

Aus dem Institut für Neuropathologie  
der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf  
Prof. Dr. M. Glatzel

Potentielle Merkmale für Dedifferenzierung und Tumorprogress in  
peripheren Nervenscheidentumoren

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

vorgelegt von

Urs Naber

aus Stuttgart Bad-Cannstatt

Hamburg, 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am:

14.02.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. C. Hagel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. Dr. R. Friedrich

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. M. Glatzel

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1. Neurofibromatose Typ 1	2
2.2. Neurofibromatose Typ 2	4
2.3. Die Schwannomatose	5
2.4. Sporadische Schwannome	5
2.5. Histopathologie peripherer Nervenscheidentumoren	6
2.6. Adhäsionsmoleküle	9
2.6.1. CD34	9
2.6.2. Podoplanin	10
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
3.1. Reagenzien und Antikörper	12
3.2. Laborgeräte	14
3.3. Verbrauchsmaterialien	14
3.4. Lösungen	15
3.4.1. Tris buffered saline (TBS) 50 mM pH 7,6	15
3.4.2. TBS / Triton	15
3.4.3. DAB-Stammlösung	15
3.4.4. DAB-Reaktionslösung	15
3.4.5. Hemmung der endogenen Peroxidase	15
3.4.6. Antikörper Blockierungslösung	15
3.5. Patientenkollektiv	15
3.6. Gewebeproben	16
3.7. Histochemie	17
3.7.1. Schnittherstellung	17
3.7.2. PAS Färbung	17
3.8. Immunhistochemie	18
3.8.1. CD34	18
3.8.2. D2-40 Mouse Lymphatic Endothelial Marker	18
3.8.3. MIB-1 (Ki-67) und EMA (Epitheliales Membranantigen)	19

## Inhaltsverzeichnis

3.9. Evaluation	20
3.9.1. Antikörperfärbung	20
3.9.2. Vaskularisierung (Blut und Lymphe)	20
3.9.3. Mastzellichte	20
3.9.4. Proliferationsindex	20
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>21</b>
4.1. Immunhistochemie	21
4.1.1. CD34-Expression	21
4.1.2. Podoplanin Expression	21
4.1.3. Ki-67- und EMA-Färbungen	23
4.2. Mastzellen	24
4.3. Vaskularisierung durch Blutgefäße	25
4.4. Vaskularisierung durch Lymphgefäße	27
<b>5. Diskussion</b>	<b>29</b>
5.1. Blutgefäße in peripheren Nervenscheidentumoren	29
5.2. Lymphgefäße in peripheren Nervenscheidentumoren	30
5.3. Mastzellen in peripheren Nervenscheidentumoren	31
5.4. CD34 in peripheren Nervenscheidentumoren	33
5.5. Podoplanin in peripheren Nervenscheidentumoren	33
5.6. Atypische Neurofibrome und Malignität	34
<b>6. Beantwortung der Fragestellung</b>	<b>35</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>36</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>37</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>37</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>38</b>
<b>11. Literaturverzeichnis</b>	<b>39</b>
<b>12. Danksagung</b>	<b>48</b>
<b>13. Erklärungen</b>	<b>49</b>
<b>14. Anhang</b>	<b>50</b>
14.1. Legende	50
14.1.1. Tumortyp	50
14.1.2. Geschlecht	50

## Inhaltsverzeichnis

14.1.3. Lokalisation	50
14.1.4. Grunderkrankung	50
14.1.5. Färbeintensität	50



# 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

An Neurofibromatose erkrankte Patienten leben mit einem hohen Risiko periphere Nervenscheidentumore (PNST) zu entwickeln.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Faktoren untersucht, um mögliche Prädiktoren für eine Tumorprogression zu identifizieren.

Untersucht wurden die Tumore sowohl auf der Gewebeebene, als auch auf zellulärer Ebene. Auf Gewebeebene wurde die Mastzellichte evaluiert und es wurde die Blut- und die Lymphgefäßdichte gemessen.

Auf zellulärer Ebene wurden zwei Adhäsionsmoleküle, Podoplanin und CD34, auf ihre Expression in den verschiedenen Tumorarten immunhistochemisch untersucht.

In ausgewählten Fällen wurden zusätzlich Proliferationsindices und die Verteilung von Perineuralzellen untersucht (Ki-67 und EMA Immunhistochemie).

Es wurden folgende 3 Fragestellungen bearbeitet:

1. Korreliert die Expression von CD34 und Podoplanin mit der Tumordignität bzw. haben diese Marker prädiktiven Wert für die Tumorprogression?
2. Nimmt die Vaskularisierung, sowohl durch Blut-, als auch durch Lymphgefäße mit zunehmender Dedifferenzierung zu?
3. Weisen die verschiedenen Tumorentitäten typische Mastzellichten auf? Nimmt die Mastzellichte mit zunehmender Dedifferenzierung zu?

## 2. Einleitung

Die Neurofibromatosen (NF) mit ihren verwandten Syndromen (Watson Syndrom, LEOPARD Syndrom, Noonan Syndrom etc.), sind neurogenetische Erkrankungen mit komplexen Phänotypen. Bisher wurden drei Arten von Neurofibromatosen klassifiziert: Neurofibromatose Typ 1, Neurofibromatose Typ 2 und seit kurzem die Schwannomatose (McClatchey 2007).

### 2.1. Neurofibromatose Typ 1

Neurofibromatose Typ 1 (NF1, Inzidenz 1: 3.000 bis 1: 4.000) ist eine der häufigsten autosomal dominant vererbten neurogenetischen Krankheiten, die Penetranz liegt bei 100% (Lynch 2002). Die Neomutationsrate beträgt 50%, die übrigen 50% sind vererbte Keimbahnmutationen (Packer 2002). NF1-Patienten mit milder verlaufendem Mosaiktyp (5-10%) weisen meist keine Keimbahnmutation auf. Die Erstbeschreibung geht zurück auf das Jahr 1882 durch von Recklinghausen (von Recklinghausen 1882). Der Phänotyp zeigt eine ganze Reihe neurologischer Manifestationen, einschließlich einem breiten Spektrum von Tumoren. Die Ausprägung der Symptome jedoch kann bedeutend variieren.

#### NIH Diagnosekriterien der NF1

- a) Mind. 6 Café-au-lait-Flecken, die vor der Pubertät mind. 5 mm und nach der Pubertät mind. 15 mm groß zu sein haben. (99%)
- b) Axilläre oder inguinale Freckling (90%)
- c) Mind. zwei Neurofibrome jeden Typs (90%) oder ein plexiformes Neurofibrom (30%).
- d) Mind. zwei Lisch Knötchen (70%)
- e) Optikusgliom
- f) Dysplasien des Keilbeinflügels, Pseudarthrosen, Corticalisatrophie in den langen Knochen.
- g) Verwandtschaft 1. Grades mit einem NF1-Patienten (50%)

**Tabelle 1: Diagnosekriterien der NF1** Häufigkeiten der einzelnen Merkmale in Klammern, mindestens zwei Kriterien müssen erfüllt sein. National Institutes of Health Consensus Development Conference 1988.

Das NF1-Gen befindet sich auf dem Chromosom 17 und besteht aus 61 Exonen, die für ein 2818 Aminosäuren langes Protein codieren, welches als Neurofibromin bezeichnet wird. Das Protein fungiert sowohl über die Regulation des Ras-Pathway als auch über die intrazelluläre cAMP-Ausschüttung, als Proliferationsinhibitor (Xu et al. 1990, Hegedus et al. 2007). Schwannomzellen sind einige der wenigen Zellen, die cAMP als Proliferationsinduktor nutzen (Kim et al. 1997).

Die Diagnose der NF1 wird anhand der klinischen Diagnosekriterien entsprechend der NIH Consensus Conference von 1988 gestellt (NIH Consensus Conference, 1988, siehe Tabelle 1).

Die charakteristischen klinischen Merkmale treten mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Café-au-lait-Flecken haben die höchste Penetranz, in bis zu 99% ist diese Veränderung schon im ersten Lebensjahr vorhanden. Die restlichen kutanen Veränderungen treten progredient auf (Riccardi 1999). Neben den äußerlich offensichtlichen, kutanen Manifestationen emergieren regelhaft schon im Kindesalter neuropsychologische Auffälligkeiten; u.a. findet sich eine Entwicklungsverzögerung, motorisches Ungeschick, Gleichgewichtsstörungen, aber auch kognitive Defekte sind bei bis zu 2/3 der Kinder zu beobachten.

29% bis 45% der Kinder mit NF1 entwickeln einen Macrocephalus, jedoch meist ohne klinische Auswirkung (Gutmann 1999). Komplikationen vaskulärer Genese sind selten und umfassen sowohl Nierenarterienstenose als auch das Moyamoya Syndrom. Die auffälligste Manifestation ist eine oft sehr hohe Anzahl von Tumoren. An erster Stelle stehen die Neurofibrome. Weitaus seltener sind gutartige Optikusgliome. Diese Tumore haben wie Hirnstammgliome oder zerebelläre Gliome eine wesentlich günstigere Prognose als die entsprechenden sporadisch auftretenden Tumore (Arun et al. 2004). Die Tumore treten zum Teil schon in den ersten Lebensjahren auf. Die einzelnen Tumortypen werden später genauer erläutert.

## 2.2. Neurofibromatose Typ 2

Die Neurofibromatose Typ 2 (NF2, Geburtsinzidenz 1: 35-40.000, symptomatische Prevalenz 1: 200.000) ist eine autosomal dominante Erbkrankheit (Evans et al. 2002). Der Genlocus des NF2-Gens liegt auf dem Chromosom 22. Das Gen besteht aus 17 Exonen und kodiert für ein 595 Aminosäuren langes Protein, genannt Merlin (ehemals Schannomin). Merlin ist ein Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin-Protein Familie (ERM) und hat zusätzlich zu seiner Funktion als Teil dieser Familie die Eigenschaft eines Tumorsuppressors (Trofatter et al. 1993). Die genaue Funktion Merlins ist noch unklar. Neuen Ergebnissen zufolge könnte Merlin an der Phosphorylierung bzw. Aktivierung der Sarcoma tyrosine kinase (Src) beteiligt sein (Houshmandi et al. 2009). Eine Mosaiktyp kommt bei der NF2 weitaus häufiger vor (30%) als bei der NF1. Die Phänotypen können, abhängig von der Art der Mutation, in ihrem Schweregrad stark voneinander abweichen. Die NF2 manifestiert sich relativ spät, zu ca. 80% erst zwischen dem 18.-24. Lebensjahr. Diese späte Manifestation führt zu der geringen diagnostischen Prevalenz. Das diagnostische Charakteristikum der Krankheit sind bilaterale Akustikusschwannome (Bilateral Vestibular Schwannoma=BVS). Es können

### Manchester Kriterien zur Diagnose von NF2

- (a) Bilaterale Akustikusschwannome
- (b) Verwandte 1. Grades mit NF2 & unilaterales Akustikusschwannom vor Erreichen des 30. Lj.
- (c) Verwandte 1. Grades mit NF2 & zwei der folgenden Veränderungen: Meningeom, Gliom, Schwannom, Juvenile subkapsuläre hintere Augentrübung
- (d) Unilaterales Akustikusschwannom vor Erreichen des 30. Lj. & mind. eines der folgenden Veränderungen: Meningeom, Gliom, Schwannom, Juvenile subkapsuläre hintere Augentrübung
- (e) 2 oder mehr Meningeome & unilaterales Akustikusschwannom vor Erreichen des 30. Lj.
- (f) 2 oder mehr Meningeome & eines der folgenden Veränderungen: Gliom, Schwannom, Juvenile subkapsuläre hintere Augentrübung

**Tabelle 2: Manchester Kriterien zur Diagnose von NF2** (modifizierte NIH-Kriterien, angepasst nach McClatchey 2007). Punkt a-c definitive NF2 Kriterien, Punkt d-f mögliche NF2 Kriterien.

noch andere Tumorentitäten wie Meningeome, Gliome, Schwannome in anderer Lokalisation und seltener Ependymome entstehen. Die Diagnose kann meist anhand des klinischen Bildes gestellt werden. Eines der ersten klinischen Zeichen ist zumeist der Hörverlust durch BVS. Es können auch andere Hirnnerven betroffen sein. Die Diagnose erfolgt entsprechend den Manchester Kriterien aus dem Jahr 2000 (siehe Tabelle 2).

### 2.3. Die Schwannomatose

Die Schwannomatose ist mit einer jährlichen Inzidenz von 1: 30.000 ähnlich häufig wie die NF2 und mit dieser eng verwandt, unterscheidet sich jedoch durch die Abwesenheit von BVS (MacCollin et al. 2005). Sie wurde erst kürzlich als eigene Form der Neurofibromatose identifiziert, eine Tatsache, die auf eine starke Verwandtschaft zur NF2 hindeutet (Diagnostik siehe Tab. 3). Neuesten Forschungen zufolge treten bei der familiären Schwannomatose keine Keimbahnmutationen, sondern vielmehr somatische NF2 Mutationen auf (MacCollin et al. 2005). Viele der peripheren und spinalen Schwannome, die sich unter dieser Krankheit bilden, weisen Verstümmelungsmutationen (truncating mutations) des NF2-Gens bis hin zum kompletten Verlust des zweiten NF2-Gen Allels auf.

Schwannomatosepatienten entwickeln multiple Schwannome in verschiedenen Lokalisationen. Der größte Unterschied zwischen den beiden Erkrankungen ist die bei der Schwannomatose im Gegensatz zur NF2 nicht merklich reduzierte Lebenserwartung.

### 2.4. Sporadische Schwannome

Sporadische Schwannome entstehen in allen Altersgruppen mit einem

#### Kriterien zur Diagnose von Schwannomatose

- (a) 2 oder mehr nicht intrakutane Schwannome, mind. eine histologische Sicherung
- (b) Kein Hinweis auf Akustikusschwannom in der hochauflösenden MRT
- (c) Keine bekannte NF2-Mutation
- (d) ODER ein pathologisch bestätigtes Schwannom (anders als Akustikusschwannom) & Verwandte 1. Grades mit bestätigter Schwannomatose (a-c)**

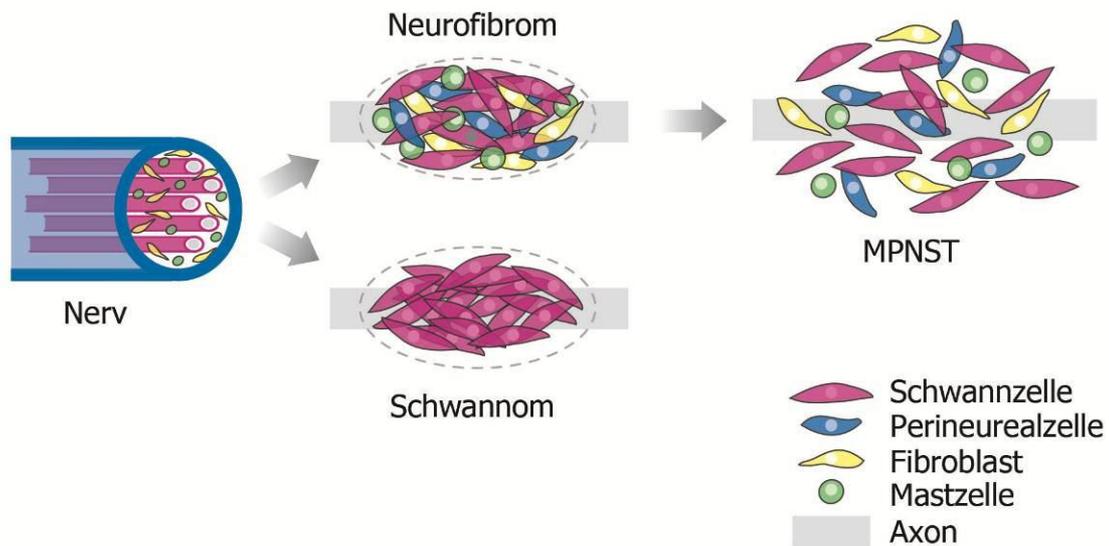
**Tabelle 3: Kriterien zur Diagnose von Schwannomatose** für Individuen älter als 30 Jahre, angepasst nach MacCollin et al. 2005.

Predilektionszeitraum zwischen der 3. und 6. Dekade. Typische Körperregionen sind Kopf, Hals und die Flexorseiten der Extremitäten. Hierbei sind öfter die sensorischen als die motorischen Nervenwurzeln oder der Sympathikus befallen (MacCollin et al. 2005).

