

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. med. M. Glatzel

**Expression von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren in peripheren
Nervenscheidentumoren bei Neurofibromatose Typ I**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Judith Anne Carolin Beer
aus Bad Arolsen

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 12.5.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. C. Hagel

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. M. Glatzel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr.med. R. Friedrich

Inhaltsverzeichnis

1	Fragestellung	2
2	Einleitung	3
2.1	Neurofibromatose Typ 1	3
2.1.1	Klinische Manifestation	3
2.1.2	Genetischer Defekt	5
2.1.3	Periphere Nervenscheidentumore bei NF1	5
2.1.3.1	Dermale Neurofibrome	6
2.1.3.2	Plexiforme Neurofibrome	6
2.1.3.3	Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST)	7
2.1.4	Therapieoptionen.....	8
2.2	Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).....	9
2.3	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	10
2.4	Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, FGF-2).....	11
2.5	Angiogenese	13
3	Material und Methoden	16
3.1	Patienten und Tumormaterial	16
3.2	Reagenzien.....	16
3.3	Lösungen und Puffer	17
3.4	Geräte und Verbrauchsmaterial	18
3.5	Immunhistochemische Färbungen am in Paraffin eingebetteten Gewebe.....	18
3.5.1	Durchführung der Färbungen	18
3.5.2	Färbeprotokolle 1-4: Nachweis von EGFR, VEGF, bFGF und von-Willebrand-Faktor/ Faktor VIII-assoziiertes Antigen im Paraffin-Material	19
3.6	Immunhistochemische Färbungen und Ermittlung der Gefäßdichte.....	20
3.7	Statistische Auswertung	21
4	Ergebnisse	22
4.1.1	Färbung von VEGF	22
4.1.2	Färbung von bFGF	25
4.1.3	Färbung von EGFR	26
4.2	Gefäßdichte.....	30
4.3	Tumorlokalisation.....	31
5	Diskussion	32
5.1	Ausblick.....	36

6	Zusammenfassung.....	37
7	Literatur.....	38
8	Danksagung.....	48
9	Lebenslauf.....	48
10	Eidstattliche Versicherung.....	49
11	Anhang.....	50
11.1	Abkürzungsverzeichnis.....	50
11.2	Tabellenverzeichnis.....	50
11.3	Abbildungsverzeichnis.....	50
11.4	Diagrammverzeichnis.....	51

1 Fragestellung

Bei der Neurofibromatose Typ 1 handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte neurokutane Erkrankung mit einer weltweiten Inzidenz von 1: 2.500-3.500 Lebendgeburten. Die Betroffenen leiden unter dem Auftreten multipler Symptome, wie zum Beispiel der Ausbildung von Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems sowie kutanen, skelettalen, endokrinen und kardiovaskulären pathologischen Veränderungen, bis hin zu mentalen Auffälligkeiten. Eines der Hauptmerkmale der Erkrankung bilden die Tumoren der peripheren Nervenscheiden, welche sowohl benigne als auch maligne sein können. Die operative Entfernung dieser Neubildungen gestaltet sich mitunter schwierig, da es sich um sehr gefäßreiche Gebilde handeln kann. In präklinischen Studien werden bereits Therapieoptionen durch Inhibitoren der Neoangiogenese an diesen Tumorformen untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, unter der Annahme, dass maligne Tumoren gefäßreicher sind als benigne und mehr Angiogenesefaktoren exprimieren, zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, bzw. deren Rezeptoren (bFGF, VEGF, EGFR) und der Gefäßdichte des Tumormaterials besteht. Weiterhin sollten eventuell vorhandene Korrelationen zwischen den einzelnen Wachstumsfaktoren/ -rezeptoren untereinander im Tumorgewebe aufgedeckt werden, da zwar die Expression dieser Faktoren in der Literatur bereits beschrieben wurde, aber kaum Daten bezüglich ihrer Wechselbeziehung vorliegen.

Es wurden unterschiedliche Tumortypen, welche dermale, dermal/diffuse und plexiforme Neurofibrome sowie MPNSTs einbezogen, aus einem 58 Patienten umfassenden Kollektiv mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren untersucht und die Wachstumsfaktor- bzw. Rezeptorexpression sowie die Gefäßdichte des jeweiligen Präparates ermittelt und miteinander verglichen. Außerdem wurde die Gefäßdichte unterschiedlicher Tumortypen untereinander verglichen.

2 Einleitung

2.1 Neurofibromatose Typ 1

Bei der Neurofibromatose Typ 1 (NF1), vormals nach ihrem Erstbeschreiber auch Morbus von Recklinghausen genannt (von Recklinghausen 1882), handelt es sich um eine hereditäre Erkrankung, die mit einem weiten Spektrum an kutanen, ossären, neurologischen und kardiovaskulären Symptomen sowie im Besonderen mit der Prädisposition zur Entstehung benigner und maligner Tumoren des Nervensystems einhergeht. Die NF1 wird autosomal-dominant mit vollständiger Penetranz, aber variabler Expressivität vererbt (Carey und Viskochil 1999). In ca. 50% der Fälle ist eine Neumutation ursächlich für die Krankheitsentstehung (Packer et al. 2002), wobei diese hohe Rate auf die Größe des NF1-Gens und der damit verbundenen großen Angriffsfläche für Mutationen zurückführbar sein könnte (Friedman 1999). Die Inzidenz der Neurofibromatose Typ1 wird in der Literatur mit 1:2.500 bis 1:3.500 Lebendgeburten angegeben (Huson et al. 1988, Friedman 1999, Lammert et al. 2005, Ferner et al. 2007).

2.1.1 Klinische Manifestation

Klinisch diagnostizieren lässt sich die NF1 anhand der im *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement* 1988 festgelegten Kriterien (NIH 1988), von denen mindestens 2 erfüllt sein müssen, um einem Patienten die Diagnose NF1 zuordnen zu können:

1. Sechs oder mehr Café-au-lait-Flecken, im Durchmesser größer als 5 mm präpubertär, bzw. größer 15 mm postpubertär
2. Zwei oder mehr kutane Neurofibrome oder ein plexiformes Neurofibrom
3. Axilläres und/oder inguinales freckling (Sommersprossen)
4. Gliom des N. opticus
5. Zwei oder mehr Hamartome der Iris (Lisch-Knötchen)
6. Eine für die Erkrankung spezifische skelettale Auffälligkeit, wie die Dysplasie des Keilbeinflügels oder eine Ausdünnung der Corticalis der langen Röhrenknochen
7. Ein Verwandter ersten Grades mit NF1, diagnostiziert nach den oben genannten Kriterien.

Die meisten Merkmale der NF1 treten altersabhängig auf (vgl. Tabelle 1) und aufgrund der variablen Expressivität der Erkrankung kann es selbst intrafamiliär zu unterschiedlichen Ausprägungen der Symptome kommen (Carey und Viskochil 1999, Carroll und Ratner 2008). Zu den klinischen Manifestationen der NF1 gehören vor allem Tumore des peripheren Nervensystems, die Neurofibrome, welche das Hauptmerkmal der Erkrankung darstellen und

vornehmlich benigne sind, aber maligne entarten können. Weitere kutane Auffälligkeiten sind Café-au-lait Flecken, auffällige intertriginöse Sommersprossen (freckling) und Irishamartome (sogenannte Lisch-Knötchen) (vgl. Tabelle 1).

Des Weiteren treten Tumoren des zentralen Nervensystems auf, allen voran Gliome, wobei es sich meist um Optikusgliome (pilozytische Astrozytome, WHO Grad I) handelt, welche bei 15 % der kindlichen NF1-Patienten vorkommen und bevorzugt in der ersten Lebensdekade entstehen (Williams et al. 2009). Bei NF1-Patienten findet man häufig skelettale Auffälligkeiten, wie Minderwuchs, Skoliosen, Pseudarthrosen sowie eine Ausdünnung der langen Röhrenknochen mit Bevorzugung der Tibia, Makrocephalie oder die Dysplasie eines Keilbeinflügels. Weiterhin kommt es bei NF1-Erkrankten gehäuft zum Auftreten neurologischer Symptome, wie einer Epilepsie, einer mentalen Retardierung, zu Aufmerksamkeitsstörungen und Lernschwäche (Mautner et al. 2002, Ferner et al. 2007). Außerdem besteht bei betroffenen Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung neuroendokriner (besonders Phäochromozytom) sowie hämatopoietischer Tumoren (hier vor allem die chronisch myeloische Leukämie) und kardiovaskulärer Auffälligkeiten (Hypertonus, Aneurysmen) (Ferner et al. 2007, Williams et al. 2009).

Tabelle 1: Häufigkeiten und Alter bei Auftreten der klinischen Hauptmerkmale der NF1 (Ferner et al. 2007)

Klinische Manifestation	Häufigkeit (%)	Alter bei Auftreten
Café-au-lait Flecken	> 99	Geburt – 12
Freckling	85	3 – Adoleszenz
Irishamartome	90 – 95	> 3
Dermale Neurofibrome	> 99	> 7 (gewöhnlich späte Adoleszenz)
Plexiforme Neurofibrome	30 (klinisch) - 50 (Bildgebung)	Geburt - 18
MPNSTS	2 - 5	5 - 75
Optikusgliom	15	Geburt - 30
Keilbeinflügeldysplasie	<1	Kongenital
Scoliose	10	Geburt - 18
Schwere mentale Retardierung (IQ<70)	4 - 8	Geburt
Lernschwierigkeiten	30 - 60	Geburt
Epilepsie	6 - 7	Lebenslang
Phäochromozytom	2	> 10

2.1.2 Genetischer Defekt

Der Basisdefekt bei der Neurofibromatose Typ 1 wird durch die Mutation eines Tumorsuppressorgens, des NF1-Gens verursacht, welches beim Menschen auf dem Chromosom 17q11.2 lokalisiert ist und eine Größe von 350kB hat (Cawthon et al. 1990, Viskochil et al. 1990, Wallace et al. 1990). Es erstreckt sich über 60 Exons. Das NF1-Genprodukt Neurofibromin, ein 2818 Aminosäuren umfassendes Protein (De Clue et al. 1991, Carey und Viskochil 1999), wirkt als Tumorsuppressor, indem es die RAS-Signaltransduktion durch Spaltung der aktiven RAS-Form (RAS-GTP) in die inaktive Form (RAS-GDP) negativ reguliert (Viskochil et al. 1999, Packer et al. 2002).

Durch einen Mangel an funktionierendem Neurofibromin bleiben die RAS-Proteine in ihrer die Zellteilung und -differenzierung fördernden Wirkung aktiv. Bei Neurofibromin handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes, zytoplasmatisches Protein, mit einer hohen Expression in Nervengewebe und Schwannzellen (Gottfried et al. 2010).

Bei NF1-Patienten tragen alle Körperzellen eine Mutation des NF1-Gens, aber erst durch den Verlust des zweiten intakten Allels durch eine somatische Mutation kommt es zur Ausbildung von Neurofibromen (*two hit* Hypothese) (Kluwe et al. 1999). Der Verlust beider Neurofibrominallele (LOH= *loss of heterozygosity*) konnte in Schwannzellen, welche sowohl aus Neurofibromen, als auch MPNSTs gewonnen wurden, nachgewiesen werden und damit die Schwannzelle als Tumorzelle identifiziert werden (Kluwe et al. 1999). Es ist bislang unklar, welche Art von Zelle der Schwannzellen, ob Vorläufer- oder reife Zelle, den Ursprung der Tumorbildung bildet. Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Nf^{-/-} Schwannzelle als Auslöser bei der Tumorentstehung ein Umfeld verschiedener Zellen benötigt, welche ein inaktives Nf-Allel besitzen. Des Weiteren scheinen mehrere Wachstumsfaktoren und –rezeptoren an der Neurofibrombildung beteiligt zu sein (Carroll und Ratner 2008).

2.1.3 Periphere Nervenscheidentumore bei NF1

Neurofibrome stellen das Kennzeichen der Neurofibromatose Typ 1 dar und sind gutartige periphere Nervenscheidentumoren, die kutan oder subkutan oder netz- bzw. knotenartig entlang von Nervensträngen auftreten können (Ferner et al. 2007). Neurofibrome bestehen – wie andere Tumore auch- aus transformierten und untransformierten Zellen, wobei Schwannzellen mit bis zu 80% den Hauptbestandteil der Neurofibrome ausmachen (Kluwe et al. 1999, Muir et al. 2001). Des Weiteren finden sich Fibroblasten, Perineuralzellen, Mastzellen, Endothelzellen sowie Leukozyten, die in eine Matrix aus Kollagenfasern und Mucosubstanzen eingebettet sind (Packer et al. 2002, Gottfried et al. 2010). Obwohl es unterschiedliche Subtypen der Neurofibrome mit jeweils typischen klinischen Symptomen

gibt, ist die zelluläre Zusammensetzung bei allen Formen gleich (Carroll und Ratner 2008). Die Schwannzellen im Tumorgewebe zeigen gegenüber gesunden Zellen Auffälligkeiten, indem sie die Basalmembran durchbrechen und die Gefäßneubildung (Angiogenese) fördern können (Sheela et al. 1990, Carroll und Ratner 2008). Aus plexiformen Neurofibromen können durch Dedifferenzierung maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNSTs) entstehen.

2.1.3.1 Dermale Neurofibrome

Die häufigste Tumorform bei NF1-Erkrankten stellen die dermalen Neurofibrome dar, welche bei mehr als 90% der Patienten vorkommen. Die Anzahl der Hauttumoren kann von Patient zu Patient stark variieren, von einigen wenigen bis hin zu hunderten am gesamten Körper. Sie entstehen überwiegend präpubertär, können im Erwachsenenalter jedoch weiter an Anzahl und Größe zunehmen, wobei sich Phasen von raschem Wachstum und Ruhephasen abwechseln können (Packer et al. 2002). Als Begleitsymptom klagen Patienten gelegentlich über Pruritus. Dermale Neurofibrome gehen nicht in eine maligne Form über. Die chirurgische Resektion ist das Mittel der Wahl, zum Beispiel aus kosmetischen Gründen (Williams et al. 2009).

2.1.3.2 Plexiforme Neurofibrome

Bei ca. 60% der NF1-Patienten treten plexiforme Neurofibrome auf (Kissil et al. 2009), welche meist congenital bestehen und oft mehrere Nervenstränge netzartig betreffen (Packer et al. 2002). Diese Tumoren können jederzeit wachsen, wobei eine vermehrte Größenzunahme vornehmlich in der frühen Kindheit sowie in Phasen hormoneller Umstellung, wie zum Beispiel während einer Schwangerschaft zu beobachten ist. In diesen Zeiten kann es auch zu einer Entstehung neuer Tumoren dieser Art kommen (Korf 1999). Plexiforme Neurofibrome können im gesamten Körper sowohl an oberflächlich liegenden, wie auch sehr tiefen Nerven, beispielsweise im Gastrointestinaltrakt, entstehen. Besonders hervorzuheben sind dabei größere Nervenstränge, wie der Plexus brachialis oder lumbalis, aber auch die Gesichtsregion, wobei hier am häufigsten der Nervus trigeminus betroffen ist. Es kann zu einem Einbruch des Tumors in die Orbita kommen, besonders bei einer vorhandenen Dysplasie des Keilbeinflügels. Die über dem plexiformen Neurofibrom liegende Haut kann durch die Tumormasse vorgewölbt sein und/oder eine Hyperpigmentierung aufweisen. Hierbei ist die Diagnose durch klinische Untersuchung allein zu stellen, bei tieferliegenden oder auch asymptomatischen plexiformen Neurofibromen hat sich das MRT als hilfreich erwiesen (Korf 1999). Klinische Relevanz besteht, wenn es durch Kompression des Nerven zu neurologischen Defiziten oder Schmerzen kommt. Nicht nur die flächenhafte

Ausbreitung und das netzartige Wachstumsmuster der plexiformen Neurofibrome, sondern auch ihr Gefäßreichtum sind der Grund dafür, dass eine chirurgische Entfernung dieser Tumortypen Schwierigkeiten birgt (Ferner et al. 2007). Bei den plexiformen Neurofibromen besteht die Möglichkeit zur malignen Entartung in maligne periphere Nervenscheidentumoren.

