

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik
Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Vaskularisation von Schwannomen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lena Roesberg
aus Hamburg

Hamburg 2018

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.09.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Reinhard Friedrich

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung und Arbeitshypothese	6
2 Einleitung	7
2.1 Neurofibromatose 2	7
2.1.1 Epidemiologie	7
2.1.2 Krankheitsbild und Diagnostische Kriterien	8
2.1.3 Genetik	9
2.1.4 Therapie	11
2.2 Schwannomatose	12
2.2.1 Epidemiologie	12
2.2.2 Krankheitsbild und Diagnostische Kriterien	12
2.2.3 Genetik	14
2.2.4 Therapie	17
2.3 Differentialdiagnosen	17
2.4 Histopathologie von Schwannomen	18
2.5 Aufbau von Gefäßen	20
2.6 Gefäßassoziierte Antigene	21
2.6.1 CD34	21
2.6.2 Ki-67	21
2.6.3 VEGFR 1	22
2.6.4 VEGFR-2	23
3 Material	25
3.1 Selektion des Patientenkollektivs	25
3.2 Reagenzien und Antikörper	27
3.3 Lösungen	29
3.4 Laborgeräte	30
3.5 Verbrauchsmaterialien	31
4 Methoden	32
4.1 Schnittherstellung	32
4.2 Elastica van Gieson Färbung	32
4.3 Turnbull Färbung	32

4.4	Immunhistochemie	33
4.5	Evaluation der Färbungen	33
4.5.1	Auswertung von Elastica van Gieson	34
4.5.2	Auswertung von CD34	34
4.5.3	Auswertung von Ki-67	34
4.5.4	Auswertung von Turnbull	35
4.5.5	Auswertung von VEGFR- 1 & VEGFR-2	35
4.6	Statistische Auswertung	35
5	Ergebnisse	37
5.1	Auswertung des Patientenkollektivs	37
5.2	Auswertung der Gefäßmorphologie in der Elastica van Gieson Färbung	37
5.2.1	Gefäßdichte	37
5.2.2	Gefäßlumen	39
5.2.3	Gefäßwanddicke	41
5.3	Morphologische Analyse der Gefäße mittels CD34-Markierung	43
5.3.1	Gefäßdichte	43
5.3.2	Gefäßradius	45
5.4	Auswertung der Ki-67-Markierung	48
5.4.1	Proliferationsindex der Tumorzellen	48
5.4.2	Proliferation der Endothelzellen	49
5.5	Tumorzelldichte	52
5.6	Auftreten von Tumorblutungen	52
5.7	Auswertung der VEGFR-1-Markierung	53
5.8	Auswertung der VEGFR-2-Markierung	55
6	Diskussion	57
7	Zusammenfassung	62
8	Summary	63
9	Abkürzungsverzeichnis	64
10	Abbildungsverzeichnis	66
11	Tabellenverzeichnis	67

12 Literaturverzeichnis	68
13 Anhänge	77
14 Danksagungen	88
15 Lebenslauf	89
16 Eidesstattliche Versicherung	90

1. Fragestellung und Arbeitshypothese

Schwannome sind benigne, typischerweise gekapselte Nervenscheidentumore, welche von den Schwannzellen der peripheren Nerven ausgehen.

Schwannome können sporadisch vorkommen oder im Rahmen hereditärer Erkrankungen entstehen. Beim Auftreten von multiplen Schwannomen kann in der Regel von einer hereditären Pathogenese ausgegangen werden. Multiple Schwannome sind häufig assoziiert mit Neurofibromatose Typ 2 (NF2) oder Schwannomatose. Obwohl beide Erkrankungen mit der Ausbildung von Schwannomen einhergehen, ist das klinische Erscheinungsbild stark unterschiedlich. Während die Schwannomatose durch das Leitsymptom Schmerz gekennzeichnet ist (Merker et al. 2012), ist bei der NF2 ein bilaterales Akustikusneurinom das Hauptkennzeichen (Evans et al. 1992).

Die Therapie besteht in der Regel in der chirurgischen Intervention sowie in den letzten Jahren auch in der Behandlung von den Akustikusneurinomen mit Angiogenesehemmern, wie z.B. Bevacizumab (Farschtschi et al. 2016).

Für die Wirkung von Angiogenesehemmern spielen die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) eine entscheidende Rolle.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob morphologische und immunhistochemische Unterschiede in der Vaskularisation sporadischer Schwannome und syndromal bedingter Schwannome zu finden sind. Es wird die Frage diskutiert, ob sich aufgrund der Ergebnisse Optionen für eine Therapie mit VEGF-Antagonisten ableiten lassen.

Hypothese: Periphere Schwannome mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund unterscheiden sich bezüglich morphometrischer Kriterien und der Antigenexpression in ihrer Vaskularisation.

2 Einleitung

Schwannome zählen zu den häufigsten benignen Tumoren, die von den Schwannschen Zellen der peripheren Nerven ausgehen (Adani et al. 2008). Sie sind charakterisiert durch ein langsames und nicht infiltrierendes Wachstum.

Sie können bei ausreichender Größe z.B. eine Dysästhesie und Ausfallerscheinungen hervorrufen (Adani et al. 2008).

Schwannome werden meist sporadisch als solitäre Tumoren beobachtet. Das Auftreten von multiplen Schwannomen spricht meistens für eine syndromale Grunderkrankung wie Schwannomatose oder Neurofibromatose 2. Diese Erkrankungen werden im Folgenden beschrieben.

2.1 Neurofibromatose 2

2.1.1 Epidemiologie

Neurofibromatose 2 (NF2) wird autosomal-dominant vererbt und gehört zu der Gruppe der neurokutanen Syndrome (früher: Phakomatosen). Erstmals wurde NF2 1822 von dem schottischen Chirurgen James Wishart dokumentiert (Wishart 1822).

Die Inzidenz wurde lange Zeit mit 1:40.000 angegeben (Evans et al. 1992). Aufgrund der Entwicklung in der Diagnostik und der Einbeziehung von u.a. Mosaikformen einer Neurofibromatose wurde die Inzidenz auf 1:25.000 (Evans et al. 2005) korrigiert.

Ungefähr 50% der Fälle entstehen durch Neumutationen ohne einen familiären genetischen Hintergrund (Evans 1995).

2.1.2 Krankheitsbild und Diagnostische Kriterien

Die häufigste Manifestation ist das bilaterale Akustikusneurinom (Evans et al. 1992), welches zu Hörverlust und Gleichgewichtsstörungen führen kann.

Zusätzlich zu multiplen Schwannomen (Halliday, Sobel und Martuza 1991) treten häufig Meningeome sowie Ependymome auf. Unter Meningeomen versteht man Tumore, welche von den arachnoidalen Deckzellen der Hirnhäute ausgehen. Ependymome sind Neoplasien, deren Ursprung Ependymzellen bilden.

Meningeome treten in 54% der Fälle intrakranial und in 42% der Fälle intraspinal auf (Rodriguez und Berthrong 1966). Auch die Ependymome treten im zentralen Nervensystem auf und zeigen sich häufig als multiple Läsionen (Rodriguez und Berthrong 1966). NF2-assoziierte Gliome sind den Ependymomen zuzuordnen, welche in 88% im Hirn und in 12% im Spinalkanal auftreten (Hagel et al. 2012).

Die Diagnostik ist bei Kindern sowie bei mildereren Verlaufsformen, wie z.B. der Mosaikbildung, erschwert (Kluwe et al. 2003).

Neben den bereits beschriebenen Manifestationen gibt es folgende Kriterien, die laut des National Institutes of Health (NIH) auf eine NF2 schließen lassen. Diese Kriterien wurden 1987 erstmals definiert und seitdem fortlaufend modifiziert (NIH 1988). Die Modifikationen und Aktualisierungen der Manchester Kriterien hatte zur Folge, dass Patienten ohne familiären Hintergrund und ohne bilaterales Akustikusneurinom identifiziert und erfasst werden können (Baser et al. 2003).

Laut des NIH ist das Vorhandensein von mindestens einem der folgenden Merkmale ein Kriterium für NF2 (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 – Manchester Kriterien modifiziert nach Baser et al. 2003

Kriterien NF2 laut National Institutes of Health (Manchester Kriterien)
<ul style="list-style-type: none">• Bilaterales Akustikusneurinom
<ul style="list-style-type: none">• Ein Verwandter 1. Grades mit NF2 <u>und</u> ein unilaterales Akustikusneurinom oder mindestens zwei der folgenden Kriterien: Meningeom, Schwannom, Gliom, Neurofibrom, Katarakt
<ul style="list-style-type: none">• Unilaterales Akustikusneurinom <u>und</u> zwei der folgenden Kriterien: Meningeom, Schwannom, Gliom, Neurofibrom, Katarakt
<ul style="list-style-type: none">• Multiple Meningeom <u>und</u> ein unilaterales Akustikusneurinom oder zwei der folgenden Kriterien: Schwannom, Gliom, Neurofibrom, Katarakt

NF2 kann außerdem abhängig vom Schweregrad der Erkrankung in zwei unterschiedliche Typen eingeteilt werden. Es wird der Gardner- und der Wishart Typ unterschieden.

Die Gardner-Variante wird typischerweise erst im Erwachsenenalter diagnostiziert und umfasst bilaterale Akustikusneurinome und tritt in einer mildereren Verlaufsform auf. Der Wishart-Typ ist die schwere Form und präsentiert sich meist schon im Jugendalter. Wie in 2.1.3 beschrieben, geht eine schwerere klinische Ausprägung in der Regel mit *Non-Sense*- und *Frameshift*- Mutationen einher (Baser et al. 2004).

Die apparative Diagnostik umfasst MRT-Untersuchungen, molekulare Diagnostik und ophthalmologische Untersuchungen.

2.1.3 Genetik

Das NF2 Gen liegt auf dem Chromosom 22q12. Es können 2 Isoformen des Proteins identifiziert werden (Rouleau et al. 1989).

