

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Rainer Schmelzle

Immunhistochemische Untersuchung der L1-Expression bei Neurofibromatose
assoziierten Tumoren unterschiedlicher Entität

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von
Georgios Mistakidis
aus Iserlohn

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich der
Universität Hamburg am:

21. Oktober 2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. M. Heiland

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in

Prof. Dr. med. T. Strate

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in

PD Dr. med. J. Regelsberger

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Definition und Ätiologie der Neurofibromatose | 5 |
| 1.2 | Historischer Hintergrund | 5 |
| 1.3 | Klassifikation und Genetik | 6 |
| 1.4 | Symptome der NF-1 und der NF-2 | 10 |
| 1.4.1 | Café-au-lait-Flecken | 10 |
| 1.4.2 | Neurofibrome | 10 |
| 1.4.3 | Freckling | 12 |
| 1.4.4 | Optikusgliom | 12 |
| 1.4.5 | Lisch-Knötchen | 13 |
| 1.4.6 | Internistische Symptomatik | 13 |
| 1.4.7 | Veränderungen des Skeletts | 13 |
| 1.4.8 | Neurophysiologische Defizite | 15 |
| 1.5 | Differentialdiagnosen der Neurofibromatose | 16 |
| 1.6 | Die Bedeutung der Zelladhäsion beim Aufbau neuronaler Strukturen | 18 |
| 1.7 | Struktureller Bauplan und Funktion von L1 | 18 |
| 1.8 | Struktureller Bauplan und Funktion von CD34 | 20 |
| 1.9 | Struktureller Bauplan und Funktion von S100 | 20 |
| 1.10 | Ziel dieser Arbeit | 21 |
| 2 | Material und Methode | 22 |
| 2.1 | Untersuchungsmaterial | 22 |
| 2.2 | Anfertigen der Paraffinschnitte | 22 |
| 2.3 | Verwendete Reagenzien, Lösungen, Materialien und Geräte für die Immunhistochemie | 23 |
| 2.3.1 | Reagenzien und Lösungen | 23 |
| 2.3.2 | Materialien und Geräte | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.4 | Immunhistochemische Färbeprotokolle für die jeweiligen Antikörper | 25 |
| 2.4.1 | Färbeprotokoll für CD34 im Techmate 500 Plus (DAKO) | 25 |
| 2.4.2 | Programm für Färbeautomaten bei CD34 | 26 |
| 2.4.3 | Färbeprotokoll für L1 im Techmate 500 Plus (DAKO) | 29 |
| 2.4.4 | Programm für Färbeautomaten bei L1 | 30 |
| 2.4.5 | Färbeprotokoll für S100 | 33 |
| 2.4.6 | Programm für Färbeautomaten bei S100 | 34 |
| 2.5 | Befundung der histologischen Präparate | 37 |
| 3 | Ergebnisse | 39 |
| 3.1 | Das gesamte Untersuchungsmaterial | 39 |
| 3.2 | Untersuchungsgruppe 1 mit dermal-diffusen Neurofibromen | 41 |
| 3.2.1 | Immunhistochemische Befunde der Tumorproben dermal-diffuser Neurofibrome | 42 |
| 3.3 | Untersuchungsgruppe 2 mit plexiformen Neurofibromen | 46 |
| 3.3.1 | Immunhistochemische Befunde der Tumorproben plexiformer Neurofibrome | 47 |
| 3.4 | Untersuchungsgruppe 3 mit malignen peripheren Nervscheiden Tumoren | 52 |
| 3.4.1 | Immunhistochemische Befunde der Tumorproben maligner peripherer Nervscheiden Tumoren | 53 |
| 3.5 | Überblick der Untersuchungsergebnisse | 57 |
| 4 | Diskussion | 58 |
| 4.1 | Diskussion der Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungsgruppe | 58 |
| 4.2 | Ausblick | 67 |
| 5 | Zusammenfassung | 69 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 70 |
| 7 | Danksagung | 92 |
| 8 | Lebenslauf | 93 |
| 9 | Erklärung | 95 |

1 Einleitung

1.1 Definition und Ätiologie der Neurofibromatose

Die Neurofibromatose ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die in erster Linie durch ein gutartiges Tumorwachstum gekennzeichnet ist.

Bei der Erkrankung handelt es sich um ein Fehlbildungssyndrom, bei dem alle Keimblätter betroffen sein können. Dabei können häufig mesodermale bzw. ektomesenchymale Strukturen unterentwickelt und ektodermale bzw. neuro-ektodermale Strukturen hyperplastisch sein (Westphal und Koblin 1977). Auf Grund der Annahme, dass es sich dabei um eine Störung der Ausdifferenzierung im Bereich des Neuralleistenmaterials und der aus ihm entstehenden Strukturen handelt, wird bei der Neurofibromatose auch oft von Neurocristopathie gesprochen (Bolande 1974; Mautner et al. 1995). Unter Betrachtung des NF-1 Gens zeigt sich der Wirkmechanismus dieser Fehlbildung.

1.2 Historischer Hintergrund

Akenside beschrieb 1768 einen Patientenfall, bei dem er multiple Hauttumoren bis zur Größe eines Hühnereis an verschiedenen Stellen des Körpers beobachtete. Sie wurden vom Vater vererbt, so seine Darstellung (Akenside 1768). Sobald die Tumoren eine bestimmte Größe erreicht hatten, wurden sie mit einem Rasiermesser entfernt. Tilenius von Tilenau prägte 1793 den Begriff „Molluscum fibrosum“, der die weichen Hautknoten beschreibt (Tilenius von Tilenau 1793). Rudolf Virchow dokumentierte 1847 das Auftreten der Krankheit in drei Generationen (Rudolf Virchow 1847). Zwei Jahre später stellte Smith (1849) als erster eine intraorale Manifestation von Neurofibromen im Bereich der Zunge fest. In seiner feingeweblichen Untersuchung beschrieb er allerdings nicht die nervalen Veränderungen seiner Präparate (Smith 1849). Der Straßburger Pathologe Friedrich Daniel von Recklinghausen brachte 1882 zum ersten Mal die Befunde in Verbindung mit dem Nervensystem (Recklinghausen, von 1882). In einer Festschrift an Rudolf Virchow aus Anlass des 25jährigen Jubiläums des pathologischen Instituts in Berlin berief er sich auf zwei Patientenbeispiele und schlussfolgerte: „Hinsichtlich der Entstehung sind die multiplen, weichen Fibrome der Haut aus Neuromen

entsprossen, also neuromatöse Fibrome oder Neurofibrome“. Preiser und Davenport zeichneten 1918 den genauen Erbgang der Erkrankung nach (Preiser 1918). Der autosomal-dominante Erbgang wurde im Jahr 1951 von Borberg und 1956 von Crowe et al. bestätigt (Borberg 1951; Crowe et al. 1956). Die moderne Molekularbiologie hat noch zahlreiche offene Fragen im Rahmen dieser Erkrankung zu klären.

1.3 Klassifikation und Genetik

Das Krankheitsbild der Neurofibromatose wird an Hand verschiedener Merkmale charakterisiert. Nach (Ricardi 1982) wird sie in acht und nach (Gorlin et al. 1990) in neun verschiedene Formen unterteilt (siehe Tabelle 1). Hierbei handelt es sich um eine klinische Klassifikation.

| Form | Klinische Befunde |
|---------------------------------|--|
| NF I (Morbus Recklinghausen) | siehe Tabelle 2 |
| NF II (Zentrale Form) | Bilaterale Akustikus-Schwanome der Spinalwurzeln und der Hirnnerven, Gliome und Meningeome, subkapsulärer Katarakt, vereinzelt Café-au-lait-Flecken und kutane Neurofibrome, keine Lisch-Knötchen, autosomal-dominant vererbbar |
| NF III (Misch-Form) | Tumoren des ZNS wie bei der NF II, vereinzelt blasse, ggf. sehr große Café-au-lait-Flecken, kutane Neurofibrome speziell auf der Handfläche, keine Optikus-Gliome oder Lisch-Knötchen, bisher ausschließlich Spontanmutationen, schwerer Verlauf, verhindert Fortpflanzung |
| NF IV (Variante Form) | Verschiedene Phänotypen, die nicht genau zu einer anderen Form passen |

| Form | Klinische Befunde |
|-------------------------------------|---|
| NF V (Segmentale Form) | Café-au-lait-Flecken und/oder Freckling, die Neurofibrome befinden sich in einem umschriebenen Areal auf einer Seite des Körpers, ohne die Mittellinie zu überschreiten, meist sporadisch gelegentlich familiär |
| NF VI (Café-au-lait-Form) | Nur Café-au-lait-Flecken, keine Neurofibrome oder Lisch-Knötchen, ggf. in Verbindung mit unspezifischen Befunden, autosomal-dominant |
| NF VII (Late onset Form) | Keine NF typischen Befunde wie Café-au-lait-Flecken oder Lisch-Knötchen, Neurofibrome nicht vor dem 30. Lebensjahr |
| NF-NOS (Not otherwise specified) | Alle Phänotypen, die in diesem Schema nicht genannt werden |
| NF VIII (Gastrointestinale Form) | Neurofibrome, die sich auf den GI Trakt beschränken, erst im Erwachsenenalter symptomatisch, vermutlich autosomal dominant |
| NF IX (Noonan Form) | Sowohl NF-typische Befunde als auch Befunde, die für ein Noonan-Syndrom sprechen |

Tabelle 1: (nach Ricardi 1982 und 1992; NF VIII und IX ergänzt nach Gorlin et al.1990 an Stelle NF-NOS)

Die beiden wichtigsten Formen, die NF-1 und NF-2, sind genetisch voneinander abgrenzbar. Die NF-1, auch als ‚Morbus Recklinghausen‘ bezeichnet, entsteht durch Mutation eines Gens an der pericentromeren Region des Chromosomen 17q. Sie wird autosomal-dominant vererbt. In ca. 50% der Fälle ist eine Neumutation für die Krankheitsentstehung verantwortlich (Packer 2002) – mit variabler Expression und 100% Penetranz (Huson 1989; Korf 1999; Carmi 1999). Sie macht ca. 90% der Erkrankungen aus (Huson 1989) und ist mit einer Inzidenz von ca. 1:3000 (Lammert et al. 2005) eine der häufigsten neurogenetischen Erkrankungen, unabhängig der ethnischen Zugehörigkeit der Patienten (Friedmann 1999; Lynch 2002). Das NF-1 Gen wurde 1990 kloniert und gehört zu den Tumorsupressorgenen. Das Proteinprodukt dieses Gens ist das so genannte Neurofibromin, das eine ähnliche Struktur aufweist wie die Proteine

der GAP-Familie. Dadurch ist das Eingreifen im Bereich des p 21-ras Proto-Onkogens möglich, das unter anderem für Zellwachstum und Differenzierung zuständig ist. Die Differenzierung von Fibroblasten zu Perineuralzellen ist abhängig vom Neurofibromin (Rosenbaum et al. 1995). Somit können sowohl Zellen neuroektodermalen Ursprungs als auch mesenchymalen Ursprungs beeinflusst werden. Allerdings sind bis heute noch nicht alle Einflussfaktoren analysiert.

Für die klinische Erfassung der Diagnose NF-1 können unten aufgeführten Diagnosekriterien von 1988 des National Institutes of Health Consensus Development Conference als Richtlinien sehr hilfreich sein.

Die Diagnose NF-1 gilt klinisch dann als gesichert, wenn mindestens zwei oder mehr der aufgeführten Kriterien verifiziert werden können. Sie treten mit unterschiedlicher Häufigkeit auf und manifestieren sich zunehmend mit steigendem Lebensalter (Friedmann und Ricardi 1999; DeBella et al. 2000).

Diagnosekriterien zur klinischen Erfassung der NF-1 (National Institutes of Health Consensus Development Conference 1988, Gutmann et al. 1997):

- ▶ Sechs oder mehr Café-au-lait-Flecken, die einen Durchmesser von 5 mm vor der Pubertät überschreiten und nach der Pubertät größer als 15 mm sind
- ▶ Axilläre und/oder inguinale hyperpigmentierte Flecken (Freckling)
- ▶ Zwei oder mehr Neurofibrome jeglichen Typs oder ein Neurofibrom des plexiformen Typs
- ▶ Zwei oder mehr Lisch-Knötchen
- ▶ Optikusgliom
- ▶ Charakteristische Knochenanomalien wie z.B. Keilbeinflügeldysplasie, Ausdünnung der kortikalen Schicht langer Knochen, Pseudarthrosen
- ▶ Positive Familienanamnese bei Verwandten ersten Grades hinsichtlich der oben aufgeführten Diagnosekriterien der NF-1

Auch die Neurofibromatose Typ 2 ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Sie weist mit 1:40000 eine deutlich geringere Inzidenz auf als die NF-1. Bis zum Alter

von 60 Jahren zeigt sich eine 100% klinische Manifestation der Erkrankung (Evans et al. 1992). Fast 50% der Erkrankungen entstehen durch Neumutationen (Barker et al. 1987). Das NF-2 Gen liegt auf dem Chromosom 22q12 und wurde von Trofatter et al. 1993 kloniert. Anders als das NF-1 Gen codiert das NF-2 Gen für das Protein Merlin (Schwannomin), dessen Funktion höchstwahrscheinlich darin besteht, Plasmamembranproteine mit dem Zytoskelett zu verknüpfen. Auf Grund dessen könnte ein Defekt im Bereich dieser Struktur zu einer veränderten Zell-zu-Zell Kommunikation und somit zu einem übermäßigen Zellwachstum führen (Lutchman 1996). Auch das NF-2 Gen fungiert als Tumorsuppressorgen (Gusella 1996; Louis 1995). Bei sporadischen Schwannomen und Meningeomen waren erst bei Verlust des zweiten Allels Mutationen im NF-2 Gen zu erkennen (DeVitis 1996; Wellenreuther 1995). Das steht im Einklang mit der „two hit“-Hypothese von Knudson 1971, nach der erst eine Inaktivierung von beiden Allele zu einer Tumorentstehung führt. Der Verlust des ersten Allels ist bei der NF-2 eine Folge von Keimbahnmutation und wird als erster „hit“ bezeichnet. Das zweite Allel geht sowohl bei NF-2 assoziierten Tumoren als auch bei sporadischen Tumoren in der Regel durch eine größere Deletion verloren, die man auch „loss of heterozygosity“ nennt. Diese Reaktion ist der „zweite hit“ in der Tumorgenese. Erst beide „hits“ zusammen führen zur Tumorentstehung. Man kann zwei Typen der NF-2 unterscheiden (Evans et al. 1992), die mit dem Lebensalter beim Auftreten der Erkrankung in Verbindung stehen. Beim Typ Gardner erkranken die Patienten nach dem 25. Lebensjahr und zeigen als einziges Merkmal bilaterale vestibuläre Schwannome (Evans et al. 1992). Beim Typ Wishart erkranken die Patienten vor dem 25. Lebensjahr (Evans et al. 1992). Sie leiden unter verschiedenen Tumoren mit starker Progression und sterben relativ früh. Evans überarbeitete die Diagnosekriterien des National Institutes of Health 1992 für die NF-2.

Überarbeitete Diagnosekriterien des National Institute of Health für die NF-2:

- ▶ Bilaterale vestibuläre Schwannome
- ▶ Positive Familienanamnese bei Verwandten ersten Grades hinsichtlich NF-2, außerdem ein unilaterales vestibuläres Schwannom und eine oder mehrere der folgenden Erscheinungen: Meningeom, Gliom, Neurofibrom, Schwannom, subkapsuläre Katarakte des hinteren Linsenpols, zerebrale Verkalkungen

- ▶ Unilateral vestibuläres Schwannom mit einer oder mehreren der folgenden Erscheinungen: Meningeom, Gliom, Neurofibrom, Schwannom, subkapsuläre Katarakte des hinteren Linsenspols, zerebrale Verkalkungen
- ▶ Zwei oder mehr Meningeome und ein unilaterales vestibuläres Schwannom
- ▶ Zwei oder mehr Meningeome, außerdem eine oder mehrere der folgenden Erscheinungen: Meningeom, Gliom, Neurofibrom, Schwannom, subkapsuläre Katarakte des hinteren Linsenspols, zerebrale Verkalkungen

1.4 Symptome der NF-1 und der NF-2

1.4.1 Café-au-lait-Flecken

Diese Flecken stellen eines der wichtigsten Diagnosekriterien für die NF-1 dar. Im Durchmesser betragen sie 8-30cm, sind scharf begrenzt, einheitlich gefärbt und in der Regel oval. Sie können bei der Geburt vorhanden sein oder sich im Laufe des ersten Lebensjahrs erstmalig zeigen (Ricardi 1992). Gewöhnlich treten sie als erstes Krankheitszeichen auf (Pape 1991). Im Laufe der Kindheit nehmen sie an Größe und Zahl zu und verblassen im Alter (Huson 1992). Die Café-au-lait-Flecken bestehen aus morphologisch veränderten Melanocyten. Charakteristisch sind Riesmelanosomen und Melanin-Makroglobuline, die sich durch Fusion von Melanosomen-Komplexen und Phagolysosomen (Kaufmann et al. 1989) mit Variation in Größe und interner Struktur bilden (Nakawaga et al. 1984).

1.4.2 Neurofibrome

Neurofibrome sind primär gutartige Tumoren, die sowohl vom peri- und endoneuralen Zwischengewebe als auch von Schwannschen Zellen ausgehen. Sie können verschiedene Nerven betreffen: das periphere Nervensystem einschließlich des autonomen Nervensystems, Plexus und Ganglien sowie der Hirnnerven, wobei sie immer bis in die kleinsten Nervenverzweigungen impliziert sind. Wesentliche zelluläre Bestandteile sind Schwannsche Scheidezellen und Fibroblasten, perineurale und endotheliale Zellen, Perizyten und Mastzellen. Neurofibrome nehmen mit fortschreitendem Alter

an Zahl und Größe zu (Gutmann und Collins 1994) und sind für das Kindesalter eher untypisch (Mautner et. al 1995). Man kann langsam wachsende, peripher gelegene kutane und subkutane Neurofibrome von schnell und invasiv wachsenden, plexiformen Neurofibromen unterscheiden. Folgende Neurofibrome lassen sich definieren:

- ▶ **Kutane Neurofibrome:** entstehen meist an kleinsten Nerven aufzweigungen zwischen Epidermis und Dermis. Sie haben eine weiche Konsistenz, variieren stark in ihrer Größe und lassen sich auf der Haut verschieben. Sie sitzen entweder breitbasig auf oder hängen als so genanntes „neurofibroma pendulans“. Sie sind selten schmerzhaft, stellen allerdings eine massive ästhetische Beeinträchtigung dar (Crowe et al 1956; Huson et. al 1988; Riccardi 1992) und zählen mit 94-99% zu den am häufigsten vorkommenden Neurofibromen bei der NF-1.
- ▶ **Subkutane Neurofibrome:** liegen tiefer als kutane, können sehr schmerzhaft sein und Sensibilitätsstörungen, Paresen bis hin zu Paralysen verursachen. Im Gegensatz zu den kutanen Neurofibromen haben sie keine Kapsel (Huson et al. 1988).
- ▶ **Plexiforme Neurofibrome:** treten nur im Zusammenhang mit der Neurofibromatose Typ 1 auf, während kutane und subkutane Neurofibrome auch solitär vorkommen können (Friedrich et al. 1994, 1995, 1998). Sie imponieren als große, subkutane Schwellungen und können durch Infiltration in das angrenzende Gewebe zu massiven Entstellungen der jeweiligen Region führen (Huson 1994). Durch die Hypertrophie der darüberliegenden Gewebe und die enorme Volumenzunahme der Tumoren kann die so genannte Elephantiasis neurofibromatosa entstehen (Crowe et al. 1956; Pape 1991). Oft sind plexiforme Neurofibrome im Gesicht zu beobachten, die sich meist nur auf eine Gesichtshälfte beschränken oder die Mittellinie nur geringfügig überschreiten. Beim Wachstum in der periorbitalen Region kann es zu Facialisparesen kommen (Keutel et al. 1997; Friedrich et al. 1998). Die Manifestation ist meistens im frühen Kindesalter zu beobachten, oft schon im ersten Lebensjahr (Friedrich et al. 1998). Durch das infiltrierende Wachstum ist die Unterscheidung vom gesunden Nachbargewebe äußerst schwierig, was eine chirurgische Intervention erschwert (Keutel et al. 1997; Friedrich et al. 1998). Da die plexiformen Neurofibrome innerhalb eines Nerven wachsen, kommt es zu einer Verlängerung der Faszikel, die sich umein-

ander schlingen. Durch das Wachstum des Tumors bilden sich mehr Schwannzellen und Perineuralzellen, was zu einer Verdickung des Perineuriums durch die kugelig aufgetriebenen Axone führt (Harkin 1986). Auch im Bereich der Augenlider sind plexiforme Neurofibrome zu beobachten. Sie wachsen in die Orbita hinein und können auch die Augenmuskulatur infiltrieren. Das progressive Wachstum kann bis zu Erblindung führen (Keutel et al. 1997; Friedrich et al. 1998). Durch die Verlegung des Kammerwasserabflusses ist auch die Bildung eines Glaukoms möglich. Die Diagnose eines unilateralen Buphthalmus, eines homolateralen plexiformen Neurofibroms des Oberlides und eines unilateral hyperthrophierten Gesichts wird auch als ‚Francois-Syndrom‘ bezeichnet (Francois et al. 1956). Auf Grund der starken Vaskularisierung weisen Neurofibrome eine ähnliche Blutungsneigung wie Hämangiome auf (Mukherji 1974; Littlewood und Stilwell 1983; Sailer et al. 1988). Die maligne Entartung zum MPNST(= Maligner Peripherer Nervscheiden Tumor) liegt nach Ferner und Gutmann (2002) bei ca. 10% der Fälle vor.

1.4.3 Freckling

Hierbei handelt es sich um hyperpigmentierte Flecken, die den Café-au-lait-Flecken ähnlich sehen. Ihr Durchmesser ist jedoch gering und beträgt 1-3 mm. Darüber hinaus treten diese Flecken zu einem späteren Zeitpunkt auf als Café-au-lait-Flecken. Freckling zeigt sich oft am Rumpf und den oberen Extremitäten, insbesondere in Bereichen wie Axilla, Inguinalregion, Oberlid und Nacken (Ricardi 1992). Huson et al. beobachtet den Befall der Axillarregion bei 67% und der Leistenregion bei 44% aller untersuchten Probanden mit nachgewiesener NF.

1.4.4 Optikusgliom

Das Optikusgliom ist ein benigner Tumor, der einem pilozystischen Astrozytom zuzuordnen ist. Es entsteht im Bereich des Nervus opticus in der Regel vor oder im Chiasma opticum (Ricardi 1992). Die Symptome können sehr unterschiedlich sein: Visusverlust, Gesichtsfeldeinschränkung, Strabismus, Optikusatrophie, Exophthalmus,

Kopfschmerzen bis hin zum Nystagmus. Bei Beteiligung des Chiasmas kann es zu Störungen der Hypophyse kommen.

1.4.5 Lisch-Knötchen

Benannt nach Ihrem Entdecker Lisch 1937 werden sie öfter auch als Iris Hämatoeme bezeichnet (Lisch 1937). Es handelt sich um kleine, geschwulstähnliche Fehlbildungen der Iris ohne bedeutenden Krankheitswert. Bei der Spaltlampenuntersuchung imponieren sie als gelbe oder braune, klar begrenzte, kuppelförmige Erhebungen (Bouzas et al. 1993).

1.4.6 Internistische Symptomatik

Da fast jedes Organ im Rahmen einer Neurofibromatose befallen sein kann, liegt auch eine Vielfalt an Symptomen vor. Viscerale Tumoren können gastrointestinale Blutungen, Obstipation oder Flatulenz verursachen (Mautner et al. 1995). Nierenarterienstenosen führen gehäuft zur Hypertonie, auch bei Kindern (Halpern und Currarino 1965; Holt 1978). Desweiteren sieht man bei Erwachsenen häufig ein Phäochromozytom (Huson et al. 1988) und bei Kindern eine erhöhte Leukämie-Inzidenz (Jang et al. 1999). Neurofibromatose Patienten, insbesondere NF-1 Patienten, weisen ein erhöhtes Risiko für maligne Tumoren gemessen an der Normalbevölkerung auf (Riccardi 1992). Durch eine verstärkte Tendenz zu Malignomen und anderen internistischen Manifestationen der Erkrankung ist die Mortalität bei Neurofibromatose Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung höher (Zoller et al. 1995).

