erhalten. Insbesondere sollte die Haut inspiziert werden hinsichtlich dem Auftreten von akinetischen Keratosen und Plattenepithelkarzinomen in über zehn Prozent der Vemurafenib-Behandelten [16, 17, 57].

4.4 Ausblick auf mögliche Konsequenzen für Therapie und Prophylaxe

4.4.1 Anwendbarkeit und Relevanz der verwendeten Antikörper p16 und VE1

Zwei große Studien mit jeweils über 700 Fällen untersuchten die Spezifität und Sensitivität der immunhistochemischen VE1-Färbung hinsichtlich der Detektion einer *BRAF*^{V600E}-Mutation. Dabei zeigte sich eine Spezifität und Sensitivität jeweils über 99 % [72, 73]. Auch weitere Studien mit kleinerem Kollektiv bestätigten diese Ergebnisse [6, 74]. Diese Studien hatten aber meist eine Mehrzahl von Melanomen im Kollektiv. Estrella et al. zeigten allerdings an einer ebenfalls großen Kohorte (n=480) von kolorektalen Karzinomen deutlich schlechtere Zahlen. Die Sensitivität lag bei 75% und die Spezifität bei 93%. Es wurde unter anderem bei mehreren Wildtypträgern eine diffuse Expression beschrieben.

Dies sind deutlich schlechtere Werte als beispielsweise beim Melanom oder papillären Schilddrüsenkarzinom. Estrella et al. sprechen sich deshalb gegen eine Anwendung des VE1-Antikörpers beim kolorektalen Karzinom aus. In der vorliegenden Arbeit entsprach die Übereinstimmung zwischen Immunhistochemie und Sanger-Sequenzierung nicht den vorbeschriebenen Daten. Wie oben bereits beschrieben, wurden acht Wildtypträger in der Immunhistochemie zunächst als unklare Fälle klassifiziert, da ein sehr schwaches, diffuses Expressionsmuster zu sehen war. Alle negativen Fälle waren auch in der Sanger-Sequenzierung *BRAF*^{V600E} negativ, allerdings

enthielten sie einen *BRAF*^{V600D}-Fall, welcher von dem Antikörper nicht angefärbt wurde. Bei der *BRAF*^{V600D}-Mutation wird Valin nicht wie bei der *BRAF*^{V600E} - Mutation in Glutaminsäure, sondern in Asparaginsäure umgewandelt [75]. Obwohl sich die chemischen Eigenschaften dieser beiden Aminosäuren ähneln, muss auf Proteinebene an der Bindungsstelle des VE1-Antikörpers doch ein entscheidender Unterschied vorliegen. Das wirft die Frage eines Therapieansprechens von BRAF-Inhibitoren bei *BRAF*^{V600D} -Mutationsträgern auf, welches in aktuellen Studien noch nicht sicher bewiesen wurde [57, 76]. Zudem wurden im vorliegenden Kollektiv vier immunhistochemisch positive Fälle nochmals als Kontrollen nachsequenziert. Interessanterweise konnte bei zwei der Fälle in der Sequenzierung keine Mutation gefunden werden. Die wiederholte immunhistochemische Validierung zeigte, dass zwei der Fälle eine sehr geringe Anfärbung zeigten und so retrospektiv nicht eindeutig positiv eingestuft werden konnten, sondern zu den unklaren Fällen zu zählen waren. Diese inkomplette Übereinstimmung der immunhistochemischen Daten mit den Sequenzierungsergebnissen wirft die Frage auf, ob das Problem hier genauso wie bei Estrella et al. bei der Gewebeart liegt. Dies würde nahelegen, dass abhängig von der Gewebeart eine unterschiedliche Sicherheit des Eindringens und der Bindung der Antikörper am immunhistochemischen Schnitt vorliegt. So lagen im vorliegenden Kollektiv neben Haut- und Schleimhautbiopsien auch mehrere Knochenstanzen, Lungen- und ZNS-Biopsien vor. Die zwei zunächst immunhistochemisch falsch-positiven Fälle waren eine Mandibula-Biopsie und eine Schädelkalotten-Biopsie mit umgebendem Weichteilgewebe. Für die diagnostische Anwendung des VE1-Antikörpers zur Detektion von *BRAF*-Mutationen ist nach Estrella et al. und den analysierten Daten zufolge eher Vorsicht geboten. Weitere Studien sollten hier noch eine deutliche Sicherheit der Anwendung speziell bei der LCH beweisen. Die großen Vorteile des VE1-Antikörpers liegen in der schnellen und unkomplizierten Handhabung. Für die nächsten Jahre wird dies sicherlich für die Diagnostik von Bedeutung sein. Ob hinsichtlich der revolutionär fortschreitenden Entwicklung der neuen Sequenzierungsverfahren, wie beispielsweise des Next-Generation-Sequencing, in fernerer Zukunft noch die nur auf eine ganz spezielle Mutation begrenzte

Antikörper-Färbung eine Rolle spielen wird, bleibt gerade bei einem so mutationsbunten Krankheitsbild wie der LCH fraglich.

Was die Expression der p16 betrifft, waren die Hochrisiko-Fälle dabei zu gleichen Teilen auf die schwach und stark exprimierten Fälle verteilt. Wir konnten die Hypothese von Chilosì et al. einer verminderten p16 Expression bei den Hochrisikoverläufen damit nicht bestätigen [37]. Dies entspricht den Daten von Kim et al. von 2010. Hier fand man bei den Hochrisiko-Verläufen sogar eher eine stärkere p16-Expression [38]. Die Oncogene induced Senescence (OIS)-Theorie hinsichtlich einer reaktiven Aktivierung und Expression des Tumorsuppressorproteins p16 zum Zellzyklus-Arrest kann bei einer Expression von p16 bei 33/34 Fällen zwar nicht widerlegt werden, aber durch kein besonders starkes Expressionsmuster und keiner verringerten Expression bei besonders aggressiven Verläufen auch nicht klar bewiesen werden. Weitere Untersuchungen, die sowohl die inflammatorische Komponente, als auch die Expression von weiteren Mediatoren des OIS-Modells, wie beispielsweise p21, prüfen, könnten hier mehr Klarheit schaffen.

4.4.2 Bedeutung prädiktiver molekularer Marker für die Therapie der LCH

Durch die erstaunlichen Fortschritte in der Techniken der molekularen Forschung der letzten Jahre stehen wir vor neuen Herausforderungen. Während bisher standardmäßig die gleichen bewährten Medikamente zur Therapie verwendet wurden, so geht der durch die einfache Mutationsanalyse ausgelöste Trend auch bei der LCH hin zur personalisierten Medizin (4.1.3). Für die *BRAF^{V600E}*-Mutation steht hierfür ja schon ein spezifischer Inhibitor bereit. Mit Aufkommen des Next Generation Sequencing wird diese Entwicklung noch stärker gefördert. Neue Studien haben bereits bei mehreren LCH-Fällen ein Whole-Exome-Sequencing durchgeführt, welche neben der bekannten *BRAF^{V600E}*- und *MAP2K1*-Mutationen noch weitere Mutationen aufzeigten, in Genen wie *MAP3K1*, *ARAF*, *ERBB3*, *PICK1* oder *PIK3R1* [15, 29].

Das stellt die Therapeuten vor große Herausforderungen, denn schon beim Auftreten anderer *BRAF^{V600}*-Mutationen, wie der *BRAF^{V600D}*-Mutation, oder auch

der bei der LCH selten beschriebenen *BRAF^{V600K}*-Mutation, ist die Wirksamkeit von Vemurafenib laut Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (Stand 12.06.2012) bisher nicht ausreichend bewiesen [57]. Laut Fisher et Larkin soll Vemurafenib auch für *BRAF^{V600}*-Varianten wie *BRAF^{V600K}* und *BRAF^{V600D}* und sogar für *ARAF*-Mutationen wirken, es gibt dafür allerdings noch keine große Studien [76]. Dies verwundert nicht, bedenkt man, dass die *BRAF^{V600D}*-Mutation auf Cosmic bisher erst 19 mal vorbeschrieben ist (4.2.2, [68]). Gentilcore et al. veröffentlichten 2013 eine Studie, in denen sie den BRAF-Inhibitor Dabrafenib an Zelllinien mit *BRAF^{V600D}*-Mutationen testeten. Laut der Studie soll Dabrafenib speziell für diese Mutation eine gute Wirksamkeit zeigen. Allerdings ist dies die einzige Studie mit *BRAF^{V600D}*-Mutationen, und beinhaltet keinen Wirkvergleich mit Vemurafenib [77]. Folglich ist eine sichere Wirkung von Vemurafenib bei der aktuellen Studienlage nicht garantiert. Für die Praxis empfiehlt sich die kritische Evaluation des Ansprechens und gegebenenfalls ein Absetzen des Medikaments.