Das Protein, welches von dem NF2 Gen kodiert wird, ist Merlin (kurz für *moesin-ezrin-radixin-like-protein*) (Gusella et al. 1999, Trofatter et al. 1993). Es zeigt einen ähnlichen Aufbau zum Protein 4.1, welches für die Verknüpfung von Bestandteilen des Zytoskelettes verantwortlich ist. Studien zeigen, dass Merlin

sich ähnlich zu den Proteinen der Ezrin-Radixin-Moesin-Gruppe (ERM) verhält, allerdings zeigt sich ein Unterschied in der intramolekularen Interaktion bei der Isoform 2, welche von Exon 1-16 codiert wird.

Mehrere Keimbahnmutationen und somatische Mutationen des NF2 Gens sprechen für die Hypothese, dass das Gen zu den Tumorsuppressorgenen gezählt werden kann (Gusella et al. 1999). Obwohl der genaue Prozess noch nicht bekannt ist, geht man nach heutiger Studienlage davon aus, dass Merlin eine Verknüpfung zwischen den Proteinen und dem Zytoskelett bewirkt und die Tumorsuppressoreigenschaft durch die Regulierung der Signalübertragung in die Zelle ausgeübt wird. Des Weiteren ist nach heutiger Studienlage bekannt, dass Merlin Prozesse der Wachstumsfaktoren koordinieren kann (McClatchey und Giovannini 2005) (Abbildung 1).

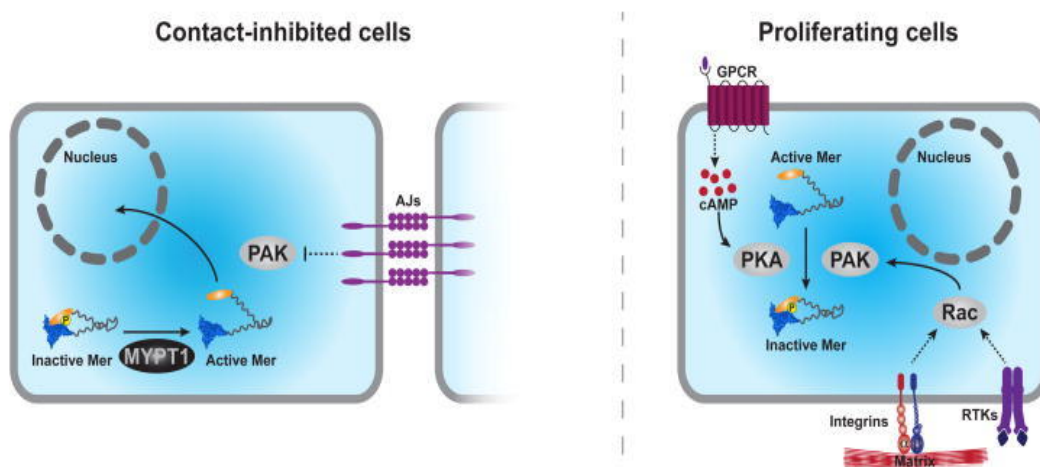


Abbildung 1 – links: Regulation von Merlin in der Zelladhäsion durch PAK Inhibition. Durch MYP-1 vermittelte Dephosphorylierung kann Merlin aktiviert werden, **rechts:** Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) stimulieren Rac, welches PAK aktiviert. In der Folge wird Merlin phosphoryliert und liegt inaktiv vor. Durch einen hohen cAMP Spiegel phosphoryliert PAK Merlin, wodurch es ebenfalls inaktiviert wird (Cooper und Giancotti 2014)

Für den Ausprägungsgrad der NF2-Erkrankung ist die Art der Mutation verantwortlich. *Non-Sense*- und *Frameshift*-Mutationen sind mit einer stärkeren klinischen Ausprägung assoziiert (Baser et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigt sich bei einer *Miss-Sense*- oder *Large-Deletion*-Mutation ein milderes klinisches Bild. Die Art der Mutation spielt eine wichtige Rolle für die Anzahl der Tumore und intrakraniellen Meningeome (Baser et al. 2004).

2.1.4 Therapie

Die Therapie der NF2 umfasst regelmäßige Kontrollen durch einen erfahrenen Spezialisten sowie regelmäßige ophthalmologische Untersuchungen und Hörtests, um bei neurologischen Ausfällen bzw. beginnendem Hörverlust rechtzeitig intervenieren zu können.

Eine kausale medikamentöse Therapie ist derzeit nicht bekannt, allerdings zeigen Studien, dass eine Therapie mit anti-VEGF, z.B. Bevacizumab (Handelsname: Avastin), einen positiven Effekt haben kann (Linda und Recht 2016, Farschtschi et al. 2016). Bei Patienten mit einem Akustikusneurinom konnte in einigen Fällen eine Verbesserung des Hörvermögens erreicht werden (Mautner et al. 2010). Entzündungshemmende Medikamente können nach einer Studie von Dilwali et al. ebenfalls das Wachstum von Schwannomen hemmen (Dilwali et al. 2015).

Unterstützend kann Physiotherapie dazu beitragen, die Mobilität zu erhalten und einer Muskelatrophie entgegen zu wirken (Schulz et al. 2017), die bei NF2 im Rahmen einer Polyneuropathie auftreten kann.

2.2 Schwannomatose

2.2.1 Epidemiologie

Die Schwannomatose gehört ebenfalls zu der Gruppe der neurokutanen Syndrome.

Erstmals wurde das Krankheitsbild in den 70er Jahren von dem Japaner Phalen beschrieben (Phalen 1976), allerdings prägte MacCollin in 1996 erstmals den Begriff der Schwannomatose und definierte es als eigenständiges Krankheitsbild (MacCollin et al. 1996).

Die Schwannomatose kann grundsätzlich in jedem Alter symptomatisch werden, sie tritt aber vornehmlich zwischen dem 30.-60. Lebensjahr auf.

Die Studienlage zur Inzidenz der Schwannomatose ist heute noch nicht ausreichend gesichert, man vermutet, dass sie eine der NF2 vergleichbare Häufigkeit hat. Eine Vielzahl der Fälle (ca. 85%) entstehen sporadisch. Eine familiäre Schwannomatose ist mit 10-15% der Fälle selten (MacCollin et al. 1996).

2.2.2 Krankheitsbild und Diagnostische Kriterien

Das Krankheitsbild der Schwannomatose ist wie bei NF2 sehr vielfältig.

Es bilden sich multiple benigne Schwannome an den peripheren Nerven (89%), sowie an den Spinalnerven (74%) aus (Merker et al. 2012).

Kutane Schwannome sind in der Regel plexiform, wodurch mehrere Nervenfaszikel oder Nervenplexus im Wachstum beteiligt sind. Außerdem klagen die Patienten über starke Schmerzen, welche einen wichtigen Unterschied zur NF2 darstellen und Schmerz zu einem der Leitsymptome bei Schwannomatose machen (Merker et al. 2012). Die Schmerzen können lokal oder diffus sein (MacCollin et al. 2005). Weitere molekulare und genetische Unterschiede führen dazu, dass die Schwannomatose als eigenständiges Krankheitsbild definiert wurde (MacCollin et al. 2003). Plotkin et al. erweiterten die Kriterien, indem sie die molekulare Diagnostik mit einbezogen (Plotkin et al. 2013).

Ein wichtiger Unterschied zur NF2 besteht im Fehlen von bilateralen Akustikusneurinomen. Eine Keimbahnmutation des NF2 Gens ist nicht nachweisbar (Baser, Friedman und Evans 2006).

Die Tabellen 2 und 3 zeigen die aktuellen diagnostischen Kriterien für die Schwannomatose:

Tabelle 2 – Diagnostische Kriterien einer Schwannomatose nach MacCollin et. al. 2003

Kriterien für eine definitive Schwannomatose
<ul style="list-style-type: none"> • 2 oder mehrere Schwannome (nicht dermal, pathologisch bestätigt) <u>und</u> kein bilaterales Akustikusneurinom (bestätigt mittels MRT)
<ul style="list-style-type: none"> • ein Schwannom oder Meningeom (pathologisch bestätigt) <u>und</u> ein Verwandter ersten Grades mit Schwannomatose
Kriterien für eine mögliche Schwannomatose
<ul style="list-style-type: none"> • Alter <30 Jahre <u>und</u> mindestens zwei nicht intraepidermale Schwannome, davon mind. eines mit histologischem Nachweis <u>und</u> kein Akustikusneurinom <u>und</u> keine NF2 Keimbahnmutation
<ul style="list-style-type: none"> • Alter >45 Jahre <u>und</u> mindestens zwei nicht intraepidermale Schwannome, davon mind. eines mit histologischem Nachweis <u>und</u> keine Dysfunktion des 8. Hirnnervs <u>und</u> keine NF2 Keimbahnmutation
<ul style="list-style-type: none"> • Bildmorphologischer Nachweis von Schwannomen <u>und</u> ein Verwandter 1. Grades, der die o.g. Kriterien erfüllt

Tabelle 3 – Diagnostische Kriterien nach Plotkin et al. 2013

Kombinierte molekulargenetische und klinische Diagnose
<ul style="list-style-type: none"> • Zwei oder mehr histopathologisch bestätigte Schwannome oder Meningeome und mindestens 2 Schwannome mit Nachweis von LOH von Chromosom 22 und zwei verschiedenen NF2 Mutationen. Beim Nachweis einer SMARCB1-Mutation besteht eine SMARCB1 assoziierte Schwannomatose.
Klinische Diagnose
<ul style="list-style-type: none"> • Zwei oder mehr nicht intradermale Schwannome, davon eines mit histologischem Nachweis und keinem bilateralem Akustikusneurinom (einige NF2 Patienten mit Mosaikverläufen werden in jungen Jahren in der Diagnose miteingeschlossen, einige Schwannomatose Patienten hingegen besitzen unilaterale Vestibularisschwannome oder multiple Meningeome) oder ein histologisch gesichertes Schwannom oder intrakraniales Meningeom und Verwandter 1. Grades, der die o.g. Kriterien erfüllt
Fehlen der diagnostischen Kriterien einer NF2 (Manchester Kriterien oder NNFF Kriterien)
<ul style="list-style-type: none"> ○ Akustikusneurinome ○ Subkapsuläre Katarakt ○ NF2-Mutation in der Blut DNA ○ Verwandter 1. Grades mit der Diagnose NF2 ○ Multiple Meningeome oder Neurofibrome

2.2.3 Genetik

Nach heutigem Wissensstandard sind die wichtigsten Gene in der Entwicklung der Schwannomatose SMARCB1 und das LZTR1 (Smith et al. 2012).