1.4.7 Veränderungen des Skeletts

In dem Buch „Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis“ von Riccardi 1992 werden diverse skelettale Veränderungen beschrieben (Riccardi 1992). Knochenveränderungen treten bei 40-70% der Patienten auf (Casselmann et al. 1977). Die häufigsten skelettalen Veränderungen sind im Bereich der Wirbelsäule zu beobachten. Bei 30% der Patienten findet sich eine Skoliose der Wirbelsäule im unteren

Zervikal- und oberen Thorakalbereich (Friedmann und Birch 1997). Eine kurzbogige Kyphoskoliose mit dysplastischen Veränderungen ist typisch für eine NF-1 und kann zu einer Rückenmarksdehnung mit neurologischen Ausfällen führen (Mautner et al. 1995). Schon 1948 haben Holt und Wright skelettale Knochenveränderungen bei der Neurofibromatose festgestellt (Holt et al. 1948). Hierzu gehören:

- ▶ Erosive Knochendefekte in der Nachbarschaft von Neurofibromen
- ▶ Skoliose
- ▶ Kongenitale Anomalien
- ▶ Extreme Bewegungen (Verbiegungen) und Pseudoarthrosen der unteren Extremitäten
- ▶ Wachstumsstörungen (Über- bzw. Unterentwicklung) einzelner Knochen
- ▶ Zystische Veränderungen (intraossär)

Diese Transformationen/Symptome wurden im Laufe der Jahre genauer erforscht und in ihren Mechanismen näher beschrieben. Veränderungen im Bereich des Schädels betreffen in erster Linie das Versorgungsgebiet des N. trigeminus (Goetsch 1955). Riccardi (1992) unterscheidet hierbei zwei verschiedene Ausprägungsformen: zum einen das Versorgungsgebiet des zweiten Trigeminasastes, d.h. die orbitale und periorbitale Region; zum anderen das Versorgungsgebiet des dritten Astes, d.h. die bukkale, oropharyngeale und retropharyngeale Region. Zu den häufigsten Veränderungen zählen Knochenusuren und Defekte am Boden und an der Seitenwand der vorderen und mittleren Schädelgrube, an der Orbita und am Jochbein sowie im Kieferbereich (Sailer et al. 1988, Giese 1995, Friedrich et al. 1995, 1998). Als bekannteste und pathognomisch geltende Veränderung wird die Keilbeindysplasie herausgestellt (Tänzer 1966). Eine Keilbeindysplasie wurde nach Zanella (1984) bei ca. 7% der Erkrankten nachgewiesen. Dabei kann es sowohl zur einseitigen als auch doppelseitigen Aplasie des kleinen und großen Keilbeinflügels kommen (Michel 1988; Di Mario 1993). Oft wird diese Veränderung von einer Erweiterung der Sella turcica begleitet, die allerdings zu keinen pathologischen Veränderungen der Hypophyse führt (Winkelbauer 1927, Holt und Wright 1948, Tänzer 1966). Aufgrund von fehlenden Anteilen des Keilbeinflügels und Defekten der Orbita kann es zur Fortleitung von Pulsationen aus dem Stirnhirn-Areal

kommen. Diese Pulsationen können auf den Augapfel übertragen werden, so dass der Eindruck eines Exophthalmus Pulsans entsteht, der auch eine Karotis-Sinus-Cavernosus-Fistel vortäuschen kann (Rockliffe und Parson 1904, Lewald 1933, Kleinsasser und Brandt 1953). Veränderungen im Umfeld der Kalotte treten meistens im Bereich der Lambdanaht auf (Di Mario 1993). Auch Hyperostosen und Makrozephalie bei Kindern wurden beobachtet (Di Mario 1993, Szudek et al. 2000). Modifikationen im Kieferbereich werden in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. Eine genaue Aufarbeitung der Publikationen von 1891 bis 1994 findet sich in der Dissertationsschrift von Giese 1995. Es kommt zu Veränderungen der Kiefer und der Zahnstellung bei Neurofibromatose Typ I. Anomalien im Bereich der Kiefer und der Zahnstellung werden bei ca. 77% der Patienten beschrieben. Dazu gehören aufgetriebene Alveolarfortsätze, verkürzte Zahnbögen, retinierte oder nicht angelegte Zähne, hohe, spitz zulaufende Gaumen sowie eine Verschiebung der raphe palatina zur gesunden Seite (Giese und Friedrich et al. 1995). Auch eine Veränderung der Zahnhartsubstanz sowie eine erhöhte Karies-Inzidenz konnten beobachtet werden (Lohoff 1930, Rappaport 1953, Klammt 1966). Perineurale fibröse Auftreibungen innerhalb der Pulpa werden von Curtin und McCarthy 1997 definiert.

1.4.8 Neurophysiologische Defizite

Bei Neurofibromatose-Patienten, insbesondere bei NF-1, lassen sich neurophysiologische Defizite feststellen. Zoller et al. (1997) sprechen von dieser Symptomatik bei 40-45 % der Erkrankten. Ein typisches Defizit ist ein reduzierter IQ im Vergleich zur Normalbevölkerung. Zudem werden Probleme in folgenden Kompetenzen beobachtet:

- ▶ Visuelle Wahrnehmung
- ▶ Räumliches Vorstellungsvermögen
- ▶ Einschränkung des abstrakten Denkens und der geistigen Flexibilität

Diese Beeinträchtigungen lassen sich durch gezieltes Training verbessern, wie Lernversuche an Mäusen gezeigt haben (Silva et al. 1997). Die Mechanismen der Lernstörung sind als solche noch nicht ganz verstanden. Man vermutet allerdings Zusammenhänge zwischen Neurofibromin und Neurotrophin im Hippocampus (Vogel et al. 1995) sowie

Veränderungen des Kalium-Haushaltes (Zhong et al. 1995). Andere Veränderungen auf molekularer Ebene werden ebenfalls diskutiert. Selbst pathologische Veränderungen des Gehirns durch Proliferation einzelner Zelltypen werden für die Ursachen in Erwägung gezogen.

1.5 Differentialdiagnosen der Neurofibromatose

- ▶ **Autosomal-dominante, multiple Café-au-lait-Flecken:** Auch familiäre Café-au-lait-Flecken‘ genannt; Untersuchungen haben gezeigt, dass bei dieser Erkrankung die Ursache nicht an den NF-Genen zu finden ist (Charrow et al. 1993). Abeliovich weist jedoch eine enge Korrelation zu den NF-Genen nach und bezeichnet diese autosomal-dominanten, multiplen Café-au-lait-Flecken als allelische Variante der Neurofibromatose (Abeliovich et al. 1995).
- ▶ **Noonan-Syndrom:** Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang. Die klassischen Symptome dieser Erkrankung sind zumeist: Hypertelorismus, nach unten und außen geneigte Lidachsen, Ptosis, tiefsitzende Ohren, Ohrmuschelanomalien, Kleinwuchs, Pterygium colli und angeborene Herzfehler. Das Noonan-Syndrom hat eine Prävalenz von 1:1000 und tritt in 20% der Fälle familiär auf. Das klinische Erscheinungsbild ist sehr variabel (Viskochil et al. 1994). Ähnlich wie bei den familiären Café-au-lait-Flecken zeigen unterschiedliche Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse (Viskochil et al. 1994, Ahlboom et al. 1995, Bahau et al. 1996).
- ▶ **Watson-Syndrom:** Auch hierbei handelt es sich um eine autosomal-dominante Erbkrankheit. Watson beschreibt 1967 die typischen Symptome: Pulmonalklappenstenose, Café-au-lait-Flecken und verminderte Intelligenz. Außerdem ließen sich in einigen Fällen Lisch-Knötchen, Makrozephalie und Neurofibrome feststellen (Allanson et al. 1991). Auf dem Chromosom 17 konnten die für das Watson-Syndrom zuständigen Mutationen aufgezeigt nachgewiesen werden (Tassabehji et al. 1993).
- ▶ **McCune-Albright-Syndrom:** McCune, Albright, Bruch und seine Mitarbeiter beschreiben 1937 unabhängig voneinander das heute nach ihnen benann-

te Syndrom. Charakteristisch hierfür sind: polyostotische, fibröse Dysplasien, Café-au-lait-Flecken und zahlreiche endokrine Hyperfunktionen. Grund ist eine postzygotische, somatische Mosaik-Mutation, die die Funktion von G-Proteinen (cAMP) beeinflusst, die als second messenger eine wichtige Rolle im Hormonhaushalt spielen (Tinschert et al. 1999).

- ▶ **Leopard-Syndrom:** Auch hier liegt eine Erkrankung mit einem autosomal-dominanten Erbgang vor. Die Ätiologie ist noch unklar. Möglicherweise bedingt eine Mutation des NF-1 Gens einen atypischen Phänotyp in Bezug zur Neurofibromatose Typ 1 (Wu Rina et al. 1996). LEOPARD steht als Abkürzung für folgende Symptome: Linsenflecken (dunkle, linsenförmige Flecken auf der Haut), EKG Veränderungen, okulärer Hypertelorismus (Teil einer kraniofazialen Dysmorphie), Pulmonalstenose, Abnormalitäten der Genitalien, Retardierung des Wachstums und Taubheit (Deafness).

- ▶ **Multiple Lipomatose:** Hier lassen sich zwei Arten der Lipomatose unterscheiden: 1.) Die familiäre, multiple Lipomatose – eine gutartige Störung der Fettgewebsregulation, die auch mit einer Hyperlipidämie einhergehen kann; 2.) Die multiple, symmetrische Lipomatose, die gehäuft bei Alkoholabhängigen auftritt und oft in Verbindung mit Polyneuropathien und ZNS Funktionsstörungen zu verzeichnen ist (Naumann et al. 1995). Als Ursache werden Dysfunktionen der Mitochondrien erwogen (Klopstock et al. 1994). Typisch bei dieser Erkrankung ist das Vorkommen von Lipomen im Nacken und Schulterbereich (Wilson et Boland 1994).

- ▶ **Proteus-Syndrom:** Das Proteus-Syndrom charakterisiert sich wie folgt: Hyperplasie unterschiedlicher Gewebe, asymmetrische Vergrößerung der Extremitäten – häufig der Finger (Makrodaktylie) – große lipomatöse Tumoren, epidermale Naevi, Gefäßnaevi und gyriforme Hyperplasien der Fußsohlen und Handinnenflächen (Clark 1994).

1.6 Die Bedeutung der Zelladhäsion beim Aufbau neuronaler Strukturen

Seit über hundert Jahren wird der Frage nach Rezeptoren an der Zelloberfläche nachgegangen. Bei einfachen Experimenten in der Kulturschale beobachtete Wilson 1907 eine Aggregatbildung identischer Zelltypen (Wilson 1907). Bestätigt wurde seine auf dieser Beobachtung fußende Hypothese anhand dissoziierter Vertebratenzellen aus Embryonalgewebe verschiedenen Ursprungs. Ein Durchmischen dieser Zellen *in vitro* führte zur Reaggregation einzelner Zelltypen desselben Herkunftsgewebes (Townes 1955). Eine exakt aufeinander abgestimmte Zelladhäsion bildete die Grundlage für die Entstehung funktioneller Strukturen. Die funktionelle Bedeutung neuronaler Zelladhäsionsmoleküle beinhaltet allerdings weit mehr als das bloße „Aneinanderhaften“ komplementärer Zellen. So kann die Expression dieser Proteine durchaus einen gegenteiligen Effekt bewirken und als repulsives Signal die Abstoßung angrenzender Zellen vermitteln (Gotz et al. 1996). Zelladhäsionsmoleküle stellen den Informationsaustausch zwischen extra- und intrazellulärem Milieu her. Über die Induktion von second messenger-Systemen werden die Signale in das Zellinnere geleitet, was zu einer Neuorganisation des Cytoskeletts oder einer veränderten Genexpression führt (Crossin et Krushel 2000; Suter et al. 1998). Da ein Molekül je nach vorliegenden Bedingungen und Anforderungen sowohl adhäsive als auch repulsive Eigenschaften haben kann, ist die Bezeichnung Zelladhäsionsmolekül durch Zellerkennungsmolekül zu ersetzen. Um die L1 Expression bei Neurofibromatose assoziierten Tumoren rekapitulieren zu können, werden die Schwannschen Zellen mit S100 angefärbt. So ist nachzuvollziehen, ob sie daran beteiligt sind und welche Zellen diese Färbung ausmachen. Damit ausgeschlossen werden kann, dass Fibroblasten an der L1 Expression beteiligt sind, wird CD 34 als Standardfärbung eingesetzt.

1.7 Struktureller Bauplan und Funktion von L1

Das Zellerkennungsmolekül L1 gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie (Moos et al. 1988) und beteiligt sich an der Regulation diverser Zellerkennungsmechanismen im zentralen und peripheren Nervensystem (Kowitz et al. 1993; Martini 1994). Es besitzt ein N-terminales Ende und sechs Ig-Domänen, gefolgt von vier bis fünf Fibronektin-

Domänen und einer Transmembran-Domäne. Es weist ein spezifisches Gewicht von ca. 200-240 kDa auf. An die transmembranöse Domäne schließt sich eine kurze, phylogenetisch konservierte, zytoplasmatische Domäne an (Fransen et al. 1997; Kujat et al. 1995; Thor et al. 1985). Intrazellulär besitzen Mitglieder der L1-Familie die höchste Homologie und weisen eine Reihe potentieller Phosphorylierungsstellen auf, die Angriffspunkte für verschiedene Proteinkinasen sind (Kamiguchi & Lemmon 2000). Der Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsstatus hoch konservierter Tyrosinreste bestimmt maßgeblich das Trafficking von L1-Familienmitgliedern an der Zellmembran (YRSL-Motiv) sowie ihre Verbindung zum Cytoskelett (FIGQY-Motiv), was zu einer Beeinflussung der extrazellulären Bindungseigenschaften führen kann (Garver et al. 1997; Tuvia et al. 1997). Signale an der Zelloberfläche können somit über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden transzelluläre Kontakte modulieren und eine dynamische Zelladhäsion als Grundlage plastischer Prozesse ermöglichen (Schäfer et al. 2002; Schmidt et al. 2000). Gestützt wird dieses Modell durch eine Anreicherung FIGQY-phosphorylierter Proteine in Regionen migrierender sowie spezialisierter Zell-zu-Zell-Kontakte (Jenkins et al. 2001). Neben der RSLE-Sequenz ist eine Ankyrin-bindende Region innerhalb der cytoplasmatischen Domäne zu konstatieren. L1 vermittelt sowohl homotypische als auch heterotypische Zelladhäsion (Kadmon et al. 1990; Blaess et al. 1998; Grumet et al. 1993). In der Literatur wird das L1 auch als sialinsäurebindendes Lektin (Siglec) beschrieben. Die Siglec-Domäne liegt in der ersten fibronectinähnlichen Sequenz des Moleküls und bindet spezifisch an α -2,3 Sialinsäure (Kleene et al. 2001). Auch das L2/HNK1, ein Kohlenhydratepitop auf dem L1, kann direkte Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktionen vermitteln (Chou et al. 1986). Auch in anderen Gewebearten konnte L1 nachgewiesen werden: in Lymphknoten, Granulozyten und Epithelzellen des Intestinal- und Urogenitaltraktes (Kujat et al. 1995; Allory et al. 2005; Kaifi et al. 2006). Mitglieder der L1-Familie sind maßgeblich an Migration, Neuritenwachstum, Faszikulierung und Zellerkennungsprozessen beteiligt. Bei Ovarial- und Endometriumkarzinomen kann L1 sogar als Progressionsmarker angesehen werden (Fogel et al. 2004).

1.8 Struktureller Bauplan und Funktion von CD34

Hierbei handelt es sich um ein einkettiges Transmembranprotein/Glykoprotein-Antigen mit ca. 116 kDa. Es wird aus unreifen hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen, kapillären Endothelzellen, embryonalen Fibroblasten und vereinzelt Gliazellen im Nervengewebe exprimiert (Nishio et al. 1997; Kraus et al. 1996). CD34 ist der erste Marker für koloniebildende Zellen im Knochenmark, dessen Expression mit der Reifung ständig abnimmt (Civin et al. 1990). Das Molekül ist in seinem N-terminalen, extrazellulären Bereich stark glykosyliert und Neuraminidase sensitiv (Angriffspunkt für Klasse I Antikörper). Diesem Bereich folgt eine globuläre (Cys-reiche) Domäne. Der cytoplasmatische Teil des Moleküls enthält Anteile für Tyrosin-Phosphorylierung durch Proteinkinase C (Krause et al. 1996). Monoklonale Antikörper gegen CD34 lassen sich in drei Hauptklassen einteilen, die durch die differentielle Empfindlichkeit der entsprechenden CD34-Epitope auf den Abbau durch spezifische Enzyme definiert werden.

1.9 Struktureller Bauplan und Funktion von S100

S100 ist das calciumbindende Protein einer Multigenfamilie mit einem niedrigen molekularen Gewicht von ca. 20 kDa, das von Moore 1965 erstmals isoliert wurde (Moore 1965). Die Familie besteht aus 19 Mitgliedern, die von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. Die Hauptkomponenten des S100 sind das S100A und das S100B. S100A weist 93 Aminosäuren auf und S100B 91, wobei 54 Aminosäuren in ihrer Sequenz bei beiden identisch sind (Isobo et al. 1978 und 1981). Zunächst wurde S 100 als spezifisches Protein für Nervengewebe angesehen. Es zeigte sich jedoch, dass S100B in großen Anteilen in Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems, in Melanozyten, Chondrozyten, Adipozyten, in Tumorzellen und in Unterpopulationen von Neuronen zu finden ist. Dagegen lässt sich das S100A umfangreich in Kardio-Myozyten, leicht zuckenden Skelett-Muskelzellen, glatten Muskelzellen, epithelialen Speicheldrüsenzellen, in renalen Zellen und auch in Fibroblasten nachweisen. Die Mitglieder der S100-Familie regulieren calciumabhängig eine Vielzahl von intrazellulären Aktivitäten, z.B. Proteinphosphorylierung, Zellproliferation und Differenzierung einschließlich neoplastischer Transformation (Donato 1999). In der Regel liegt S100 im Zytoplas-

ma der Zellen, in einigen Zellen auch in der Kernmatrix vor. Funktionell bedeutsam ist die Fähigkeit zur reversiblen Kalziumbindung (Kahn et al 1983). S100 spielt ferner eine Rolle im Zellwachstum – eventuell als Wachstumsregulator. Darüber hinaus hat es Einfluss auf die Membranpermeabilität für Kationen sowie auf die Aktivität der RNA-Polymerase. In den Adipocyten kann es sogar als Carrier-Protein für freie Fettsäuren wirken.

1.10 Ziel dieser Arbeit

Wie schon eingehend erläutert, besitzt das L1 vielfältige Aufgaben. Sein Expressionsverhalten wurde schon in vielen Studien für diverse Gewebearten dargestellt.

Bei der Neurofibromatose handelt es sich um eine genetisch bedingte Erkrankung des peripheren Nervensystems, die überwiegend durch benignes Tumorwachstum gekennzeichnet ist. Allerdings kann es auch zu einer malignen Entartung, dem so genannten MPNST kommen, was sehr häufig zum Tod führt. Die L1-Expression wurde für Neurofibromatose assoziierte Tumoren noch nicht untersucht. Vor diesem Hintergrund sollen im Rahmen einer immunhistochemischen Untersuchung folgende Fragen beantwortet werden:

- ▶ Wird L1 exprimiert? Wenn ja: Gibt es mögliche Unterschiede im Expressionsmuster, der verschiedenen Neurofibromatose assoziierten Tumoren
- ▶ Wie ist das Expressionsverhalten von Neurofibromen unterschiedlicher Entität zu bewerten?
- ▶ Kann man eventuell anhand der unterschiedlichen Expressionsmuster einen Progressionsmarker bei Neurofibromatose assoziierten Tumoren ableiten?
- ▶ CD34 als Standardmarker für Endothelzellen und Fibroblasten
- ▶ S100 als Marker der Schwannschen Zellen, um evaluieren zu können, welche Zellanteile L1 exprimieren

2 Material und Methode

2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurden in Paraffin eingebettete Neurofibrome unterschiedlicher Entität untersucht. Insgesamt wurden 60 Tumorproben mit jeweils vier Schnitten auf Superfrost-Objektträger angefertigt. Alle Präparate stammen von Patienten mit der Diagnose NF-1, die in der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Nordwestdeutsche Kieferklinik) im Kopf- und Hautzentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf operiert wurden. Insgesamt wurden 36 Paraffinblöcke im Jahr 2006 angefertigt, 15 Paraffinblöcke im Jahr 2005, sechs Paraffinblöcke im Jahr 2004, jeweils ein Paraffinblock in den Jahren 2003 und 2001, und ein weiterer 1997. Insgesamt liegen zur immunhistochemischen Untersuchung 20 dermal-diffuse Neurofibrome, 23 plexiforme Neurofibrome und weitere 17 maligne periphere Nervscheiden Tumoren (MPNST) vor.

Für die Routinediagnostik wurde das Tumorgewebe im Institut für Neuropathologie in Paraffin eingebettet. Anhand histologischer Präparate erfolgte die Befundung. Immunhistochemisch wurden alle Fälle routinemäßig auf die Expression von S100 und CD34 untersucht.

Zum Zweck einer Negativkontrolle kontrastierte man die Ergebnisse mit einer internen immunhistochemischen Studie des Institutes für Pathologie am UKE (Direktor: Prof. Sauter). Auf Tissue-Micro-Arrays wurden 3000 Prostata Karzinome mit L1 gefärbt. L1 positiv zeigten sich die prostatistischen Nerven im Prostata Karzinom. Das Prostata Karzinom selbst konnte nicht L1 gefärbt werden. Eine erneute Negativkontrolle erfolgte hier durch Anfärben des Prostatagewebes ohne Primärantikörper.

2.2 Anfertigen der Paraffinschnitte

Die Gewebsschnitte wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom 2-4 µm Schnitte angefertigt, die auf Superfrost-Objektträger aufgebracht wurden. Die Objektträger wurden bei 60 ° C über Nacht im Brutschrank getrocknet. Nach dem Trocknungsvor-

gang wurden die angefertigten Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe für die folgenden immunhistochemischen Schritte rehydriert.

2.3 Verwendete Reagenzien, Lösungen, Materialien und Geräte für die Immunhistochemie

2.3.1 Reagenzien und Lösungen

- ▶ Xylol (J.T. Baker 8118)
- ▶ Alkohol
- ▶ Pufferlösung pH 9,0 Target Retrieval Solution (DAKO S2367 10fach konzentriert)
- ▶ Tris-ETDA-Puffer (selbst angesetzt): Ansetzen der Stammlösung 20fach (1:20):Trizma base (Sigma T 1503-1kg) = 5,0 g plus EDTA (Merck 1.08418.0250) = 10,0 g plus Tri Natrium-Citrat (Sigma C 0909-100g) = 6,4, g mit 1 mol HCL auf pH 7,8 einstellen
- ▶ Ansetzen der Gebrauchslösung: 50 ml TEC 20fach + 950ml A.dest
- ▶ Proteinase K (DAKO S2019) im Verdünnungsmedium Atibody-Diluent-Solution (DAKO S2019; Proteinase 40fach konzentriert)
- ▶ H₂O₂ Peroxidase-Blocking-Solution (DAKO S2023)
- ▶ Antikörper Polyclonal Rabbit Anti-S100 (DAKO Z0311) 1:1000 im Verdünnungsmedium (DAKO S2022)
- ▶ Antikörper Monoclonal Mouse Anti-Human CD34 (DAKO M7165) 1.25 im Verdünnungsmedium (DAKO S2022)
- ▶ Antikörper L1 Mouse 1:150 (Neomarkers MS770P) in Verdünnungsmedium (DAKO S2022)

- ▶ TBS Spülpuffer TRIS-NaCl-Puffer pH 7,6/7,4 insgesamt 2 Liter: Trizma base (Sigma T 1503) = 12,1g plus 17,5 g NaCl (J.T. Baker) plus 90ml 1 n HCL (Merck Art.1.09057) plus 1910ml Aqua dest
- ▶ TBST-Puffer Stammlösung 1 Liter 10fach (1+10), die im Gerät Techmate 500 plus vorliegt: Trizma base (Sigma T1503-1kg) = 60,57g plus NaCl (J.T. Baker) = 87,66g plus Tween 20 (Sigma P 9416-100ml) = 5g plus 25% HCL ca. 40ml, auf pH 7,6 einstellen und auf entsprechendes Volumen auffüllen, Ansetzen der Gebrauchslösung: 200ml TBST 10fach plus 1800 ml Aqua dest.
- ▶ Haemalaun-Gebrauchslösung: 5g (Haematoxylin-Monohydrat Merck 15938) in 500ml Aqua dest. heiß lösen und abkühlen lassen, dazu in folgender Reihenfolge lösen: 1g Natriumjodat (Merck 15938) plus 250g Aluminium-Kaliumsulfat Dodecahydrat (Riedel-de Haen 12623) plus 250g Chloralhydrat (Merck 1.02425) plus 5g Citronensäure (Merck 1.00244) und dann auffüllen mit Aqua dest. auf 5 Liter
- ▶ EnVision Detection System, Peroxidase/DAB + Rabbit/Mouse (DAKO K5007): Fläschchen A; HRP Rabbit/Mouse 100ml gebrauchsfertig = mit Peroxidasemolekülen und sekundären Ziegenantikörpermolekülen gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobulinen gekoppeltes Dextran.
- ▶ Fläschchen B; Substrate Buffer 250ml = in gepufferter Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel
- ▶ Fläschchen C; DAB + Chromogen 5ml 50fach konzentriert = 3,3 - Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel

2.3.2 Materialien und Geräte

- ▶ Dampfgarer (Braun Multigourmet)
- ▶ Färbeautomat der Firma DAKO Techmate 500 plus
- ▶ Glasküvetten

- ▶ Fotowanne
- ▶ Pinzette
- ▶ Filterpapier
- ▶ Objektträger „Superfrost“ (Firma Mentzel-Glaser Art. Nr.: 041300)
- ▶ Objektträger „Starfrost“ (DAKO S2025)
- ▶ Deckglas (Firma Marienfeld)
- ▶ Eukitt (Firma Kindler)
- ▶ Mikrowelle (Firma Sharp 750 Watt)

2.4 Immunhistochemische Färbeprotokolle für die jeweiligen Antikörper

2.4.1 Färbeprotokoll für CD34 im Techmate 500 Plus (DAKO)

1. Entparaffinieren in Xylol für jeweils 2x10 min.
2. Absteigende Alkoholreihe 3x3 min. in 100% Alkohol, 2x2 min. in 96% Alkohol und 2x3 min. in 80% Alkohol, es wird mit Leitungswasser in einer Fotoschale gespült.
3. Zur Vorbehandlung werden die Objektträger in der Target Retrieval Solution pH 9 (Pufferlösung) für 25 min. in den Dampfgerat gelegt.
4. Abkühlen bei Zimmertemperatur für 20 min.
5. In TBS Spülpuffer spülen.
6. Zwei Objektträger werden mit der Schnittseite zusammengestellt. Abstandhalter an den Objektträgern bewirken eine Kapillarspaltbildung. Durch die Kapillarlösung werden die Reagenzien angesaugt.