Über Whole-Exome-Sequenzierungs-Ansätze können in Zukunft immer mehr Mutationen bei LCH-Patienten gefunden werden. Da diese oft auch in anderen Tumoren vorhanden sind, stehen dafür häufig spezifische Therapien mit monoklonalen Antikörpern und Kinaseinhibitoren zur Verfügung. Inwiefern die Anwendung dieser Substanzen gerechtfertigt ist, ist nicht nur aufgrund der oftmals schweren Nebenwirkungen fraglich. Ob ein solcher protoonkogener „Einzelfund“ einer Mutation bei einem LCH-Fall auch pathogenetische Bedeutung für die LCH hat, ist im Einzelfall oft unklar. Und damit bleibt auch eine spezifische Antikörpertherapie seltenerer Mutationen bei der LCH kritisch zu hinterfragen und im Einzelfall zu entscheiden. Die Möglichkeiten, die sich heute durch schnelle Sequenzierungsmethoden bieten, stellen die Therapeuten also auch vor die schwere Aufgabe der Befundinterpretation und der richtigen Therapieentscheidung, welche neben modernem molekular-onkologischem Verständnis zusätzlich noch das klinische Gespür in der jeweiligen Situation erfordert. Aktuell spannend bleibt natürlich auch, ob nach den Entdeckungen von Mukamari et al. eine Therapie, welche am Interleukin-1-Rezeptor ansetzt, wie

beispielsweise Anakinra bei Erdheim-Chester-Erkrankten, eine zukünftige Behandlungsmethode darstellen könnte.

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte diese Arbeit durch bisher erstmalige umfassende Daten eines Behandlungszentrums über sowohl immunhistochemische und molekulare Daten, als auch klinische Verlaufparameter und zudem Spätfolgen, einen Überblick über aktuelle Zusammenhänge zwischen molekularen Erkrankungsmodellen und Einflussfaktoren für Verlauf der kindlichen LCH und deren Spätfolgen bieten. In einer retrospektiven Analyse konnte von 55 Patienten über einen Zeitraum von 31 (1983-2014) Jahren der Wandel in Diagnostik und Therapie von Szintigraphie, Bestrahlung und VP16/Etoposid-Behandlung bis hin zu neusten Ansätzen mit Kinaseinhibitoren und Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten diskutiert werden. Spätfolgen wurden mit einer Range von 0-31 Jahren (medianes Follow-up von 13 Jahre) erhoben. Dabei gaben 41 % der 46 ehemaligen LCH Patienten vor allem orthopädische und hormonelle Spätfolgen an. Diese waren tendenziell eher bei älteren Kindern, bei multisystemischem Befall und signifikant erhöht beim Auftreten von Rezidiven im Verlauf zu sehen. Der Mutationsstatus zeigte dabei keinen Einfluss auf die Spätfolgen. Es trat zudem in einem Fall weißer Hautkrebs auf, welcher in Zusammenhang zu einer erfolgten Strahlentherapie stand. Die immunhistochemischen Untersuchungen deuteten in der VE1-Expressionsanalyse auf eine geringere Spezifität und Sensitivität, verglichen mit der molekularen Sequenzierung hin und könnten auf gewebeabhängige Unterschiede in der Verwendbarkeit des Antikörpers hinweisen. Es konnte weiter gezeigt werden, dass das mit dem Modell der mit *BRAF^{V600E}*-Mutationen assoziierten Oncogene-induced Senescence zusammenhängende Tumorsuppressorprotein p16-Expression in allen bis auf einem Fall vorhanden war. Ein Zusammenhang zwischen der Stärke der p16-Expression und dem klinischen Status konnte nicht hergestellt werden. Es war mit 46 % und 30 % eine ähnliche Inzidenz an *BRAF*- und *MAP2K1*-Mutationen zu finden, wie bereits in der Literatur angegeben, darunter eine bisher erst einmalig vorbeschriebene *BRAF^{V600D}*-Mutation in einer Knochenläsion. Die Korrelationsanalysen bestätigten eine erhöhte Prävalenz von *BRAF*-Mutationen beim Auftreten von Rezidiven. Zudem konnte erstmals ein Zusammenhang

zwischen *BRAF*-Mutationen und dem Alter und Lokalisation der LCH aufgezeigt werden. Eine signifikant erhöhte *BRAF*-Mutationsrate bei Hautbeteiligung und Kleinkindern unter zwei Jahren deutet dabei auf variierende pathogene Mechanismen je nach Erkrankungsalter und Befallsart hin.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie ähnliche Häufigkeiten der *BRAF*^{V600E}- und *MAP2K1*-Mutationen wie vorbeschrieben, dazu einen seltenen Fall einer *BRAF*^{V600D}-Mutation. Es konnte erstmalig ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer *BRAF*^{V600E}-Mutation und dem Kleinkindalter, beziehungsweise Hautbefall aufgezeigt werden. Bei einem maximalen Follow-up von 31 Jahren wurden bei 41 % der Patienten Spätfolgen der LCH erhoben.

6 Verzeichnisse

6.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung der dendritischen Langerhanszellen (Graphik modifiziert nach Swerdlow et al., 2008 [7]) | 4 |
| Abbildung 2: Histopathologisches Bild der LCH | 5 |
| Abbildung 3: ERK-Signalweg | 8 |
| Abbildung 4: Darstellung des Modells der oncogene induced senescence (OIS) bei <i>BRAF^{V600E}</i> -mutierten Zellen (Grafik modifiziert nach Cavalli et al., 2014 [36]) | 13 |
| Abbildung 5: Übersicht über die verschiedenen Subgruppen und deren Zusammensetzung..... | 44 |
| Abbildung 6: Schematische Beschreibung des Gesamtkollektivs und der retrospektiven und experimentellen Subgruppe | 45 |
| Abbildung 7: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Altersgruppen in Jahren | 46 |
| Abbildung 8: Darstellung der BSG-Werte zu verschiedenen Zeitpunkten | 55 |
| Abbildung 9: Verteilung des LCH-Stadiums auf die verschiedenen Altersgruppen | 56 |
| Abbildung 10: Darstellung des prozentualen Anteils der Fälle mit und ohne Rezidive in den Gruppen mit monosystemischem und multisystemischem Befall | 57 |
| Abbildung 11: Säulendiagramm der Verteilung der Spätfolgen auf die verschiedenen Altersgruppen..... | 59 |
| Abbildung 12: Darstellung des prozentualen Anteils der Fälle mit und ohne Spätfolgen: | 60 |
| Abbildung 13: Darstellung der histologischen Analysen | 62 |
| Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Banden einer PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung bei 140 Volt und 35 Minuten (Darstellung unter UV-Licht). | 63 |
| Abbildung 15: Immunhistochemische <i>BRAF^{V600E}</i> -Färbung in 400-facher Vergrößerung | 64 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 16: Elektropherogramm der Sanger-Sequenz der seltenen <i>BRAF</i> ^{V600D} -Mutation | 65 |
| Abbildung 17: Elektropherogramm der Sanger-Sequenz einer typischen Hotspot-in-frame-Deletion des Exon 2 der <i>MAP2K1</i> | 66 |
| Abbildung 18: p16 INK4a – Immunhistochemie..... | 68 |
| Abbildung 19: Verteilung des Befalls auf die Stufen der p16-Expression (Gesamtfallzahl n=33) | 68 |
| Abbildung 20: Darstellung der Verteilung der <i>BRAF</i> -Mutation und <i>BRAF</i> -Wildtypen auf die Altersgruppen..... | 71 |
| Abbildung 21: Verteilung des Mutationsstatus nach den befallenen Organen . | 73 |
| Abbildung 22: Darstellung der Verteilung der <i>BRAF</i> - und <i>MAP2K1</i> -Mutationsträger, sowie der Wildtypen auf den Rezidiv-Status | 75 |
| Abbildung 23: Kaplan-Meyer-Kurve des rezidivfreien Überlebens der <i>BRAF</i> -Mutationsträger und der Wildtypträger | 76 |

