

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. M. Glatzel

**Untersuchung des Hyaluronsäuregehaltes in kutanen und
plexiformen Neurofibromen hinsichtlich einer möglichen
Korrelation mit einer postoperativen Ödembildung**

Dissertation

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

vorgelegt von

Timo Behrens

aus Rotenburg/Wümme

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg am: 19.01.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Ch. Hagel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. R. Friedrich

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
2 Theoretische Grundlagen	6
2.1 Ödementwicklung innerhalb der Wundheilung	6
2.2 Neurofibromatose Typ 1	6
2.2.2 Krankheitsbild	7
2.2.3 Neurofibrome	8
2.3 Die Hyaluronsäure	10
2.3.1 Struktur von Hyaluronsäure	10
2.3.2 Hyaluronsäurefunktion	11
2.3.3 Hyaluronsäurestoffwechsel	12
2.3.4 Hyaluronidasen	12
2.3.5 Abhängigkeit der biologischen Aktivität von Hyaluronsäure von der molekularen Masse	13
2.3.6 Rolle von Hyaluronsäure in der Tumorbiologie	14
2.3.7 Rolle von Hyaluronsäure in der Ödementwicklung	14
2.4 Hyaluronektin	15
2.5 Die Mastzellen	16
2.5.1 Die biologische Funktion der Mastzellen	16
2.5.2 Histamin	17
2.6 Schwann-Zellen	17
2.7 Fibroblasten	18
3 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	19
4 Material und Methoden	20
4.1 Materialien und Reagenzien	20
4.1.1 Affinitätschromatographie	20
4.1.2 Coomassie Blau Färbung	20
4.1.3 Dot Blot Analyse	21
4.1.4 Biotinylierung des Hyaluronsäure-Bindenden-Proteins	21
4.1.5 Immunhistochemie	21

4.1.6	Sonstige Materialien und Geräte	22
4.2	Pufferlösungen und Reagenzien	23
4.3	Patienten und Tumormaterial	25
4.4	Affinitätschromatographische Aufreinigung des Hyaluronsäure-Bindenden-Proteins	25
4.5	Färbung in Coomassie Blau Lösung	27
4.6	Dialyse und Gefriertrocknung der Eluate	27
4.7	Biotinylierung des Hyaluronsäure-Bindenden-Proteins	27
4.8	Darstellung von Fibronectin mittels Dot Blot Verfahren	28
4.9	Immunhistochemie	29
4.9.1	Demonstration von Hyaluronsäure in Tumorgewebe mit biotinyliertem HABP	29
4.9.1.1	Fixation, Paraffinierung und Herstellung der Paraffinschnitte	29
4.9.1.2	Färbeprotokoll DAB Färbung	29
4.9.2	Demonstration der Bindungsspezifität von HABP	30
4.9.2.1	Negativkontrolle	30
4.9.2.2	Positivkontrolle	31
4.9.3	Demonstration der Anzahl und Lage von Fibroblasten und Schwann-Zellen in Relation zu Kollagenfasern und HA	31
4.10	ELISA und Auszählung der Tumor- und Mastzellen	32
4.11	Statistische Auswertung und klinische Parameter	32
5	Ergebnisse	34
5.1	Affinitätschromatographie	34
5.2	Bindungsspezifität des affinitätschromatographisch hergestellten Hyaluronektins	35
5.3	Negativkontrolle	37
5.4	Positivkontrollen	38
5.5	Untersuchungen an Neurofibromen	39
5.5.1	Patienten und Tumore	39
5.5.2	Klinische Beobachtung der postoperativen Ödembildung	40
5.5.3	Einzelfärbung mit Hyaluronektin	40

5.6	Doppelmarkierungen mit Hyaluronektin und S-100, Anti-Fibroblasten-AK und Prokollagen AK	41
5.6.1	Doppelmarkierung mit Hyaluronektin und S-100 AK	41
5.6.2	Doppelmarkierungen mit Hyaluronektin und Anti Fibroblasten Antikörper	42
5.6.3	Markierung mit Prokollagen I C–Peptid Antikörper	43
5.7	Auszählung der Mastzellen	44
5.8	Statistische Auswertung der Ergebnisse	45
6	Diskussion	49
6.1	Hyaluronsäure im Kontext der postoperativen Ödembildung	49
6.2	Mastzellen im Kontext der postoperativen Ödembildung	52
6.3	Hyaluronsäuresynthese in Schwann-Zellen und Fibroblasten	53
6.4	Schwann-Zellen im Kontext der Kollagenproduktion	55
7	Zusammenfassung	57
8	Abkürzungsverzeichnis	58
9	Literaturverzeichnis	60
10	Danksagung	73
11	Lebenslauf	74
12	Eidesstattliche Versicherung	75
13	Anhang	76

1 Einleitung

Die operative Entfernung eines symptomatischen Neurofibroms stellt die Therapie der Wahl bei der Neurofibromatose Typ1 dar. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass die Resektionen einiger Neurofibrome zu erheblichen intra- und postoperativen Schwellungen führten. Die Ödeme entwickelten sich innerhalb von Minuten bis Stunden und persistierten teilweise über mehrere Tage. Das führte zu postoperativen Komplikationen in Form von Nahtdehiszenzen und lokalen Spannungsschmerzen. Zwei pathologische Mechanismen für die Ödementwicklung sind dabei naheliegend. Histamin wird innerhalb des Wundheilungsprozesses oder bei direkter Zerstörung der Zellmembran von Mastzellen und basophilen Leukozyten sezerniert. Das Amin führt nach Bindung an H₁ Rezeptoren des Gefäßendothels zu einer Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität. Nachfolgend kommt es durch den Übertritt von Proteinen in die Extrazellulärmatrix (EZM) und der Veränderung des osmotischen Druckes zum passiven Ausstrom von Wasser. Das Ergebnis ist ein interstitielles Ödem (Stadelmann et al., 1998), dessen Ausprägung beeinflusst wird von der Vaskularisierung des Tumors, der Dichte an Mastzellen und basophilen Leukozyten sowie der Zusammensetzung der EZM im Wundgebiet. Einen wichtigen Bestandteil der EZM bildet Hyaluronsäure (HA) welche aufgrund ihres molekularen Aufbaus in der Lage ist, große Mengen Wasser zu binden. Eine hyaluronsäurereiche EZM im Tumorgewebe könnte somit die Bildung eines interstitiellen Ödems fördern.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die mögliche Rolle des EZM Moleküls Hyaluronsäure bei intra- und postoperativen Schwellungen zu untersuchen und ihre Bedeutung mit der von Mastzellen und anderen Kriterien zu vergleichen. In der Studie wurden Operationspräparate plexiformer und kutaner Neurofibrome von NF1 Patienten untersucht.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Ödementwicklung innerhalb der Wundheilung

Die Wundheilung wird in die Exsudations-, Proliferations-, Regenerations- und Maturationsphase eingeteilt. In den letzten drei Phasen der Wundheilung kommt es im Wesentlichen zu einer Neubildung von Binde- und Epithelgewebe, einer Angiogenese und einer Remodellierung des Gewebes mit Narbenbildung. Die Exsudations- oder Entzündungsphase findet direkt nach der Gewebsverletzung statt und führt zu einer raschen Blutstillung und der Einwanderung von Abwehrzellen (Stadelman et al., 1998). Kurze Zeit nach der für die Hämostase verantwortlichen initialen Vasokonstriktion, führt die thrombozytäre Sekretion von Mediatoren (z.B. PDGF, Serotonin, Bradykadin und Histamin) zu einer Vasodilatation der Gefäße im Wundgebiet (Steed, 1997). Über die Aktivierung der Komplementfaktoren C3 und C5 kommt es zu einer weiteren Freisetzung von Histamin aus basophilen Leukozyten und Mastzellen (Stadelman et al., 1998). Dabei ist das Histamin hauptverantwortlich für die Vasodilatation und die erhöhte Gefäßpermeabilität innerhalb des Wundgebietes. Das führt nicht nur zu einer erleichterten Einwanderung von Leukozyten und anderen Abwehrzellen, sondern auch zum vermehrten Ausstrom von Proteinen in den EZR (Stadelman et al., 1998). Die Erhöhung des extravasalen osmotischen Drucks führt dazu, daß Wasser passiv nachfolgt. Es bildet sich ein interstitielles Ödem.

2.2 Neurofibromatose Typ 1

Die zu den Phakomatosen zählende Neurofibromatose Typ 1 (NF1), auch als periphere Form des M. von Recklinghausen bekannt, tritt als eine autosomal dominante Störung auf. Huson et al. (1989), schätzte die Inzidenz der Träger einer NF1 Mutation bei der Geburt auf ca. 1 zu 2500. Jedoch erscheinen einige Symptome der Erkrankung erst später, so dass eine genaue Schätzung schwierig erscheint (Lammert et al., 2005). Die Prävalenz der NF1 liegt bei 1 zu 3000 was einer Gesamtzahl von ca. 25000 Erkrankten in Deutschland entspricht (Lammert et al., 2005). Der Gendefekt des für die Neurofibromatose Typ 1 verantwortlichen Gens befindet sich auf dem Chromosom 17

(17q11.2) (Ledbetter et al., 1989) und entsteht zu 50 % durch Neumutationen und zu 50 % durch familiäre Vererbung. Die Neumutationsrate des NF1-Gens (ca. 1 Fall auf 10000) ist eine der höchsten Raten unter den menschlichen Genen (Riccardi, 2007). Die Ursache für diese ungewöhnlich hohe Mutationsrate ist noch nicht bekannt. Bei einer vollständigen Penetranz ist die Expression der Störung variabel, und die Ausprägung einer Erkrankung variiert sowohl innerhalb einer Familie als auch bei Individuen unterschiedlicher Familien (Easton et al., 1993). Das Protein, welches durch das NF1-Gen codiert wird, ist Neurofibromin. Es hat eine molekulare Masse von 327 kDa. Obwohl die vollständige Funktion von Neurofibromin noch unklar ist, konnte gezeigt werden, daß es eine GTPase Aktivierende Protein (GAP)-Domäne enthält, welche die Hydrolyse von Ras-GTP zu Ras-GDP reguliert (Xu G et al., 1990; Shen MH et al., 1996).

2.2.2 Krankheitsbild

Daniel von Recklinghausen 1882 fasste erstmals die neurokutanen Symptome zum Krankheitsbild der Neurofibromatose zusammen. Später wurden zahlreiche weitere Manifestationsformen beschrieben. Die Symptomatik der NF1 ist außerordentlich variabel. Für die klinische Diagnosestellung der Neurofibromatose Typ 1 sind mindestens zwei der in der folgenden Tabelle aufgeführten Symptome notwendig. Die klinischen Kriterien lauten wie folgt:

National Diagnostic of Health (NIH) Diagnosekriterien für NF1
1. Mind. 6 Café-au-lait-Flecken, vor der Pubertät >5 mm, nach der Pubertät >15 mm (95%)
2. Axilläre und/oder inguinale sommersprossenartige Pigmentierungen (90%)
3. Mind. 2 Neurofibrome jeden Typs (95%) oder ein Neurofibrom des plexiformen Typs (30%)
4. Zwei oder mehr Irishamartome (Lisch-Knötchen) (70%)
5. Opticusgliom
6. Ossäre Dysplasien (Keilbeinflügel, Ausdünnung der kortikalen Schicht langer Knochen, Pseudoarthrosen, Makrozephalie, Skoliose)
7. Positive Familienanamnese hinsichtlich NF1 (50%)

Tabelle1: Diagnosekriterien der Neurofibromatose Typ 1 (aus Debella et al., 2000), die Häufigkeit der einzelnen Symptome ist in Klammern angegeben.

Eine sichere Diagnose anhand der in Tabelle 1 gezeigten Diagnosekriterien kann ab dem 8. Lebensjahr bei 95 % und ab dem 20. Lebensjahr bei allen Erkrankten gestellt werden (DeBella et al., 2000).

Neben den in der Tabelle 1 genannten Kardinalsymptomen können weitere Symptome auftreten. So sind neben der Sphenoiddysplasie ophthalmologische Manifestationen in Form von Opticusgliomen, Glaukomen oder einer Ptosis beschrieben worden (Tongard, 2006). Bei 16 % der Betroffenen ist ein Minderwuchs bekannt (Roos und Dunn, 1992). Bei 16 bis 25 % aller NF1 Patienten ist ein Makrozephalus beobachtet worden (Riccardi, 1989; Dunn und Roos, 1989), der in 2 bis 5 % der Fälle einen Hydrozephalus als Ursache hat (Riccardi und Eichner, 1986; Afifi et al., 1988). Weiterhin weisen 30 bis 45 % der Patienten eine milde Form einer mentalen Retardierung auf, die im Kindesalter durch Lernschwierigkeiten und Konzentrationsstörungen auffällig wird (Dunn und Roos, 1989; Samuelsson und Riccardi, 1989). 5 bis 7 % der NF1 Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens Tumoren des zentralen Nervensystems in Form von Meningeomen, Astrozytomen oder malignen Schwannomen (Dunn und Roos, 1988). Zusätzlich haben Kinder mit NF1 ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Rhabdomyosarkomen, Wilms Tumoren und Leukämien (Roos und Dunn, 1992). Relativ selten entwickeln NF1 Patienten eine arterielle Hypertonie bei einer Stenose der A. renalis (1 bis 2 %) oder einem Phäochromozytom (0,5 %) (Riccardi, 1989).

2.2.3 Neurofibrome

Neurofibrome sind das charakteristische Merkmal der NF1. Nahezu jeder an NF1 erkrankte Patient entwickelt in seinem Leben ein Neurofibrom. Es handelt sich um gutartige periphere Nervenscheidentumoren (WHO-Klassifikation Grad I), die ein nicht vorhersagbares Wachstumsmuster und eine variable, aber typische zelluläre Zusammensetzung aufweisen (Kluwe et al., 2007). Neoplastische Schwann-Zellen, sowie nicht transformierte Fibroblasten, Mastzellen, perivaskuläre Lymphozyten und Perineurialzellen sind eingebettet in einer myxoiden hyaluronsäurereichen EZM und Kollagenfasern (Sasaki und Onodera, 1990; Kluwe et al., 2007). Kutane Neurofibrome (KNF) können schon während der Kindheit auftreten, entwickeln sich aber häufiger erst während oder kurz vor der Pubertät und sind bei über 90 % der erwachsenen Patienten zu finden. Auch während der Schwangerschaft nehmen KNF häufig an Größe und

Anzahl zu, was für eine hormonelle Modulation sprechen könnte (Dugoff and Sojansky, 1996). Sie entstehen vielfach im Bereich sensibler Nerven und können sowohl exophytisch und lokal begrenzt als auch subkutan diffus wachsen (Packer, 2002). Selten verursachen KNF schwerwiegende neurologische Symptome, können jedoch zu schweren kosmetischen Beeinträchtigungen und starkem Juckreiz führen (Roos und Dunn, 1992). KNF zeigen keine maligne Entartung (Packer, 2002).

Plexiforme Neurofibrome (PNF) werden bei ca. 30 bis 50 % der NF1 Patienten beobachtet (Packer, 2002). Es wird diskutiert, daß es sich bei PNF um kongenitale Läsionen handelt (Korf, 1999). Die Tumore nehmen während der ersten Lebensjahre häufig schnell an Größe zu und können somit schon in der frühen Kindheit zu äußerlichen Entstellungen führen. Der Begriff plexiform bezieht sich auf das Wachstum innerhalb zahlreicher Faszikel eines Nerven und seiner Äste. Dies führt zu einer diffusen strangförmigen Verdickung des betroffenen Nerven (Woodruff, 1999).

Die PNF entstehen vorzugsweise im Bereich des Körperstamms (43 %), der Extremitäten (15 %) und in der Kopf- und Nackenregion (42 %) (Waggoner et al., 2000). Klinisch relevant werden die Tumoren aufgrund von Organinfiltrationen, neurologischen Defiziten, Schmerzen, kosmetischen Beeinträchtigungen und einer Malignisierung. Teilweise führen PNF auch zu einer Stimulation des Wachstums benachbarter Knochen. Daraus können Längendiskrepanzen der Extremitäten oder Knochendysplasien resultieren (Packer, 2002).

Eine kennzeichnende Komplikation der NF1 sind die malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST), die zu einem Großteil aus bereits existierenden PNF entstehen (Hruban, 1990; Kourea, 1998). Die Malignisierung der PNF bildet den Hauptgrund für eine reduzierte Lebenserwartung von NF1 Patienten mit einer mittleren Überlebenszeit von 59 Jahren (Rasmussen et al., 2001). Die MPNST gehören zu den aggressivsten Tumortypen mit einer 5 Jahres Überlebensrate von 34 % (Ducatman et al., 1986). Nach neueren Angaben entwickeln ca. 8-12% der NF1-Patienten im Verlaufe ihres Lebens einen MPNST (Evans et al., 2002)



Abb. 2.2.3: NF1 Patienten mit multiplen kutanen Neurofibromen (A) und einem plexiformen Neurofibrom (B), (Fotos freundlicherweise überlassen von Herrn Prof. Dr. Dr. R.E. Friedrich, Zahn-, Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie).

2.3 Die Hyaluronsäure

2.3.1 Struktur von Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA), das vom Aufbau einfachste aller Glucosaminoglycane, wurde erstmals im Glaskörper des Auges beschrieben (Meyer, 1934). HA unterscheidet sich von anderen Glycosaminoglycanen durch das Fehlen von kovalent gekoppelten Peptiden (Laurent and Fraser, 1992). Es ist ein unsulphatiertes, lineares Polymer bestehend aus den repetitiven Disaccarideinheiten D-Glucuronsäure (β 1,3) und N-acetyl-D-glucosamin (β 1,4). Stabilisiert wird das Molekül durch parallel zur Achse verlaufende Wasserstoffbindungen. Aufgrund seiner helikalen Konfiguration hat das Molekül eine streng spiralförmige Struktur mit einem Windungsradius von 200 nm (Scott, 1989). Die HA-Moleküle bilden in Lösung stark hydrierte zufällig geknickte Spiralen, die sich schon bei einer Konzentration von weniger als 1mg/ml verwinden und dabei sehr belastungsstabil sind (Laurent et al., 1996). Gleichzeitig kommt es durch die Verwindungen zu einer mechanischen Immobilisierung des Wassers innerhalb der Spirale, ohne daß Wasser chemisch an das Polysaccharid gebunden wird (Laurent and

Fraser, 1992). Auch die starke negative Ladung der Moleküle trägt zur Bindung des Wassers bei. Das hydrierte Molekül weist ein 10000fach größeres Volumen auf als das Polymer allein. Dieser Umstand befähigt die HA hoch visköse und elastische Lösungen zu bilden (Paiva et al., 2005).

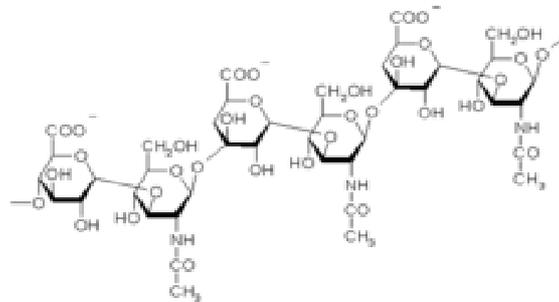


Abb.2.3.1: Die chemische Struktur von Hyaluronsäure. Das Polymer besteht aus den repetitiven Disaccharideinheiten D-Glucuronsäure (GlcUA) und N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc).

2.3.2 Hyaluronsäurefunktion

HA verhindert durch die Bildung von Polysaccharidnetzwerken (s. Kapitel 2.3.1) exzessive Flüssigkeitsverschiebungen innerhalb des Gewebes und besitzt eine hohe osmotische Aktivität, was das Molekül zu einem bedeutenden Regulator der Wasserhomöostase macht (Laurent et al., 1996). HA-Lösungen verhalten sich viskoelastisch. Die Viskosität der Lösung ist scherungsabhängig und steigt exponentiell mit der Konzentration der Hyaluronsäure an (Laurent et al., 1996). Die Elastizität der Lösung steigt ebenfalls mit wachsendem Molekulargewicht und der Konzentration von HA an. Die thixotropen (Senkung der Viskosität bei konstanter Scherbeanspruchung) Eigenschaften des HA werden im Körper genutzt, wo sich Oberflächen gegeneinander bewegen wie an Knorpelflächen in Gelenken, in Schleimbeuteln oder Sehnenscheiden (Fraser et al., 1997).