7. Einbringen der Objektträger (hier spezielle Objektträger, sog. Kapillarspaltobjektträger) in den Färbeautomat „Techmate 500 plus“ von DAKO. Hier werden die zusammengestellten Objektträger in spezielle Halter (Körbe) senkrecht eingespannt. Jeder Korb kann bis zu 60 Schnitte fassen. Diese werden durch automatische Greifarme je nach Programm von Kammer zu Kammer bewegt. In den abgetrennten Kammern des Färbeautomaten befinden sich alle Lösungen, die für die jeweilige immunhistochemische Färbung notwendig sind. Der Färbeautomat wird für die jeweilige Färbung programmiert, so dass alle weiteren Schritte vom Gerät übernommen werden. Zum Programmablauf für die Färbung mit CD34, s. u. 2.4.2.
8. Nach der Färbung müssen die Schnitte konserviert werden. Dafür werden sie zuerst für 2x30 sec. in 80% Alkohol gelegt, dann für 2x30 sec. in 96% Alkohol und für weiter 3x30 sec. in 100% Alkohol.
9. Dann 3x1 min. in Xylol.
10. Zum Schluss werden die Objektträger mit Eukitt und einem Deckglas abgedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4.2 Programm für Färbeautomaten bei CD34

| Step | Name | Min.Time | Max.Time |
|------|------|----------|----------|
| 1 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 2 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 3 | BUF | 00:00:10 | 00:00:10 |
| 4 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 5 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 6 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 7 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 8 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 9 | AB | 00:25:00 | 00:25:00 |
| 10 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 11 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |

| | | | |
|----|----------|----------|----------|
| 12 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 13 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 14 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 15 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 16 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 17 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 18 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 19 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 20 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 21 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 22 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 23 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 24 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 25 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 26 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 27 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 28 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 29 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 30 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 31 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 32 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 33 | ENVI | 00:25:00 | 00:25:00 |
| 34 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 35 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 36 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 37 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 38 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 39 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 40 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 41 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 42 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 43 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 44 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |

| | | | |
|----|-------|----------|----------|
| 45 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 46 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 47 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 48 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 49 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 50 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 51 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 52 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 53 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 54 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 55 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 56 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 57 | BUF | 00:00:10 | 00:01:00 |
| 58 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 59 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 60 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 61 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 62 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 63 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 64 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 65 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 66 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 67 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 68 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 69 | HEMA | 00:01:00 | 00:01:00 |
| 70 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 71 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 72 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 73 | BUF | 00:01:00 | 00:10:00 |
| 74 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 75 | BUF | 00:01:00 | 00:10:00 |
| 76 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 77 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |

| | | | |
|----|-----|----------|----------|
| 78 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 79 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 80 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 81 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 82 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 83 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |

Erläuterung der Abkürzungen (Name) im Programm für den Färbeautomaten

BUF = TBST Puffer

PAD = Filterpapier (Absaugkissen)

HP BLOCK = H2O2 Peroxidase-Blocking Solution

ENVI = EnVision Detection System

CHROM = EnVision Detection System Fläschchen C

HEMA = Haemalaun-Gebrauchslösung

AB = Antikörper

H2O = Wasser

2.4.3 Färbeprotokoll für L1 im Techmate 500 Plus (DAKO)

1. Entparaffinieren in Xylol für jeweils 2x10 min.
2. Absteigende Alkoholreihe 3x3 min. in 100% Alkohol, 2x2 min. in 96% Alkohol und 2x3 min. in 80% Alkohol, es wird mit Leitungswasser in einer Fotoschale gespült.
3. Zur Vorbehandlung werden die Objektträger in der Target Retrieval Solution pH 9 (Pufferlösung) für 25 min. in den Dampfgerat gelegt.
4. Abkühlen bei Zimmertemperatur für 20 min.
5. In TBS Spülpuffer spülen.

6. Zwei Objektträger werden mit der Schnittseite zusammengestellt. Abstandhalter an den Objektträgern bewirken eine Kapillarspaltbildung. Durch die Kapillarwirkung werden die Reagenzien angesaugt.
7. Einbringen der Objektträger in den Färbeautomat „Techmate 500 plus“ von DAKO. Hier werden die zusammengestellten Objektträger in spezielle Halter (Körbe) senkrecht eingespannt. Jeder Korb kann bis zu 60 Schnitte fassen. Diese werden dann durch automatische Greifarme je nach Programm von Kammer zu Kammer bewegt. In den abgetrennten Kammern des Färbeautomaten befinden sich alle Lösungen, die für die jeweilige immunhistochemische Färbung notwendig sind. Der Färbeautomat wird für die jeweilige Färbung programmiert, so dass alle weiteren Schritte vom Gerät übernommen werden. Zum Programmablauf für die Färbung mit CD34, s.u. 2.4.2.
8. Nach der Färbung müssen die Schnitte konserviert werden. Dafür werden sie zuerst für 2x30 sec. in 80% Alkohol gelegt, dann für 2x30 sec. in 96% Alkohol und für weitere 3x30 sec. in 100% Alkohol.
9. Dann 3x1 min. in Xylol.
10. Zum Schluss werden die Objektträger mit Eukitt und einem Deckglas abgedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4.4 Programm für Färbeautomaten bei L1

| Step | Name | Min.Time | Max.Time |
|------|------|----------|----------|
| 1 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 2 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 3 | BUF | 00:00:10 | 00:00:10 |
| 4 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 5 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 6 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 7 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 8 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 9 | AB | 00:25:00 | 00:25:00 |

| | | | |
|----|----------|----------|----------|
| 10 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 11 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 12 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 13 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 14 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 15 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 16 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 17 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 18 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 19 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 20 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 21 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 22 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 23 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 24 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 25 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 26 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 27 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 28 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 29 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 30 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 31 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 32 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 33 | ENVI | 00:25:00 | 00:25:00 |
| 34 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 35 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 36 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 37 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 38 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 39 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 40 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 41 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 42 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |

| | | | |
|----|-------|----------|----------|
| 43 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 44 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 45 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 46 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 47 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 48 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 49 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 50 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 51 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 52 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 53 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 54 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 55 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 56 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 57 | BUF | 00:00:10 | 00:01:00 |
| 58 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 59 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 60 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 61 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 62 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 63 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 64 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 65 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 66 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 67 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 68 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 69 | HEMA | 00:01:00 | 00:01:00 |
| 70 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 71 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 72 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 73 | BUF | 00:01:00 | 00:10:00 |
| 74 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 75 | BUF | 00:01:00 | 00:10:00 |

| | | | |
|----|-----|----------|----------|
| 76 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 77 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 78 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 79 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 80 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 81 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 82 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 83 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |

Erläuterung der Abkürzungen (Name) im Programm für den Färbeautomaten:

BUF = TBST Puffer

PAD = Filterpapier (Absaugkissen)

HP BLOCK = H2O2 Peroxidase-Blocking Solution

ENVI = EnVision Detection System

CHROM = EnVision Detection System Fläschchen C

HEMA = Haemalaun-Gebrauchslösung

AB = Antikörper

H2O = Wasser

2.4.5 Färbeprotokoll für S100

1. Entparaffinieren in Xylol für jeweils 2x10 min.
2. Absteigende Alkoholreihe 3x3 min. in 100% Alkohol, 2x2 min, in 96% Alkohol und 2x3 min. in 80% Alkohol, es wird mit Leitungswasser in einer Fotoschale gespült.
3. In TBS Spülpuffer spülen.
4. Zwei Objektträger werden mit der Schnittseite zusammengestellt. Abstandhalter an den Objektträgern bewirken eine Kapillarspaltbildung. Durch die Kapillarwirkung werden die Reagenzien angesaugt.

5. Einbringen der Objektträger in den Färbeautomat „Techmate 500 plus“ von DAKO. Hier werden die aufeinander gelegten Objektträger in spezielle Behälter (Körbe) senkrecht eingelegt. Jeder Korb kann bis zu 60 Schnitte fassen. Diese können dann durch automatische Greifarme je nach Programm von Kammer zu Kammer bewegt werden. Im Färbeautomaten befinden sich in den abgetrennten Kammern alle Lösungen, die zum Gelingen der immunhistochemischen Färbung notwendig sind. Der Färbeautomat wird für die jeweilige Färbung programmiert, so dass alle weiteren Schritte von dem Gerät übernommen werden. Zum Programmablauf für die Färbung mit CD34, s.u. 2.4.6.
6. Nach der Färbung müssen die Schnitte konserviert werden. Dafür werden sie zuerst für 2x30 sec. in 80% Alkohol gelegt, dann für 2x30 sec. in 96% Alkohol und für weiter 3x30 sec. in 100% Alkohol, es wird mit Leitungswasser in einer Fotoschale gespült.
7. Dann für 3x1 min. in Xylol.
8. Zum Schluss werden die Objektträger mit Eukitt und einem Deckglas abgedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4.6 Programm für Färbeautomaten bei S100

| Step | Name | Min.Time | Max.Time |
|------|------|----------|----------|
| 1 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 2 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 3 | BUF | 00:00:10 | 00:00:10 |
| 4 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 5 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 6 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 7 | ENZ | 00:10:00 | 00:10:00 |
| 8 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 9 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 10 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 11 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |

| | | | |
|----|----------|----------|----------|
| 12 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 13 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 14 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 15 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 16 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 17 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 18 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 19 | AB | 00:25:00 | 00:25:00 |
| 20 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 21 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 22 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 23 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 24 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 25 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 26 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 27 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 28 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 29 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 30 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 31 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 32 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 33 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 34 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 35 | HP BLOCK | 00:02:30 | 00:02:30 |
| 36 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 37 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 38 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 39 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 40 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 41 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 42 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 43 | ENVI | 00:25:00 | 00:25:00 |
| 44 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |

| | | | |
|----|-------|----------|----------|
| 45 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 46 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 47 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 48 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 49 | BUF | 00:00:00 | 00:10:00 |
| 50 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 51 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 52 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 53 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 54 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 55 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 56 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 57 | BUF | 00:00:10 | 00:01:00 |
| 58 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 59 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 60 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 61 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 62 | PAD | 00:00:45 | 00:00:45 |
| 63 | CHROM | 00:05:00 | 00:05:00 |
| 64 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 65 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 66 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 67 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 68 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 69 | HEMA | 00:01:00 | 00:01:00 |
| 70 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 71 | BUF | 00:00:10 | 00:00:10 |
| 72 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 73 | BUF | 00:01:00 | 00:10:00 |
| 74 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 75 | BUF | 00:01:00 | 00:10:00 |
| 76 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 77 | BUF | 00:00:10 | 00:10:00 |

| | | | |
|----|-----|----------|----------|
| 78 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 79 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 80 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 81 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |
| 82 | PAD | 00:00:29 | 00:00:29 |
| 83 | H2O | 00:00:10 | 00:10:00 |

Erläuterung der Abkürzungen (Name) im Programm für den Färbeautomaten

BUF = TBST Puffer

PAD = Filterpapier (Absaugkissen)

HP BLOCK = H2O2 Peroxidase-Blocking Solution

ENVI = EnVision Detection System

CHROM = EnVision Detection System Fläschchen C

HEMA = Haemalaun-Gebrauchslösung

H2O = Wasser

ENZ = Proteinase K in Verdünnungsmedium Atibody-Diluent-Solution
(Proteinase 40-fach konzentriert)

2.5 Befundung der histologischen Präparate

Nach Abschluss der Immunhistochemie wurden die Präparate mit Hilfe eines Olympus Mikroskops (Modell: B-H 2) befundet. Die Befundung jedes einzelnen Präparates erfolgte ohne das Wissen der jeweiligen Diagnose.

Im Anschluss an das erste Mikroskopieren erfolgte eine grobe Einschätzung über den Erfolg der Immunhistochemie. Nach dem zweiten Durchlauf wurde für jedes Präparat ein Protokoll erstellt, das folgende Punkte festhielt:

- ▶ Welche Färbung liegt vor?
- ▶ Welches Gewebe wurde gefärbt?
- ▶ Wie stark und wie viel wurde angefärbt?

Erst nach der Befundung jedes einzelnen Präparates wurden die jeweiligen Diagnosen zugeordnet.

Das gleiche Prozedere wurde unabhängig voneinander von einer Kollegin und einem Kollegen aus dem Pathologischen Institut durchgeführt. Anschließend hat man die einzelnen Protokolle miteinander verglichen. Protokolliert wurde die ungefähre prozentuale Anzahl der gefärbten Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellanzahl.

3 Ergebnisse

3.1 Das gesamte Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden in den drei unten aufgeführten Untersuchungsgruppen 60 Tumorproben in Paraffin eingebettet, die sich wie folgt auf die einzelnen Gruppen verteilen:

- ▶ Untersuchungsgruppe 1:
20 Tumorproben dermal-diffuse Neurofibrome
- ▶ Untersuchungsgruppe 2:
23 Tumorproben plexiforme Neurofibrome
- ▶ Untersuchungsgruppe 3:
17 Tumorproben maligne periphere Nervscheiden Tumoren

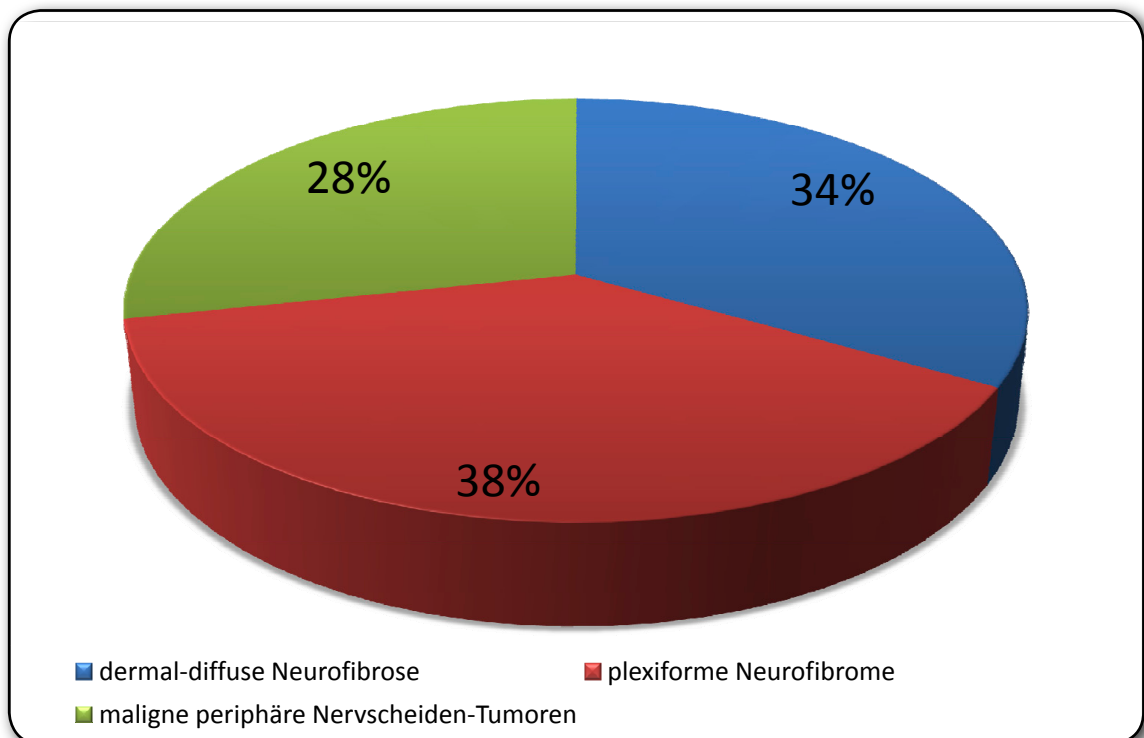


Diagramm 1: Verteilung der Tumorproben des gesamten Untersuchungsmaterials

Aus den Paraffinblöcken wurden insgesamt 240 Schnitte angefertigt; das bedeutet vier Schnitte für jedes Tumorgewebe. Anschließend sind folgende Färbungen durchgeführt worden:

- ▶ HE-Färbung (Hämalaun-Eosin-Färbung)
- ▶ S100
- ▶ CD34
- ▶ L1

Die 60 Tumorproben stammten von 30 Männern und 30 Frauen, die alle die Diagnose NF-1 vorwiesen. Das Durchschnittsalter lag bei 28,9 Jahren, wobei das Alter der männlichen Patienten im Durchschnitt 25,63 Jahre betrug, das der weiblichen Patientinnen 34,33 Jahre. Die Spannweite des Lebensalters bewegte sich bei den Männern zwischen einem Jahr beim jüngsten und 61 Jahren beim ältesten Patienten. Bei den Frauen waren die jüngste Patientin sieben Jahre und die älteste 65 Jahre alt.

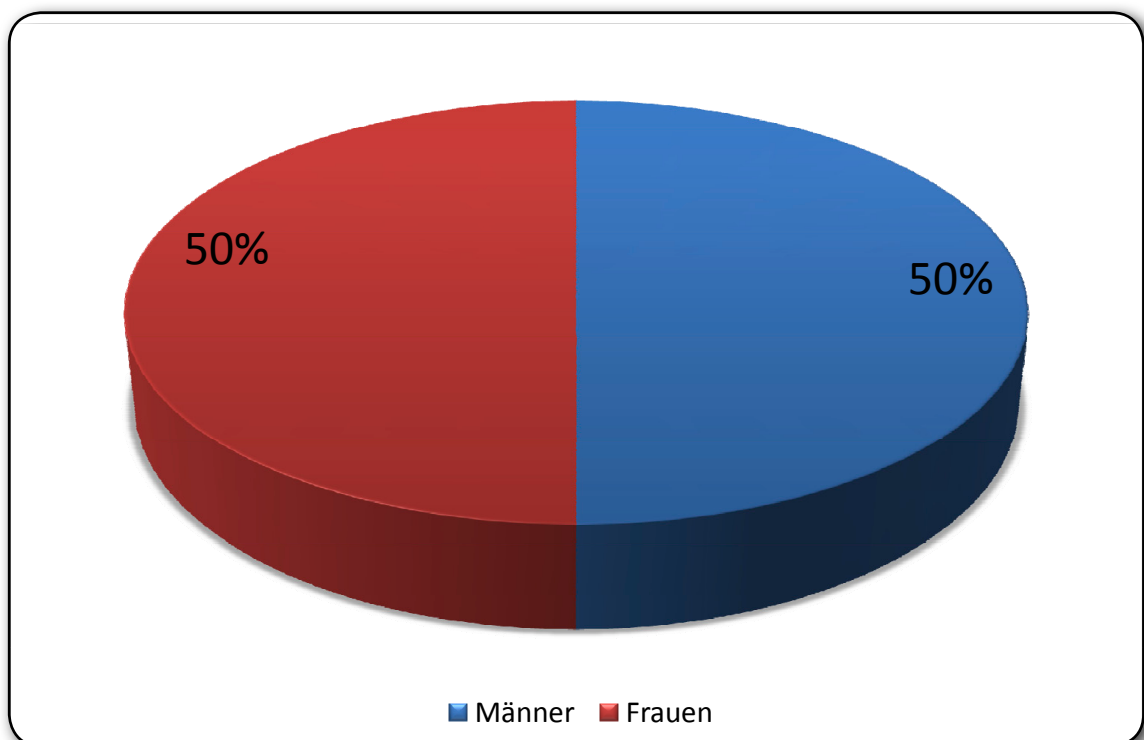


Diagramm 2: Geschlechterverteilung der gesamten Untersuchungsgruppe

3.2 Untersuchungsgruppe 1 mit dermal-diffusen Neurofibromen

Zu dieser Gruppe gehörten 20 Patienten; darunter waren acht Männer und 12 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 36,85 Jahre. Geschlechtsspezifisch betrachtet lag das männliche Alter im Durchschnitt bei 37,37 Jahren und das weibliche Alter bei 36,5 Jahren. Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen war der jüngste Patient 13 Jahre alt. Der älteste männliche Patient war 61 Jahre; die älteste Frau 45 Jahre.

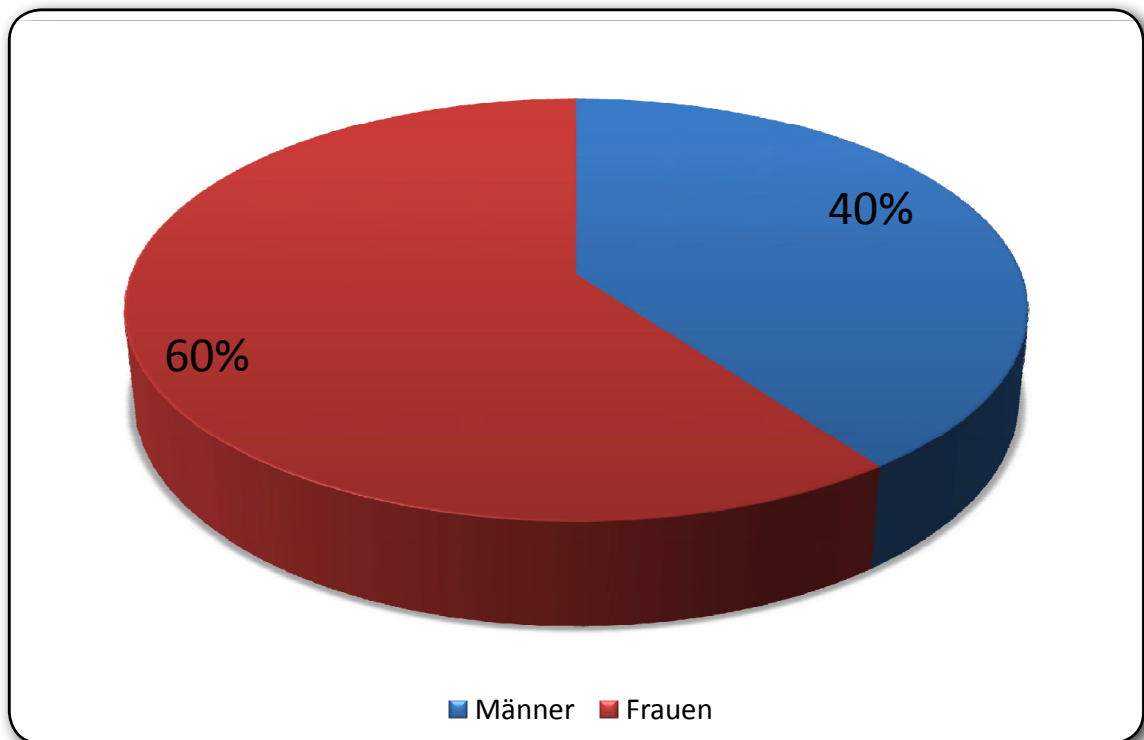


Diagramm 3: Geschlechterverteilung der Untersuchungsgruppe 1

3.2.1 Immunhistochemische Befunde der Tumorproben dermal-diffuser Neurofibrome

Von den 20 auf L1 untersuchten Schnitten zeigten alle eine Anfärbung auf L1 und waren somit L1 positiv. Die Intensität der angefärbten Zellen wies jedoch starke Unterschiede auf, wobei die Messskala von 20% bis 40% Färbungsdichte reichte, innerhalb derer die Messergebnisse verortet waren. Insgesamt waren sechs Schnitte mit ca. 20% angefärbt, zehn Schnitte mit ca. 30% und weitere vier Schnitte mit deutlicheren 40%.