6.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Schematische Darstellung des PCR-Programms zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA | 27 |
| Tabelle 2: PCR zur Mutationsanalyse der Regionen in <i>BRAF</i> und <i>MAP2K1</i> ... | 29 |
| Tabelle 3: PCR zur Mutationsanalyse von <i>BRAF</i> mit LNA bei Proben mit schlechter Amplifizierbarkeit der DNA | 30 |
| Tabelle 4: PCR zur Sequenzanalyse nach Sanger | 33 |
| Tabelle 5: Referenzwerte der Laborparameter | 39 |
| Tabelle 6: Beschreibung des klinisch-retrospektiven Kollektivs..... | 48 |
| Tabelle 7: Übersicht über den Anteil der verschiedenen Therapieoptionen in der Behandlung an der Kinderklinik Tübingen | 50 |
| Tabelle 8: Inzidenz der Spätfolgen bei LCH-Patienten..... | 52 |
| Tabelle 9: Auflistung der Verteilung ausgewählter Parameter auf das Befallsstadium der LCH bei Erstdiagnose in absoluter und relativer Anzahl | 54 |
| Tabelle 10: Darstellung des zeitlichen Verlaufs verschiedener Entzündungsparameter | 55 |
| Tabelle 11: Auftreten von Spätfolgen in Abhängigkeit der klinischen Parameter Altersgruppe bei Erstdiagnose, Stadium der LCH, Lokalisation des LCH-Befalls und Auftreten von Rezidiven | 58 |
| Tabelle 12: Schematische Darstellung der Spätfolgen bei bestrahlten Patienten (n=7). Dabei traten auch mehrere Spätfolgen bei einzelnen Patienten auf. | 61 |
| Tabelle 13: Zusammenfassung über die untersuchten Hotspotregionen in Exon 2 und 3 des <i>MAP2K1</i> -Gens und im Kodon 600 des <i>BRAF</i> -Gens..... | 67 |
| Tabelle 14: Verteilung der Wildtypträger und Mutationsträger auf das Geschlecht | 70 |
| Tabelle 15: Darstellung der Verteilung der Mutationsträger auf die Patienten mit monosystemischem Befall und multisystemischem Befall..... | 72 |
| Tabelle 16: Übersicht über das Alter, Stadium und Rezidivzahl der LCH-Fälle mit Hautbeteiligung | 74 |
| Tabelle 17: Auflistung der einzelnen Mutationen des Exons 2 und Exons 3 der <i>MAP2K1</i> und deren bisherige Aufführungen auf der COSMIC Datenbank | 86 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 18: Auflistung der einzelnen Spätfolgen bei vier ausgewählten Studien über Langzeitfolgen der vergangenen zwanzig Jahre..... | 92 |
| Tabelle 19: Auflistung des Vorkommens von Sekundärtumoren in der vorliegenden und vier ausgewählter Studien von den vergangenen 20 Jahren | 94 |

6.3 Literaturverzeichnis

1. Salotti, J.A., et al., *Incidence and clinical features of Langerhans cell histiocytosis in the UK and Ireland*. Arch Dis Child, 2009. **94**(5): p. 376-80.
2. Guyot-Goubin, A., et al., *Descriptive epidemiology of childhood Langerhans cell histiocytosis in France, 2000-2004*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **51**(1): p. 71-5.
3. Yagci, B., et al., *Langerhans cell histiocytosis: retrospective analysis of 217 cases in a single center*. Pediatr Hematol Oncol, 2008. **25**(5): p. 399-408.
4. Hämatologie, G.f.P.O.u., *Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) in Langerhanszell-Histiozytose (LCH) im Kindesalter*. 2013.
5. Willman, C.L., et al., *Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X)--a clonal proliferative disease*. N Engl J Med, 1994. **331**(3): p. 154-60.
6. Alayed, K., et al., *BRAF and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis: a study of 50 cases*. Hum Pathol, 2016.
7. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4, ed. C.E. Swerdlow S., Harris N. Jaffe E., Pileri S., Stein H., Thiele J., Vardiman J. 2008, Lyon: WHO Health Organization Classification of Tumours. 441.
8. Bernstein, E.F., et al., *Solitary Congenital Self-Healing Reticulohistiocytosis*. British Journal of Dermatology, 1993. **129**(4): p. 449-454.
9. Haupt, R., et al., *Langerhans cell histiocytosis (LCH): guidelines for diagnosis, clinical work-up, and treatment for patients till the age of 18 years*. Pediatr Blood Cancer, 2013. **60**(2): p. 175-84.
10. Gadner, H., et al., *A randomized trial of treatment for multisystem Langerhans' cell histiocytosis*. J Pediatr, 2001. **138**(5): p. 728-34.
11. Gadner, H., et al., *Improved outcome in multisystem Langerhans cell histiocytosis is associated with therapy intensification*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2556-62.
12. Bernard, F., et al., *Multi-centre pilot study of 2-chlorodeoxyadenosine and cytosine arabinoside combined chemotherapy in refractory Langerhans cell histiocytosis with haematological dysfunction*. Eur J Cancer, 2005. **41**(17): p. 2682-9.

13. *A multicentre retrospective survey of Langerhans' cell histiocytosis: 348 cases observed between 1983 and 1993. The French Langerhans' Cell Histiocytosis Study Group.* Arch Dis Child, 1996. **75**(1): p. 17-24.
14. Steiner, M., et al., *Improved outcome of treatment-resistant high-risk Langerhans cell histiocytosis after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning.* Bone Marrow Transplant, 2005. **36**(3): p. 215-25.
15. Chakraborty, R., et al., *Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis.* Blood, 2014. **124**(19): p. 3007-15.
16. Gandolfi, L., et al., *Multisystemic and Multiresistant Langerhans Cell Histiocytosis: A Case Treated With BRAF Inhibitor.* J Natl Compr Canc Netw, 2015. **13**(6): p. 715-8.
17. Haroche, J., et al., *Vemurafenib as first line therapy in BRAF-mutated Langerhans cell histiocytosis.* J Am Acad Dermatol, 2015. **73**(1): p. e29-30.
18. Willis, B., et al., *Disease course and late sequelae of Langerhans' cell histiocytosis: 25-year experience at the University of California, San Francisco.* J Clin Oncol, 1996. **14**(7): p. 2073-82.
19. Donadieu, J., *A multicentre retrospective survey of Langerhans' cell histiocytosis: 348 cases observed between 1983 and 1993. The French Langerhans' Cell Histiocytosis Study Group.* Arch Dis Child, 1996. **75**(1): p. 17-24.
20. Haupt, R., et al., *Permanent consequences in Langerhans cell histiocytosis patients: a pilot study from the Histiocyte Society-Late Effects Study Group.* Pediatr Blood Cancer, 2004. **42**(5): p. 438-44.
21. Nanduri, V.R., et al., *Long term morbidity and health related quality of life after multi-system Langerhans cell histiocytosis.* Eur J Cancer, 2006. **42**(15): p. 2563-9.
22. Yu, R.C., et al., *Clonal proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis.* Lancet, 1994. **343**(8900): p. 767-8.
23. Badalian-Very, G., et al., *Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis.* Blood, 2010. **116**(11): p. 1919-23.
24. Zeng, K., et al., *BRAFV600E and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis occur predominantly in children.* Hematol Oncol, 2016.
25. Kolch, W., *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 827-37.
26. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - BRAF V600E* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=476>.
27. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1 Mutationen* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=MAP2K1>.