HA wirkt *in vivo* als eine Diffusionsbarriere und reguliert somit den interzellulären Transport von Substanzen. Es konnte gezeigt werden, dass HA als sterisches Hindernis wirkt. Dabei gilt, je größer das Molekül ist, desto stärker werden Bewegungen von anderen Substanzen behindert. Das gibt dem Molekül die Fähigkeit Proteoglycane wie Aggrecan, Brevican, Neurocan oder Versican am gewünschten Ort zu immobilisieren (Comper and Laurent, 1978). In der Embryogenese werden migrierende und proliferierende Zellen von einer hyaluronsäurereichen perizellulären Schicht umhüllt. Durch Hydratation des umliegenden Gewebes wird eine leicht zu penetrierende

Umgebung geschaffen und somit der Weg für die Embryonalzellen geebnet (Toole, 1997).

2.3.3 Hyaluronsäurestoffwechsel

HA wird an der Innenseite der Plasmamembran produziert. Im Gegensatz zu anderen im Golgiapparat synthetisierten und kovalent an Proteine gebundene Glycosaminoglycanen (GAG), wird das Molekül nach der Synthese in den perizellularen Raum transloziert (Almond et al., 2006). Verantwortlich für die Synthese von HA sind die Hyaluronsäuresynthetasen (HAS). HAS gehören zur Familie der Plasmamembran-assoziierten Glycosyltransferasen. Bisher sind drei unterschiedliche HAS bekannt, die in die Isoenzyme HAS 1-3 unterteilt werden (Camenisch and McDonald, 2000). Itano et al. (1998) haben in ihren Studien demonstriert, daß HAS 1-3 HA von unterschiedlicher Länge und Molekulargewicht synthetisieren. Die Umsatzrate von HA liegt beim Menschen bei 15g täglich (Laurent et al., 1991). Das Polysaccharid wird teilweise lokal metabolisiert oder über das lymphatische System aus dem Gewebe transportiert und zu 90 % in sinusoidalen Endothelzellen der Lymphknoten metabolisiert (Fraser and Laurent, 1997). 85- 90 % der in den Blutkreislauf übergehenden HA wird in der Leber und ca 10 % in der Niere und der Milz verstoffwechselt (Fraser and Laurent, 1997). In sinusoidalen Endothelzellen der Leber wird das Molekül über einen spezifischen Endozytoserezeptor aufgenommen und innerhalb der Lysosomen in die Monosaccharide Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin überführt. Verantwortlich für den Abbau in den Lysosomen sind die Enzyme β -Glucuronidase, β -N-Acetylglucosaminidase und Hyaluronidase (HYAL) (Smedsröd et al., 1990; Forsberg und Gustafson, 1991).

2.3.4 Hyaluronidasen

Die Hyaluronidasen (HYAL) sind spezifische Enzyme der HA. Die im menschlichen Organismus vorkommenden HYAL werden als Endo- β -Acetyl-Hexosaminidasen bezeichnet. Sie katalysieren die Hydrolyse der β 1,4- glycosidischen Bindungen der HA. Es sind sechs humane Gene (HYAL1-4, SPAM1 („sperm adhesion molecule 1“) und PHYAL1 („pseudogene hyaluronidase 1“)) bekannt, die für Hyaluronidase-ähnliche Sequenzen codieren (Stern and Jedrzejewski, 2006). Die verschiedenen Enzyme spalten Hyaluronsäure auf unterschiedliche Art. So führt HYAL-2 durch Abbau hochmolekularer HA zu einem Molekül mit ca. 50 Sacchariden und einem

Molekulargewicht (MG) von ca. 20 kDa, während HYAL-1 das Substrat zu niedermolekularen Oligomeren, hauptsächlich zu Tetrasacchariden abbaut (Stern and Jedrzejak, 2006). HPH-20 ist ein bifunktionales Protein, welches als Hyaluronidase wirkt, aber auch die Penetration der Spermien durch die Cumulus Zellen der weiblichen Eizelle während der Fertilisation vereinfacht (Hunnicutt et al., 1996). Die detaillierten Eigenschaften von HYAL-3 und HYAL-4 sind zurzeit noch nicht bekannt.

2.3.5 Abhängigkeit der biologischen Aktivität von Hyaluronsäure von der molekularen Masse

Zahlreiche Studien haben belegt, daß es einen Zusammenhang zwischen dem MG von HA und seinem biologischen Effekt gibt. Eine Fragmentierung hochmolekularer HA wird bei Entzündungen, der Tumorgenese und Gewebsverletzung vermehrt beobachtet. Dabei spielen sowohl unterschiedliche HYAL-Aktivitäten (Stern, 2003) als auch die Oxidation der HA eine Rolle (Uchiyama et al., 1990). In Untersuchungen an Asthmatikern zeigten Ohkawara et al. (2000), dass HA mit dem MG von 5×10^5 D das Überleben von Eosinophilen im peripheren Blut durch eine Vergrößerung der Expression von „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) verbessert. Zusätzlich kam es zu einer HA assoziierten Induktion der Expression von TGF β mRNA in peripheren Eosinophilen. Hochmolekulare HA (1×10^6 D) hatte dagegen einen wesentlich geringeren Effekt auf die peripheren Eosinophilen. McKee et al. (1996) konnten in Studien an Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose (IPF) demonstrieren, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente in alveolaren Makrophagen zu einer vermehrten Genexpression von Chemokinen und Zytokin IL-8 führen. Termeer et al. (2000) haben in Studien an dendritischen Zellen (DZ) gezeigt, dass HA mit einer definierten Länge von 4-16 Oligosacchariden immunophänotypische Veränderungen in Form einer Hochregulation von Oberflächenmarkern (z.B. CD83 und CD44) hervorruft. Weiterhin wurde bei mit HA behandelten DZ eine zunehmende Fähigkeit zur Stimulation von alloreaktiven T-Zellen gezeigt. Das führte zu einer vermehrten Ausschüttung der Zytokine IL-12, IL-1 β und TNF- α . Bei Untersuchungen mit hochmolekularer HA blieben diese Effekte auf die DZ aus. In Studien von Rooney et al. (1993) wurde gezeigt, daß HA-Fragmente bestehend aus 3-10 Disaccharideinheiten sowohl die Proliferation von Fibroblasten, als auch die Kollagensynthese stimulierten.

Anhand von Hautpräparaten konnte gezeigt werden, daß niedermolekulare HA Fragmente die Proliferationsrate und Kollagensynthese (Kollagentyp I und VIII) von Endothelzellen erhöhten, was zu einer vermehrten Zellmigration und Bildung von Kapillargefäßen führte (Sattar et al., 1994).

2.3.6 Rolle von Hyaluronsäure in der Tumorbiologie

Das Überleben von Krebszellen im Gewebe ist abhängig von zahlreichen Faktoren. Die Adhäsion der Zellen an der Gewebematrix und die Fähigkeit zur Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung ohne von der körpereigenen Immunabwehr zerstört zu werden sind charakteristische Merkmale von malignen Tumorzellen (Delpech et al., 1997). Im Kapitel 2.3.5 wurde bereits die Stimulation der Angiogenese durch niedermolekulare HA im gesunden Gewebe beschrieben. Rooney et al. (1995) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass auch die für das Wachstum unerläßliche Neovaskularisation im Tumorgewebe von HA beeinflusst wird.

In Analogie zur Zellbewegung während der Embryogenese kann die HA Synthese ebenfalls die Tumorzellproliferation und Invasion durch Bereitstellung einer passenden Umgebung unterstützen (Knudson et al., 1989). Toole et al. (1979), beobachteten in invasiv wachsenden V2-Karzinomen von Kaninchen einen 3-4fach höheren Hyaluronsäuregehalt verglichen mit nicht invasiv wachsenden Karzinomen. Eine perizelluläre, hyaluronsäurereiche Schicht verhindert dabei sowohl die Bildung antigenspezifischer T-Lymphozyten, als auch die Lyse der Tumorzellen durch zytolytische Lymphozyten (McBride et al., 1979 und Dick et al., 1983).

Obwohl der Mechanismus der Beteiligung von HA an einer Metastasierung noch nicht eindeutig geklärt ist, konnte in früheren Studien demonstriert werden, daß HA-CD44 und HA-RHAMM vermittelte Signalwege u.a. zu einer Stimulation der Tumorzell-Metastasierung führen (Itano et al., 1999; Bourguignon et al., 2000; Paiva et al., 2005).

2.3.7 Rolle von Hyaluronsäure in der Ödementwicklung

In Kapitel 2.3.1 wurde bereits auf die besonderen strukturellen Eigenschaften von HA und die Wasserbindungskapazität eingegangen. Die enge Beziehung zwischen exzessiver Hyaluronsäureakkumulation im Gewebe und der Bildung von interstitiellen Ödemen wurde bereits in früheren Studien demonstriert. In Untersuchungen an Ratten

mit einer experimentell induzierten Aveolitis konnte ein entzündungsbedingter Anstieg von hochmolekularer HA ($>200 \times 10^3$) um 70 % verglichen zum Normalgewebe gezeigt werden. Das führte über die Bindung von Wasser zu einem interstitiellen und alveolaren Ödem (Nettelbladt et al., 1989). HA spielt auch eine bedeutende Rolle in der Entwicklung eines interstitiellen Ödems während der Transplantatabstoßung (Hällgren et al., 1990). Es wurde gezeigt, daß Fibroblasten des abgestoßenen Spendergewebes im Vergleich zu den Zellen im normalen Gewebe vermehrt proliferieren und HA produzieren. (Hellkvist et al., 2002). Eine prophylaktische Therapie mit Hyaluronidase führte zu einer Reduktion des interstitiellen Ödems und einer Verlängerung des Überlebens des Spenderorgans (Johnsson et al., 1999). Auch bei einer bereits vorhandenen Abstoßung führte eine Hyaluronidasetherapie zu einem geringeren Gewebedruck und Wasservorkommen im Spenderorgan und damit zu einem verlängerten Überleben (Johnsson et al., 1999; Johnsson et al., 2000). In einer Studie von Laurent et al. (2003) wurde eine mögliche Verbindung zwischen der Ödementwicklung und dem sukzessivem Wachstum nasaler Polypen einerseits und der Hyaluronsäuremasse in den Tumoren andererseits hergestellt. Eine Akkumulation von HA und ein daraus resultierendes interstitielles Ödem konnte auch in infarziertem myokardialen Gewebe demonstriert werden. Der erhöhte extrazelluläre Druck beeinträchtigte dabei die Mikrozirkulation der Herzmuskulatur signifikant (Waldenström et al., 1991).

2.4 Hyaluronektin

Hyaluronektin (HN) ist ein Glycoprotein, welches erstmals von Delpech und Halavent (1981) aus menschlichem Gehirn extrahiert wurde. Es hat ein MG von 45 bis 110 kDa und ist charakterisiert durch eine sehr hohe Bindungsaffinität zu HA (Delpech und Delpech, 1984). Isoformen des Proteins sind im fetalen und adulten Gewebe der Nerven und des Mesenchyms nachweisbar (Ponting und Kumar, 1995). Die Isoform des Nervengewebes ist im Fetus mit wachsenden Axonen und Dendriten assoziiert und im Extrazellularraum zu finden (Delpech et al., 1987), während es beim Erwachsenen überwiegend im Ranvier'schen Schnürring von myelinisierten Nerven und im Bereich von Neuronen des Kleinhirns lokalisiert ist (Delpech et al., 1982). Die mesenchymale Form des HN findet sich im fetalen Gewebe im Bereich der oberen Schicht der Dermis und der Mukosa des Darms, während sie beim Erwachsenen im interstitiellen

Bindegewebe und in proliferierendem Gewebe, wie z.B. in der EZM von Haarfollikeln, dem intralobulären Bindegewebe der Milchdrüse und der Lamina propria des Dickdarms vorkommt (Delpech und Delpech, 1984). Desweiteren wurde HN in Oligodendrozyten, Schwann-Zellen (Courel et al., 1998), Monozyten (Girard et al., 1999) und Fibroblasten (Ponting und Kumar, 1995) nachgewiesen, aber auch in maligne veränderten Fibroblasten und mononukleären Zellen (Delpech et al., 1997).

2.5 Mastzellen

Mastzellen (MZ) entwickeln sich im Knochenmark aus pluripotenten CD34 positiven Stammzellen. Nach Verlassen des Knochenmarks zirkulieren die Vorläuferzellen im Blut und im lymphatischen System. Im Zielgewebe reifen die MZ unter dem Einfluß des Stammzellfaktors (SCF), und den Zytokinen IL-4, IL-5 und Interferon γ (IFN- γ) heran. Sie sind zahlreich in der Haut lokalisiert (10000 Zellen/mm³), befinden sich typischerweise aber auch im lymphatischen Gewebe, Lunge, Thymus, Mucosa des Nasen-Rachenraums, Konjunktiven, Uterus und Synovialflüssigkeit. Unterschiedlichste Membranrezeptoren werden abhängig vom Gewebe und dem Grad der Differenzierung exprimiert. So tragen MZ neben den IgE Rezeptoren (Fc ϵ RI) und Fc γ RIIb (CD32), sowohl Zytokin- (z.B. IL-3R, IL-4R) als auch Chemokinrezeptoren (z.B. CCR3, CCR5). MZ werden mittels verschiedener immunologischer (z.B. Aggregation des Fc ϵ RI Rezeptors) und nicht immunologischer (Gewebverletzung) Vorgänge aktiviert und setzen daraufhin Mediatoren frei. Dabei unterscheidet man die in Granula gespeicherten Mediatoren (Histamin, Serinprotease, Carboxypeptidase A und Proteoglycane) von den de novo synthetisierten Lipidmediatoren Prostaglandin D₂ (PGD₂) und Leukotrien (LT) und den Zytokinen (Prussin und Metcalfe, 2003). Neben Tumornekrosefaktor α (TNF- α) wird Interleukin 2 (IL-2) sezerniert, welches mit der Differenzierung von T_H2 Zellen und der IgE Synthese assoziiert ist. Die ebenfalls freigesetzten Cytokine IL-3, GM-CSF und IL-5 sind bedeutend in der Entwicklung und dem Überleben von Eosinophilen (Metcalfe et al., 1997).

2.5.1 Die biologische Funktion der Mastzellen

Humane Mastzellen spielen eine bedeutende Rolle bei Allergien und Anaphylaxie und sind gleichzeitig in den Mechanismus der Wundheilung und der Abwehr von

pathogenen Keimen involviert. Sie sind wichtiger Bestandteil der angeborenen und erworbenen Immunabwehr (Castleman et al., 1990; Arock et al., 1998). Eine Überreaktion der erworbenen Immunantwort mündet aufgrund IgE-abhängiger Mastzellaktivierung in einer Hypersensitivitätsreaktion. Hierbei führt eine Histaminfreisetzung und die Synthese von PGD_2 und LTC_4 zu einer Sofortreaktion im Bereich der Haut, der oberen Luftwege, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes. Die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen führt anschließend zu einer Spätphase-Reaktion, die einhergeht mit persistierenden Ödemen und einer Leukozyteninfiltration (Prussin und Metcalfe, 2003).

2.5.2 Histamin

Histamin wird hauptsächlich in MZ und basophilen Leukozyten mittels Decarboxylierung der Aminosäure L-Histidin synthetisiert, in Granula gespeichert und bei Aktivierung der Zellen freigesetzt. Die unterschiedlichen biologischen Funktionen dieses Moleküls werden über vier Histamin Rezeptoren vermittelt (H_{1-4}). Die Interaktion von Histamin mit dem H_1 Rezeptor führt dabei zu den klassischen Zeichen der allergischen Reaktion: Ödembildung durch Vasodilatation und erhöhte Gefäßpermeabilität, Bronchiokonstriktion, Schleimsekretion, Urtikaria und Juckreiz (Akdis und Blaser, 2003). Weiterhin ist Histamin in Proliferation und Differenzierung von Zellen, Hämatopoiese, Embryonalentwicklung, Geweberegeneration und Wundheilung involviert (Simons und Estelle, 2004). Neben der Wirkung als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) spielt das Molekül ebenfalls eine zentrale Rolle im Schlaf- Wachrhythmus, bei der endokrinen Homöostase sowie bei kognitiven Prozessen und dem Gedächtnis (Castleman et al., 1990; Haas und Panula, 2003).

2.6 Schwann-Zellen

Die Schwann-Zellen sind die Gliazellen des peripheren Nervensystems (PNS). Axone markloser dünner Nervenfasern sind in nicht myelinisierende Schwann-Zellen eingebettet. Ab einem bestimmten Axondurchmesser umwickeln die Schwann-Zellen mit ihren breitflächigen Ausläufern die Axone und bilden die Myelinscheiden. Durch Verklebung der Plasmamembranen mit Myelin-spezifischen Proteinen kommt es zu

einer Kompaktierung des Myelins. Die umwickelte Axonstrecke bezeichnet man als Internodium. Eine Schwann-Zelle ist jeweils für ein Internodium zuständig (Schiebler und Schmidt, 2002; Lüllman-Rauch, 2003).

Sowohl plexiforme als auch kutane Neurofibrome bestehen zu 60- 80 % aus Schwann-Zellen (Menon et al., 1990; Levy et al., 2004), welche immunhistochemisch mittels S-100 Protein Antikörpern nachgewiesen werden können (Stefansson et al., 1982). Sie sind die eigentlichen Tumorzellen der Neurofibrome.

2.7 Fibroblasten

Fibroblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen und zählen zu den festen Zellen des Bindegewebes. Sie sind zuständig für den Umsatz der Extrazellulärmatrixstruktur, was Neusynthese, Aufrechterhaltung und Abbau beinhaltet. Dabei produzieren sie sowohl Bestandteile der Grundsubstanz wie Glycosaminoglycane, Proteoglycane und Glycoproteine, als auch retikuläre und elastische Fasern und Kollagene. Unter bestimmten physiologischen Voraussetzungen wie Gewebewachstum oder Entzündungen produzieren Fibroblasten Kollagenasen mit spezifischen Affinitäten zu den unterschiedlichen Kollagenen, die zu einem Abbau der Kollagenfasern führen. Fibroblasten werden durch Gewebsverletzung zu einer vermehrten Synthese von EZM Bestandteilen angeregt und spielen eine bedeutende Rolle bei der Wundheilung. Im Aktivierungszustand sind die Fibroblasten durch zytoplasmatische PAS-positive Granula charakterisiert, welche die intrazellulären Vorläufermoleküle des Kollagens und der Glycosaminoglycane repräsentieren (Fawcett und Raviola, 1994). Die hochmolekularen α -Ketten des Präprokollagens werden in den Ribosomen der Fibroblasten synthetisiert. Die kurze Signalsequenz am aminoterminalen Ende des Präprokollagens wird bei der Ausschleusung aus dem Endoplasmatischen Retikulum entfernt. Durch zahlreiche weitere intrazelluläre Modifikationen im Golgi-Apparat entsteht das Prokollagen. Durch Ausschleusung des Prokollagens in den perizellulären Raum und anschließender Abspaltung von Amino- und Carboxypeptiden durch Proteasen, entsteht das Kollagen (Weiß, 1988).

3 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie in der Einleitung erläutert, spielt Hyaluronsäure in vielen biologischen Prozessen des Körpers eine bedeutende Rolle. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung einer langanhaltenden intra- und postoperativen Schwellung nach Resektion von Neurofibromen bei NF1 Patienten. Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen Einfluss von Hyaluronsäure und Mastzellen auf eine intra- und postoperative Ödembildung nach Entfernung von Neurofibromen, zu untersuchen.