Um zu evaluieren, welche Zellpopulationen L1 exprimieren, wurde jeweils ein Schnittpräparat mit S100 und eins mit CD34 gefärbt. Für eine histologische Übersicht fertigte man vom jeweiligen Paraffinblock zusätzlich einen HE-Schnitt an, siehe Abbildung 1 und Abbildung 1.1.

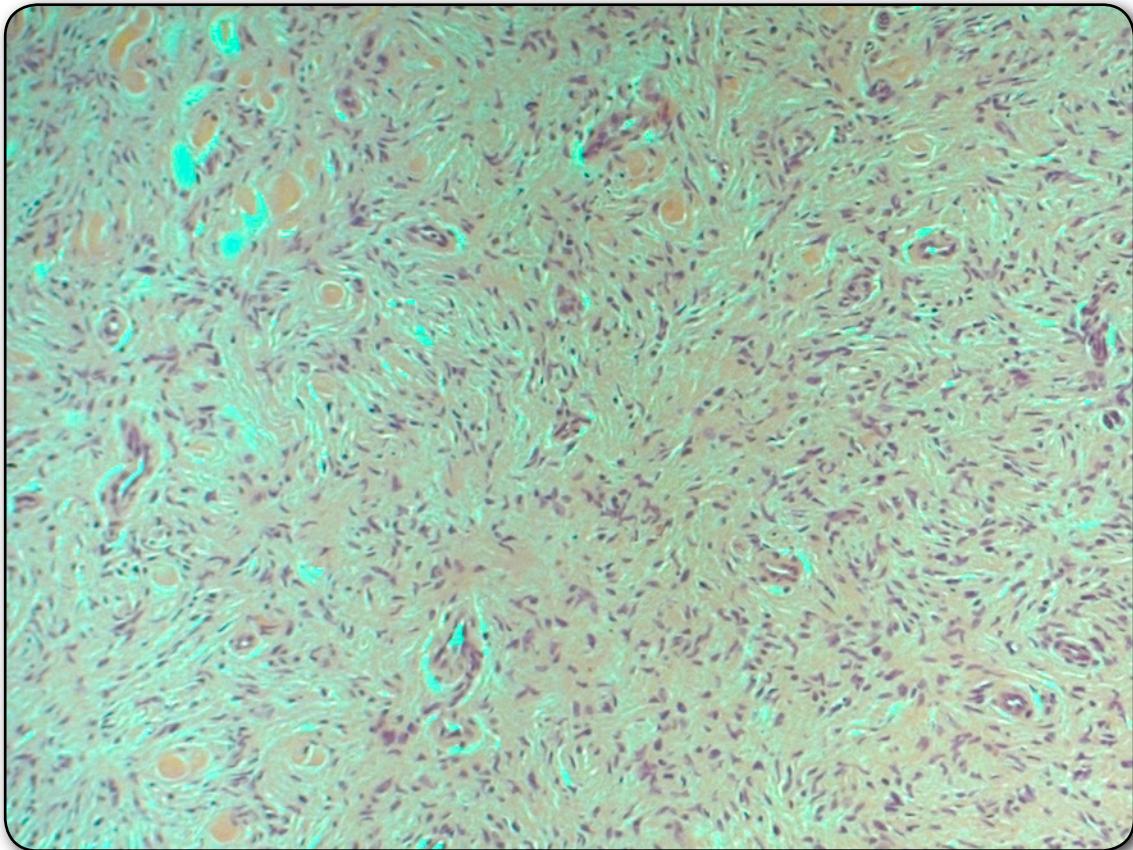


Abbildung 1: HE Färbung eines dermal-diffusen Neurofibroms (10x)

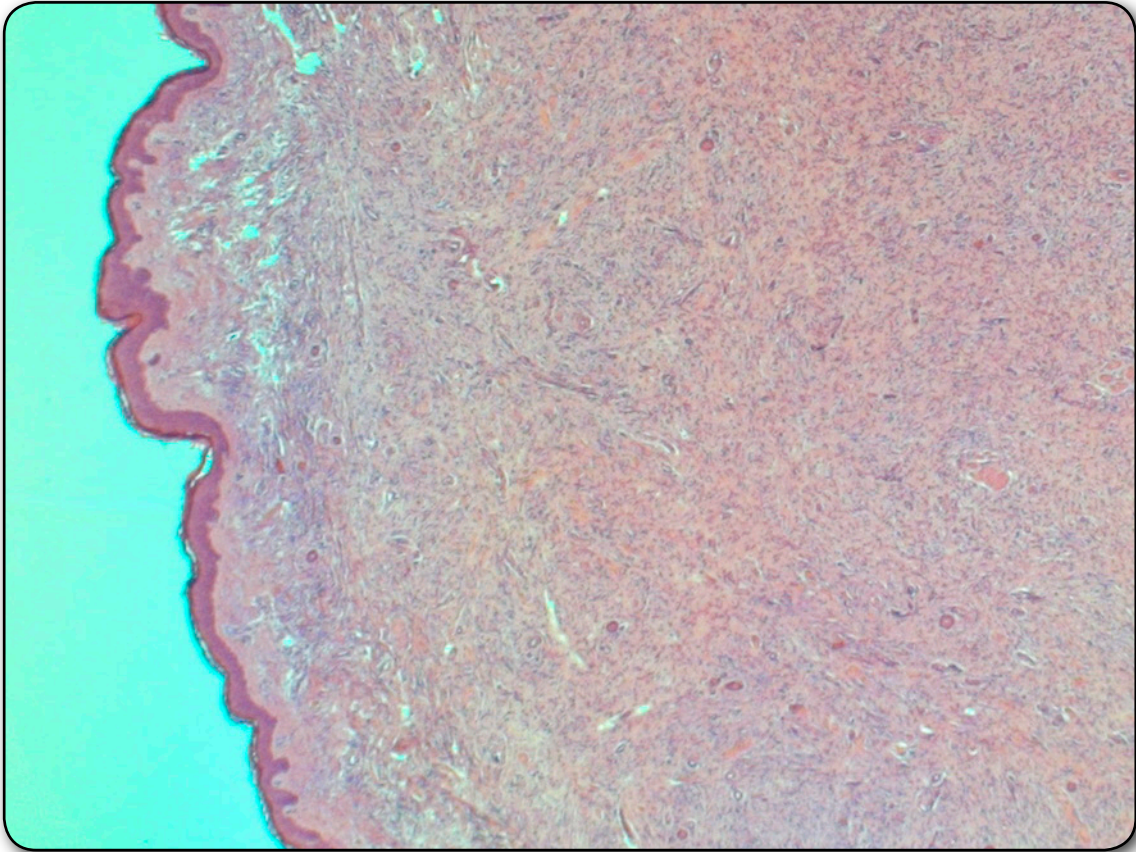


Abbildung 1.1: HE Färbung eines dermal-diffusen Neurofibroms (2,5x)

In anderen immunhistochemischen Untersuchungen von Neurofibromatose assoziierten Tumoren (Friedrich 2007; Takeuchi 2001; Khalifa 2000) wurden bereits S100, CD34 sowie Insulin-like growth Faktor Rezeptor Typ I angewendet. Der Marker S100 dient zum Nachweis von Schwannschen Zellen, die in vielen Neurofibromen, Schwannomen oder auch malignen peripheren Nervscheiden Tumoren vorkommen (Ariza 1988), siehe Abbildung 2.

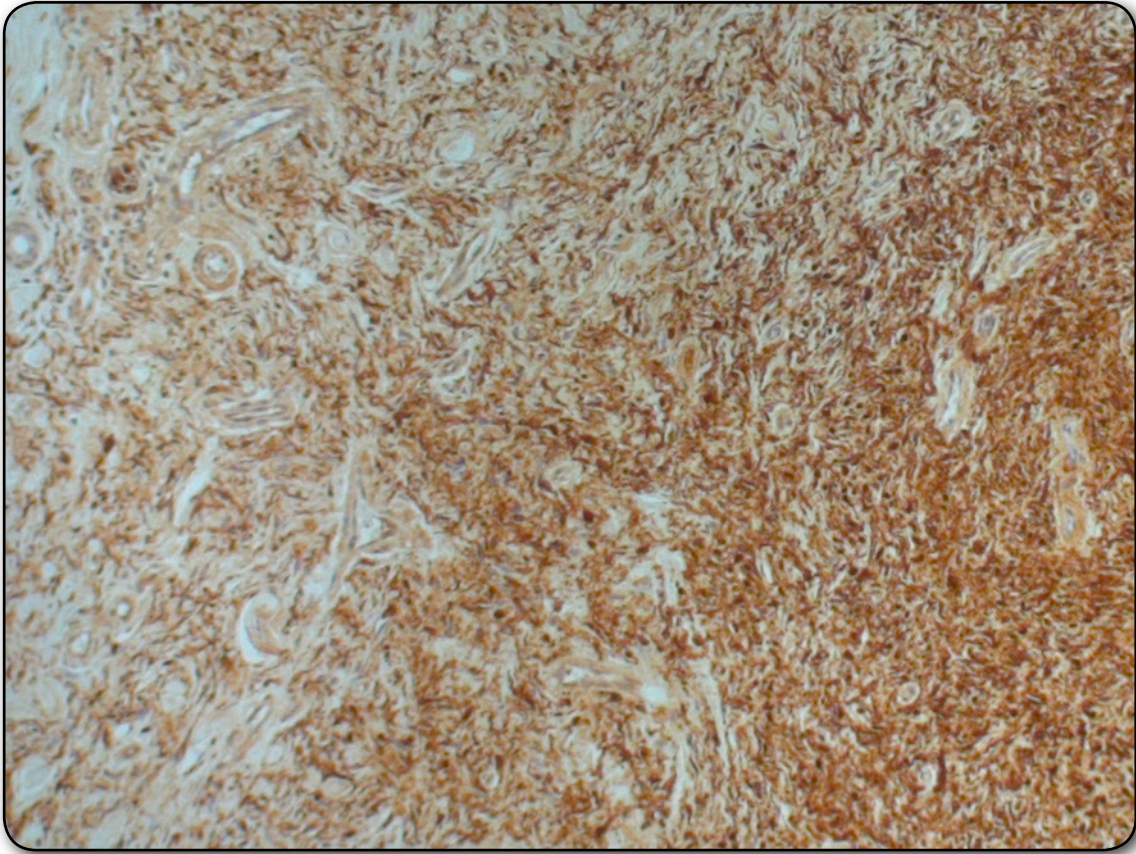


Abbildung 2: S100 Färbung eines dermal-diffusen Neurofibroms (10x)

In der Untersuchungsgruppe der dermal-diffusen Neurofibrome zeigte sich eine kräftige und satte Färbung mit S100, was auf die deutliche Existenz von Schwannschen Zellen schließen ließ. Der Marker CD34 reagierte einmal mit den Gefäßendothelzellen und desweiteren auch mit den Fibroblasten. Die Reaktion von CD34 deutet darauf hin, dass weder Endothelien noch Fibroblasten zu einer Expression von L1 führen; dermal-diffuse Neurofibrome hingegen exprimieren CD34, wie in Abbildung 3 deutlich erkennbar ist.

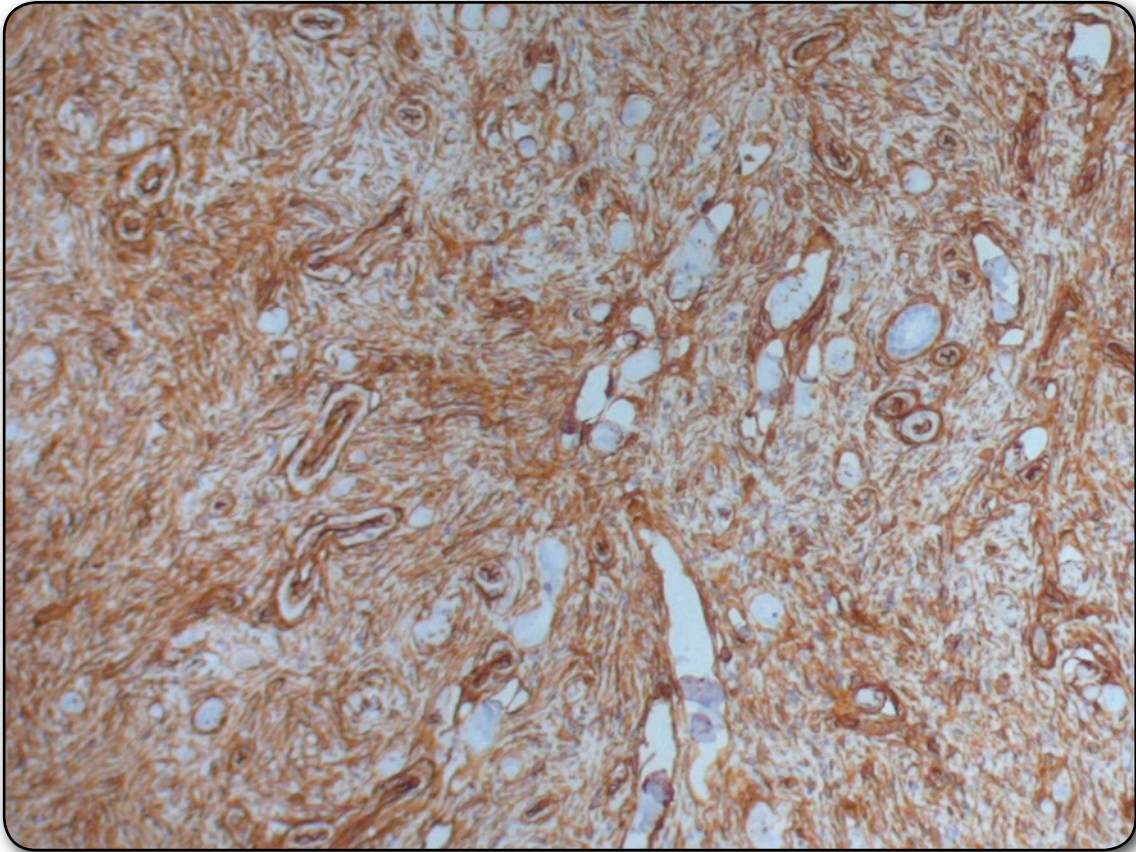


Abbildung 3: CD34 Färbung eines dermal-diffusen Neurofibroms (10x)

Konstatieren lässt sich: Bei den Tumorproben der dermal-diffusen Neurofibrome war eine stark positive Färbung mit S100 und CD34 auffällig. Die immunhistochemischen Markierungen lassen den Schluss zu, dass die positive L1-Expression nicht von unterschiedlichen Zellkomponenten ausging, die in dermal-diffusen Neurofibromen zu finden sind. Vielmehr können dafür Schwannsche Zellen und ihre Subpopulationen verantwortlich gemacht werden, auch wenn sie sich mit unterschiedlicher Intensität darstellen. Für die Evaluierung wurden dünne Serienschritte mit einer Dicke von 1 μm angefertigt und anschließend betrachtet. Dabei war sehr deutlich zu erkennen, dass ein Teil der Schwannschen Zellen für die L1-Expression verantwortlich ist. Insgesamt lagen mehr S100 positive Zellen als L1 positive Zellen vor. In dieser Untersuchungsgruppe zeigte sich die positive L1-Expression nicht nur bei den Schwannschen Zellen, sondern auch bei den Mastzellen. In Abbildung 4 ist die positive L1-Expression erkennbar.

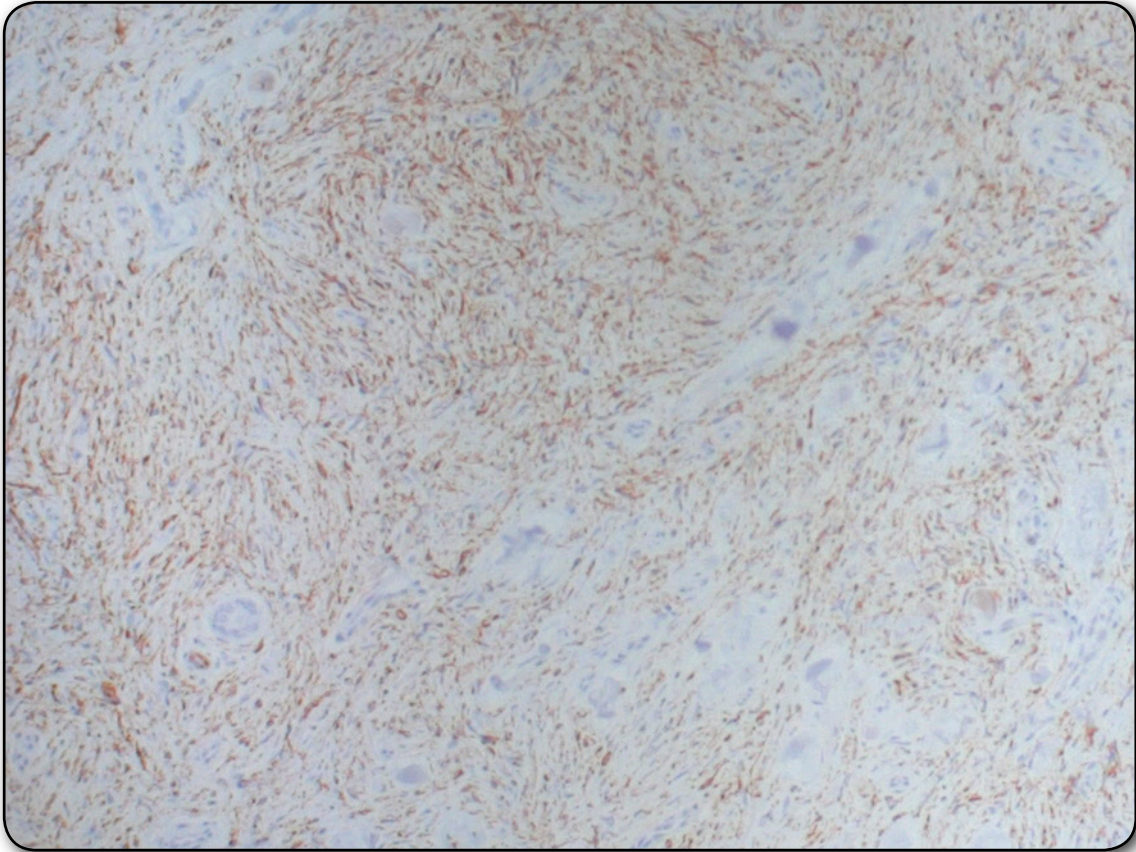


Abbildung 4: L1 Färbung eines dermal-diffusen Neurofibroms (10x)

3.3 Untersuchungsgruppe 2 mit plexiformen Neurofibromen

Zu dieser Gruppe zählten 23 Patienten; darunter waren 13 Männer und 10 Frauen. Das Durchschnittsalter in dieser Gruppe betrug 21,56 Jahren, wobei die Männer im Durchschnitt 17,07 Jahre und die Frauen 27,4 alt waren. Die Spannweite des Lebensalters der männlichen Patienten bewegte sich zwischen einem Jahr und 35 Jahren. Die Spannweite des Lebensalters unter den Frauen hingegen lag zwischen sieben Jahren bei der jüngsten und 50 Jahren bei der ältesten Patientin.

Im Vergleich zur Untersuchungsgruppe mit dermal-diffusen Neurofibromen war diese Gruppe also deutlich jünger. Das lässt sich in Zahlen konkretisieren: Im Durchschnitt war diese Gruppe um ca. 15 Jahre jünger. Unter den Männern gab es eine Altersdifferenz von ca. 20 Jahren und bei den Frauen differierte das Durchschnittsalter um ca. neun Jahre von der anderen Gruppe.

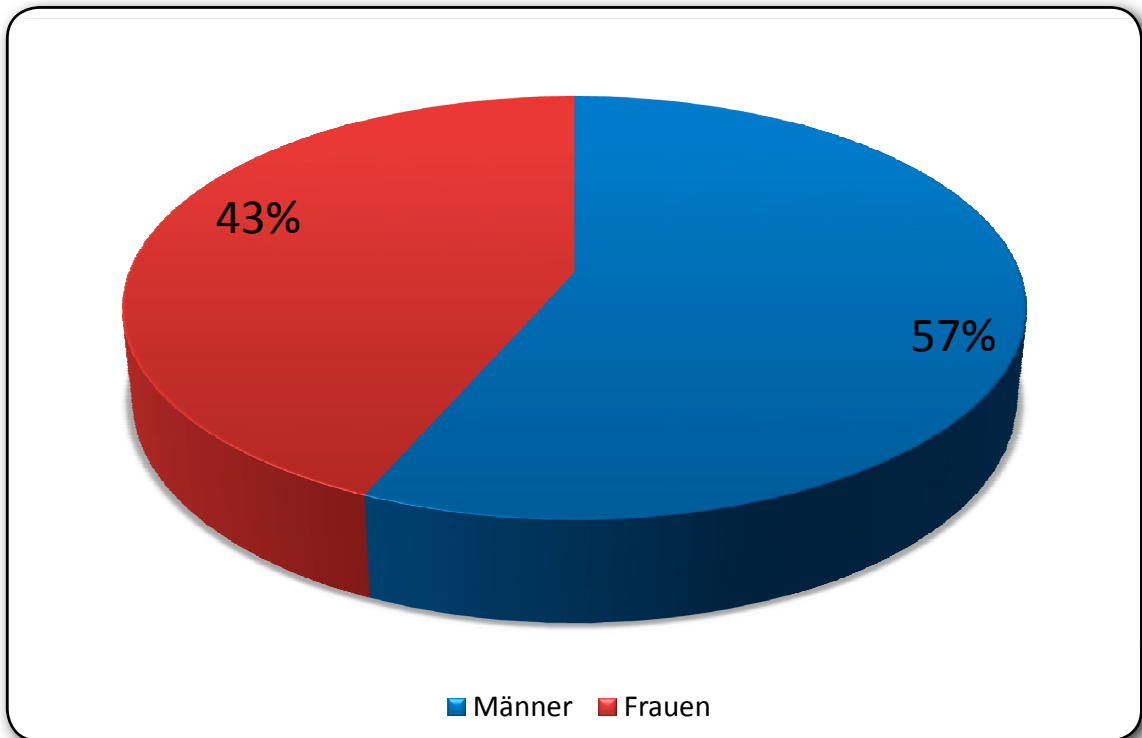


Diagramm 4: Geschlechterverteilung der Untersuchungsgruppe 2

3.3.1 Immunhistochemische Befunde der Tumorproben plexiformer Neurofibrome

Allgemein ist festzuhalten, dass von den 23 auf L1 untersuchten Schnitten alle mit einer positive Anfärbung auf L1 reagierten. Genauer betrachtet, zeigten sich bei allen Schnitten vereinzelte Zellen, die L1 positiv waren. Insgesamt war hier eine Anfärbung von max. 2% zu erkennen; darunter gab es zwei bis drei Präparate mit einer Anfärbung von max. 5%. Wie schon in der Untersuchungsgruppe mit dermal-diffusen Neurofibromen bestätigten auch hier die immunhistochemischen Markierungen, dass die positive L1-Expression nicht auf unterschiedliche Zellkomponenten zurückzuführen ist, die sich in plexiformen Neurofibromen finden. Dafür sind ausschließlich Schwannsche Zellen und ihre Subpopulationen verantwortlich – auch wenn sie hier mit einer deutlich geringeren Intensität exprimieren.

Die Vorgehensweise in dieser Untersuchungsgruppe war identisch mit der in der Untersuchungsgruppe 1. Um beurteilen zu können, welche Zellpopulationen ggf. L1 exprimieren, wurde jeweils ein Schnittpräparat mit S100 und eins mit CD34 gefärbt. Darüber hinaus wurde zur histologischen Übersicht vom jeweiligen Paraffinblock ein

HE-Schnitt angefertigt, wie in Abbildung 5 und 5.1 in unterschiedlichen Vergrößerungen zu erkennen ist.