28. Brown, N.A., et al., *High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis*. Blood, 2014. **124**(10): p. 1655-8.
29. Nelson, D.S., et al., *MAP2K1 and MAP3K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis*. Genes Chromosomes Cancer, 2015. **54**(6): p. 361-8.
30. West, J.A., et al., *Polyclonal T-Cells Express CD1a in Langerhans Cell Histiocytosis (LCH) Lesions*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109586.
31. De Filippi, P., et al., *Specific polymorphisms of cytokine genes are associated with different risks to develop single-system or multi-system childhood Langerhans cell histiocytosis*. Br J Haematol, 2006. **132**(6): p. 784-7.
32. Murakami, I., et al., *Merkel cell polyomavirus DNA sequences in peripheral blood and tissues from patients with Langerhans cell histiocytosis*. Hum Pathol, 2014. **45**(1): p. 119-26.
33. Murakami, I., et al., *Interleukin-1 loop model for pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis*. Cell Commun Signal, 2015. **13**: p. 13.
34. Murakami, I., et al., *Acute-phase ITIH4 levels distinguish multi-system from single-system Langerhans cell histiocytosis via plasma peptidomics*. Clin Proteomics, 2015. **12**(1): p. 16.
35. Cangj, M.G., et al., *BRAFV600E-mutation is invariably present and associated to oncogene-induced senescence in Erdheim-Chester disease*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(8): p. 1596-602.
36. Cavalli, G., et al., *Oncogene-induced senescence as a new mechanism of disease: the paradigm of erdheim-chester disease*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 281.
37. Chilosi, M., et al., *Oncogene-induced senescence distinguishes indolent from aggressive forms of pulmonary and non-pulmonary Langerhans cell histiocytosis*. Leuk Lymphoma, 2014. **55**(11): p. 2620-6.
38. Kim, S.Y., et al., *Role of p16 in the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis*. Korean J Hematol, 2010. **45**(4): p. 247-52.
39. Arico, M., et al., *Familial clustering of Langerhans cell histiocytosis*. Br J Haematol, 1999. **107**(4): p. 883-8.
40. Venkatramani, R., et al., *An exploratory epidemiological study of Langerhans cell histiocytosis*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **59**(7): p. 1324-6.
41. Berres, M.L., et al., *BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups*. J Exp Med, 2015. **212**(2): p. 281.
42. Minkov, M., et al., *Reactivations in multisystem Langerhans cell histiocytosis: data of the international LCH registry*. J Pediatr, 2008. **153**(5): p. 700-5, 705 e1-2.
43. van Dongen, J.J., et al., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene*

- recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.* Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2257-317.
44. Fend, F., et al., *Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies.* Virchows Arch, 2005. **447**(6): p. 909-19.
45. !!! INVALID CITATION !!! {}.
46. Thomas, L., *Labor und Diagnose Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.* 7. Aufl. ed. 2008, Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges. 2016 S.
47. Moosbrugger, H., *Testtheorie und Fragebogenkonstruktion,* A. Kelava, Editor. 2012, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 439.
48. Stalemark, H., et al., *Incidence of Langerhans cell histiocytosis in children: a population-based study.* Pediatr Blood Cancer, 2008. **51**(1): p. 76-81.
49. Kansal, R., et al., *Identification of the V600D mutation in Exon 15 of the BRAF oncogene in congenital, benign langerhans cell histiocytosis.* Genes Chromosomes Cancer, 2013. **52**(1): p. 99-106.
50. Grois, N., et al., *Diabetes insipidus in Langerhans cell histiocytosis: results from the DAL-HX 83 study.* Med Pediatr Oncol, 1995. **24**(4): p. 248-56.
51. Masaka, T., et al., *Gender differences in oesophageal mucosal injury in a reflux oesophagitis model of rats.* Gut, 2013. **62**(1): p. 6-14.
52. Asanuma, K., K. Iijima, and T. Shimosegawa, *Gender difference in gastro-oesophageal reflux diseases.* World J Gastroenterol, 2016. **22**(5): p. 1800-10.
53. Bernstrand, C., et al., *Long-term follow-up of Langerhans cell histiocytosis: 39 years' experience at a single centre.* Acta Paediatr, 2005. **94**(8): p. 1073-84.
54. Calming, U. and J.I. Henter, *Elevated erythrocyte sedimentation rate and thrombocytosis as possible indicators of active disease in Langerhans' cell histiocytosis.* Acta Paediatr, 1998. **87**(10): p. 1085-7.
55. Hocker, T. and H. Tsao, *Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants.* Hum Mutat, 2007. **28**(6): p. 578-88.
56. Tran, K.A., et al., *MEK inhibitors and their potential in the treatment of advanced melanoma: the advantages of combination therapy.* Drug Des Devel Ther, 2016. **10**: p. 43-52.
57. *Vemurafenib Zelboraf - Information der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) - Neue Arzneimittel,* A.d.d. Ärzteschaft, Editor. 2012. p. 4.
58. Aouba, A., et al., *Rationale and efficacy of interleukin-1 targeting in Erdheim-Chester disease.* Blood, 2010. **116**(20): p. 4070-6.
59. Munoz, J., et al., *Erdheim-Chester disease: characteristics and management.* Mayo Clin Proc, 2014. **89**(7): p. 985-96.
60. Wellcome Trust Sanger Institute, G.R.L., *COSMIC database.*

61. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1, c170_184del15* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=map2k1+c.170_184del.
62. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1 c.168_182del* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=map2k1+c.168_182del.
63. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1 c.171_185del* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=map2k1+c.171_185del.
64. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1 c.173_187del* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=map2k1+c.173_187del.
65. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1 c.388 T>C.* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=map2k1+c.388+T%3EC>.
66. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1 c.302_307del* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=MAP2K1+c.302_307del.
67. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - MAP2K1 c.301_306del* [[text/html]] 20.04.2017, Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=MAP2K1+c.301_306del.
68. cancer, C.C.o.s.m.i. *COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer - BRAF V600D.* [text/html] 20.04.2017; Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=477>
69. Filbin, M.G. and M.L. Suva, *Gliomas Genomics and Epigenomics: Arriving at the Start and Knowing It for the First Time.* Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 497-521.
70. Varga, E., et al., *BRAFV600E mutation in cutaneous lesions of patients with adult Langerhans cell histiocytosis.* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2015. **29**(6): p. 1205-11.
71. Bertz J., D.S., Haberland J., Kraywinkel K., Kurth B.-M., Wolf U., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010*, K.K. Bertz J., Editor. 2010, Robert-Koch-Institut: Berlin. p. 166.
72. Qiu, T., et al., *Detection of BRAF mutation in Chinese tumor patients using a highly sensitive antibody immunohistochemistry assay.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 9211.
73. Kakavand, H., et al., *BRAF and NRAS mutation analysis in metastatic melanoma using immunohistochemistry: a study of 754 cases highlighting potential pitfalls and guidelines for interpretation and reporting.* Histopathology, 2016.

74. Harle, A., et al., *Detection of BRAF Mutations Using a Fully Automated Platform and Comparison with High Resolution Melting, Real-Time Allele Specific Amplification, Immunohistochemistry and Next Generation Sequencing Assays, for Patients with Metastatic Melanoma*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0153576.
75. Estrella, J.S., et al., *Assessment of BRAF V600E Status in Colorectal Carcinoma: Tissue-Specific Discordances between Immunohistochemistry and Sequencing*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(12): p. 2887-95.
76. Fisher, R. and J. Larkin, *Vemurafenib: a new treatment for BRAF-V600 mutated advanced melanoma*. Cancer Manag Res, 2012. **4**: p. 243-52.
77. Gentilcore, G., et al., *Effect of dabrafenib on melanoma cell lines harbouring the BRAF(V600D/R) mutations*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 17.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption und Leitung der Studie erfolgte durch PD Dr. Martin Ebinger, Oberarzt, Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie der Kinderklinik Tübingen, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Falko Fend, Ärztlicher Direktor der Allgemeinen Pathologie des Instituts für Pathologie und Neuropathologie Tübingen. PD Dr. Martin Ebinger war zudem an der Evaluation der klinischen und statistischen Daten sowie des Gesamtergebnisses beteiligt. Prof. Dr. Falko Fend war involviert an der Evaluation der experimentellen und statistischen Ergebnisse, sowie des Gesamtergebnisses.

Dr. med. Dominik Nann wirkte an der Evaluation der histologischen, immunhistochemischen und molekularpathologischen Ergebnissen mit.

Dr. rer. nat. Irina Bonzheim war beteiligt an der Planung und Etablierung der molekularpathologischen Untersuchungen und Evaluation der molekularpathologischen Daten und deren statistischen Auswertung.

Dr. rer. nat. Julia Steinhilber war an der Evaluation der molekularpathologischen Daten beteiligt.

Die experimentellen Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Sieglinde Baisch, Julia Baturin, Julia Steinhilber, Janine Schmidt, Sema Colak und Irina Bonzheim) eigenständig durchgeführt. Einzelne, nachträglich zu wiederholende, Versuche wurden dabei zum Teil durch oben genannte Personen durchgeführt. Sämtliche histologischen und immunhistochemischen Färbungen (HE, CD1a, S100, p16) wurden durch Mitarbeiter des Labors für Immunhistochemie des Instituts für Allgemeine Pathologie Tübingen unter der Leitung von Claudia Hermann durchgeführt.

Die Behandlung der Patienten und die Erstellung des Patientenkollektivs erfolgte durch Dr. med. Hans-Gerhard Scheel-Walter, Prof. Dr. Rupert Handgretinger, Prof. Dr. Peter Lang, Dr. med. Carl Philipp Schwarze und PD Dr. Martin Ebinger. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Aline Naumann vom Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie Tübingen eigenständig.