Zur Untersuchung stand frisches und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe von plexiformen und kutanen Neurofibromen zur Verfügung. Da sich die Gewebezusammensetzung der Oberflächen von Wundrand und exzidiertem Tumor aufgrund der unscharfen Begrenzung der Neurofibrome gleichen, konnte das Tumorgewebe stellvertretend für das Gewebe der Wundränder zur Untersuchung herangezogen werden.

Mit Hilfe von selbst hergestelltem, affinitätschromatographisch aufgereinigtem Hyaluronektin wurden der Hyaluronsäuregehalt und die Hyaluronsäureverteilung innerhalb der Tumore untersucht. Zusätzlich wurden andere Tumorkomponenten wie Mastzellen, Fibroblasten und Schwann-Zellen immunhistochemisch charakterisiert. Die eigenen Resultate wurden mittels einer ELISA Analyse des Hyaluronsäuregehaltes, die für einen Teil der Tumorproben vorgenommen wurde, verglichen. Die Daten der histologischen Untersuchungen wurden untereinander und mit den klinischen Parametern Alter, Geschlecht und intraoperative Schwellung korreliert.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien und Reagenzien

4.1.1 Affinitätschromatographie

Sepharosesäule:

- Hyaluronic acid sodium salt from human umbilical cord Sigma, 3740
- ω -Aminohexyl-Sepharose 4B Sigma, A2419
- 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-Ethyl Carbodiimide EDC Sigma, E6383
- Essigsäure ($C_2H_4O_2$) Merck # 00063

- 10 mM HCL Pufferlösung Merck # 1.09045
- 1 M HCL Pufferlösung Merck # 1.09057
- Eichpufferlösung pH 4,00 Merck # 1.09435
- Eichpufferlösung pH 7,00 Merck # 1.09439
- Kaliumchlorid 3M Merck # 1.04817
- Aqua ad injectabilia Baxter # 001428
- Natriumchlorid (NaCl) J.T. Baker # 0278
- Kaliumchlorid (KCl) Merck # 4936
- Natriumhydrogenphosphat ($Na_2 HPO_4$) Merck # 1.06579
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) Merck # 4873
- Natriumhydroxid (NaOH) Merck # 09137
- Glycin Merck # 4201

4.1.2 Coomassie Blau Färbung

- Methanol J.T. Baker # 8045
- Coomassie Blue Merck # 1.02082
- Essigsäure ($C_2H_4O_2$) Merck # 00063

4.1.3 Dot Blot Analyse

- Anti Human Fibronektin Antibody (Rabbit)	Sigma, K4813
- Tween 20 Lösung	Merck # 822184
- Strept ABCComplex/HRP (Anti mouse, rabbit)	Dako K0377
- Diaminobenziden-tetrahydrochlorid-dihydrat-Lösung (DAB)	Sigma, K3765
- Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker # 0278
- Trizma Base	Sigma, T1503
- Triton-X-100	Serva No. 37238
- Aqua ad injectabilia	Baxter # 001428
- H ₂ O ₂ (30 %)	Merck # 1.07210
- Magermilchpulver	Merck # 15363

4.1.4 Biotinylierung des Hyaluronsäure-Bindenden Proteins

- Blockierungsreagenz	Roche Biotin Protein Labeling Kit
- Phosphate buffered saline (PBS)	Roche Biotin Protein Labeling Kit
- D-Biotinoyl-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimideester (Biotin-7--NHS)	Roche Biotin Protein Labeling Kit
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roche Biotin Protein Labeling Kit
- Sephadex G-25 Säule	Roche Biotin Protein Labeling Kit
- Aqua ad inject	Roche Biotin Protein Labeling Kit

4.1.5 Immunhistochemie

- Polyclonal Rabbit Anti S-100	Dako, Z0311
- Anti Procollagen (Procollagen type 1 c-peptide)	Axxora TAK M012
- Anti Fibroblast antibody (anti fibroblast surface protein)	Sigma, F4771
- Hyaluron Acid Binding Protein	Sigma, H0161
- Universal LSAB™2 Kit/HRP, Rabbit/Mouse	Dako, K0675
- Goat Serum	DAKO X0907
- Laktase 1g	ICN 100780
- Hyaluronate Lyase From Streptomyces Hyalurolyticus	Sigma, H1136

- Fast Red Substrate System	DAKO K699
- DAB- Lösung	Sigma K3765
- Ethanol absolut	J.T. Baker 8006
- Ethanol 96%	M.EMK.Verg.
- Xylol	SDS # 1307
- Eukitt	Sigma 03989
- Mayer´s Hämalaun	Merck # 09249

4.1.6 Sonstige Materialien und Geräte

- Schott Labor-Daten-pH-Meter	CG 841
- Schott H-Einstabmesskette	N6180
- Zentrifuge Sorval Labofuge	Heraeus 6000
- Waage	Mettler PM 1200
- Parafilm Pechiney	WI 54952
- Magnetrührer	IKA Labortechnik
- Schüttler	Heto
- Vortex Mixer	SA3 Stuart
- Dialysemembran	Medical Int. LTD 3-20/32“
- Filterpapier	Schleicher & Schnell 300009
- Nitrocellulosefolie Roti-PVD	Carl Roth GmbH A1471
- Mikrotom	Jung HN40
- Klängen	Feather R 35
- Wachsstift	Dakopen
- Messbecher 5ml, 10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml	
- Eppendorf Pipetten 20µl, 100µl, 500µl, 1000µl	
- Eppendorf Röhrchen 0,5ml, 1ml, 1,5ml	
- Objektträger „Superfrost“	
- Inkubator Memmert	
- Petrischalen	
- Kolben	
- Homogenisator	

4.2 Pufferlösungen und Reagenzien

- Sepharose-Hyaluronsäure-Säule:

Es wurde eine bereits gepackte Säule benutzt, die wie folgt hergestellt worden war:

- 10 ml ω -Aminohexyl-Agarose in Säule (entleerte NICK Einmalsäule) füllen
- Säule mit 150 ml 0,5 M NaCl spülen und die Agarose in Hyaluronsäurelösung (100 mg HA in 100 ml 0,3 M NaCl/PBS) resuspendieren
- 300 mg EDC dazugeben
- 1 Std. den pH zwischen 4,5 und 6,0 konstant halten, dann über Nacht rühren
- 3,5 ml konzentrierte Essigsäure zugeben und 6 Std stehen lassen
- Die Lösung über die Säule geben
- Das abgesetzte Gel mit 300 ml 1M NaCl herauspülen, im Becherglas 10 min schütteln und wiederum über die Säule geben
- Das abgesetzte Gel mit 1 M NaCl herauspülen und in 0,1 M Tris-HCl pH 8,1 über Nacht bei 4°C lagern
- Die Lösung über die Säule geben und das Gel absetzen lassen
- Die Säule mit 300 ml Aqua dest. und 300 ml PBS spülen.

- Phosphate buffered saline (PBS):

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ auf 1 l mit Aqua ad inject. aufgefüllt und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

- Natriumphosphatpuffer:

58,44 g NaCl und 1,78 g Na₂HPO₄ in ca. 800 ml Aqua ad inject. gelöst, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt und mit Aqua ad inject. auf 1000 ml aufgefüllt.

- 0,2 mol Glycin/HCl Puffer pH 2,8:

15 g Glycinpulver auf 1 l Aqua ad inject. mit 1 M HCl Lösung auf pH 2,8 eingestellt.

- 60 %ige Methanollösung:

60 % Methanol in 40 % Aqua ad inject.

- Coomassie Blue Lösung:

0,1 % Coomasie Blue, 10 % Essigsäure, 25 % Methanol in 64,9 % Aqua ad inject.

- Entfärbelösung:

80 % Methanol in 20 % Essigsäure v/v.

- Blockierungspuffer (BB):

10 g Magermilchpulver in 100 ml PBS.

- PBS-Tween Lösung:

0,05 % Tween 20 in 100 ml PBS.

- Blockierungspuffer (BB)-Tween:

10 g Magermilchpulver in 100 ml PBS mit 0,05 % Tween 20.

- BB Tween und Anti Human Fibronektin Ak 1:200:

20 µl Fibronektin in 4 ml BB Tween.

-BB Tween und biotinyliertes Ziegenserum (Anti Mouse/Rabbit) AK 1:100:

40 µl biotinyliertes Ziegenserum in 4 ml BB Tween.

-Streptavidin und biotinylierte Peroxidase in PBS 1:100:

40 µl Streptavidin und 40 µl Peroxidase in 4 ml PBS.

-DAB Stammlösung:

200 mg DAB in 40 ml TBS/Triton, 2 x filtriert, in 1 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

- DAB Reaktionslösung:

1,0 ml Tris/Triton mit 100 µl H₂O₂ gemischt, davon 300 µl zu 9 ml TBS/Triton gegeben, 1 ml Stammlösung zugesetzt.

- Tris buffered saline (TBS) 50 mM pH 7,6:

42,5 g NaCl und 30,5 g Tris in 4700 ml Aqua dest gegeben, mit 1 M HCl auf pH 7,6 eingestellt (207 ml) und mit Aqua dest auf 5000 ml aufgefüllt.

- TBS/Triton 50 mM pH 7,6:

Herstellung wie TBS, zusätzlich 5 ml Triton-100-X zugefügt.

- Hemmung der Peroxidase:

250 ml Ethanol absolut in 10 ml H₂O₂ (30 %).

- Blockierungspuffer:

10 % Ziegenserum in 90 % Trispuffer v/v.

- Biotinylierte HABP-Lösung:

50 µl biotinyliertes HABP in 50 µl TBS/Triton.

- Streptavidin und Biotinylated Peroxidase in TBS/Triton 1:100:

50 µl Streptavidin und 50 µl Peroxidase in 5 ml TBS/Triton.

- Laktaselösung 1:20:

10 mg Laktasepulver in 200 µl Aqua dest, 25 µl der Lösung in 475 ml Aqua dest

- Hyaluronidaselösung:

560 Einheiten Hyaluronidase von Streptomyces Hyalurolyticus in 150 µl Aqua ad inject.

4.3 Patienten und Tumormaterial

Insgesamt wurden 51 verschiedene Tumoren untersucht. Dabei handelte es sich um 40 kutane Neurofibrome (kNF) und 11 plexiforme Neurofibrome (PNF) von 35 Neurofibromatose Typ 1 Patienten (16 Frauen, 19 Männer). Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Alter der Patienten zwischen 1 und 63 Jahren, das mittlere Lebensalter war 32 Jahre.

Die Tumorresektate wurden in der Klinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gewonnen. Die Diagnostik wurde im Institut für Neuropathologie durchgeführt. Die Befundung wurde anhand von histologischen Präparaten vorgenommen, welche mit Hämatoxylin und Eosin, nach Elastica van Giesson und PAS sowie mit Antikörpern gegen das S-200 Protein gefärbt waren. Ein Aliquot der Proben wurde anonymisiert, in Carnoy Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und für die vorliegende Arbeit verwendet. Zusätzlich wurden weitere Aliquots von 30 Neurofibromen schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.4 Affinitätschromatographische Aufreinigung des Hyaluronsäure-Bindenden-Proteins

Das Hyaluronsäure-Bindende-Protein (HABP) wurde in Anlehnung an die Studien von Delpuch und Halavent (1981) und Delpuch et al. (1995) affinitätschromatographisch durch Bindung an Hyaluronsäure, die an Sepharose gekoppelt war, aufgereinigt. Die Affinitätschromatographie basiert auf dem Prinzip der nicht kovalenten und spezifischen Bindung von Proteinen einer mobilen Phase an einen immobilen Liganden. Durch anschließende pH-Wert Veränderung innerhalb der Säule kommt es zu einer Schwächung der Affinität zwischen Protein und Ligand, so dass sich das Protein eluieren lässt.

In diesem Fall durchläuft der Überstand des zuvor bearbeiteten Homogenats die Säule nach dem Prinzip der Schwerkraft. Das HABP bindet an die Sepharose gekoppelte HA. In weiteren Arbeitsschritten werden überschüssige Komponenten durch das Spülen mit Pufferlösungen entfernt und das Protein in einzelnen Fraktionen eluiert.

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung des HABP wurde Lammhirn benutzt, welches nach der Schlachtung der Tiere bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert wurde.

Bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung der HA wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Homogenisation von 15 g tief gefrorenem Lammhirn in 45 ml 10 mmol HCl.
2. Das Homogenat mit einem pH- Wert von 5,7 mittels 1 M HCl Lösung auf einen pH- Wert von 2,3 eingestellt.
3. Zentrifugation des Homogenats in der Sorvalzentrifuge bei Raumtemperatur für 30 min mit 6000 rpm (entsprechend 8064 RCF(g)).
4. Überstand mit 1 M NaOH auf einen pH von 5,6 eingestellt.
5. Inkubation für 30 min bei 4°C.
6. Zentrifugation für 30 min mit 8064 x g in der Sorvalzentrifuge bei Raumtemperatur.
7. Überstand mit 1 M NaOH auf einen pH von 7,2 eingestellt.
8. Zentrifugation für 30 min mit 8064 x g in der Sorvalzentrifuge bei Raumtemperatur.
9. Parallel zu den Schritten 1-8 wurde die Sepharosesäule durch Spülen mit 0,5 l PBS Pufferlösung pH 7,4 und 0,5 l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 vorbereitet.
10. Überstand bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min auf die Säule gegeben.
11. Säule mit 0,1 l PBS Pufferlösung pH 7,4 und 0,5 l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gespült.
12. Überstand mit 0,2 M Glycin/HCL Puffer pH 2,8 in 30 Eppendorf Röhrchen à 2 ml eluiert.
13. Zur Neutralisation des pH-Wertes wurde die Säule mit 0,5 l PBS Pufferlösung pH 7,4 gespült.

Die RCF (g)-Zahl läßt sich bei vorhandener Umdrehungszahl und dem ausgemessenen Radius der Zentrifuge mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{rpm}^2 \times 1120 \times r/m}{1000000} = \text{RCF (g)}$$

$$\sqrt{\frac{\text{RCF (g)}}{1120 \times r/m}} \times 1000 = \text{rpm}$$

4.5 Färbung in Coomassie Blau Lösung

Die 30 in Eppendorf Röhren gesammelten Eluate wurden mit einer Coomassie Färbelösung behandelt. Mit dieser Methode werden Proteine blau gefärbt und man erhält einen Anhalt, ob und wie viel Protein sich in der Lösung befindet.

Es wurden je 5 µl der einzelnen Fraktionen auf einer gerasterten und in 60%iger Methanollösung vorbehandelten Transfermembran (Nitrocellulose) aufgetragen und 30 min getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Folie für 30 s. in die Coomassie Blau Lösung getaucht und anschließend in der Entfärbelösung entfärbt. Es zeigte sich in den Fraktionen 3-9 eine Blaufärbung.

4.6 Dialyse und Gefriertrocknung der Eluate

Die mit Coomassie Blau positiv getesteten Fraktionen 3-9 wurden in eine schlauchförmige Dialysemembran gegeben. Die Membran wurde an beiden Seiten geschlossen und in 1 l PBS Lösung pH 7,4 getaucht. Unter Rotation wurde die Proteinlösung 20 Std. dialysiert, wobei die PBS Lösung alle 3 Std. gewechselt wurde. Nach dem Dialysevorgang wurde die Lösung über Nacht bei -180°C gefriergetrocknet und der Rückstand in 1 ml Aqua ad inject resuspendiert.

4.7 Biotinylierung des Hyaluronsäure-Bindenden-Proteins

Zur Biotinylierung des HABP wurde das „Biotin Protein Labeling Kit“ von Roche verwendet. Das Prinzip der Biotinylierung beruht auf einer Markierung freier Aminogruppen von Proteinen mit D-Biotinyl-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimideester (Biotin-7-NHS) unter Bildung einer starken Amidbindung. Nach der Reaktion wird ungebundenes Biotin-7-NHS über eine Sephadex G-25 Säule abgetrennt.

Zunächst wurde die Säule mit 5 ml Blockierungspuffer aus dem Kit gespült. Danach wurde die Säule mit 30 ml PBS Puffer (6 x 5 ml) äquilibriert. Nach Vorbereitung der Säule wurde die Biotin-7-NHS-Lösung mit 250 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt (20 mg/ml) und mehrmals auf dem Mixer gevortext. Für die aus dem Lammhirn extrahierte Menge an Protein wurden 10 µl der Biotin-7-NHS-Lösung nun mit 90 µl DMSO auf 1:10 verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 15 µl entnommen, in

die 1 ml Proteinlösung gegeben und 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Vorgänge wurden auf einem Wipptisch ausgeführt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1,5 ml PBS Puffer auf 2,5 ml aufgefüllt und langsam über die Säule gegeben. Anschließend wurde das mit Biotin markierte Protein mit 3,5 ml PBS Puffer in 7 Eppendorf Röhrchen à 10 Tropfen (0,5 ml) eluiert. Zum Nachweis des biotinylierten Proteins wurden von den 7 Eluaten Proben von 5 µl entnommen und einer Coomassie Färbung durchgeführt. In den Fraktionen 3-7 zeigte sich eine Färbung, so dass diese Eluate für die immunhistochemische Färbung der Tumoren benutzt wurden.

4.8 Darstellung von Fibronectin mittels Dot Blot Verfahren

Fibronectin (FN) ist ein Protein, welches sich besonders in Kollagenfasern befindet, die ebenfalls zahlreich in den zu untersuchenden Tumoren vorkommen. Somit kann dieses Protein bei fehlender Herauslösung aus der Proteinlösung zu einer möglichen Quelle der Verunreinigung in der immunhistochemischen Färbung werden und zu fehlerhaften Färbungen führen. Zur Prüfung einer etwaigen Verunreinigung der Lösung mit FN wurde ein Dot Blot mit immunchemischer Darstellung von FN durchgeführt. Dazu wurden Proben aus den unterschiedlichen Zeitpunkten der Aufreinigung entnommen und auf einer gerasterten Nitrocellulosefolie pipettiert.

Nach dem Trocknen des Blots wurde dieser zunächst in Blockierungspufferlösung auf dem Schüttler über Nacht inkubiert. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Folie in einer PBS-Tween Lösung 3 mal kurz gespült und hinterher für 2 Std mit dem Anti Human Fibronectin Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt wurde der Blot 3 mal in PBS-Tween gewaschen und anschließend für 5 min in BB-Tween geschwenkt. Anschließend folgte die Inkubation für 30 min auf dem Schwenker in BB-Tween mit biotinyliertem Ziegen Serum (Anti Mouse/Rabbit) als Sekundär-AK in einer 1:100 Verdünnung. Nach dem einmaligen Waschen in PBS-Tween und dem zweimaligen Waschen in PBS- Puffer wurde eine erneute Inkubation des Blots für 40 min auf dem Schwenker in PBS und Streptavidin und biotinylierter Peroxidase in einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt. Nach dem Waschen für 10 min in PBS Lösung wurde der Blot dann 10 min in der chromogenen DAB Reaktionslösung gefärbt und anschließend für 10 min unter fließendem Wasser gespült.

4.9 Immunhistochemie

4.9.1 Demonstration von Hyaluronsäure in Tumorgewebe mit biotinyliertem HABP

4.9.1.1 Fixation, Paraffinierung und Herstellung der Paraffinschnitte

Die gesammelten Neurofibrome wurden zunächst in Carnoy Lösung (Chloroform, Essigsäure, Methanol 30:10:60 v/v) fixiert. Diese Form der Fixation wurde gewählt, da sich in früheren Studien zeigte, dass Hyaluronsäure in Formalin löslich ist (Lin et al., 1997) und somit aus dem Gewebe diffundiert. Die Carnoy Lösung verhindert diese Diffusion (Salamonsen et al., 2001).