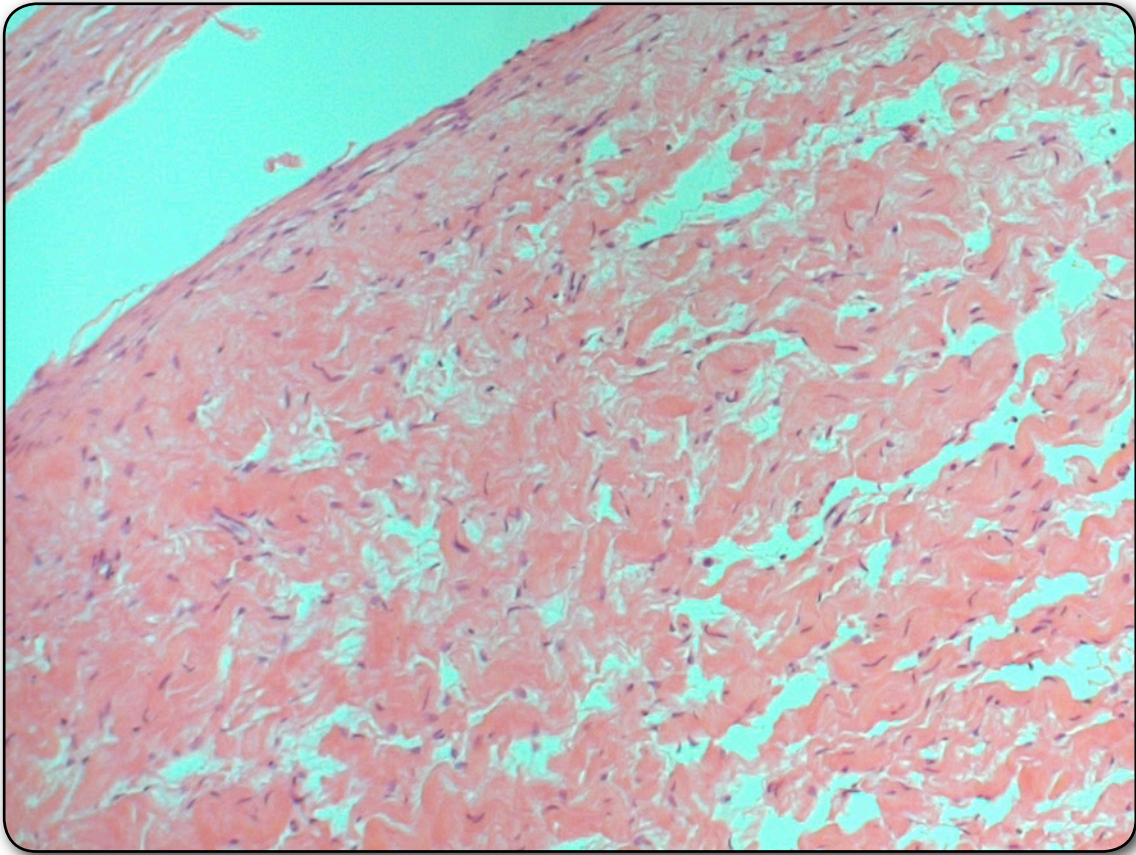


Abbildung 5: HE Färbung eines plexiformen Neurofibroms (2,5x)

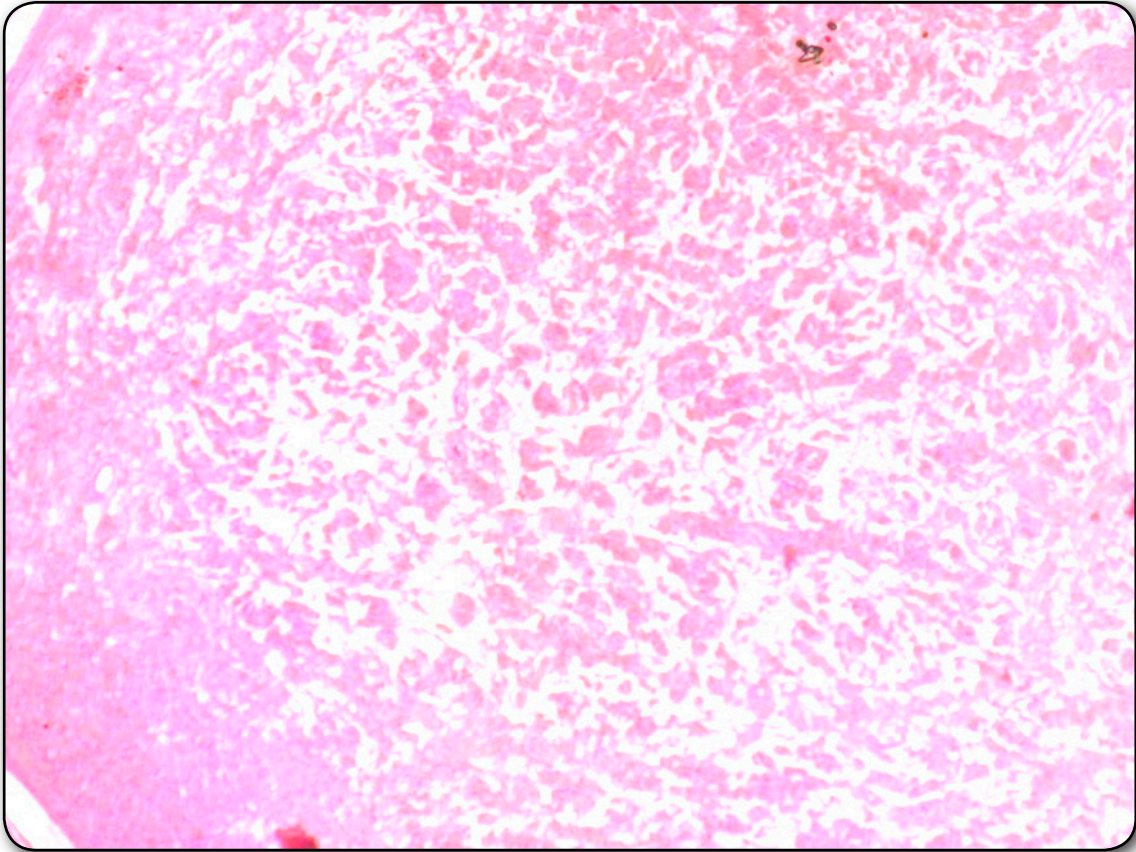


Abbildung 5.1: HE Färbung eines plexiformen Neurofibroms (10x)

Wie schon in der Untersuchungsgruppe 1 mit dermal-diffusen Neurofibromen kam es auch hier, wie Abbildung 6 deutlich zeigt, zu einer kräftigen und satten Färbung mit S100, die ein Vorkommen von Schwannschen Zellen wahrscheinlich macht.

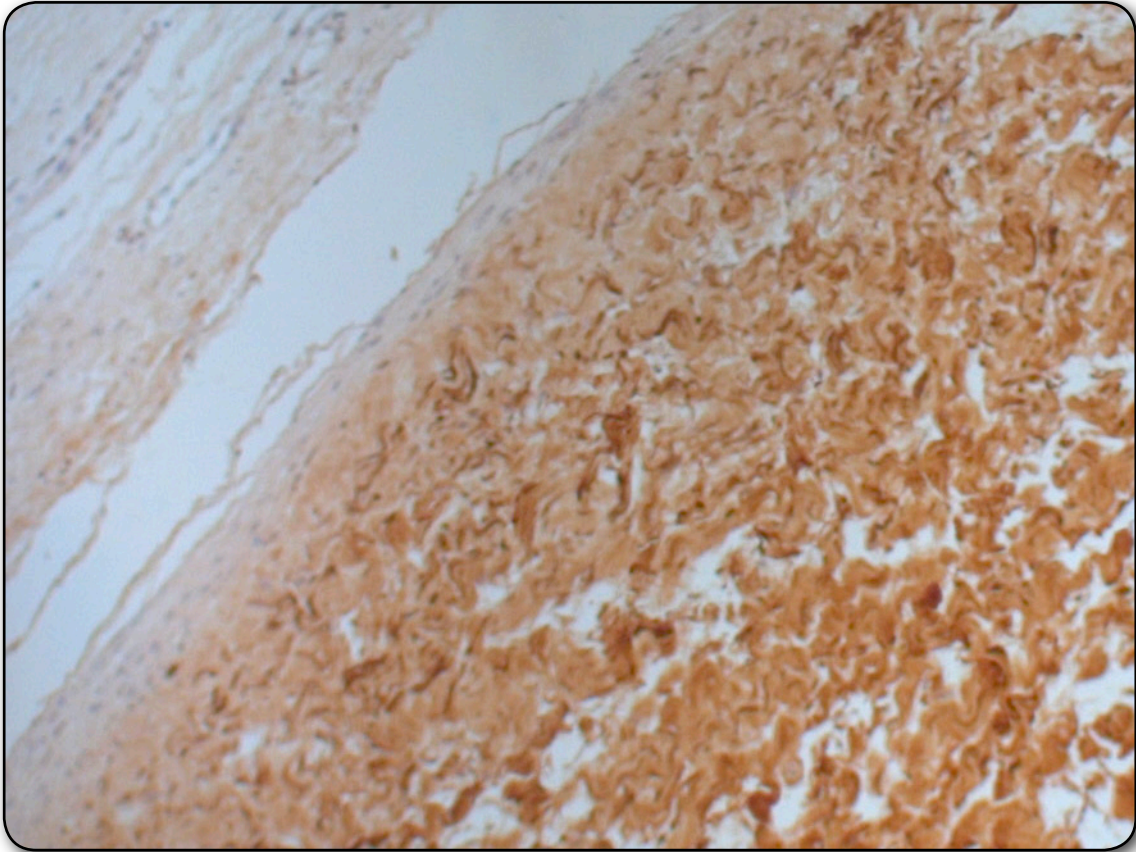


Abbildung 6: S100 Färbung eines plexiformen Neurofibroms (10x)

Der Marker CD34 verhielt sich ebenfalls identisch: Er reagierte einmal mit Gefäßendothelzellen und mit den Fibroblasten. Die Anfärbung von CD34 zeigte, dass weder Endothelien noch Fibroblasten zu einer Expression von L1 führen, jedoch plexiforme Neurofibrome CD34 exprimieren, was in Abbildung 7 sichtbar wird.

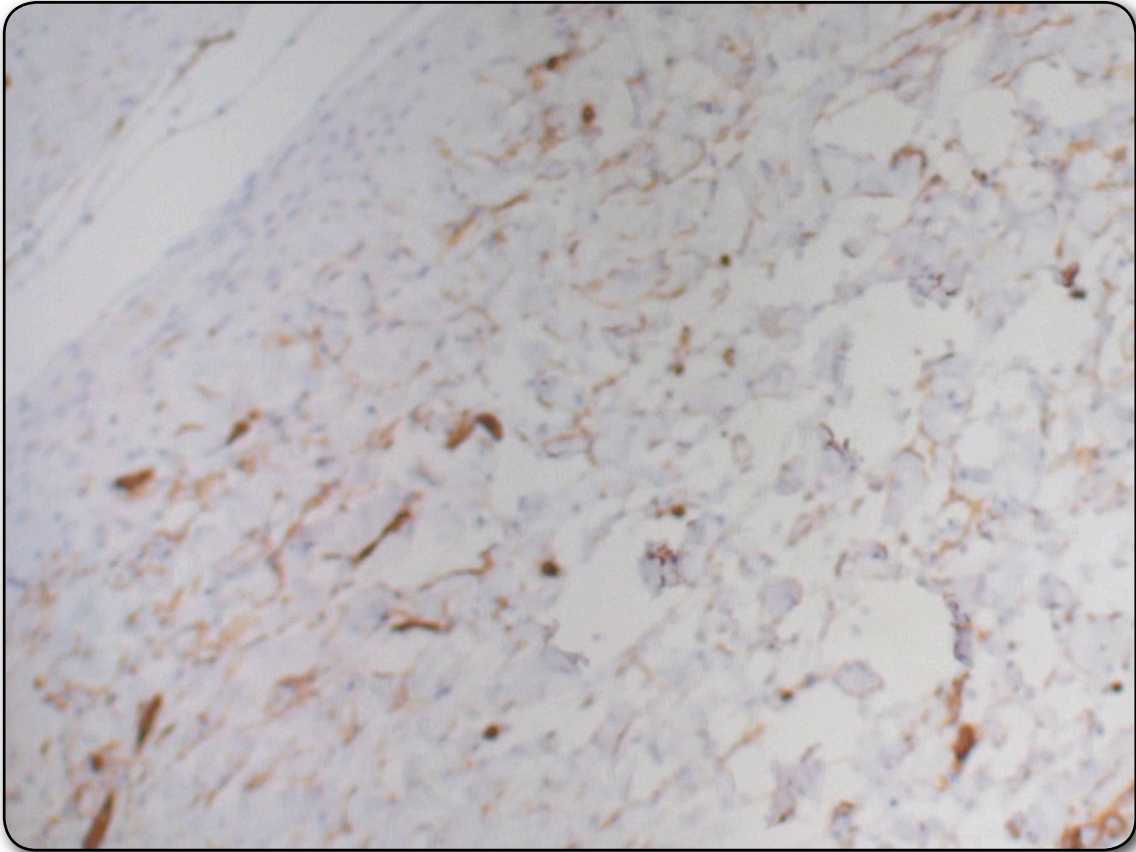


Abbildung 7: CD34 Färbung eines plexiformen Neurofibroms (10x)

Das Fazit für diese Untersuchungsgruppe fällt damit ähnlich aus wie für die Gruppe 1: Bei den Tumorproben der plexiformen Neurofibrome gab es eine stark positive Färbung mit S100 und CD34. Auch hier konnte anhand der genaueren Betrachtung von dünnen Serienschritten gezeigt werden, dass ein Teil der Schwannschen Zellen die L1-Expression übernehmen. Auch die plexiformen Neurofibrome ließen eine Expression von L1 erkennen, welche in Abbildung 8 deutlich zu erkennen ist, die jedoch weniger intensiv auftrat wie bei den dermal-diffusen Neurofibromen. Mögliche Ursachen für diese Reaktion wären zum Beispiel weniger Zellen im Präparat als bei Gruppe 1, die L1 exprimieren. Oder dass plexiforme Neurofibrome im Vergleich zu dermal-diffusen Neurofibromen insgesamt weniger L1 exprimieren. Die Evaluierung dieser Thesen muss allerdings Gegenstand einer weiteren Untersuchung sein. Weiterhin gibt es auch hier eine deutliche L1-Expression der Mastzellen.

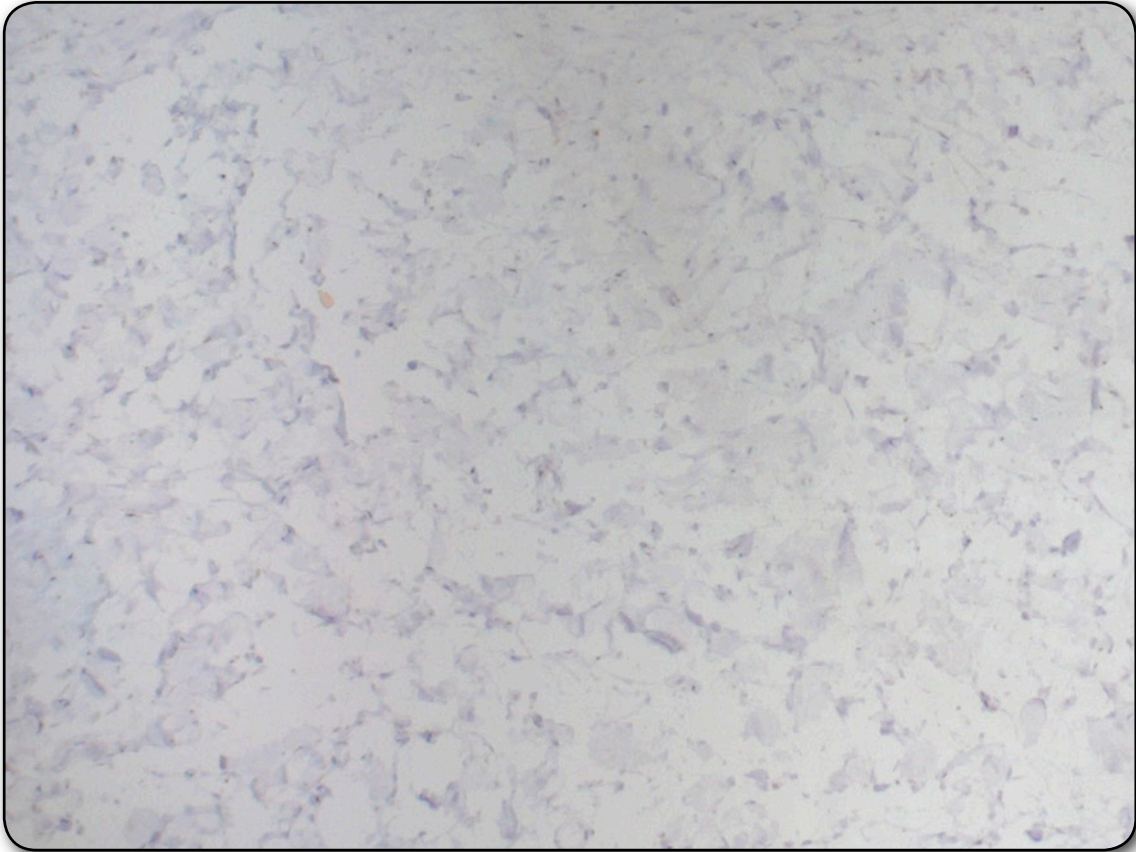


Abbildung 8: L1 Färbung eines plexiformen Neurofibroms (10x)

3.4 Untersuchungsgruppe 3 mit malignen peripheren Nervscheiden Tumoren

Zu dieser Gruppe gehörten 17 Patienten; darunter waren neun Männer und acht Frauen. Das Durchschnittsalter in dieser Gruppe lag bei 33,29 Jahren. Die männlichen Patienten waren im Durchschnitt 27,55 Jahre alt und die weiblichen Patientinnen 39,75. Die Spannweite des Lebensalters bewegte sich bei den Männern zwischen zwei Jahren beim jüngsten Patienten und 52 Jahren beim ältesten. Die Spannweite des Lebensalters bei den Frauen hingegen ging von 16 Jahren bis 65 Jahren. Im Vergleich zu den anderen Untersuchungsgruppen waren die Männer ca. zehn Jahre jünger als in der Untersuchungsgruppe 1 und ca. zehn Jahre älter als in der Gruppe 2. Die Frauen der Untersuchungsgruppe 3 waren ca. drei Jahre älter als in der Gruppe 1 und ca. 12 Jahre älter als in der Untersuchungsgruppe 2.

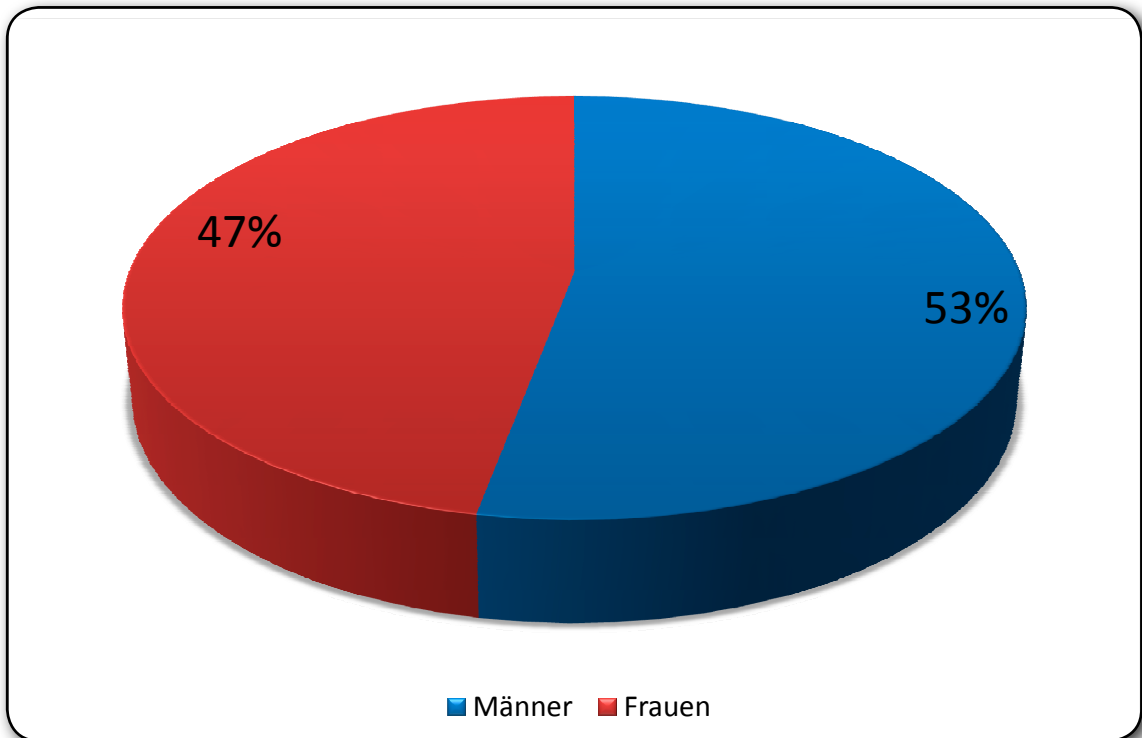


Diagramm 5: Geschlechterverteilung der Untersuchungsgruppe 3

3.4.1 Immunhistochemische Befunde der Tumorproben maligner peripherer Nervscheiden Tumoren

Bei den 17 auf L1 untersuchten Schnitten wurde ein inhomogenes Bild bei der Anfärbung auf L1 sichtbar. Bei genauerer Untersuchung zeigten sich jedoch bei einigen malignen peripheren Nervscheiden Tumoren vereinzelt Zellen, die L1 positiv waren. Insgesamt fielen die Reaktionen bei der Anfärbung mit L1 sehr unterschiedlich aus. Zehn Schnitte stellten L1 gar nicht dar - hier kann nicht von einer positiven Reaktion gesprochen werden. Bei vier Präparaten war die Anfärbung mit L1 ausgeprägter und lag bei ca. 10% und mehr. Drei maligne periphere Nervscheiden Tumoren zeigten eine sehr kräftige L1-Expression mit ca. 80% und mehr. Diese Ergebnisse lassen bei näherer Betrachtung vermuten, dass es in besser differenzierten Abschnitten des Tumors zu einer positiven Darstellung von L1 kommt.

Auch in dieser Untersuchungsgruppe ging man genauso vor wie in den anderen beiden Untersuchungsgruppen. Um zu evaluieren, welche Zellpopulationen ggf. L1 exprimieren, wurde jeweils ein Schnittpräparat mit S100 und eins mit CD34 gefärbt. Zu-

sätzlich fertigte man auch hier vom jeweiligen Paraffinblock einen HE-Schnitt für eine histologische Übersicht an zwei unterschiedlichen Präparaten an, siehe Abbildung 9.