2.1.3.3 Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST)

Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) sind aggressive Weichteilsarkome, welche sporadisch selten vorkommen. Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 hingegen haben ein Lebenszeitrisiko von 8-13% einen MPNST zu entwickeln (Evans et al. 2002). Meist gehen die malignen Tumore von einem plexiformen Neurofibrom aus (Woodruff 1999, Kissil et al. 2010) und treten gewöhnlich in der 3. bis 6. Lebensdekade auf (Bodempudi et al. 2009). Die bei NF1-Patienten auftretenden MPNSTs entwickeln sich deutlich früher als die sporadischen (Hagel et al. 2007). Molekulargenetisch scheint bei der malignen Tumorentwicklung sowohl ein Verlust beider NF1-, als auch weiterer Tumorsuppressorgene (beispielsweise des TP53- Gens) und eine Ral-Überaktivierung (Ras-like protein) eine Rolle spielen zu können (Bodempudi et al. 2009). Ebenfalls wird vermutet, dass beim Übergang von plexiformen Neurofibromen in eine maligne Form mehrere Wachstumsfaktoren und ihre –rezeptoren, wie zum Beispiel EGFR beteiligt sein könnten (Carroll und Ratner 2008). Klinisch verdächtig auf eine solche maligne Entartung sind persistierender Schmerz, schnelle Größenzunahme, neu entstehende neurologische Defizite sowie eine Veränderung in der Textur des Gewebes. MPNSTs entstehen bevorzugt am Rumpf, seltener an Extremitäten und Kopf und zeigen sich bei Diagnose häufig bereits größer als 5 cm im Durchmesser (Woodruff 1999). Die Prognose der betroffenen Patienten ist schlecht, da eine kurable Therapie mit weiträumiger Exzision des malignen Gewebes im Gesunden oft nicht möglich ist und die Tumore eine schnelle Metastasierung zeigen, zum Beispiel in die Lunge (Rasmussen et al. 2001; Evans et al. 2002). Die 5–Jahres–Überlebensrate wird lediglich mit 21% angegeben (Holtkamp et al. 2007), womit MPNSTs die Hauptursache für eine Reduktion der Lebenserwartung bei NF1-Patienten darstellen.

2.1.4 Therapieoptionen

Eine kausale Therapie der Neurofibromatose ist derzeit nicht möglich, sodass sich die Behandlungsbemühungen auf die Vermeidung, bzw. Therapie von Komplikationen erstrecken. Die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten von peripheren Nerventumoren reichen von Beobachtung über Biopsieentnahme und chirurgischer Tumorentfernung bis hin zu Strahlen- und Chemotherapie. Besonders die chirurgische Resektion von Tumoren hat dabei einen hohen Stellenwert. Dermale Neurofibrome werden unter anderem aus kosmetischen Gründen entfernt, plexiforme Neurofibrome zum Beispiel, weil sie Nerven oder Organe komprimieren und Schmerzen oder neurologische Defizite verursachen. Das Mikromilieu der NF1-assoziierten Tumore, welches Mastzellen, tumorbedingte Fibrose und Neoangiogenese umfasst, spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum. Bei dermalen Neurofibromen eingesetzte Mastzellstabilisatoren wie Ketotifen erbrachten in klinischen Studien jedoch keine signifikante Besserung von Pruritus, Blutungsrisiko bei chirurgischer Resektion oder einen Rückgang der Tumorgröße (Riccardi 1993).

RAS-Inhibitoren, wie Sirolimus/ Rapamycin als Inhibitor der mTOR-Signalkaskade finden Anwendung bei plexiformen Neurofibromen und MPNSTs und konnten in Studien die Proliferation sowie die Angiogenese hemmen ohne die Apoptoserate zu erhöhen oder eine toxische Systemwirkung zu induzieren (Gottfried et al. 2010). Eine weitere klinische Studie befasst sich derzeit mit der Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD-001 bei progressiven Gliomen (Kissil et al. 2010). Außerdem konnten in einer Phase 1 Studie bei der Behandlung plexiformer Neurofibrome mit Thalidomid Erfolge im Sinne einer Tumorgrößenreduktion erzielt werden (Gupta et al. 2003). Präklinische Studien konzentrieren sich unter anderem auf den RAS-Inhibitor Farnesylthiosalicylsäure, wo der Wirkstoff in MPNST-Zelllinien zu einem verminderten Tumorwachstum führte (Barkan et al. 2006).

Ramibizumab als monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A wird bezüglich seiner Wirksamkeit bei dermalen Neurofibromen getestet, wo er zum einen lokal in die Tumore injiziert, als auch systemisch angewendet wird und eine Hemmung der Vaskularisation bewirken soll (Kissil et al. 2010). Auch Cediranib, ein molekularer Inhibitor des VEGFR und andere Thyrosinkinase-Hemmer werden derzeit in klinischen Studien an NF1-Patienten getestet und führten bei einigen Betroffenen zu einem Stillstand der Krankheitssymptome (Huson et al. 2010).

Des Weiteren erfolgen Studien mit EGFR-Antagonisten (Bsp. Cetuximab), welche sich im Mausmodell und in vitro bei der Erprobung an MPNST-Zelllinien bereits bewährt haben, indem sie unter anderem zu einer Abnahme der Tumorgröße führten (Wu et al. 2006).

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren und –rezeptoren näher beschrieben. Zusätzlich findet sich eine erläuternde Übersicht in Tabelle 2.

2.2 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Beim *epidermal growth factor* (EGF) handelt es sich um ein aus 53 Aminosäuren bestehendes Peptid mit einem Molekulargewicht von 6000 Dalton. Das für den Wachstumsfaktor kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 4, das für den Rezeptor (EGFR) codierende Gen auf Chromosom 7 (Weimann und Kiess 1991). Der EGFR ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kD und stellt eine Tyrosinkinase dar. Die EGF- Rezeptorfamilie, auch bekannt als ErbB-Tyrosinkinase-rezeptoren, umfasst insgesamt 4 unterschiedliche Rezeptoren: den Epidermal Growth Factor Receptor (erbB1/EGFR/HER1), erbB2 (HER2/neu), erbB3 (HER3) und erbB4 (HER4). Insgesamt sind bislang 6 verschiedene Liganden bekannt, wobei EGF, *transforming growth factor β* (TGF β) und Amphiregulin an EGFR binden (Dutta und Maity 2007).

Der Rezeptor besteht aus drei Segmenten: einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer transmembranösen Verankerungsdomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Der EGF-Rezeptor findet sich auf der Oberfläche nahezu aller Säugetierzellen (Carpenter und Cohen 1990), wobei pro Zelle etwa 20000-50000 dieser Rezeptoren vorkommen. Als Antwort auf die Bindung mit einem Liganden dimerisiert der Rezeptor mit einem weiteren EGFR-Monomer, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, welche die Tyrosinkinasen aktiviert. Der Rezeptor wird mitsamt dem gebundenen EGF internalisiert und danach abgebaut. Die Autophosphorylierung des EGFR stimuliert über Adapterproteine mehrere intrazelluläre Signalkaskaden, wie die Proteinkinase C sowie die Phosphatidylinositol-3-kinase (Carpenter und Cohen 1990). Es kommt zu einer erhöhten Aktivität und Expression von Transkriptionsfaktoren und somit zu einer Steigerung der Tumorzellproliferation, der Angiogenese, der Migration, der Adhäsion und einer Hemmung der Apoptose (Dutta und Maity 2007). Die Funktion von EGFR besteht in der Förderung der Proliferation von Epithelien und epidermalen Zellen. EGF findet sich in Körperflüssigkeiten, hauptsächlich Speichel und Urin, des Weiteren in Thrombozyten. Es unterstützt in normalem Gewebe die Wundheilung (Weimann und Kiess 1991). Erhöhte EGFR-Spiegel oder mutierte

Formen des Rezeptors wurden bei einer Reihe unterschiedlicher Krebsarten gefunden, wie Mamma-Ca, Colon-Ca, Prostata-Ca und Glioblastomen (Ling et al. 2005). EGFR beeinflusst bei diesen Tumoren über die Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese auch die Metastasierung und führt zu einer gewissen Resistenz gegenüber Radiatio und Chemotherapie (Wu et al. 2006, Dutta und Maity 2007, Lichtenberger et al. 2010). Im Zusammenhang mit der Neurofibromatose Typ 1 sind in vitro Experimente interessant, nach denen eine Überexpression von EGFR und eine Aktivierung mittels EGF zu einer Proliferation von Neurofibromin-negativen Schwannzellen führt, ebenso wie von Zellen, die aus MPNSTs stammen (Ling et al. 2005, Bodempudi et al. 2009). Allerdings lässt sich eine Überexpression von EGF in Neurofibromen nicht nachweisen (Mashour et al. 2004). Durch eine Überexpression von EGFR können im Modell Tumoren induziert werden, welche von den Schwannzellen ausgehen und charakteristisch für die NF1 sind, obwohl normale Schwannzellen EGFR nicht exprimieren und auf EGF als Ligand nicht reagieren (DeClue 2000, Thomas und DeVries 2007). Die EGFR-Expression in Schwannzellen führt zu einem tumorspezifischen Phänotyp der Zellen sowie zur Mastzellakkumulation und Fibrose, typische Erscheinungen in Neurofibromen (Li et al. 2002, Ling et al. 2005, Wu et al. 2006). Mashour et al. (2004) konnten keine Erhöhung von EGFR im Serum von NF1-Erkrankten als diagnostischen Marker nachweisen.

EGF führt in verschiedenen Zelllinien zur Expression von VEGF und umgekehrt führt die pharmakologische Hemmung von EGFR zu einer verminderten VEGF-Expression sowie Angiogenese (Dutta und Maity 2007).

2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Bei dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF), früher auch als *vascular permeability factor* (VPF) bezeichnet, handelt es sich um ein heparinbindendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45kDa (Carmeliet 2005). Das für den Wachstumsfaktor codierende Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 6p21.3. Die VEGF-Familie umfasst mehrere Faktoren, wie VEGF-A (im Folgenden als VEGF bezeichnet), *placenta growth factor* (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und zwei VEGF ähnliche Proteine (Ferrara 2004). VEGF besitzt mehrere Isoformen (VEGF121, VEGF165, VEGF189 und VEGF206), die durch alternatives Spleißen entstehen und von denen VEGF165 die häufigste Form darstellt. Diese Isoformen besitzen bis auf VEGF121 alle eine Heparinbindungsdomäne, unterscheiden sich allerdings in ihrer Bindungsfähigkeit an Heparin und Heparansulfat (Cohen 1995). Im Gegensatz zu VEGF121, bei dem es sich um eine lösliche Variante handelt, bleiben VEGF189 und VEGF206 an der Zelloberfläche gebunden. VEGF165 kommt sowohl

in löslicher, als auch in gebundener Form vor (Ferrara 2004). VEGF ist ein Hauptmediator der Gefäßneubildung und zwar sowohl in gesundem Gewebe, zum Beispiel bei der embryonalen Gefäßentwicklung und der Wundheilung, als auch in pathologischem Gewebe, wo die Expression durch Hypoxie, Hypoglykämie oder durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden kann (Angelov et al. 1999, Carmeliet 2005). Gewebhypoxie führt zu einer vermehrten Produktion und Sekretion von VEGF, was zusammen mit der Bindung von VEGF an seine Rezeptoren eine Grundlage zur Angiogenese bildet. VEGF bindet an Tyrosinkinasegekoppelte Membranrezeptoren auf ruhenden Endothelzellen und regt diese zur Sekretion von Proteasen an, die eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwände herbeiführen. Es kommt zur Auflösung der extrazellulären Matrix und der vaskulären Basalmembran. VEGF führt so zu Fenestrations im Endothel (Angelov et al. 1999, Ferrara 2004), was ursächlich für ein begleitendes Tumorödem ist (Angelov et al. 1999) sowie die Hypoxie wiederum verstärkt und damit erneut die Expression von VEGF stimuliert (Carmeliet 2005). In menschlichen Endothelzellen induziert VEGF die Expression der Apoptose hemmenden Proteine Bcl-2 und A-1 (Ferrara 2004) und sorgt somit für ein längeres Überleben der Zellen. Weiterhin ist VEGF an der Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen beteiligt. Als Rezeptoren für den Wachstumsfaktor fungieren die Tyrosinkinase-Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und KDR (VEGFR-2, Flk-1), die auf Endothelzellen exprimiert werden sowie VEGFR-3 (Flt-3), welcher hingegen fast ausschließlich im lymphatischen Endothel lokalisiert ist (Veikkola et al 2000). VEGFR-1 findet sich auch auf weiteren Zellarten, wie etwa Makrophagen, Neutrophilen und anderen hämatopoietischen Vorläuferzellen. VEGF bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2B. VEGF-C und VEGF-D präferieren VEGFR-3, können aber auch mit VEGFR-2 interagieren (Veikkola et al. 2000). Zusätzlich zu diesen spezifischen Rezeptoren reagiert VEGF auch mit den so genannten Neuropilinen (NP), einer Familie von Corezeptoren (Ferrara 2004). Die Schlüsselrolle bei der Angiogenese spielt der VEGFR-2, indem er chemotaktische, anti-apoptische und mitogene Signale in den Endothelzellen vermittelt.

VEGF ist auch wesentlich für die embryonale Vaskulogenese verantwortlich. Bei Inaktivität eines Allels kommt es zum Absterben des Embryos (Ferrara 2004).