## **2.5. Histopathologie peripherer Nervenscheidentumoren**

Schwannome bestehen zum grössten Teil aus Schwannzellen und entwickeln sich vielfach am unmittelbaren Übergang von ZNS zu PNS. Ätiologisch werden Schwannzell-Vorläufer (Schwann cell precursors) für die Entstehung von Schwannomen, bzw. ein spezielles nur im Grenzbereich zwischen PNS und ZNS auftretendes NF2-haploides Milieu, diskutiert (Govannini et al. 2000, Woods et al. 2003). Ausgangszellen sind myelinisierende Schwannzellen. Das histologische Bild der Schwannome weist zwei Wachstumsmuster auf, die mit Antoni A und B bezeichnet werden. In den Antoni A differenzierten Arealen wächst der Tumor zellreich und fibrillär, mit in Zügen angeordneten Zellen und pallisadenähnlicher Ausrichtung der Zellkerne. Das Antoni B Wachstumsmuster hingegen ist netzig aufgelockert und erinnert mit einer unsystematischen Ausrichtung der Zellen teilweise an das Muster von Neurofibromen (Bhattacharyya et al. 2004). Die Schwannome sind benigne Neoplasien, können jedoch benachbarte neuronale Strukturen komprimieren und dadurch erhebliche Schmerzsymptome bis hin zur Dysfunktion verursachen (McClatchey 2007).

Die Tumore der NF1 entwickeln sich aus nichtmyelinisierenden Schwannzellen und unterscheiden sich von denen der NF2 oder Schwannomatose im Hinblick auf Wachstumsmuster, zellulärer Zusammensetzung sowie malignem Potential (Zhu et al. 2002). Sie imponieren häufig als Schwellungen am Kopf, können aber überall am Körper auftreten. Die als Neurofibrome bezeichneten Neoplasien zeigen einen komplexen Aufbau aus spindelförmigen Schwannzellen, mit dünnen, welligen Nuklei, Kollagenfasern, Fibroblasten, Mastzellen und Gefäßen (Jokinen et al. 2009).



**Abbildung 1: Schemata der zellulären Zusammensetzung der Tumorentitäten** (angepasst nach McClatchey 2007).

Neurofibrome lassen sich in verschiedene Untergruppen untergliedern. Konnatale bzw. früh entstehende Tumore sind meist vom plexiformen Typus. Die anderen Neurofibromtypen, wie das kutane Neurofibrom, treten in den seltensten Fällen vor Erreichen des 10. Lebensjahres auf (Lynch 2002). Die plexiform nodulären Neurofibrome können tief im Körperinneren nahe den Nervenwurzeln wachsen und breiten sich netzartig entlang der Nervenbahnen aus. Oft beinhalten sie mehr als einen Fasciculus und erstrecken sich über weite Segmente (McClatchey 2007). 8-12% der plexiform nodulären Neurofibrome weisen einen malignen Progress hin zum malignen peripheren Nervenscheidentumor auf (siehe Abb.1). Oberflächlich lokalisierte, plexiform diffuse, Neurofibrome wachsen diffus und schlecht abgrenzbar. Oftmals ist mehr als ein Nervenfaszikel betroffen. Die Tumore sind schlecht resezierbar. Die häufigste Manifestation der NF1 sind die dermalen oder kutanen Neurofibrome. Diese entstammen, wie die plexiformen Neurofibrome, den sensiblen Nervenfasern, wachsen intrakutan und verursachen in den seltensten Fällen neurologische Störungen. Sie zeigen keine Invasivität oder maligne Entartung und werden meist nur aus kosmetischen Gründen exstirpiert. Des Weiteren unterscheidet man noch atypische Neurofibrome. Atypische Neurofibrome können als jeglicher Neurofibromtyp auftreten. Maßgebend für

die Namensgebung ist ein erhöhter Proliferationsindex, die vermehrt vorkommenden zeldichten Areale sowie die gesteigerte Anzahl von Kernatypien.

Als tumorbildende Zellen wurden bei den Neurofibromen die Schwannzellen herausgearbeitet (Cichowski et al. 1999, Kluwe et al. 1999, Zhu et al. 2002). Verschiedene Studien legen nahe, dass eine NF1-haploinsuffiziente Umgebung für die Tumorgenese Voraussetzung ist (Bajenaru et al. 2003, Zhu et al. 2002). Nach einer Studie sind die NF1-haploiden Mastzellen nicht unwesentlich an der Tumorgenese beteiligt (Yang et al. 2008).

Eine Gefahr für das Leben der NF1-Patienten geht von malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) aus. Die MPNSTs können de novo oder aus einem bestehenden plexiform, nodulären Neurofibrom entstehen. MPNSTs zeigen, abgesehen vom Nf1-Gen, meist zusätzliche Mutationen u.a. in dem p53-Gen oder dem p16-Gen (Greenblatt et al. 1994, Nielsen et al. 1999). Sie wachsen invasiv und destruierend und metastasieren früh.

Patienten mit NF1 haben ein Lebensrisiko von ca. 8-12% einen MPNST zu entwickeln (Evans et al. 2002). Auch das Wiederauftreten (Rezidiv) und die metastasierende Streuung sind bei NF1 Patienten signifikant erhöht (Hagel et al. 2007). Eine Studie neueren Datums stuft die 5-Jahres-ereignisfreie Rate und die absolute Überlebensrate auf 19% und 28% ein (Ferrari et al. 2007).

Angesichts der hohen Mortalität bei MPNSTs kommt der Identifizierung von Markern für eine Tumorprogression bei Neurofibromen eine große Bedeutung zu. Schlüsselpositionen könnten in diesem Zusammenhang die interzelluläre Interaktion (über Adhäsionsmoleküle), die zelluläre Komposition der Tumore und die Vaskularisierung einnehmen. Hier setzt diese Studie an. In einem breiten Tumorspektrum werden Mastzellendichte, Vaskularisierung und die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle untersucht.

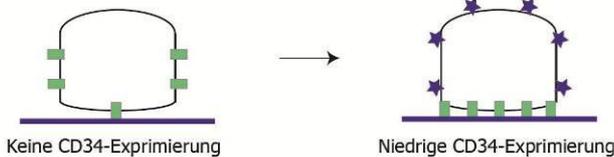
## 2.6. Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle haben eine wichtige Funktion in der Zell-Zell Interaktion, Migration, Adhäsion, der Modifikation der Zellgestalt und auch in der Zellteilung.

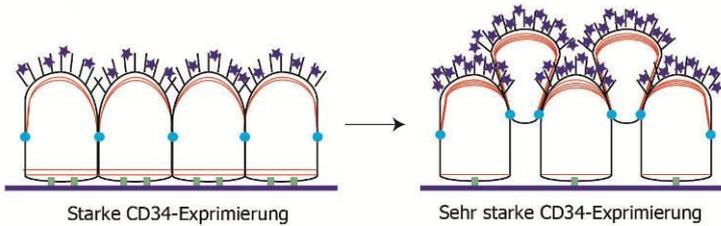
### 2.6.1. CD34

CD34 ist ein Single-Pass-Transmembran Sialomucin Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 116-kDa. Bisher bekannte Funktionen beinhalten

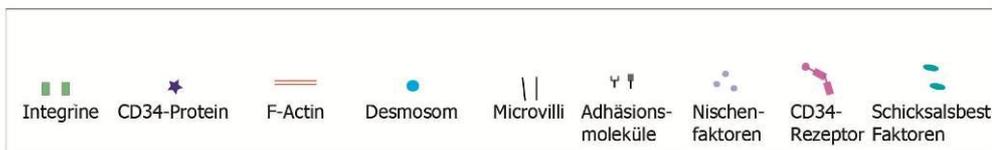
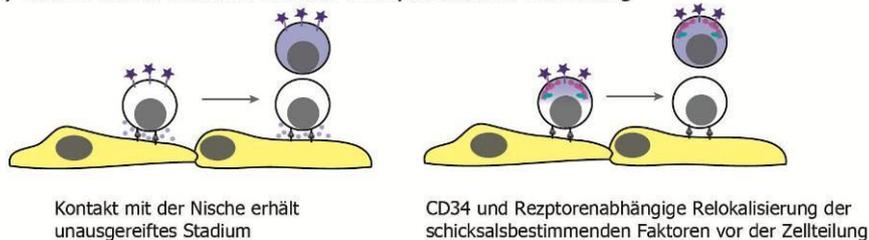
#### A) CD34-Familie Protein induzierte Adhäsionssteigerung



#### B) CD34-Familie Protein induzierte Microvilliformation und Adhäsionsverringderung



#### C) CD34-Familie Protein Funktion in asymmetrischer Zellteilung



### Abbildung 2: Mögliche Funktionsmodelle der CD34-Familie zugehörigen Proteine

A) niedrige Expression generiert eine apikale Domäne und verdrängt die Integrine zur basalen Oberfläche und wirkt adhäsionssteigernd. B) Starke Expression steigert die Microvilliformation. Die resultierende verstärkte Relokalisierung von Aktin zur apikalen Membran könnte zur Unterbrechung der aktinabhängigen Adhäsion führen. C) 2 mögliche Mechanismen der asymmetrischen Zellteilung. Die Beschränkung von CD34s auf die apikale Oberfläche ermöglicht die Interaktion von Adhäsionsmolekülen mit der Stammzell-Nische. Nach der Zellteilung würde nur die Zelle, die weiterhin mit der Nische in Kontakt bliebe, die Pluripotenz erhalten. Alternativ könnte CD34 und ein zugehöriger Rezeptor der Zelle durch Spaltung von Differenzierungsfaktoren den Befehl zur asymmetrischen Zellteilung geben (Angepasst nach Nielsen et al. 2008).

Adhäsionskontrolle, Zelldifferenzierung und proliferationsfördernde Effekte. Abbildung 2 zeigt mehrere mögliche Funktionsmodelle der der CD34-Familie zugehörigen Proteine.

CD34 wird in vielen verschiedenen Körperzellen, unter anderem hämatopoietischen oder anderen gewebsspezifischen Stammzellen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten, Endothelzellen der Blutgefäße, Fibrozyten und etwas schwächer in Neuronen exprimiert (Andrews et al. 1989, Berenson et al. 1988, Ema et al. 1990, Fina et al. 1990, Young et al. 1995). Eine große Anzahl von Tumoren zeigt dieses Oberflächenprotein in starker Expression. Einige Beispiele sind das Ewing Sarkom, der myofibroblastische Tumor des Magens, das Prostatakarzinom, das Mammakarzinom, embryonale Karzinome, Karzinome des Pankreas und Leukämien.

#### 2.6.2. Podoplanin

Podoplanin (auch bekannt als Aggrus, M2A, gp36, T1 $\alpha$ -2) ist ein transmembranöses Glycoprotein vom Mucintyp, das erstmals in den Fußfortsätzen der glomerulären Epithelzellen (Podozyten) beschrieben wurde (Breiteneder-Geleff et al. 1997). Es hat ein Molekulargewicht 38-kDa und wird, neben den Podozyten, in verschiedentlichen Zelltypen exprimiert, so auch in den Zellen des peritonealen Mesothels, den Stroma Retikulozyten und den dendritischen Zellen des Lymphgewebes (Kalof et al. 2009). Eine Besonderheit ist seine Expression in Endothelzellen der Lymphgefäße, die einen spezifischen Nachweis eben jener erlaubt, ohne die Endothelzellen der Blutgefäße zu markieren (Kalof et al. 2009). Unter den Tumoren, die Podoplanin exprimieren, sind unter anderem Hämangioblastome, Keimbahntumore, seröse Karzinome der Ovarien sowie Plattenepithelkarzinome zu nennen (Sonne et al. 2006).

In der Diagnostik wird der Podoplaninnachweis zur Differenzierung von malignem epitheloiden Mesotheliom und Adenokarzinom herangezogen (Chu et al. 2005).

Über die genaue Funktionsweise des Podoplanins gibt es bislang nur wenige Daten. In Mäusen ist das Protein für die Genese der Alveoli sowie für das lymphatische System essentiell (Martin-Villar et al. 2009).

Podoplanin induziert in einigen Zellen eine Relokalisierung von Ezrin und beschleunigt hierdurch die Bildung filopodienähnlicher Strukturen bzw. die Migration (Martin-Villar et al. 2005). In Tumoren lässt sich Podoplanin vielfach im Bereich der Invasionsgrenze nachweisen (Wicki et al. 2006). 2008 wurde die Expression von Podoplanin in MPNSTs und Schwannomen erstmals beschrieben (Jokinen et al. 2008). In der genannten Studie wurden sogenannte Tissue Micro Arrays (TMA) eingesetzt, mit denen eine relativ große Stichprobe an Tumoren untersucht werden konnte. In der vorliegenden Studie soll die Expression von Podoplanin und CD34 systematisch in den verschiedenen Neurofibromtypen und in Schwannomen dargestellt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Reagenzien und Antikörper

Tabelle 4 gibt eine Übersicht der verwendeten Reagenzien.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht der Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.

<b>Tabelle 4: Verwendete Reagenzien</b>		
<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
1 N HCl	Merck	1.09057
1 N NaOH	Merck	1.09137
Antibody Diluent Reagent Solution	Zymed	00.3218
Aqua Destillata	UKE Apotheke	
DAB (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma	K3765
EDTA Puffer	Serva	#11280
Ethanol 50,70,80%	eigene Verdünnung von 100% Ethanol mit Aqua dest.	
Ethanol 96%, 100%	Apotheke UKE	
Eukitt	Sigma	03989
Histofine Multifine Peroxidase Antimouse Antirabbit	Medac	414154F
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Perhydrol)	Merck	1.07209
Mayer's Hämalun	Merck	1.09249

<b>Tabelle 4: Verwendete Reagenzien</b>		
<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Perjodsäure	Th. Geyer	RO/00032571
Schiff Reagenz	Th. Geyer	ME/00109033
TBS-Pufferfertigmischung	DAKO	S1968
Triton X100	Serva	37238
Xylol	SDS	0750021
Ziegenserum	DAKO	X0907

Tabelle 4: Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge

<b>Tabelle 5: Antikörper</b>			
<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Verdünnung</b>
Mouse Lymphatic Endothelial Marker D2-40	ZYMED	18-2410	1: 20
CD34	DAKO	M7165	1: 50
Ki-67	Ventana	790-4286	1: 1000
EMA	Ventana	790-4463	1: 200
Histofine Max-PO Anti-Mouse, Anti- Rabbit	Nichirei Bioscience	414151F	ready-to-use

Tabelle 5: Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

### 3.2. Laborgeräte

<b>Tabelle 6: Laborgeräte</b>	
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Heizbad	GFL
Küvetten	Roth
Microtom	Jung HN40
Microwellengerät	LG intellowave
Pipetten 20µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf
Shandon Coverplate Immunostaining Chambers	Thermo scientific
Vollautomatischer Färbeautomat	Ventana Systems

Tabelle 6: Laborgeräte mit zugehörigen Herstellern

### 3.3. Verbrauchsmaterialien

<b>Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien</b>	
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	Marienfeld
Eppendorf Tubes	Eppendorf
Klingen	Feather R 35
Objektträger Histobond	Marienfeld
Objektträger Superfrost	Bernhardt Schulz und Sohn

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien mit zugehörigen Herstellern

### 3.4. Lösungen

#### 3.4.1. Tris buffered saline (TBS) 50 mM pH 7,6

42,5 g NaCl mit 30,5 g Tris in 4700 ml Aqua dest. gelöst, mit 1 M HCl auf pH 7,6 eingestellt. Ergänzung mit Aqua dest. auf 5 l.

#### 3.4.2. TBS / Triton

TBS (s.o.) + 5 ml Triton-100-X.

#### 3.4.3. DAB-Stammlösung

200 mg DAB in 40 ml TBS/Triton, nach doppelter Filtration, 1 ml / Eppendorf Tube, Aufbewahrung in Aliquots á 1ml bei -20°C.

#### 3.4.4. DAB-Reaktionslösung

1 ml TRIS / Triton + 100 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, davon 300 µl auf 9 ml TRIS / Triton + 1 ml DAB-Stammlösung, ergibt 10,3 ml Reaktionslösung.

#### 3.4.5. Hemmung der endogenen Peroxidase

180 ml 100% Ethanol + 20 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.4.6. Antikörper Blockierungslösung

1 ml Ziegenserum + 9 ml TRIS / Triton + 10 ml Antibody Diluent Reagent Solution.