Nach der Fixation wurden die Neurofibrome in einem Einbettautomaten in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Proben wurden zur Anfertigung histologischer Schnitte in Paraffinblöcke eingegossen. Von den Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm mit einem Schlittenmikrotom hergestellt, in einem 58°C Wasserbad gestreckt und auf Silan beschichtete Objektträger („Superfrost“, 75mm x 25mm) aufgezogen. Durch anschließendes Inkubieren für 45 min bei 56°C wurde ein Großteil des Paraffins von den Schnitten entfernt. Die vorbereiteten Schnitte wurden anschließend bei -80°C gelagert. Für alle Färbungen und Inkubationen der Schnitte wurde eine feuchte Kammer benutzt.

4.9.1.2 Färbeprotokoll DAB Färbung

Bei der Färbung wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Entparaffinierung für 2x 10 min in Xylol und 30 S in Ethanol absolut
2. Hemmung der endogenen Peroxidase für 15 min in Ethanol absolut und H₂O₂ (30 %).
3. Rehydrierung in Ethanol 100 %, 96 %, 96 %, 80 %, 70 % 50 % für jeweils 30 S und für 2 min in Aqua dest.
4. Für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
5. Schnitte abtropfen lassen, mit dem Markierungsfettstift umrandet und 150 µl

Blockierungspuffer auf die Schnitte gegeben. Schnitte für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.

6. Schnitte für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
7. Inkubation der Schnitte mit 100 µl der 1:1 verdünnten biotinylierten HABP-Lösung für 2 Std bei 37°C.
8. Schnitte für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
9. Inkubation der Schnitte mit Streptavidin und biotinylierter Peroxidase in TBS/Triton in einer Verdünnung von 1:100 für 40 min bei Raumtemperatur.
10. Schnitte für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
11. Inkubation der Schnitte mit chromogenem Substrat DAB für 20 min bei Raumtemperatur.
12. Schnitte für 10 min unter fließendem Wasser gespült. und Zellkerne für 2-3 S in Hämalaun Lösung gegengefärbt.
13. Dehydrierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (80 %, 96 %, 2 x 100 für jeweils 30 S und Xylol für 2 x 2 min). Anschließendes Eindecken mit Eukitt.

Dieses Färbeprotokoll wurde auch für die Färbung mit dem erworbenen HABP („Hyaluronic Acid-Binding Protein“ Sigma H0161) benutzt. Lediglich an Punkt 7 wurde das hergestellte HN gegen das erworbene HABP ausgetauscht.

4.9.2 Demonstration der Bindungsspezifität von HABP

4.9.2.1 Negativkontrolle

Für die Negativkontrolle wurden drei Schnitte eines Neurofibroms simultan in drei unterschiedlichen Färbereihen behandelt. Vor der Inkubation mit HABP wurde einer der Schnitte mit 150 µl einer vorbereiteten Laktase- Lösung (irrelevantes Enzym) und einer mit 150 µl Hyaluronidase („Hyaluronate Lyase from Streptomyces hyalurolyticus“) (Negativkontrolle) bei 37°C über Nacht inkubiert. Ein weiterer Schnitt wurde lediglich mit Aqua ad inject feucht gehalten. Alle drei Schnitte wurden anschließend wie in Kapitel 2.9.1.2 beschrieben mit HABP behandelt und gefärbt.

4.9.2.2 Positivkontrolle

Zur weiteren Demonstration der Spezifität des isolierten Hyaluronsäure-Bindenden-Proteins wurde eine Färbung von Gewebe durchgeführt, welches bekanntermaßen Hyaluronsäure enthält. Frühere Studien an Hautpräparaten haben gezeigt, daß die Interzellularräume hauptsächlich im Bereich des Stratum spinosum aber auch in der Basalzellschicht besonders viel Hyaluronsäure enthält, das Stratum granulare aber hyaluronsäurefrei ist (Tammi et al., 1988).

4.9.3 Demonstration der Anzahl und Lage von Fibroblasten und Schwann-Zellen in Relation zu Kollagenfasern und HA

Zur Demonstration der Schwann-Zellen in Relation zur Hyaluronsäure wurden Neurofibrome mit HABP und S-100 Protein Antikörpern markiert. Folgendes Färbeprotokoll wurde verwendet:

1. Entparaffinierung für 2x 10 min in Xylol und 30 S in Ethanol absolut.
2. Hemmung der endogenen Peroxidase für 15 min in Ethanol absolut und H₂O₂ (30 %).
3. Rehydrierung in 100 %, 96 %, 96 %, 80 %, 70 % 50 % für jeweils 30 S und für 2 min in Aqua dest danach für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
4. Schnitte abtropfen lassen, mit dem Markierungsfettstift umrandet und 150µl Blockierungspuffer auf die Schnitte gegeben. Inkubation der Schnitte für 1 Std. bei Raumtemperatur.
5. Schnitte für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
6. Benetzung der Schnitte mit 100 µl der 1:1 verdünnten biotinylierten HABP-Lösung und Inkubation für 2 Std bei 37°C.
7. Schnitte für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
8. Inkubation der Schnitte mit Streptavidin und biotinylierteter Peroxidase in TBS/Triton in einer Verdünnung von 1:100 für 40 min bei Raumtemperatur.
9. Schnitte für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
10. Inkubation der Schnitte im chromogenen Substrat DAB für 20 min bei Raumtemperatur.
11. Schnitte für 10 min in TBS/Triton auf dem Schüttler gewaschen.
12. Inkubation mit Anti S-100 (Dako, Z0311) (Verdünnung 1:1000) über Nacht bei

Raumtemperatur.

13. 2. Färbung der Schnitte mit Fast Red nach Herstellerangaben.
14. Schnitte für 5 min unter fließendem Wasser gespült und Zellkerne für 2-3 S in Hämalaun Lösung gegengefärbt
15. Anschließendes Wässern für 5 min.
16. Dehydrierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (80 %, 96 %, 2 x 100 % für jeweils 30 S und Xylol für 2x 2 min). und anschließendes Eindecken mit Eukitt.

Dieses Färbeprotokoll wurde auch für die Doppelfärbungen zur Demonstration der Fibroblasten benutzt. Sowohl die Färbung mit Anti-Prokollagen (Verdünnung 1:20) und HABP, als auch die Färbung mit Anti-Fibroblasten-Antikörper (Verdünnung 1:200) und HABP wurde exakt nach diesem Schema durchgeführt. Lediglich an Punkt 12 des Schemas wurde der jeweilige zweite Antikörper ausgetauscht.

4.10 ELISA und Auszählung der Tumor- und Mastzellen

Mit den 30 direkt nach der Resektion bei -80°C eingefrorenen Tumorproben wurde eine ELISA Analyse durchgeführt. Die Proben wurden abgewogen, in Eppendorf Röhrchen gelagert und mit Trockeneis tiefgefroren gehalten. Die ELISA Analyse wurde im Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Münster von Herrn Prof. Dr. Prehm durchgeführt. Zur Identifikation der Proben wurden lediglich die Probennummern ohne weitere Informationen übermittelt. Eine Tabelle zu den Daten der ELISA Untersuchung befindet sich im Anhang.

Die Anzahl der Tumor- und Mastzellen wurde mikroskopisch mittels Auszählung der Zellen zweier Gesichtsfelder ermittelt. Durchgeführt wurde diese Zählung an einem Zeiss Mikroskop bei einer Objektivgröße x40 (Gesichtsfeld 0,19 mm²) in einem Areal möglichst hoher Mastzellendichte.

4.11 Statistische Auswertung und klinische Parameter

Klinische Parameter wie Alter der Patienten, Geschlecht und intraoperative Schwellung wurden mit dem Tumortyp, Tumorzell- und Mastzellendichte sowie dem Vorkommen von

Hyaluronsäure und Kollagen verglichen und korreliert. Die Einschätzung der Schwellung erfolgte durch Operateur Herrn Prof. Dr. Dr. R. E. Friedrich, ZMKG, UKE. Dabei wurde für nicht parametrische Daten die Korrelation nach Spearman-Rho berechnet. Für die parametrischen Daten kam der Test nach Pearson zum Einsatz. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant angesehen.

Die Intensität der Färbung und damit die Stärke des Vorkommens von HA und Kollagen wurde in 4 Abstufungen gemessen: („0“) = keine Färbung erkennbar, („1“) = schwache Färbung erkennbar, („2“) = mäßige Färbung erkennbar und („3“) = starke Färbung erkennbar.

Die Intensität der Schwellung wurde eingeteilt in die Abstufungen: („0“) = keine Schwellung erkennbar, („1“) = schwache Schwellung erkennbar, („2“) = mittelgradige Schwellung erkennbar, („3“) = hochgradige Schwellung erkennbar.

Die klinischen Daten wurden erst zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung mit den histologischen und biochemischen Messungen zusammengeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Affinitätschromatographie

Für die immunhistochemische Darstellung von Hyaluronsäure in kutanen und plexiformen Neurofibromen wurde zunächst ein erworbenes Hyaluronsäure-Bindendes Protein (HABP) („Hyaluronic Acid-Binding Protein“ Sigma H0161) verwendet (s. 4.9.1.2). Bei der Färbung stellte sich heraus, dass das HABP neben HA auch hyaluronsäurefreie aber fibronektinreiche Kollagenfasern markierte (Abb. 5.1). Im Ergebnis war dieses Produkt ungeeignet für die Studien.

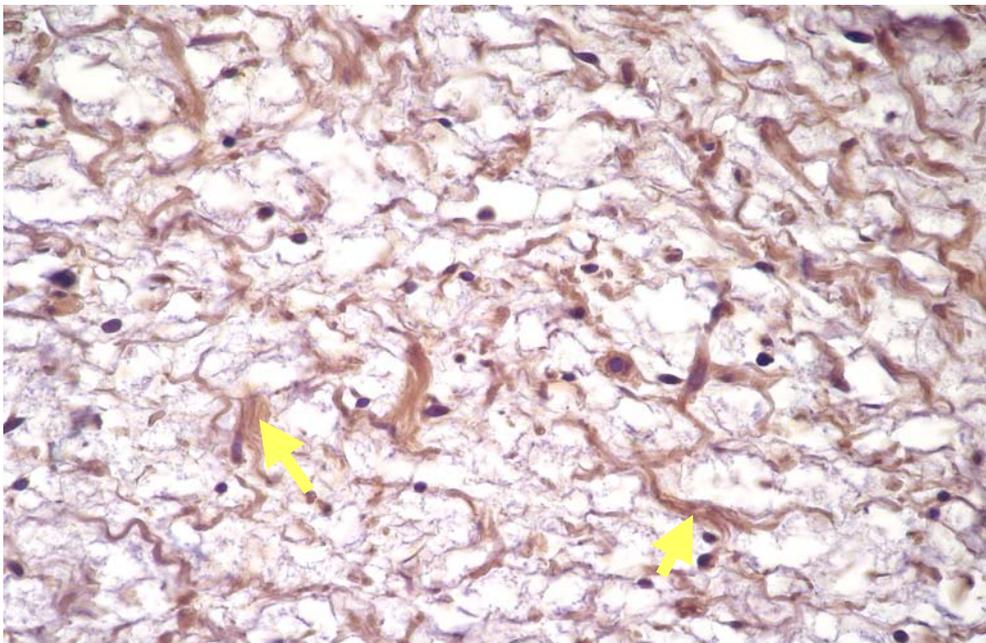


Abb. 5.1: Plexiformes Neurofibrom behandelt mit HABP von der Firma Sigma,
Chromogen DAB (Objektiv x 40, HABP braun), die Pfeile zeigen HABP markierte Kollagenfasern.

Für die affinitätschromatographische Aufreinigung der Hyaluronsäure wurden die Studien von Delpech und Halavent (1981) und Delpech et al. (1995) herangezogen und modifiziert (s. 4.4). Anstelle der in den Studien benutzten spektrometrischen Bestimmung des HN, wurde die Coomassie Blau Färbung eingesetzt (s. 4.5). Anhand dieser unspezifischen Proteinfärbung konnten Proteine in den Fraktionen 3-9 sichtbar gemacht und anschließend gepoolt werden.

Es wurde mit dem Dot Blot Verfahren demonstriert, dass Fibronektin im Aufreinigungsvorgang entfernt wurde. Dabei wurde die Dot Blot Analyse mit einem

Fibronectin Antikörper („Anti Human Fibronectin Antibody“, Sigma K4813) an zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aufreinigung entnommener Proben (s. 4.8) durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigten sich in den Proben des Homogenats und der Überstände bei pH 2, pH 5, pH 7 und nach dem Säulendurchlauf (Felder 1-5) deutliche Mengen an Fibronectin. Die mit 0,2 M Glycin/HCl Puffer bei pH 2,8 eluierten Fraktionen (Felder 6-30) wurden jedoch nicht mehr gefärbt (Abb. 5.1.2).

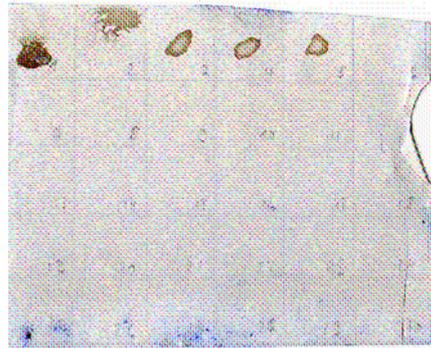


Abb. 5.1.2: Dot Blot zum immunochemischen Nachweis von FN mit Anti Human Fibronectin AK, Probe aus dem Homogenat (Feld 1), Probe vom Überstand bei pH 2 (Feld 2), Probe vom Überstand bei pH 5 (Feld 3), Probe vom Überstand bei pH 7 (Feld 4), Probe vom Säulendurchlauf (Feld 5) und Proben von den Eluatn (Feld 6-30).

5.2 Bindungsspezifität des affinitätschromatographisch hergestellten Hyaluronektins

Zur Demonstration der Bindungsspezifität des affinitätschromatographisch hergestellten HN wurde eine immunhistochemische Einzelmarkierung von kutanen und plexiformen Neurofibromen durchgeführt (s. 4.9.1.2). Es zeigte sich eine deutlich ausgeprägte Färbung der Tumormasse innerhalb der Nervenfaszikel eines PNF (Abb. 5.2.1). Makroskopisch imponierten diese Neurofibrome durch eine myxoide Morphologie. Die EZM außerhalb der Nervenfaszikel zeigte ebenfalls eine Färbung von geringerer Intensität. Das Gefäßendothel wurde dagegen nicht markiert. Die intensive Färbung der Tumormasse innerhalb der Nervenfaszikel und die fehlende Markierung des hyaluronsäurefreien Gefäßendothels belegen die Spezifität der Hyaluronektinbindung. Die Abbildungen 5.2.1 und 5.2.2 zeigen beispielhaft eine plexiformes Neurofibrom und ein kutanes Neurofibrom mit einer ausgeprägten HA-Expression.

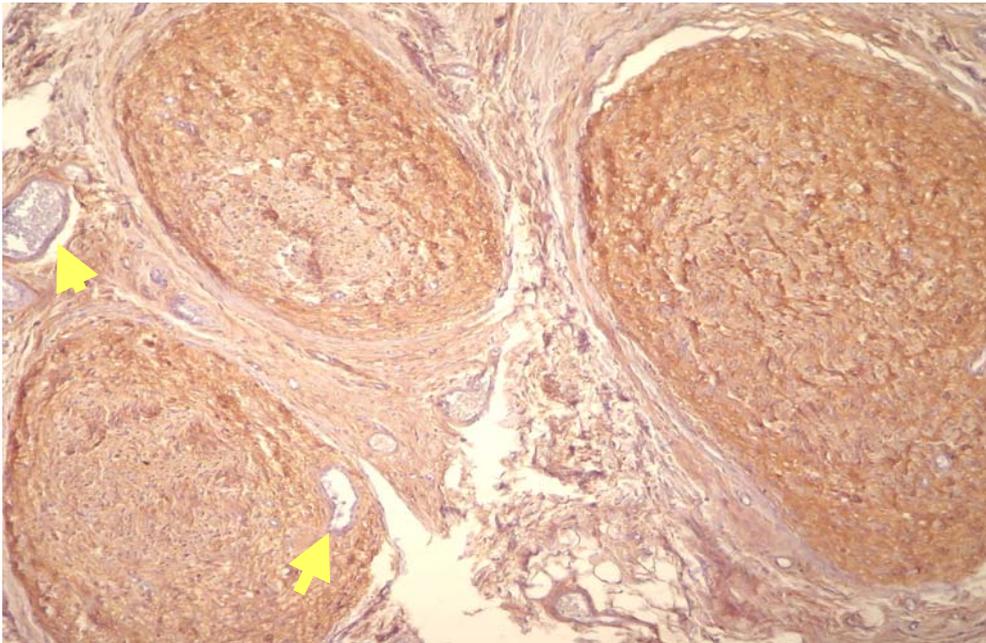


Abb. 5.2.1: Plexiformes Neurofibrom behandelt mit HN,
Chromogen DAB (Objektiv x 40, HN braun), die Pfeile zeigen das unmarkierte Gefäßendothel.

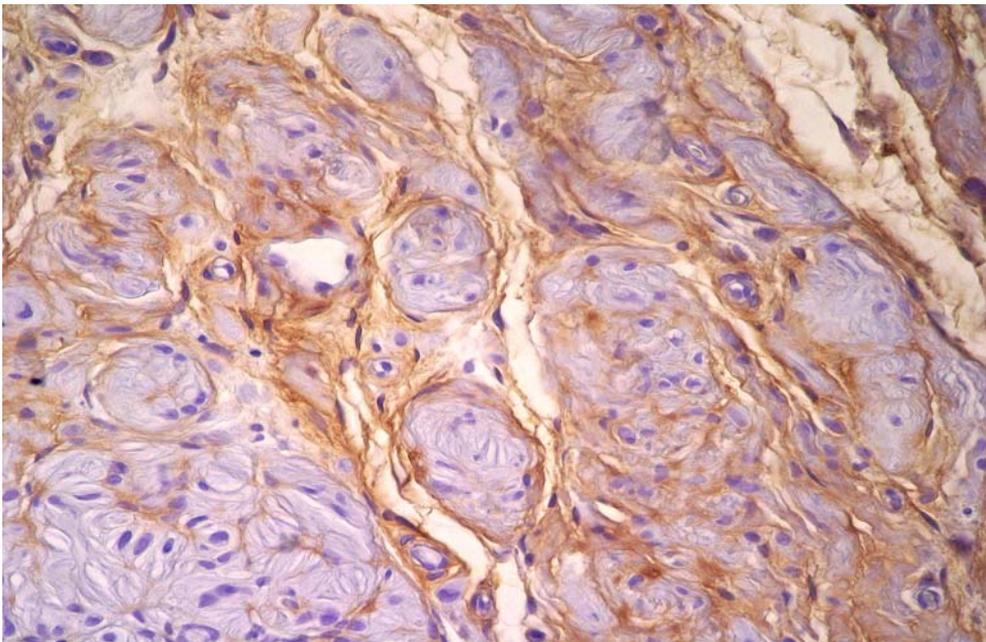


Abb. 5.2.2: Kutanes Neurofibrom behandelt mit HN,
Chromogen DAB (Objektiv x 40, HN braun).

5.3 Negativkontrolle

Die Negativkontrolle wurde an drei Proben eines PNF durchgeführt. Die drei Schnitte wurden parallel mit Lactase, Hyaluronidase und Aqua ad inject. über Nacht inkubiert und anschließend mit HN behandelt (s. 4.9.2.1). Die Glycosidase Lactase katalysiert die Hydrolyse des Disaccharids Lactose zu Galactose und Glucose. Das Enzym weist keine Bindungsaffinität zu HA auf. Die verwendete Hyaluronidase („Hyaluronate Lyase from *Streptomyces hyalurolyticus*“, Sigma H1136) ist ein spezifisches Enzym der HA, welches die β 1-4 glycosidischen Bindungen zwischen den Monosacchariden D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin spaltet. Die Hyaluronidase hat dabei keine Affinität zu Chondroitin und Chondroitin Sulfat (Stern und Jedrzejak, 2006).