2.4 Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, FGF-2)

Die strukturell verwandte Familie der *fibroblast growth factors* (FGFs) spielt als parakrin wirkende Faktoren eine große Rolle in der Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen, im Besonderen während der Embryonalentwicklung. Im adulten Organismus haben sie bei der Homeostase, der Wundheilung sowie in der neuronalen Signaltransduktion im

zentralen und peripheren Nervensystem eine wichtige Funktion (Ornitz und Itoh 2001). Eine Unterbrechung der endothelialen FGF-Funktion führt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität (Murakami et al. 2008). Die beiden am besten charakterisierten Faktoren dieser Gruppe besitzen unterschiedliche chemische Eigenschaften, da der eine sauer ist (aFGF, FGF-1) und der andere basisch (bFGF, FGF-2). Beide besitzen die Eigenschaft an Heparin zu binden, weshalb sie auch *heparin binding growth factor alpha* und *beta* genannt werden. Die Familie der FGFs umfasst insgesamt 22 Mitglieder (Murakami et al. 2008), wobei es sich neben den bereits erwähnten hierbei zum Beispiel um die Onkogene FGF-3 (Int2) und FGF-4 (hst/Kaposi) handelt, weiterhin FGF-5, FGF-6, FGF-7 (KGF), FGF-8 (AIGF), FGF-9 (GAF) und FGF-10. Die einzelnen Faktoren haben eine ähnliche Genstruktur, weisen auf der Proteinebene eine 13-71%ige Homologie auf und haben ein Molekulargewicht zwischen 17 und 34kDa. Der Effekt an der Zielzelle wird über an der Zelloberfläche gebundene Tyrosinkinaserzeptoren vermittelt, wovon bislang vier verschiedene bekannt sind, FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 (Murakami et al. 2008). Durch eine Bindung an Heparin kann eine Erhöhung der mitogenen Aktivität festgestellt werden. Die genetische Information für den bFGF liegt beim Menschen auf Chromosom 4q26-27 (Ornitz und Itoh 2001). Der basische FGF kommt ubiquitär in vielen Geweben vor (Abraham et al. 1986) und liegt in vier Isoformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten vor. Den verschiedenen Formen des bFGF konnten unterschiedliche Zellfunktionen und –lokalisationen zugeordnet werden. Die Form mit dem leichtesten Molekulargewicht (18 kD) wird von den Zellen freigesetzt und stimuliert durch Bindung an Oberflächenrezeptoren die Migration und Proliferation der Zellen sowie eine negative Regulation der FGF-Rezeptordichte. Die schwereren Isoformen (22, 22.5 und 24kD) konnten im Zellkern nachgewiesen werden und modulieren die Zellproliferation (Seghezzi et al. 1998). Die biologische Bedeutung des bFGF liegt daher hauptsächlich in der Induktion des Blutgefäßwachstums sowie in der Wachstumsförderung von Neuronen während der Entwicklung, da der bFGF in der embryonalen Entwicklung die Formation von mesodermalen und neuroektodermalen Zellen, wie Fibroblasten und Endothelzellen induziert und deren Differenzierung und Proliferation moduliert. Somit führt bFGF über einen Einfluss auf die DNA-Synthese zur Differenzierung unterschiedlicher Gewebe und kann durch seine chemotaktische Wirkung auf Gefäßendothelzellen die Zellwanderung beeinflussen. Bezogen auf diese Arbeit ist hervorzuheben, dass FGF als hochpotenter parakriner Wachstumsfaktor für Gefäßendothelzellen bei Neurofibromen die Tumorangiogenese fördert (Gesundheit et al. 2010). Um eine vergleichbare Endothelzellproliferation zu induzieren, ist eine deutlich kleinere Menge FGF, als zum Beispiel EGF notwendig.

Tabelle 2: Angiogenesefaktoren /-inhibitoren (aus Conway et al. 2001).

Activators	Function	Inhibitors	Function
VEGF, VEGF-C, PlGF and homologues ^b	Stimulate angiogenesis, permeability; VEGF-C: stimulates lymphangiogenesis; PlGF: role in pathologic angiogenesis	VEGFR-1, soluble VEGFR-1 and neuropilin-1 (NP-1)	Sink for VEGF, VEGF-B, PlGF (VEGFR-1) and for VEGF ₁₆₅ (NP-1)
VEGF receptors (VEGFR)	VEGFR-2: angiogenic signaling receptor; VEGFR-3: (lymph)angiogenic signaling receptor; neuropilin-1 (NP-1): binds specifically VEGF ₁₆₅ ; coreceptor of VEGFR-2	Angiopoietin-2	Antagonist of Ang1: induces vessel regression in the absence of angiogenic signals
FGF, HGF, MCP-1	Stimulate angiogenesis (FGF, HGF) and arteriogenesis (FGF, MCP-1)	Endostatin	Fragment of type XVIII collagen; inhibits endothelial survival and migration

2.5 Angiogenese

Im Gegensatz zur Vaskulogenese, bei der es sich um die Neuentstehung von primären Gefäßen während der Embryogenese handelt, indem sich Endothelzellen aus Angioblasten, multipotenten mesenchymalen Vorläuferzellen, differenzieren, bezeichnet man als Angiogenese die Entstehung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen durch aussprossende Endothelzellen (Conway et al. 2001). Um über eine gewisse Größe hinaus wachsen zu können, muß in einem mehrzelligen Organismus Angiogenese stattfinden. In gesundem Gewebe besteht normalerweise ein Gleichgewicht von Angiogenese fördernden und hemmenden Faktoren. Im Tumorgewebe kann es jedoch durch zwei Prinzipien zu einer erhöhten Gefäßneubildung kommen, entweder durch eine gesteigerte Expression angiogener Faktoren, wie VEGF, oder durch eine Hemmung inhibierender Faktoren, wie zum Beispiel Endostatin oder Angiostatin (Folkman 2002, Carmeliet und Jain 2000). Tumorzellen sezernieren verschiedene Angiogenesefaktoren, darunter VEGF, FGF, *placenta-like growth factor* (PlGF), *transforming growth factor-beta* (TGF-β), *transforming growth factor-alpha* (TGF-α), *insulin-like growth factor* (IGF) und *scatter factor/hepatocyte growth factor* (SF/HGF). Als Folge hiervon werden sie von inflammatorischen Zellen, wie Lymphozyten, Neutrophilen, Macrophagen und Mastzellen umgeben, welche zu einer weiteren Stimulation der Angiogenese führen (Crivellato et al. 2008). Eine physiologische Angiogenese findet während der Embryogenese, im Erwachsenenalter im Rahmen der Wundheilung sowie in den weiblichen Reproduktionsorganen während des Menstruationszyklus und bei einer Schwangerschaft in der Plazenta statt (Folkman und Shing 1992, Seghezzi et al. 1998). Ohne entsprechende Stimuli sind die Gefäße weitgehend ruhend (Folkman 2002). Nur ca. 0,01% der Endothelzellen sind während eines bestimmten Zeitpunktes in Teilung begriffen (Carmeliet und Jain 2000). Die Genese neuer Blutbahnen ist besonders bei Tumoren ab einer Größe von 1mm³ entscheidend, da nur durch diesen Prozess genügend Nährstoffe, Sauerstoff, Wachstumsfaktoren, etc. für die wachsende Tumormasse zur Verfügung gestellt werden

können. Tumorzellen, die mehr als 100-200 µm von dem nächsten Gefäß entfernt liegen, können nicht mehr per Diffusion mit Sauerstoff und überlebensnotwendigen Nährstoffen versorgt werden (Carmeliet und Jain 2000). Außerdem kann bei dieser Entfernung kein Abtransport von Stoffwechselprodukten allein durch Diffusion erfolgen. Der Tumor macht ab einer Größe von ca. 1-2mm³ einen so genannten *angiogenic switch* durch, womit der Übergang eines avaskulären Wachstums in den vaskulären Zustand des Tumors bezeichnet wird (Ferrara 2001, Folkman 2007). Dieser Übergang kann durch verschiedene Faktoren, wie Gewebhypoxie, Hypoglykämie, Aktivierung bestimmter Oncogene oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ausgelöst werden (Folkman 2002). Die Tumorzellen fungieren dabei als Trigger für die Angiogenese, indem sie angiogene Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF-A, exprimieren. Durch VEGF aktivierte Endothelzellen ändern ihre ursprüngliche Form und produzieren Proteasen und Kollagenasen, was zum Auflösen interzellulärer Kontakte und zum Abbau der Basalmembran durch proteolytische Enzyme (Metalloproteinasen) führt (Cross und Claesson-Welsh 2001). Den proliferierenden Endothelzellen wird so eine Einwanderung in das umliegende Gewebe ermöglicht. Durch die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße kommt es zu einem Austreten verschiedener Plasmaproteine, die dann als eine Art provisorische Matrix oder Leitstruktur dienen, auf der die Endothelzellen migrieren können (Conway et al. 2001). Die wandernden Endothelzellen bilden eine lose Aneinanderreihung, die so genannte Migrationssäule, und folgen einem angiogenen Stimulus. Die Migrationssäulen sprossen immer weiter aus und die enthaltenen Endothelzellen nehmen später wieder Zell-Zell-Kontakte auf, so dass sich letztendlich ein neues Gefäß mit einem Lumen formt (vgl. Abbildung 1). Physiologisch käme es durch eine Rekrutierung von Perizyten zur Bildung einer neuen Basalmembran und zur Reifung des neu gebildeten Gefäßes. Bei der Tumorangiogenese bleibt dieser Vorgang allerdings aus, woraus sich die weitgehend unreifen Gefäße in Tumoren erklären lassen (Carmeliet und Jain 2000, Liu et al. 2006), welche strukturelle Auffälligkeiten in Bezug auf die Gefäßgröße, -form sowie die normale Gefäßhierarchie mit Unterteilung in Arteriolen, Venolen und Kapillaren zeigen (Crivellato et al. 2008).

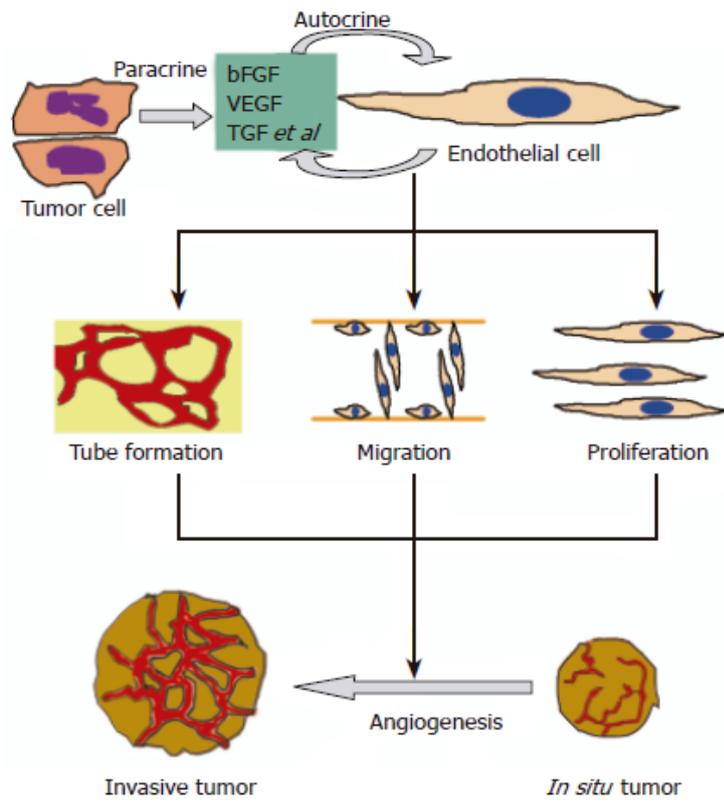


Abbildung 1: Angiogenese (aus Liu et al. 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Patienten und Tumormaterial

Es wurden Proben von 29 männlichen und 29 weiblichen NF1-Patienten hinsichtlich ihrer EGFR-, bFGF- und VEGF-Expression beurteilt. Das Patientenalter lag zum Zeitpunkt der Tumorentfernung zwischen 3 und 70 Jahren, das mittlere Alter bei 29,2 Jahren und das mittlere geschlechtsbezogene Alter bei 27,5 Jahren (Frauen), bzw. 30,8 Jahren (Männer). Alle Tumorproben wurden operativ in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gewonnen. Für die Routinediagnostik wurde das Tumorgewebe im Institut für Neuropathologie in Paraffinblöcke eingebettet und die Befundung anhand von histologischen Präparaten vorgenommen, welche nach HE, van Giesson und PAS gefärbt waren. Des Weiteren wurde routinemäßig die proliferative Aktivität mittels Markierung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 ermittelt und die Schwanzzellen mit S100-Protein Antikörpern dargestellt.

Für die vorliegende Untersuchung erfolgte eine Gruppierung der Tumortypen in 1 = dermal, 2 = dermal/diffus, 3 = plexiform und 4 = MPNST, wobei 18 Präparate der Gruppe 1, 9 Präparate der Gruppe 2, 22 Präparate der Gruppe 3 und 9 Präparate der Gruppe 4 entsprachen. Des Weiteren wurden die Tumoren ihrer Lokalisation nach in drei Gruppen unterteilt, wobei der Gruppe 1 = Extremitäten 23 Präparate zugeteilt werden konnten, der Gruppe 2 = Stamm 9 Präparate und der Gruppe 3 = Kopf/Hals 25 Präparate.

3.2 Reagenzien

- Antibody-Diluent Solution, (Zymed 00-3218) (Zymed Laboratories Inc, USA)
- Aquatex (Merck 1.08562) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Citronensäure-Monohydrat, (Merck 244) (Merck KGaA, Darmstadt)
- DAB (3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat) -Lösung (Sigma Chemical Co, USA)
- Ethanol (technisch, Apotheke UKE)
- Eukitt (Kindler, Freiburg)
- H₂O₂ (30%), (Merck 1.07210) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Mayers Hämalan, (Merck 09249) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Protease Type XXIV (Sigma 232-642-4) (Sigma Chemical Co., USA)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, (Merck 6448) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Triton-X-100 (Serva No. 37238) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Trizma Base (Sigma T-1503) (Sigma Chemical Co, USA)
- Xylol (SDS)

Immunreagenzien

- Faktor VIII assoziiertes Antigen Antikörper (A0082; Verdünnung 1:1000) (DakoCytomation, USA)
- Goat Serum (DAKO X0907) (DakoCytomation, USA)
- *Monoclonal Mouse Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor* Antikörper (Clone:H11, Code M3563; Verdünnung 1:200) (DakoCytomation, USA)
- *Mouse monoclonal IgG 2a Vascular Endothelial Growth Factor* Antikörper (C-1) (Sc7269; Verdünnung 1:200) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- *Rabbit polyclonal IgG Fibroblast Growth Factor-2* Antikörper (147) (Sc79; Verdünnung 1:50) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Strept ABComplex/HRP Duet (Mouse, Rabbit), (DAKO K0492) (DakoCytomation, USA) mit Reagens A : Streptavidin, Reagens B : Biotinylated Peroxidase (Horseradish) und Reagens C : Biotinylated Goat anti- Mouse/ Rabbit Ig

3.3 Lösungen und Puffer

- Wasserstoffperoxid für die Blockierung der endogenen Peroxidase:
10 ml H₂O₂ + 250 ml Ethanol 100% für 15 Minuten
- DAB- Stammlösung:
200 mg DAB ad 40 ml TBS/Triton, 2 mal filtrieren, Portionen a 1ml bei -20°C einfrieren
- DAB-Reaktionslösung:
1 ml TBS/Triton + 100 µl H₂O₂ mischen, davon 300 µl zu 9 ml TBS/Triton geben und 1 ml DAB-Stammlösung zusetzen, mischen
- Puffer zur Verdünnung der Antikörper:
Ziegenserum und TRIS-Puffer im Verhältnis 1:10 mischen, dann diesen Ansatz mit der Antibody-Diluent Solution 1:2 mischen
- TRIS-Lösung, 0,2 M:
121,14 g Trizma Base + Aqua bidestillata ad 5000 ml
- TRIS-Puffer (TRIS-BSS) 0,05 M; pH 7,6:
1225 ml TRIS-Lösung 0,2M + 207 ml HCl 1N + 42,5 g NaCl + Aqua bidestillata ad 5000 ml, Zugabe von 5 ml Triton-X-100 für Benutzung bei Paraffinschnitten
- 0,1 M Citronensäure: 21,01 g + 1000 ml Aqua bidestillata, bei 4°C aufbewahren
- 0,1 M Natriumcitrat: 29,41 g + 1000 ml Aqua bidestillata, bei 4°C aufbewahren

- Mikrowellen-Puffer: 9 ml Citronensäure + 41 ml Natriumcitrat + Aqua bidestillata ad 500 ml

3.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

- Brutschrank
- Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
- Feuchtkammer
- Mikrowelle (Sharp 750W)
- pH- Meter CG841 (Schott Instruments GmbH, Mainz)
- Schüttler Magnetic Stirrer Hi300N (Hama Instruments, Israel)
- Waage Mettler P1200N (Mettler-Toledo GmbH, Giessen)

- Deckgläser
- Filterpapier, Rundfilter (Whatman, USA)
- Glasküvetten, -zylinder, -bechergläser etc.
- Objektträger (SuperFrost), (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig)
- Parafilm Laboratory Film (Pechiney Plastic Packaging, USA)
- Petrischalen
- Pinzetten
- Wachsstift Dakopen, DAKO S2002 (DakoCytomation, USA)

3.5 Immunhistochemische Färbungen am in Paraffin eingebetteten Gewebe

3.5.1 Durchführung der Färbungen

Alle Paraffinschnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom in einer Dicke von 4 µm angefertigt, in einem 56°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Silan-beschichtete Objektträger (Superfrost, 75 mm x 25 mm) aufgezogen. Danach erfolgten das Trocknen der Präparate in einem Brutschrank (37°C) und die immunhistochemischen Färbungen (siehe folgende Färbeprotokolle) der Schnitte in einer feuchten Kammer.