Das SMARCB1 Gen liegt auf Chromosom 22q11.23 und wird als das Schwannomatose prädisponierende Gen bei den familiären Fällen bezeichnet (Hulsebos et al. 2007).

SMARCB1 wird heute als ein Tumorsuppressorgen angesehen, bei dem beide Kopien im Tumor inaktiviert sein müssen (Boyd et al. 2008). Genetische Studien

zeigen, dass Mutationen im SMARCB1-Tumorsuppressor-Gen in 40-50% der familiären Fälle und in 8-10% der sporadischen Fälle von Schwannomatose auftreten (Plotkin et al. 2013).

Die Tumorgenese und den damit verbundenen Verlust des SMARCB1 Gens bezeichnet man auch als *4-hit/3-step model*. Wie die Abbildung 2 zeigt, ist der erste Schritt die Keimbahnmutation des SMARCB1 Gens, gefolgt von dem Verlust des zweiten Allels des SMARCB1 Gens und des NF2 Gens auf Chromosom 22 (bezeichnet als Hit 2 und 3). Anschließend erfolgt eine somatische Mutation des noch verbliebenen NF2 Gens.

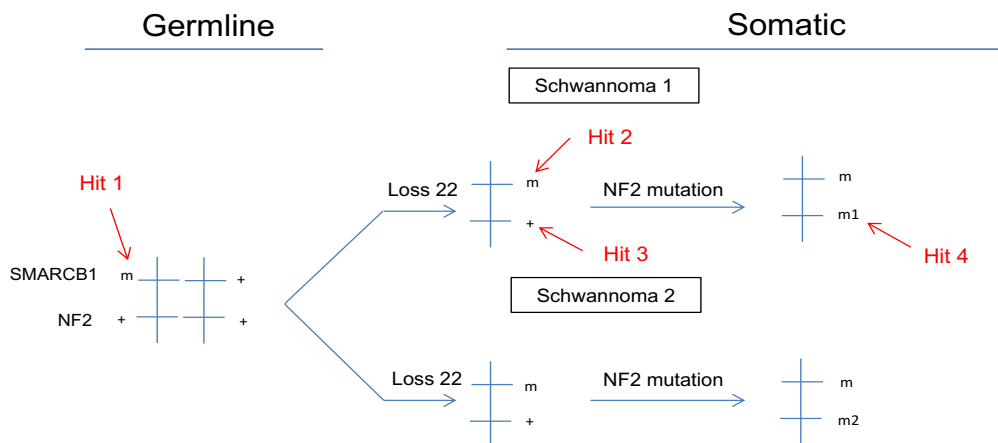


Abbildung 2 – 4-hit/3-step model

Die Tumorgenese bei der Schwannomatose beginnt mit der Keimbahnmutation des SMARCB1 Gens (Hit 1), gefolgt vom Verlust des 2. Allels des SMARCB1- und NF2 Gens (Hit 2 & 3), schließlich kommt es zur somatischen Mutation des verbliebenen NF2 Gens (Hit 4) (Plotkin et al. 2013)

Des Weiteren kann es durch Mutation des SMARCB1 Gens zur Ausbildung eines Rhabdoid Tumors kommen (Smith et al. 2014).

Das andere bereits beschriebene Gen, welches zur Tumorausbildung führen kann, ist das in 2014 entdeckte Tumorsuppressorgen LZTR1. Es ist ebenfalls auf dem Chromosom 22q11.21 lokalisiert und liegt proximal des SMARCB1 Gens (Abbildung 3).

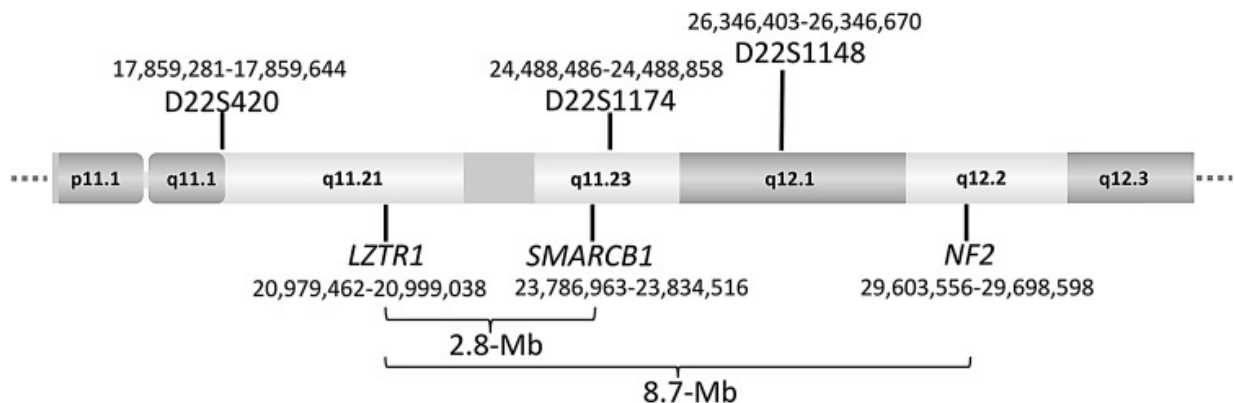


Abbildung 3 – Aufbau Chromosom22 (Ausschnitt) (Kehrer-Sawatzki et al. 2017)

Auch bei diesem Gen wird eine Keimbahnmutation mit einem *4-hit/3-step model* vermutet (Paganini et al. 2015).

Bei Patienten ohne Keimbahnmutation des SMARCB1 Gens war bei 40% der familiären Fälle und bei 25% der sporadischen Fälle eine Mutation des LZTR1 Gens zu finden (Hutter et al. 2014, Paganini et al. 2015, Smith et al. 2015)

Die Tatsache, dass nicht alle Fälle auf eine Mutation des SMARCB1- oder des LZTR1 Gens zurückzuführen sind, deutet darauf hin, dass es noch weitere Gene gibt, die in der Tumorgenese eine Rolle spielen (Hutter et al. 2014).

2.2.4 Therapie

Wie bei anderen Schwannomen wird bei Schwannomatose-assoziierten Tumoren in der Regel symptomatisch behandelt. Bei starken neurologischen Ausfällen oder Schmerzen besteht die Möglichkeit der operativen Entfernung des Tumors (Merker et al. 2012).

Allerdings haben ca. 45% der Patienten nach der Operation postoperative Defizite (Merker et al. 2012). Eine weitere Möglichkeit ist die Gabe von Analgetika und Opioiden. 62% der Patienten geben an, dass sie eine Medikation während ihrer Behandlung erhalten haben (Merker et al. 2012).

Eine Radiatio wird aufgrund des möglichen Risikos einer Malignisierung des Prozesses bei der bereits vorbestehenden Schädigung des Genoms nach Möglichkeit vermieden.

2.3 Differentialdiagnosen

Zu den Differentialdiagnosen von NF2 und Schwannomatose zählt die Neurofibromatose 1 (NF1). NF1 gehört ebenfalls zur Gruppe der neurokutanen Syndrome und wurde erstmals 1882 durch Friedrich Daniel von Recklinghausen beschrieben (Recklinghausen 1882). NF1 wird autosomal-dominant vererbt und kommt mit einer Inzidenz von ca. 1:3000 vor und ist damit eine der häufigsten genetischen Erkrankungen des Menschen (Evans et al. 2010). NF1 ist durch das Auftreten von multiplen Neurofibromen im Bereich der Haut, der peripheren Nerven und Spinalnerven sowie der Ausbildung von Gliomen gekennzeichnet. Die Betroffenen zeigen außerdem Pigmentanomalien, die sog. *Café-au-lait* Flecken und Lisch-Knötchen (Seizinger et al. 1987).

Der Gendefekt beruht auf einer Mutation auf dem Chromosom 17q11.2 (Seizinger et al. 1987), die das für Neurofibromin kodierende Gen betrifft. Zu einer malignen Entartung kommt es bei den plexiformen Neurofibromen in ca. 10% der Fälle (Hirbe und Gutmann 2014).

2.4 Histopathologie von Schwannomen

Schwannome (WHO Grad 1) lassen sich histologisch als plexiformes, konventionelles, zelluläres oder melanotisches Schwannom einteilen (Rodriguez et al. 2012).

Makroskopisch imponieren Schwannome in der Regel als globoide Massen mit einem Durchmesser von weniger als 10cm und einer gelblichen Schnittfläche. Der Tumor besteht aus Schwannzellen, ist bekapselt und in der Regel benigne. Die Kapsel besteht aus EMA-reaktiven perineuralen Zellen. Nah der Tumorkapsel finden sich häufig residuelle Nervenfasern. Histologisch betrachtet existieren zwei Gewebsbilder, die Antoni A und B Form.

Antoni A ist faserreich mit länglichen Zellen und zeigt stellenweise eine palisadenartige Anordnung der Zellkerne. Diese nennt man auch *Verocay Bodies*. Im Gegensatz dazu hat die Antoni B Form netzartig angeordnete Zellen und ist eher faserarm. Antoni B zeigt oft regressive Veränderungen, wie z.B. myxoide Degeneration (Ulrich Welsch 2014). Antoni A dominiert in Tumoren vom Spinalkanal und in zellulären Schwannomen. Vestibuläre Schwannome haben eine Prädominanz zu Antoni B Arealen mit wenig *Verocay* Körpern und Schaumzellnestern (Scheithauer 2007).