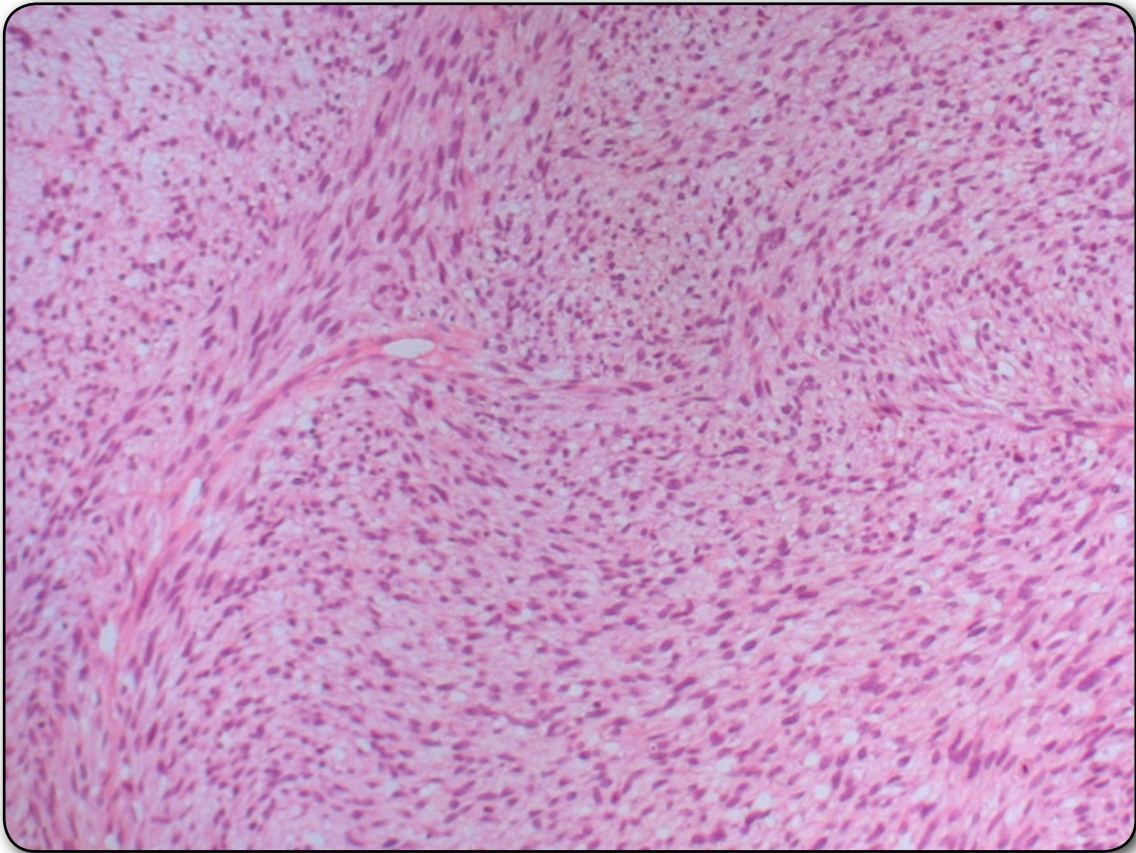


Abbildung 9: HE Färbung eines malignen peripheren Nervscheiden Tumors (10x)

In der Untersuchungsgruppe der malignen peripheren Nervscheiden Tumoren zeigte sich teilweise eine kräftige und satte Färbung mit S100, ähnlich dem Verhalten der dermal-diffusen und plexiformen Neurofibrome, die auf das vermehrte Vorhandensein von Schwannschen Zellen hinweist.

Allerdings wurde auch deutlich, dass die maligne Entartung die Struktur der Schwannschen Zellen offensichtlich verändert, da die S100-Expression deutlich weniger homogen verlief als bei den Untersuchungsgruppen 1 und 2. Bei der Anfärbung mit CD34 zeigte sich auch hier, dass der Marker CD34 einmal mit Gefäßendothelzellen und mit Fibroblasten reagierte. Aufgrund der reichlichen Kapillarisation zeigte sich eine satte CD34-Expression. Diese Reaktion weist darauf hin, dass weder Endothelien noch Fibroblasten zu einer Expression von L1 führen; maligne periphere Nervscheiden Tumoren allerdings CD34 exprimieren. Fazit: Bei den Tumorproben der malignen peripheren Nervscheiden Tumoren konnte eine stark positive Färbung mit CD34 protokolliert werden und überwiegend eine deutliche Anfärbung von S100. Allerdings

waren Unterschiede bei der S100-Expression zu erkennen, die eventuell auf die maligne Entartung und eine damit zusammenhängende Veränderung der Zellverteilung zurückzuführen sind. Darüber hinaus zeigte sich bei den malignen peripheren Nervscheiden Tumoren eine L1-Expression, die nicht in allen Schnitten die gleiche Intensität aufwies, was nur zum Teil in der Abbildung 10 und 10.1 sichtbar ist.

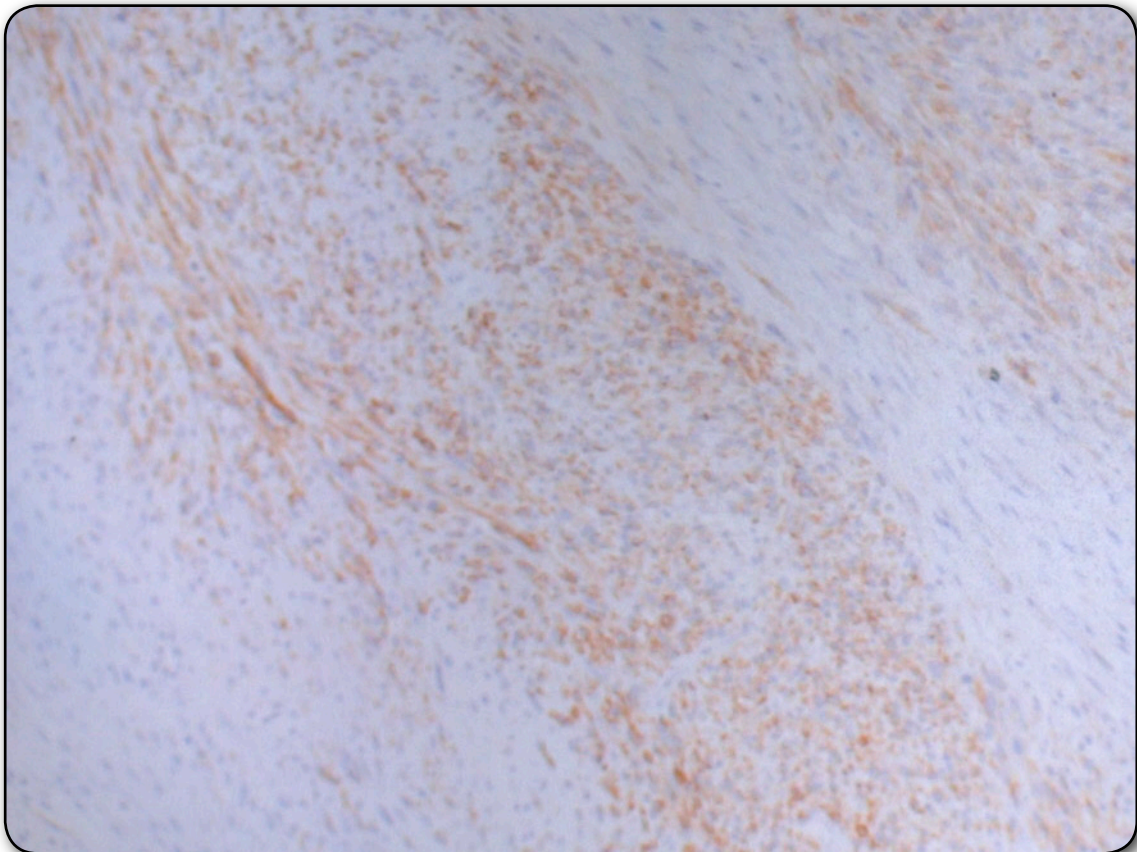


Abbildung 10: L1 Färbung eines malignen peripheren Nervscheiden Tumors (10x)

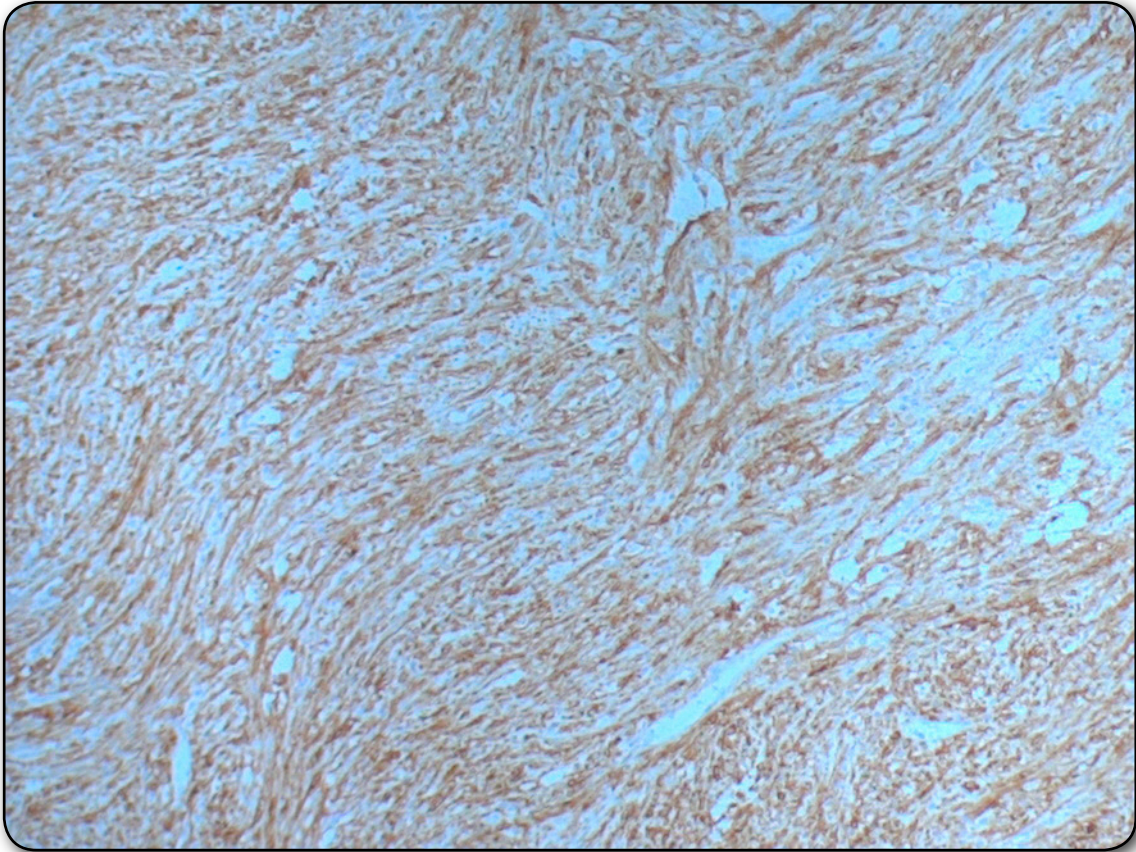


Abbildung 10.1: L1 Färbung eines malignen peripheren Nervscheiden Tumors (10x)

Das Unterschiedsspektrum war sehr deutlich und reichte von gar nicht messbar bis zu einer fast vollständigen Dominanz des Präparats. An diesem Punkt ließe sich ähnlich wie in der Untersuchungsgruppe 2 darüber nachdenken, ob hier tatsächlich weniger Zellen im Präparat existierten als in der Untersuchungsgruppe 1, die L1 exprimieren. Oder ob es bei den malignen peripheren Nervscheiden Tumoren durch die maligne Entartung zu einer Transformation der Zellstrukturen kommt, die auf die L1-Expression nachhaltige Auswirkungen hat.

Wichtig ist hierbei, dass der Differenzierungsgrad der malignen peripheren Nervscheiden Tumoren offensichtlich eine wichtige Rolle bei der L1-Expression spielt. In dieser Untersuchungsgruppe wurde beobachtet, dass gut differenzierte maligne periphere Nervscheiden Tumoren deutlich mehr L1 darstellen als die weniger gut differenzierten. Um dieses Ergebnis genauer zu evaluieren, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Wie schon in den beiden vorangegangenen Untersuchungsgruppen zeigte sich auch hier eine deutliche L1-Expression der Mastzellen.

3.5 Überblick der Untersuchungsergebnisse

| Untersuchungsgruppe 1 | Untersuchungsgruppe 2 | Untersuchungsgruppe 3 |
|----------------------------|--|--|
| 20 Präparate | 23 Präparate | 17 Präparate |
| L1 = alle positiv (20-40%) | L1 = alle positiv (2-5% vereinzelte Zellen) | L1 = 10 Präparate negativ 4 Präparate positiv (10%) 3 Präparate positiv (80% bei gut differenzierten Tumoren) |
| S100 = alle positiv | S100 = alle positiv | S100 = alle positiv (jedoch weniger positiv im Ver- gleich zur Untersuchungs- gruppe 1 und 2, abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors) |
| CD34 = alle positiv | CD34 = alle positiv | CD34 = alle positiv |

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungsgruppe

Der Antikörper L1 ist seit Anfang der 1980er Jahre Gegenstand aktueller medizinischer Forschung. Maßgeblich beteiligt an der Replikation dieses Antikörpers ist das Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Melitta Schachner-Camartin (Schachner et al. 1983). Im Laufe der Jahre hat es diverse Untersuchungen und Publikationen gegeben, die sich u.a. mit dem Expressionsverhalten unterschiedlicher Tumoren beschäftigt haben. Hier seien nur einige erwähnt: neuroendokrine Pankreas-Tumoren (Kaifi 2006), kleinzelliges Lungenkarzinom (Miyahara 2001), malignes Melanom (Thies 2002), Kolonkarzinom (Gavert 2005), Uterus- und Ovarial-Karzinom (Fogel 2003) uva.. Um L1 als Standardmarker zu etablieren, müssten Multicenter-Studien mit umfangreicheren Kohorten durchgeführt werden, um prospektiv verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

Weitere Tumor-Arten, an denen Marker mit prognostischer Relevanz untersucht wurden, sind das Mammakarzinom (Leathem und Brooks et al., 1996), das Kolonkarzinom (Taylor und Schumacher et al., 1994), Prostatakarzinom (Shirashi et al., 1992), Magenkarzinom (Kakeji et al., 1992), Bronchialkarzinom und Adenokarzinom (Laak et al., 2002). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es keinerlei prognostische Signifikanz für diese Marker gibt. Ihnen wird jedoch unter tumorbiologischen Aspekten eine funktionell größere Bedeutung zugeschrieben. L1 kann jedoch als Progressionsmarker bei Ovarial- und Endometriumkarzinomen angewendet werden (Fogel 2004).

In der vorliegenden Arbeit geht es darum, das Expressionsverhalten von L1 an Neurofibromatose assoziierten Tumoren unterschiedlicher Entität zu untersuchen. Anhand der Ergebnisse sollen ggf. Progressionsmarker und ihre klinische Relevanz abgeleitet werden. In einer anderen immunhistochemischen Untersuchung von Neurofibromatose assoziierten Tumoren wurde auch S100, CD34 und zusätzlich Insulin-like growth Faktor Rezeptor Typ I angewendet (Friedrich 2005; Takeuchi 2001; Khalifa 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 240 Gewebeproben von 60 unterschiedlichen Patienten hinsichtlich ihrer L1-Expression untersucht. Das Verhältnis der ge-

schlechtlichen Verteilung betrug 50:50. Das Alter der Patienten zeigte eine Spannweite von einem Jahr bis 65 Jahre.

In der Untersuchungsgruppe 1 wurden insgesamt 20 Gewebeproben dermal-diffuser Neurofibrome immunhistochemisch untersucht. Von den 20 auf L1 untersuchten Schnitten exprimierten alle deutlich und waren somit L1 positiv. Allerdings gab es in der Menge der angefärbten Zellen durchaus Unterschiede von 20% bis 40%. Insgesamt waren sechs Schnitte mit ca. 20% angefärbt, zehn Schnitte mit ca. 30% und weitere vier Schnitte mit markanteren 40%. Die immunhistochemischen Markierungen verdeutlichen, dass die positive L1-Expression nicht von unterschiedlichen Zellkomponenten ausgeht, die in dermal-diffusen Neurofibromen zu finden sind, sondern ausschließlich von den Schwannschen Zellen und ihren Subpopulationen - auch wenn sie sich mit unterschiedlichen Intensitäten darstellen. Auch Adcock (2004) zeigte in ihrer Untersuchung, dass L1 von den Schwannschen Zellen exprimiert wird und nicht von Astrocyten oder anderen Zellkompartimenten. In dieser Untersuchungsgruppe kommt es nicht nur bei den Schwannschen Zellen zu einer positiven L1-Expression, sondern auch bei den Mastzellen ist eine positive L1-Anfärbung und damit L1-Expression nachweisbar, was bisher noch nicht beschrieben worden ist.

Insgesamt wurden von dem in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe drei weitere Schnitte angefertigt. Ein Schnitt wurde zur histomorphologischen Übersicht HE gefärbt. Die charakteristische Histomorphologie bei dermal-diffusen Neurofibromen weist direkt subepidermal gelegene Knoten eines mäßig zellreichen Tumors aus kompakt bis faszikulär gewachsenen kleinen eosinophilen, wellenförmig konturierten Tumorzellen mit zarten zytoplasmatischen Ausläufern auf. Kleine, mäßig pleomorphe und größenvariate, häufig charakteristisch gebogene und chromatindichte Zellkerne sind typisch. Wichtig ist, dass keine Mitosen erkennbar sind. Ein zweiter Schnitt diente der immunhistochemischen S100-Expression. Ariza (1988) entdeckte in seiner Untersuchung, dass der Marker S100 zum Nachweis der Schwannschen Zellen dient. Sie kommen in vielen Neurofibromen, Schwannomen oder auch malignen peripheren Nervscheiden Tumoren vor. Diese Erkenntnis bedeutete für uns, die Schwannschen Zellen unserer Gewebeproben über die Expression von S100 darzustellen. In der immunhistochemischen Anfärbung der dermal-diffusen Neurofibrome zeigte sich eine homogene satte Anfärbung der jeweiligen Präparate, was mit den Ergebnissen der Arbeit von Ariza (1988) korrespondiert. Der dritte Schnitt wurde für den immunhis-

tochemischen Nachweis der CD34-Expression benötigt. Der Marker CD34 reagierte einmal mit den Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems. Das heißt, Gefäßendothelzellen wurden angefärbt und wie in dieser Arbeit deutlich sichtbar, auch Fibroblasten. Aus der Anfärbung von CD34 lässt sich schlussfolgern, dass weder Endothelien noch Fibroblasten zu einer Expression von L1 führen, dermal-diffuse Neurofibrome allerdings CD34 ausweisen. Das wurde auch im Rahmen einer Untersuchung im Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf belegt. Friedrich et al. untersuchten an peripheren Nervscheiden Tumoren bei Neurofibromatose Typ 1 die Expression von Insulin-like growth Faktor Rezeptor Typ I (Friedrich 2005). Auch hier kam es zu einer deutlichen Anfärbung der Gefäßendothelzellen und Fibroblasten. Im Gegensatz zu unserem Vorgehen wurden hier die perineuralen Fibroblasten mit EMA angefärbt. In allen Präparaten ließ die deutlich positive Anfärbbarkeit Rückschlüsse auf eine Expression von IGF-IR in perineuralen Fibroblasten von Neurofibromen zu.

In der Untersuchungsgruppe 2 wurden insgesamt 23 Gewebeproben plexiformer Neurofibrome immunhistochemisch untersucht. Von den 23 auf L1 untersuchten Schnitten waren alle L1 positiv. Allerdings war die Anzahl der angefärbten Zellen deutlich niedriger als in der Untersuchungsgruppe 1. Bei den meisten der 23 Präparate war eine Anfärbung auf L1 von ca. 1% bis 2% erkennbar; bei wenigen lag die Färbung bei ca. 5%. Daraus resultiert die Frage, ob die geringe Anzahl an Zellen, die L1 exprimieren, dafür verantwortlich ist oder ob sich die Fähigkeit der L1-Expression bei plexiformen Neurofibromen verliert? Sollte der Grund in der reduzierten Zellzahl liegen, so muss man von einer 100%igen L1-Expression der vorhandenen Schwannschen Zellen sprechen. Für eine genauere quantitative Bestimmung sollte man entweder alle im Sichtfeld erkennbaren Zellen zählen und zur Menge der angefärbten Zellen ins Verhältnis setzen; oder die Untersuchung mit einem ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) erweitern, mit dem das quantitative Ausmaß noch genauer zu evaluieren ist. Durch die photometrische Bestimmung der Immunkomplex gebundenen Markerenzyme wäre eine exakte Mengenangabe der L1 angefärbten Zellen möglich. Die L1-Expression ist auch bei Mastzellen plexiformer Neurofibrome positiv. Auch für die Untersuchung der plexiformen Neurofibrome wurden ähnlich wie in der Untersuchungsgruppe 1 insgesamt drei weitere Schnitte von dem in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe angefertigt. Ein Schnitt wurde wie bereits oben beschrieben HE gefärbt,

um eine histomorphologische Übersicht zu erhalten. Verglichen zu den dermal-diffusen Neurofibromen konnten mehrere von Perineurium umgebene Knoten einer zellarmen, bindegewebsreichen Neoplasie aus länglichen und wellenförmig konturierten Tumorzellen mit Infiltration des Binde- und Fettgewebes konstatiert werden. Die Tumorzellkerne sind rund-oval, teils kommaartig gebogen und haben ein mitteldichtes Heterochromatin. Auch hier sind keine Mitosen erkennbar. Ein zweiter Schnitt diente der immunhistochemischen Untersuchung der S100-Expression und ein weiterer zur Darstellung der CD34-Expression. In der immunhistochemischen Reaktion auf CD34 und S100 der plexiformen Neurofibrome zeigte sich eine satte, homogene Anfärbung der jeweiligen Präparate, was mit den oben beschriebenen Ergebnissen der Untersuchungsgruppe 1 übereinstimmt. Damit wurde auch bei den plexiformen Neurofibromen anhand von CD34 deutlich, dass reichlich Fibroblasten und Gefäße in den einzelnen Präparaten vorhanden waren. Das gleiche traf hier auch für das Vorhandensein von Schwannschen Zellen zu, was die satte, homogene Darstellung von S100 bestätigte. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen dermal-diffuser und plexiformer Neurofibrome nur in einem einzigen Punkt unterscheiden: im quantitativen Expressionsverhalten von L1. Darüber hinaus gab es beim Expressionsverhalten von S100 und CD34 in beiden Untersuchungsgruppen keinen signifikanten Unterschied.

In der Untersuchungsgruppe 3 wurden insgesamt 17 Gewebeproben maligner peripherer Nervscheiden Tumoren immunhistochemisch untersucht. Histomorphologisch definiert sich der maligne periphere Nervscheiden Tumor mit erhöhter Zellularität und ausgedehnten, landkartenförmigen Nekrosearealen. Die Zellen sind unscharf voneinander abgegrenzt mit runden bis länglich mittelbreiten, mäßig eosinophilem Zytoplasma. Hochgradige Kernpleomorphie neben runden, mittelgroßen bis großen Kernen auch nierenförmigen, kantigen, hammerförmigen und zigarrenförmigen Kernen. Die Kerne weisen ein mitteldichtes bis helles, überwiegend fein- bis mittelgrobes Heterochromatin auf, in dem sich immer wieder kleine und vereinzelt auch größere Nukleoli finden. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Tumoren sind hier viele Mitosen typisch. Von den 17 auf L1 untersuchten Schnitten reagierten zehn ohne positive Anfärbung auf L1. Das heißt, dass die meisten Schnitte kein L1 exprimierten und somit negativ waren. Vier weitere Präparate zeigten eine ausgeprägtere L1-Expression, die bei ca. 10% und mehr lag. Sehr interessant waren die Ergebnisse bei drei malignen

peripheren Nervscheiden Tumoren, die L1 mit ca. 80% und mehr darstellten. Bei genauerer Betrachtung dieser Präparate erkennt man, dass es in besser differenzierten Abschnitten des Tumors zu einer positiven Darstellung von L1 kam.

Diese Beobachtung gehört zu den wesentlichen Erkenntnissen unserer Untersuchung und sollte durch Folgeuntersuchungen genauer evaluiert werden. Wird dabei unsere Hypothese fundiert untermauert, dass es in besser differenzierten Abschnitten des Tumors zu einer positiven Darstellung von L1 kommt, könnte daraus tatsächlich ein Prognose- oder auch Progressionsmarker abgeleitet werden. Diese Beobachtung müsste allerdings mit dem klinischen Verlauf des jeweiligen Patienten in Verbindung gebracht werden, denn schließlich sollte auch ein Prognosefaktor Einfluss auf den klinischen Verlauf einer Erkrankung haben.