3.5.2 Färbeprotokolle 1-4: Nachweis von EGFR, VEGF, bFGF und von-Willebrand-Faktor/ Faktor VIII-assoziiertes Antigen im Paraffin-Material

1. Entparaffinieren der Schnitte in absteigender Alkoholreihe:

- a) Xylol 7 – 8 min
- b) Xylol 7 – 8 min
- c) Ethanol 100% 2 min
- d) Ethanol 100% 2 min

2. Hemmung der endogenen Peroxidase

- 250 ml Alkohol absolut + 10 ml H₂O₂ 15 min
30%

3. Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe:

- e) Ethanol 96% 2 min
- f) Ethanol 96% 2 min
- g) Ethanol 80% 2 min
- h) Ethanol 70% 2 min
- i) Ethanol 50% 2 min
- j) Aqua bidestillata 2 min

4. a) Bei EGFR Andau mit Protease: 25 mg Protease bei 37°C im Brutschrank in 250 ml vorgewärmter TBS-Pufferlösung auflösen. Präparate in der Lösung 14 min auf dem Schüttler inkubieren. Reaktion stoppen, indem die Präparate zweimal für jeweils 10 min in 250 ml im Kühlschrank vorgekühlte TBS-Pufferlösung gegeben werden. Während der Proteasebehandlung Antikörper ansetzen und feuchte Kammer herstellen

b) Bei vWF hitzeinduzierte Demaskierung der Antigenepitope in der Mikrowelle mit Citratpuffer 0,01 M, pH 6 für 15 min. Schnitte in 250 ml TBS-Puffer geben und 15 min spülen

c) VEGF und bFGF ohne Vorbehandlung

5. Tumormaterial mit Fettstift (Dakopen) auf dem Objektträger eingrenzen

6. Pro Schnitt 300 µl Primär- Antikörper (EGFR und VEGF in Verdünnung 1:200, bFGF in Verdünnung 1:50, vWF in Verdünnung 1:1000) auftragen und 1 Stunde inkubieren

7. Schnitte abtropfen lassen, in 250 ml TBS- Puffer geben und für 10 min auf dem Schüttler ausspülen
- 8.-13. *Nur bei EGFR, VEGF und bFGF:*
8. Schnitte aus der Pufferlösung nehmen und den Zweit-Antikörper (Ziege) auftragen (5 ml TBS- Puffer + 50 µl Reagens C), für 30 min inkubieren
9. Schnitte abtropfen lassen, in 250 ml TBS- Puffer geben und für 5 min auf dem Schüttler ausspülen
10. ABComplex auf die Schnitte auftragen (5 ml TBS- Puffer + jeweils 50 µl Reagens A und B) und 30 min inkubieren
11. Schnitte abtropfen lassen, in 250 ml TBS-Puffer geben und 5 min auf dem Schüttler ausspülen
12. Inkubieren mit chromogenem Substrat (DAB- Reaktionslösung) für 7 min
13. Schnitte für 10 min unter fließendem Leitungswasser wässern
14. Schnitte mit Hämalaun für 30 s gegen färben
15. erneut 10 min fließend wässern
16. Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe fixieren:

a) Ethanol 80%	2 min
b) Ethanol 96%	2 min
c) Ethanol 100%	2 min
d) Ethanol 100%	2 min
e) Xylol	2 min
f) Xylol	2 min
17. Schnitte mit Eukitt und Deckgläschen eindecken.

3.6 Immunhistochemische Färbungen und Ermittlung der Gefäßdichte

Die einzelnen Präparate wurden gemäß den oben beschriebenen Färbeprotokollen angefärbt. Die Expressionsstärke der einzelnen untersuchten Wachstumsfaktoren und –rezeptoren wurde jeweils in 4 Abstufungen von 0 = keine Anfärbung über 1 = geringe und 2 = mittlere bis 3 = starke Anfärbung unterteilt.

Die Auszählung der Gefäßdichte erfolgte mittels eines Binokularmikroskops der Firma Olympus (Modell BH-2), wobei pro Präparat ein Areal in der Größe von 1mm² ausgewertet wurde.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Rechenprogramms SPSS (IBM, Version 15.0) für MS Windows. Es wurde eine nichtparametrische Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b für die Faktoren VEGF, bFGF, EGFR, Patientenalter, Dekade, Tumortyp und Tumorlokalisation durchgeführt. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit <5% ($p < 0,05$) als signifikant erachtet. Des Weiteren erfolgte ein Mann-Whitney-U-Test bezogen auf die Daten von Tumortyp und VEGF.

4 Ergebnisse

4.1.1 Färbung von VEGF

Von den 18 untersuchten dermalen Tumoren zeigten sechs keine Anfärbung für VEGF (33,3%), acht eine geringe Anfärbung (44,4%), drei eine mittlere Anfärbung (16,6%) und ein Präparat eine starke Anfärbung (5,6%). Bei den diffusen Tumoren zeigten vier keine Anfärbung von VEGF (44,4%), und fünf eine geringe Anfärbung (66,6%). Die 21 plexiformen Präparate teilten sich in drei ohne Anfärbung (14,3%), zehn mit geringer Anfärbung (47,6%), sieben mit mittlerer Anfärbung (33,3%) und eins mit starker Anfärbung (5%) auf. Bei den MPNSTs zeigten zwei Tumoren keine Anfärbung von VEGF (22,2%), drei eine geringe Anfärbung (33,3%), und vier eine mittlere Anfärbung (44,4%) (siehe Abbildung 2, 3, Tabelle 3 und Diagramm 1).

Tabelle 3: Mittelwerte Wachstumsfaktoren/-rezeptor und Gefäßdichte vs. Tumortyp.

TUMORTYP		VEGF	FGF2	EGFR	Gefäßdichte
1	Mittelwert	,89	1,17	,67	36,06
	N	18	18	18	18
	Standardabweichung	,900	,618	,767	17,059
2	Mittelwert	,56	1,11	,78	43,22
	N	9	9	9	9
	Standardabweichung	,527	,601	,833	25,723
3	Mittelwert	1,27	1,45	1,18	35,27
	N	22	22	22	22
	Standardabweichung	,767	,510	,958	11,544
4	Mittelwert	1,22	1,00	1,00	68,78
	N	9	9	9	9
	Standardabweichung	,833	,707	,866	38,858
Insgesamt	Mittelwert	1,03	1,24	,93	41,95
	N	58	58	58	58
	Standardabweichung	,816	,601	,876	24,140

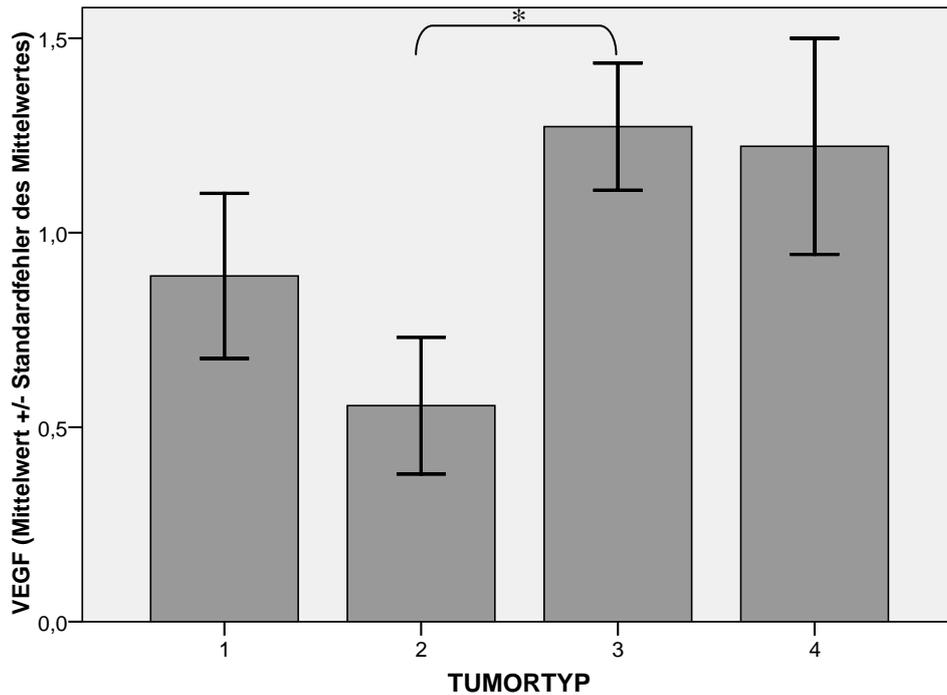


Diagramm 1: Tumortyp vs. VEGF im Zytoplasma. Tumortyp1 = dermal, 2 = dermal/ diffus, 3 = plexiform, 4 = MPNST. * : $p < 0,05$

Vergleicht man die VEGF-Expression in den einzelnen Tumortypen, lässt sich eine signifikante Beziehung dahingehend feststellen, dass plexiforme Neurofibrome und MPNSTs eine höhere VEGF-Expression aufwiesen ($r = 0,300$; $p = 0,009$; $N = 58$). Der zusätzlich mit den Tumorgruppen 2 und 3 durchgeführte Mann-Whitney-U-Test bestätigte diese Signifikanz ($r = 0,026$).

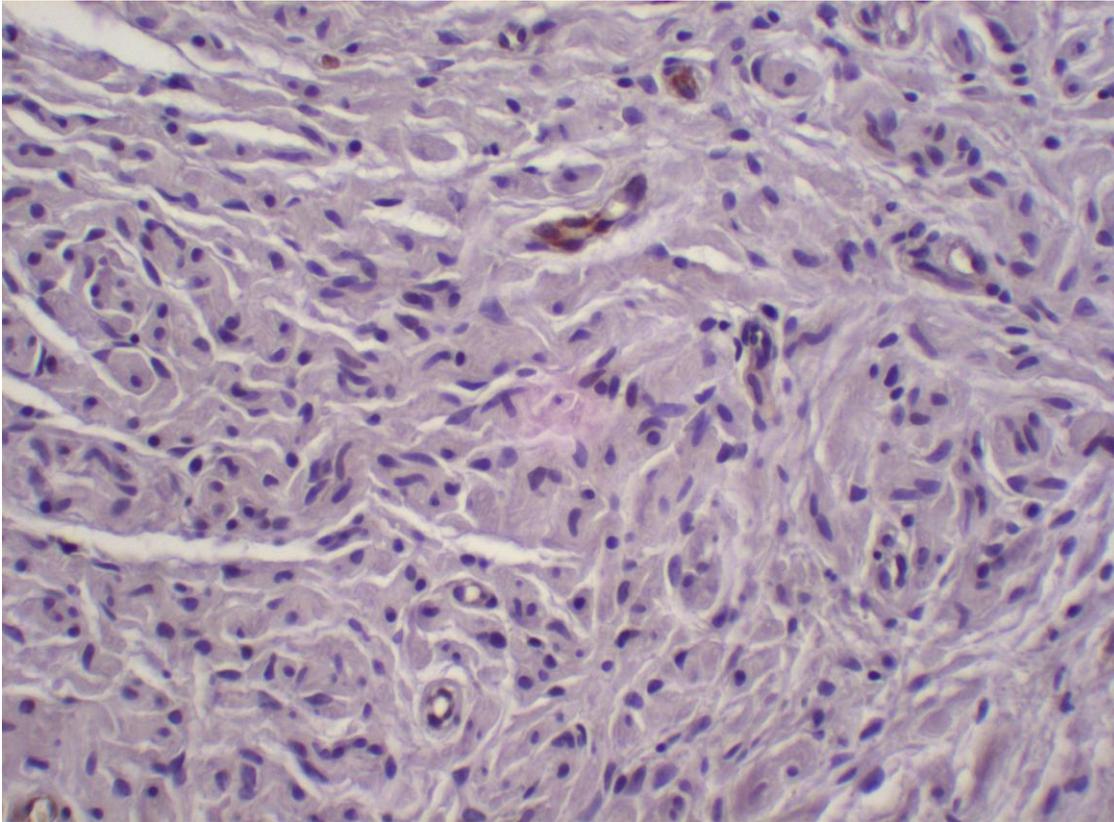


Abbildung 2: Anfärbung von VEGF in einem dermal/diffusen Neurofibrom. Gleicher Maßstab wie Abb.6.