Regressive Veränderungen zeigen sich in Form von Schaumzellen, Hämorrhagien, Fibrosierung und Zystenbildung.

Schwannome sind S100 Protein immunreaktiv (Jokinen et al. 2008). Eine Reaktivität mit Leu-7-Antikörpern ist ebenfalls möglich, aber nicht so häufig anzutreffen wie die Reaktivität auf S100 (Johnson, Glick und Davis 1988), weswegen S100 als bedeutsamster Marker für die Identifizierung von Schwannomen gezählt werden kann.

Das Ansprechen auf S100 stellt den größten Unterschied zu den MPNST dar, die meist nicht positiv auf S100 reagieren.

CPI-17, ein spezifischer Myosin Phosphatase Inhibitor, wird exklusiv in Schwannomzellen exprimiert, nicht jedoch in Neurofibromen oder malignen peripheren Nervenscheidentumoren (Hagel et al. 2016).

Schwannome entarten nur sehr selten zu einem malignen peripheren Nervenscheidentumor (Woodruff et al. 2003).

2.5 Aufbau von Gefäßen

Die Wand einer Arterie oder Vene zeigt mikroskopisch einen dreischichtigen Aufbau. Von innen nach außen bezeichnet man die Schichten als Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia/externa (Ulfig 2015). Die Media ist in der Regel die breiteste Schicht und besteht überwiegend aus glatten Muskelzellen. Die Muskelzellen sind zirkulär angeordnet. Sie stehen über *gap junctions* oder *tight junctions* miteinander in Verbindung (Ulfig 2015).

In den Arterien existieren zwei zusätzliche Lamellen, die Membrana elastica interna und die elastica externa. Diese liegen jeweils zwischen der Intima und Media, bzw. zwischen Media und Adventitia.

Innerviert werden die Gefäße von sympathischen und parasymphatischen Fasern (Lüllmann-Rauch 2003). Die marklosen Nervenfasern des vegetativen Nervensystems innervieren die glatten Muskelzellen der Intima in Form einer *Synapse à distance* (Lüllmann-Rauch 2003). Es handelt sich hierbei um keine echte Synapse, da zwischen den Nervenendigungen und der Zielzelle ein relativ großer Abstand besteht und sie keinen synaptischen Spalt aufweist.

Die Angiogenese neuer Gefäße geht von dem Endothel aus. Von hier bildet sich ein Gewebezapfen, welcher mit weiteren Zapfen fusioniert und so eine Schlinge bildet (Lüllmann-Rauch 2003). In Folge weiterer Verschmelzungen bildet sich ein neues Lumen aus.

Jegliche Angiogenese geht mit einem Umbau von der Extrazellulärmatrix einher, welche von Faktoren von minderversorgten oder schnellwachsenden Geweben stimuliert wird (Lüllmann-Rauch 2003). Einer der wichtigsten pro-angionetischen Faktoren hierbei ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (vgl. 2.6.3) (Lüllmann-Rauch 2003).

2.6 Gefäßassoziierte Antigene

Zum immunhistochemischen Nachweis von Gefäßen bieten sich mehrere Marker bzw. Antikörper an, die gegen spezifische Strukturproteine gerichtet sind.

2.6.1 CD34

CD34 ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 116kDa. Es ist hoch glykosyliert und wird durch die Proteinkinase C phosphoryliert (Kong et al. 2016). Das Antigen wird von Endothelzellen exprimiert. Zu den Aufgaben von CD34 gehört zum einen die Zelldifferenzierung und Proliferation, zum anderen die Adhäsionskontrolle.

CD34 Antikörper eignen sich zur Darstellung von hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen. Die Kapillaren der meisten Gefäße sind ebenfalls CD34 positiv (Fina et al. 1990).

2.6.2 Ki-67

Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, der eingesetzt wird, um Kerne von Zellen zu markieren, die sich außerhalb der G0-Phase des Zellzyklus befinden. (Gerdes et al. 1983).

Während der Interphase des Zellzyklus befindet sich Ki-67 im Zellkern. Während der weiteren Zellteilung kommt es zum Auflösen des Zellkerns. In dieser Phase kann sich das Protein an die Chromosomen anlagern (Scholzen und Gerdes 2000).

Der Anteil auf Ki-67 positiver Zellen wird mit dem sog. Ki-67-Proliferationsindex angegeben (Scholzen und Gerdes 2000).

2.6.3 VEGFR 1

Vaskuläre Wachstumsfaktoren, darunter der schon erwähnte VEGF, sind eine Gruppe von Proteinen, die von Zellen wie zum Beispiel Makrophagen oder Tumorzellen exprimiert werden (Boocock et al. 1995). Erstmals wurde VEGF in den 80er Jahren von Ferrara et al. beschrieben (Ferrara und Henzel 1989). Vaskuläre Wachstumsfaktoren sind Mediatoren in der physiologischen, aber auch der pathologischen Angiogenese, z.B. während des Tumorwachstums.

VEGF fördert im Tumor die Regulation der Vaskularisation und der Angiogenese. VEGF wirkt über zwei verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, die fast ausschließlich in Endothelzellen exprimiert werden (Neufeld et al. 1999). Sie bestehen aus einer extrazellulären Immunglobulindomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne (Smith et al. 2015). VEGFR-1 und VEGFR-2 bilden nach Ligandenbindung Homodimere oder Heterodimere aus (vgl. Abb. 4). Diese Dimere induzieren die Signaltransduktion (Olsson et al. 2006). Die Hauptaufgabe von VEGFR-1 besteht in der Förderung und Entwicklung der embryonalen Angiogenese und wird hauptsächlich für die Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wie den Monozyten benötigt.

VEGF-A bindet an VEGFR-1 mit einer sehr hohen Affinität von $K_d=1^{-10}$ pmol. Außerdem bindet an VEGFR-1 der *placenta growth factor* (PlGF) und VEGF-B, welche nicht an VEGFR-2 binden können. VEGFR-1 kann, je nach aktivierendem Ligendentyp, anti- und pro-angiogenetische Signalisierung vermitteln (Zachary 2003). Die negative Regulierung besteht aus der Maskierung von VEGF-A, wodurch dieser Faktor weniger für VEGFR-2 verfügbar ist.

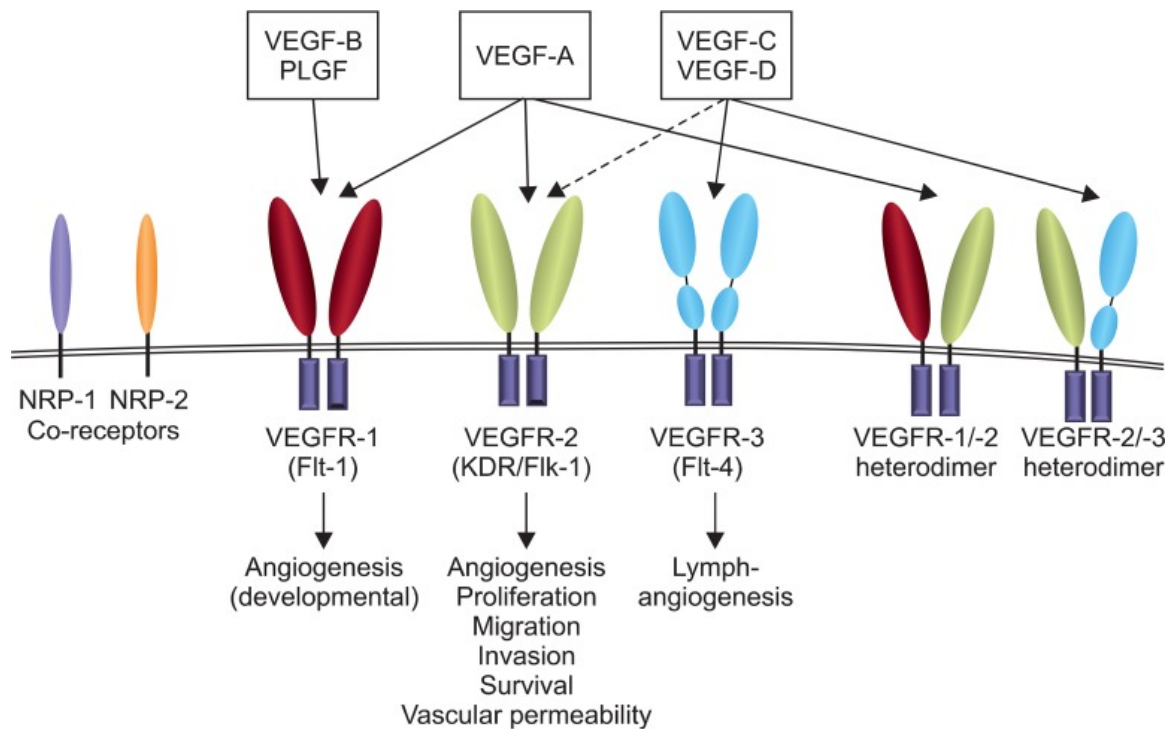


Abbildung 4 – Interaktion von VEGF mit den VEGF-Rezeptoren und deren Wirkung, VEGFR: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor, VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, PLGF: placental growth factor, NRP: Neuropilin (Bae et al. 2015)

2.6.4 VEGFR-2

VEGFR-2 ist für die vaskulären endothelialen Zellen essentiell (Olsson et al. 2006). VEGF-A bindet an VEGFR-2 und fördert die Angiogenese, Proliferation und Migration (vgl. Abb. 4). Die Bindung ist ca. 10-mal schwächer als die Bindung mit VEGFR-1, allerdings ist die Kinaseaktivität von VEGFR-2 deutlich höher (Waltenberger et al. 1994).

Durch die Bindung und anschließende Dimerisierung des Rezeptors, kommt es zur Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase und zur Aktivierung von weiteren Kinase-Signalwegen. Dies verursacht eine zelluläre Proliferation (Fontanella et al. 2014).

Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler IgG Antikörper, bindet an VEGFR-2 und blockiert damit die Bindung von VEGF-A was zu einer anti-angiogenetischen Aktivität führt (Culy 2005) (Abbildung 5).