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

Tübingen, den 26. April 2017

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Martin Ebinger für die Konzeption und Vergabe dieses interessanten Themas, die Leitung der Studie und die zuverlässige, freundliche und ermutigende Betreuung bedanken.

Prof. Dr. Falko Fend sei ein großer Dank ausgesprochen für die gute Führung des Projekts, alle Unterstützung, sowie allen weisen und freundlichen Rat.

Dr. med. Dominik Nann gebührt ein ganz besonderer Dank für die exzellente Betreuung. Seine stets geduldige, freundliche, präzise Arbeitsweise und sein Engagement trugen einen großen Teil zum Gelingen der Arbeit bei.

Auch Dr. rer. nat. Irina Bonzheim sei ein ganz herzlicher Dank ausgesprochen für ihre zeitintensive, kompetente und liebe Unterstützung. Mit ihrer großen fachlichen Kompetenz und ihrem außerordentlichen Einsatz zu jeder Zeit spielte sie eine entscheidende Rolle in der Durchführung dieser Studie.

Dr. rer. nat. Julia Steinhilber war nicht nur in der Auswertung der Labordaten beteiligt, sondern hatte, ebenso wie Janine Schmidt, stets ein offenes Ohr und allen guten Rat. Ein ganz herzlicher Dank sei ihnen für alle Unterstützung an dieser Stelle ausgesprochen.

Auch bei Sabine Gahlen möchte ich mich bedanken für alle Ermutigung und tatkräftige Unterstützung.

Dr. med. Hans-Gerhard Scheel-Walter, Prof. Dr. Rupert Handgretinger, Prof. Dr. Peter Lang, Dr. med. Carl Philipp Schwarze und auch PD Dr. Martin Ebinger danke ich herzlich für die Zusammenstellung des Patientenkollektivs und die Überlassung der Patientendaten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Rudi Beschorner und Dr. med. Gisela Metzler für die Kooperation.

Ein großer Dank geht ebenso an Sieglinde Baisch und Julia Baturin für die tolle Einarbeitung und Unterstützung im Labor in einer stets fröhlichen und freundschaftlichen Atmosphäre.

An Sema Colak und auch an alle weiteren, hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Pathologie Tübingen und der Kinderklinik Tübingen geht ein herzlicher Dank für die Unterstützung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für all ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Lebenswegs bisher, aber auch besonders bei meinem Studium und dieser Dissertation bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Geschwister mit Partnern, meine Nichte Cataleya und meinen Neffen Mateo und meine Duppels für alle Rücksichtnahme und alles Verständnis während der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein besonderer Dank meiner Großmutter, meiner Dote Annegret und meinem Döte Albrecht, sowie allen weiteren Verwandten für Ihre Unterstützung und alle Gebete auf meinem bisherigen Weg.

Auch meinen Rutesheimer und Tübinger Freunden möchte ich für alle Ermutigung, alle Gebete, aber besonders auch für das Korrekturlesen dieser Dissertationsschrift danken.

Mein allergrößter Dank aber gebührt Gott.

9 Anhang

EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN



UNIVERSITÄTS
KLINIKUM
TÜBINGEN

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität
und am Universitätsklinikum Tübingen, Gartenstraße 47, 72074 Tübingen

Herrn
OA Dr. med. Martin Ebinger
Universitätskinderklinik
Abt. Hämatologie/Onkologie
Hoppe-Seyler-Str. 1
72076 Tübingen

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger
Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend, Institut für Pathologie und Neuropathologie

502/2014BO2
unsere Projekt-Nummer

28. August 2014
eingegangen am

09. September 2014
Datum

**Korrelation zwischen dem klinischen Langzeitverlauf und einer BRAF^{V600E} Mutation bei
der Langerhans-Histiozytose des Kindesalters. Prüfplan Version 1.1 vom 31.07.2014**

Anschreiben an Patienten

Fragebogen

Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung

Schreiben vom 26.08.2014

Sehr geehrter Herr Kollege,

die Unterlagen zur o.g. Studie haben der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Tübingen zur Beratung vorgelegen.

Danach bestehen gegen die geplante Studie seitens der Kommission keine Bedenken.

Dabei geht die Ethik-Kommission davon aus, dass ausschließlich solche Gewebe in dieser Studie untersucht werden, deren wissenschaftlicher Verwendung die Patienten bzw. die Sorgeberechtigten nach Information zugestimmt haben. Auf das Einholen einer Einwilligungserklärung bei bereits archivierten Proben kann ausnahmsweise dann verzichtet werden, wenn sämtliche Kriterien, die die Zentrale Ethik-Kommission bei der Bundesärztekammer formuliert hat (siehe Deutsches Ärzteblatt 2003; 100, A1632 und A2251) erfüllt sind. Dabei geht die Ethik-Kommission davon aus, dass es keinen unangemessen großen Aufwand bedeutet, noch nachträglich eine Einwilligungserklärung bei Proben einzuholen, die weniger als 5 Jahre gelagert werden.

Die retrospektive Auswertung vorhandener Daten eigener Patienten, die im Rahmen der Diagnostik, Therapie bzw. Therapiekontrolle entstanden sind, bedarf keiner Beratung durch die Ethik-Kommission gemäß der Berufsordnung für Ärzte und keiner nachträglichen Einwilligungserklärung der behandelten Patienten. Einer Einwilligungserklärung bedarf es immer dann, wenn Gewebe bzw. Daten untersucht werden, die einem bestimmten Menschen zugeordnet sind bzw. zugeordnet werden können.

Anschreiben an die Patienten:

1. Die Formulierungen in der Information zum Datenschutz (Satz 1) sollten überprüft werden.

Universitätsklinikum Tübingen
Anstalt des öffentlichen Rechts
StZ Tübingen
Gartensweg 3 • 72076 Tübingen
Tel. 07071/29-0
www.medizin.uni-tuebingen.de
Steuer-Nr. 86155/09402
USt-ID DE 146 889 874

Aufsichtsrat
Härtmut Schraide (Vorsitzende)
Vorstand
Prof. Dr. Michael Barthelg (Vorsitzender)
Gabriele Sonntag (SoStV, Vorsitzende)
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth
Jane Lutz

Baden-Württembergische Bank Stuttgart
BLZ 600 501 01 Konto-Nr. 7477 5037 95
IBAN DE 41 6005 0101 7477 5037 95
BIC (SWIFT-Code) SGLADEST333
Kreissparkasse Tübingen
BLZ 641 500 20 Konto-Nr. 18 144
IBAN DE 78 9410 0200 0000 0141 44
BIC (SWIFT-Code) SGLADES1TUB

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Prof. Dr. med. D. Luft
Vorsitzender

Telefon: +49 7071 29-77661

Telefax: +49 7071 29-5965

E-Mail:

ethik.kommission@med.uni-tuebingen.de

2. Die Ethik-Kommission geht davon aus, dass die Unterschriftenzeile des Fragebogens beim Eingang vom restlichen Fragebogen getrennt wird.

Für die Durchführung der Studie wünschen wir Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. Dieter Luft
Vorsitzender der Ethik-Kommission

ALLGEMEINE HINWEISE:

Mitglieder der Ethik-Kommission: PD Dr.med. Margitta Albinus - Pharmakologie, Toxikologie, Prof. Dr.med. Henner Giedke -Psychiatrie, Prof. Dr.med. Else Heidemann - Innere Medizin, Prof. Dr.med. Jürgen Honegger - Neurochirurgie, Prof. Dr.med. Holger Lerche - Neurologie, Prof. Dr.med. Dieter Luft - Innere Medizin, Prof. Dr.med. Christian F. Poets – Kinderheilkunde, Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Siegmair Reinert - Zahnheilkunde, Prof. Dr.iur. Dr.h.c. Georg Sandberger – Rechtswissenschaft, Prof. Dr.med. Dr.phil. Urban Wiesing - Medizinische Ethik

Die Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen verfährt entsprechend den ICH-GCP-Richtlinien, der Deklaration von Helsinki in der jeweils gültigen Fassung sowie den gesetzlichen Bestimmungen. Die Ethik-Kommission ist gemäß § 20 Abs. 7 MPG, Aktenzeichen: Z14-A1871-14924/97, gemäß § 92 Strahlenschutzverordnung, Aktenzeichen: Z 2.1.2-22471/2-EK-012-Ber und gemäß § 28g der Röntgenverordnung, Aktenzeichen: Z 2.1.2-22472/2.EK-013/R registriert.