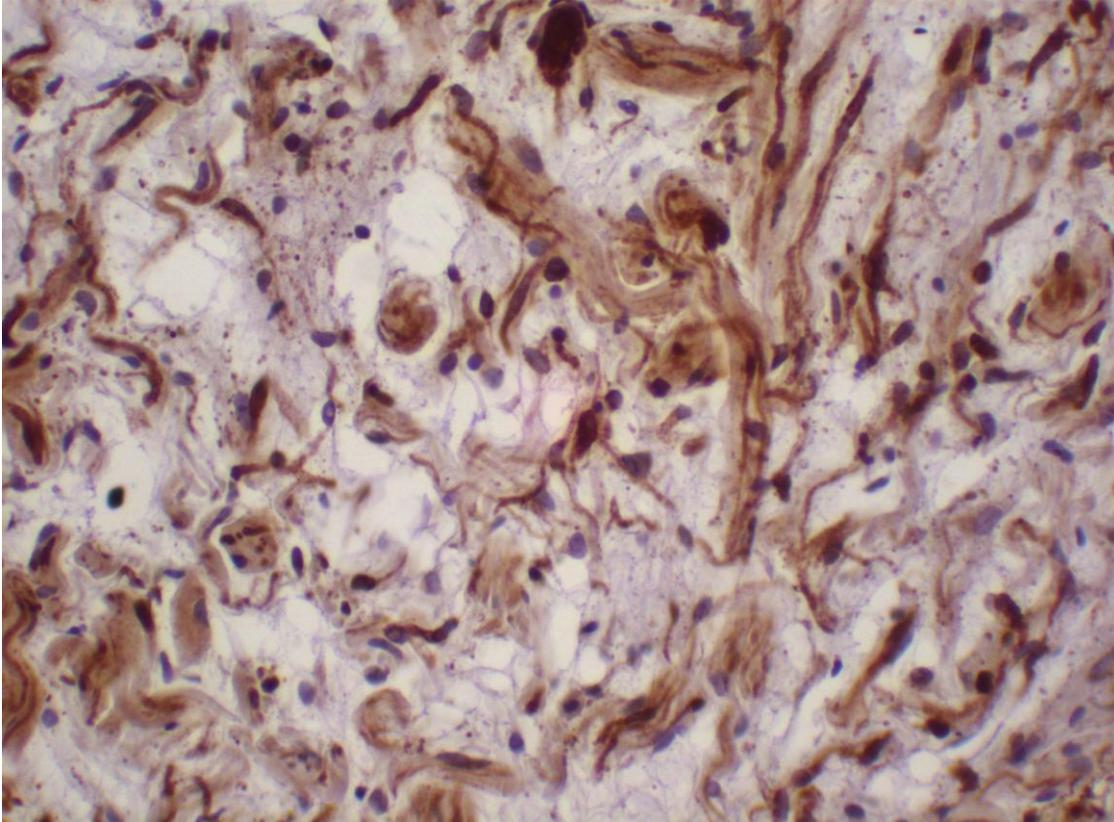


Abbildung 3: Anfärbung von VEGF in einem plexiformen Neurofibrom. Gleicher Maßstab wie Abb. 6.

4.1.2 Färbung von bFGF

Zwei der dermalen Tumoren zeigten keine Anfärbung für bFGF (11,1%), zwölf eine geringe Anfärbung (66,7%) und vier eine mittlere Anfärbung (22,2%). Die diffusen Tumoren zeigten in einem Fall keine Anfärbung (11,1%), sechs Präparate wiesen eine geringe Anfärbung (66,7%) und zwei Tumoren eine mittlere Anfärbung (22,2%) auf. Von den 21 plexiformen Tumoren zeigten zwölf eine geringe (57,1%) und neun eine mittlere Anfärbung (42,9%). Die MPNSTs zeigten in zwei Fällen keine (22,2%), in fünf Fällen eine geringe (55,6%) und in zwei Fällen eine mittlere Anfärbung (22,2%) (siehe Abbildung 4, Tabelle 3 und Diagramm 2). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

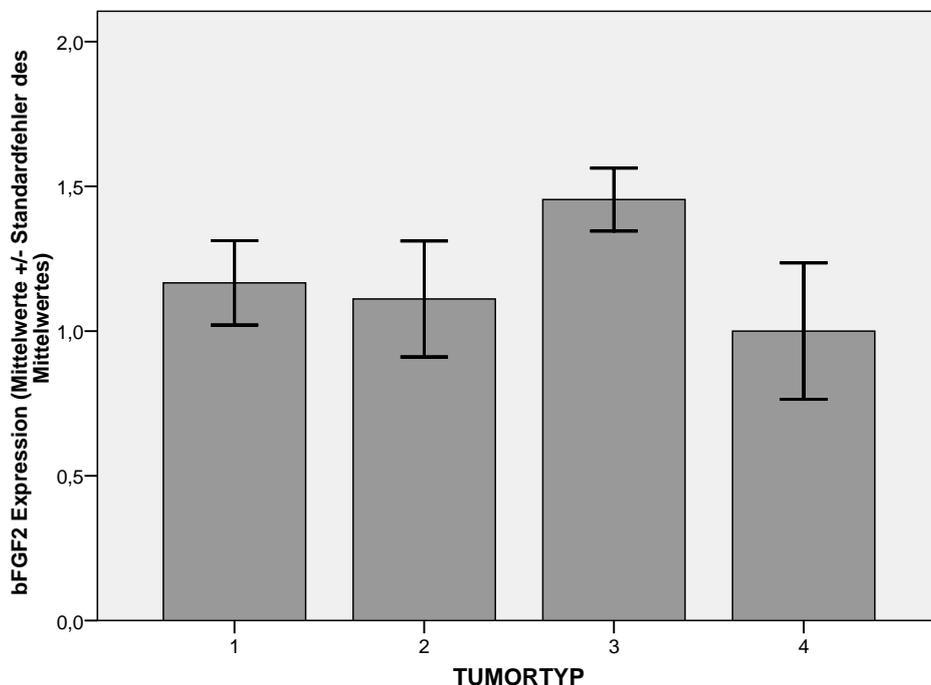


Diagramm 2: Tumortyp vs. bFGF im Zytoplasma. Tumortyp 1 = dermal, 2 = dermal/diffus, 3 = plexiform, 4 = MPNST.

Eine erhöhte b-FGF-Expression im Zytoplasma ging mit einer ebenfalls erhöhten VEGF-Expression im Zytoplasma einher ($r = 0,289$; $p = 0,017$; $N = 58$).

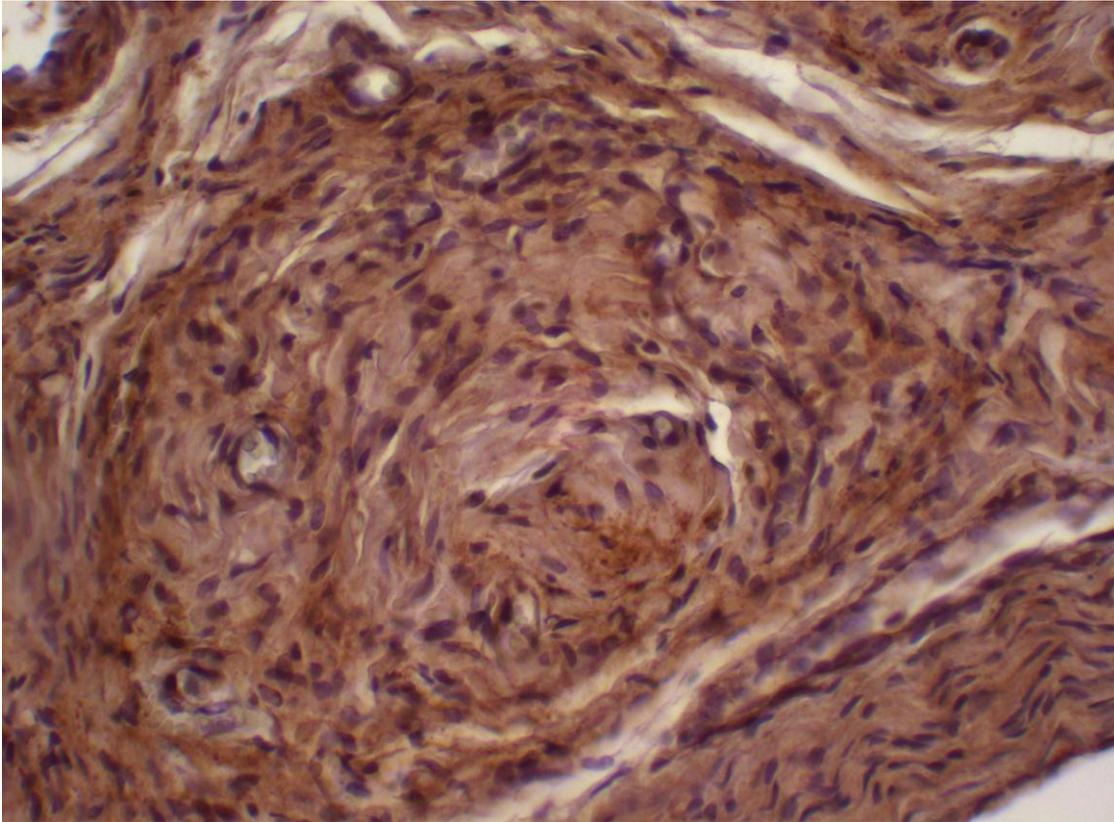


Abbildung 4: Anfärbung von bFGF in einem dermalen Neurofibrom. Gleicher Maßstab wie Abb. 6.

4.1.3 Färbung von EGFR

Neun der untersuchten dermalen Tumoren wiesen keine Anfärbung für EGFR auf (50%), sechs eine geringe Anfärbung (33,3%) und drei eine mittlere Anfärbung (16,7%). Bei den diffusen Tumoren zeigten vier keine Anfärbung (44,4%), drei eine leichte (33,3%) und zwei eine mittlere (22,2%). Die Gruppe der plexiformen Tumoren teilte sich in fünf Präparate, welche keine Anfärbung für EGFR aufwiesen (23,8%) sowie acht mit leichter (38,1%), sechs mit mittlerer (28,6%) und zwei mit starker Anfärbung (1,0%) auf. Bei den MPNSTs war bei drei Präparaten keine Anfärbung (33,3%), in drei Fällen eine geringe (33,3%) und in ebenfalls drei Fällen eine mittlere Anfärbung (33,3%) nachweisbar (siehe Abbildung 5, 6, Tabelle 3 und Diagramm 3).

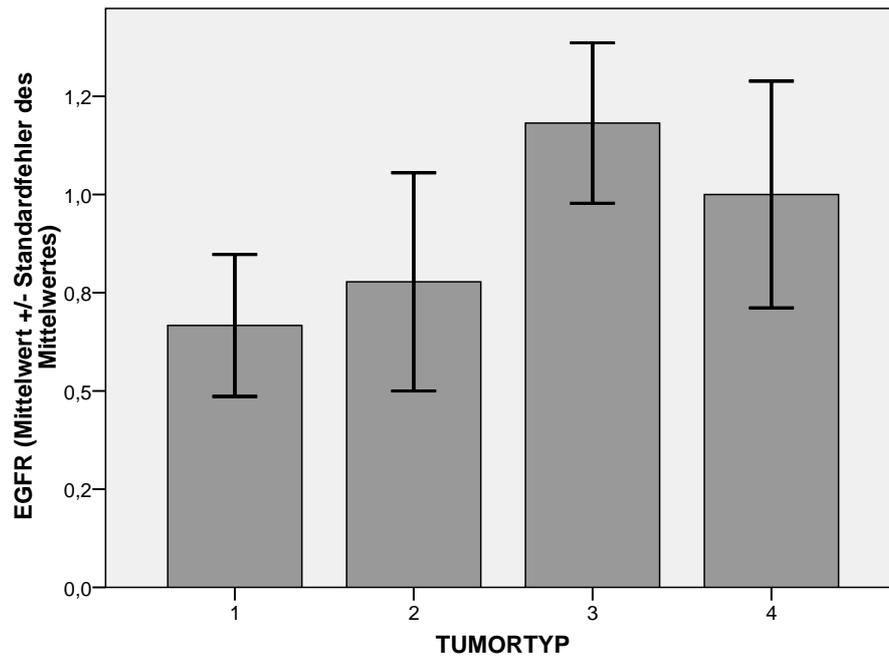


Diagramm 3: Tumortyp vs. EGFR im Zytoplasma. Tumortyp 1 = dermal, 2 = dermal/ diffus, 3 = plexiform, 4 = MPNST.

Bezogen auf die Expression von EGFR und den Tumortyp konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Zwischen der EGFR-Expression und der Expression der anderen untersuchten Angiogenesefaktoren ließ sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang nachweisen.

Allerdings konnte bei allen untersuchten Wachstumsfaktoren eine Zunahme der Expression von Tumorgruppe 2 zu 3 nachgewiesen werden.

Die EGFR-Expression zeigt sich bei jüngeren Patienten deutlich erhöht ($r = -0,238$; $p = 0,032$; $N = 58$). In der grafischen Darstellung der EGFR-Expression bezogen auf das Patientenalter ergibt sich in der 7. Dekade eine auffällige Abweichung vom Mittelwert dadurch, dass in dieser Altersstufe nur zwei Präparate einbezogen wurden, welche unterschiedliche Tumortypen mit stark abweichender EGFR-Anfärbung umfassten (vgl. Diagramm 4 und Tabelle 4).

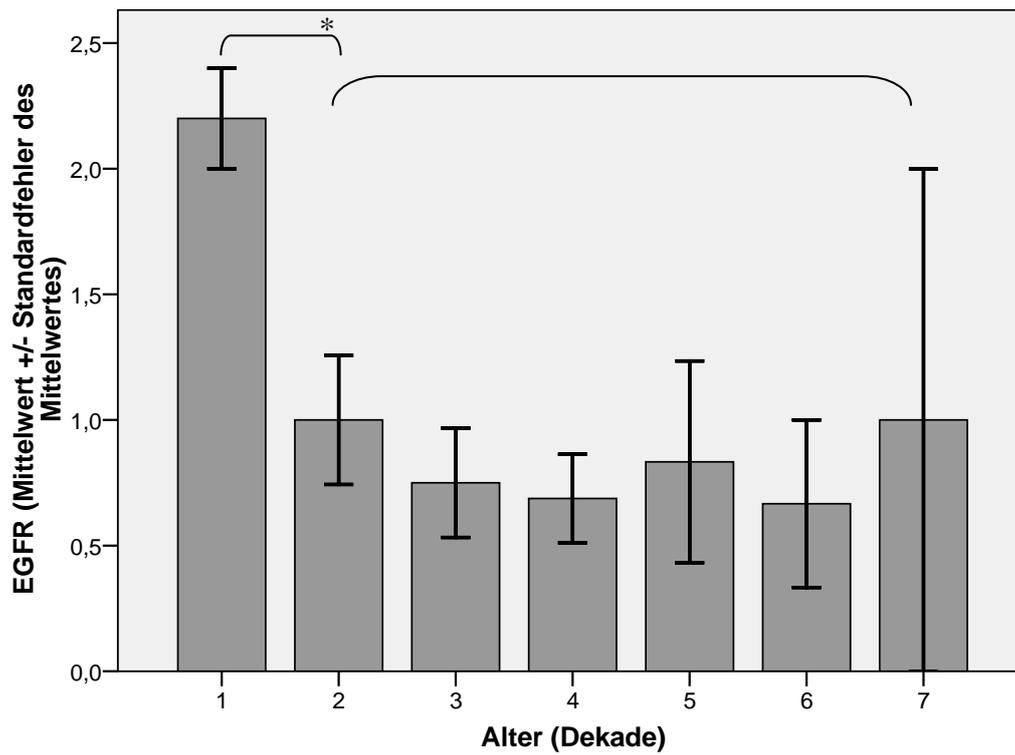


Diagramm 4: Dekade vs. EGFR im Zytoplasma. *: $p < 0,05$

Tabelle 4: Tumortyp vs. Dekade.