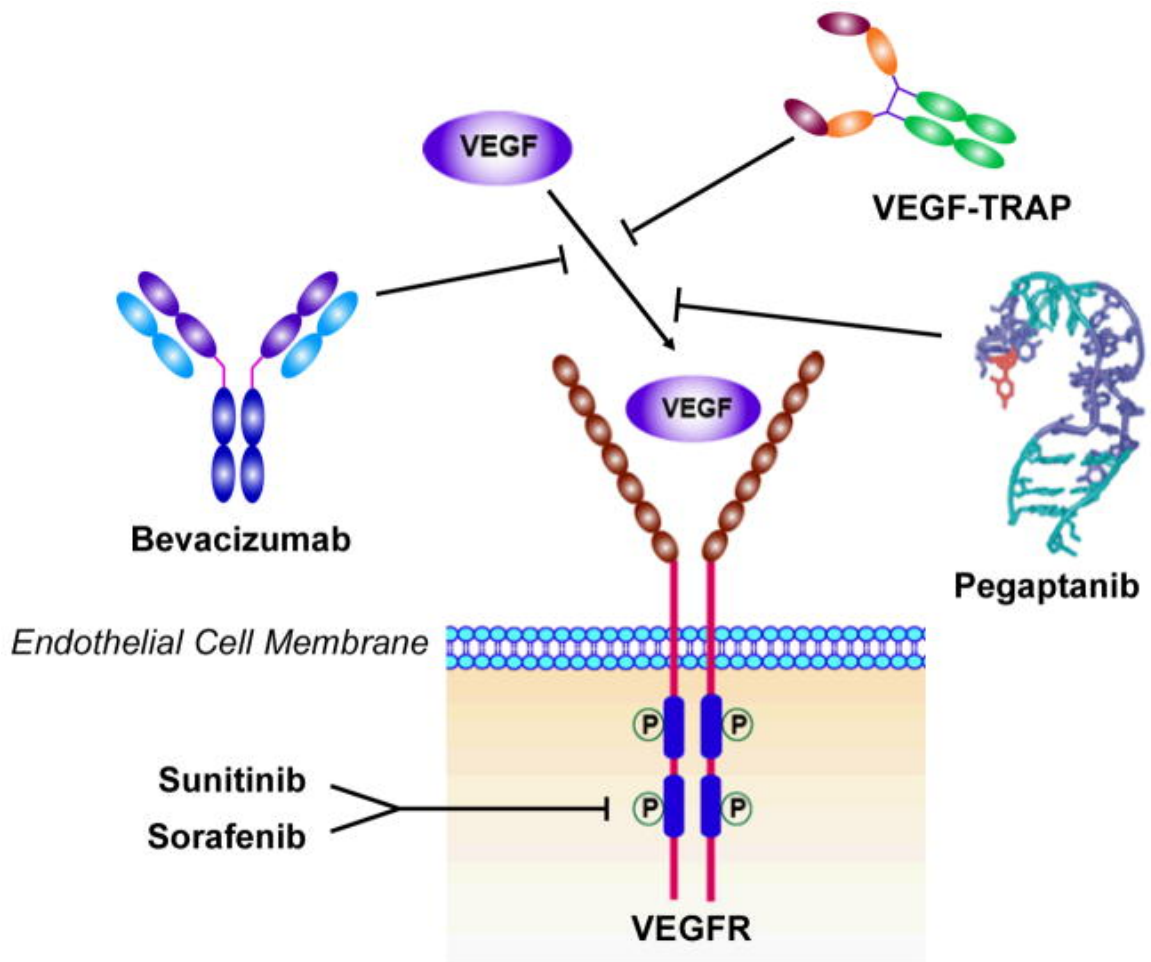


Abbildung 5 – VEGF Bindung sowie anti-VEGF Wirkstoffe mit deren Angriffspunkt, VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, VEGFR: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor (Niu und Chen 2010)

3 Material

3.1 Selektion des Patientenkollektivs

Alle Patienten, die in dieser Studie eingeschlossen waren, wurden im Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) untersucht und hatten – sofern es sich nicht um sporadische Tumoren handelte – entsprechend den Konsensus Kriterien (Plotkin et al. 2013) eine gesicherte Diagnose der Schwannomatose oder durch die Manchester Kriterien die Diagnose der NF2 (Baser et al. 2003). Alle Patientenproben wurden in dem Institut für Neuropathologie des UKE nach der Operation untersucht. Für diese Untersuchung wurden alle Probanden mittels ID Nummern anonymisiert. Es wurden drei unterschiedliche Patientengruppen definiert. Gruppe 1 entsprach den sporadischen Schwannomen, Gruppe 2 Neurofibromatose 2-assoziierten Schwannomen und Gruppe 3 den Tumoren von Patienten mit einer Schwannomatose. Es wurde zur Erhebung der Daten jeweils die Erstoperation des Patienten gewählt.

Das Patientendurchschnittsalter der Gruppen ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4 – Durchschnittsalter der Patientenkollektive

Gruppe	Durchschnittsalter in Jahren
Gruppe 1 (sporadische Schwannome)	46,6
Gruppe 2 (NF2)	27,5
Gruppe 3 (Schwannomatose)	38,3

38 Proben stammten von weiblichen Patienten und 27 von männlichen. Bei 3 Patienten war das Geschlecht sowie das Alter nicht bekannt. Zunächst wurde das Tumormaterial von 114 Patienten einbezogen, welches sich bereits in den Standardfärbungen im Archiv der Neuropathologie befand. Diese Proben wurden von Prof. Dr. C. Hagel und der Verfasserin der Dissertation daraufhin geprüft, ob es sich um periphere Schwannome handelte und ob eine ausreichende Menge

an Tumormaterial für die weitere Auswertung enthalten war. Am Ende der Selektion umfasste das Kollektiv 67 Patienten (Tabelle 5).

Tabelle 5 – Aufteilung des Kollektivs auf die untersuchten Gruppen

Kohorte	Anzahl der Fälle
Gruppe 1 (sporadische Schwannome)	27
Gruppe 2 (NF2)	22
Gruppe 3 (Schwannomatose)	19

3.2 Reagenzien und Antikörper

Im Folgenden werden die in der Studie verwendeten Reagenzien (Tab. 6) und Antikörper (Tab. 7) aufgelistet.

Tabelle 6 – Verwendete Reagenzien, alphabetisch sortiert

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
2. LCS (ready-to-use)	Ventana Roche	650-010 2L
2x SSC (Konzentrat)	Ventana Roche	950-110 2L
Ammoniumsulfid	Merck	#1.05442.1000
Amplifier A	Ventana Roche	#253-2122
Amplifier B	Ventana Roche	#253-2123
Bluing Reagent	Ventana Roche	#760-2037
CC1 (ready-to-use)	Ventana Roche	950-124 2L
CC2 (ready-to-use)	Ventana Roche	950-123 2L
Eisen-3-Chloridlösung konz. DAB6	Merck	#1.05512.0250
Ethanol 80%, 96%, 100%	Apotheke UKE	
EZ Prep Konzentrat	Ventana Roche	950-120 2L
Glas Mounting Medium	Sakura	#1408
Hämatoxylin kristallin	Merck	#1.04302.0100
Hematoxylin	Ventana Roche	#760-2021
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck	#1.04973.1000
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlsg.	Roth	#N069.1
Pikrinsäure	Waldeck	#2E086
Protease 1	Ventana Roche	#760-2018
Reaction buffer (Konzentrat)	Ventana Roche	950-300 2L
Resorchin-Fuchsin	Waldeck	#2E030
Salzsäure 25%	Merck	#1.00316.1000
Thiazinrot R	Waldeck	#1A416
Ultraview Universal DAB Detection Kit	Ventana Roche	#760500

<ul style="list-style-type: none"> – 25ml ultraview Universal DAB Inhibitor – 25ml ultraview Universal HRP Multimer – 25ml ultraview Universal DAB Chromogen – 25ml ultraview Universal DAB H₂O₂ – 25ml ultraview Universal DAB Copper 		
Xylol	ChemSolute/Th. Geyer	#326.2500

Tabelle 7 – Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Antikörper	CD34	Ki67	VEGF1	VEGF2
Hersteller	Dako	Neo Markers	Santa Cruz	Santa Cruz
Bestellnummer	M7165	RM-9106 S	SC316	SC504
Vorbehandlung	Keine	Mikrowelle, Citratpuffer	Citratpuffer, CC1St	Citratpuffer CC1St
Verdünnung	1:100	1:1000	1:00	1:100

3.3 Lösungen

In der Tabelle 8 und 9 sind alle verwendeten Lösungen aufgelistet, die für die van Gieson (v.G.) und Turnbull Färbung verwendet wurden. Tabelle 10 zeigt die verwendeten Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen in der Ventana.

Tabelle 8 – verwendete Lösungen für van Gieson, alphabetisch sortiert

Bezeichnung	Lösungen
Eisenhaematoxylin nach Weigert	Lösung A: 475ml Aqua dest. Mit 5ml HC 25% und 20ml Eisen-3-Chloridlösung mischen Lösung B: 10g Hämatoxylin in 1000ml 96% Ethanol lösen Lsg. A+B zu gleichen Teilen mischen
HCL Alkohol	6ml HCL 25% in 500ml Ethanol 96% geben
Van Gieson Farbstoff	200ml Pikrinsäure (gesättigt) mit 6ml Thiazinrot 1% mischen

Tabelle 9 – verwendete Lösungen für Turnbull, alphabetisch sortiert

Bezeichnung	Lösung
Ammoniumsulfid	1:10 mit Aqua
Ferricyankaliumlösung	20% Kaliumhexacyanoferrar(III)lösung (20g ad. 100ml Aqua dest.) 1+1 mit 1% HCL (5ml 25% HCL auf 125ml Aqua dest) mischen

Tabelle 10 – Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen

Bezeichnung	Lösungen
EZ Prep	18l Aqua dest. + 2l EZ Konzentrat
2xSSC	16l Aqua dest. + 4l 2xSSC Konzentrat
Reaction buffer	18l Aqua dest. + 2l Reaction buffer

3.4 Laborgeräte

In der Tabelle 11 werden die verwendeten Laborgeräte mit Hersteller aufgelistet.