### 3.5. Patientenkollektiv

Alle Patienten, die in dieser Studie eingeschlossen waren, werden von Herrn Prof.Dr. V.F. Mautner in der Neurofibromatose-Ambulanz des UKE betreut und erfüllen die NIH Kriterien für NF1 bzw. die Manchester Kriterien für NF2. Die Diagnose einer Schwannomatose wurde aufgrund des klinischen Bildes erhoben (mind. 2 Schwannome, Ausschluß von NF2) sowie durch DNA-Sequenzierung des NF2-Gens (keine Keimbahnmutation) gesichert. Vor Beginn der Untersuchung wurden alle Daten anonymisiert. Das Alter der Patienten betrug im Mittel 34,02 + / - 18,39 Jahre zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme. 71 Proben stammen von weiblichen, 61 Proben von männlichen Patienten.

### 3.6. Gewebeproben

Für die Untersuchung wurden 132 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus dem Archiv des Institutes für Neuropathologie, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, herangezogen. Die Gewebeproben der NF-Patienten wurden in der Klinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gewonnen, die der sporadischen Tumore wurden in der Neurochirurgischen Klinik des UKE exzidiert.

In Tabelle 8 sind die Proben aufgelistet.

<b>Tabelle 8: Fallzahlen und Tumorentitäten vs. Erkrankung</b>				
<b>Tumorentität</b>	<b>NF1 zugehörig</b>	<b>NF2 zugehörig</b>	<b>Schwannomatose zugehörig</b>	<b>Andere</b>
Kutane Neurofibrome	20			
Plexiform diffuse Neurofibrome	17			
Plexiform noduläre Neurofibrome	24			
Atypische Neurofibrome	18			
Schwannom in Neurofibrome		2		
Sporadisches Akustikusschwannom				20
Schwannom		3	11	
MPNST	8			
Normale Haut (Kontrolle)				5
Normaler Nerv (Kontrolle)				4
<b>Insgesamt</b>	<b>87</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>29</b>

Tabelle 8: Fallzahlen und Tumorentitäten vs. Erkrankung

Die Gewebeproben wurden routinemäßig in Paraffin eingebettet und Schnitte hergestellt, die nach HE, PAS, und Elastica von Gieson gefärbt wurden. Eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis von S-100-Protein wurde bei sämtlichen Tumorproben durchgeführt. In Schwannomen wurden des Weiteren mittels Neurofilamentfärbung enthaltene Nervenfasern dargestellt. Ferner wurden die maximalen Proliferationsindices von allen Schwannomen und MPNSTs mittels Ki-67 Antigenmarkierung evaluiert. Das Material wurde dann gemäß den WHO Kriterien von zwei Neuropathologen begutachtet.

### **3.7. Histochemie**

#### **3.7.1. Schnittherstellung**

Die bereits formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden gekühlt, dann wurden mit dem Microtom 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Anschließend wurden diese in einem Warmwasserbad gestreckt und auf Glas-Objektträger aufgezogen. Standardmäßig wurden hierzu Silanbeschichtete Histobond Objektträger eingesetzt. Nur wenn die Schnitte für den Färbeautomaten bestimmt waren kamen Superfrost Objektträger zum Einsatz.

#### **3.7.2. PAS Färbung**

- Deparaffinierung: 30 Minuten in der Wärmekammer bei 60°C, anschließend 30 Minuten in Xylol.
- Rehydratation: Absteigende Ethanolreihe 2 x 100%, 2 x 96%, 80%, 70%, 50%, Aqua dest., jeweils 2 Minuten;
- 5 Minuten Perjodsäure;
- 5 Minuten Spülen mit Aqua dest.;
- 4 Minuten Schiff Reagenz;
- 5 Minuten Spülen unter fließendem Leitungswasser;
- 30 Sekunden Gegenfärben mit Mayers Hämalaun;
- 5 Minuten Spülen unter fließendem Leitungswasser;

- Dehydration je 2 min 50-70-96-100-100% Ethanol, Xylol und Eindecken mit Eukitt .

### **3.8. Immunhistochemie**

#### **3.8.1. CD34**

- Deparaffinisierung wie bei normaler Histochemie (s. 3.7.2.);
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% Ethanol 10 Minuten;
- Rehydration wie bei normaler Histochemie (s. 3.7.2.);
- 5 min puffern mit TRIS Puffer;
- Antikörper verdünnen in Blockierungslösung CD34: Blockierungslösung=1:50;
- Schnitte in Shandon Coverplate Immunostaining Chambers einspannen;
- Spülen mit TRIS Puffer zur Dichtigkeitsprüfung;
- 100 µl pro Schnitt/Kammer der verdünnten Antikörperlösung;
- Inkubation über Nacht bei 4°C;
- Spülung mit TRIS Puffer;
- 3 Tropfen ≈ 150 µl/Kammer MAX-PO Antimouse Antirabbit ready-to-use Sekundärantikörper;
- Inkubation 1,5 h bei 4°C;
- Spülen mit TRIS Puffer;
- Inkubation mit 100 µl DAB-Reaktionslösung 15 Min. bei Raumtemperatur;
- 10 Minuten fließend wässern;
- Kernfärbung mit Mayers Hämalaun für 30 sek;
- 5 Minuten fließend wässern;
- Aufsteigende Alkoholreihe 50-70-96-96-100-100% Ethanol, Xylol, jeweils 2 Minuten, Eindecken mit Eukitt;

#### **3.8.2. D2-40 Mouse Lymphatic Endothelial Marker**

- Deparaffinisierung wie bei normaler Histochemie (s. 3.7.2.);
- Blockierung der Endogenen Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% Ethanol für 10 Minuten;

- Rehydratation wie bei normaler Histochemie (s. 3.7.2.);
- In Plastischüssel bedecken mit EDTA Puffer;
- Antigendemaskierung in der Microwelle (640 Watt für 20 min);
- 10-20 min abkühlen lassen;
- 5 min puffern mit TRIS Puffer;
- Antikörper verdünnen in Blockierungslösung D2-40: Blockierungslösung=1:20;
- Schnitte in Shandon Coverplate Immunostaining Chambers einspannen;
- Spülen mit TRIS Puffer, um Sitz zu prüfen;
- 100 µl pro Schnitt/Kammer der verdünnten Antikörperlösung;
- Inkubation über Nacht bei 4°C;
- Spülung mit TRIS Puffer;
- 3 Tropfen  $\approx$  150 µl/Kammer MAX-PO Antimouse Antirabbit ready-to-use Sekundärantikörper;
- Inkubation 1,5 h bei 4°C;
- Spülen mit TRIS Puffer;
- Inkubation mit 100 µl DAB-Reaktionslösung 15 min bei Raumtemperatur;
- 10 min fließend wässern;
- Kernfärbung mit Mayers Hämalaun für 30 sek;
- 5 min fließend wässern;
- Aufsteigende Alkoholreihe 50-70-96-96-100-100% Ethanol, Xylol, jeweils 2 Minuten, anschließend Eindecken mit Eukitt;

### 3.8.3. MIB-1 (Ki-67) und EMA (Epitheliales Membranantigen)

Für die Ki-67- (Verdünnung 1: 1000) und EMA- (Verdünnung 1: 200) Immunofärbungen wurde ein Färbeautomat (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) benutzt. Die Schnitte wurden auf Superfrost -Objektträger aufgezogen. Auch hier war DAB das angewandte Chromogen.

### **3.9. Evaluation**

#### **3.9.1. Antikörperfärbung**

Die gefärbten Schnitte wurden semiquantitativ von einem Neuropathologen und dem Autor ausgewertet und entsprechend folgender Graduierung eingeteilt: Keine Anfärbung (0), leichte Anfärbung von 5-10% der Zellen (1), mittelstarke Anfärbung von bis zu 20% der Zellen (2), starke Anfärbung von mehr als 20% der Zellen (3).

#### **3.9.2. Vaskularisierung (Blut und Lymphe)**

Für die Vaskularisierung wurden mit dem Programm Zeiss Axio-Vision 4.6 sechs aneinander angrenzende Bilder bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend in der Software zusammengefügt. Die erhaltene Bildfläche betrug ca. 2,5 mm<sup>2</sup>. Anschließend wurden im Gesamtbild die Lumina der markierten Gefäße manuell angefärbt. Podoplanin erlaubte die Untersuchung der Lymphgefäßdichte, CD34 die der Blutgefäßdichte. Es wurden nur Gefäße mit klar sichtbarem Lumen angefärbt. Die Gefäßdichte pro mm<sup>2</sup> wurde mittels Axio Vision 4.6 und Microsoft Excel ermittelt und ausgewertet.

#### **3.9.3. Mastzellendichte**

Für die Mastzellendichte wurden die einzelnen PAS-Präparate bei 100-facher Vergrößerung evaluiert und die angefärbten Mastzellen an der Stelle des höchsten Vorkommens in 4 Sichtfeldern je 0,03 mm<sup>2</sup> ausgezählt.

#### **3.9.4. Proliferationsindex**

Die Proliferation wurde in der Region der höchsten Dichte Ki-67 positiver Nuclei bestimmt. Die Proliferationsindices wurden als Prozentzahl der Ki-67 gefärbten Zellkerne im Verhältnis zu allen Zellkernen ermittelt. Es wurde ein hochauflösendes Feld ausgemessen (0,12 mm<sup>2</sup>).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Immunhistochemie

#### 4.1.1. CD34-Expression

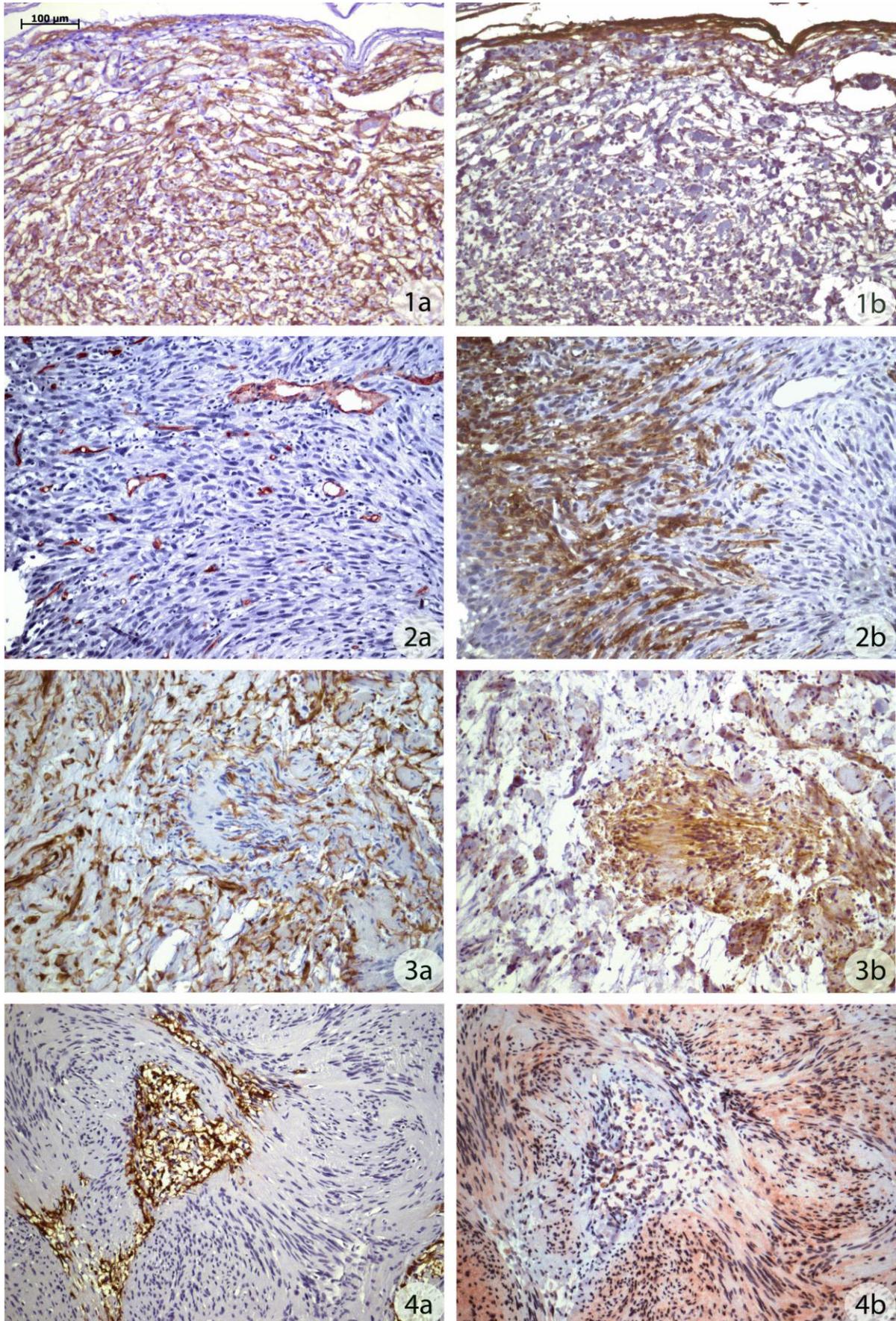
In den untersuchten Kontrollen von Haut und Nerv konnte abgesehen von den Endothelien der Blutgefäße keine CD34 Färbung festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu wiesen alle untersuchten Tumore eine mehr oder minder starke Färbung mit CD34 auf.

In Schwannomen beschränkte sich die CD34 Expression vornehmlich auf die retikulären Areale (Antoni B). Im Gegensatz dazu zeigte sich die Podoplanin Expression ausschließlich in den Antoni A Regionen. Übereinstimmend verhielt es sich mit atypischen Neurofibromen, hier zeigten sich die Regionen CD34-negativ, welche von Ihrer Struktur her den fibrillären, zellichten Regionen der Schwannome stark ähnelten. In den MPNSTs zeigten sich verschiedene Ausprägungsmuster, übereinstimmend war jedoch, dass die Regionen mit hoher Podoplanindichte geringe CD34-Expression zeigten und umgekehrt.

Abbildung 4 zeigt die Mittelwerte der CD34 Expression in den untersuchten Tumorentitäten  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes.

#### 4.1.2. Podoplanin Expression

Die Podoplanin Expression in den Kontrollgeweben beschränkte sich auf das Perineurium der Nervenfaszikel und die Axone. D2-40 markierte in sämtlichen untersuchten sporadischen Akustikusschwannomen sowie in 2 NF2 Schwannomen und allen atypischen Neurofibromen, die fibrillär gewachsenen, zellichten Areale (Antoni A). Drei der NF2 Schwannome zeigten keine Expression von Podoplanin ebenso wie nahezu alle Neurofibrome. Nur ein einziger plexiform-diffus gewachsener Tumor zeigte eine schwache Färbung. Zwei der 20 Akustikusschwannome zeigten zur zytoplasmatischen noch zusätzlich eine intensive nukleäre Färbung.

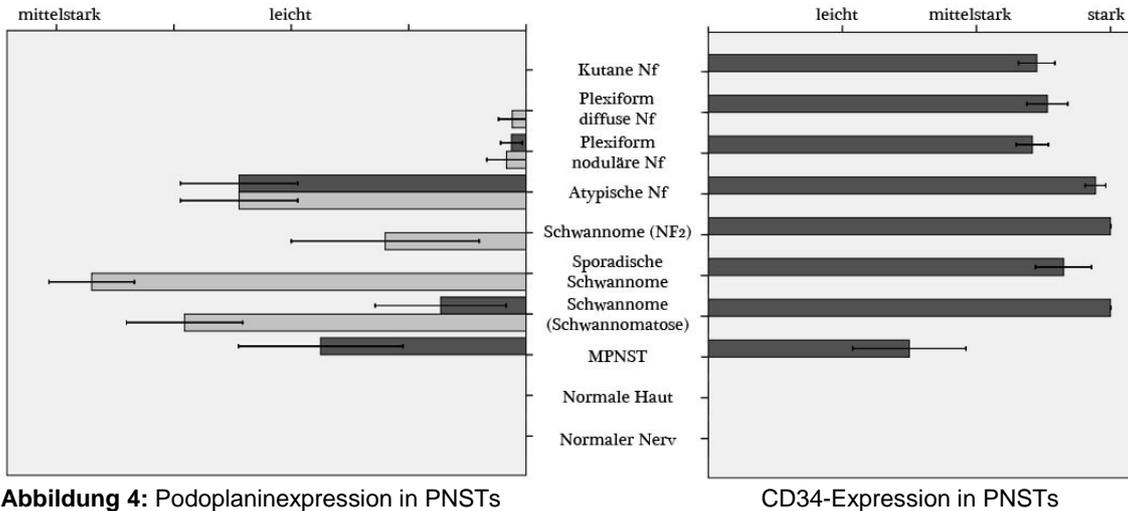


**Abbildung 3:** Komplementäre CD34- und Podoplaninfärbemuster in verschiedenen PNSTs.

(1) Plexiform Noduläres Neurofibrom, (2) MPNST, (3) Atypisches Neurofibrom, (4) Akustikuschwannom  
*Linke Seite (CD34):* (2a) Endothelzellen d. Blutgefäße sind angefärbt. (3a) Alle, außer den fibrillär arrangierte Zellen, sind angefärbt. (4a) Antoni B Regionen sind gefärbt.