Es zeigte sich eine Färbung von nahezu unveränderter Intensität auf den zuvor mit Wasser und Lactase behandelten Schnitten (Abb.5.3 A und 5.3 B), die somit den Bindungsprozess zwischen HA und HN nicht beeinflussen.

Sowohl die Zellkomponenten als auch die EZM blieben in dem mit Hyaluronidase behandelten Schnitt komplett ungefärbt (Abb.5.3 C). Da die verwendete Hyaluronidase hochspezifisch HA spaltet, spricht dieses Ergebnis für die spezifische Bindung an HA der hergestellten Hyaluronektinlösung.

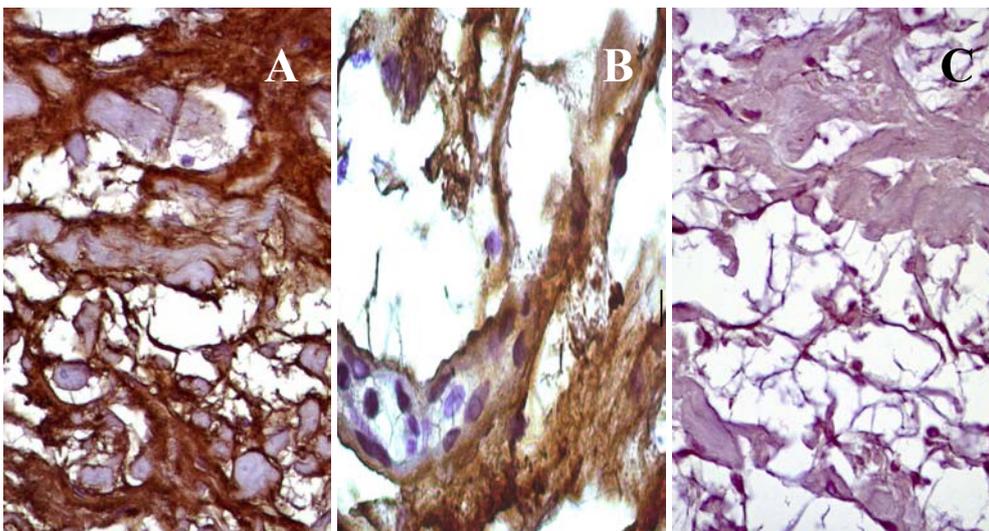


Abb. 5.3: Nachweis von HA mittels HN in einem plexiformen Neurofibrom ohne Vorbehandlung (A), nach Vorbehandlung mit Lactase (B) und nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase von *Streptomyces hyalurolyticus* (Negativkontrolle) (C),

A,B und C: Chromogen DAB, HN braun; Vergrößerung: A und C x40; B x100.

5.4 Positivkontrollen

Frühere Studien haben gezeigt, dass der Interzellularraum der Epidermis, insbesondere das Stratum spinosum, reich an Hyaluronsäure ist (Tammi et al., 1988). Zur weiteren Bestimmung der Spezifität der Hyaluronektinbindung wurde ein Präparat mit dem hergestellten HN gefärbt. Dabei zeigte der Interzellularraum des Stratum spinosum die stärkste Färbeintensität. Das Stratum corneum war unspezifisch gefärbt, während das Stratum basale und das Stratum granulare keine Färbung zeigten (s. Abb. 5.4.1). Das Ergebnis der Positivkontrolle stimmt überein mit den früheren Studien.

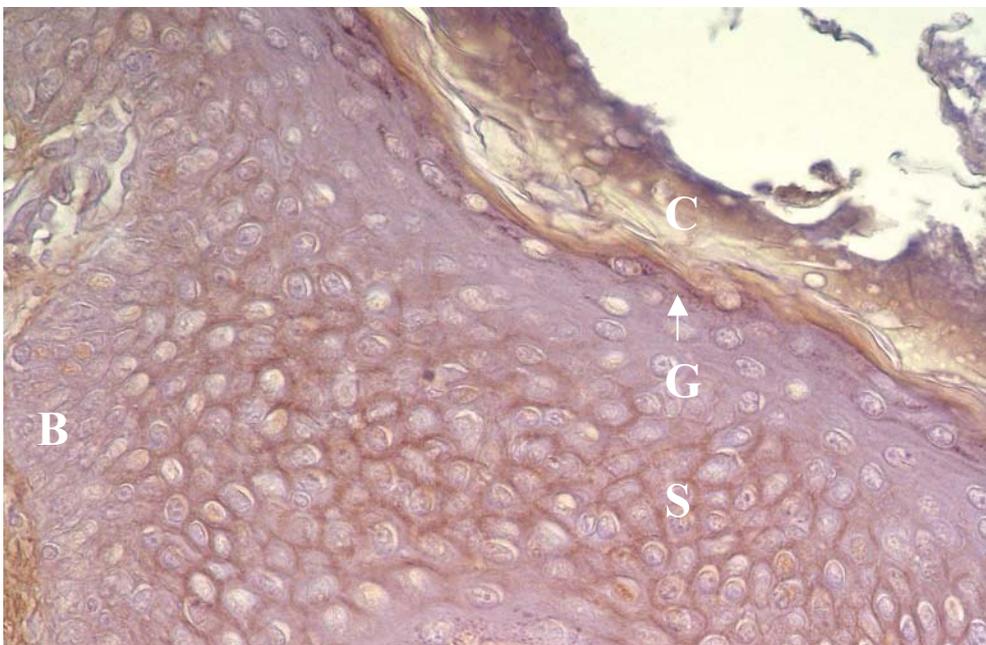


Abb. 5.4.1: Nachweis von HA markiert mit HN in der Epidermis eines Hautpräparates, Chromogen DAB (Objektiv x40, HN braun) **C**, Stratum corneum, **G**, Stratum granulare, **S**, Stratum spinosum, **B**, Stratum basale

Abbildung 5.4.2 zeigt die angeschnittene Epidermis eines kutanen Neurofibroms. Die HA wurde mit HN markiert. Ähnlich wie in Abbildung 5.4.1 ist die Anfärbung des Interzellularraumes in der Epidermis zu erkennen. Zusätzlich ist die Markierung der HA in der EZM eines Neurofibroms zu sehen. Die interne Positivkontrolle bestätigt hier die Spezifität der hergestellten Hyaluronektinlösung.

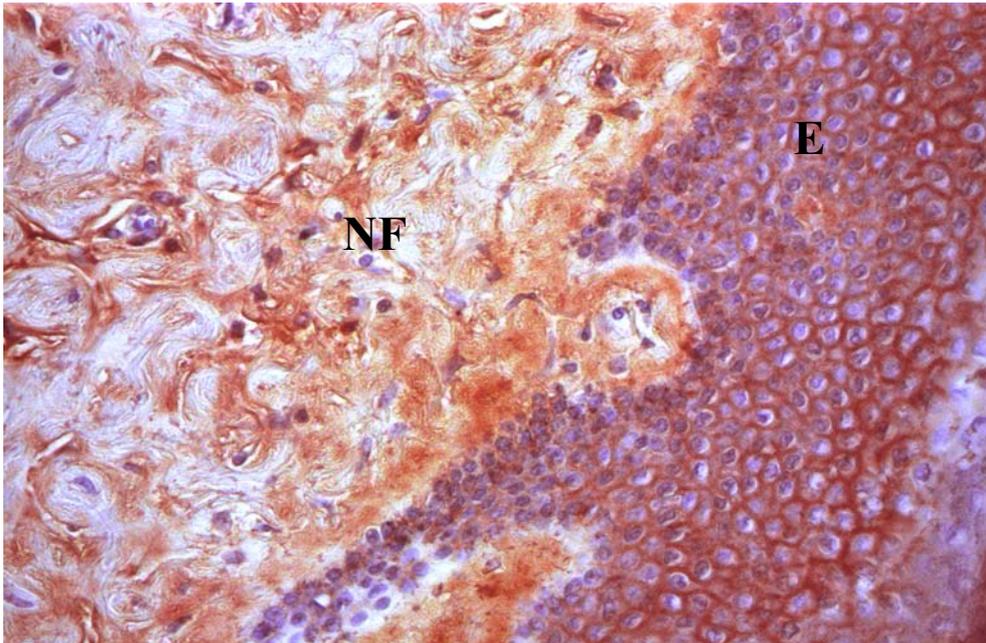


Abb. 5.4.2: Nachweis von HA markiert mit HN in der Epidermis und im Tumorgewebe eines kutanen Neurofibroms (interne Positivkontrolle), Chromogen DAB (Objektiv x40, HN braun), E, Epidermis, NF, Neurofibromgewebe

5.5 Untersuchungen an Neurofibromen

5.5.1 Patienten und Tumore

Es wurden insgesamt 61 Tumorproben von 36 Patienten untersucht. Alle Patienten erfüllten die Kriterien des „National Institutes of Health“ für die NF1 Diagnose und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Untersuchungen an den resezierten Tumoren. Als ungeeignet erwiesen sich im nachhinein 10 Proben, weshalb 3 Patienten nicht weiter berücksichtigt wurden. Bei den Proben handelte es sich um Schwannome, Entzündungsgewebe, Lymphknoten, Narbengewebe und eine Tumormetastase. Bei 23 Patienten wurde entweder ein kutanes oder ein plexiformes Neurofibrom reseziert. Bei 10 Patienten wurden zwei oder mehr Neurofibrome entnommen. Bei den 51 diagnostizierten Neurofibromen handelte es sich um 38 KNF und 13 PNF.

5.5.2 Klinische Beobachtung der postoperativen Ödembildung

Insgesamt wurden bei 42 Neurofibromresektionen von 28 Patienten intra- oder postoperative Schwellungen des Wundgebietes dokumentiert. Es handelte sich dabei um 30 kutane und 12 plexiforme Neurofibrome.

75 % der plexiformen (9 Proben) und 33 % der kutanen Neurofibrome (10 Proben) wiesen eine mäßig- oder hochgradige postoperative Schwellung auf. Bei 60 % der KNF (18 Proben) und 25 % der PNF (3 Proben) konnte dagegen keine Schwellung beobachtet werden. Tabelle 5.5.2 zeigt den Grad der Schwellungen bei KNF und PNF.

Intensität der Schwellung	KNF	PNF	NF gesamt
Keine Schwellung	18	3	21
Geringe Schwellung	2	0	2
Mäßige Schwellung	6	2	8
Starke Schwellung	4	7	11
gesamt	30	12	42

Tabelle 5.5.2: Grad der postoperativen Schwellung bei kutanen und plexiformen Neurofibromen.

5.5.3 Einzelfärbung mit Hyaluronektin

Von den 51 Neurofibromen zeigte 1 Tumor in der immunhistochemischen Untersuchung keine Markierung (2 %). 11 Schnitte zeigten eine schwache Anfärbung (22 %), 22 Tumore zeigten eine mäßige (43 %) und 17 Neurofibrome zeigten eine starke Färbung (33 %). Berücksichtigt man nur die Neurofibrome des plexiformen Typs zeigten 77 % (10 Proben) der Schnitte eine mittelgradige bis starke Färbung. Bei den Neurofibromen des kutanen Typs waren es 76 % (29 Proben). Die zahlenmäßige Verteilung der Färbeintensitäten ist in Tabelle 5.5.3. dargestellt.

Intensität der Färbung	KNF	PNF	NF gesamt
Keine Färbung	1	0	1
Geringe Färbung	8	3	11
Mittelgradige Färbung	17	5	22
Starke Färbung	12	5	17
gesamt	38	13	51

Tabelle. 5.5.3: Verteilung der Färbeintensitäten der mit Hyaluronektin markierten Neurofibrome.

5.6 Doppelmakierungen mit Hyaluronektin und S-100-AK, Anti-Fibroblasten-Ak und Prokollagen-AK

5.6.1 Doppelmarkierung mit HN und S-100-Antikörper

Das S-100 Protein wird unter anderem in Schwann-Zellen exprimiert (Stefansson et al., 1982). Um zu evaluieren, ob neoplastische Schwann-Zellen HA in Neurofibromen produzieren, wurden PNF mit einer starken HA Expression für die Doppelmarkierung ausgewählt.

S-100 positive Schwann-Zellen bildeten die stärkste Population innerhalb der Neurofibrome. Sie sind fast immer in Kollagenfasern eingebettet und sind umgeben von HA (s. Abb. 5.6.1).

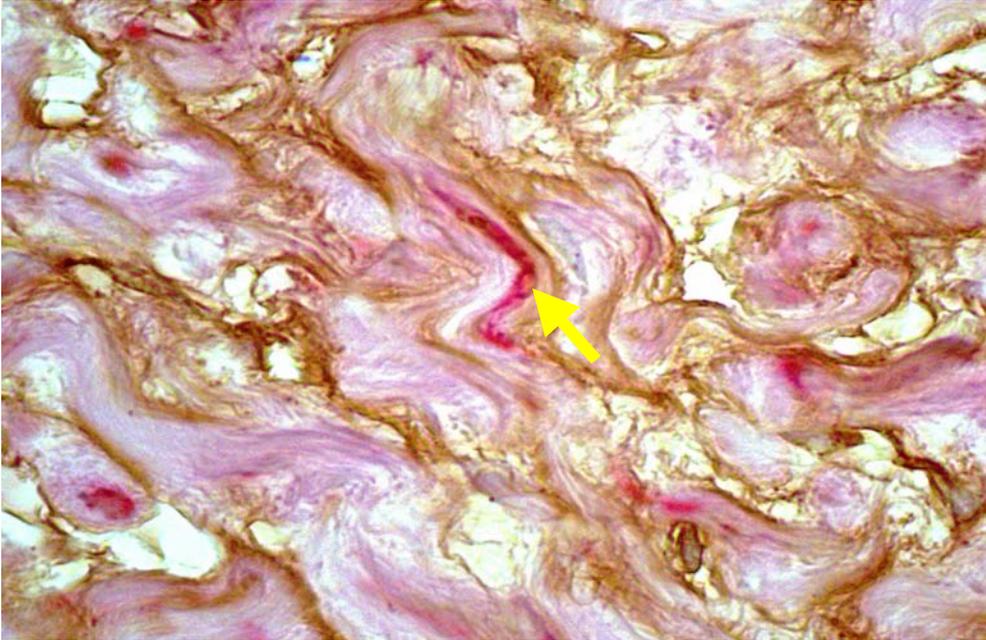


Abb. 5.6.1: Doppelmarkierung eines plexiformen Neurofibroms mit HN und S-100 Protein AK, Chromogen DAB und Fast Red (Objektiv x 100, HN braun, S-100 Protein rot), der Pfeil markiert beispielhaft den Fast Red markierten Zellkern einer Schwann-Zelle.

5.6.2 Doppelmarkierungen mit Hyaluronektin und Anti-Fibroblasten-Antikörper

Es wurde in früheren Studien demonstriert, dass Fibroblasten ein „Fibroblast Surface Antigen“ (SFA) tragen (Wartiovaara et al., 1974; Vaheri et al., 1975). Die Fibroblasten können daher mit Antikörpern gegen SFA markiert werden. Der AK („anti fibroblast surface protein antibody, Sigma, F4771) wurde angewandt, um zu evaluieren, in welcher Zahl Fibroblasten innerhalb eines Neurofibroms vorkommen, und ob sie eher als Produzenten der HA in Frage kommen als Schwann-Zellen. Untersucht wurden PNF mit einer ausgeprägten HA Expression.

Es zeigte sich, daß Fibroblasten nur in geringer Anzahl in den Neurofibromen vorkommen (s. Abb. 5.6.2 A, 5.6.2 B).

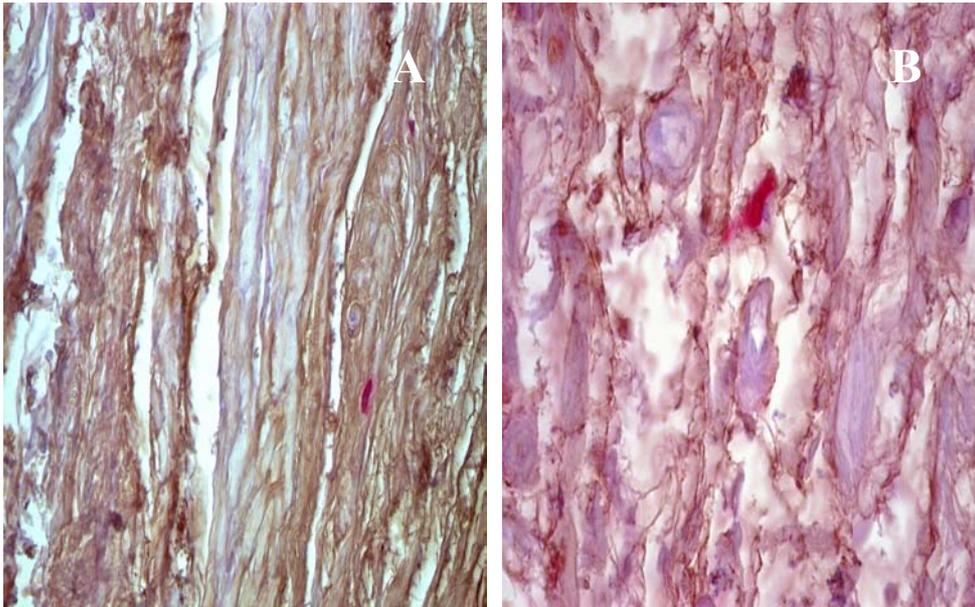


Abb. 5.6.2: Doppelmarkierung eines plexiformen Neurofibroms mit HN und Anti-Fibroblasten-AK, Chromogen DAB und Fast Red (A: Objektiv x 40, B: Objektiv x 100, HN braun, Fibroblasten rot)

5.6.3 Markierung mit Prokollagen I C–Peptid Antikörper

Das Prokollagen I C-Peptid (PIP) wird bei Leberzirrhose, alkoholtoxischer Fettleber, Knochenerkrankungen und bestimmten Formen des Adenocarcinoms als spezifischer Marker zur Korrelation von Kollagenmenge und Schwere der Erkrankung eingesetzt. Der Antikörper bindet spezifisch an das PIP von Kollagen produzierenden Zellen, insbesondere an Fibroblasten (Niitsu et al., 1988; Kohda et al., 1991). Um zu evaluieren, in welcher Menge HA und Kollagen produzierende Fibroblasten in den Neurofibromen vorkommen, wurden PNF mit einer ausgeprägten HA Expression mit Anti-PIP-Antikörper markiert.

Es wurden zahlreiche Zellen mit Anti-PIP-AK markiert. Das Färbemuster ähnelte dem der S-100 Markierung von Schwann-Zellen. Die hohe Zahl der gefärbten Zellen verglichen mit den sporadisch vorkommenden Fibroblasten in der Färbung mit Anti-SFA-AK (s. Abb. 5.6.2) könnte darauf hinweisen, dass neben Fibroblasten auch Kollagen produzierende Schwann-Zellen markiert wurden. Die Abbildung 5.6.3 zeigt beispielhaft die PIP-Markierung eines plexiformen Neurofibroms.