Die Vorgehensweise in dieser Untersuchungsgruppe war identisch zu denen der anderen Untersuchungsgruppen. Um zu evaluieren, welche Zellpopulationen ggf. L1 exprimieren, wurden jeweils ein Schnittpräparat mit S100 und eins mit CD34 gefärbt. Bei der Anfärbung mit CD34 zeigte sich auch hier, dass der Marker CD34 einmal mit Gefäßendothelzellen und wie gehabt mit Fibroblasten reagierte. Aufgrund der reichlichen Kapilarisierung kam es zu einer satten CD34 Expression. Auch hier wurde wie in den beiden oben beschriebenen Untersuchungsgruppen von dem jeweiligen Paraffinblock ein HE-Schnitt angefertigt. In der Untersuchungsgruppe der malignen peripheren Nervscheiden Tumoren konnte man überwiegend eine kräftige und satte Färbung mit S100 erkennen. Allerdings wurde auch deutlich, dass sich durch die maligne Entartung das Vorhandensein der Schwannschen Zellen veränderte. Die Darstellung der S100-Expression war in einigen Tumorarealen im Vergleich zu den dermal-diffusen und plexiformen Neurofibromen weniger homogen. Somit zeigte sich, ähnlich wie bei der Expression von L1, auch bei S100 ein verändertes Expressionsverhalten abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors. Hier könnte man ebenfalls die Hypothese aufstellen, dass die maligne Entartung zum malignen peripheren Nervscheiden Tumor zu einer Veränderung von Zellstrukturen führt. Durch diese Transformation kommt es zu einer Abweichung der eigentlichen Zellfunktion und damit zum Verlust bzw. zu einer deutlichen Veränderung des Expressionsverhaltens, insbesondere bei S100 und L1. Die S100-Expression wird in der Literatur mit 50-70% beschrieben, was sich mit den Ergebnissen unserer Untersuchung deckt. Auch die Beobachtung, dass die Anzahl der S100 positiven Zellen bei malignen peripheren Nervscheiden Tumoren geringer ist

als bei benignen Schwannomen bzw. Neurofibromen (Scheithauer 1999) wird durch unsere Untersuchung bestätigt. Dieses Ergebnis sollte wie die oben beschriebene Veränderung der L1-Expression durch weitere Untersuchungen präziser geklärt werden. Dabei könnte es etwaige Parallelen zur Hypothese geben, dass besser differenzierte Abschnitte des Tumors L1 positiver darstellen und stärker S100 exprimieren. Würde man diese Annahme verifizieren, könnten zukünftig eventuelle Prognosefaktoren für den klinischen Verlauf der Erkrankung diversifizierter aufgenommen und diese dadurch spezifischer definiert werden.

Diese Hypothese verhält sich umgekehrt proportional zu den Ergebnissen einer Untersuchung der L1-Expression bei schlecht differenzierten, neuroendokrinen Pankreas-Karzinomen. Kaifi et al. (2006) zeigten in einem ähnlichen Versuchsaufbau, dass von 63 untersuchten Pankreas-Karzinomen neun schlecht differenziert waren und nur vier von ihnen L1 darstellten. Lediglich ein gut differenzierter Tumor sprach auf L1 an. Somit protokollierte diese Messreihe ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen der L1-Expression und dem Differenzierungsgrad eines Tumors, wenn auch in einem umgedrehten Verhältnis verglichen zu unseren Ergebnissen.

Eine weitere Untersuchung (Thies et al. 2002) versuchte anhand der L1-Expression eine Verbindung zur Metastasierung maligner Melanome darzustellen. Dabei wird die L1-Expression der Expression von α 2,3 Sialinsäure gegenübergestellt, die als Ligand von L1 fungiert. Diese bindet an der Siglec Domäne von L1. Insgesamt wurden 100 maligne Melanome immunhistochemisch auf ihre L1-Expression untersucht. Kaplan-Meiers Analysen, die auf das Überleben der Patienten fokussierten, bescheinigten eine signifikant positive Assoziation zur schlechten Prognose bei der Bindung von L1 ebenso wie seiner exprimierten Menge. Darüber hinaus zeigte L1 bei einer intensiven Expression eine tendenziell schlechtere Prognose auf. Das Expressionsverhalten beider stimmte nicht mit der Klassifizierung der histologischen Subtypen überein. Damit ist L1 ein unabhängig prognostischer Marker.

Durch die Expression von L1 und der gefundenen Glykostrukturen kann die Einschätzung des individuellen Metastasierungsrisikos für den Patienten deutlich verbessert werden. Da L1 in die Metastasierungskaskade involviert ist, ergeben sich mögliche Ansatzpunkte für Therapien.

In diesem Zusammenhang steht ein anderer denkbarer Interpretationsansatz zur L1-Expression: Die Tumormetastasierung wird durch die Expression des Zelladhäsi-

onsmoleküls L1 positiv beeinflusst, da im ersten Schritt der Metastasierungskaskade metastatische Zellen aus der Tumormasse abgelöst werden. Für diese Ablösung ist eine Herabregulierung oder Mutation von Zelladhäsionsmolekülen zu einem nicht-funktionellen Stadium erforderlich. Alle weiteren Schritte der Metastasierungskaskade beinhalten aber Zell-zu-Zell- und/oder Zell-zu-Matrix-Interaktionen zwischen den metastatischen Zellen und dem Wirtsgewebe, die eine Hochregulation oder Neoexpression von Zelladhäsionsmolekülen benötigen. Da L1 entscheidend durch die Invasion von Tumorzellen in das Gefäßendothel beeinflusst wird (Schedding und Brunner et al. 2004), lässt eine L1-Expression – unabhängig ihrer Intensität – vermuten, dass L1 auch in diesem Stadium der Metastasierungskaskade von malignen peripheren Nervscheiden Tumoren eine Rolle spielen könnte. Ein wichtiger Schritt innerhalb der Metastasierung ist die Anheftung der malignen Zellen an das Gefäßendothel des Zielorgans der Metastasierung und die daran anschließende Extravasation in das Interstitium. Vor diesem Hintergrund ließe sich darüber spekulieren, ob eine L1-vermittelte Anheftung der malignen Zellen an das Gefäßendothel den Metastasierungsprozess beim malignen-peripheren-Nervscheiden-Tumor unterstützt. Da L1 auch das Einwachsen von Tumorblutgefäßen in den Tumor fördert, würde zusätzlich die These bestätigt, dass L1 die späteren Schritte des Metastasierungsprozesses beeinflusst.

Neben seiner Funktion als zellmembrangebundenes Adhäsionsmolekül kann L1 auch von der Zellmembran sezerniert und in der extrazellulären Matrix deponiert werden (Beer et al. 1999; Martini und Schachner 1988). Das sezernierte L1 ist funktionsfähig und unterstützt die integrinvermittelte Zelladhäsion und Migration (Schedding und Brunner et al. 2004; Beer et al. 1999). Hieraus lässt sich eine weitere mögliche Rolle von L1 als Matrix-Bestandteil ableiten: Durch die Sekretion von L1 könnten die malignen peripheren Nervscheiden Tumoren ihre extrazelluläre Umgebung modifizieren. Das wäre für eine integrin- bzw. L1-vermittelte Tumorzellmotilität von Bedeutung, da auch die Expression von Integrinen auf den Zellen mit einer Tumorprogression assoziiert ist (Siletti et al., 2000; Taooka et al., 1999). Daraus resultiert möglicher Weise eine doppelte Funktion von L1 innerhalb der Metastasierung von malignen peripheren Nervscheiden Tumoren: und zwar als Zelladhäsionsmolekül und als Substrat-Adhäsionsmolekül, das somit auch die Metastasierungskaskaden bedingt.

Das Neurofibrom und das Schwannom gehören zu den am häufigsten auftretenden benignen peripheren Nervscheiden Tumoren. Beim malignen peripheren Nervscheiden-

den Tumor handelt es sich um eine Diagnose, der man im klinischen Alltag selten begegnet. Maligne Tumoren, die von einem peripheren Nerven ausgehen oder eine Nervscheidendifferenzierung erkennen lassen, werden definitionsgemäß als maligner-peripherer Nervscheiden-Tumor eingestuft. Die synonym verwendeten Begriffe „neurogenes Sarkom“, „Neurofibrosarkom“ und „malignes Schwannom“ sollten vermieden werden, da maligne periphere Nervscheiden Tumoren nur in seltenen Fällen aus primär benignen Schwannomen entstehen und auch keine mesodermalen Anteile enthalten (Stark 2002). Diese Tumoren sind mit einer Inzidenz von 0,001% sehr selten, stellen allerdings 5-10% aller malignen Weichteiltumoren dar. Neben einer „de novo“ Genese und der Entstehung aus benignen Vorstufen sind häufig insbesondere Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 von einer malignen Entartung betroffen. Die genaue Zahl liegt zwischen 4-5% (Ducatman 1983). Maligne periphere Nervscheiden Tumoren finden sich bevorzugt am Rumpf (ca. 50%), seltener an den Extremitäten (ca. 30%) und am Kopf-Hals-Bereich (ca. 20%) (Woodruff 1994). Als gesicherter Risikofaktor wird neben der bestehenden Neurofibromatose eine vorangegangene Bestrahlungstherapie aufgrund einer anderen malignen Grunderkrankung angesehen (Ducatman 1983). Die Prognose dieser Erkrankung ist als schlecht einzustufen. Die 5-Jahre-Überlebensrate wird mit ca. 50% angegeben. Die hohe Fernmetastasierungsrate von ca. 50-80% ist ein weiterer Punkt für die schlechte Prognose. Metastasen sind überwiegend in der Lunge und Leber, den Lymphknoten und Knochen, im Weichgewebe, den Nieren, Nebennieren, im Gehirn sowie in den Ovarien zu finden (Arpornchayanon 1984, Ducatman 1983, 1986).

Aufgrund der eher unspezifischen Symptomatik, die bei Kindern zudem wesentlich schlechter bis gar nicht anamnestisch zu erheben ist (Friedrich et al. 2007), ist die Früherkennung der Erkrankung anhand klinischer Angaben fast nicht möglich. Auch moderne Diagnostiken lassen keine frühzeitige Differenzierung eines benignen Neurofibroms von einem malignen-peripheren Nervscheiden-Tumor zu. Mautner (2007) beschreibt, dass die Diagnostik benigner oder maligner Tumoren weder mit Hilfe eines PET (Positronen- Emissions-Tomographie) noch durch ein MRT (Magnet-Resonanz-Tomogramm) erfolgreich ist. Als Ultima Ratio des therapeutischen Vorgehens ist die radikale, chirurgische Intervention das Mittel der Wahl. Bei geeigneter Lokalisation, z.B. bei Extremitäten, ist eine Amputation zur kurativen Behandlung zu erwägen, um das hohe Risiko (ca. 50%) eines Lokalrezidivs deutlich zu reduzieren (Kunisada 1997;

Wong 1998). Eine effektive Chemotherapie gibt es bisher noch nicht und eine Bestrahlungstherapie wird sehr kontrovers diskutiert (Mundt 1995; Mautner 2007).

Somit wäre es wünschenswert, einen Marker zu finden, der frühzeitig zur Einschätzung klinischer Verläufe und ihren Entwicklungen herangezogen werden kann. Idealerweise sollten Veränderungen benigner Nervscheiden Tumoren sensitiver erfasst und so in ihrem Verlauf beherrschbarer werden. Um Veränderungen immunhistochemisch zu erfassen, ist eine chirurgische Intervention vorauszusetzen. Insgesamt sollte man sich stärker der Entstehung und dem Verlauf der Neurofibromatose insbesondere des malignen peripheren Nervscheiden Tumors widmen, da hier die therapeutischen Optionen sehr einseitig ausgerichtet sind und sich in den letzten Jahrzehnten nicht signifikant verbessert haben. Deshalb müssen alle nur erdenklichen Wege gegangen werden, damit Bewegung in die Diagnostik und dadurch ggf. auch in die Therapie von Neurofibromatose assoziierten Tumoren kommt.

Zu den hier beschriebenen und diskutierten Ergebnissen sind wir auf verschiedenen Wegen gelangt. Die ersten immunhistochemischen Färbungen haben wir manuell umgesetzt. Dabei hat es sehr lange gedauert, bis die L1-Expression dargestellt werden konnte. Anfänglich reagierten die Gewebeproben gar nicht, so dass wir befürchten mussten, dass die immunhistochemische Anfärbung von L1 bei Neurofibromatose assoziierten Tumoren nicht funktionieren würde. Nach wiederholten Versuchen und Korrekturen der Konzentrationen der jeweiligen Reagenzien und der verwendeten Antikörper gelang es, ein reproduzierbares Protokoll zu erstellen. Aufgrund der schrittweise gefärbten Präparate zeigten sich Unterschiede im Färbemuster. Daraufhin entschieden wir uns, die Expression von S100 und CD 34 bei allen vorliegenden Gewebeproben zu untersuchen. Dafür suchten wir eine Methode, mit der man alle Präparate zeitnah und unter gleichen Bedingungen färben kann, um möglichst genaue Verhältnisse zu erreichen. Unter dieser Prämisse hielten wir eine automatische Färbemethode mit dem Färbeautomaten Techmate 500 Plus der Firma DAKO für geeignet. Ein Vorteil der automatischen Färbung ist, dass individuelle und mechanische Fehler im Vergleich zum manuellen Verfahren vermieden werden können. Natürlich bringen Färbeautomaten andere Probleme mit sich, verglichen zur manuellen Vorgehensweise. Bei den automatischen Systemen kommen in der Regel zwei Methoden zum Einsatz: das horizontale Färbesystem und das vertikale Kapillarsystem. In Absprache mit der Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Sauter), die

beide Systeme routinemäßig einsetzt, haben wir uns für das vertikale Kapillarsystem entschieden, da es nicht wie das horizontale Färbesystem das mechanische Prinzip kopiert. Die Vorbehandlung der Proben, z.B. mit der Mikrowelle oder auch die enzymatische Demaskierung, wurde trotz allem außerhalb des Färbeautomaten manuell durchgeführt. Dabei kommt es nicht selten zu Fehlern, besonders bei der genauen Anwendung von enzymatischen Lösungen in Verbindung mit Hitze, um maskierte Epitope wieder freizulegen und somit in ihre ursprüngliche Konfiguration zu überführen. Auch Veränderungen im Bereich der Epitope führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Deshalb ist bei empfindlichen Untersuchungen wie der Immunhistochemie sorgfältig darauf zu achten, dass alles „aus einem Guss ist“ und nicht etablierte Färbeprotokolle unterschiedlicher Quellen miteinander kombiniert werden. Aus diesem Grund sollte alles in einer Hand bleiben, um eine valide Aussage zu gewährleisten.

4.2 Ausblick

Um L1 als Standardmarker zu etablieren, müssten Multicenter-Studien mit umfangreicheren Kohorten durchgeführt werden, die prospektive Ergebnisse garantieren. Dabei könnten verschiedene Beobachtungen dieser Untersuchung weiter ausgebaut werden, um Hypothesen zu untermauern oder auch zu verwerfen.

Zu einer der wesentlichen Erkenntnisse dieser Untersuchung gehört, dass es in besser differenzierten Abschnitten des Tumors, insbesondere des malignen peripheren Nervscheiden Tumors zu einer positiven Darstellung von L1 kommt. Diesem Punkt sollte in weiteren Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen nachgegangen werden, um ihn genauer zu evaluieren.

Weiterhin empfiehlt es sich, die Ergebnisse mit klinischen Angaben zu begleiten wie z.B. Metastasierung ja/nein, Metastasierungsintervall oder Kaplan-Meier Analysen, um Überlebensraten zu erfassen. Schließlich sollte auch ein Prognosefaktor Einfluss auf den klinischen Verlauf einer Erkrankung haben.

Eine andere Option wäre die genauere Betrachtung des Metastasierungsverhaltens der malignen peripheren Nervscheiden Tumoren unter besonderer Berücksichtigung der L1-Expression und ggf. der Expression von α 2,3 Sialinsäure im Hinblick auf eventuelle Verbindungen oder sogar Abhängigkeitsverhältnisse.

Auch die Frage, ob das Expressionsverhalten von S100 vom Differenzierungsgrad des Tumors abhängt und in Beziehung zum Expressionsverhalten von L1 steht, ist ein interessanter Untersuchungsgegenstand. Dabei könnten Doppelfärbungen von S100 und L1 versucht werden.

Zu guter Letzt würde sich auch eine genauere Untersuchung plexiformer Neurofibrome mit deutlichen Atypien unter dem Gesichtspunkt einer eventuellen malignen Entartung anbieten.

Um die Frage zu klären, ob dermal-diffuse Neurofibrome tatsächlich mehr L1 exprimieren als plexiforme Neurofibrome, sollte hier mit einer ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) Untersuchung weiter vorgegangen werden. Durch die photometrische Bestimmung der Immunkomplex gebundenen Markerenzyme könnte man zur Menge der L1 angefärbten Zellen präzisere Angaben machen.

Um tatsächlich die L1-Expression der Mastzellen zu unterstreichen, müsste man Mastzellen z.B. mit einer c-Kitt Färbung darstellen oder in einer Doppelfärbung mit S100.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Expressionsverhalten des Zellerkennungsmoleküls L1 an Neurofibromatose assoziierten Tumoren unterschiedlicher Entität immunhistochemisch untersucht. Alle Tumorproben stammten aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Nordwestdeutsche Kieferklinik) im Kopf- und Hautzentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und lagen in Paraffinblöcken im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vor.

Insgesamt wurden 240 Schnittpräparate aus 60 Tumorproben von unterschiedlichen Patienten angefertigt, in drei Untersuchungsgruppen eingeteilt und immunhistochemisch analysiert. Neben der L1-Expression wurde von jeder Tumorprobe weiterhin die CD34 und S100-Expression dargestellt. Zur histomorphologischen Übersicht wurde weiterhin von jeder Tumorprobe ein HE- Schnittpräparat angefertigt.

- ▶ Untersuchungsgruppe 1 = 20 dermal-diffuse Neurofibrome
- ▶ Untersuchungsgruppe 2 = 23 plexiforme Neurofibrome
- ▶ Untersuchungsgruppe 3 = 17 maligne periphere Nervscheiden Tumoren

Ziel dieser Arbeit war es das Expressionsmuster von L1 zu evaluieren. Im Fall einer positiven Reaktion sollte nach möglichen Unterschieden im Expressionsverhalten zwischen den jeweiligen Tumorentitäten gesucht werden, aus denen sich klinisch relevante Prognose- und ggf. Progressionsmarker ableiten lassen.

Fast alle untersuchten Tumorproben waren L1 positiv. Auffällig war in der Untersuchungsgruppe 3, dass es in besser differenzierten Abschnitten des Tumors zu einer deutlich positiven Darstellung von L1 kommt als bei schlechter differenzierten Tumoren, die kaum bis gar nicht L1 exprimieren. Auch das Expressionsverhalten von S100 zeigte eine Abhängigkeit zum Differenzierungsgrad des Tumors. Weiterhin wurde deutlich, dass dermal-diffuse Neurofibrome deutlich mehr L1 exprimieren als plexiforme Neurofibrome. Unabhängig der primären Zielstellung der vorliegenden Studie konnte auch nachgewiesen werden, dass Mastzellen L1 exprimieren.

6 Literaturverzeichnis

Abeliovich D, Gelman-Kohan Z, Silverstein S, Lerer I, Chemke J, Merin S, Zlotogora J (1995)

Familial café-au-lait-spots: A variant of neurofibromatosis type 1. *J Med Genet* 32; 12: 985-986

Adcock KH, Brown DJ, Shearer MC, Shewan D, Schachner M, et al. (2004)

Axon behaviour at Schwann cell-astrocyte boundaries: Manipulation of axon signalling pathways and the neural adhesion molecule L1 can enable axons to cross. *Eur J of Neuroscience*; 20: 1425-1435

Ahlbom B, Dahl N, Zetterqvist P, Anneren G (1995)

Noonan Syndrome with café-au-lait-spots and multiple lentiginos Syndrome are not linked to the Neurofibromatosis Type 1 locus. *Clinical Genetics* 48; 2: 85-89

Akensinde M (1768)

Observations on Cancers. *Med Trans, London*; 1: 64-92

Allanson JE, Upadhyaya M, Watson GH, Partington M, MacKenzie A, Lahey D, MacLeod H, Sarfarazi M, Broadhead W, Harper PS, Huson SM (1991)

Watson-Syndrome: Is it a subtype of type 1 neurofibromatosis? *J Med Genet* 28; 11: 752-756

Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H (2005)

The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res*; 3: 1190-7

Ariza A, Bilbao JM, Rosai J (1988)

Immunohistochemical detection of epithelial membrane antigen in normal perineurial cells and perineurioma. *Am J Surg Pathol* 12; 9: 678-683

Arpornchayanon O, Hirot T, Itabashi M, Nakajima T (1984)

Malignant peripheral nerve tumors: A clinicopathological and electron microscopic study. *Jpn J Clin Oncol*; 14: 57-74

Avizonis P (1927)

Zur Frage über den Zusammenhang der einseitigen Elephantiasis des Oberlides mit Erweiterung der Sella Turica. *Z Augenheilkd*; 63: 235-241

Bader JL (1986)

Neurofibromatosis and Cancer. *Ann NY Acad Sci*; 486: 57-65

Bahusi M, Midkiff BR, Gates AM, Richter M, Schachner M, Maness PF (2003)

Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration. *J of Biol Chem*; 278: 25024-25031

Bahuau M, Flinthoff W, Assouline B, Lyonnet S, Le-Merrer M, Prieur M, Guilloud-Bataille M, Feingold M, Munnich A, Vidaud M, Vidaud D (1996)

Exclusion of allelism of noonan syndrome and neurofibromatosis association. *Am J Med Genet*; 66: 347-353

Barker D, Wright E, Nguyen K, et al. (1992)

Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosom 17. *Science*; 236: 1100-1102

Bernreuther C, Dihne M, Johann V, Schiefer J, Cui Y, Hargus G, Schmid JS, Xu J, Kosinski CM, Schachner M (2006)

Neural Cell Adhesion Molecule L1-Transfected Emryonic Stem Cells Promote Functional Recovery after Excitotoxic Lesion of the Mouse Striatum. *J of Neuroscience*; 26(45): 11532-11539

Blaess S, Kammerer RA, Hall H (1998)

Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interactions with alpha(v)beta3, alpha(IIb)beta3, and alpha5 beta1 integrins. *J Neurochem*; 71: 2615-2625

Bolande RP (1974)

The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest development. *Hum Pathol*; 5: 409-429

Bolande RP (1981)

Neurofibromatosis: The quintessential neurocristopathy: Pathogenetic concepts and relationships. *Adv Neurol*; 29: 67-75

Borberg A (1951)

Clinical and genetic investigations into tuberous sclerosis and Recklinghausen's neurofibromatosis typ I. *Acta Psychiatr Neurol Scand*; 71: 1-239

Bouzas EA, Mastorakos G, Chrousos GP, Kaiser-Kupfer MI (1993)

Lisch nodules in cushing's disease. *Arch Ophthalmol*; 111: 439-440

Casselmann ES, Miller WT, Lin SR, Mandell GA (1977)

Von Recklinghausen's disease: Incidence of roentgenographic findings with a clinical review of the literature. *Crit Rev Diagn Imaging*; 9: 387-419

Charrow J, Listerick R, Ward K (1993)

Autosomal dominant multiple café-au-lait-spots and neurofibromatosis 1: Evidence of non-linkage. *Am J Med Genet*; 45: 606-608

Chou DK, Ilyas AA, Evans JE, Costello C, Quarles RH, Jungalwala FB (1986)

Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy. *J Biol Chem*; 261: 11717-11725

Clark RD (1994)

Proteus syndrome. In: Huson SM, Hughes RAC *The neurofibromatoses: A pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall Medical, London, 1994

Civin CI, Trischmann TM, Fackler MJ, Bernstein ID, Bühring HJ (1989)

Report of the CD34 Cluster Workshop. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference. Oxford University Press: 818-25

Civin CI, Strauss LC, Fackler MJ, Trischmann TM, Willey JM, Loken MR (1990)

Positive stem cell selection – basic science. *Prog Clin Biol Res*; 333: 387-402

Crossin KL, Krushel LA (2000)

Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn*; 218: 260-279

Crowe FW, Schull WJ (1993)

Diagnostic importance of café-au-lait-spot in neurofibromatosis. *Arch Intern Med*; 91: 758-766

Crowe FW, Schull WJ, Neel JV (1956)

A clinical, pathological and genetic study of multiple neurofibromatosis. Charles C Thomas, Springfield, Illinois

Crowe FW (1964)

Axillary freckling as a diagnostic aid in neurofibromatosis. *Ann Intern Med*; 61: 1142-1143

Curtin JP, McCarthy SW (1997)

Perineural fibrous thickening within the dental pulp in type 1 neurofibromatosis. *Oral Radiol Endod*; 84: 400-403

De Angelis E, MacFarlane J, Du JS, Yeo G, Hicks R, Rathjen FG, Kenwrick S, Brümmerdorf T (1999)

Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *J Eur Mol Biol Organ*; 18: 4744-4753

DeBella K, Szudek J, Friedmann JM (2000)

Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics*; 105: 608-614

Deichmann M, Kurzen H, Egner U, Altevogt P, Hartschuh W (2003)

Adhesion molecules CD171 (L1 CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas). *J Cutan Pathol*; 30: 363-368

Dercksen MW, Daams GM, de Haas M, van der Schoot CE (1995)

Proceedings of the 5th International Workshop and Conference. Oxford University Press: 850-53

DeVitis LR, Tedde A, Vitelli F, et al. (1996)

Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF 2) gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet*; 97: 632-637