Die berufsethische und berufsrechtliche Beratung gemäß §15 Abs.1 Berufsordnung für Ärzte in Baden-Württemberg ist für 3 Jahre ab Ausstellungsdatum gültig.

Änderungen im Prüfplan und in der Phase der Umsetzung bitten wir der Kommission mitzuteilen; dabei wären wir Ihnen dankbar, wenn Sie geänderte Passagen deutlich kennzeichnen würden.

Unabhängig vom Beratungsergebnis macht die Ethik-Kommission darauf aufmerksam, dass die medizinische, ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer klinischen Prüfung beim Leiter der klinischen Prüfung und auch bei allen an der Prüfung teilnehmenden Ärzten liegt.

Nach Abschluss der Studie bittet die Kommission um einen abschließenden Bericht.



Dr. M. Ebinger • Abt. Kinderheilkunde I • Hoppe-Seyler-Str. 1 • 72076 Tübingen

Adresse

Sehr geehrter Herr/Frau (Namen des ehemaligen Patienten) bzw.:

Liebe/r (Namen des Kindes)
sehr geehrte Eltern,

Anlass dieses Schreibens ist eine aktuelle Forschungsarbeit über die Ursachen und den Verlauf der Langerhans-Zell-Histiozytose. Zum Langzeitverlauf dieser seltenen Krankheit gibt es leider bisher noch wenige Forschungsarbeiten, obwohl die Langerhans-Zell-Histiozytose für die Betroffenen eine sehr ernstzunehmende und je nach Verlauf auch lebensbedrohliche Erkrankung darstellen kann.

Damit die Krankheit in Zukunft noch besser therapiert werden kann und gezielte Vorsorgeuntersuchungen entwickelt werden können, werden weitere Erkenntnisse über die Ursachen, Zusammenhänge und Langzeitfolgen der Krankheit gebraucht. In dieser Forschungsarbeit soll untersucht werden, inwieweit die Langerhans-Zell-Histiozytose als Tumorerkrankung einzuordnen ist und welche Langzeitfolgen sie mit sich bringt.

Da diese Erkrankung allerdings sehr selten ist, sind einzelne Daten sehr wertvoll für uns und wir sind daher auf die Rückmeldung der ehemals betroffenen Patienten angewiesen.

Deshalb wenden wir uns hiermit an Sie mit der Bitte, unsere Arbeit zu unterstützen, indem Sie beiliegenden Fragebogen ausfüllen. Der zeitliche Aufwand beträgt dabei ungefähr 5 Minuten. Natürlich steht es Ihnen frei, diesen Fragebogen auszufüllen und Sie haben keine Nachteile zu befürchten, falls der Fragebogen nicht ausgefüllt wird. Über Ihre Mithilfe wären wir aber sehr dankbar!

Falls Sie Fragen dazu haben, können Sie sich gerne an mich, Dr. M. Ebinger, per E-Mail oder telefonisch wenden; die Kontaktdaten finden Sie oben.

Mit freundlichen Grüßen,

Dr.med. Martin Ebinger, Oberarzt

Cand.med. Priscilla Schneckenburger

Informationen zum Datenschutz

Der Fragebogen wird nach Eingang durch den obenstehenden Code so verschlüsselt, dass ein Rückschluss Ihr Namen nicht auftaucht (pseudonymisiert). Für die weitere Bearbeitung, Auswertung und Veröffentlichung werden ausschließlich verschlüsselte Daten verwendet. Bei Bedarf ist eine Rückführung der Daten mithilfe einer Patientenliste möglich. Diese Liste wird getrennt von den Fragebögen aufbewahrt und ist nur dem Studienärzten zugänglich. Sie können zu einem späteren Zeitpunkt ohne Begründung verlangen, dass der Fragebogen vernichtet wird. Dies ist allerdings nur bis zu dem Zeitpunkt möglich, an dem die Daten vollständig anonymisiert werden.

Verschlüsselungs-Code (wird von uns ausgefüllt) _____

Universitätsklinikum Tübingen
Anstalt des öffentlichen Rechts
Sitz Tübingen
Geissweg 3 • 72076 Tübingen
Tel. 07071/29-0
www.medizin.uni-tuebingen.de
Steuer-Nr. 86156/09402
USt-ID: DE 146 889 674

Aufsichtsrat
Dr. Simone Schwanitz (Vorsitzende)
Vorstand
Prof. Dr. Michael Bamberg (Vorsitzender)
Gabriele Sonntag (Stellv. Vorsitzende)
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth
Jana Luntz

Baden-Württembergische Bank Stuttgart
BLZ 600 501 01 Konto-Nr. 7477 5037 93
IBAN: DE41 6005 0101 7477 5037 93
SWIFT-Nr.: SOLADEST
Kreissparkasse Tübingen
BLZ 641 500 20 Konto-Nr. 14 144
IBAN: DE79 6415 0020 0000 0141 44
SWIFT-Nr.: SOLADES1TUB

Seite 1 von 2

Universitätsklinik
für Kinder- und
Jugendmedizin

**Abt. Kinderheilkunde I
mit Poliklinik**
Allgemeine Pädiatrie,
Hämatologie und Onkologie
Prof. Dr. Rupert Handgretinger
Ärztlicher Direktor



Geschäftsleitung
Prof. Dr. med. R. Handgretinger
Stephanie Flich, MBA

Dr. med. Martin Ebinger
Oberarzt
Tel. 07071-29-83781
Fax 07071-29- 4713
martin.ebinger@med.uni-tuebingen.de

Datum:



Universitätsklinik
für Kinder- und
Jugendmedizin

Fragebogen

Hatten Sie einen Rückfall der Langerhans-Zell-Histiozytose?

- Nein
 Ja, im Jahr _____

Haben Sie Folgeschäden durch die Langerhans-Zell-Histiozytose?

- Nein
 Ja
- | | |
|---|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Diabetes insipidus (Zuckererkrankung), | Aufgetreten: _____ |
| <input type="checkbox"/> Wachstumshormon-Mangel (GH-Mangel) | Aufgetreten: _____ |
| <input type="checkbox"/> andere hormonelle Erkrankung/en: | Aufgetreten: _____ (Jahr) |
-
- | | |
|---|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Orthopädische Probleme | Aufgetreten: _____ |
| <input type="checkbox"/> Zahnausfall | Aufgetreten: _____ |
| <input type="checkbox"/> Andere Folgeerscheinungen: | Aufgetreten: _____ (Jahr) |

Ist bei Ihnen eine Krebserkrankung aufgetreten?

- Nein
 Ja
- | | |
|---|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Hautkrebs | Aufgetreten: _____ (Jahr) |
| <input type="checkbox"/> Augentumor (Retinoblastom) | |
| <input type="checkbox"/> Sarkom / Knochenkrebs | |
| <input type="checkbox"/> Leukämie: (genaue Bezeichnung) _____ | |
| <input type="checkbox"/> Lymphdrüsenkrebs/Lymphom: (genaue Bezeichnung) _____ | |
| <input type="checkbox"/> Andere Krebsarten: | |

Haben Sie direkte Familienangehörige (Eltern, Geschwister, Kinder) mit einer Krebserkrankung?

- Nein
 Ja
- | | | |
|--|--------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Mutter / Vater: _____ | im Alter von ca. _____ | Jahren aufgetreten |
| <input type="checkbox"/> Geschwister: _____ | im Alter von ca. _____ | Jahren aufgetreten |
| <input type="checkbox"/> Kinder: _____ | im Alter von ca. _____ | Jahren aufgetreten |
| <input type="checkbox"/> _____ | (Art/Name der Tumorerkrankung) | im Alter von ca. _____ (Alter) Jahren aufgetreten |

(wird aus datenschutzrechtlichen Gründen von uns abgetrennt)

Name (bitte lesbar)

Unterschrift

Datum

Herzlichen Dank für Ihre Unterstützung!