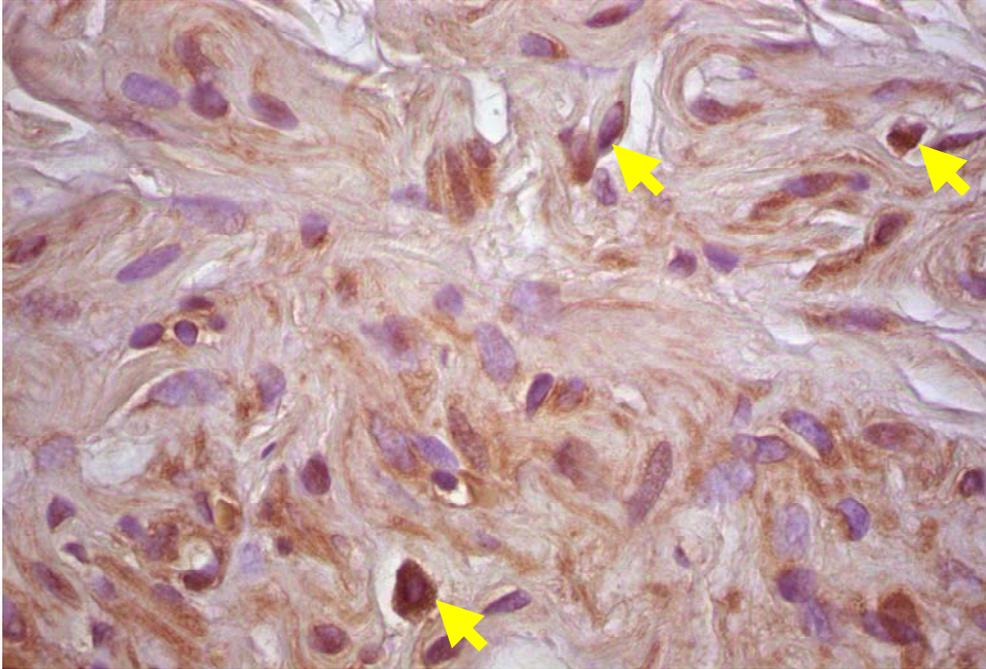


Abb. 5.6.3: Nachweis von PIP mittels Anti-PIPAK in einem plexiformen Neurofibrom, Chromogen DAB (Objektiv x 40, braun PIP), die Pfeile zeigen beispielhaft Anti-PIP-AK markierte Zellen.

5.7 Auszählung der Mastzellen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der postoperativen Ödembildung und der Ausschüttung von Histamin durch ortsständige Mastzellen zu untersuchen, wurde die Anzahl der Mastzellen/mm² im histologischen Schnitt ermittelt. Die mittels PAS-Färbung („Periodic acid-Schiff stain“) zur Darstellung kommenden Mastzellen wurden in zwei Gesichtsfeldern (0,38 mm²) ermittelt.

Die Anzahl der Mastzellen/mm² variierte zwischen den Tumorproben stark (0 MZ/mm² bis 168 MZ/mm²; mittlerer Gehalt an MZ = 33,5 MZ/mm²).

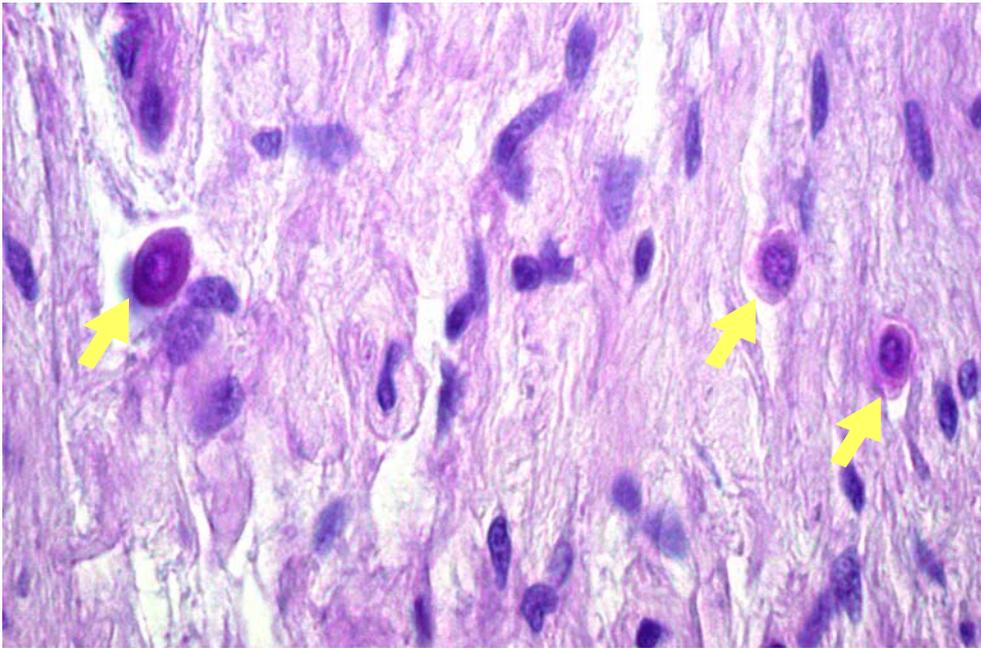


Abb.5.7: Darstellung von Mastzellen eines kutanen Neurofibroms,
PAS Färbung (Objektiv x 40), die Mastzellen sind mit Pfeilen markiert.

5.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Von den 12 untersuchten PNF zeigten 75 % eine mittel- oder hochgradige postoperative Ödembildung. Im Gegensatz dazu konnte lediglich bei 33 % der 30 untersuchten KNF ein mittel- oder hochgradiges Ödem beobachtet werden. 60 % der KNF zeigten keine Schwellungen nach Resektion. Auch statistisch zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten intra- und postoperativen Ödembildung nach der Resektion von plexiformen Neurofibromen ($r = 0,277$; $p = 0,038$; $N = 42$; einseitige Korrelation).

Vergleicht man den immunhistochemisch ermittelten HA Gehalt anhand der Farbeintensität mit der postoperativen Ödembildung beider Tumorarten, so war die mittlere Intensität bei ödembildenden Neurofibromen höher, als die der Tumore ohne postoperatives Ödem ($r = 0,278$; $p = 0,038$; $N = 42$; einseitige Korrelation). Somit tendieren plexifome Neurofibrome in dem untersuchten Kollektiv mit einem hohen Hyaluronsäuregehalt stärker zur Ausbildung eines postoperativen Ödems.

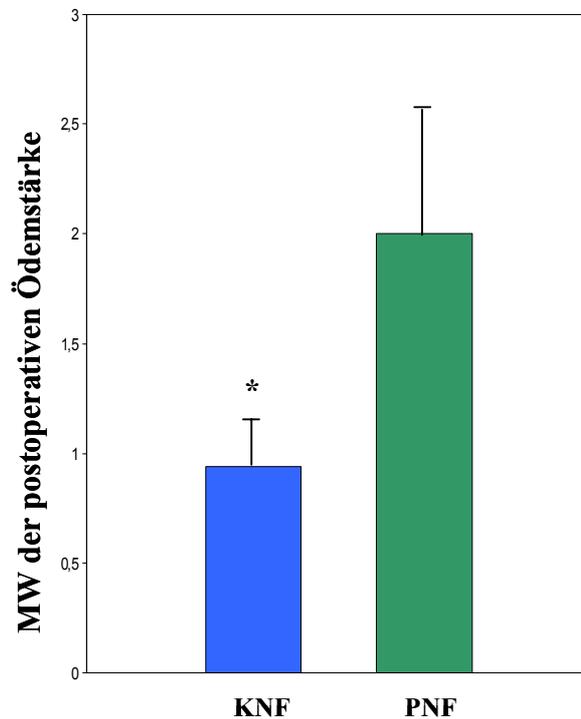


Abb. 5.8. B: Säulendiagramm der MW (\pm SEM) der postoperativ ermittelten Ödemstärke von KNF verglichen mit PNF,

MW in KNF = 0,94, s = 1,19, SEM = 0,21; MW in PNF = 2, s = 1,81, SEM = 0,55; *p = 0,038, einseitige Korrelation; Werte der Ordinate: („0“) = keine Schwellung erkennbar, („1“) = schwache Schwellung erkennbar, („2“) = mittelgradige Schwellung erkennbar, („3“) = hochgradige Schwellung erkennbar.

In der ELISA Untersuchung von 25 KNF und 5 PNF konnte ein signifikant höherer Hyaluronsäuregehalt in plexiformen Neurofibromen verglichen zu Neurofibromen vom kutanen Typ ermittelt werden ($r = 0,375$; $p = 0,041$; $N = 30$; zweiseitige Korrelation; mittlerer HA Gehalt in KNF = 23,57 $\mu\text{g/ml}$, s = 18,8; mittlerer HA Gehalt in PNF = 45,67, s = 34,8). Die Tendenz der immunhistochemischen Untersuchungen wurde somit bestätigt.

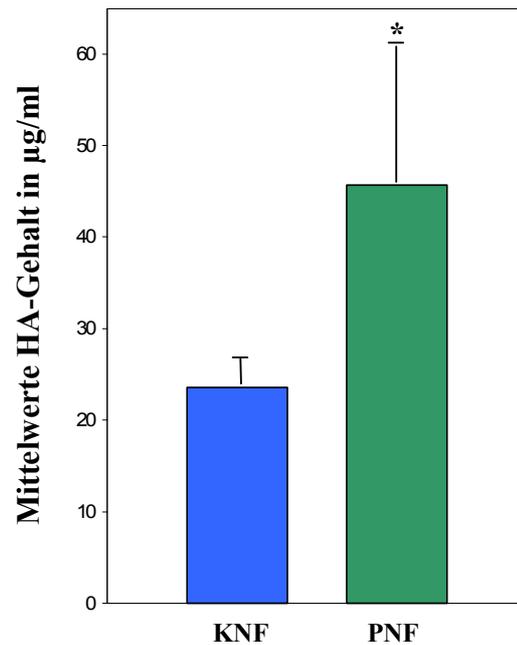


Abb. 5.8.1: Säulendiagramm der im ELISA gemessenen Mittelwerte (\pm SEM) des HA-Gehalts in $\mu\text{g/ml}$ von KNF verglichen mit PNF, MW in KNF = 23,57, $s = 18,8$, SEM = 3,76; MW in PNF = 45,67, $s = 34,4$, SEM = 15,56; * $p = 0,041$; zweiseitige Korrelation.

In PAS gefärbten Schnitten wurde die Zelldichte und der Kollagengehalt ausgewertet. Dabei bestätigte sich die Erwartung, dass Neurofibrome vom plexiformen Typ eine signifikant geringere Zelldichte aufweisen, als Neurofibrome vom kutanen Typ ($r = -0,386$; $p < 0,01$; $N = 49$). Gleichzeitig enthielten KNF signifikant weniger Kollagen enthalten als PNF ($r = -0,414$; $p < 0,01$; $N = 49$; zweiseitige Korrelation).

Die Mastzellendichte zeigte keine signifikanten Korrelationen mit den anderen Variablen. Die Kriterien Alter und Geschlecht korrelierten ebenfalls mit keinem der anderen Parameter signifikant.

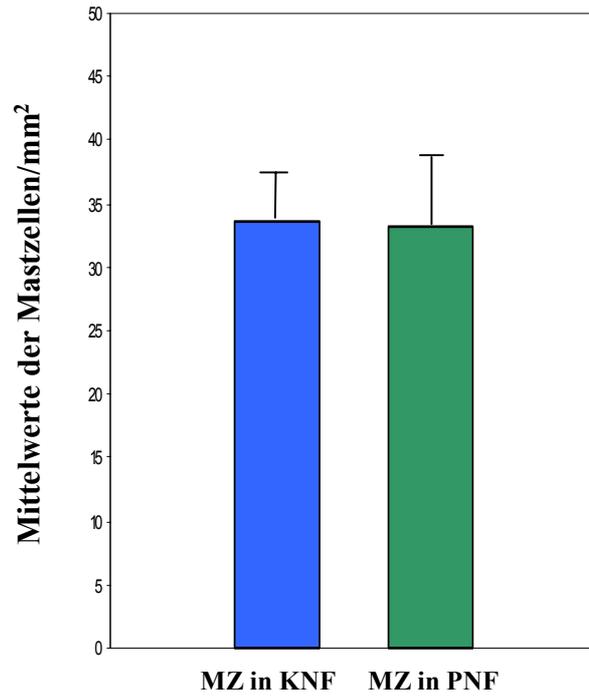


Abb.5.8.2: Säulendiagramm der Mittelwerte (\pm SEM) der Mastzellanzahl/mm² in KNF und PNF, MW der MZ in KNF = 33,63, s = 33,71, SEM = 5,47; MW der MZ in PNF = 33,15, s = 24,98, SEM = 6,93.

6 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen der Resektion plexiformer und kutaner Neurofibrome und einer erheblichen tagelang persistierenden intra- und postoperativen Schwellung ist in bisherigen Veröffentlichungen noch nicht näher untersucht worden. Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit richtete sich besonders auf die Rolle der Neurofibrom-Hyaluronsäure im Vergleich zu Neurofibrom-Mastzellen und anderen Komponenten der resezierten Neurofibrome bei der intraoperativen Ödembildung.

Das Polysaccharid HA, welches aus repetitiven Disacchariden aufgebaut ist, wurde mit Hilfe des Hyaluronsäure-Bindenden-Proteins Hyaluronectin markiert. Da die zur Zeit industriell hergestellten HABP-Lösungen aufgrund einer zu unspezifischen Anfärbung des Tumorgewebes für diese Studie nicht geeignet waren (s. 5.1), wurde das HN affinitätschromatographisch aufbereitet (s. 4.4). Für die Aufreinigung wurden dabei die Protokolle von Delpech und Halavent (1981) und Delpech et al. (1995) herangezogen und teilweise modifiziert.

Für die Färbungen wurden ausschließlich unmittelbar postoperativ in Carnoy Lösung fixierte Neurofibrome verwendet. Eine Untersuchung an vorhandenen in Formalin fixierten Neurofibromen wurde nicht vorgenommen, da HA nach Literaturangaben aus dem Gewebe deutlich stärker herausgewaschen wird als bei der Fixation in Carnoy Lösung (Lin et al., 1997; Salamonsen et al., 2001).

6.1 Hyaluronsäure im Kontext der postoperativen Ödembildung

HA ist ein unsulfatiertes stark negativ geladenes Glucosaminoglycan. Der bereits in 2.3.1 beschriebene molekulare Aufbau und die strukturellen Eigenschaften befähigen das Molekül große Mengen an Wasser zu binden. Diese Eigenschaften machen es zu einem bedeutenden Regulator der Wasserhomöostase im Körper (Laurent und Fraser, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand einer Hyaluronectinmarkierung von HA gezeigt werden, dass die EZM der untersuchten Neurofibrome HA enthält (Abb.5.2.1). Weiterhin konnte histologisch die Tendenz zu einem höheren Gehalt an HA in PNF verglichen mit dem Gehalt in KNF demonstriert werden. Dieser Trend wurde in einer ELISA Analyse bestätigt ($r = 0,375$; $p = 0,041$; $N = 30$; zweiseitige Korrelation;

mittlerer HA Gehalt in KNF = 23,57 µg/ml, s = 18,8; mittlerer HA Gehalt in PNF = 45,67, s = 34,8). Das Ergebnis stimmt überein mit einer Studie von Sasaki und Onodera aus dem Jahre 1990. In dieser Studie wurde anhand der Untersuchungen von zwei unterschiedlichen Glycosaminoglycanen (Hyaluronsäure und Dermatansulfat) in der EZM von Neurofibromen ein signifikant höherer Gehalt an HA in PNF als in KNF nachgewiesen. Dabei wurden allerdings nur 8 kutane und 3 plexiforme Neurofibrome von 5 Patienten mit NF1, sowie 2 sporadisch aufgetretene Neurofibrome untersucht. In weiteren Veröffentlichungen ist die EZM von Neurofibromen lediglich als glycosaminoglycanhaltige, myxoide Matrix beschrieben ohne, dass dabei auf die einzelnen Komponenten oder deren quantitative Unterschiede bei PNF oder KNF eingegangen wurde (Woodruff, 1999; Packer et al. 2002; Kluwe et al., 2007).

Bei der Evaluation der intra- und postoperativen Ödementwicklung innerhalb des Wundgebietes konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass 75 % der untersuchten PNF eine mittel- bis hochgradige Schwellung ausbildeten, aber nur 33 % der untersuchten KNF. Dagegen zeigten 60 % der KNF keine Schwellung. Auch statistisch zeigte sich ein Trend zur vermehrten Ödembildung nach der Resektion von plexiformen Neurofibromen ($r = 0,277$; $p = 0,038$; $N = 42$; einseitige Korrelation). Die Daten der vorliegenden Studie legen nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen dem statistisch signifikant höheren Gehalt an HA in plexiformen Neurofibromen und der Tendenz zur vermehrten intra- und postoperativen Ödementwicklung gibt. Hällgren et al. (1990) beschrieben bereits den Zusammenhang zwischen der Akkumulation von HA und der Bildung eines interstitiellen Ödems bei der Organtransplantation im Tiermodell (heterotrope allogene Rattennierentransplantation). Als Ursache für das am zweiten postoperativen Tag auftretende Ödem wurde dabei eine durch das chirurgische Trauma ausgelöste Induktion der HA-Synthese diskutiert. In einer Studie von Waldenström et al. (1991), wurde die postoperative Ödembildung bei operativ induzierten Herzinfarkten untersucht. Dabei kam es am dritten postoperativen Tag zu einem signifikanten Anstieg von HA und der Bildung eines interstitiellen Ödems. Diskutiert wurde auch in dieser Studie eine mediatorabhängige Aktivierung der Fibroblasten und Induktion der HA-Biosynthese. Bestätigt wurde diese Vermutung später von Hellkvist et al. (2002). Diese Arbeitsgruppe demonstrierte den Zusammenhang zwischen der zytokinabhängigen Induktion der Hyaluronsäurebiosynthese in aus Transplantationsgewebe entnommenen Fibroblasten (allogenes heterotropes Rattenmyokard) und der Entwicklung eines postoperativen Ödems. Weiterhin konnte die hyaluronsäureabhängige Bildung eines

interstitiellen Lungenödems bei einer bleomycininduzierten Alveolitis im Mausmodell demonstriert werden. Anhand der wenige Tage andauernden Latenz zwischen dem Beginn der Entzündung bis zu der Bildung des Ödems, haben Nettelblatt et al. (1989) gezeigt, dass die Induktion der HA-Biosynthese und die Ödementwicklung Teil der inflammatorischen Gewebereaktion sind. Papanikolaou et al. (2002) haben demonstriert, dass die Behandlung von Rattenlebertransplantaten mit Hyaluronidase ein vermindertes entzündungsbedingtes Gewebeödem, verglichen mit der unbehandelten Vergleichsgruppe zur Folge hatte. Zusätzlich stieg die Überlebenswahrscheinlichkeit der mit Hyaluronidase behandelten Transplantate, verglichen mit dem Überleben unbehandelter Organe um 40 %. Ratten bei denen es zu einer Abstoßungsreaktion kam wiesen eine signifikant höhere Konzentration von Serumhyaluronsäure auf als erfolgreich transplantierte Tiere.

In der gegenwärtigen Literatur sind allerdings keine Ergebnisse über den Zusammenhang von hyaluronsäureabhängigen Schwellungen und einer Tumorresektion veröffentlicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sehr kurze Zeitspanne (Minuten bis Stunden) zwischen der Tumorresektion und dem Auftreten der Schwellung beobachtet. Das lässt vermuten, dass die Schwellung nicht nur Folge einer durch Signaltransduktion vermittelten Induktion der Hyaluronsäurebiosynthese in den Zielzellen ist sondern, dass darüber hinaus die im Neurofibrom vorhandene HA mit für die Schwellung verantwortlich ist. Die hier vorgelegten Untersuchungen ergaben, dass plexiforme Neurofibrome am stärksten zu einer postoperativen Schwellung neigen. Sie weisen im Vergleich zu kutanen Neurofibromen auch einen signifikant höheren Hyaluronsäuregehalt auf. Eine mögliche Erklärung für die stärkere Schwellung des postoperativen Gewebes nach Resektion eines PNF könnte in der unterschiedlichen Morphologie der Neurofibrome liegen. PNF werden als strangförmige innerhalb eines oder mehrerer Faszikel wachsende Tumoren beschrieben. Sie werden vom Epi- und Perineurium begrenzt und sind somit abgekapselt gegenüber dem restlichen Gewebe. Möglicherweise wird die HA durch Zerstörung von Epi- und Perineurium intraoperativ freigesetzt und führt zu einer interstitiellen Bindung von Wasser.

Die diffus wachsenden kutanen Neurofibrome enthalten dagegen weniger HA. Durch die fehlende Abgrenzung zum umliegenden Gewebe fehlt möglicherweise die massive intraoperative Freisetzung von HA. KNF zeigen eine geringere Tendenz zur Ödembildung.