	1 Anzahl	2 Anzahl	3 Anzahl	4 Anzahl
1	1			4
2	2	3	7	2
3	5	3	3	1
4	5	2	4	5
5	4	1	1	
6	1		2	
7			1	1

Tumortyp 1= dermal, 2 = dermal/diffus, 3 = plexiform, 4 = MPNST

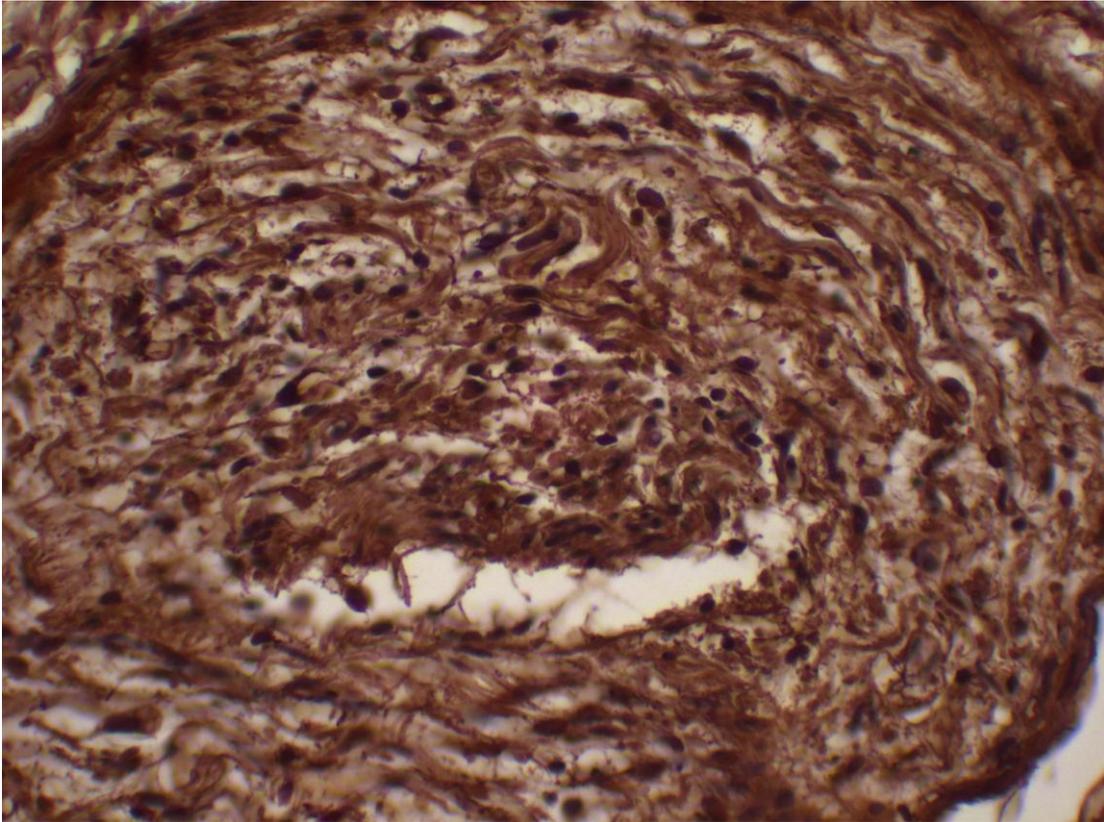


Abbildung 5: Anfärbung von EGFR in einem plexiformen Neurofibrom eines 13jährigen Patienten. Gleicher Maßstab wie Abb.6.

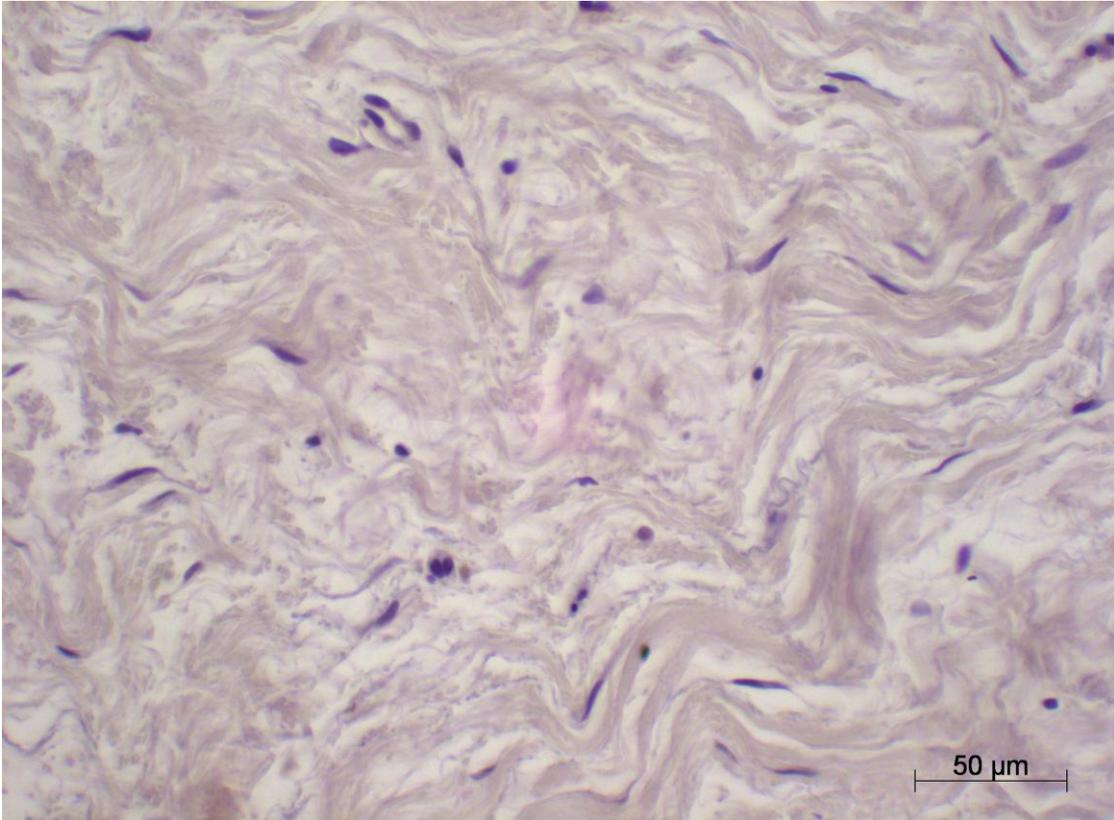


Abbildung 6: Anfärbung von EGFR in einem plexiformen Neurofibrom eines 70jährigen Patienten.

4.2 Gefäßdichte

Hinsichtlich der Gefäßdichte zeigte sich eine Korrelation von Tumortyp und Gefäßdichte ($r = 0,249$; $p = 0,014$; $N = 58$), wobei die Gefäßdichte von den benignen Neurofibromen zu den MPNSTs signifikant zunahm (vgl. Diagramm 5, Abbildung 7).

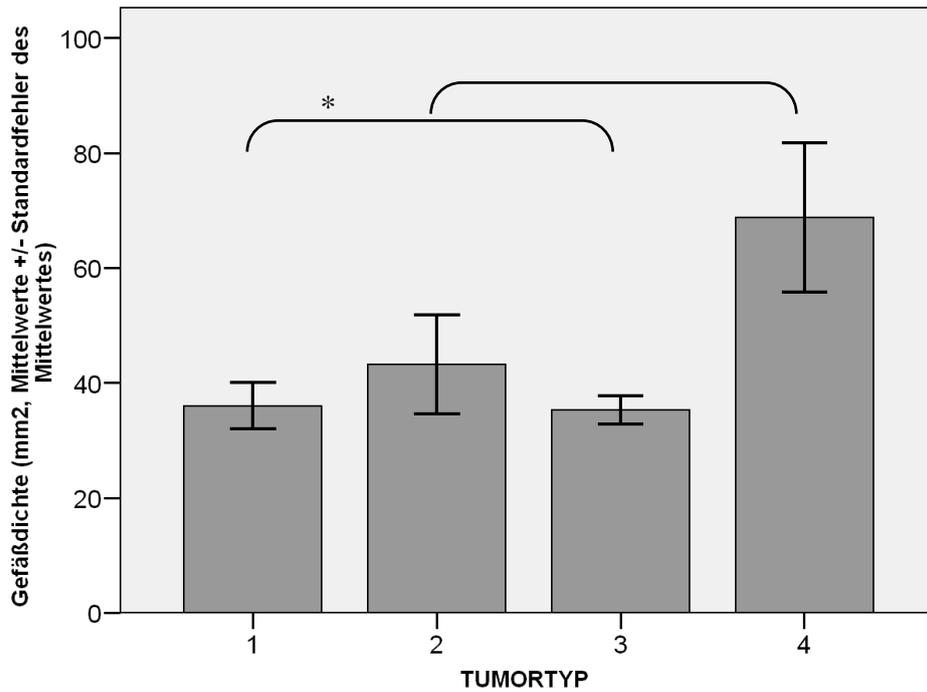


Diagramm 5: Tumortyp vs Gefäßdichte.

Tumortyp: 1= dermal, 2= dermal/diffus, 3= plexiform, 4= MPNST. *: $p < 0,05$

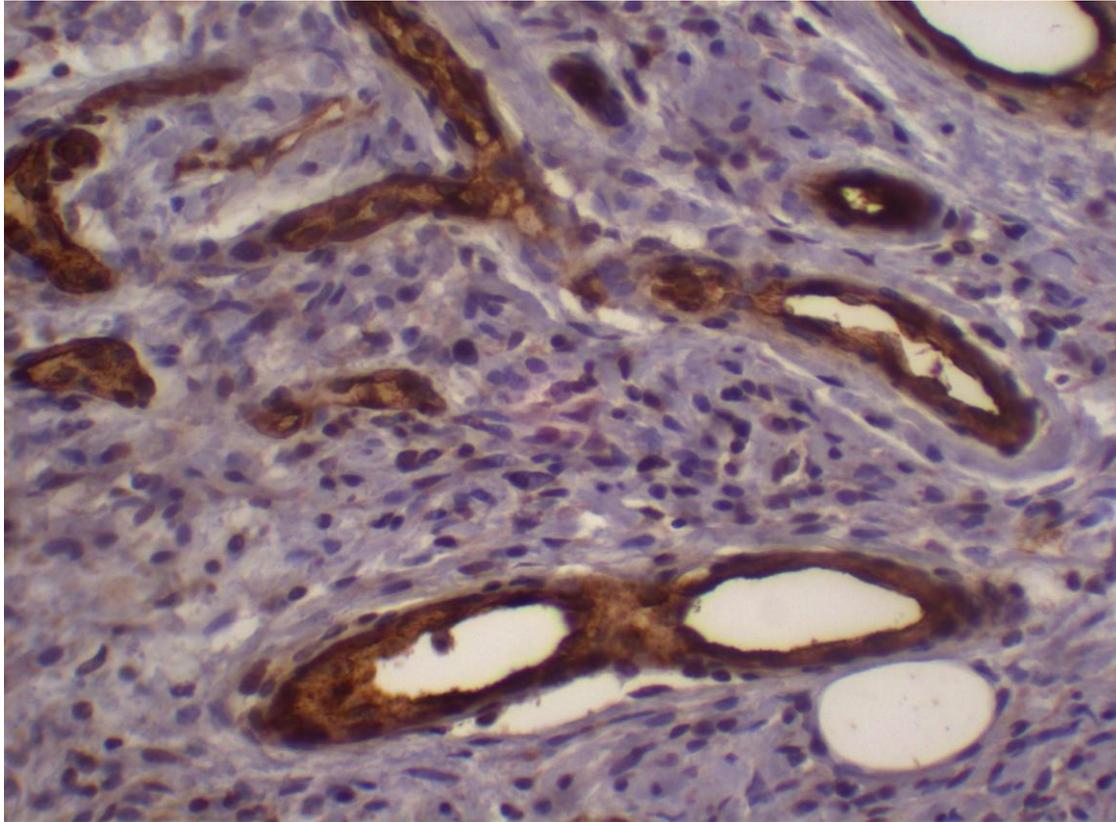


Abbildung 7: Anfärbung von Faktor VIII in einem MPNST. Gleicher Maßstab wie Abb. 6

4.3 Tumorlokalisation

Tumorart und Tumorlokalisation korrelierten miteinander ($r = -0,258$; $p = 0,028$; $N = 57$). Plexiforme Tumoren entstehen bevorzugt in großen Nerven und Plexus, also stammbetont, dermale Neurofibrome finden sich hingegen über den gesamten Körper verteilt (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Tumortyp vs. Lokalisation.

Lokalisation	Tumortyp			
	1	2	3	4
Extremitäten	4	5	5	9
Rumpf	5	2	2	0
Gesicht/Hals	9	1	15	0

Tumortyp: 1= dermal, 2= dermal/diffus, 3= plexiform, 4= MPNST

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse weisen Zusammenhänge unterschiedlicher Angiogenesefaktoren bei verschiedenen Tumorformen nach, welche im Rahmen einer Neurofibromatose Typ 1 auftreten können. Es zeigte sich, dass plexiforme Neurofibrome, obwohl sie bei operativer Entfernung stark bluten und gut vaskularisiert sind (Kawachi et al. 2003), eine im Vergleich zu den dermalen/ dermal-diffusen Neurofibromen zwar erhöhte VEGF- Expression, jedoch keine erhöhte Gefäßdichte aufweisen. Die erhöhte VEGF-Konzentration in den plexiformen Neurofibromen könnte damit erklärbar sein, dass diese Tumorform, im Gegensatz zu den dermalen, von einer Kapsel umgeben wird, welche ein Diffundieren des Wachstumsfaktors in das umgebende Gewebe verhindert. Interessant ist, dass die Gefäßdichte in den plexiformen Neurofibromen trotz erhöhter VEGF-Konzentrationen im Gewebe nicht ansteigt. Erst bei den MPNSTs ließ sich eine deutliche Zunahme der Gefäßdichte ermitteln. Angelov und Kollegen stellten entsprechend bereits 1999 eine deutlich erhöhte Vaskularisierung sowie VEGF-Expression in MPNSTs im Vergleich zu normalem Nervengewebe fest. Die Forschergruppe um Gesundheit (2010) konnte beim Übergang von plexiformen Neurofibromen zu MPNSTs eine Veränderung der Gefäßqualität sowie eine inflammatorische Komponente mit Leukozyteneinwanderung und Mikroblutungen bei vorliegender Malignität nachweisen. Sie fanden in ihrer Untersuchung einen Anstieg von VEGF und Gefäßdichte beim Vergleich von plexiformen Neurofibromen und MPNST, allerdings nahmen sie keinen Vergleich mit dermalen Neurofibromen vor. Thomas und DeVries wiesen 2007 hingegen eine erhöhte VEGF-Expression in MPNSTs und normalen Schwannzellen im Vergleich mit Neurofibromen nach. Interessant wäre herauszufinden, was genau die Zunahme der Gefäßdichte beim Übergang zur Malignität triggert, ob z.B. in den plexiformen Tumoren das Gleichgewicht von Angiogenese und Antiangiogenese durch ein erhöhtes Angebot an Antiangiogenesefaktoren aufrecht erhalten wird. Eine mögliche Erklärung könnte in einer bereits von Gesundheit und Kollegen vermuteten Zunahme der VEGF-Rezeptoren beim Übergang zum MPNST liegen. VEGFR konnte überwiegend, wenn auch nicht ausschließlich, auf Endothelzellen nachgewiesen werden (Gesundheit et al. 2010), VEGF als Ligand hingegen wird unter anderem auch von Tumorzellen sezerniert. Die hier nachgewiesene erhöhte VEGF-Expression in plexiformen Neurofibromen könnte eine weitere Erklärung für das schnelle Wachstum dieser Tumorart sein. Zietsch und Kollegen (2010) beschrieben bereits eine Expression von VEGF in peripheren Nervenscheidentumoren und konnten einen Zusammenhang mit der Expressionszunahme und der voranschreitenden Malignität herstellen, wie auch die Forschergruppe um Gesundheit

(2010) einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten VEGF und VEGFR-Expression und dem Übergang von plexiformen Neurofibromen in MPNSTs aufzeigen konnte. Sie wiesen in plexiformen Neurofibromen kein VEGF im Zytoplasma der Tumorzellen nach, wohl aber in MPNSTs. In der vorliegenden Untersuchung gelang es, VEGF auch bei plexiformen Neurofibromen im Zytoplasma nachzuweisen. Die von Gesundheit und Kollegen beschriebene Zunahme von VEGF beim Übergang zur Malignität konnte hier nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Es war zwar ein genereller Anstieg in der VEGF-Konzentration zu konstatieren, der Unterschied war aber zwischen diffusen und plexiformen Tumoren am größten und steigerte sich danach nicht mehr beim MPNST.