Radiologische Diagnostik

| | | Anzahl | Anzahl als Spalten% |
|------------|---|--------|------------------------|
| Diagnostik | Keine | 0 | 0,0% |
| | Schädel-Sonographie | 1 | 1,8% |
| | Abdomen Sonographie | 2 | 3,6% |
| | MRT | 1 | 1,8% |
| | CT | 0 | 0,0% |
| | Sonographie und CT | 2 | 3,6% |
| | Sonographie und MRT | 7 | 12,7% |
| | MRT und CT | 7 | 12,7% |
| | MRT und Röntgen | 1 | 1,8% |
| | Sonographie, Röntgen und Szintigraphie | 9 | 16,4% |
| | Sonographie und Szintigraphie und CT oder MRT | 22 | 40,0% |
| | Sonographie und Röntgen | 3 | 5,5% |

Analyse möglicher Risikofaktoren für den Verlauf der LCH

Laborparameter

| Laborparameter | Anzahl | Relativer Anteil in % der Gesamtzahl |
|---------------------------|--------|---|
| erhöhtes GOT | 2/25 | 5,7% |
| erhöhtes GPT | 2/34 | 5,9% |
| erhöhtes Gesamt-Bilirubin | 1/21 | 4,8% |
| erhöhtes Kreatinin | 1/24 | 4,2% |
| erhöhte BSG | 6/10 | 60,0% |
| erhöhtes CRP | 15/30 | 50,0% |
| erhöhte LDH | 4/26 | 15,4% |
| verminderte LDH | 1/26 | 3,8% |
| erhöhtes Ferritin | 0/5 | 0,0% |
| erhöhtes Hämoglobin | 0/41 | 0,0% |
| vermindertes Hämoglobin | 5/41 | 12,2% |
| erhöhte Erythrozyten | 1/39 | 2,6% |
| verminderte Erythrozyten | 3/39 | 7,7% |

| | | |
|--------------------------|-------|-------|
| erhöhtes MCV | 0/39 | 0,0% |
| vermindertes MCV | 12/39 | 30,8% |
| erhöhte Thrombozyten | 27/40 | 67,5% |
| verminderte Thrombozyten | 1/40 | 2,5% |
| erhöhte Leukozyten | 3/40 | 7,5% |
| verminderte Leukozyten | 3/40 | 7,5% |
| erhöhte Neutrophile | 2/38 | 5,3% |
| verminderte Neutrophile | 3/38 | 7,9% |
| erhöhte Eosinophile | 5/38 | 13,2% |
| erhöhte Lymphozyten | 0/38 | 0,0% |
| verminderte Lymphozyten | 2/38 | 5,3% |

Verarbeitete Fälle

| | Fälle | | | | | |
|-----------------------------|--------|---------|---------|---------|--------|---------|
| | Gültig | | Fehlend | | Gesamt | |
| | N | Prozent | N | Prozent | N | Prozent |
| Stadium * GOT hoch | 35 | 63,6% | 20 | 36,4% | 55 | 100,0% |
| Stadium * GPT hoch | 34 | 61,8% | 21 | 38,2% | 55 | 100,0% |
| Stadium * CRP hoch | 30 | 54,5% | 25 | 45,5% | 55 | 100,0% |
| Stadium * HB tief | 41 | 74,5% | 14 | 25,5% | 55 | 100,0% |
| Stadium * Erythrozyten tief | 39 | 70,9% | 16 | 29,1% | 55 | 100,0% |

Kreuztabelle

Anzahl

| | GOT hoch | | Gesamt |
|------------------------|----------|------|--------|
| | ,00 | 1,00 | |
| Stadium monosystemisch | 24 | 0 | 24 |
| multisystemisch | 9 | 2 | 11 |
| Gesamt | 33 | 2 | 35 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2-seitig) | Exakte Signifikanz (1-seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 4,628 ^a | 1 | ,031 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 1,869 | 1 | ,172 | | |
| Likelihood-Quotient | 4,901 | 1 | ,027 | | |

| | | | | | |
|------------------------------------|-------|---|------|------|------|
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,092 | ,092 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 4,496 | 1 | ,034 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 35 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,63.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Kreuztabelle

Anzahl

| | | GPT hoch | | Gesamt |
|---------|-----------------|----------|---|--------|
| | | 0 | 1 | |
| Stadium | monosystemisch | 23 | 0 | 23 |
| | multisystemisch | 9 | 2 | 11 |
| Gesamt | | 32 | 2 | 34 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 4,443 ^a | 1 | ,035 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 1,766 | 1 | ,184 | | |
| Likelihood-Quotient | 4,782 | 1 | ,029 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,098 | ,098 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 4,312 | 1 | ,038 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 34 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,65.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Kreuztabelle

Anzahl

| | | CRP hoch | | Gesamt |
|---------|-----------------|----------|----|--------|
| | | 0 | 1 | |
| Stadium | monosystemisch | 14 | 8 | 22 |
| | multisystemisch | 1 | 7 | 8 |
| Gesamt | | 15 | 15 | 30 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2-seitig) | Exakte Signifikanz (1-seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 6,136 ^a | 1 | ,013 | ,035 | ,018 |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 4,261 | 1 | ,039 | | |
| Likelihood-Quotient | 6,719 | 1 | ,010 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | | |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 5,932 | 1 | ,015 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 30 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Kreuztabelle

Anzahl

| | | HB tief | | Gesamt |
|---------|-----------------|---------|---|--------|
| | | 0 | 1 | |
| Stadium | monosystemisch | 29 | 0 | 29 |
| | multisystemisch | 7 | 5 | 12 |
| Gesamt | | 36 | 5 | 41 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2-seitig) | Exakte Signifikanz (1-seitig) |
|------------------------------------|---------------------|----|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 13,762 ^a | 1 | ,000 | ,001 | ,001 |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 10,145 | 1 | ,001 | | |
| Likelihood-Quotient | 14,105 | 1 | ,000 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | | |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 13,426 | 1 | ,000 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 41 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,46.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Kreuztabelle

Anzahl

| | | Erythrozyten tief | | Gesamt |
|---------|-----------------|-------------------|---|--------|
| | | 0 | 1 | |
| Stadium | monosystemisch | 27 | 0 | 27 |
| | multisystemisch | 9 | 3 | 12 |
| Gesamt | | 36 | 3 | 39 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 7,312 ^a | 1 | ,007 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 4,215 | 1 | ,040 | | |
| Likelihood-Quotient | 7,657 | 1 | ,006 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,024 | ,024 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 7,125 | 1 | ,008 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 39 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,92.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Kreuztabelle

Anzahl

| | | Eosinophile hoch | | Gesamt |
|----------|------------------------|------------------|---|--------|
| | | 0 | 1 | |
| Rezidive | Keine Rezidive | 17 | 5 | 22 |
| | ein oder mehr Rezidive | 16 | 0 | 16 |
| Gesamt | | 33 | 5 | 38 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 4,187 ^a | 1 | ,041 | ,061 | ,052 |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 2,435 | 1 | ,119 | | |
| Likelihood-Quotient | 6,010 | 1 | ,014 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | | |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 4,077 | 1 | ,043 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 38 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,11.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Kreuztabelle

Anzahl

| | | MCV tief | | Gesamt |
|----------|------------------------|----------|----|--------|
| | | 0 | 1 | |
| Rezidive | Keine Rezidive | 18 | 4 | 22 |
| | ein oder mehr Rezidive | 9 | 8 | 17 |
| Gesamt | | 27 | 12 | 39 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 3,754 ^a | 1 | ,053 | ,082 | ,056 |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 2,521 | 1 | ,112 | | |
| Likelihood-Quotient | 3,775 | 1 | ,052 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | | |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 3,658 | 1 | ,056 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 39 | | | | |

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 5,23.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

*Weitere klinische Risikofaktoren***Rezidive * Stadium Kreuztabelle**

Anzahl

| | | Stadium | | Gesamt |
|----------|------------------------|----------------|-----------------|--------|
| | | monosystemisch | multisystemisch | |
| Rezidive | keine Rezidive | 27 | 7 | 34 |
| | ein oder mehr Rezidive | 10 | 11 | 21 |
| Gesamt | | 37 | 18 | 55 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 5,960 ^a | 1 | ,015 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 4,603 | 1 | ,032 | | |
| Likelihood-Quotient | 5,906 | 1 | ,015 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,020 | ,016 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 5,852 | 1 | ,016 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 55 | | | | |

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,87.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Alter * Stadium

Anzahl

| | | Stadium | | Gesamt |
|-------------------|------------|----------------|-----------------|--------|
| | | monosystemisch | multisystemisch | |
| kleiner 2,0 Jahre | 0-<2 Jahre | 10 | 11 | 21 |
| | >=2 Jahre | 27 | 7 | 34 |
| Gesamt | | 37 | 18 | 55 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2-seitig) | Exakte Signifikanz (1-seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 5,960 ^a | 1 | ,015 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 4,603 | 1 | ,032 | | |
| Likelihood-Quotient | 5,906 | 1 | ,015 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,020 | ,016 |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 5,852 | 1 | ,016 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 55 | | | | |