*Rechte Seite (Podoplanin):* (1b) Nur Perineurealzellen sind gefärbt. (2b) zunehmende Färbung gegen die Invasionsgrenze. (3b) Fibrilläre Partien sind gefärbt. (4b) Antoni A Regionen sind gefärbt.

In den atypischen Neurofibromen waren die schwannomähnlichen, fibrillär gewachsenen, länglichen Zellen oftmals locker zwischen den zellärmeren Arealen versprengt. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Podoplaninfärbung.

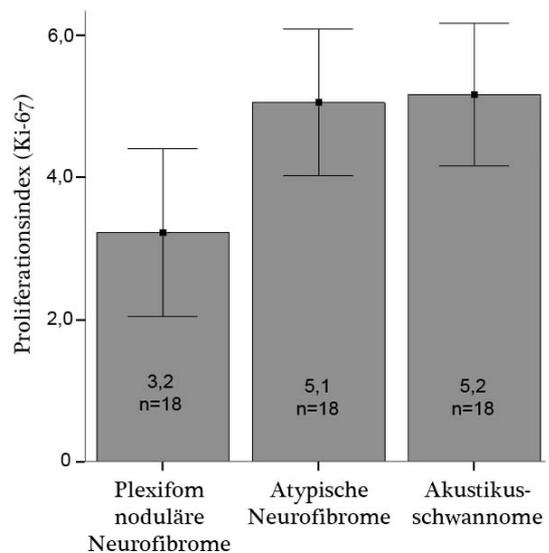


**Abbildung 4:** Podoplaninexpression in PNSTs Antoni A - dichte zellreiche Areale als hellgraue Balken, Antoni B - als dunkle Balken Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes.

#### 4.1.3. Ki-67- und EMA-Färbungen

Ki-67 Proliferationsindices von 18 Akustikus-schwannomen, 18 atypischen Neurofibromen und 18 plexiformen Neurofibromen ergaben ähnliche Werte für Schwannom und atypisches Neurofibrom, während die plexiformen Neurofibrome weniger stark proliferierten. Die Unterschiede waren jedoch aufgrund der starken Schwankungen der proliferativen Aktivität statistisch nicht signifikant.

Abbildung 5 zeigt die Proliferationsindices im Vergleich. EMA-Färbungen wurden nur bei den

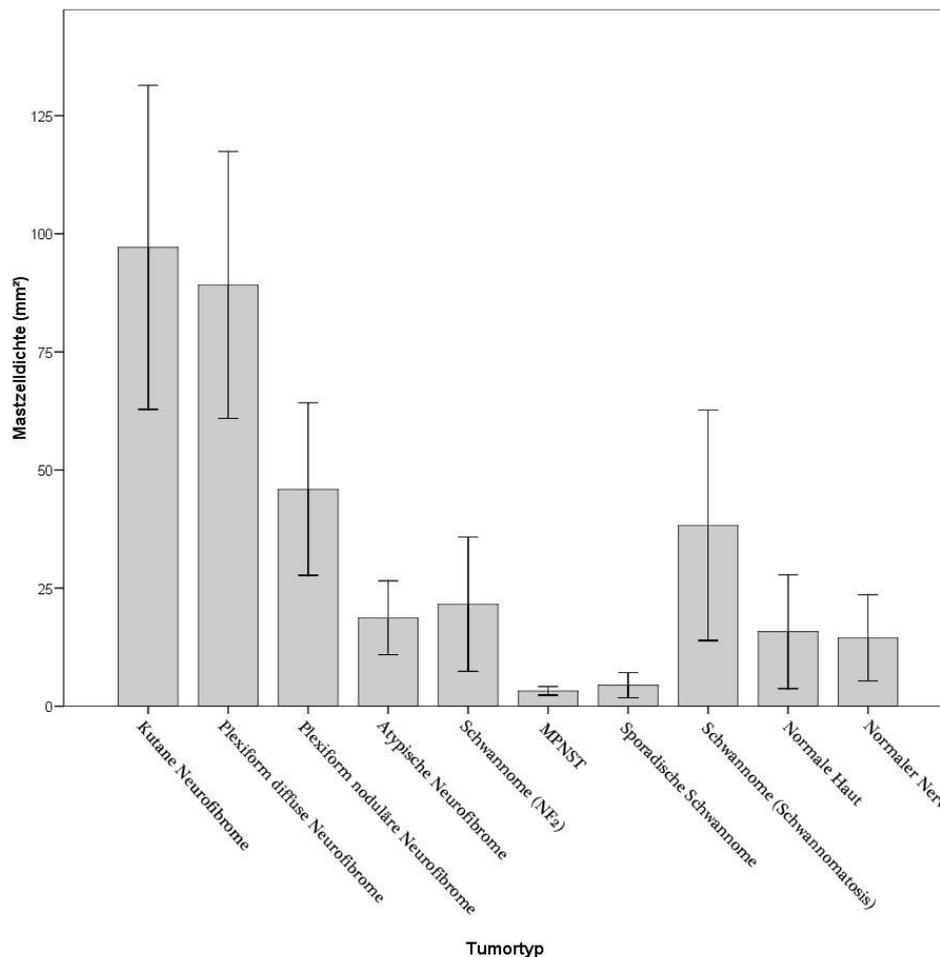


**Abbildung 5:** Proliferationsindices für plexiforme noduläre und atypische Neurofibrome im Vergleich zu Akustikus-schwannomen. Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes.

atypischen Neurofibromen durchgeführt, um auszuschließen, dass nicht Perineuriome, bzw. versprengte Perineurealzellen durch D2-40 angefärbt wurden. Die EMA-Färbung war in allen Fällen negativ.

#### 4.2. Mastzellen

Das Mastzellvorkommen unterschied sich deutlich von Tumor zu Tumor. Es fiel auf, dass bestimmte Tumore (z.B. kutane Neurofibrome) einen weitaus größeren Anteil an Mastzellen enthielten als andere. Abbildung 6 zeigt eine Übersicht über die Mastzellichte in den untersuchten Tumorentitäten.

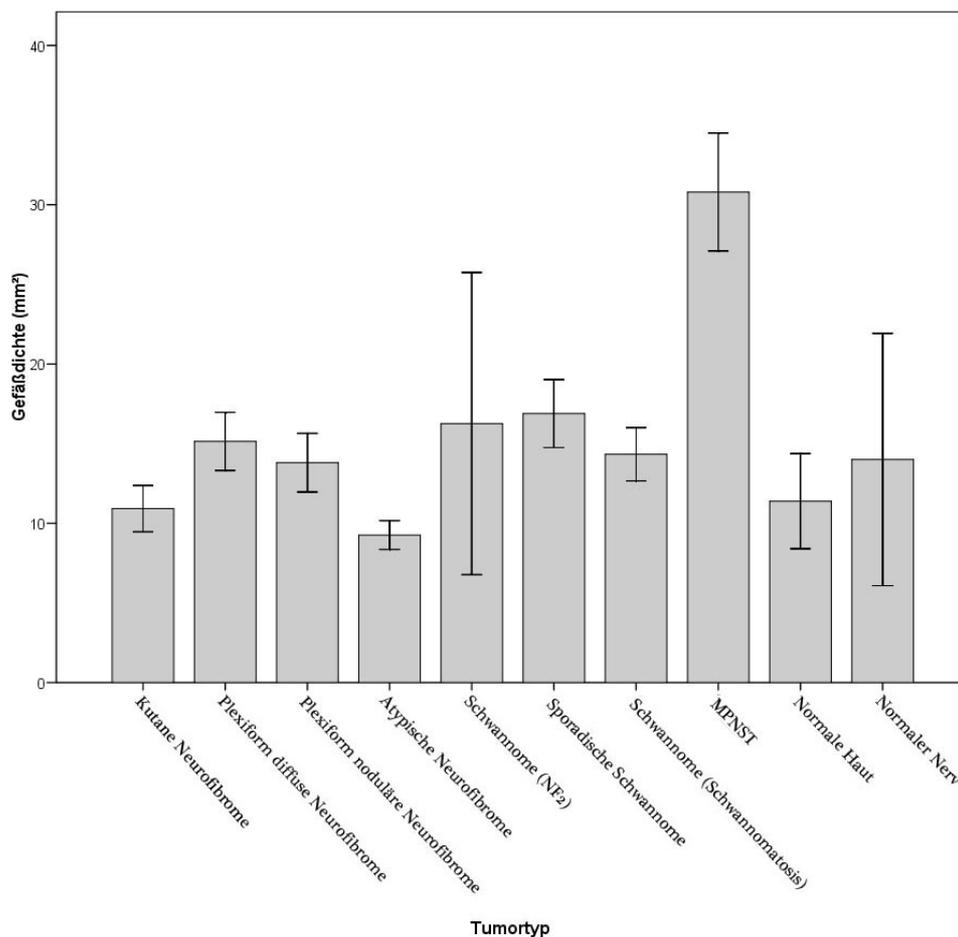


**Abbildung 6:** Übersicht über die Mastzellichte in den untersuchten Tumortypen. Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler.

Kutane und plexiform diffuse Neurofibrome zeigten die höchste Mastzellichte während MPNSTs und sporadische Schwannome die niedrigste Infiltration durch Mastzellen aufwiesen, die noch unter der der Kontrollgruppe lag.

### 4.3. Vaskularisierung durch Blutgefäße

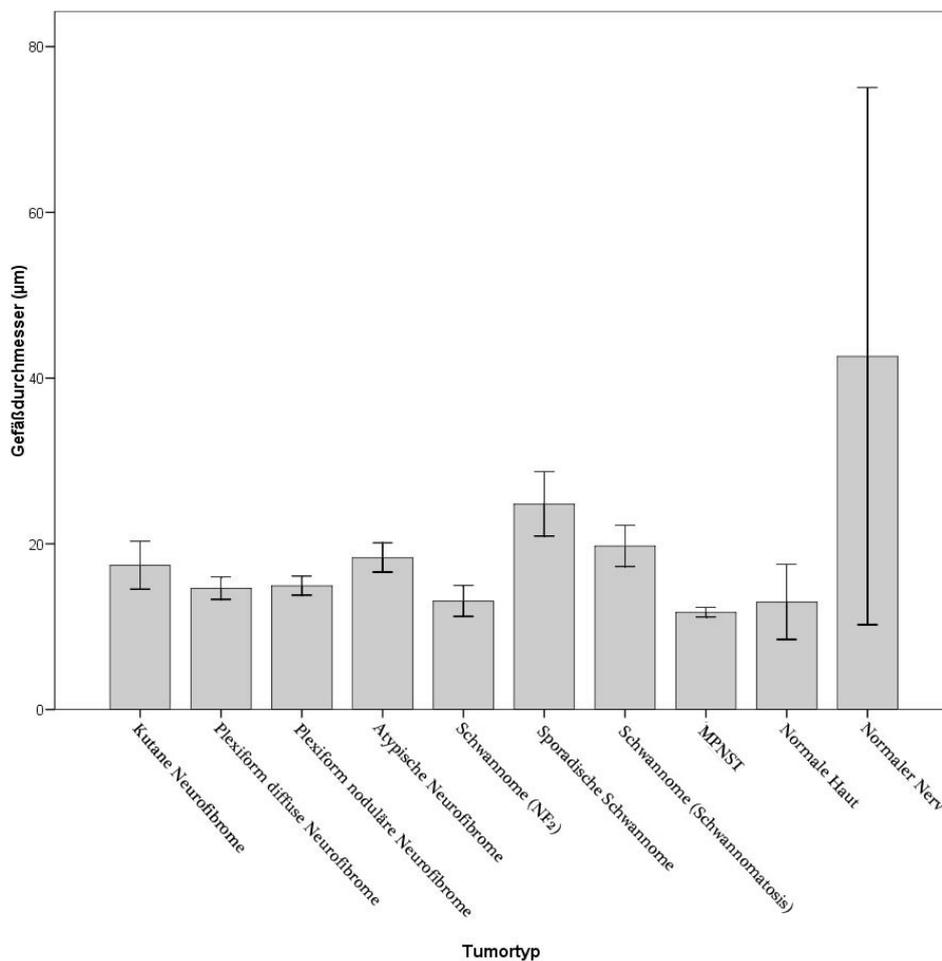
MPNSTs zeigten eine deutliche Neovaskularisierung. Die Anzahl der Gefäße lag bei malignen Tumoren mit  $30,8/\text{mm}^2$  deutlich über den  $13,46/\text{mm}^2$  der benignen Tumoren. Die übrigen Tumoren wiesen, abgesehen von den Schwannomen, eine nahezu identische Vaskularisierung auf, die der in Normalgeweben entsprach. Bei den Schwannomen und plexiformen Neurofibromen wurden dabei auch die perineurialen Gefäße in die Evaluation



**Abbildung 7:** Übersicht über die Anzahl versorgender Blutgefäße pro  $\text{mm}^2$  in den untersuchten Tumortypen. Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler.

mit einbezogen. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht der Vaskularisation mit Blutgefäßen der untersuchten Tumore.

Die Gefäßdurchmesser unterschieden sich bei den meisten Tumortypen nicht signifikant, abgesehen von den Schwannomen, in denen sich oft große,



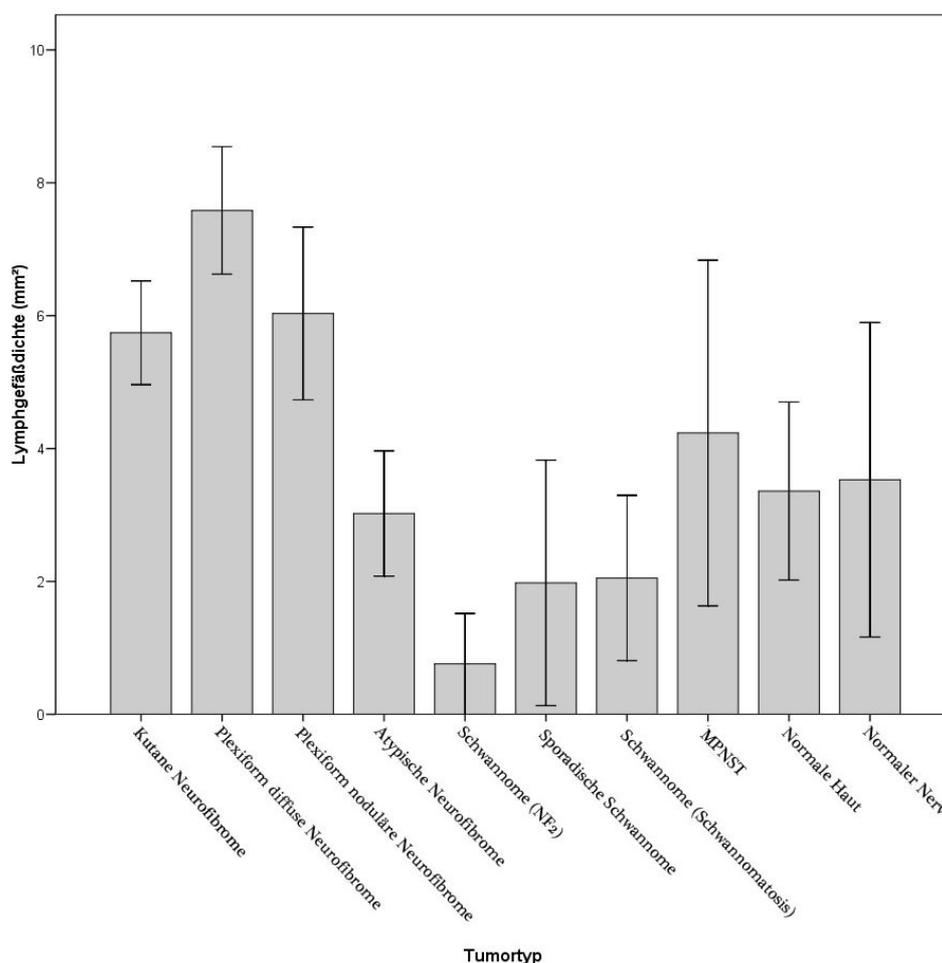
**Abbildung 8:** Übersicht über die Durchmesser versorgender Blutgefäße in µm in den untersuchten Tumortypen. Durchschnitt  $\pm$  Standard Fehler. Die starke Abweichung in normalem Nervengewebe resultiert aus einer mit eingerechneten Ateriole.

regressiv veränderte Gefäße fanden. Abbildung 8 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Durchmesser  $\pm$  Standard Fehler des Mittelwertes.