Thomas und DeVries stellten 2007 fest, dass bFGF in Neurofibromen stärker exprimiert wird als in normalen Schwannzellen und auch in MPNSTs konnten sie ein vermehrtes Vorliegen nachweisen, welches sich allerdings nicht so deutlich zeigte wie in den Neurofibromen. In der vorliegenden Untersuchung fanden sich bei den verschiedenen Tumortypen keine signifikanten Unterschiede in der bFGF-Expression.

Die in dieser Arbeit bestätigte Korrelation von bFGF und VEGF im Zytoplasma der Neurofibrome ist nachvollziehbar, da bFGF über parakrine und autokrine Mechanismen zu einer vermehrten VEGF Expression in Endothelzellen sich bildender Kapillaren führt, wie bereits durch Seghezzi et al. (1998) nachgewiesen wurde. Auch Murakami und Simons (2008) konnten einen Einfluss von bFGF auf die Expression von VEGF feststellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Angiogenesefaktoren mit einbezogen. Die Gruppe um Lichtenberger (2010) konnte synergetische Effekte der VEGF- sowie der EGFR – Signalkaskade in epithelialen Tumoren nachweisen, unter anderem darauf beruhend, dass eine VEGF-Überexpression durch das Vorliegen von EGFR hervorgerufen wird. Die gleiche Forschergruppe konnte ebenfalls darlegen, dass ein Fehlen von VEGF und EGFR zu keiner weiteren Tumorentwicklung führte. Auch Fujiyama und Kollegen kamen 2001 zu dem Schluß, dass VEGF in der Kaninchencornea über eine Aktivierung der EGFR/ERK-Kaskade exprimiert wird. Ein derartig klarer Zusammenhang von VEGF- und EGFR-Expression war hingegen in der vorliegenden Studie nicht nachweisbar. Zwar war bei beiden Parametern eine Zunahme der Expressionsrate von den dermalen/dermal-diffusen Tumoren zu den plexiformen Neurofibromen und MPNSTs hin nachweisbar und ebenfalls in beiden Fällen zeigte sich die Expression bei den plexiformen Neurofibromen noch stärker als bei den MPNSTs, allerdings war diese Zunahme statistisch nicht signifikant.

Generell konnte in der vorliegenden Untersuchung ein Unterschied bei allen untersuchten Wachstumsfaktoren und –rezeptoren zwischen den dermalen Neurofibromen (Tumorgruppe 1,2) sowie den plexiformen Neurofibromen und MPNSTs (Tumorgruppe 3,4) festgestellt werden, der allerdings nur für VEGF statistisch signifikant war. Eine mögliche Ursache für das Fehlen weiterer Korrelationen könnte in der Untersuchungsmethode begründet sein, die keine echte quantitative Auswertung ermöglicht.

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und dem Alter der Patienten nachgewiesen werden. Jüngere Patienten scheinen mehr EGFR zu exprimieren als ältere, wobei die Expressionsrate am Übergang der ersten zur zweiten Dekade am stärksten abfällt, um nachfolgend annähernd gleich zu bleiben (vgl. Diagramm 5 und Tabelle 4). Diese Ergebnisse decken sich mit den Aussagen der Forschungsgruppe um Hiramatsu (1988), welche im Tiermodell eine Abnahme der EGFR-Expression im alternden Rattenhirn nachwies und der Gruppe um Kamat (2008), die eine im Alter abnehmende Expression von EGFR in der Rattenleber beschrieb. Ohta und Ichimura konnten 2000 ebenfalls einen altersbedingten Rückgang von EGFR im olfaktorischen Epithel von Mäusen beschreiben, welcher mit einer abnehmenden Zellproliferation und einer Atrophie des olfaktorischen Epithels assoziiert war. Enwere und Kollegen (2004) konnten diese Beobachtung beim Menschen ebenfalls im Zusammenhang mit einer Abnahme der olfaktorischen Neurogenese machen. In der vorliegenden Untersuchung wird ein Zusammenhang von erhöhter EGFR-Expression mit den jüngeren Dekaden allerdings vermutlich auch dadurch erzeugt, dass es sich bei den Tumortypen, welche in der ersten Lebensdekade entnommen wurden, vornehmlich um MPNSTs handelte (vgl. Tabelle 5), welche generell eine höhere Expression dieses Rezeptors aufweisen als Neurofibrome (vgl. Tabone-Eglinger et al. 2008). Bei anderen Tumorerkrankungen lässt sich im Alter eine erhöhte EGFR- Expression nachweisen, wie zum Beispiel beim Glioblastoma multiforme oder colorectalen Karzinom. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit nicht aufgezeigt werden. EGFR wurde in einigen Arbeiten als prognostischer Faktor für das Outcome bei Glioblastoma multiforme beschrieben (vgl. Simmons et al. 2001) und zeigt sich bei malignen Entitäten, wie auch MPNSTs, erhöht (vgl. Holtkamp et al. 2008, Perrone et al. 2009). Dilworth und Kollegen (2008) konnten weiterhin nachweisen, dass EGFR in MPNSTs bei Patienten mit Neurofibromatose stärker exprimiert wird als in sporadischen MPNSTs. In der vorliegenden Studie zeigte sich hingegen kein signifikanter Zusammenhang von EGFR und Tumortyp, bzw. einem Übergang zur Malignität. Zwar konnte eine vermehrte Expression

in plexiformen Neurofibromen und MPNSTs im Vergleich zu den dermalen/ dermal-diffusen Neurofibromen nachgewiesen werden, diese war allerdings statistisch nicht signifikant. Thomas und DeVries beschrieben 2007 ebenfalls einen Anstieg von EGFR in Neurofibromen und MPNSTs im Vergleich zu normalen Schwannzellen, welcher bei beiden Entitäten annähernd gleich war.

Wie auch bei Kawachi und Kollegen (2003), zeigte sich in der durchgeführten Untersuchung kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Gefäßdichte zwischen dermalen und dermal/diffusen Tumoren. Die Gefäßdichte bei den plexiformen Neurofibromen lag noch darunter. Erst in MPNSTs konnte eine erhöhte Gefäßdichte mikroskopisch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Forschergruppe um Gesundheit (2010), welche ebenfalls eine erhöhte Gefäßdichte in MPNSTs im Vergleich zu plexiformen Neurofibromen nachweisen konnte sowie mit den Ergebnissen von Naber (2012), der eine Zunahme der Vaskularisation in MPNSTs gegenüber differenzierten peripheren Nervenscheidentumoren und gesundem Kontrollgewebe dokumentierte.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation und dem Tumortyp nachgewiesen werden, welcher sich mit der Literatur deckt (vgl. Wu et al. 2006). Die plexiformen Neurofibrome zeigten sich eher stammbetont, ebenfalls die MPNSTs, da sie zumeist aus plexiformen Tumoren entstehen und die dermalen Neurofibrome sind eher peripher lokalisiert (vgl. Staser et al. 2010).

Ein weiterer interessanter Aspekt betrifft den Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem Vorhandensein von Wachstumsfaktoren sowie von Mastzellen im Mikromilieu von Tumoren. Mastzellen vermitteln Entzündungsreize und gelten als Angiogenese-Stimulatoren verschiedener Tumorarten. Ch`ng und Kollegen konnten 2006 einen Zusammenhang zwischen der peritumoralen Mastzellendichte und der mikrovaskulären Gefäßdichte sowie Progression und Prognose beim Malignen Melanom nachweisen. Mastzellen im Mikromilieu von Melanomen und Basalzellkarzinomen enthalten mehrere Angiogenesefaktoren, darunter auch bFGF und VEGF und stellen sogar die hauptsächliche Quelle von VEGF in diesen Tumorarten dar (Ch`ng et al. 2006). Auch Crivellato und Kollegen (2008) sehen in der Eigenschaft der Mastzellen angiogene Zytokine (u.a. VEGF und FGF-2) zu synthetisieren und zu sezernieren eine Hauptrolle in der Tumorentstehung und Metastasierung, da sie zum „angiogenic switch“ beitragen. Zhu und Kollegen wiesen bereits 2002 auf die Rolle von Nf-

heterozygoten Mastzellen im peritumoralen Gewebe hin, welche noch vor der Entstehung von plexiformen Neurofibromen in periphere Nerven einwandern. Nach neueren Arbeiten unterscheidet sich die Mastzellichte im Gewebe von dermalen und plexiformen Neurofibromen nicht (Behrens 2008, Hagel et al. 2011). Dieses Ergebnis deckt sich bezüglich der Gefäßdichte mit der Feststellung dieser Arbeit, dass diese sich erst beim Übergang zur Malignität erhöht.

5.1 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Wachstumsfaktoren und –rezeptoren sind Ziele möglicher zukünftiger Therapieoptionen bei peripheren Nervenscheidentumoren, weshalb weitere Untersuchungen in dieser Richtung wichtig sind, um Zusammenhänge aufzuklären und so bessere Therapieansätze zu liefern. Gegebenenfalls könnte die Kombination mehrerer Antikörper gegen bestimmte Angiogenesefaktoren zu einem Erfolg bei der Behandlung von Neurofibromatose-Tumoren führen.

So konnten Lichtenberger et al. (2010) bereits im Mausmodell einen signifikanten Therapieerfolg bei der Behandlung epithelialer Tumore durch EGFR-Hemmung (BI-2992) im Sinne einer Tumorstase nachweisen sowie einen milden Effekt durch VEGF-Inhibition (BI-1120) und die Kombination beider Ansätze führte sogar zu einer kompletten Regression mancher Tumoren. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Dutta und Maity (2007) gemacht, welche einen Rückgang der VEGF-Expression unter dem Einsatz von EGFR-Antikörpern nachwiesen, aber auch auf die Tatsache hinwiesen, dass es zu einer Resistenz von Tumoren gegenüber EGFR-Antikörpern kommen kann, welche mit einer Überexpression von VEGF einherging, was einen Rückgang der Angiogenese verhinderte. Plotkin und Kollegen erbrachten 2008 den Nachweis, das Erlotinib, ein der EGFR- Tyrosinkinasehemmer bei einem Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 zu einer Verbesserung der Hörfähigkeit sowie zu einer Regression des Vestibularschwannoms führte. Mautner und Kollegen berichteten 2010 über therapeutische Erfolge mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF, bei zwei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2, wobei es in beiden Fällen bereits nach einer kurzen Therapie zu einem Rückgang der Tumormasse sowie bei einem Patienten zu einer Verbesserung der Hörfähigkeit kam. Bevacizumab ist bei anderen Tumorarten (colorektales Carcinom, Brustkrebs) in Verbindung mit anderen Therapieformen, wie Chemotherapie, bereits als Medikation zugelassen und könnte bei weiteren Tumorentitäten als Therapieoption in Frage kommen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Zusammenhang der Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF, des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR sowie der Gefäßdichte in peripheren Nervenscheidentumoren, welche im Rahmen der Erkrankung Neurofibromatose Typ 1 beobachtet werden. Bei der Neurofibromatose Typ 1 handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte neurokutane Erkrankung, welche mit einer Inzidenz von 1:2.500-3.500 Lebendgeburten beziffert wird und durch das Auftreten peripherer Nervenscheidentumoren sowie ein weites Spektrum kutaner, skelettaler, kardiovaskulärer, endokriner und mentaler Auffälligkeiten charakterisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden 58 dermale, dermal/ diffuse und plexiforme Neurofibrome sowie MPNSTs auf die oben genannten Angiogenesefaktoren hin immunhistochemisch untersucht sowie die Gefäßdichte in den Präparaten ermittelt.

Es zeigte sich, dass plexiforme Neurofibrome sowie MPNSTs eine im Vergleich zu den dermalen Tumoren deutlich erhöhte VEGF-Expression aufweisen, die Gefäßdichte aber erst bei den MPNSTs signifikant zunimmt. Die anderen Parameter zeigten keine signifikant unterschiedliche Expression in den verschiedenen Tumortypen. In der ersten Lebensdekade wurde eine deutlich höhere EGFR-Expression beobachtet als in den folgenden Lebensjahrzehnten. Dieses Ergebnis ist zumindest zum Teil dadurch erklärbar, dass in der Gruppe der bis Zehnjährigen 4 von 5 Tumoren MPNSTs waren, welche tendenziell eine erhöhte EGFR-Expression zeigten.

7 Literatur

1. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *Embo J.* 5(10): 2523-8.
2. Angelov L, Salhia B, Roncari L, McMahon G, Guha A (1999) Inhibition of angiogenesis by blocking activation of the vascular endothelial growth factor receptor 2 leads to decreased growth of neurogenic sarcomas. *Cancer Res.* 59(21): 5536-41.
3. Barkan B, Starinsky S, Friedman E, Stein R, Kloog Y (2006) The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid as a potential therapy for neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res.* 12(18): 5533-42.
4. Behrens T (2008) Untersuchung des Hyaluronsäuregehaltes in kutanen und plexiformen Neurofibromen hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit einer postoperativen Ödembildung. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.
5. Bodempudi V, Yamoutpoor F, Pan W, Dudek AZ, Esfandyari T, Piedra M, Babovick-Vuksanovic D, Woo RA, Mautner VF, Kluwe L, Clapp DW, DeVries Gh, Thomas SL, Kurtz A, Parada LF, Farassati F (2009) Ral overactivation in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Mol Cell Biol.* 29(14): 3964-74.
6. Carey JC, Viskochil DH (1999) Neurofibromatosis Type 1: A Model Condition for the Study of the Molecular Basis of Variable Expressivity in Human Disorders. *Am J Med Genet.* 26; 89(1):7-13.
7. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407: 249-257.
8. Carmeliet P (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 69 Suppl 3: 4-10.
9. Carpenter G, Cohen S (1990) Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 265: 7709-12.

10. Carroll SL, Ratner N (2008) How Does the Schwann Cell Lineage form Tumors in NF1? *Glia*. 56(14): 1590-1605.
11. Cawthon R, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Vulver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O`Connell P, White R (1990) A major segment of neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure and point mutations. *Cell*. 62: 193-201.
12. Ch`ng S, Wallis RA, Yuan L, Davis PF, Tan ST (2006) Mast cells and cutaneous malignancies. *Mod Pathol*. 19(1): 149-59.
13. Cohen T, Gitay-Goren H, Sharon R, Shibuya M, Halaban R, Levi BZ, Neufeld G (1995) VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparin sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J Biol Chem*. 270(19):11322-6.
14. Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 49(3): 507-21.
15. Crivellato E, Nico B, Ribatti D (2008) Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Lett*. 269(1): 1-6.
16. Cross MJ, Claesson-Welsh L (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 22(4): 201-7.
17. De Clue JE, Cohen BD, Lowy DR (1991) Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 9914-9918.
18. De Clue JE, Heffelfinger S, Benvenuto G, Ling B, Li S, Rui W, Vass WC, Viskochil D, Ratner N (2000) Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J Clin Invest*. 105: 1233-1241.