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,87.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Analyse möglicher klinischer Risikofaktoren für die beschriebenen Spätfolgen der LCH

Alter * Spätfolgen Kreuztabelle

Anzahl

| | | Spätfolgen gesamt | | Gesamt |
|--------|------------------|-------------------|------------|--------|
| | | keine Spätfolgen | Spätfolgen | |
| Alter | 0 bis <2,0 Jahre | 13 | 6 | 19 |
| | ≥2,0 Jahre | 14 | 13 | 27 |
| Gesamt | | 27 | 19 | 46 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2-seitig) | Exakte Signifikanz (1-seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 1,263 ^a | 1 | ,261 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | ,672 | 1 | ,412 | | |
| Likelihood-Quotient | 1,279 | 1 | ,258 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,364 | ,207 |

| | | | | |
|------------------------------------|-------|---|------|--|
| Zusammenhang linear- mit-linear | 1,235 | 1 | ,266 | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 46 | | | |

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 7,85.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Stadium * Spätfolgen gesamt Kreuztabelle

Anzahl

| | | Spätfolgen gesamt | | Gesamt |
|---------|-----------------|---------------------|------------|--------|
| | | keine Spätfolgen | SpätfolgeN | |
| Stadium | monosystemisch | 21 | 10 | 31 |
| | multisystemisch | 6 | 9 | 15 |
| Gesamt | | 27 | 19 | 46 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 3,209 ^a | 1 | ,073 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 2,167 | 1 | ,141 | | |
| Likelihood-Quotient | 3,195 | 1 | ,074 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,111 | ,071 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 3,139 | 1 | ,076 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 46 | | | | |

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,20.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Rezidive * Spätfolgen gesamt Kreuztabelle

Anzahl

| | | Spätfolgen gesamt | | Gesamt |
|----------|------------------------|---------------------|------------|--------|
| | | keine Spätfolgen | SpätfolgeN | |
| Rezidive | keine Rezidive | 21 | 5 | 26 |
| | ein oder mehr Rezidive | 6 | 14 | 20 |

| | | | |
|--------|----|----|----|
| Gesamt | 27 | 19 | 46 |
|--------|----|----|----|

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|---------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 12,018 ^a | 1 | ,001 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 10,015 | 1 | ,002 | | |
| Likelihood-Quotient | 12,480 | 1 | ,000 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,001 | ,001 |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 11,757 | 1 | ,001 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 46 | | | | |

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 8,26.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Kreuztabelle Bestrahlung*Spätfolgen gesamt

Anzahl

| | | Spätfolgen gesamt | | Gesamtsumme |
|-------------|-------------|-------------------|------------|-------------|
| | | keine Spätfolgen | Spätfolgen | |
| Bestrahlung | Keine | 25 | 14 | 39 |
| | Bestrahlung | 2 | 5 | 7 |
| Gesamtsumme | | 27 | 19 | 46 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymp. Sig. (zweiseitig) | Exakte Sig. (zweiseitig) | Exakte Sig. (einseitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Pearson-Chi-Quadrat | 3,090 ^a | 1 | ,079 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 1,799 | 1 | ,180 | | |
| Likelihood-Quotient | 3,075 | 1 | ,080 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,107 | ,091 |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 3,023 | 1 | ,082 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 46 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben die erwartete Anzahl von weniger als 5. Die erwartete Mindestanzahl ist 2,89.

b. Berechnung nur für eine 2x2-Tabelle

Symmetrische Maße

| | | Wert | Asymp. Standardfehler ^a | Näherungsw eise A ^b | Näherungsw eise Sig. |
|----------------------------------|--------------------------|------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Intervall bezüglich Intervall | Pearson-R | ,259 | ,141 | 1,780 | ,082 ^c |
| Ordinal bezüglich Ordinal | Spearman- Korrelation | ,259 | ,141 | 1,780 | ,082 ^c |
| Anzahl der gültigen Fälle | | 46 | | | |

a. Die Nullhypothese wird nicht vorausgesetzt.

b. Unter Annahme der Nullhypothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

c. Basierend auf normaler Approximation.

Korrelation zwischen Alter und Mutationsstatus

Alter * BRAF-Mutationsstatus Kreuztabelle

Anzahl

| | | BRAF | | Gesamt |
|--------|------------|---------|---------|--------|
| | | Wildtyp | Mutante | |
| Alter | 0-<2 Jahre | 3 | 10 | 13 |
| | ≥2 Jahre | 13 | 8 | 21 |
| Gesamt | | 16 | 18 | 34 |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) | Exakte Signifikanz (2- seitig) | Exakte Signifikanz (1- seitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Chi-Quadrat nach Pearson | 4,859 ^a | 1 | ,028 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 3,425 | 1 | ,064 | | |
| Likelihood-Quotient | 5,061 | 1 | ,024 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,039 | ,031 |
| Zusammenhang linear- mit-linear | 4,716 | 1 | ,030 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 34 | | | | |

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,12.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Hautbefall und Mutationen

Kreuztabelle $BRAF^{V600E}$ Haut

Anzahl

| | | Haut | | Gesamtsumme |
|---------------------|----|-----------------|------------|-------------|
| | | Kein Hautbefall | Hautbefall | |
| | | all | all | |
| <i>BRAF</i> Wildtyp | 15 | 1 | 16 | |
| Mutante | 10 | 8 | 18 | |
| Gesamtsumme | 25 | 9 | 34 | |

Chi-Quadrat-Tests

| | Wert | df | Asymp. Sig. (zweiseitig) | Exakte Sig. (zweiseitig) | Exakte Sig. (einseitig) |
|------------------------------------|--------------------|----|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Pearson-Chi-Quadrat | 6,349 ^a | 1 | ,012 | | |
| Kontinuitätskorrektur ^b | 4,538 | 1 | ,033 | | |
| Likelihood-Quotient | 7,087 | 1 | ,008 | | |
| Exakter Test nach Fisher | | | | ,019 | ,014 |
| Zusammenhang linear-mit-linear | 6,162 | 1 | ,013 | | |
| Anzahl der gültigen Fälle | 34 | | | | |

a. 2 Zellen (50,0%) haben die erwartete Anzahl von weniger als 5. Die erwartete Mindestanzahl ist 4,24.

b. Berechnung nur für eine 2x2-Tabelle

Symmetrische Maße

| | | Wert | Asymp. Standardfehler ^a | Näherungsweise A ^b | Näherungsweise Sig. |
|-------------------------------|----------------------|------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Intervall bezüglich Intervall | Pearson-R | ,432 | ,132 | 2,711 | ,011 ^c |
| Ordinal bezüglich Ordinal | Spearman-Korrelation | ,432 | ,132 | 2,711 | ,011 ^c |
| Anzahl der gültigen Fälle | | 34 | | | |

a. Die Nullhypothese wird nicht vorausgesetzt.

b. Unter Annahme der Nullhypothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

c. Basierend auf normaler Approximation.

Rezidive und Mutationen

| | Korrigiert | | | | | |
|------------------------|------------|------------------------|---------------|------------------------|-----------------|------------------------|
| | Wildtyp | | BRAF-Mutation | | MAP2K1-Mutation | |
| | Anzahl | Anzahl der Spalten (%) | Anzahl | Anzahl der Spalten (%) | Anzahl | Anzahl der Spalten (%) |
| keine Rezidive | 5 | 71,4% | 8 | 44,4% | 6 | 66,7% |
| ein oder mehr Rezidive | 2 | 28,6% | 10 | 55,6% | 3 | 33,3% |
| Gesamt | 7 | 100,0% | 18 | 100,0% | 9 | 100,0% |

Korrelation zwischen den einzelnen Mutationen und dem Auftreten von Spätfolgen

| | | Korrigiert | | | | | |
|----------------|------------------|------------|---------------------|---------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| | | Wildtyp | | BRAF-Mutation | | MAP2K1-Mutation | |
| | | Anzahl | Anzahl als Spalten% | Anzahl | Anzahl als Spalten% | Anzahl | Anzahl als Spalten% |
| Spätfolge n | keine Spätfolgen | 4 | 67 % | 9 | 56 % | 2 | 50 % |
| | Spätfolgen | 2 | 33 % | 7 | 44 % | 2 | 50 % |
| | Gesamtsumme | 6 | 100 % | 16 | 100 % | 4 | 100 % |