Die Gefäße der benignen Tumoren (Schwannome oder Neurofibrome) waren in der Regel regelrecht aufgebaut und hatten intakte Wandstrukturen. Gefäße der MPNSTs hingegen imponierten als schlitzförmige Endothelschläuche.

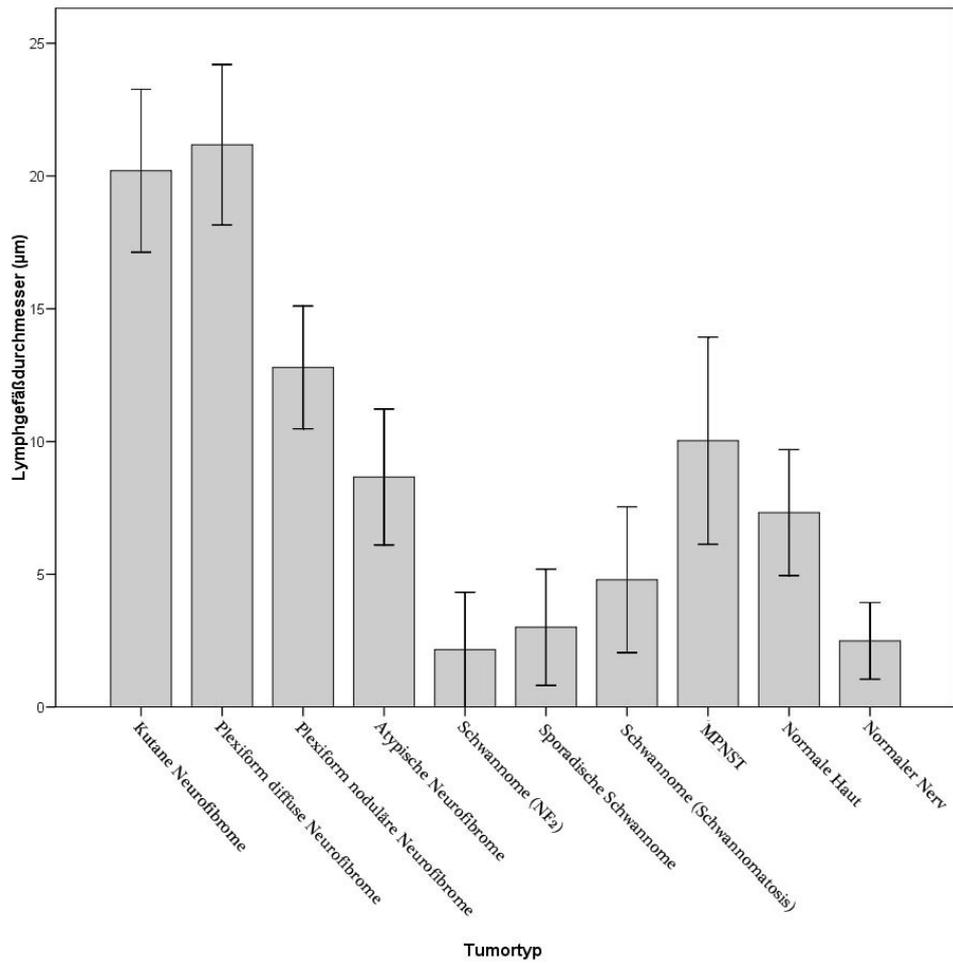
#### 4.4. Vaskularisierung durch Lymphgefäße

Die Vaskularisierung durch Lymphgefäße zeigte sich in den kutanen und plexiform diffusen Neurofibromen deutlich ausgeprägt. Die gemessenen Werte für die plexiform nodulären Neurofibrome und für das Kontrollnervengewebe spiegeln die lymphatische Versorgung des umgebenden Perineuriums wieder. Eine tatsächliche Vaskularisierung innerhalb des Perineuriums fehlte - wie auch bei den Schwannomen - vollständig und entsprach damit den physiologischen Verhältnissen. Abbildung 9 zeigt eine Übersicht der Lymphgefäßdichte der verschiedenen Tumorentitäten im Mittel  $\pm$  Standard Fehler des Mittelwertes.



**Abbildung 9:** Übersicht über die Anzahl der Lymphgefäße pro mm<sup>2</sup> in den untersuchten Tumortypen. Durchschnitt  $\pm$  Standard Fehler.

Abbildung 10 zeigt die durchschnittlichen Durchmesser der Lymphgefäße in den untersuchten Tumoren. Die Angaben bei den plexiform nodulären



**Abbildung 10:** Übersicht über die Durchmesser der Lymphgefäße in  $\mu\text{m}$  in den untersuchten Tumortypen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Neurofibromen und den Schwannomen beziehen sich auf die epineurialen bzw. im Perineurium enthaltenen Lymphgefäße.

## 5. Diskussion

### 5.1. Blutgefäße in peripheren Nervenscheidentumoren

Die Angiogenese ist kein auf die Organogenese begrenzter Prozess. Vielmehr können ischämische Zellen Signale aussenden, die zu erneuter Gefäßeinsproßung führen (Tate et al. 2009). Bei malignen Tumoren reifen diese Gefäße nicht mehr voll aus, und es bilden sich vielfach ineffiziente Kapillarschlingen (Tate et al. 2009).

Eine erhöhte Gefäßdichte kann daher ein Anhaltspunkt für eine mögliche Dedifferenzierung sein. Die Datenlage für die Vaskularisierung in PNSTs ist unzureichend und bedurfte weiterer Untersuchung. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf den intraneural wachsenden plexiform nodulären sowie den atypischen Neurofibromen. Erstere sind bei zusätzlicher Dedifferenzierung für den größten Teil der MPNSTs verantwortlich, letztere wurden von einigen Autoren als Übergangsform zum MPNST angesehen (Valeyrie-Allanore et al. 2008).

Eine neue Arbeit zur Vaskularisierung, in der ein vergleichbares Verfahren zur Bestimmung der Gefäßdichte eingesetzt wurde, kam in Schwannomen (NF2) zu ähnlichen Ergebnissen wie die vorliegende Studie (Plotkin et al. 2009). Im Vergleich zu Plotkin und Kollegen (Werte in Klammern) maßen wir bei den Gefäßen der NF2-Schwannome im Mittel einen Durchmesser von 13,1  $\mu\text{m}$  (14,2  $\mu\text{m}$ ) und eine Gefäßdichte von 16,26/ $\text{mm}^2$  (22/ $\text{mm}^2$ ). In normalen Nerven zeigte sich eine Gefäßdichte von 14/ $\text{mm}^2$  (18/ $\text{mm}^2$ ) und ein Durchmesser von 42,64  $\mu\text{m}$  (7,9  $\mu\text{m}$ ). Die Große Abweichung des Durchmessers im Normalgewebe ergibt sich durch einen Ausreißer aufgrund einer zwischen den Nervenbündeln gelegenen Arteriole. Mit einer Bereinigung der Werte ergeben auch unsere Messungen einen ähnlichen Durchschnitt von 10,29  $\mu\text{m}$ . Eine ältere Studie, die von Eady und Kollegen 1979 durchgeführt wurde, zeigte eine durchschnittliche Gefäßdichte von  $\sim 30/\text{mm}^2$  (Eady et al. 1979). Allerdings ist hierzu zu sagen, dass hier keine spezifische Antikörperfärbung hinzugezogen wurde. Die erhöhten Werte lassen sich z.B. durch versehentlichen Einschluß der lymphatischen Gefäße in die Zählung erklären.

Wir konnten zeigen, dass sich die Vaskularisierung der verschiedenen benignen Tumorentitäten nicht signifikant von denen der Kontrollgewebe (Haut oder Nerv) unterschied. Da das Tumorgewebe jedoch ein neu entstandenes, physiologisch an dieser Stelle nicht angelegtes Gewebe ist, muss es sich um eine regelhaft ablaufende Neovaskularisation handeln.

Im Gegensatz hierzu bestanden die Gefäße der MPNSTs lediglich aus schlitzförmigen Endothelschläuchen. Die Anzahl der Gefäße war beim malignen Tumor signifikant erhöht und lag mit  $30,8/\text{mm}^2$  deutlich über den benignen Tumoren ( $13,46/\text{mm}^2$  inkl. atypische Neurofibrome). Eine Arbeit, die sich mit der Angiomatose in sowohl Neurofibromen als auch MPNSTs beschäftigt, beschreibt mit einer gitternetzartigen Struktur und unregelmäßigen, schwer abgrenzbaren Lumina eine ähnliche Morphologie der Sarkomgefäße. Hier konnte ebenfalls eine deutlich gesteigerte Gefäßdichte im dedifferenzierten Gewebe festgestellt werden (Gesundheit et al. 2010).

## **5.2. Lymphgefäße in peripheren Nervenscheidentumoren**

Eine starke lymphatische Vaskularisierung scheint in Tumoren sowohl positive als auch negative Effekte haben zu können. Eine Studie aus dem Jahr 2001 zeigte, dass das Metastasierungsrisiko für lymphatisch gut versorgte Neoplasien deutlich höher ist (Swartz et al. 2001). Neuere klinische Studien zeigen allerdings auch, dass eine gesteigerte Lymphangiogenese nicht immer mit einem gesteigerten Metastasierungsrisiko und vor allem nicht immer mit erhöhter Sterblichkeit assoziiert ist. Dies könnte daran liegen, dass Lymphknotenmetastasen selbst eine Immunantwort auf den Tumor triggern (Sleeman et al. 2009). Ein zweiter Aspekt betrifft die Ödembildung z.B. im Rahmen einer Tumorextirpation. Da der Abtransport von interstitieller Flüssigkeit aus dem Gewebe über die Lymphe erfolgt, ist es vorstellbar, dass gut versorgte Areale z.B. nach einem operativen Eingriff schnell wieder anschwellen. Damit würde die Druckbelastung des umgebenden Gewebes abnehmen, eine zusätzliche Gewebsschädigung träte in geringerem Ausmaß auf. Wir fanden bei den intraneuralen Tumoren (plexiforme noduläre Neurofibrome, Schwannome) Lymphgefäße entsprechend den physiologischen

Verhältnissen exklusiv im Perineurium. Auch war die Lymphgefäßdichte in kutanen und diffus plexiformen Neurofibromen höher. In einer Dissertation, die sich mit der intraoperativen Schwellung von Neurofibromen befasste, konnte gezeigt werden, dass insbesondere plexiforme noduläre Neurofibrome bei Operationen eine langanhaltende Schwellung zeigen können und diese zusätzliche einen höheren Gehalt der wasserbindenden extrazellulären Hyaluronsäure aufweisen. Beide Faktoren könnten additiv wirkend für eine langanhaltende postoperative Schwellung verantwortlich sein (Behrens 2008).

### **5.3. Mastzellen in peripheren Nervenscheidentumoren**

Mastzellen zählen zu den vielseitigsten Zellen des Körpers. Entdeckt wurden sie durch Paul Ehrlich im Zuge seiner Dissertation (Ehrlich 1878). Sie kommen in nahezu jedem Gewebe des menschlichen Körpers vor, verstärkt an Schnittpunkten mit der Umwelt z.B. der Haut oder im Epithel der oberen und unteren Atemwege oder in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes (Prussin et al. 2003). Quervernetzte IgE-Antikörper, die an dem IgE-Rezeptor der Mastzelle (FcεRI) binden, stimulieren deren Degranulation. Dadurch werden unterschiedliche chemotaktische Stoffe in den extrazellulären Raum freigesetzt, u.a. Histamin, Serotonin, Heparin, Prostglandin D<sub>2</sub> und Leukotrien C<sub>4</sub> (Prussin et al. 2003). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass zur Entstehung von Neurofibromen neben Nf1 negativen Schwanzzellen (loss of heterozygosity, LOH) zusätzlich eine geeignete Microumgebung vorhanden sein muss. Als der für die Neurofibromgenese wichtigste Bestandteil dieser Microumgebung wurden Nf1 heterozygote Mastzellen identifiziert (Yang et al. 2008). Diese Zusammenhänge legen nahe, das Mastzellvorkommen in PNSTs in vivo zu untersuchen.

Die wenigen bisher erhobenen Daten geben äußerst unterschiedliche Ergebnisse zur Mastzellendichte in normaler Haut an. Während Eady und Kollegen 1979 ca. 50/mm<sup>2</sup> gefunden haben, gibt eine Studie aus dem Jahre 2005 Dichtewerte von 77-108/mm<sup>2</sup> an (Eady et al. 1979, Janssens et al. 2005). Die Unterschiede in der neuen Studie könnten mit den unterschiedlichen Zählmethoden zusammenhängen. So wurden in der neueren Studie

mastzellspezifische Antikörper (mouse ATA clone AA1, Dako, Glostrup, Denmark) verwandt und die Auszählung am Computer standardisiert. Diese Studie zeigt auch eine gesteigerte proximale Mastzellichte im Vergleich zu distalen Hautarealen (Janssens et al. 2005).

Mit unserer Messmethode konnten wir deutlich weniger Mastzellen in den verschiedenen Geweben feststellen. Sollte es sich hierbei um einen Messfehler handeln, ist dieser jedoch systematischer Natur und erlaubt daher eine Interpretation des Trends.

Unsere Auswertung zeigte vor allem in den kutanen und diffus plexiform wachsenden Neurofibromen eine signifikant gesteigerte Mastzellichte im Vergleich zum Kontrollgewebe normaler Haut ( $p=0,035$  und  $p=0,027$ ). Andere benigne Tumoren zeigten sich hingegen ähnlich dem Kontrollnervengewebe oder zeigten Abweichungen, die nicht signifikant waren (siehe Abbildung 6).

Andere Arbeiten, die sich mit der Funktion der Mastzellen beschäftigten, kommen für verschiedene Tumorgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Augenscheinlich können Mastzellen von einigen Tumoren mittels intrinsischer Faktoren angelockt werden (Poole et al. 1983). Zusätzliche Stimuli könnten auch Gewebereaktionen auf Tumorwachstum und lokale Entzündung darstellen (Maltby et al. 2009). Nach derzeitigem Erkenntnisstand können Mastzellen sowohl tumorfördernd als auch tumorstatisch wirken. Studien hierzu geben für verschiedene Tumoren andere prognostische Wertigkeiten für eine abnorme Mastzellichte an. Patienten mit kolorektalem Karzinom und geringer Mastzellzahl hatten in einer älteren Studie eine bessere Überlebensrate (Fisher et al. 1989). Verglichen hierzu hatten Patienten mit Mammakarzinom bei gesteigerten Mastzellzahlen eine verbesserte Prognose (Dabiri et al. 2004). Maltby und Kollegen kommen in Ihrem Review (2009) zu dem Schluss, dass Mastzellen das Tumorwachstum durch Geweberemodelling oder Angiogeneseinduktion unterstützen. Im weiteren Verlauf aber ist die Funktion der Mastzellen entweder tumorstatisch durch Förderung der Immunantwort auf den Tumor oder alternativ tumorfördernd durch die Unterdrückung einer entzündlichen Immunantwort auf das Tumorwachstum. Eine Unterdrückung des Immunsystems ist unter anderem durch Interaktion der Mastzellen mit den

regulatorischen T-Zellen erklärbar (Maltby et al. 2009). Die Ergebnisse der vorausgegangenen Studien basieren nicht alle auf denselben Mess- und Färbemethoden. Daher ist nicht unwahrscheinlich, dass es sich bei den Mastzellen um verschiedene Untergruppen handeln könnte, die dementsprechend anders fungieren. Die vorliegende Studie konnte, wie oben beschrieben, keine gesteigerte Mastzellichte in MPNSTs feststellen, wohl aber in kutanen Neurofibromen. Die eigenen Ergebnisse widersprechen denen in der Literatur damit nicht, es erscheint aber eher unwahrscheinlich, dass Mastzellen in PNSTs eine Rolle beim Tumorprogress zukommt.

#### **5.4. CD34 in peripheren Nervenscheidentumoren**

Die Färbung der PNSTs auf CD34 zeigte eine Expression in allen PNSTs mit Ausnahme der fibrillären (Antoni A) Regionen der Schwannome und atypischen Neurofibrome. Ursprünglich wurde gezeigt, dass CD34 in PNSTs mit Fibroblasten assoziiert sein könnte (Khalifa et al. 2000). Eine neuere Arbeit legt jedoch nahe, dass es sich bei den CD34-exprimierenden Zellen um EGFR-positive Tumorvorläuferzellen handeln könnte (Williams et al. 2008).