Tabelle 11 – verwendete Laborgeräte, alphabetisch sortiert

Gerät	Hersteller
Glaseindeckautomat	Leica
Heizbad	GFL
Hamamatsu Photonics Sanner	Hamamatsu
Kühlplatte	Leica
Mikrotom	Leica
Mikroskop	Olympus Corporation
Ventana Systems, Vollautomatisierter Färbeautomat, Typ: BenchMark XT	Roche Tissue Diagnostics

3.5 Verbrauchsmaterialien

Die Tabelle 12 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 12 – verwendete Verbrauchsmaterialien, alphabetisch sortiert

Material	Beschreibung	Hersteller
Deckgläser	24x50mm	Marienfeld Laboratory Glassware
Eppendorf Tubes	Pipettenspitzen	Eppendorf
Klingen	Für das Mikrotom	Feather Microtome Blades R35
Objektträger	SuperFrost Plus Objektträger, Nr. 2409/1	Hecht Assistent

4 Methoden

Die histologischen Schnitte (4.1), die Färbungen (4.2, 4.3) und die immunhistochemischen Markierungen (4.4) erfolgten durch die medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts der Neuropathologie.

4.1 Schnittherstellung

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden auf 4°C gekühlt. Danach wurden mit dem Mikrotom 3 µm dicke Schnitte hergestellt. Anschließend wurden diese in einem Warmwasserbad gestreckt und auf Glas-Objektträger aufgezogen. Dabei wurden standardisierte Superfrost Objektträger verwendet.

4.2 Elastica van Gieson Färbung

Die Ausführung der v.G. Färbung entsprach dem folgenden Arbeitsablauf:

- Entparaffinieren bis 80% Ethanol
- Resorchin-Fuchsin 7min
- Kurz spülen mit Leitungswasser
- Eisenhämatoxylin 7min
- Kurz spülen mit Leitungswasser
- Kurz differenzieren in HCL-Alkohol
- Wässern in fließendem Wasser 5min
- Van Gieson Farbstoff 5min
- Alkoholreihe 96% und 100% - möglichst schnell – Xyol
- Eindecken in Mounting Medium

4.3 Turnbull Färbung

Die Ausführung der Turnbull-Färbung entsprach dem folgendem Arbeitsablauf:

- Entparaffinieren bis Aqua dest. (Wiegen mit Bindfaden halten, keine eisenhaltigen Haltebügel benutzen)

- Ammoniumsulfid 15min
- 2x Spülen in Aqua dest.
- Ferricyankaliumlösung 15 min
- 2x Spülen in Aqua dest.
- Gegenfärben mit Kerechrot 5min
- Spülen in Aqua dest.
- Aufsteigende Alkoholreihe
- Xyol
- Eindecken in Eukitt

4.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Färbeautomaten „Ventana Benchmark XT“ durchgeführt. Die Gewebeschnitte bedürften für die immunhistochemischen Nachweise der verschiedenen Antigene einer unterschiedlichen Vorbehandlung. Für die CD34 Darstellung war keine Vorbehandlung notwendig (T.oV¹).

Bei Ki-67, VEGF und VEGF-R1 erfolgte eine Vorbehandlung mittels Citratpuffer (T. CC1Std²).

4.5 Evaluation der Färbungen

Die morphologische Evaluation aller Präparate erfolgte durch die Verfasserin an einem Olympus Mikroskop und digital mittels der Software NDP.view2. Jeder Tumor wurde in allen Färbungen untersucht. Die Reihenfolge der Auswertung der Präparate war zufällig.

¹ ohne Vorbehandlung

² Citratpuffer mit einer Stunde Einwirkzeit

4.5.1 Auswertung von Elastica van Gieson

Die Evaluation der v.G. Präparate erfolgte digital mit der Software NDP.view2. Hierfür wurden die Präparate mit dem Hamamatsu Photonics Scanner digitalisiert. Bei jedem Präparat wurde eine Kreisfläche von 20mm² ausgewählt, in der alle Gefäße über 300µm² Lumenfläche vermessen wurden.

Es wurde jeweils der Umfang, die Fläche des Gefäßlumens sowie die breiteste Stelle der Gefäßwand gemessen.

4.5.2 Auswertung von CD34

Bei der Auswertung der CD34 Präparate, welche ebenfalls gescannt und digitalisiert wurden, wurde eine Fläche von 10 mm² gemessen. Diese Fläche war außer in zwei Fällen eine Teilfläche von der v.G. Auswertung. In den zwei Fällen war es aufgrund von Färbungenauigkeiten nicht möglich, die selbe Fläche auszumessen wie bei den v.G. Schnitten. In der 10 mm² Fläche wurde die Anzahl und der Radius aller CD34-positiven Gefäße mittels NDP.view2 erfasst.

4.5.3 Auswertung von Ki-67

Die Auswertung der Ki-67 Färbung erfolgte unter dem Mikroskop. Es wurde ein Gesichtsfeld mit der 40fachen Vergrößerung ausgewertet. Die Fläche betrug 0,1mm². In dieser Fläche wurden die positiven und negativen Zellkerne ausgezählt und daraus der Ki-67-Index gebildet als Anzahl der Ki-67-positiven Kerne geteilt durch die Gesamtzahl der ausgezählten Kerne multipliziert mit 100. Des Weiteren wurde untersucht, ob Ki-67-positive Endothelzellkerne nachweisbar waren. Je nach Reaktion des Endothels wurde das Tumorpräparat eingeteilt nach,

- (0) negativ auf Endothelproliferation
- (1) positiv auf Endothelproliferation.

4.5.4 Auswertung von Turnbull

Die Untersuchung der Turnbull Färbung erfolgte unter dem Mikroskop nominal (Vorhandensein von Hämosiderinablagerungen/ nicht Vorhandensein von Hämosiderinablagerungen).

4.5.5 Auswertung von VEGFR- 1 & VEGFR-2

Die Auswertung der VEGFR-1- und VEGFR-2-Expression in den Tumorzellen erfolgte ebenfalls semiquantitativ entsprechend der folgenden Graduierung:

- (0) keine Färbung
- (1) geringe Färbung
- (2) mittelstarke Färbung
- (3) starke Färbung

Es wurden die gleichen 20mm² ausgemessen wie bei den v.G. Färbungen. Zur Bestimmung der Expression von VEGFR in den Endothelien wurde in dem zu vermessenden Bereich die Gefäße gezählt, bei denen das Endothel positiv auf den Antikörper reagiert hat und daraus der prozentuale Anteil an positiven Gefäßen ermittelt.

4.6 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel Version für Mac, Version 15.53.

Die statistische Auswertung erfolgte mit IMB® SPSS® Statistics für Windows Version 22 durch Prof. Dr. Hagel und mit Unterstützung des Instituts für Epidemiologie und Biometrie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Es wurde die Spearman Korrelation gewählt, da nicht von einem linearen Zusammenhang der Daten ausgegangen werden konnte und die Spearman Korrelation eine Analyse ohne Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Variablen zulasse. Somit konnten Ausreißer von Daten besser berücksichtigt

werden. Zur Darstellung von altersabhängigen Zusammenhängen der einzelnen Gruppen, wurde die Varianzanalyse ANOVA³ gewählt. Für die Auswertung der nominal skalierten Daten (Turnbullfärbung) wurde der Kruskal-Wallis Test gewählt. Die exakte Signifikanz wurde hierbei nach der Monte-Carlo-Methode berechnet.

³ engl.: analysis of variance

5 Ergebnisse

Nachfolgend werden alle Ergebnisse der morphologischen und immunhistochemischen Auswertung und die Ergebnisse der Korrelationsanalysen der einzelnen Faktoren aufgeführt.

5.1 Auswertung des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv umfasste 68 Patienten im Alter von 9-77 Jahren. Davon waren 38 weiblich und 27 männlich. Bei 2 Patienten war das Geschlecht unbekannt. Der Altersdurchschnitt variierte in den Gruppen. Die Durchschnittsalter bestätigten das in der Literatur beschriebene Altersaufkommen für die Grunderkrankung einer Schwannomatose und NF2 (vgl. Kap. 2.1.1 und 2.2.1). Mit steigendem Alter nahm das Auftreten von Schwannomen bei Patienten mit einer syndromalen Grunderkrankung ab, welches auch die Korrelationsanalyse zeigte ($p=0,024$, $r=-0,280$).

Das Durchschnittsalter ist in Tabelle 4 auf Seite 25 aufgelistet.

Es wurde deutlich, dass die NF2-Patienten die jüngste Gruppe bildeten, die Schwannomatose-Patienten ein mittleres Alter aufwiesen und die sporadischen Schwannome überwiegend bei älteren Patienten auftraten. Daher war die Berechnung einer alterskorrigierten Statistik erforderlich (alterskorrigierte ANOVA).

5.2 Auswertung der Gefäßmorphologie in der Elastica van Gieson Färbung

5.2.1 Gefäßdichte

Bei den $n=67$ Präparaten wurde die Anzahl der Gefäße pro Fläche (Gefäßdichte) sowie die Fläche des Lumens und die Wanddicke mittels der van Gieson-Färbung morphometrisch ausgewertet.

Unter den drei Kohorten gab es wesentliche Unterschiede in allen drei Faktoren.

Die sporadischen Schwannome waren ausgezeichnet durch wenige Gefäße mit einer dicken Gefäßwand und einem großen Lumen. Bei den Patienten mit einer syndromalen Grunderkrankung verhielten sich die Gefäße gegenteilig. Hier waren viele, dünnwandige und kleinlumige Gefäße zu finden.