19. Dilworth JT, Wojtkowiak JW, Mathieu P, Tainsky MA, Reiners Jr JJ, Mattingly RR, Hancock CN (2008) Suppression of proliferation of two independent NF1 malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines by the pan-ErbB inhibitor CI-1033. *Cancer Biol Ther.* 7(12): 1938-1946.
20. Dutta PR, Maity A (2007) Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett.* 254(2): 165-177.
21. Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging Results in Reduced Epidermal Growth Factor Receptor Signaling, Diminished Olfactory Neurogenesis, and Deficits in Fine Olfactory Discrimination. *J Neurosci.* 24(38): 8354-8365.
22. Evans DGR, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 39: 311-314.
23. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, Upadhyaya M, Towers R, Gleeson M, Steiger C, Kirby A (2007) Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 44: 81-88.
24. Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 25: 581-611.
25. Folkman J (2007) Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg.* 42(1): 1-11.
26. Folkman J (2002) Role of Angiogenesis in Tumor Growth and Metastasis. *Semin Oncol.* 29(6 Suppl 16):15-8.
27. Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267(16): 10931-4.
28. Friedman JM (1999) Epidemiology of Neurofibromatosis Type 1. *Am J Med Genet.* 26; 89(1): 1-6.

29. Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, Masaki H, Uchiyama Y, oyama Y, Nose A, Iba O, Tateishi E, Ogata N, Jyo N, Higashiyama S, Iwasaka T (2001) Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res.* 88(1): 22-9.
30. 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: 548-553.
31. Gottfried ON, Viskochil DH, Couldwell WT (2010) Neurofibromatosis Type 1 and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurosurg Focus.* 28(1): E8.
32. Gupta A, Cohen BH, Ruggieri P, Packer RJ, Phillips PC (2003) Phase I study of thalidomide for the treatment of plexiform neurofibroma in neurofibromatosis. *Neurology.* 60: 130-132.
33. Hagel C, Behrens T, Prehm P, Schnabel C, Glatzel M, Friedrich RE (2011) Hyaluronan in intra-operative edema of NF1-associated neurofibromas. *Neuropathology.* Dec 1.
34. Hagel C, Zils U, Peiper M, Kluwe I, 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: 187-192.
35. Hiramatsu M, Kashimata M, Sato A, Murayama M, Minami N (1988) Influence of age on epidermal growth factor receptor level in the rat brain. *Experientia.* 44(1): 23-5.

36. Holtkamp N, Atallah I, Okuducu AF, Mucha J, Hartmann C, Mautner VF, Friedrich RE, Mawrin C, von Deimling A (2007) MMP 13 and p53 in the progression of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neoplasia*. 9(8): 671-677.
37. Holtkamp N, Malzer E, Zietsch J, Okuducu AF, Mucha J, Mawrin C, Mautner VF, Schildhaus HU, von Deimling A (2008) EGFR and erbB2 in malignant peripheral nerve sheath tumors and implications for targeted therapy. *Neuro Oncol*. 10(6): 946-957.
38. Kamat A, Ghosh PM, Glover RL, Zhu B, Yeh CK, Choudbury GG, Katz MS (2008) Reduced Expression of Epidermal Growth Factor Receptors in Rat Liver During Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 63(7): 683-692.
39. Kawachi Y, Xu Y, Ichikawa E, Imakado S, Otsuka F (2003) Expression of angiogenic factors in neurofiromas. *Exp Dermatol*.
40. Kissil JL, Blakeley JO, Ferner RE, Huson SM, Kalamarides M, Mautner VF, McCormick F, Morrison H, Packer R, Ramesh V, Ratner N, Rauen KA, Stevenson DA, Hunter-Schaedle K, North K (2010) What`s new in neurofibromatosis? Proceedings from the 2009 NF Conference: new frontiers. *Am J Med Genet A*. 152A(2): 269-83.
41. Kluwe L, Friedrich R, Mautner VF (1999) Loss of NFI Allele in Schwann Cells but not in Fibroblasts Derived From an NFI-Associated Neurofibroma Genes *Chromosomes Cancer*. 24(3):283-5.
42. Korf BR, (1999) Plexiform Neurofibromas. *Am J Med Genet*. 26: 89(1): 31-37.
43. Lammert M, Friedman JM, Kluwe L, Mautner VF (2005) Prevalence of Neurofibromatosis 1 in German Children at Elementary School Enrollment. *Arch Dermatol*. 141: 71-74.
44. Li H, Velasco-Miguel S, Vass WC, Parada LF, DeClue JE (2002) *Cancer Res*. 62(15): 4507-4513.

45. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P (2010) Autocrine VEGF Signaling synergizes with EGFR in Tumor Cells to Promote Epithelial Cancer Development. *Cell* 140: 268-279.
46. Ling BC, Wu J, Miller SJ, Monk KR, Shamekh R, Rizvi TA, Decourten-Myers G, Vogel KS, DeClue JE, Ratner N (2005) Role for the epidermal growth factor receptor in neurofibromatosis-related peripheral nerve tumorigenesis. *Cancer Cell*. 7(1): 65-75.
47. Liu CC, Sheng Z, Kung HF, Lin MCM (2006) Cancer gene therapy targeting angiogenesis: an updated review. *World J Gastroenterol*. 12(43): 6941-6948.
48. Mashour GA, Driever PH, Hartmann M, Drissel SN, Zhang T, Scharf B, Felderhoff-Müser U, Sakuma S, Friedrich RE, Martuza RL, Mautner VF, Kurtz A (2004) Circulating Growth Factor Levels Are Associated with Tumorigenesis in Neurofibromatosis Type 1. *Clin Cancer Res*. 10(17): 5677-5683.
49. Mautner VF, Kluwe L, Thakker SD, Lark RA (2002) Treatment of ADHD in neurofibromatosis type 1. *Dev Med Child Neurol*. 44(3): 164-70.
50. Mautner VF, Nguyen R, Kutta H, Fuensterer C, Bokemeyer C, Hagel C, Friedrich RE, Panse J (2010) Bevacizumab induces regression of vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2. *Neuro Oncol*. 12(1): 14-8.
51. Muir D, Neubauer D, Lim IT, Yachnis AT, Wallace MR (2001) Tumorigenic properties of neurofibromin-deficient neurofibroma Schwann cells. *Am J Pathol*. 158(2): 501-513.
52. Munchhof AM, Li F, White HA, Mead LE, Krier TR, Fenoglio A, Li X, Yuan J, Yang FC, Ingram DA (2006) Neurofibroma –associated growth factors activate a distinct signaling network to alter the function of neurofibromin-deficient endothelial cells. *Hum Mol Genet*. 15(11): 1858-1869.

53. Murakami M, Simons M (2008) Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol.* 15(3):215-220.
54. Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, Simons M (2008) The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest.* 118:3355–3366.
55. Naber U (2012) Potentielle Merkmale für Dedifferenzierung und Tumorprogress in peripheren Nervenscheidentumoren. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.
56. Ohta Y, Ichimura K (2000) Immunohistochemical localization of proliferating cells and epidermal growth factor receptor in mouse olfactory epithelium. *ORL J Otorhinolayngol Relat Spec.* 62(1): 20-5.
57. Ornitz DM, Itoh N (2001) Protein family review: Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2(3): reviews 3005.1-3005.12.
58. Packer RJ, Gutmann DH, Rubenstein A, Viskochil D, Zimmerman RA, Vezina G, Small J, Korf B (2002) Plexiform neurofibromas in NF 1: toward biologic-based therapy. *Neurology.* 28;58(10):1461-70.
59. Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocolle G, Millefanti C, Pastore E, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S (2009) PDGFRA, PDGFRB, EGFR, and downstream signaling activation in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Neuro Oncol.* 11(6): 725-36.
60. Plotkin SR, Singh MA, O'Donnell CC, Harris GJ, McClatchey AI, Halpin C (2008) Audiologic and radiographic response of NF2-related vestibular schwannoma to erlotinib therapy. *Nat Clin Pract Oncol.* 5: 487-491.
61. Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM (2001) Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum Genet.* 68(5):1110-8.

62. Riccardi VM (1993) A controlled multiphase trial of ketotifen to minimize neurofibroma-associated pain and itching. *Arch Dermatol.* 129(5): 577-81.
63. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P (2009) Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev.* 89(2): 607-48.
64. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P (1998) Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in the Endothelial Cells of Forming Capillaries: An Autocrine Mechanism Contributing to Angiogenesis. *J Cell Biol.* 141: 1659-1673.
65. Sheela S, Riccardi VM, Ratner N (1990) Angiogenic and Invasive Properties of Neurofibroma Schwann Cells. *J Cell Biol.* 111(2):645-53.
66. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, Chen P, Israel MA, Berger MS, Godfrey T, Nigro J, Prados M, Chang S, Barker FG 2nd, Aldape K (2001) Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 61(3): 1122-8.
67. Staser K, Yang FC, Clapp DW (2010) Mast cells and the neurofibroma microenvironment. *Blood* 116(2): 157-164.
68. Steinmann K, Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H (2009) Mechanisms of Loss of Heterozygosity in Neurofibromatosis Type 1-Associated Plexiform Neurofibromas. *J Invest Dermatol.* 129(3):615-21.
69. Tabone-Eglinger S, Bahleda R, Côté JF, Terrier P, Vidaud D, Cayre A, Beauchet A, Théou-Anton N, Terrier-Lacombe J, Lemoine A, Penault-Llorca F, Le Cesne A, Emile JF (2008) Frequent EGFR Positivity and Overexpression in High-Grade Areas of Human MPNSTs. *Sarcoma.* 2008:849156.
70. Thomas SL, DeVries GH (2007) Angiogenic Expression Profile of Normal and Neurofibromin-Deficient Human Schwann Cells. *Neurochem Res.* 32: 1129-1141.

71. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K (2000) Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cancer Res.* 60: 203-212.
72. Viskochil DH (2003) It takes two to tango: mast cell and Schwann cell interactions in neurofibromas. *J Clin Invest.* 112: 1791-1793.
73. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell.* 62: 187-192.
74. Von Recklinghausen F (1882) Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuomen: Festschrift zur Feier des fünfundzwanzigjährigen Bestehens des pathologischen Instituts zu Berlin. Herrn Rudolf Virchow dargebracht. Berlin: Verlag August Hirschwald.
75. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL et al. (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF-1 patients. *Science.* 249(4965): 181-186.
76. Weimann E, Kiess W (1991) Wachstumsfaktoren: Grundlagen, Biochemie und klinische Bedeutung; mit 36 Tabellen. Schattauer Stuttgart. 12: 412-417.
77. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL (2009) Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *Pediatrics.* 123(1): 124-133.
78. Woodruff JM (1999) Pathology of Tumors of the Peripheral Nerve Sheath in Type 1 Neurofibromatosis. *Am J Med Genet.* 26: 89(1): 23-30.
79. Wu J, Crimmins JT, Monk KR, Williams JP, Fitzgerald ME, Tedesco S, Ratner N (2006) Perinatal epidermal growth factor receptor blockade prevents peripheral nerve disruption in a mouse model reminiscent of benign world health organization grade I neurofibroma. *Am J Pathol* 168(5): 1686-96.

80. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF (2002) Neurofibromas in NF1: Schwann Cell Origin and Role of Tumor Environment. *Science*. 3; 296(5569):920-2.
81. Zietsch J, Ziegenhagen N, Heppner FL, Reuss D, von Deimling A, Holtkamp N (2010) The 4q12 amplicon in malignant peripheral nerve sheath tumors: consequences on gene expression and implications for sunitinib treatment. *PLoS One*. 5(7): e11858.

8 Danksagung

Ich bedanke mich im Besonderen bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Hagel für die Überlassung des Themas sowie die geduldige und unkomplizierte Unterstützung, welche er mir jederzeit entgegen brachte. Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Neuropathologischen Labors des UKE, allen voran Frau Pulkenat, Frau Rumpf und Herrn Haberkorn bedanken, welche mir beim Erlernen der nötigen Schnitt- und Färbetechniken halfen und mir während des praktischen Teils meiner Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Herrn Dr. Bernreuther danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinem lieben Mann Alexander, der mich, besonders in der theoretischen Phase der Arbeit, fortwährend unterstützt hat und unseren Sohn liebevoll betreute, sodass ich konzentriert arbeiten konnte. Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, insbesondere bei meinem Vater, welcher durch beständiges Nachfragen zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat sowie bei meinem Bruder für den Rückhalt.

9 Lebenslauf

Name:	Judith Anne Carolin Beer, geb. Ashauer
Geburtstag:	05.04.1978
Geburtsort:	Arolsen, jetzt Bad Arolsen
Familienstand:	verheiratet
Kinder:	1 Sohn
Wohnort:	Ahrensburg
Ausbildung/ Studium:	Musicalausbildung 1997-1998, Hamburg Historische Musikwissenschaften und Gesang 1998- 2001, Universität Hamburg Medizin 2001-2003, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen Medizin 2003-2007, Universität Hamburg
Staatsexamen:	Herbst 2007
Assistenzarztstätigkeit:	seit 2008 Klinik für Kinder- u. Jugendmedizin Neumünster.

10 Eidstattliche 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.

Unterschrift:

11 Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

EGFR = epidermal growth factor receptor

bFGF = basic fibroblast growth factor, FGF-2

VEGF = vascular endothelial growth factor

VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor

VPF = vascular permeability factor

RAS = rat sarcoma (Protoonkogen)

GTP = Guanosintri-phosphat

GDP = Guanosindiphosphat

MPNST = maligne periphere Nervenscheidentumoren

PNF = plexiformes Neurofibrom

LOH = Loss of heterozygosity

NF1 = Neurofibromatose Typ 1

Nf = Neurofibromin

11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeiten und Alter bei Auftreten der Klinischen Hauptmerkmale der Neurofibromatose Typ 1 (Ferner et al. 2007)

Tabelle 2: Angiogenesefaktoren/ -inhibitoren (aus Conway et al. 2001)

Tabelle 3: Mittelwerte Wachstumsfaktoren/ -rezeptor und Gefäßdichte vs. Tumortyp

Tabelle 4: Tumortyp vs. Dekade

Tabelle 5: Tumortyp vs. Lokalisation

11.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Angiogenese (aus Liu et al. 2006)

Abbildung 2: Anfärbung von VEGF in einem dermal/ diffusen Neurofibrom

Abbildung 3: Anfärbung von VEGF in einem plexiformen Neurofibrom

Abbildung 4: Anfärbung von bFGF in einem dermalen Neurofibrom

Abbildung 5: Anfärbung von EGFR in einem PNF eines 13-jährigen Patienten

Abbildung 6: Anfärbung von EGFR in einem PNF eines 70-jährigen Patienten

Abbildung 7: Anfärbung von Faktor VIII in einem MPNST

11.4 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Tumortyp vs. VEGF im Zytoplasma

Diagramm 2: Tumortyp vs. bFGF im Zytoplasma

Diagramm 3: Tumortyp vs. EGFR im Zytoplasma

Diagramm 4: Dekade vs. EGFR im Zytoplasma

Diagramm 5: Tumortyp vs. Gefäßdichte