#### **5.5. Podoplanin in peripheren Nervenscheidentumoren**

Anknüpfend an die Ergebnisse von Jokinen und Kollegen (2008) wurde systematisch die Expression von Podoplanin und CD34 in PNSTs unterschiedlicher Genese untersucht. Im Gegensatz zu Jokinen et al. untersuchten wir nicht TMAs, sondern einzelne größere Tumorproben. Mit diesem Verfahren zeigte sich ein zweigeteiltes Färbemuster in Schwannomen. So wurden durch Podoplanin in den Schwannomen die Antoni A Regionen gefärbt während die Antoni B Regionen ungefärbt blieben. Auch unterschieden sich die mit der Schwannomatose und mit NF2 assoziierten Schwannome in ihren Färbeeigenschaften nicht von den sporadischen Tumoren. Ein den Schwannomen ähnliches Bild zeigten die atypischen Neurofibrome. Hier waren zwar die fibrillären und retikulären Regionen nicht in klar definierten Arealen voneinander getrennt; dennoch wurden auch hier die fibrillären, zellreichen Areale durch Podoplanin markiert, unter Aussparung derselben Areale in der

CD34 Darstellung (siehe Abb.4, [3a] und [3b]). Hinsichtlich der Podoplaninexpression in MPNSTs konnte eine verstärkte Expression an den Invasionsgrenzen festgestellt werden. Dies deckt sich mit früher berichteten Ergebnissen (Wicki et al. 2006). Aufgrund der Podoplaninexpression an der Wachstumsfront von MPNSTs könnte dieses Protein nach Wicki et al. (2006) möglicherweise als Zielantigen für einen gezielten Therapieansatz im Sinne einer „target therapy“ genutzt werden.

### **5.6. Atypische Neurofibrome und Malignität**

Die verschiedenen Neurofibromtypen zeigen charakteristische Wachstumsmuster. Während kutane Neurofibrome als intrakutane- klar umschriebene- Knötchen imponieren, wachsen oberflächlich gelegene diffus/plexiforme Neurofibrome vielfach plattenartig und schließen oft mehrere Nervenbündel ein. Plexiforme noduläre Neurofibrome entwickeln sich häufig entlang der Nervenwurzeln oder auch der großen peripheren Nerven. Atypische Neurofibrome können bei jedem Neurofibromtyp auftreten, vor allem ähneln sie aufgrund ihres Wachstumsmusters oft niedrigmalignen MPNSTs. Charakteristika sind eine gesteigerte proliferative Aktivität, eine erhöhte Zelldichte und vermehrt vorkommende zelluläre und nukleäre Atypien (Coindre 2006). Diese Tumore wurden von einigen Autoren als intermediäre Form zwischen Neurofibrom und MPNST angesehen (Valeyrie-Allanore et al. 2005). In einer neueren Studie wurde das klinische Outcome mit den histologischen Eigenschaften abgeglichen, wobei die Hypothese, die die dysplastischen Eigenschaften mit einem prämaligen Progress in Verbindung brachten, nicht bestätigt werden konnte (Valeyrie-Allanore et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit waren die atypischen Neurofibrome die einzigen Neurofibrome, welche eine Podoplaninfärbung aufwiesen. Das Färbemuster ähnelte hierbei dem der Schwannome. CD34 und Podoplanin wurden auch in den atypischen Neurofibromen komplementär exprimiert (Siehe Abbildung 4). Vor dem Kontext der Ki-67 Proliferationsindices, welche ebenfalls eine gewisse Übereinstimmung bei Schwannomen und atypischen Neurofibromen zeigten, konnten damit Ähnlichkeiten in der Morphologie und der Tumorbilogie der beiden

Tumortypen herausgearbeitet werden. In eine ähnliche Richtung weist eine Ploiditätsstudie, welche anhand der FISH Technik die Ploidität verschiedener PNSTs untersuchte und eine ähnliche Übereinstimmung zwischen atypischen Neurofibromen und Schwannomen aufzeigte (Hruska et al. 2004). Eine neuere Studie, durch Jokinen und Kollegen, die 11 superfizielle atypische Neurofibrome untersuchte, fand keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der atypischen Morphologie und einer malignen Entartungen (Jokinen et al. 2009).

## **6. Beantwortung der Fragestellung**

Zu 1. CD34 erscheint nicht geeignet als Differenzierungsantigen in PNSTs oder MPNSTs aufgrund seiner ubiquitären Expression. Podoplanin erlaubte eine Differenzierung der atypischen Neurofibrome von den kutanen wie plexiformen PNSTs sowie vom MPNST. Ein prädiktiver Wert für eine Tumorprogression konnte nicht festgestellt werden.

Zu 2. Die Blutgefäßedichte nimmt vom PNST zum MPNST, also mit zunehmender Dedifferenzierung deutlich zu. Die Versorgung mit Lymphgefäßen spiegelt die physiologischen Verhältnisse der Ursprungsgewebe wieder und war mit zunehmender Dedifferenzierung nicht erhöht.

Zu 3. Die Mastzellinfiltration in den untersuchten Geweben war stark abhängig vom untersuchten Tumortyp, jedoch nicht von der Tumordignität oder dem Grad der Dedifferenzierung. Eine Zunahme der Mastzellidichte bei zunehmender Dedifferenzierung wurde nicht beobachtet.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden zwei Oberflächenantigene in PNSTs und MPNSTs untersucht. Die CD34- und Podoplaninexpression wurden in 123 Tumorproben, sowie 9 Kontrollgeweben analysiert. Zusätzlich hierzu wurde in sämtlichen Proben auch die Mastzellendichte ausgewertet. Anhand der spezifischen Markierung der Blutgefäße durch CD34 und der Lymphgefäße durch Podoplanin konnte dargestellt werden, dass die Blutgefäßdichte bei MPNSTs gegenüber benignen PNSTs oder normalem Kontrollgewebe signifikant erhöht ist. Die Versorgung mit Lymphgefäßen zeigte sich bei kutanen und plexiform diffusen Neurofibromen deutlich stärker ausgeprägt als bei intraneural gelegenen Tumoren (Schwannom, plexiform noduläres Neurofibrom) und entsprach damit den physiologischen Verhältnissen der jeweiligen Gewebe. Die Mastzellendichte korrelierte weder mit der Dignität des Tumors noch mit der klinischen Prognose. Kutane Neurofibrome, die extrem selten malignisieren, hatten hohe Mastzellendichten, wohingegen MPNSTs nur wenige Mastzellen aufwiesen. Damit könnten Mastzellen an der Entstehung von Neurofibromen beteiligt sein, scheinen aber nicht zu deren Progress oder Dedifferenzierung beizutragen. Interessanterweise zeigte CD34 eine inverse Expression zu Podoplanin. Sämtliche PNSTs und MPNSTs wiesen eine starke CD34 Expression auf, wobei in Schwannomen nur die retikulären Bereiche markiert wurden. Podoplanin wurde in Schwannomen und atypischen Neurofibromen in fibrillären Arealen exprimiert, nicht jedoch in kutanen und plexiformen Neurofibromen. Damit scheint Podoplanin als Differenzierungsantigen in der Diagnostik atypischer Neurofibrome geeignet. Die morphologische Ähnlichkeit, das vergleichbare immunohistochemische Expressionsmuster von CD34 und Podoplanin sowie die ähnliche proliferative Aktivität von atypischen Neurofibromen und Schwannomen weist auf eine verwandte phänotypische Endstrecke beider Tumorarten hin.

Die Ergebnisse zur Podoplanin- und CD34-Expression in peripheren Nervenscheidentumoren wurden veröffentlicht (Naber et al. 2011).

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema zur zellulären Zusammensetzung der untersuchten Tumorgruppen
Abbildung 2:	Schemata zur Möglichen Funktion von CD34
Abbildung 3:	Podoplanin- und CD34-Expression in PNSTs und MPNSTs
Abbildung 4:	CD34 (li) und Podoplanin (re) Komplementärfärbung
Abbildung 5:	Proliferationsindices PNSTs, Mittel $\pm$ Standard
Abbildung 6:	Mastzellverteilung in PNSTs, Mittel $\pm$ Standard
Abbildung 7:	Blutgefäße in PNSTs. Mittel $\pm$ Standard Fehler
Abbildung 8:	Blutgefäßdurchmesser in PNST, Mittel $\pm$ Standard Fehler
Abbildung 9:	Lymphgefäße in PNSTs. Mittel $\pm$ Standard Fehler
Abbildung 10:	Lymphgefäßdurchmesser in PNST, Mittel $\pm$ Standard Fehler

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnosekriterien der NF1
Tabelle 2:	Manchester Kriterien zur Diagnose von NF2
Tabelle 3:	Diagnosekriterien der Schwannomatose
Tabelle 4:	Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge
Tabelle 5:	Antikörper
Tabelle 6:	Laborgeräte
Tabelle 7:	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 8:	Fallzahlen und Tumorentitäten vs. Erkrankung

## 10. Abbkürzungsverzeichnis

BVS	<b>B</b> ilaterale <b>V</b> estibuläre <b>S</b> chwannome
cAMP	Zyklisches <b>A</b> denosin <b>M</b> ono <b>P</b> hosphat
EMA	<b>E</b> pitheliales <b>M</b> embran <b>A</b> ntigen
FISH	<b>F</b> luoreszenz <b>I</b> n <b>S</b> itu <b>H</b> ybridisierung
FcεRI	Hochaffiner IgE Rezeptor
LOH	<b>L</b> oss <b>O</b> f <b>H</b> eterozygosity
PNST	<b>P</b> eripherer <b>N</b> erven <b>S</b> cheiden <b>T</b> umor
MPNST	<b>M</b> aligner <b>P</b> eripherer <b>N</b> erven <b>S</b> cheiden <b>T</b> umor
NF*	<b>N</b> euro <b>F</b> ibromatose (*=1 oder 2 entspricht Typ 1 oder 2)
Ras	<b>R</b> atten <b>S</b> arcom Protoonkogen
Src	<b>S</b> a <b>R</b> coma Tyrosin Kinase
TMA	<b>T</b> issue <b>M</b> icro <b>A</b> rray

## 11. Literaturverzeichnis

- **Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID (1989)** Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 169: 1721-1731
- **Arun D, Gutmann DH (2004)** Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 17(2): 101-105
- **Baser ME, R Evans DG, Gutmann DH (2003)** Neurofibromatosis 2. *Curr Opin Neurol* 16: 27-33.
- **Bhattacharyya AK, Perrin R, Guha A (2004)** Peripheral nerve tumors: management strategies and molecular insights. *Journal of Neuro-Oncology* 69: 335–349
- **Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA (1994)** Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84: 2554-2565
- **Bajenaru ML, Hernandez MR, Perry A, Zhu Y, Parada LF, et al. (2003)** Optic nerve glioma in mice requires astrocyte Nf1 gene inactivation and Nf1 brain heterozygosity. *Canc. Res.* 63: 8573–8577
- **Bakkouri WE, Kania RE, Guichard JP, Lot G, Herman P, Huy PT (2009)** Conservative management of 386 cases of unilateral vestibular schwannoma: tumor growth and consequences for treatment. *J Neurosurg* 110(4): 662-669
- **Behrens T (2008)** Untersuchung des Hyaluronsäuregehaltes in kutanen und plexiformen Neurofibromen hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit einer postoperativen Ödembildung. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg
- **Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID (1988)** Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 81: 951-955

- **Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D (1997)** Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 151(4): 1141-1152
- **Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ (2005)** Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma, *Mod Pathol* 18: 105–110
- **Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T (1999)** Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286: 2172–2176
- **Coindre JM (2006)** Grading of Soft Tissue Sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 130: 1448-1453
- **Dabiri S, Huntsman D, Makretsov N, Cheang M, Gilks B, Bajdik C, Gelmon K, Chia S, Hayes M (2004)** The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis, *Mod. Pathol.* 17: 690–695.
- **Drew E, Merzaban JS, Seo W, Ziltener HJ, McNagny KM (2005)** CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity* 22: 43-57
- **Eady RA, Cowen T, Marshall TF, Plummer V, Greaves MW (1979)**, Mast cell population density, blood vessel density and histamine content in normal human skin. *Br J Dermatol.* 100: 623-633
- **Ehrlich P (1878)** Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Medizinische Dissertation, Universität Leipzig
- **Ema H, Suda T, Miura Y, Nakauchi H (1990)** Colony formation of clone-sorted human hematopoietic progenitors. *Blood* 75: 1941-1946

- **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: 311–314
- **Ferrari A, Bisogno G, Macaluso A, Casanova M, D'Angelo P, Pierani P, Zanetti I, Alaggio R, Cecchetto G, Carli M (2007)** Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Cancer* 109: 1406-1412
- **Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990)** Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417-2426
- **Fisher ER, Paik SM, Rockette H, Jones J, Caplan R, Fisher B (1989)** Prognostic significance of eosinophils and mast cells in rectal cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (protocol R-01). *Hum. Pathol.* 20: 159–163.
- **Gesundheit B, Parkin P, Greenberg M, Baruchel S, Senger C, Kapelushnik J, Smith C, Klement GL (2010)** The role of angiogenesis in the transformation of plexiform neurofibroma into malignant peripheral nerve sheath tumors in children with neurofibromatosis type 1. *J Pediatr Hematol Oncol.* 32(7):548-53
- **Giovannini M, Robanus-Maandag E, van der Valk M, Niwa-Kawakita M, Abramowski V, Goutebroze L, Woodruff JM, Berns A, Thomas G (2000).** Conditional biallelic Nf 2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2. *Genes Dev.* 14: 1617–1630
- **Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994)** Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Canc Res* 54: 4855–4878
- **Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D (1997)** The diagnostic evaluation and

multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. JAMA 278: 51-57

- **Guyton AC, Hall JE (2006)** Textbook of Medical Physiology 11th Edition. Elsevier Saunders ISBN 0-8089-2317-X: 190-193
- **Hagel C, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, Zurakowski D, von Deimling A, Mautner VF (2007)** Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. J Neurooncol 82: 187-92
- **Hegedus B, Dasgupta B, Shin JE, Emmett RJ, Hart-Mahon EK, Elghazi L, Bernal-Mizrachi E, Gutmann DH (2007)** Neurofibromatosis-1 Regulates Neuronal and Glial Cell Differentiation from Neuroglial Progenitors In Vivo by Both cAMP- and Ras-Dependent Mechanisms. Cell Stem Cell 1: 443–457
- **Houshmandi SS, Emmett RJ, Giovannini M, Gutmann DH (2009)** The Neurofibromatosis 2 Protein, Merlin, Regulates Glial Cell Growth in an ErbB2- and Src-Dependent Manner. Mol Cell Biol 29: 1472–1486
- **Hruska A, Bollmann R, Kovács RB, Bollmann M, Bodó M, Sági Z (2004)** DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors, Cell Oncol 26: 335–345
- **Janssens AS, Heide R, den Hollander JC, Mulder PG, Tank B, Oranje AP (2005)** Mast cell distribution in normal adult skin. J Clin Pathol 58(3): 285-289
- **Jokinen CH, Dadras SS, Goldblum JR, van de Rijn M, West RB, Rubin BP (2008)** Diagnostic implications of podoplanin expression in peripheral nerve sheath neoplasms, Am J Clin Pathol 129: 886-893
- **Jokinen CH, Argenyi ZB (2009)** Atypical neurofibroma of the skin and subcutaneous tissue: clinicopathologic analysis of 11 cases. J Cutan Pathol 37(1): 35-42
- **Kalof AN, Cooper K (2009)** D2-40 immunohistochemistry--so far!. Adv Anat Pathol 16: 62–64

- **Kamba T, McDonald DM (2007)** Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer* 96(12): 1788-1795
- **Khalifa MA, Montgomery EA, Ismiil N, Azumi N (2000)** What are the CD34+ cells in benign peripheral nerve sheath tumors? Double immunostaining study of CD34 and S-100 protein. *Am J Clin Pathol* 114: 123-126
- **Kim HA, DeClue JE, Ratner N (1997)** cAMP-dependent protein kinase A is required for Schwann cell growth: interactions between the cAMP and neuregulin/tyrosine kinase pathways. *J Neurosci Res* 49: 236–247
- **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
- **Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996)** CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1-13
- **Lynch TM, Gutmann DH (2002)** Neurofibromatosis 1. *Neurol Clin* 20(3): 841-865
- **MacCollin M, Chiocca EA, Evans DG, Friedman JM, Horvitz R, Jaramillo D, Lev M, Mautner VF, Niimura M, Plotkin SR, Sang CN, Stemmer-Rachamimov A, Roach ES (2005)** Diagnostic criteria for schwannomatosis. *Neurology* 64: 1838-1845
- **MacCollin M, Willett C, Heinrich B, Jacoby LB, Acierno JS Jr, Perry A, Louis DN (2003)** Familial schwannomatosis: Exclusion of the NF2 locus as the germline event. *Neurology* 60: 1968-1974
- **Maltby S, Khazaie K, McNagny KM (2009)** Mast cells in tumor growth: Angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta* 1796(1): 19-26
- **Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M (2005)** Characterization of human PA2.26 antigen