6.2 Mastzellen im Kontext der postoperativen Ödembildung

Entzündungszellen nehmen eine bedeutende Rolle beim Wachstum, der Entwicklung und der Angiogenese von Tumoren ein (Hanahan und Weinberg 2000; Coussens und Werb 2001; Coussens und Werb 2002). Es ist ebenfalls bekannt, dass NF1^{-/-} Schwann-Zellen und NF1^{+/-} Mastzellen in Neurofibromen miteinander interagieren. Der vollständige Verlust des Tumorsuppressorgens Neurofibromin in Schwann-Zellen führt dabei zu einer vermehrten Expression des löslichen Wachstumsfaktors Kit-Ligand (KitL). Das Chemokin aktiviert über den c-Kit Rezeptor einen spezifischen RAS Effektor Signalweg in NF1^{+/-} Mastzellen, induziert deren beschleunigte Migration in das Tumorgewebe und führt zu einer Hypermotilität der Zellen (Yang et al., 2003; Gottfried et al., 2006).

Eine für die vorliegende Arbeit wichtige Funktion aktivierter Mastzellen ist die Freisetzung von Histamin nach einer Gewebeverletzung. Durch die histaminvermittelte Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität während der Entzündungsphase der Wundheilung, bekommen Abwehrzellen schnelleren Zugang zum Wundgebiet. Gleichzeitig führt der vermehrte Ausstrom von Proteinen in den Extravasalraum zu einem interstitiellen Ödem (s. 2.1).

In der vorliegenden Studie wurde in PAS gefärbten Schnitten die Mastzellendichte in den Neurofibromen ermittelt. Es konnten dabei keine Unterschiede in der Mastzellendichte zwischen KNF und PNF ermittelt werden. Weiterhin korrelierte die Mastzellendichte auch nicht mit der postoperativen Schwellung (s. 5.6). Das Ergebnis legt nahe, dass die Mastzellen allein nicht für die intra- und postoperative Schwellung verantwortlich sind. Vielmehr kommt den Mastzellen vermutlich eine Rolle als Mediator in der Ödementwicklung zu, indem sie durch Steigerung der Gefäßpermeabilität den Einstrom von Wasser in den interstitiellen Raum fördern. Danach kommt es zu einer Immobilisation der Flüssigkeit im Polysaccharidnetzwerk der HA, und es entsteht ein interstitielles Ödem. Dabei könnte eine Kompression der Lymphgefäße durch Zunahme des Druckes im Interstitium möglicherweise einen weiteren Pathomechanismus bei der Ödementwicklung darstellen. Dies wurde hier jedoch nicht näher untersucht

6.3 Hyaluronsäuresynthese in Schwann-Zellen und Fibroblasten

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Studie war es Hinweise zu erlangen, welche Zellen der kutanen und plexiformen Neurofibrome die Hyaluronsäure produzieren. Hierfür wurden die Schwann-Zellen und Fibroblasten näher untersucht.

Kluwe et al. (1999), demonstrierten genetische Veränderungen in aus Neurofibromen entnommenen Schwannzell- und Fibroblastenpopulationen. Es zeigte sich, dass beide Zelltypen genetische Veränderungen auf einem der NF1- Allele zeigten. Jedoch führte erst der Verlust beider NF1- Allele in den Schwann-Zellen zu einem funktionellen Verlust von Neurofibromin. Die Fibroblasten zeigten diese zweite genetische Veränderung nicht. Daher werden die Schwann-Zellen als die eigentlichen Tumorzellen in Neurofibromen angesehen (Rutkowski et al., 2000). Zur Darstellung der Schwann-Zellen wurden in dieser Arbeit Doppelmarkierungen mit HN und S-100 durchgeführt. Es zeigte sich, dass Schwann-Zellen verglichen mit den anderen zellulären Komponenten der Neurofibrome die weitaus stärkste Population bilden (s. 5.6.1). Das Ergebnis stimmt mit einer 1988 von Peltonen et al. veröffentlichten Studie überein, in der der Schwannzellanteil in kutanen Neurofibromen mit 60-80 % angegeben wurde.

In der gegenwärtigen Literatur sind nur wenige Veröffentlichungen über die Hyaluronsäurebiosynthese in Schwann-Zellen zu finden. Die Arbeitsgruppe um Sherman et al. (1995) demonstrierte eine Korrelation zwischen der Expression des CD44- Rezeptors und der Bindung von HA in aus Schwannzelltumoren entnommenen Schwann-Zellen. Gleichzeitig wurde ausschließlich in mit Hyaluronidase vorbehandelten Schwannzellkulturen eine Hyaluronsäurebindung beobachtet, was vermuten ließ, dass die Schwann-Zellen HA nicht nur über die CD44- Rezeptoren binden, sondern auch vermehrt synthetisieren. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Tona (1993), konnte bei der Regeneration von durchtrennten Rattennerven gezeigt werden, dass proliferierende Schwann-Zellen neben anderen Komponenten der EZM (Laminin, Chondroitinsulfat) offenbar auch Hyaluronsäure produzieren.

Wie in 2.3.6 bereits erläutert wurde, spielt die HA auch in der Tumorzellproliferation- und Invasion eine entscheidende Rolle. In einer von Berdiaki et al. (2007) durchgeführten Studie an Fibrosarkomzellen wurde demonstriert, dass die

neoplastischen Zellen zu einer Hyaluronsäurebiosynthese fähig sind und wachstumsfaktorabhängig vermehrt HA bilden. Darüber hinaus konnte eine signifikante Aktivierung der HAS in den Tumorzellen demonstriert werden. Über die HAS-Aktivität neoplastischer Schwann-Zellen in plexiformen oder kutanen Neurofibromen gibt es in der Literatur jedoch noch keine Daten.

Auch nicht-transformierte Fibroblasten, als ortsständige Zellen des Bindegewebes und in Neurofibromen verantwortlich für die Aufrechterhaltung und den Abbau, sowie die Neusynthese der Extrazellulärmatrixstruktur, synthetisieren u.a. Kollagenfasern und Glycosaminoglycane wie die Hyaluronsäure (s. 2.7).

Die Arbeitsgruppe um Hellkvist et al. (2002) hat gezeigt, dass Fibroblasten bei inflammatorischen Gewebereaktionen mit einer signifikanten Induktion der Hyaluronsäurebiosynthese und einer erhöhten Proliferationsrate reagieren. Bei der Isolierung der Fibroblasten aus abgestoßenem Myokardtransplantat (allogenes heterotropes Rattenmyokard) konnte eine im Mittel 65 % höhere Hyaluronsäurekonzentration und eine 475 % höhere Proliferationsrate, verglichen mit Fibroblasten aus nichtentzündlichem Gewebe demonstriert werden. Eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der Fibroblasten spielten dabei die Zytokine TNF α und INF γ . Im abgestoßenen Organ entwickelte sich ein hyaluronsäurebedingtes interstitielles Ödem, welches zu einer Erhöhung des Gewebedruckes und zu einer Beeinträchtigung der Gewebedurchblutung durch Kompression der Koronargefäße führte.

Es ist bereits bekannt, dass Tumorzellen die für Proliferation, Invasion und Metastasierung wichtige HA selbständig synthetisieren (s. 2.3.6). Eine von Edward et al. (2005) durchgeführte Studie an Melanomzellen hat allerdings gezeigt, dass Tumorzellen ebenfalls in der Lage sind, die Hyaluronsäuresynthese von Fibroblasten zu stimulieren. Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass invasive Tumorzellen CD44- Rezeptoren sowie HA exprimieren. In den in dieser Studie durchgeführten Färbungen hat sich gezeigt, dass Anti-SFA-AK markierte Fibroblasten in dem vorliegenden Kollektiv lediglich sporadisch in Neurofibromen vorkommen (s. Abb. 5.6.1), und sie daher an der Hyaluronsäureproduktion vermutlich nur einen kleinen Anteil haben.

Insgesamt wird deutlich, dass bei der Suche nach der für die Bildung von Hyaluronsäure verantwortlichen Zellpopulation nicht nur die Fibroblasten, die als eigentliche

Produzenten der EZM gelten, berücksichtigt werden dürfen, da offenbar auch proliferierende und neoplastische Schwann-Zellen in der Lage sind HA zu synthetisieren. In der vorliegenden Untersuchung war die Fibroblastendichte in den Neurofibromen sehr gering, was nahe legt, dass möglicherweise eine weitere Zellkomponente an der Hyaluronsäureproduktion v.a. in plexiformen Neurofibromen beteiligt ist. Bei der Hyaluronsäurebiosynthese in Neurofibromen könnten die neoplastischen Schwann-Zellen eine große Rolle spielen. Es ist zusätzlich möglich, dass die Schwann-Zellen analog zu anderen Tumoren zu einer Stimulation der Hyaluronsäureproduktion in den Fibroblasten in der Lage sind.

6.4 Schwann-Zellen im Kontext der Kollagenproduktion

Zusätzlich wurde zur Evaluation der Fibroblastendichte eine weitere Markierung mit einem Anti-Prokollagen I C-Peptid (PIP)-Antikörper durchgeführt (s. 5.6.2). Beim PIP handelt es sich um eine Sequenz am Amino- und Carboxyterminalen Ende des Typ I Prokollagens, welche bei der Ausschleusung aus der Kollagen produzierenden Zelle von der Prokollagen-Peptidase entfernt wird (Niitsu et al., 1988; Kohda et al., 1991). Es wurden zahlreiche Zellen mit dem Anti-PIP-AK markiert. Das Färbemuster ähnelte dabei dem der S-100-Markierung von Schwann-Zellen (s. Abb. 5.6.2). Berücksichtigt man in diesem Zusammenhang die Anti-SFA-AK-Färbung, die lediglich sporadische Fibroblasten in den Neurofibromen zeigte, könnte dieses Ergebnis darauf hinweisen, dass neben Fibroblasten auch Kollagen produzierende Schwann-Zellen markiert wurden. Hierfür spricht auch, dass die Schwann-Zellen fast immer in eine Kollagenfasermatrix eingebettet sind. Kritisch muß angemerkt werden, dass eine Doppelmarkierung (S-100 und PIP) durch die eindeutige Zuordnung der Prokollagensynthese zu Schwann-Zellen hätte erfolgen können, aufgrund technischer Probleme nicht durchgeführt wurde.

Es ist in früheren Studien demonstriert worden, dass Schwann-Zellen sowohl in vitro, als auch in vivo während der Entwicklung peripherer Nerven die Fähigkeit besitzen, Kollagene zu produzieren (Church et al., 1973; Rothblum et al., 2004). Bunge et al. haben 1980 an Untersuchungen des Endo- und Perineuriums peripherer Nerven demonstriert, dass Schwann-Zellen neben der Synthese von Basalmembranproteinen auch Kollagene vom Typ I, III, V und VI produzieren. In der Studie von Carey (1983) an kultivierten Ratten Schwann-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen Typ IV Prokollagene synthetisieren, sezernieren und als Kollagen Typ IV in die eigene

Basallamina einbauen. Zusätzlich ist in der Studie beobachtet worden, dass Neurone zu einer selektiven Induktion der Prokollagen Typ IV- Biosynthese in Schwann-Zellen in der Lage waren. Andere EZM- Komponenten wurden dagegen nicht stimuliert, was darauf schließen läßt, dass Schwann-Zellen in Abhängigkeit von äußeren Stimuli zur Synthese verschiedener Kollagene fähig sind. Fleischmajer et al. demonstrierten 1985, dass auch neoplastische Schwann-Zellen in Neurofibromen in die Kollagensynthese involviert sind. Die Untersuchung der EZM von Neurofibromen zeigte die gleiche Kollagenzusammensetzung wie die EZM gesunden Nervengewebes. Der geringe Anteil an durch Fibroblasten produziertem Fibronectin und die spezifische Zusammensetzung der EZM deutete darauf hin, dass die Schwann-Zellen eher als die Fibroblasten für die Kollagensynthese in Frage kommen. Yang et al. (2006) kamen allerdings zu der gegenteiligen Annahme, dass NF1^{+/-}-Fibroblasten den Hauptanteil der Kollagenbiosynthese in Neurofibromen bilden. Studien an Neurofibromen im Mausmodell und an humanen Neurofibromen haben gezeigt, dass die Freisetzung des „transforming growth factor beta“ (TGFβ) aus NF^{+/-}-Mastzellen die Proliferation, Migration und Kollagensekretion der Fibroblasten induziert. Anhand der immunhistochemischen Ergebnisse der vorliegenden Studie konnte nicht mit eindeutiger Sicherheit gezeigt werden, dass die Schwann-Zellen die Hauptproduzenten der Kollagenfasern sind. Vor dem Hintergrund der Literatur erscheint dies aber wahrscheinlich.

7 Zusammenfassung

Kutane und plexiforme Neurofibrome sind charakteristische Merkmale der NF1. Die operative Resektion symptomatischer Neurofibrome ist bei NF1 die Therapie der Wahl. Das Auftreten einer sich entwickelnden intra- und postoperativen Schwellung stellt eine wesentliche Komplikation bei dem Eingriff dar. Die Ödeme treten innerhalb einiger Minuten bis Stunden auf und persistierenden teilweise über Tage. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden das Extrazellulärmatrixmolekül Hyaluronsäure und Mastzellen in Neurofibromen untersucht und mit der Ödementwicklung korreliert:

- In der Markierung von HA mit Hyaluronektin zeigte sich, dass Neurofibrome HA enthalten.
- PNF enthielten tendenziell mehr HA enthalten als KNF in den histologischen Präparaten. Dieser Trend wurde in der ELISA Untersuchung bestätigt.
- Im Vergleich des immunhistochemisch ermittelten HA-Gehalts mit der postoperativen Ödembildung beider Tumorarten, war der HA-Gehalt in ödembildenden Tumoren höher als in Neurofibromen ohne postoperatives Ödem
- Die Mastzellichte zeigte keine signifikanten Korrelationen mit den anderen Variablen.

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass Neurofibrome vom plexiformen Typ signifikant mehr HA enthalten als Neurofibrome vom kutanen Typ und am ehesten für postoperative Schwellungen verantwortlich sind. Den Mastzellen kommt dabei womöglich die Rolle als Mediator der Ödementwicklung zu, indem sie den Einstrom von Wasser in das Interstitium fördern. Die Ergebnisse weiterer immunhistochemischer Untersuchungen (HN/Anti-SFA-AK, HN/S-100, Anti-PIP-AK) deuten darauf hin, dass neoplastische Schwann-Zellen für die Bildung von HA eine entscheidende Rolle spielen könnten. Jedoch konnten die Schwann-Zellen nicht mit eindeutiger Sicherheit als die Produzenten der HA identifiziert werden. Weiterhin geben die immunhistochemischen Untersuchungen einen Hinweis darauf, dass Schwann-Zellen die EZM von Neurofibromen mitgestalten, indem sie Kollagenfasern produzieren.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
CCR	chemokine receptors
DZ	Dendritische Zelle
EZM	Extrazellulärmatrix
FcεRI	high-affinity IgE receptor
FcεRII	low-affinity IgE receptor
FN	Fibronektin
g	Gramm
GAG	glycosaminoglycane
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GDP	Guanosin-Diphosphat
GlcNac	N-Acetyl-D-Glucosamine
GlcUA	D-Glucuronic-Acid
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GTP	Guanosin-Triphosphat
H ₁ R	Histamin 1 Rezeptor
HA	Hyaluronsäure
HBP	Hyaluronsäure-Bindendes-Protein
HAS	Hyaluronsäuresynthetase
HN	Hyaluronektin
HPH-20	human sperm membrane protein
HYAL	Hyaluronidase
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPF	ideopathische Lungenfibrose
kDA	Kilodalton
KNF	kutanes Neurofibrom
LT	Leukotrien
M	Molare Masse

MG	Molekulargewicht
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MPNST	malignant peripheral nerve sheath tumor
mRNA	messenger ribonukleic acid
MZ	Mastzelle
NF1	Neurofibromatose Typ 1
PAS	perjod acid schiff reagent
PDGF	platelet derived growth factor
PGD ₂	Prostaglandin 2
PHYAL1	pseudogene hyaluronidase 1
PIP	Prokollagen 1C Peptid
PNF	plexiformes Neurofibrom
PNS	peripheres Nervensystem
RCF	relative centrifugation Force
RHAMM	receptor for hyaluron acid mediated motility
S	Standartabweichung
SCF	stem cell factor
SFA	fibroblast surface antigen
SPAM1	sperm adhesion molecule 1
Std	Stunde
TGFβ	transforming growth factor β
T _H 2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TNFα	tumor necrosis factor α
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

Beitragswerke:

Fawcett DW, Raviola E (1994) Bloom And Fawcett, A Textbook Of Histology 12. Ed.; pp. 146-149

Lüllmann-Rauch R (2003) Histologie. S. 159-163

Schiebler TH, Schmidt W, Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann H, Kühnel W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K (2003) Anatomie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen; S. 87-90

Weiß L (1988) Cell and Tissue Biology: A Textbook Of Histology 6. Ed.; pp. 158-168

Zeitschriften:

Afifi AK, Dolan KD, Van Gilder JC, Fincham RW (1988) Ventriculomegaly in neurofibromatosis-1. Association with Chiari type I malformation. Neurofibromatosis.; 1(5-6):299-305

Akdis CA, Blaser K (2003) Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. J Allergy Clin Immunol;112:15-22

Almond A, Deangelis PL, Blundell CD (2006) Hyaluronan: the local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix. J Mol Biol.; 358(5):1256-69

Arock M, Ross E, Lai-Kuen R, Averlant G, Gao Z Abraham SN (1998) Phagocytic and Tumor Necrosis Factor Alpha Response of Human Mast Cells following Exposure to Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. Inf. and Immun; 66(12):6030–6034

Berdiaki A, Zafiropoulus A, Fthenou E, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN (2008) Regulation of hyaluronan and versican deposition by growth factors in fibrosarcoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*; 1780(2):194-202

Bunge MB, Williams AK, Wood PM, Uitto J, Jeffrey JJ (1980) Comparison of Nerve Cell and Nerve Cell plus Schwann Cell Cultures, with particular emphasis on Basal Lamina and Collagen Formation. *J Cell Biol.*; 84(1):184-202.

Bourguignon LYW, Zhu H, Shao L, Chen YW (2000) CD44 Interaction with Tiam1 Promotes Rac1 Signaling and Hyaluronic Acid-mediated Breast Tumor Cell Migration. *J Biol. Chem.*; 275(3):1829–1838

Camenisch TD, McDonald JA (2000) Hyaluronan: is bigger better? *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 23(4):431-3

Carey DJ, Eldridge CF, Cornbrooks CJ, Timpl R, Bunge RP (1983) Biosynthesis of Type IV Collagen by Cultured Rat Schwann Cells. *J Cell Biol.*; 97(2):473-9

Castleman WL, Sorkness RL, Lemanske Jr. Rf, McAllister PK (1990) Viral Bronchiolitis During Early Life Induces Increased Numbers of Bronchiolar Mast Cells and Airway Hyperresponsiveness. *AmJPathol*; 137:821-831

Church RL, Tanzer ML, Pfeiffer SE (1973) Collagen and Procollagen Production by a Clonal Line of Schwann Cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 70(7):1943-1946

Comper WD, Laurent TC (1978) Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev.*; 58(1):255-315

Courel MN, Marret S, Girard N, Chauzy C, Olivier A, Bertrand P, Delpech A, LaQuerriere A, Asou H, Delpech B (1998) Hyaluronectin is produced by oligodendrocytes and Schwann cells in vitro. *J Neurocytol.*; 27(1):27-32.

Coussens LM, Werb Z (2001) Inflammatory cells and cancer: Think Different!. *J Exp Med.*; 193(6):F23-6.

- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature*; 420(6917):860-7
- DeBella K, Szudek J, Friedman JM (2000) Neurofibromatosis 1 in Children. *Pediatrics*; 105(3):608-614
- Delpech B, Halavent C (1981) Characterization and purification from human brain of a hyaluronic acid binding glycoprotein: Hyaluronectin. *J. Neurochem*; 36:855-859
- Delpech A, Girard N, Delpech B (1982) Localization of hyaluronectin in the nervous system. *Brain Res*; 245: 251-257
- Delpech A, Delpech B (1984) Expression of Hyaluronic Acid-Binding Glycoprotein, Hyaluronectin, in the Developing Rat Embryo. *Dev Biol.*; 101(2):391-400
- Delpech A, Delpech B, Girard N, Bertrand P, Chauzy C (1987) Hyaluronectin and hyaluronic acid during the development of rat brain cortex. *Mesenchymal-Epithelial Interactions in Neural Development. Nato Asi Series*; 5:77-87
- Delpech B, Bertrand P, Maingonnat C, Girard N, Chauzy C (1995) Enzyme-Linked Hyaluronectin: A Unique Reagent for Hyaluronan Assay and Tissue Location and for Hyaluronidase Activity Detection. *Anal Biochem*; 229(1):35-41
- Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A (1997) Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med*; 242(1):41-48
- Dick SJ, Macchi B, Papazoglou S, Oldfield EH, Kornblith PL, Smith BH, Gately MK (1983) Lymphoid cell-glioma cell interaction enhances cell coat production by human gliomas: novel suppresser mechanism. *Science*, 220: 739–742, 1983
- Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM (1986) Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer.*; 57(10):2006-21

Dugoff L, Sujansky S (1996) Neurofibromatosis Type 1 and Pregnancy. *Am J Med Genet.*; 66(1):7-10

Dunn DW, Roos KL (1988) Neurofibromatosis: an update. *Indiana Med*;81(3):207-15

Dunn DW, Roos KL (1989) Magnetic resonance imaging evaluation of learning difficulties and incoordination in neurofibromatosis. *Neurofibromatosis.*; 2(1):1-5

Dunn Dw, Purvin VA (1988) Ophthalmologic manifestations of Neurofibromatosis

Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BA (1993) An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet.*; 53(2):305-13

Edward M, Gillan C, Micha D, Tammi RH (2005) Tumour regulation of fibroblast hyaluronan expression: a mechanism to facilitate tumour growth and invasion. *Carcinogenesis*; 26(7):1215-1223

Evans DG, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet.*; 39(5):311-4

Fleischmajer R, Timpl R, Dziadek M, Lebwohl M (1985) Basement Membrane Proteins, Interstitial Collagens, and Fibronectin in Neurofibroma. *J Invest Dermatol.*; 85(1):54-9

Forsberg N, Gustafson S (1991) Characterization and purification of the hyaluronan-receptor on liver endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.*; 1078(1):12-8

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB (1997) Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.*; 242(1):27-33

Girard N, Maingonnat C, Bertrand P, Vasse M, Delpech B (1999) Hyaluronectin Secretion by Monocytes: Downregulation by IL-4 and IL-13, Upregulation by IL-10. *Cytokine*; 11(8):579–584

Gottfried ON, Viskochil DH, Fults DW, Couldwell WT (2006) Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromas and surgical implications. *Neurosurgery*.; 58(1):1-16; discussion 1-16

Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*.; 4(2):121-30

Hällgren R, Gerdin B, Tengblad A, Tufveson G (1990) Accumulation of Hyaluronan (Hyaluronic Acid) in Myocardial Interstitial Tissue Parallels Development of Transplantation Edema in Heart Allografts in Rats. *J. Clin. Invest*; 85:668-673

Hällgren R, Gerdin B, Tufveson G (1990) Hyaluronic Acid accumulation and redistribution in rejecting rat kidney graft; relationship to the transplantation edema. *J Exp Med*.;171(6):2063-76.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*; 100(1):57–70

Hellkvist J, Tufveson G, Gerdin B, Johnsson C (2002) Characterization of fibroblasts from rejecting tissue: The hyaluronan production is increased. *Transplantation*; 74(12):1672–1677

Hruban RH, Shiu MH, Senie RT, Woodruff JM (1990) Malignant peripheral nerve sheath tumors of the buttock and lower extremity. A study of 43 cases. *Cancer*.; 66(6):1253-65

Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG (1996) Sperm Surface Protein PH-20 Is Bifunctional: One Activity Is a Hyaluronidase and a Second, Distinct Activity Is Required in Secondary Sperm-Zona Binding. *Biol Reprod*.; 55(1):80-6

Huson SM, Compston DAS, Clark P, Harper PS (1989) A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in southeast Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet*; 26:704–711

Itano N, Kimata K (1998) Hyaluronan synthase: new directions for hyaluronan research. *Trends Glycosci. Glycotech*; 10:23–38

Itano N, Sawai T, Miyaishi O, Kimata K (1999) Relationship between Hyaluronan Production and Metastatic Potential of Mouse Mammary Carcinoma Cells; *Cancer Res*; 59(10):2499–2504

Johnsson C, Hällgren R, Elvin A, Gerdin B, Tufveson G (1999) Hyaluronidase ameliorates rejection-induced edema. *Transpl Int.*; 12(4):235-43

Johnsson C, Tufveson G, Hällgren R (2000) Monitoring of intragraft pressure of rejecting organs (Increased tissue pressure can be reduced by hyaluronidase therapy). *Transplantation*; 70(11):1575-80

Kohda K, Ito N, Ohwada M, Morita K, Watanabe N, Kohgo Y, Mogi Y, Niitsu Y (1991) Diagnostic value of measurement of serum type I procollagen carboxy terminal peptides in patients with scirrhous carcinoma of the stomach. *Gut*; 32:624-629

Kluwe L, Friedrich R, Mautner VF (1999) Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer*; 24(3):283-5

Kluwe L, Hagel C, Mautner V (2007) Neurofibroma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*; April 2007

Knudson W, Biswas C, Li X, Nemecek RE, Toole BP (1989) The Role and Regulation of Tumour-Associated Hyaluronan. *Ciba Found Symp.*; 143:150-9; discussion 159-69, 281-5

Korf BR (1999) Plexiform neurofibromas. *Am J Med Genet.*; 89(1):31-7

Korf BR (2000) Malignancy in Neurofibromatosis Type 1 *Oncologist*; 5:477-485

Kourea HP, Bilsky MH, Leung DH, Lewis JJ, Woodruff JM (1998) Subdiaphragmatic and intrathoracic paraspinal malignant peripheral nerve sheath tumors: a clinicopathologic study of 25 patients and 26 tumors. *Cancer.*; 82(11):2191-203

Lammert M, Friedman JM, Kluwe L, Mautner VF (2005) Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment. *Arch Dermatol.*; 141(1):71-4

Laurent UB, Dahl LB, Reed RK (1991) Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver. *Exp Physiol.*; 76(5):695-703

Laurent TC, Fraser JR (1992) Hyaluronan. *FASEB J.*; 6(7):2397-404

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR (1996) The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol.*; 74(2):A1-7

Laurent C, Yoon Y, Hvidsten I, Hellström S (2003) Hyaluronan and a-Atrial Natriuretic Polypeptide in Human Nasal Polyps: Contributing Factors to Oedema Formation and Polyp Growth? *Acta Oto-Laryngologica*; 123(3); 406-412

Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M, Carey JC (1989) Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation. *Am J Hum Genet.*; 44(1):20-4

Lévy P, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G, Parfait B, Wolkenstein P, Vidaud M, Bièche I (2004) Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Mol Cancer.*; 3:20

Lin W, Shuster S, Maibach HI, Stern R (1997) Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J Histochem Cytochem.*; 45(8):1157-63

McBride WH, Brad JBL (1979) Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells: their role in blocking lymphocyte-mediated cytolysis. *J. Exp. Med.*; 149:507–515

McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW (1996) Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest.*; 98(10):2403-13

Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Yandell DW, Farmer GE, Freiman RN, Lee JK, Li FP, et al (1990) Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 87(14):5435-9

Metcalfé DD, Baram D, Mekori YA (1997) Mast Cells. *Physiol Rev.*; 77(4):1033-79

Meyer K, Palmer JW (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem*; 107:629-34

Nettelbladt O, Tengblad A, Hällgren R (1989) Lung accumulation of hyaluronan parallels pulmonary edema in experimental alveolitis. *Am. J. Physiol.* 257(1):379-384

Niitsu Y, Koda K, Ito N, et al. (1988) Measurement of carboxyl terminal peptide of type I procollagen in sera of patients with viral hepatitis and liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*; 3: 159-67

Ohkawara Y, Tamura G, Iwasaki T, Tanaka A, Kikuchi T, Shirato K (2000) Activation and transforming growth factor-beta production in eosinophils by hyaluronan. *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 23(4):444-51

Packer RJ, Gutmann DH, Rubenstein A, Viskochil D, Zimmerman RA, Vezina G, Small J, Korf B (2002) Plexiform neurofibromas in NF1: toward biologic-based therapy. *Neurology.*; 58(10):1461-70

Paiva P, Van Damme MP, Tellbach M, Jones RL, Jobling T, Salamonsen LA (2005) Expression patterns of hyaluronan, hyaluronan synthases and hyaluronidases indicate a role for hyaluronan in the progression of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*; 98(2):193-202

Papanikolaou V, Vrochides D, Gakis D, Patsiaoura K, Paraskevi M, Dogramatzi F, Antoniadou A, Paraskevi H (2002) Improvement of Rat Liver Function After Storage in University of Wisconsin Solution Containing Testicular Hyaluronidase. *Liver Transpl*; 8:1028-1035

Peltonen J, Jaakkola S, Lebowitz M, Renvall S, Risteli L, Virtanen I, Uitto J (1988) Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis. *Lab Invest.*; 59(6):760-71

Ponting JM, Kumar S (1995) Localisation and cellular origin of hyaluronectin. *J. Anat*; 187(2):331-346

Prussin C, Metcalfe DD (2003) IgE, mast cells, basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.*; 111(2):S486-94

Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM (2001) Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum Genet.*; 68(5):1110-8

Riccardi VM, Eichner JE (1986) *Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis*. Baltimore: Johns Hopkins University Press

Riccardi VM (1989) Neurofibromatosis update. *Neurofibromatosis.*; 2(5-6):284-91

Riccardi VM (2007) The genetic predisposition to and histogenesis of neurofibromas and neurofibrosarcoma in neurofibromatosis type 1. *Neurosurg Focus.*; 22(6):E3

Rooney P, Wang M, Kumar P, Kumar S (1993) Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *J Cell Sci.*; 105 (Pt 1):213-8

Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M (1995) The role of hyaluronan in tumour neovascularization. *Int J Cancer.*; 60(5):632-6

Roos KL, Dunn DW (1992) Neurofibromatoses. *CA Cancer J Clin.*; 42(4):241-54

Rothblum K, Stahl RC, Carey DJ (2004) Constitutive Release of α 1 Type V Collagen N-terminal Domain by Schwann Cells and Binding to Cell Surface and Extracellular Matrix Heparan Sulfate Proteoglycans. *J Biol Chem.*; 279(49):51282-8

Rutkowski JL, Wu K, Gutmann DH, Boyer PJ, Legius E (2000) Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet.*; 9(7):1059-66

Salamonsen LA, Shuster S, Stern R (2001) Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle. Implications for implantation and menstruation. *Cell Tissue Res.*; 306(2):335-40

Samuelsson B, Riccardi VM (1989) Neurofibromatosis in Gothenburg, Sweden. III. Psychiatric and social aspects. *Neurofibromatosis.*; 2(2):84-106

Sasaki T, Onodera S (1990) Glycosaminoglycans in neurofibromas. *J Dermatol.*; 17(11):653-60

Sattar A, Rooney P, Kumar S, Pye D, West DC, Scott I, Ledger P (1994) Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin. *J Invest Dermatol.*; 103(4):576-9

Scott JE (1989) Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Ciba Found Symp.*;143:6-15; 15-20, 281-5

Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M (1996) Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet.*; 33(1):2-17

Sherman L, Skroch-Angel P, Moll J, Schwechheimer K, Ponta H, Herrlich P, Hofmann M (1995) Schwann cell tumors express characteristic patterns of CD44 splice variants. *J Neurooncol.*;26(3):171-84

Simons F, Estelle R (2004) Drug Therapy: Advances in H₁-Antihistamines.

Singh N, Birdi TJ, Chandrashekar S, Antia NH (1997) Schwann cell extracellular matrix protein production is modulated by Mycobacterium leprae and macrophage secretory products. *J Neurol Sci.*; 151(1):13-22

Smedsrød B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC (1990) Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J.*; 266(2):313-27

Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR (1998) Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg.*; 176(2):26-38

Steed DL (1997) The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am.*; 77(3):575-86

Stefansson K, Wollmann R, Jerkovic M (1982) S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes. *Am J Pathol.*;106(2):261-8

Stern R (2003) Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiol.*; 13(12):105-115

Stern R, Jedrzejak MJ (2006) Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chem. Rev.*; 106(3):818-839

Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Tammi M (1988) Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Dermatol.*; 90(3):412-4

Tammi R, Paukkonen K, Wang C, Horsmanheimo M, Tammi M (1994) Hyaluronan and CD44 in psoriatic skin. Intense staining for hyaluronan on dermal capillary loops and reduced expression of CD44 and hyaluronan in keratinocyte-leukocyte interfaces. *Arch Dermatol Res.*; 286(1):21-9

Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC (2000) Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol.*; 165(4):1863-70

Tona A, Perides G, Rahemtulla F, Dahl D (1993) Extracellular matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on the localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. *J Histochem Cytochem.*; 41(4):593-9

Tonsgard JH (2006) Clinical manifestations and management of neurofibromatosis type 1. *Semin Pediatr Neurol.*; 13(1):2-7

Toole BP, Biswas C, Gross J (1979) Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;76(12):6299-303

Toole BP (1997) Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med.*; 242(1):35-40

Turley EA (1992) Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.*; 11(1):21-30

Uchiyama H, Dobashi Y, Ohkouchi K, Nagasawa K (1990) Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. *J Biol Chem.*; 265(14):7753-9

Vaheri A, Ruoslahti E, Westermark B, Ponten JA (1976) Common Cell-type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts: Loss in Malignant Cells. *J Exp Med.*; 143(1):64-72

Waggoner DJ, Towbin J, Gottesman G, Gutmann DH (2000) Clinic-based study of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet.*; 92(2):132-5

Waldenström A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hällgren R (1991) Accumulation of Hyaluronan and Tissue Edema in Experimental Myocardial Infarction. *J Clin Invest.*;88(5):1622-8

Wartiovaara J, Linder E, Ruoslahti E, Vaheri A (1975) Distribution of fibroblast surface antigen: association with fibrillar structures of normal cells and loss upon viral transformation. *J Exp Med.*; 140(6):1522-33

Woodruff JM (1999) Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *Am J Med Genet.*; 89(1):23-30

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell.*;62(3):599-608

Yang FC, Ingram DA, Chen S, Hingtgen CM, Ratner N, Monk KR, Clegg T, White H, Mead L, Wenning MJ, Williams DA, Kapur R, Atkinson SJ, Clapp DW (2003) Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1^{+/-} mast cells. *J Clin Invest.*; 112(12):1851-61

Yang FC, Chen S, Clegg T, Li X, Morgan T, Estwick SA, Yuan J, Khalaf W, Burgin S, TraversJ, Parada LF, Ingram DA, Clapp DW (2006) Nf1^{+/-} mast cells induce neurofibroma like phenotypes through secreted TGF-beta signalling. *Hum Mol Genet.*; 15(16):2421-37

10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Hagel für die Überlassung des Themas und die unkomplizierte und fachkompetente Betreuung, die mir jederzeit zuteil wurde.

Herrn Prof. Dr. Markus Glatzel danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten am Institut für Neuropathologie durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Dr. R.E. Friedrich danke ich für die Überlassung der klinischen Daten.

Ich bedanke mich bei Herrn Christian Bernreuther, Herrn Jakob Matschke, Frau Ulrike Rumpf, Herrn Martin Haberkorn und Frau Yvonne Pulkenat aus dem Institut für Neuropathologie für die Einführung in und Hilfe bei der Immunhistochemie.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Frau Martina Behrens und meinen Eltern für die Unterstützung und Hilfe, so dass ich die Zeit meiner Dissertation widmen konnte.

12 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ort, Datum

Unterschrift

10 Anhang

Patientenkollektiv und Tumormaterial

NUMMER	Alter	Geschlecht ^a	Diagnose ^b	Färbeintensität	Kollagengehalt	Ödeme	ELISA µgHA/ml [*]	Kerne/1mm ²	Mastzellen/1mm ²
E0383-06	19	1	3	3	2	k.A.	/	1263	24
E0427-06	17	1	3	3	1	3	/	2131	58
E0428-06	17	1	3	2	1	3	/	2710	11
E0429-06	17	1	3	2	2	3	/	1978	22
E0430-06	17	1	1	3	2	3	/	1565	21
E0431-06	17	1	3	2	3	3	/	1618	47
E0432-06	38	2	1	3	1	3	/	3565	0
E0446-06	27	1	1	3	1	k.A.	/	3105	29
E0472-06	28	2	1	2	1	3	/	2724	13
E0488-06	62	2	1	2	2	1	/	2079	58
E0489-06	62	2	1	2	2	1	/	2316	24
E0495-06	21	2	1	0	1	0	/	3579	32
E0496-06	21	2	1	1	2	0	/	4052	18
E0497-06	21	2	1	1	2	0	/	4250	18
E0539-06	20	2	1	2	1	2	/	3763	21
E0540-06	20	2	1	3	1	2	/	4974	8
E0557-06	50	1	3	1	1	0	/	4579	21
E0563-06	63	1	3	3	3	2	/	868	16
E0574-06	61	2	1	1	1	0	7,1	3447	24
E0575-06	61	2	1	1	2	0	/	1789	3
E0579-06	23	1	1	2	2	2	33,5	4447	39
E0582-06	63	1	3	2	3	3	1,7	434	16
E0602-06	51	2	1	2	1	0	/	2539	8
E0620-06	20	2	3	1	3	2	7,6	2263	63
E0629-06	21	1	1	3	2	0	42,6	3237	89
E0630-06	21	1	1	2	2	2	17,4	4816	21
E0638-06	49	1	1	2	2	0	21,4	2487	11
E0642-06	16	1	1	3	3	0	5,2	2605	16
E0650-06	16	2	1	1	2	3	0,8	4000	168
E0651-06	16	2	1	2	3	k.A.	33,5	4280	88

E0652-06	16	2	3	2	1	k.A.	29,2	4513	95
E0656-06	48	1	1	2	3	k.A.	60,1	2539	5
E0657-06	48	1	1	2	2	k.A.	81,9	3881	18
E0658-06	48	1	1	2	3	k.A.	6,4	4000	87
E0665-06	15	1	3	3	2	3	87,7	750	32
E0666-06	15	1	3	3	2	0	58,1	1500	26
E0674-06	41	2	1	2	3	0	21,4	2658	42
E0732-06	40	1	1	3	1	0	15,7	3816	39
E0734-06	54	2	1	3	2	k.A.	21,4	3237	34
E0791-06	19	2	1	2	3	2	38,5	2765	31
E0796-06	17	2	1	2	3	3	18,1	2631	84
E0802-06	61	2	1	1	2	0	29,2	3000	53
E0803-06	52	2	1	1	3	0	16,9	2605	84
E0807-06	1	2	3	1	3	0	/	988	0
E0812-06	16	2	1	3	2	2	18,1	3013	5
E0820-06	45	2	1	3	1	0	11,2	4000	8
E0839-06	44	1	1	3	2	k.A.	34,7	2947	24
E0854-06	19	2	1	3	3	0	8,2	2658	18
E0855-06	19	2	1	2	3	0	26,4	3421	16
E0856-06	19	2	1	2	3	0	38,5	1158	8
E0857-06	19	2	1	1	2	0	2,8	2776	13

a: 1, weiblich; 2, männlich

b: 1, kutanes Neurofibrom; 3, plexiformes Neurofibrom

k.A.: Keine Angaben

* Messung durch Herrn Prof. Dr. Prehm, Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Münster