Dihne M, Bernreuther C, Sibbe M, Paulus W, Schachner M (2003)

A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J of Neuroscience*; 23(16): 6638-6650

Di Mario FJ, Bowers P, Jagjivan B, Burleson J, Langshur S, Greenstein RM (1993)

Analysis of skull anthropometric measurements in patients with neurofibromatosis type 1. *Invest Radiol*; 28: 116-120

Donato R (1999)

Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type (review). *Biochem Biophys Acta*; 1450: 191-231

Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reimann HM (1986)

Malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer*; 57: 2006-2021

Ducatman BS, Scheithauer BW (1983)

Postirradiation neurofibrosarcoma. *Cancer*; 51:1028-1033

Evans DGR, Huson SM, Donnai D, et al. (1992)

A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med*; 84: 603-618

Evans DGR, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Theare D, Newton V, Strachan T, Ramesden R, Harris R (1992)

A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the north west of England and the UK: Prevalence, mutation rates, fitness and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet*; 29: 841-846

Evans DGR, Trueman L, Wallace A, Collins S, Stratchan T (1997)

Genotype/phenotype correlations in type 2 neurofibromatosis (NF2): Evidence for more severe disease associated with truncating mutations. *J Med Genet*; 35: 450-455

Ferner RE, Gutmann D (2002)

International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Cancer Res*; 62: 1573-1777

Fogel M, Mechtersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W, Reichrath J, Georg T, Altevogt P, Gutwein P (2003)

L1 adhesion molecule (CD171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Letters*; 189: 237-247

Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P (2003)

L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet*; 362: 869-875

Fogel M, Huszar M, Altevogt P, Ben-Arie A (2004)

L1 (cd171) as a novel biomarker for ovarian and endometrial carcinomas. *Expert Rev Mol Diag* 2004 Jul; 4: 455-62

Francois J, Haustrate L, Philips A (1956)

Hydrophthalmie unilaterale et hypertrophie hemifaciale homolaterale (neurinomatose de von Recklinghausen). *Ann Acul*; 189: 186-187

Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ (1997)

L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet*; 6: 1625-1632

Friedman JM, Birch PH (1997)

Type 1 neurofibromatosis: A descriptive analysis of the disorder in 1.728 patients. *Am J Med Genet*; 70: 138-143

Friedman JM (1999)

Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 89; 1: 1-6

Friedrich RE, Hartmann M, Mautner VF (2007)

Malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1-affected children. *Anticancer Research*; 27: 1957-1960

Friedrich RE, Keiner D, Hagel C (2007)

Expression of insuline-like growth-factor receptor (IGF-1R) in peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1. *Anticancer Research*; 27: 2085-2090

Gachiani J, Kim DH, Nelson A, Kline D (2007)

Surgical management of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neurosurg Focus*; 22: E13

Gachiani J, Kim DH, Nelson A, Kline D (2007)

Management of metastatic tumors invading the peripheral nervous system. *Neurosurg Focus*; 22: E14

Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V (1997)

Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol*; 137: 703-714

Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Zeev A (2005)

L1, a novel target of β -catenin signaling, transforms cells and expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol*; 168: 633-642

Giese M (1995)

Die Veränderung der Kiefer- und Zahnstellung bei Neurofibromatose Typ 1 (Morbus Recklinghausen). *Med Dissertation*; Universität Hamburg

Gil O, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo J, Felsenfeld DP (2003)
Ankyrin binding mediates L1 CAM interactions with static components of cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1 CAM on the cell surface. *J Cell Biol*; 162: 719-730

Goetsch E (1995)

Schädelveränderungen bei Neurofibromatose Recklinghausen. *Fortschr Röntgenstr*; 83: 225-229

Gorlin RJ, Cohen MM Jr, Levin LS (1990)

Syndromes of the head and neck. Oxford University Press, NY, Oxford; 3: 393

Gotz B, Scholze A, Clement A, Joster A, Schutte K, et al. (1996)

Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J Cell Biol*; 132: 681-699

Gupta G, Maniker A (2007)

Malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neurosurg Focus*; 22: E12

Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB (1996)

Neurofibromatosis 2: Loss of merlins' protective spell. *Curr Opin Genet Dev*; 6: 87-92

Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyertz RE, Rubenstein A, Viskochil D (1997)

The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *J Am Med Assoc*; 278: 51-57

Grumet M, Edelmann GM (1988)

Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. *J Cell Biol*; 106: 487-503

Grumet M, Friedlander DR, Edelman GM (1993)

Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun*; 1: 177-190

Gutmann DH, Wood DL, Collins FS (1991)

Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. Proc Natl Acad Sci 88; 21: 9658-9662

Halpern M, Currarino G (1965)

Vascular lesions causing hypertension in neurofibromatosis. N Engl J Med; 29: 248-251

Haspel J, Friedlander DR, Ivgy-May N, Chickramane S, Roonprapunt C, Chen S, Schachner M, Grumet M (2000)

Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/Ng-CAM. J Neurobiol; 42: 287-302

Harkin JC, Reed RJ (1969)

Tumors of the peripheral nervous system. In: Armed forces institute of pathology (ed). Atlas of tumor pathology, second series, Washington DC: 67-106

Harkin JC (1986)

Pathology of nerve sheath tumors. Ann NY Acad Sci; 486: 147-154

Holt JF (1978)

Neurofibromatosis in children. Am J Roentgenol; 130: 615-639

Holt JF, Wright EM (1948)

The radiologic features of neurofibromatosis. Radiology; 76: 647-663

Hortsch M (1996)

The L1 Family of neural cell adhesion molecules: Old proteins performing new tricks. Neuron; 17: 587-593

Huson SM, Harper PS, Compston DAS (1988)

Von Recklinghausen neurofibromatosis: A clinical and populations study in south-east Wales. Brain; 111: 1355-1381

Huson SM (1989)

Recent developments in the diagnosis and management of neurofibromatosis. *Arch Dis Child*; 64: 745-749

Huson SM, Compston DAS, Clark P, Harper PS (1989)

A genetic study of von Recklinghausen's neurofibromatosis in south-east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and the effect of paternal transmission on severity. *J Med Genet*; 26: 704-711

Huson SM, Compston DAS, Harper PS (1989)

A genetic study of von Recklinghausen's neurofibromatosis in south-east Wales. II. Guidelines for genetic counselling. *J Med Genet*; 26: 712-721

Huson SM (1994)

Neurofibromatosis (NF) type 1 and 2. In: Huson SM, Hughes RAC (Hrsg) *The neurofibromatosis: A pathogenetic and clinical overview*. Chapman & Hall Medical, London 1994

Isobe T, Ishioka N, Masuda T, Takahashi Y, Ganno S, Okuyama T (1983)

A rapid separation of S100 subunits by high performance liquid chromatography: The subunit composition S100 proteins. *Biochem Int*; 6: 419

Isobe T, Okuyama T (1978)

The amino-acid sequence of S100 proteins (PAPI-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Bio*; 89: 379

Isobe T, Okuyama T (1981)

The amino-acid sequence of the tryptophan-containing subunit (alpha-subunit) of bovine brain S-100 protein. *Eur J Bio*; 116: 79

Jang KA, Choi JH, Sung KJ, Moon KC, Koh JK, Im DJ (1999)

Juvenile chronic myelogenous leukemia, neurofibromatosis 1, and xanthoma. *J Dermatol*; 26: 33-35

Jenkins SM, Bennett V (2001a)

Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol*; 155: 739-746

Jenkins SM, Kizhatil K, Kramarcy NR, Sen A, Sealock R, Bennett V (2001)

FIGQY phosphorylation defines discrete populations of L1 cell adhesion molecules at sites of cell-cell contact and in migrating neurons. *J Cell Sci*; 114: 3823-3835

Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990a)

Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol*; 110: 209-218

Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990b)

The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol*; 110: 193-208

Kahn H, Marks A, Thom H, Baumal R (1983)

Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol*; 79: 341-347

Kaifi JT, Zinnkann U, Yekebas EF, Schurr PG, Reichelt U, Wachowiak R, Fiegel HC, Petri S, Schachner M, Izbicki JR (2006)

L1 is a potential marker for poorly-differentiated pancreatic neuroendocrine carcinoma. *World J Gastroenterol*.12; 1: 94-8

Kaifi J, Heidtmann S, Schurr P, Reichelt U, et al. (2006)

Absence of L1 in pancreatic masses distinguishes adenocarcinomas from poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Anticancer Research*; 26: 1167-1170

Kalus I, Schnegelsberg B, Seidah NG, Kleene R, Schachner M (2003)

The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J of Biol Chem*; 278: 10381-10388

Kamiguchi H, Lemmon V (2000)

Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J Neurosci*; 20: 3676-3686

Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Papoport I, et al. (1998b)

The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci*; 18: 5311-5321

Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V (1998a)

Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci*; 21: 97-125

Kamiguchi H, Lemmon V (1998)

A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J Neurosci*; 18: 3749-3756

Kamiguchi H, Lemmon V (1997)

Neural cell adhesion molecule L1: Signaling pathways and growth cone motility. *J Neurosci Res*; 49: 1-8

Kaufmann D, Krone W, Hochsattel R, Martin R (1989)

A cell culture study on melanocytes from patients with neurofibromatosis 1. *Archives of dermatological research*; 281: 510-513

Kenwrick S, Doherty P (1998)

Neural cell adhesion molecule L1: relating disease to function. *Bio Essays*; 20: 668-676

Khalifa MA, Montgomery EA, Ismiil N, Azumi N (2000)

What are the CD34+ cells in benign peripheral nerve sheath tumors? Double immunostaining study of CD34 and S-100 protein. *Am J Clin Pathol*; 114(1): 123-126

Klammt J (1966)

Neurofibromatose im Kiefer-Gesichtsbereich. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd*; 46: 110-119

Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M (2001)

The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem*; 276: 21656-21663

Kleinsasser O, Brandt P (1959)

Die Knochenveränderungen am Schädel bei Neurofibromatose und ihre Pathogenese. *Acta Neurochi*; 7: 364-376

Knudson AG (1971)

Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 68: 820-823

Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirmacher V, Schachner M, Altevogt P (1992)

Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol*; 22: 1199-1205

Kowitz A, Kadmon G, Verschuere H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M, Schachner M, Schirmacher V, Altevogt P (1993)

Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*; 11: 419-429

Krause DB, Fackler MJ, Clvin CI, May WS (1996)

CD34 structure biology, clinical utility. *Blood*; 87: 1-13

Kretschmar T, Antoniadis G, Heinen C, Börn W, Scheller C, Richter HP, Koenig RW (2007)

Nerve sheath tumor surgery: case-guided discussion of ambiguous findings, appropriateness of removal, repeated surgery, and nerve repairs; *Neurosurg Focus*; 22: E19

Kujat R, Miragall F, Krause D, Dermietzel R, Wrobel KH (1995)

Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract. *Histochem Cell Biol*; 103: 311-321

Kunisada T, Kawai A, Sibley GS, Simon M (1995)

A clinical analysis of malignant schwannoma. *Acta Med Okayama*; 51: 87-92

Le Waldt LT (1933)

Congenital absense of the superior orbital wall associated with pulsating exophthalmos. Am J Roentgenol; 30: 756-764

Lammert M, Friedmann JM, Kluwe L, Mautner VF (2005)

Prevalence of neurofibromatosis 1 in german children at elementary school enrollment. Arch Dermatol; 141: 71-74

Lindner J, Rathjen FG, Schachner M (1983)

L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. Nature ; 5: 427-30

Lisch K (1937)

Über Beteiligung der Augen, insbesondere das Vorkommen von Irisknötchen bei der Neurofibromatose (Recklinghausen). Z Augenheilkunde; 93: 137-143

Littlewood AHM, Stilwell JH (1983)

The vascular feature of plexiform neurofibromatoma with some observations on the importance of pre-operative angiography and the value of pre-operative intra-arterial embolism. Br J Plast Surg; 36: 501-506

Locati LD, Guzzo M, Bossi P, Massone PP, Conti B, Fumagalli E, Bareggi C, Cantu G, Licitra L (2005)

Lung metastasectomy in adenoid cystic carcinoma (ACC) of salivary gland. Oral Oncol.41; 9: 890-4

Lohoff W, Zaun T, Boden F (1930)

Über Kieferveränderungen und Störungen in der Zahnanlage bei der Neurofibromatose von Recklinghausen; Universitätsklinik Augustahospital zu Köln

Louis DN, Ramesh V, Gusella JF (1995)

Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatose 2 and related tumors. Brain Path; 5: 163-172

Lutchman M, Rouleau GA (1996)

Neurofibromatosis type 2: A new mechanism of tumor suppression. Trends Neurosci; 19: 373-377

Lynch TM, Gutmann DH (2002)

Neurofibromatosis 1. Neurol Clin NAm; 20: 841-865

Martini R (1994)

Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. J Neurocytol; 23: 1-28

Martini R, Schachner M (1988)

Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. J Cell Biol; 106:1735-1746

Mautner VF, Brenner W, Fünsterer C, Hagel C, Gawad K, Friedrich RE (2007)

Clinical relevance of positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the progression of internal plexiform neurofibroma in NF1. Anticancer Research; 27: 1819-1822

Mautner VF, Laute S, Schneider E, Pulst SM (1991)

Neurofibromatose: Aktuelle klinische und molekulargenetische Aspekte aus nervenärztlicher Sicht. Nervenarzt; 62: 340-348

Mautner VF, Lindenau M, Baser ME, et al. (1996)

The neuroimaging and clinical spectrum of neurofibromatosis 2. J Neurosurg; 38: 880-886

Mautner VF, Lindenau M, Kaufmann D (1995)

Klinik und Genetik der Neurofibromatose. Dt Ärztebl; 92: A-1758-1764 (Heft 24)

Mautner VF, Tatagiba M, Gutshoff R, Samii M, Pulst SM (1993)

Neurofibromatosis in the pediatric age group. Neurosurgery; 33: 92-96

Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, et al. (2001)

Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol*; 155: 1

Michel C, Mühling J, Reuther J, Pistner H (1988)

Zur operativen Behandlung der Neurofibromatose im Gesichtsbereich. In: Schwenzler N, Pfeifer G (Hrsg): Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie Bd.33. Thieme, Stuttgart, New York: 87-89

Miyahara R, Tanaka F, Nakagawa T, Matsuoka K, Isii K, Wada H (2001)

Expression of Neural Cell Adhesion Molecules (Polysialylated Form of Neural Cell Adhesion Molecule and L1-Cell Adhesion Molecule) on Resected Small Cell Lung Cancer Specimens: In Relation to Proliferation State. *J Surg Oncol*; 77: 49-54

Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook, JD, Zhao X, Reisfeld RA (1996)

Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha/beta 3. *J Cell Biol*; 132: 475-485

Moore BW (1965)

A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*; 19: 739

Moore BW (1982)

Chemistry and Biology of the S100 protein. *Scand J Immunol*; 15: 53

Mukherji MM (1974)

Giant Neurofibroma of the head and neck. *Plast Reconstr Surg*; 53: 184-189

Mundt AJ, Awan A, Sibley GS, Simon M (1995)

Conservative surgery and adjuvant radiation therapy in the management of adult soft tissue sarcoma of the extremities: clinical and radiobiological results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 32: 977-985

Nakagawa H, Hori Y, Sato SD, Fitzpatrick TB, Martuza RL (1984)

The nature and origin of the melanin macroglobule. *J Invest Dermatol*; 83: 134-139

Naumann M, Schalke B, Klopstock T, Reichmann H, Lange KW, Wiesbeck G, Toyka KV, Reiners K (1995)

Neurological multisystem manifestation in multiple symmetric lipomatosis: A clinical and electrophysiological study. *Muscle Nerve*; 18: 693-698

Nishio H, Tads J, Hashiyama M, Him J (1997)

CD 34 workshop panel report. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference. Garland Publishing Inc: 974-76

Oleszewski M, Beer S, Katich S, Geiger C, Zeller Y, Raucht U, Altevogt P (1999)

Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J Biol Chem*; 274: 24602-24610

Packer RJ, Gutmann DH, Rubenstein A, Viskochil D, Zimmermann RA, Vezina G, Small J, Korf B (2002)

Plexiform neurofibromas in NF 1: Toward biologic-based therapy. *Neurology*; 58(10): 1461-70

Papadopoulos H, Zachariades N, Angelopoulos AP (1981)

Neurofibroma of the mandible: Review of the literature and report of a case. *Int J Oral Surg*; 10: 293-297

Pape K (1991)

Tumoren des peripheren Nervensystems im Kiefer-Gesichts-Bereich. *Dtsch Stomatol*; 41: 136-139

Preiser SA, Davenport CB (1918)

Multiple neurofibromatosis. *Am J Med Sci*; 156: 507-540

Rappaport HM, Camden NJ (1953)

Neurofibromatosis of the oval cavity. Report of a case. *Oral Surg*; 6: 599-604

Rathjen FG, Schachner M (1984)

Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J*; 3: 1-10

v. Recklinghausen FD (1882)

Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen. Verlag August Hirschwald, Berlin

Riccardi VM (1982)

Neurofibromatosis: Clinical Heterogenetiy. *Curr Probl Cancer*; 7: 1-34

Riccardi VM, Wheeler TM, Pickard LR, King B (1984)

The pathophysiology of neurofibromatosis II. Angiosarcoma as a complication. *Cancer Genet Cytogenet*; 12: 275-280.

Riccardi VM (1992)

Neurofibromatosis. The John Hopkins University Press, Baltimore, London; 2: 30-32, 66, 224-250

Riccardi VM, Lewis RA (1988)

Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: A distinction between predecessors and descendants. *Am J Hum Genet*; 42: 284-289

Rockliffe WC, Parsons JH (1904)

Plexiform neuroma of the orbit. *Trans Path Soc Lond*; 55: 27-39

Rosenbaum TV, Boissy YL, Kombrinck K, et al. (1995)

Neurofibromin-deficient fibroblast fail to form perineurium in vitro. *Development* 121; 11: 3583-3592

Sailer HF, Künzler A, Makek MS (1988)

Neurofibrohämangiomatöse Weichteilveränderungen mit pathognomonischer Unterkieferdeformität. In: Schwenzler N, Pfeifer G (Hrsg) Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie Bd. 33, Thieme, Stuttgart, New York: 84-86

Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, et al. (2002)

L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol*; 157: 1223-1232

Schmid RS, Pruitt WM, Maness PF (2000)

A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J Neurosci*; 20: 4177-4188

Silletti S, Mei F, Sheppard D, Montgomery AMP (2000)

Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Bio*; 149: 1485-1502

Stark A, Hugo H (2002)

Tumoren peripherer Nerven. *Deutsches Ärzteblatt* 99; 14: 920-8

Suter DM, Errante LD, Belotserkovsky V, Forscher P (1998)

The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling. *J Cell Biol*; 141: 227-240

Szudek J, Birch P, Friedman JM (2000)

Growth in North American white children with neurofibromatosis 1 (NF 1). *J Med Genet* 37; 12: 933-938

Tänzer A (1966)

Die Veränderungen am Schädel bei der Neurofibromatosis Recklinghausen. *Fortschr Röntgenstr*; 105: 50-62

Takeuchi A, Ushigome S (2001)

Diverse differentiation in malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis 1: An immunohistochemical and ultrastructural study. *Histopathology* 39; 3: 298-309

Tassabehji M, Strachan T, Sharland M, Colley A, Donnai D, Harris R, Thakker N (1993)
Tandem duplication within a neurofibromatosis type1 (NF1): Gene exon in a family
with feature of watson syndrome and noonan syndrome. *Am J Hum Genet*; 53: 90-95

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

Thor G, Probstmeier R, Schachner M (1987)
Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intes-
tine. *EMBO J*; 6: 2581-2586

Tilesius von Tilenau (1793)
Historia pathologica singularis cutaneae turpitudinis. Jo Godofredi Rheinhardi viri 50
annorum, SL. Crusius, Leipzig

Tinschert S, Gerl H, Gewies A, Jung HP, Nürnberg P (1999)
McCune-Albright Syndrome: Clinical and molecular evidence of mosaicism in an un-
usual giant patient. *Am J Med Genet*; 83: 100-108

Townes PL a. JH (1955)
Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zoo*;
128: 53-120

Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell RR, Duyao MP, et al. (1993)
A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2
tumor suppressor. *Cell*; 72: 1-20

Tsiklakis K, Nikopoulou-Karayianni A (1990)
Multiple neurofibromatosis associated with mandibular growth and facial asymmetry.
Ann Dent; 49: 14-17

Tuvia S, Garver TD, Bennett V (1997)

The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. Proc Natl Acad Sci USA; 94: 12957-12962

Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, et al. (1990)

Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type1 locus. Cell; 62: 187-192

Viskochil D, Carey JC (1994)

Alternate and related forms of the neurofibromatoses. In: Huson SM, Hughes RAC The neurofibromatoses: A pathogenetic and clinical overview. Chapman & Hall Medical, London, 1994

Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, et al. (1995)

Analysis of the neurofibromatose 2 gene reveals molecular variants of Meningeoma. Am J Patho; 146: 827-832

Westphal D, Koblin I (1977)

Zahn- und Kieferbefunde bei Neurofibromatose im Kiefer- und Gesichtsbereich. Dtsch Zahnärztl Z; 32: 418-420

Wilson D, Boland J (1994)

Sporadic multiple lipomatosis: A case report and review of the literature. WV Med J; 90: 145-146

Wilson TM (1907)

The conductivity of blood in coagulation. Biochem J; 2: 377-82

Winkelbauer A (1927)

Die Veränderungen am Schädelskelett bei der Neurofibromatosis. Dtch Z Chir; 205: 231-257

Wong W, Hirose T, Scheithauer BW, Schild SE (1998)

Malignant peripheral nerve sheath tumor: Analysis of treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 42: 351-360

Woodruff JM, Selig AM, Crowley K, Allen PW (1994)

Schwannoma (neurilemoma) with malignant transformation. A rare, distinctive peripheral nerve tumor. *Am J Surg Pathol*; 18: 882-895

Wu R, Legius E, Robberecht W, Dumoulin M, Cassiman JJ, Fryns JP (1996)

Neurofibromatosis type 1: Gene mutation in a patient with features of LEOPARD-syndrome. *Human Mutation*; 8: 51-56

Zanella FE, Mödder U, Benz-Bohm G, Thun F (1984)

Die Neurofibromatose im Kindesalter. *Rofo*; 141: 498-504

Zoller ME, Rembeck B, Akesson HO, Angervall L (1995)

Life expectancy, mortality and prognostic factors in neurofibromatosis type 1. *Acta Derm Venereol*; 75: 136-140

Zoller ME, Rembeck B, Backmann L (1997)

Neuropsychological deficits in adults with neurofibromatosis type 1. *Acta Neuro Scand*; 95: 225-232

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland sowie dem Ärztlichen Direktor der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Rainer Schmelzle für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Marco Blessmann danke ich für seine gute und intensive Betreuung sowie für seine freundliche und inspirierende Art als Betreuer während dieser Arbeit. Für das Bereitstellen der Gewebeproben danke ich Herrn Prof. Dr. med. Viktor Mautner (Neurofibromatose Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf), sowie Prof. Dr. med. Christian Hagel (Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf).

Für die freundliche Unterstützung bei der Labortätigkeit bin ich Dr. med. Alexander Quaas (Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf) zu Dank verpflichtet, ebenso wie Dr. med. Christian Bernreuther (Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf).

Hamburg, im Januar 2008

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Dr. med. dent. Mistakidis Georgios
Geburtsdatum 20. Juli 1973
Geburtsort Iserlohn
Familienstand Ledig

Ausbildungsdaten:

Schulbildung

1981 - 1985 Grundschule Iserlohn
1985 - 1990 Realschule Iserlohn
1990 - 1993 Gymnasium Iserlohn
Juni 1993 Abitur
1981 - 1989 Griechische Schule Iserlohn (Abschluss Mittlere Reife)

Freiwilliges Soziales Jahr

1993 - 1994 Hohenlindkrankenhaus Köln

Hochschulstudium

1994 - 1999 Studium der Zahnmedizin in Hamburg, Abschluss Staatsexamen
2000 - 2006 Studium der Humanmedizin in Hamburg, Abschluss Staatsexamen

Beruf

- 2000 - 2006 Tätigkeit als Zahnarzt in verschiedenen Praxen
- Seit Mai 2006 Weiterbildungsassistent in der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Rainer Schmelzle)

Wissenschaft

- Dezember 2004 Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin an der Universität Hamburg (Thema: Erste Lebensqualitätsmessung bei Patienten mit einem Malignom (T3-oder T4) im Kopf-Hals-Bereich mit einem neu entwickelten Psychometrischen Fragebogen)

Hamburg, im Januar 2008

9 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen habe ich nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht. Ferner habe ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben.

Hamburg, im Januar 2008