(T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 113: 899–910

- **Martín-Villar E, Yurrita MM, Fernández-Muñoz B, Quintanilla M, Renart J (2009)** Regulation of podoplanin/PA2.26 antigen expression in tumour cells. Involvement of calpain-mediated proteolysis. *Int J Biochem Cell Biol* 41(6): 1421-1429
- **McClatchey AI (2007)** Neurofibromatosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2: 191–216
- **Naber U, Friedrich RE, Glatzel M, Mautner VF, Hagel C (2011)** Podoplanin and CD34 in peripheral nerve sheath tumours: focus on neurofibromatosis 1-associated atypical neurofibroma. *J Neurooncol.* 103(2):239-245
- **National Institutes of Health Consensus Development Conference** Neurofibromatosis. Conference statement. *Arch Neurol.* 1988 45(5):575-8
- **Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN (1999)** Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol* 155: 1879–1884
- **Nielsen, JS, McNagny KM (2008)** Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 121: 3683-3692
- **Nielsen JS, McNagny KM (2007)** Influence of host irradiation on long-term engraftment by CD34-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* 110: 1076-1077
- **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): 1461-1470
- **Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG 2nd, Halpin C, Padera TP, Tyrrell A, Sorensen AG, Jain RK, di Tomaso E (2009)** Hearing

Improvement after Bevacizumab in Patients with Neurofibromatosis Type 2. *N Engl J Med* 361: 358-367

- **Poole TJ, Zetter BR (1983)** Stimulation of rat peritoneal mast cell migration by tumor-derived peptides, *Cancer Res.* 43: 5857–5861.
- **Prussin C, Metcalfe DD (2003)** IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 111: 486-494
- **Ruggieri M (1999)** The different forms of neurofibromatosis. A review. *Childs Nerv Syst* 15: 295–308
- **Sleeman JP, Thiele W (2009)** Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int J Cancer* 125(12): 2747-2756
- **Sonne SB, Herlihy AS, Høi-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Marks A, Leffers H, Rajpert-De Meyts E (2006)** Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours, *Virchows Arch* 449: 200–206
- **Stumpf DA, Alksne JF, Annegers JF (1988)** Neurofibromatosis. NIH consensus development conference statement. *Arch Neurol* 45: 575-578
- **Swartz MA, Skobe M (2001)** Lymphatic Function, Lymphangiogenesis, and Cancer Metastasis *Microsc Res Tech* 55(2): 92-99
- **Tardío JC (2009)** CD34-reactive tumors of the skin. An updated review of an ever-growing list of lesions. *J Cutan Pathol* 36: 89-102.
- **Tate MC, Aghi MK (2009)** Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics* 3: 447-457
- **Trofatter JA, MacCollin MM (1993)** A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72: 791–800
- **Valeyrie-Allanore L, Ismaïli N, Bastuji-Garin S, Zeller J, Wechsler J, Revuz J, Wolkenstein P (2005)** Symptoms associated with malignancy of

peripheral nerve sheath tumours: a retrospective study of 69 patients with neurofibromatosis 1. *Br J Dermatol* 153: 79–82

- **Valeyrie-Allanore L, Ortonne N, Lantieri L, Ferkal S, Wechsler J, Bagot M, Wolkenstein P (2008)** Histopathologically dysplastic neurofibromas in neurofibromatosis 1: diagnostic criteria, prevalence and clinical significance, *Br J Dermatol* 158: 1008-1012
- **von Recklinghausen F. (1882)** Ueber die Multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den Multiplen Neuromen. Berlin: Hirschwald: 138 ff
- **Weiss SW, Nickoloff BJ (1993)** CD34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *Am J Surg Pathol* 17: 1039-1045
- **Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G (2006)** Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9: 261–272
- **Wilhelm M, Silver R, Silverman AJ (2005)** Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. *Eur J Neurosci* 22 (9): 2238-2248
- **Williams JP, Wu J, Johansson G, Rizvi TA, Miller SC, Geiger H, Malik P, Li W, Mukoyama YS, Cancelas JA, Ratner N (2008)** NF1 mutation expands an EGFR-dependent peripheral nerve progenitor that confers neurofibroma tumorigenic potential. *Cell Stem Cell* 3(6): 658-669
- **Woods R, Friedman JM, Evans DG, Baser ME, Joe H. (2003)** Exploring the “two-hit hypothesis” in NF2: tests of two-hit and three-hit models of vestibular schwannoma development. *Genet. Epidemiol.* 24: 265–272
- **Xu G, O’Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R (1990)** The

Neurofibromatosis Type 1 Gene Encodes a Protein Related to GAP. *Cell* 62: 599-608

- **Yamaguchi U, Hasegawa T, Hirose T, Chuman H, Kawai A, Ito Y, Beppu Y (2003)** Low grade malignant peripheral nerve sheath tumour: varied cytological and histological patterns. *J Clin Pathol* 56: 826–830
- **Yang FC, Ingram DA, Chen S, Zhu Y, Yuan J, Li X, Yang X, Knowles S, Horn W, Li Y, Zhang S, Yang Y, Vakili ST, Yu M, Burns D, Robertson K, Hutchins G, Parada LF, Clapp DW (2008)** NF1-dependent tumors require a microenvironment containing NF1+/- and c-kit-dependent bone marrow. *Cell* 135: 437–448
- **Young PE, Baumhueter S, Lasky LA (1995)** The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 85: 96- 105
- **Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF (2002)** Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 296: 920-922

## 12. Danksagung

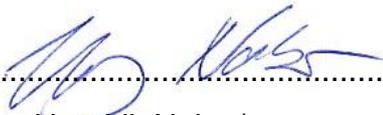
Mein herzlichster Dank gilt

- meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Hagel für die gute Betreuung, viele Gespräche und Freundschaft.
- Herrn Prof. Dr. Glatzel und Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich für die Hilfe und Mitarbeit bei der Entstehung der Arbeit und die Überlassung der Proben.
- Herrn Haberkorn für die praktische Einweisung und Unterstützung im Labor.
- Dr. Jakob Matschke und Dr. Christian Bernreuther und Dr. D. Sepulveda-Falla für Unterstützung und Kameradschaft.
- Meiner Frau für ihre Stärke und Liebe.
- Meinem Bruder und meinen Eltern für Durchsicht der Arbeit und Unterstützung in vielen anderen Belangen.

## 13. Erklärungen

### 13.1. 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.

  
.....  
(Urs Hendrik Naber)

## 14. Anhang

Tabellarische Zusammenfassung aller gesammelter Daten.  
Für die Tabellen gilt folgende Legende.

### 14.1. Legende

#### 14.1.1. Tumortyp

1. Kutanes Neurofibrom
2. Plexiform diffuses Neurofibrom
3. Plexiform noduläres Neurofibrom
6. Atypisches Neurofibrom
9. Vestibuläres Schwannom
10. Schwannomatosis Schwannom
11. MPNST
21. Haut
22. Nerv

#### 14.1.2. Geschlecht

1. Frau
2. Mann

#### 14.1.3. Lokalisation

1. Kopf
2. Rumpf
3. Extremitäten

#### 14.1.4. Grunderkrankung

1. Neurofibromatose Typ 1
2. Neurofibromatose Typ 2
3. Schwannomatose
4. Sporadische Schwannome

#### 14.1.5. Färbeintensität

0. Keine Anfärbung
1. Leichte Anfärbung (5-10% der Zellen)
2. Mittlere Anfärbung (20% der Zellen)
3. Starke Anfärbung (>20% der Zellen)

Block	Tumortyp	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Grunderkrankung	Podoplanin Retikulär	Podoplanin Fibrillär	CD34 Retikulär	CD34 Fibrillär	Mastzell- dichte	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Blutgefäße	Blutgefäße % der Fläche	Blutgefäße Mittelwert der Durchmesser	Blutgefäße Standard Abweichung	Blutgefäße max. Durchmesser	Blutgefäße min. Durchmesser	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Lymphgefäße	Lymphgefäße % der Fläche	Lymphgefäße Mittelwert der	Lymphgefäße Standard	Lymphgefäße max. Durchmesser	Lymphgefäße min. Durchmesser	Proliferationsindex
E0110-90	10	2	30	2	3	0	1	3	0	0	10.87	2.92	31.28	48.18	229.84	8.57	1.99	0.01	8.25	1.76	10.50	6.74	
E0150-91	22	1	41	2	0	0	0	0	0	38	1.25	5.49	139.71	118.02	271.24	43.08	4.11	0.02	5.28	0.86	6.63	4.32	
E0420-91	22	2	53	3	0	0	0	0	0	0	19.65	1.01	15.56	16.57	75.49	3.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0147-92	10	2	42	3	3	3	3	3	0	0	9.46	0.98	18.67	21.66	102.29	5.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0320-93	11	1	28	1	1	1	0	1	0	0	38.46	0.49	10.67	4.91	37.93	4.75	1.63	0.11	17.35	13.29	36.85	7.28	
E0428-93	10	2	43	3	3	1	1	3	0	0	15.53	3.61	32.99	31.40	151.26	6.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0541-93	11	2	34	1	1	0	0	3	0	9	13.85	0.62	12.76	12.37	78.26	5.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0002-94	11	2	40	1	1	1	0	0	0	5	43.00	1.55	13.20	13.46	135.27	5.90	4.19	0.09	11.54	4.40	17.74	5.68	
E0092-94	3	1	3	3	1	0	0	3	0	27	7.86	2.27	30.15	45.49	165.57	8.04	11.42	1.29	19.69	25.78	137.00	4.97	
E0135-94	3	2	56	3	1	0	0	2	0	5	11.26	0.37	12.60	9.83	47.82	5.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0258-94	11	2	36	1	1	3	0	0	0	1	27.25	0.43	10.44	5.95	36.99	4.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0328-94	3	1	20	1	1	0	0	3	0	247	23.95	0.85	14.96	8.09	40.16	5.36	20.54	3.06	18.70	27.67	178.81	4.82	0.00
E0209-95	3	2	15	3	1	0	0	3	0	0	14.45	0.22	10.99	4.03	24.25	6.44	3.28	0.41	20.17	15.12	54.78	5.36	7.00
E0418-95	6	1	30	1	1	3	3	3	0	41	7.06	1.32	26.86	25.37	88.26	7.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.00
E0547-95	3	2	16	3	1	1	0	3	0	0	14.87	1.11	16.90	14.81	86.50	7.00	2.98	1.05	30.72	23.36	78.36	11.20	15.00
E0539-96	3	1	5	3	1	0	0	2	0	3	15.96	0.33	11.99	6.26	41.40	5.50	3.73	0.38	23.12	21.77	67.28	5.89	1.00
E0543-96	2	2	11	3	1	0	0	2	0	0	4.91	0.61	22.37	23.40	82.41	5.36	9.91	1.60	28.68	29.91	141.55	5.89	
E0145-97	3	1	26	1	1	0	0	2	0	0	19.39	0.88	17.19	9.87	64.11	5.68	10.15	0.42	14.15	11.65	47.55	4.96	8.00
E0214-97	3	1	33	3	1	0	0	2	0	147	36.30	5.10	23.81	22.43	118.66	6.82	19.32	3.85	28.65	25.44	113.62	6.31	1.00
E0237-97	1	1	23	1	1	0	0	3	0	4	2.47	0.02	8.77	1.93	12.26	6.92	6.62	0.21	12.36	8.15	26.73	3.56	
E0249-97	3	2	12	3	1	0	0	3	0	3	21.49	0.41	9.52	6.34	33.13	4.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Block	Tumortyp	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Grunderkrankung	Podoplanin Retikulär	Podoplanin Fibrillär	CD34 Retikulär	CD34 Fibrillär	Mastzell- dichte	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Blutgefäße	Blutgefäße % der Fläche	Blutgefäße Mittelwert der Durchmesser	Blutgefäße Standard Abweichung	Blutgefäße max. Durchmesser	Blutgefäße min. Durchmesser	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Lymphgefäße	Lymphgefäße % der Fläche	Lymphgefäße Mittelwert der	Lymphgefäße Standard	Lymphgefäße max. Durchmesser	Lymphgefäße min. Durchmesser	Proliferationsindex
E0251-97	11	2	66	1	1	0	0	3	0	169	36.77	1.62	13.42	13.22	94.85	5.60	4.64	1.30	25.93	36.11	130.18	4.08	
E0268-97	1	2	33	3	1	0	0	2	0	58	18.45	0.34	11.90	5.99	31.61	5.04	3.31	2.11	45.59	48.03	148.81	5.56	
E0277-97	2	1	29	1	1	0	0	3	0	102	23.39	0.25	9.78	3.58	19.29	4.29	9.06	1.20	25.63	24.23	108.89	4.60	
E0280-97	1	1	30	1	1	0	0	2	0	53	11.25	0.16	10.19	4.78	24.06	4.29	4.71	0.22	17.42	9.99	38.46	6.83	
E0295-97	3	2	9	1	1	0	0	3	0	94	8.14	0.22	14.80	10.28	45.29	7.20	12.12	1.29	24.27	16.04	54.11	4.29	
E0466-97	2	1	41	2	1	0	0	3	0	327	21.58	0.63	13.13	5.22	30.24	7.69	10.22	0.42	13.20	11.15	52.70	4.13	
E0661-97	3	1	35	1	1	0	0	3	0	5	13.95	1.11	20.98	22.29	124.34	5.22	6.68	0.33	13.83	9.78	42.86	3.39	2.00
E0714-97	3	2	4	3	1	0	0	1	0	28	15.64	0.85	14.84	16.73	104.05	5.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E0864-97	1	1	35	1	1	2	0	0	0	0	22.58	0.32	9.80	5.11	36.43	4.29	6.22	0.09	11.04	5.10	21.43	3.11	
E0875-97	3	2	53	3	1	0	0	2	0	369	17.97	2.89	21.74	24.07	104.30	5.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
E0165-98	2	1	24	2	2	0	0	3	0	350	2.45	0.06	17.36	9.35	31.71	8.09	15.90	1.34	16.58	19.64	95.49	3.74	
E0240-98	10	1	56	1	3	0	2	3	0	1	29.27	5.14	27.72	30.68	242.70	5.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0281-98	2	2	20	1	1	0	0	3	0	116	21.39	0.31	10.28	5.10	26.41	4.29	10.28	0.71	17.43	16.66	76.45	5.60	
E0586-98	6	1	33	2	1	0	0	2	0	8	4.91	0.17	13.16	13.21	56.35	5.45	11.16	0.14	9.19	5.31	24.92	4.19	3
E0616-98	3	1	49	3	1	0	0	2	0	20	3.80	0.09	13.94	5.62	25.02	5.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E0687-98	3	2	39	2	1	0	0	2	0	11	12.32	0.13	8.81	3.67	19.06	5.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E0711-98	3	2	11	2	1	0	0	2	0	10	6.21	0.11	11.29	3.60	19.55	5.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0720-98	3	2	38	3	1	0	0	2	0	44	10.34	0.93	13.29	12.05	62.68	4.29	11.99	0.30	13.16	6.75	30.26	5.36	
E0037-99	10	2	41	3	3	0	2	3	0	0	12.22	0.56	12.19	18.80	88.49	0.52	5.56	0.54	0.04	0.05	0.13	0.00	
E0144-99	3	1	13	3	1	0	0	2	0	32	8.69	0.19	12.38	8.00	44.16	7.14	2.52	35.66	5.94	1.89	8.61	3.12	3.00
E0147-99	1	2	39	2	1	0	0	3	0	362	4.17	0.08	12.89	5.42	24.25	7.22	6.38	1.44	25.56	32.15	107.86	3.25	