Die durchschnittliche Anzahl an Gefäßen betrug 27,5/20mm² bei den sporadischen Schwannomen, 43,7/20mm² bei NF2- und 48,5/20mm² bei Schwannomatose-Patienten. In der alterskorrigierten ANOVA wiesen die sporadischen Schwannome bezüglich der Anzahl der Gefäße im Vergleich zu den Schwannomatose-assoziierten Tumoren eine hochsignifikant geringere Gefäßdichte auf (p=0,00002, r = -0,571). Ebenso verhielten sich die sporadischen Schwannome im Vergleich zu den NF2-assoziierten (p=0,004, r=-0,426).

Abbildung 6 zeigt die Mittelwerte der Gefäßdichte +/- einer Standardabweichung.

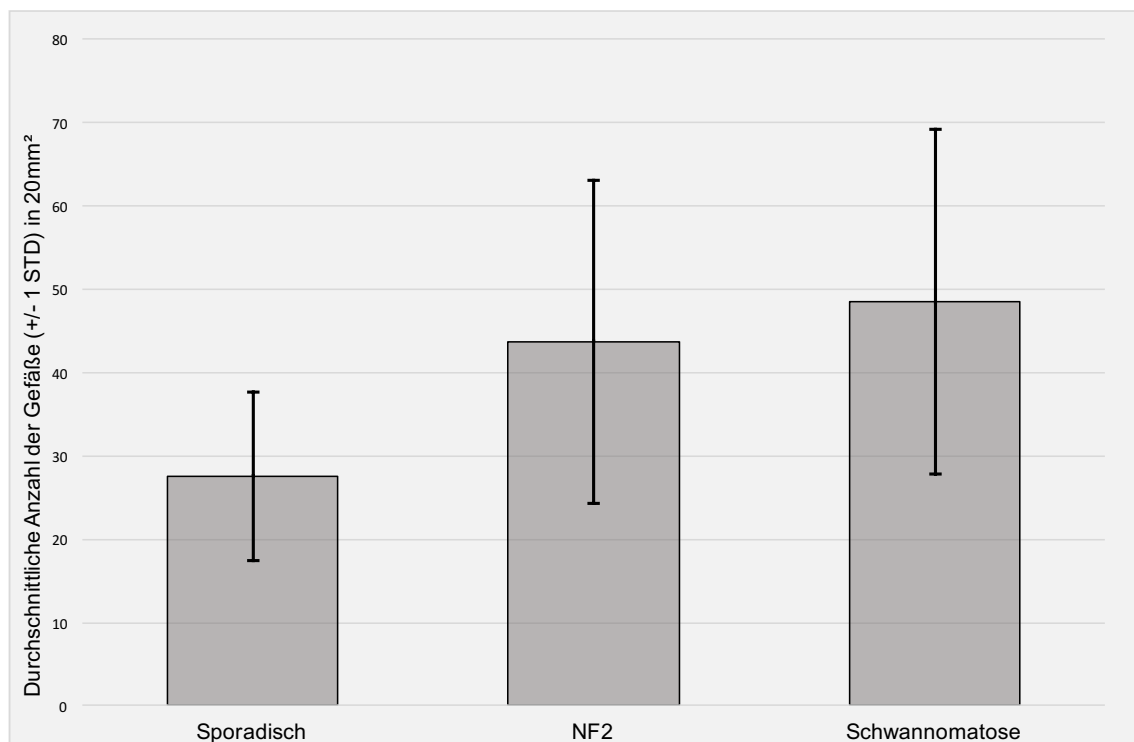


Abbildung 6 – Durchschnittliche Anzahl der Gefäße in 20mm² +/- 1 STD

Den Zusammenhang zwischen Tumorart und Anzahl der Gefäße bestätigte auch die Korrelationsanalyse mit einem Korrelationskoeffizienten r=0,496. Der Unterschied in der Gefäßdichte zwischen sporadischen und syndromalen Tumoren war mit p=0,00002 hochsignifikant. Tabelle 13 zeigt die statistische Auswertung in allen drei Kohorten.

Tabelle 13 – Auswertung: Anzahl der Gefäße in 20mm²

	Mittelwert	N	STD	Median
Sporadisch	27,5	27	10,0	25
NF2	43,7	22	19,4	36,5
Schwannomatose	48,5	18	20,4	43

5.2.2 Gefäßlumen

Ebenfalls unterschiedlich war das Lumen der Gefäße in den drei betrachteten Gruppen. Wie Abbildung 7 zeigt, verhielt sich das Lumen umgekehrt zu der Anzahl der Gefäße, sodass die sporadischen Schwannome die größten Lumina (Mittelwert von 4598µm²) aufwiesen, während die Gefäße von Patienten mit NF2 oder Schwannomatose nur etwa halb so weit waren (s. Tabelle 14).

Auch bei diesem Parameter war der Unterschied zwischen sporadischen und syndromalen Tumoren signifikant ($p=0,007$ und $r=-0,372$).

Da das Gefäßlumen mit dem Alter korrelierte, wurde auch hier eine alterskorrigierte ANOVA gerechnet, die ein signifikant größeres Lumen für die Gefäße in sporadischen Schwannomen, im Vergleich zu den NF2-assoziierten Schwannomen, ergab ($p=0,015$).

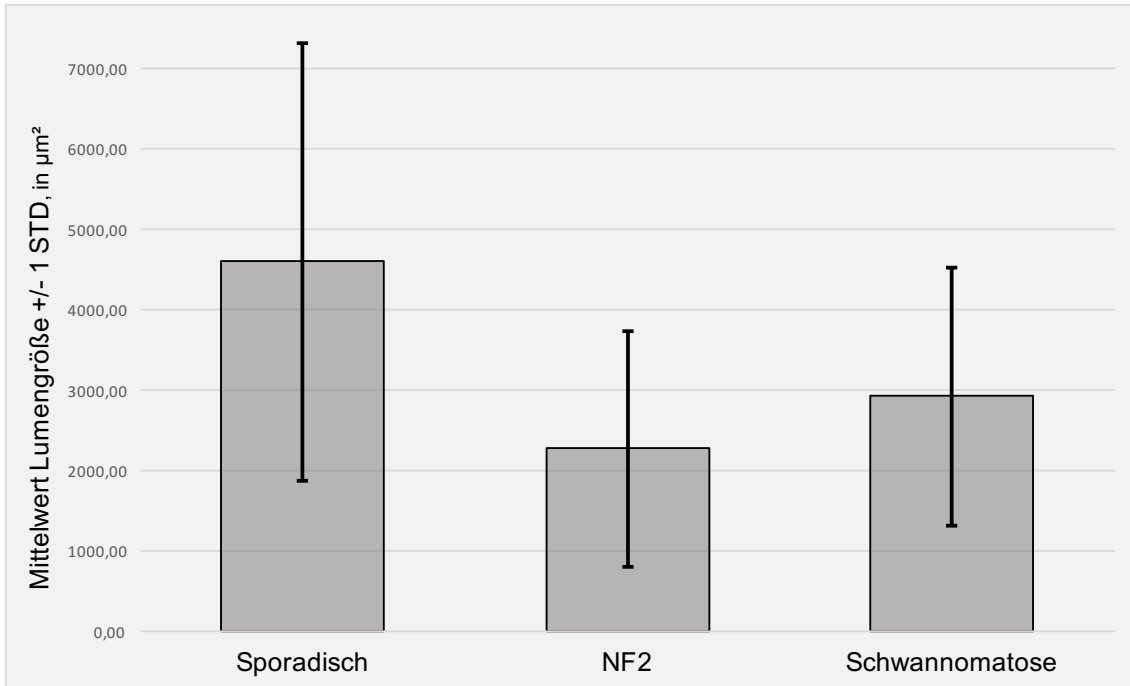


Abbildung 7 – Mittelwerte der Lumengröße aller Gruppen in (μm^2), +/- 1 STD

Tabelle 14 – Auswertung: Lumengröße

	Mittelwert (μm^2)	N	STD (μm^2)	Median (μm^2)
Sporadisch	4598	27	2721	4346
NF2	2268	22	1458	1651
Schwannomatose	2919	18	1638	2640

5.2.3 Gefäßwanddicke

Die sporadischen Schwannome zeigten in der alterskorrigierten ANOVA eine signifikant größere Gefäßwanddicke gegenüber den NF2- und Schwannomatose-assoziierten Tumoren (Sporadisch vs. NF2 $p=0,003$ und $r=0,238$; Sporadisch vs. Schwannomatose $p=0,005$ und $r=0,301$; syndromale Tumore untereinander nicht signifikant unterschiedlich, vgl. Abbildung 8 und Tabelle 15)