Block	Tumortyp	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Grunderkrankung	Podoplanin Retikulär	Podoplanin Fibrillär	CD34 Retikulär	CD34 Fibrillär	Mastzell- dichte	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Blutgefäße	Blutgefäße % der Fläche	Blutgefäße Mittelwert der Durchmesser	Blutgefäße Standard Abweichung	Blutgefäße max. Durchmesser	Blutgefäße min. Durchmesser	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Lymphgefäße	Lymphgefäße % der Fläche	Lymphgefäße Mittelwert der	Lymphgefäße Standard	Lymphgefäße max. Durchmesser	Lymphgefäße min. Durchmesser	Proliferationsindex
E0227-99	1	1	32	3	1	0	0	2	0	58	7.59	0.06	8.72	1.84	11.94	6.02	11.01	1.05	19.68	16.72	73.28	5.36	
E0247-99	3	2	70	3	1	0	0	2	0	2	4.23	0.20	16.69	15.15	50.54	5.36	14.44	2.00	21.96	26.69	115.73	4.90	0.00
E0255-99	2	2	70	1	1	0	0	3	0	47	23.63	1.66	17.19	21.31	113.22	4.18	5.45	1.97	44.29	29.27	95.15	4.47	
E0394-99	2	1	30	1	1	0	0	3	0	3	10.75	0.20	11.61	3.94	17.57	7.58	8.32	0.24	15.17	8.06	29.77	6.94	
E0457-99	1	2	41	3	1	0	0	2	0	167	7.82	0.10	10.10	4.78	20.47	4.57	2.99	1.03	33.31	55.78	159.39	7.04	
E0472-99	3	2	14	1	1	0	0	2	0	0	9.05	0.43	15.21	14.24	57.87	5.03	8.43	0.12	10.17	3.54	14.77	3.59	1.00
E0593-99	11	1	40	1	1	1	0	2	0	81	31.03	0.65	12.36	4.75	27.59	5.20	19.18	1.10	15.38	10.74	44.12	4.29	20.00
E0602-99	1	1	47	2	1	0	0	2	0	9	9.85	0.26	10.80	10.24	45.84	4.43	7.47	0.35	12.23	7.94	32.46	3.72	
E0635-99	1	2	30	3	1	0	0	2	0	49	12.49	2.06	15.37	33.97	194.03	4.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0788-99A	2	1	35	2	1	0	0	2	0	265	17.54	0.43	13.65	8.84	56.03	6.02	6.22	4.89	50.02	61.52	223.20	4.86	
E0111-00	22	1	67	3	0	0	0	0	0	20	1.23	0.00	5.88	0.83	6.49	4.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0197-00	3	2	22	3	1	1	0	3	0	6	4.19	0.02	6.39	1.21	8.60	4.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.00
E0285-00	1	1	26	2	1	0	0	3	0	17	23.01	0.75	13.56	9.00	60.07	7.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0323-00	1	1	34	3	1	0	0	3	0	44	2.92	0.15	19.50	14.78	41.32	5.81	9.11	0.32	12.31	8.09	41.34	5.92	
E0620-00	10	2	66	3	2	0	0	3	0	9	4.90	0.14	13.90	4.08	21.64	7.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0683-00	2	1	16	1	1	0	0	3	0	3	9.03	0.11	10.88	3.06	16.28	4.71	5.43	1.66	32.20	44.62	171.57	5.11	
E0792-00	2	2	14	1	2	0	0	3	0	143	24.87	0.28	8.51	7.12	42.37	3.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0795-00	10	2	26	3	2	0	0	3	0	23	54.11	0.27	6.30	3.30	25.02	3.00	3.79	0.07	10.79	6.62	23.57	3.75	
E0861-00	2	2	36	3	1	0	0	1	0	30	18.03	3.04	20.44	26.75	141.05	3.52	4.99	0.96	25.74	24.51	85.02	7.14	
E0863-00	1	1	3	1	1	0	0	3	0	6	13.34	0.22	10.23	5.79	36.71	5.96	7.67	0.11	10.13	3.99	16.63	5.16	
E0869-00	3	2	25	3	1	0	2	3	0	0	4.02	0.54	21.31	27.83	91.78	6.14	2.12	0.54	36.23	34.51	91.89	6.33	1.00

Block	Tumortyp	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Grunderkrankung	Podoplanin Retikulär	Podoplanin Fibrillär	CD34 Retikulär	CD34 Fibrillär	Mastzell- dichte	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Blutgefäße	Blutgefäße % der Fläche	Blutgefäße Mittelwert der Durchmesser	Blutgefäße Standard Abweichung	Blutgefäße max. Durchmesser	Blutgefäße min. Durchmesser	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Lymphgefäße	Lymphgefäße % der Fläche	Lymphgefäße Mittelwert der	Lymphgefäße Standard	Lymphgefäße max. Durchmesser	Lymphgefäße min. Durchmesser	Proliferationsindex
E0878-00	2	2	56	1	2	0	0	3	0	1	8.70	0.14	9.83	4.86	25.63	5.96	4.54	0.50	20.54	17.42	61.02	6.97	
E0074-01	10	2	38	3	2	0	1	3	0	0	6.11	0.29	12.47	4.65	26.46	7.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0130-01	1	1	16	2	1	0	0	3	0	11	7.33	0.22	12.59	5.97	28.78	6.69	8.71	4.41	35.35	36.45	155.49	6.06	
E0204-01	3	2	6	3	1	0	0	3	0	18	37.34	0.18	6.25	2.37	20.62	3.48	9.13	0.33	14.47	14.08	74.18	3.18	
E0243-01	1	2	24	3	1	0	0	2	0	137	7.75	3.93	43.69	52.95	228.06	6.84	1.66	0.05	59.52	59.94	144.05	7.55	
E0261-01	2	1	33	3	2	0	1	2	0	2	23.51	0.14	6.31	2.65	15.89	2.38	8.97	0.19	12.36	6.71	35.04	5.86	
E0354-01B	2	2	33	2	1	0	0	2	0	0	9.84	1.14	23.47	13.40	58.26	10.18	5.38	0.72	18.70	18.54	63.49	4.82	
E0487-01	1	2	50	3	1	0	0	3	0	19	14.53	0.14	8.57	4.55	24.86	3.95	14.84	0.36	12.11	7.48	37.78	3.72	
E0820-01	1	1	50	3	1	0	0	1	0	51	12.31	1.64	23.56	23.62	120.06	6.08	6.35	1.59	21.80	19.81	81.28	6.86	
E0881-01	3	2	4	2	1	0	0	3	0	32	9.99	0.18	12.85	10.49	38.20	4.49	5.92	0.13	11.76	6.54	22.64	3.97	
E0940-01	2	2	11	3	1	0	0	2	0	38	7.52	1.14	24.76	26.35	86.63	6.13	5.83	0.08	9.56	4.85	17.93	4.17	
E0949-01	11	1	19	3	1	0	0	1	0	3	25.24	0.30	9.42	5.53	42.79	4.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0968-01	1	2	59	3	1	0	0	3	0	8	12.83	0.94	14.59	14.59	67.71	5.35	5.41	0.28	18.27	6.54	28.93	5.68	
E0224-02	1	1	16	3	1	0	0	2	0	2	5.74	0.15	12.62	4.15	21.38	7.04	6.09	0.22	16.13	9.38	34.79	4.00	
E0419-02	2	1	27	3	1	0	0	3	0	44	20.42	1.32	16.52	17.65	81.69	4.29	14.67	0.33	11.65	8.51	37.96	3.63	
E0641-02	22	2	2	3	0	0	0	0	0	0	33.89	0.51	9.42	8.47	44.67	3.75	10.01	0.03	4.67	1.52	7.43	3.54	
E0721-02	1	1	36	2	1	0	0	3	0	199	0.42	0.16	62.64	0.00	62.64	62.64	2.10	0.52	25.88	27.10	62.64	5.04	
E0727-02	1	2	46	1	1	0	0	3	0	666	8.91	3.13	28.37	34.40	116.10	4.70	6.63	0.45	15.68	13.27	54.04	2.78	
E0746-02	10	1	35	3	2	0	2	3	0	76	8.83	0.56	17.01	22.25	121.90	4.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0816-02	21	1	49	2	0	0	0	0	0	64	18.66	0.10	7.16	3.42	13.46	3.08	5.81	0.05	8.37	2.28	12.36	5.79	
E0298-03	1	1	17	1	1	0	0	2	0	120	23.62	0.99	17.17	12.73	54.16	4.87	3.30	0.29	19.75	15.04	42.08	5.20	

Block	Tumortyp	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Grunderkrankung	Podoplanin Retikulär	Podoplanin Fibrillär	CD34 Retikulär	CD34 Fibrillär	Mastzell- dichte	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Blutgefäße	Blutgefäße % der Fläche	Blutgefäße Mittelwert der Durchmesser	Blutgefäße Standard Abweichung	Blutgefäße max. Durchmesser	Blutgefäße min. Durchmesser	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Lymphgefäße	Lymphgefäße % der Fläche	Lymphgefäße Mittelwert der	Lymphgefäße Standard	Lymphgefäße max. Durchmesser	Lymphgefäße min. Durchmesser	Proliferationsindex
E0622-03	6	1	25	3	1	1	1	3	0	7	10.94	0.72	17.84	15.48	55.50	4.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
E0658-03	6	1	41	2	1	0	0	3	0	43	12.19	0.41	12.71	9.98	52.22	4.26	4.83	1.20	26.28	26.61	98.84	6.16	3
E0659-03	6	1	41	2	1	0	0	3	0	3	6.75	2.41	29.10	61.19	248.93	5.81	10.90	0.79	18.52	12.69	53.03	5.93	2
E0660-03	6	1	41	2	1	0	0	3	0	72	12.16	0.40	13.27	8.72	36.68	5.27	4.53	1.06	30.45	29.77	100.74	8.21	5
E0724-03	10	1	49	3	3	0	2	3	0	0	10.96	0.92	18.00	18.08	89.92	6.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0630-04	10	2	14	3	2	0	0	3	0	0	7.36	0.27	15.79	10.46	43.04	6.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0765-04	6	2	31	2	1	1	1	3	0	0	14.76	3.05	26.87	29.26	115.67	5.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	11
E0829-04	10	2	53	1	3	0	0	3	0	0	15.53	19.15	26.05	116.64	725.98	3.97	13.37	1.60	25.95	23.29	100.30	4.37	
E0232-05	6	1	30	1	3	1	1	3	0	4	8.02	0.09	6.74	3.51	13.40	3.53	8.87	0.74	19.43	13.57	56.80	4.57	6
E0233-05	6	1	30	1	3	0	0	3	0	5	7.28	0.06	8.96	3.93	20.59	5.11	3.49	0.21	18.92	8.68	34.21	8.97	6
E0351-05	10	1	17	2	3	0	1	3	0	2	10.01	0.31	12.20	10.12	58.32	5.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0352-05	10	1	17	2	3	0	1	3	0	29	16.77	0.26	10.61	2.66	17.74	7.12	1.65	0.28	18.48	23.08	51.41	2.07	
E0848-05	6	1	24	2	1	2	2	3	0	0	12.33	0.34	13.67	9.27	40.67	4.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	18
E0850-05	6	1	24	2	1	2	2	3	0	3	4.38	0.77	32.39	18.38	65.35	16.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2
E0011-06	9	2	62	1	4	0	2	3	0	9	11.57	1.07	15.30	20.52	115.82	3.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0040-06	2	1	37	3	2	0	0	2	0	45	9.90	0.15	12.88	4.26	21.86	7.47	3.76	0.52	18.24	18.31	56.68	4.36	
E0138-06	21	2	49	2	0	0	0	0	0	3	2.54	0.02	8.66	3.10	11.79	4.41	0.61	0.00	4.19		4.19	4.19	
E0251-06	6	2	3	1	1	3	3	3	0	0	5.30	0.11	12.72	9.31	33.97	6.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8
E0300-06	9	2	33	1	4	0	1	3	0	11	48.63	4.49	18.25	17.22	83.87	4.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0448-06	9	1	31	1	4	0	1	3	0	1	7.85	0.13	10.33	4.88	22.17	3.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E0623-06	10	1	18	3	3	0	1	3	0	9	15.00	0.58	14.33	15.73	68.98	4.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Block	Tumortyp	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Grunderkrankung	Podoplanin Retikulär	Podoplanin Fibrillär	CD34 Retikulär	CD34 Fibrillär	Mastzell- dichte	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Blutgefäße	Blutgefäße % der Fläche	Blutgefäße Mittelwert der Durchmesser	Blutgefäße Standard Abweichung	Blutgefäße max. Durchmesser	Blutgefäße min. Durchmesser	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Lymphgefäße	Lymphgefäße % der Fläche	Lymphgefäße Mittelwert der	Lymphgefäße Standard	Lymphgefäße max. Durchmesser	Lymphgefäße min. Durchmesser	Proliferationsindex
E0626-06	10	1	18	2	3	0	2	3	0	8	12.09	0.38	13.33	6.05	33.10	7.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0825-06	21	2	69	2	0	0	0	0	0	5	7.76	0.11	9.85	3.88	18.77	3.25	3.69	0.06	10.70	3.61	17.37	7.03	
E0039-07	9	1	66	1	4	0	1	3	0	9	12.14	21.01	82.49	94.89	410.24	5.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0559-07	6	2	23	3	1	1	1	3	0	0	7.34	1.72	27.48	26.28	88.67	4.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0576-07	6	1	43	3	1	1	1	3	0	23	3.09	0.20	20.39	14.76	52.13	6.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0609-07	9	2	53	1	4	0	1	3	0	9	10.17	3.33	42.55	39.64	177.87	8.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00
E0754-07	6	1	23	2	0	1	1	2	0	3	10.62	0.62	16.75	11.83	44.78	4.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0830-07	6	1	36	2	1	2	2	3	0	125	10.16	1.17	21.37	26.44	123.85	5.39	6.20	0.63	20.32	15.62	61.41	7.05	3.00
E0873-07	9	1	45	1	4	0	1	3	0	3	14.27	1.27	21.42	13.13	65.53	9.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.00
E1085-07	9	1	53	1	4	0	2	3	0	0	28.13	4.11	21.88	25.95	125.39	4.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00
E1111-07	21	1	16	2	0	0	0	0	0	3	17.18	0.16	8.23	3.85	18.40	3.14	6.68	0.18	13.35	6.80	31.82	5.80	
E1115-07	6	1	46	1	1	3	3	3	0	0	12.34	0.27	11.86	9.00	45.07	4.76	4.41	0.14	12.78	4.91	25.67	9.18	9.00
E1244-07	9	1	60	1	4	0	1	3	0	5	8.99	0.30	11.66	8.51	32.47	4.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E1314-07	6	1	42	3	1	1	1	3	0	0	17.08	1.02	18.24	14.37	60.55	6.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
E1410-07	9	2	59	1	4	0	2	3	0	0	28.73	1.38	18.05	10.15	60.95	6.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00
E0009-08	9	1	37	1	4	0	1	3	0	0	22.73	0.34	9.74	5.97	26.69	0.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.00
E0228-08	9	1	28	1	4	0	2	2	0	10	18.83	0.59	13.82	9.81	50.36	5.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00
E0301-08	9	2	54	1	4	0	3	0	0	3	9.45	2.43	30.67	30.49	103.09	6.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0327-08	9	1	58	1	4	0	2	3	0	4	17.69	1.93	24.53	16.05	84.74	9.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00
E0453-08	9	2	56	1	4	0	3	3	0	0	11.66	0.36	13.99	6.66	33.93	8.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0484-08	9	1	60	1	4	0	3	3	0	0	13.94	2.63	19.39	25.49	140.43	4.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Block	Tumortyp	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Grunderkrankung	Podoplanin Retikulär	Podoplanin Fibrillär	CD34 Retikulär	CD34 Fibrillär	Mastzell- dichte	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Blutgefäße	Blutgefäße % der Fläche	Blutgefäße Mittelwert der Durchmesser	Blutgefäße Standard Abweichung	Blutgefäße max. Durchmesser	Blutgefäße min. Durchmesser	Fläche (mm <sup>2</sup> ) Lymphgefäße	Lymphgefäße % der Fläche	Lymphgefäße Mittelwert der	Lymphgefäße Standard	Lymphgefäße max. Durchmesser	Lymphgefäße min. Durchmesser	Proliferationsindex
E0537-08	9	1	87	1	4	0	3	0	0	1	15.33	1.22	20.54	14.68	60.45	6.56	2.57	0.67	40.02	42.89	115.51	8.32	4.00
E0575-08	9	1	69	1	4	0	1	3	0	0	9.44	7.47	44.98	43.56	191.13	8.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
E0664-08	9	2	61	1	4	0	2	3	0	0	19.69	0.45	11.52	7.82	44.73	4.84	37.00	2.34	20.04	15.43	77.85	5.03	16.00
E0733-08	21	2	80	2	0	0	0	0	0	4	10.80	4.54	31.10	49.53	241.98	4.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
E0944-08	9	1	74	1	4	0	2	3	0	0	14.82	1.27	21.44	17.27	111.43	7.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00
E1000-08	9	2	74	1	4	0	3	3	0	0	13.77	6.62	44.00	48.28	222.80	4.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00