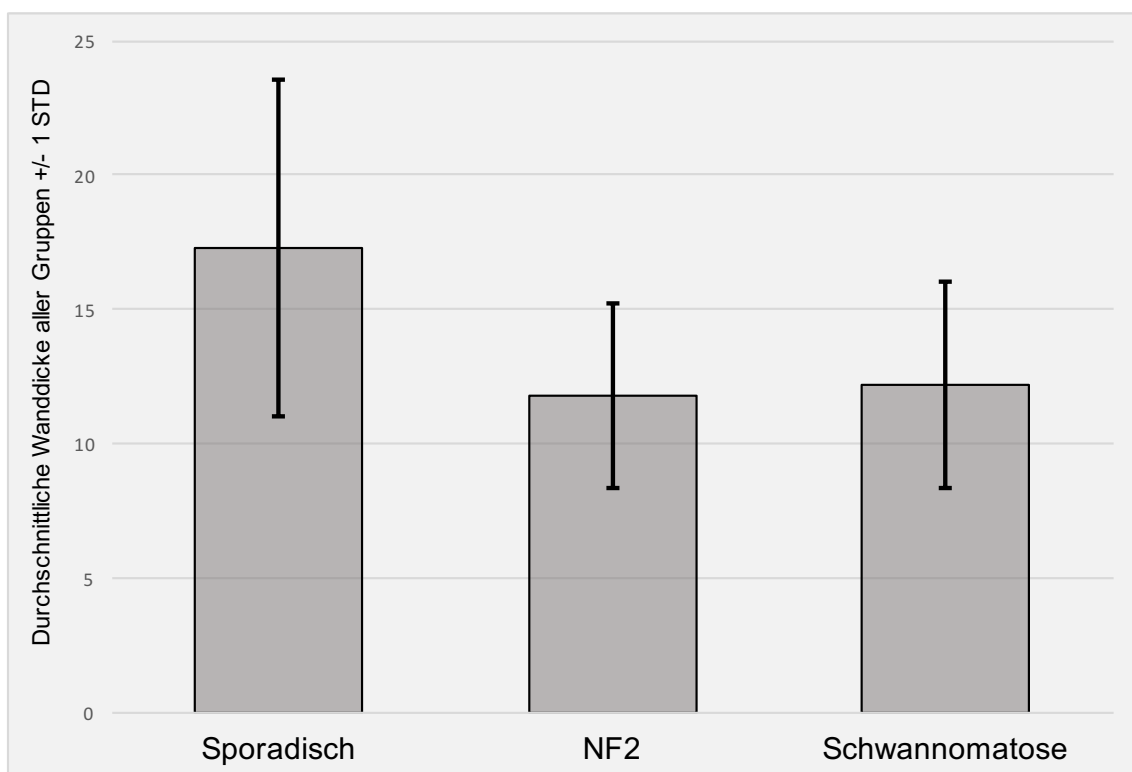


Abbildung 8 – Durchschnittliche Gefäßwanddicke aller Gruppen in μm , ± 1 STD

Tabelle 15 – Auswertung: Durchschnittliche Gefäßwanddicke

	Mittelwert (μm)	N	STD (μm)	Median (μm)
Sporadisch	17	27	6	17
NF2	12	22	3	11
Schwannomatose	12	18	4	12

Abbildungen 9-11 zeigen typische Beispiele zu den Unterkapiteln 5.2.1-5.2.3.

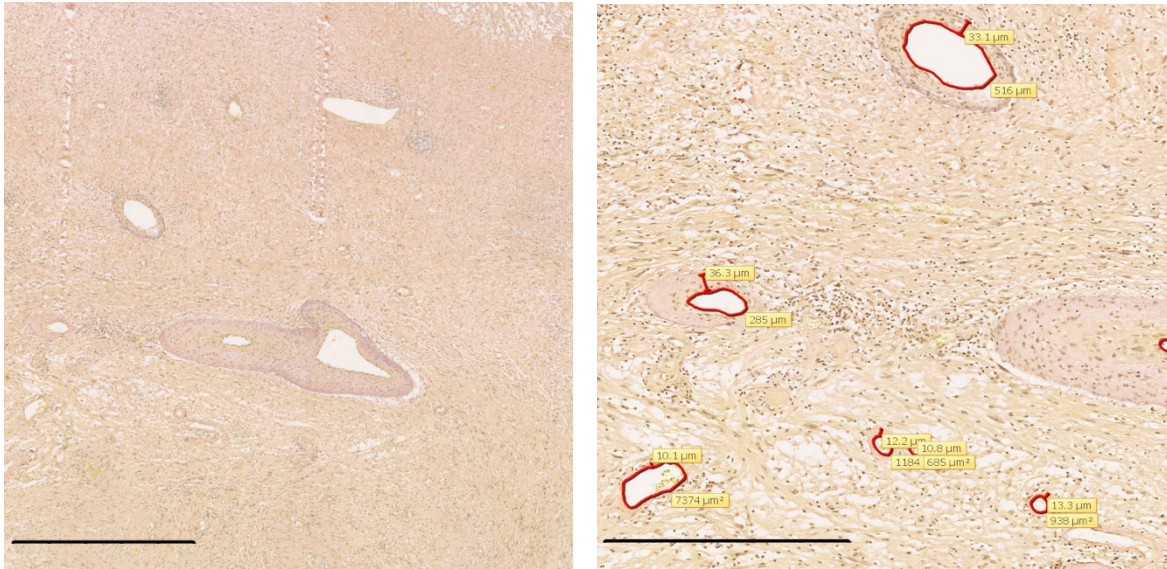


Abbildung 9 – links: Deutlich fibrosierte Gefäße eines sporadischen Schwannoms, Maßstab= 1mm, rechts: Ausschnitt aus dem gleichen Präparat mit den Messungen für Lumengröße und Wanddicke, Maßstab= 500µm, Elastica van Gieson

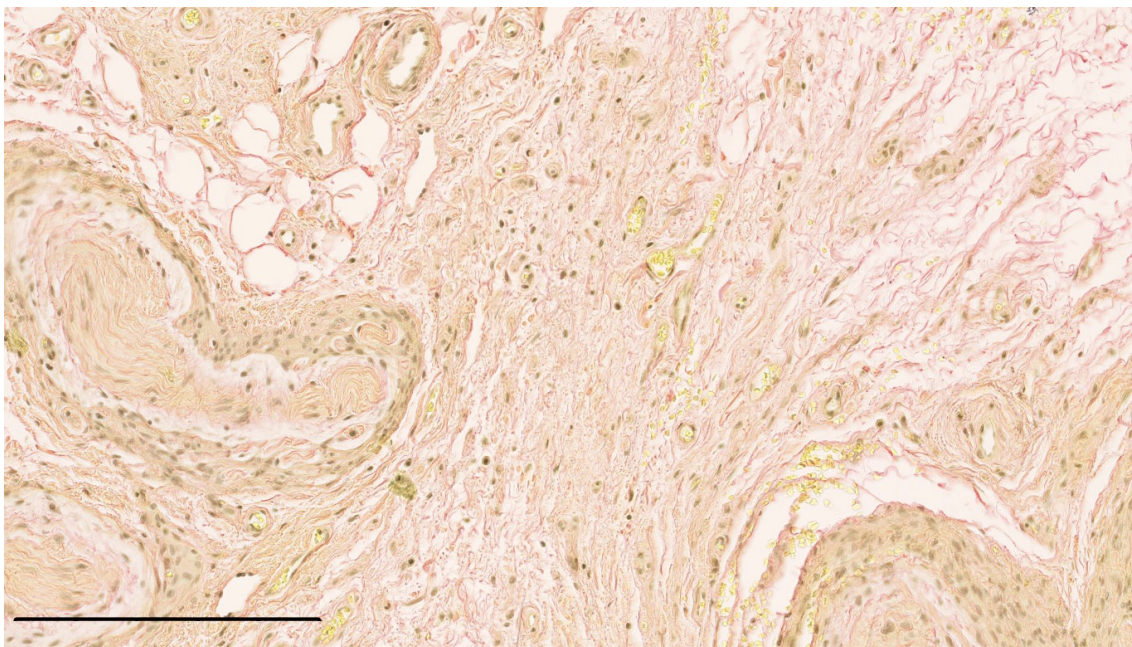


Abbildung 10 – Beispiel eines NF2-assoziierten Schwannoms, Maßstab=250 µm, Elastica van Gieson

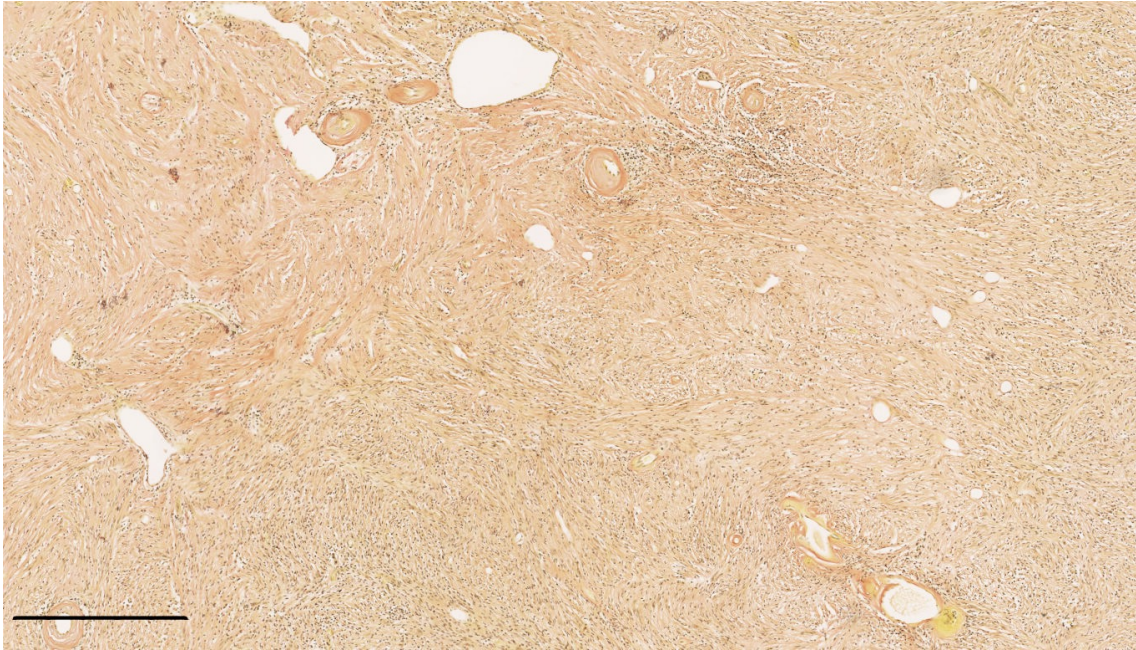


Abbildung 11 – Beispiel eines Schwannomatose-assoziierten Schwannoms, Maßstab=500 μm , Elastica van Gieson

5.3 Morphologische Analyse der Gefäße mittels CD34-Markierung

5.3.1 Gefäßdichte

Bei der CD34 Färbung wurden n=66 Fälle untersucht. Die Auswertung ergab eine durchschnittliche Anzahl an CD34 positiven Gefäßen in 10mm^2 Fläche von 89,2 bei den sporadischen Tumoren, 67,8 bei NF2- und 87,7 bei den Schwannomatose-Patienten. Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte aller Gruppen +/- eine Standardabweichung und dem Median. Die Werte sind Tabelle 16 zu entnehmen. Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gefäßdichte in der CD34-Markierung.

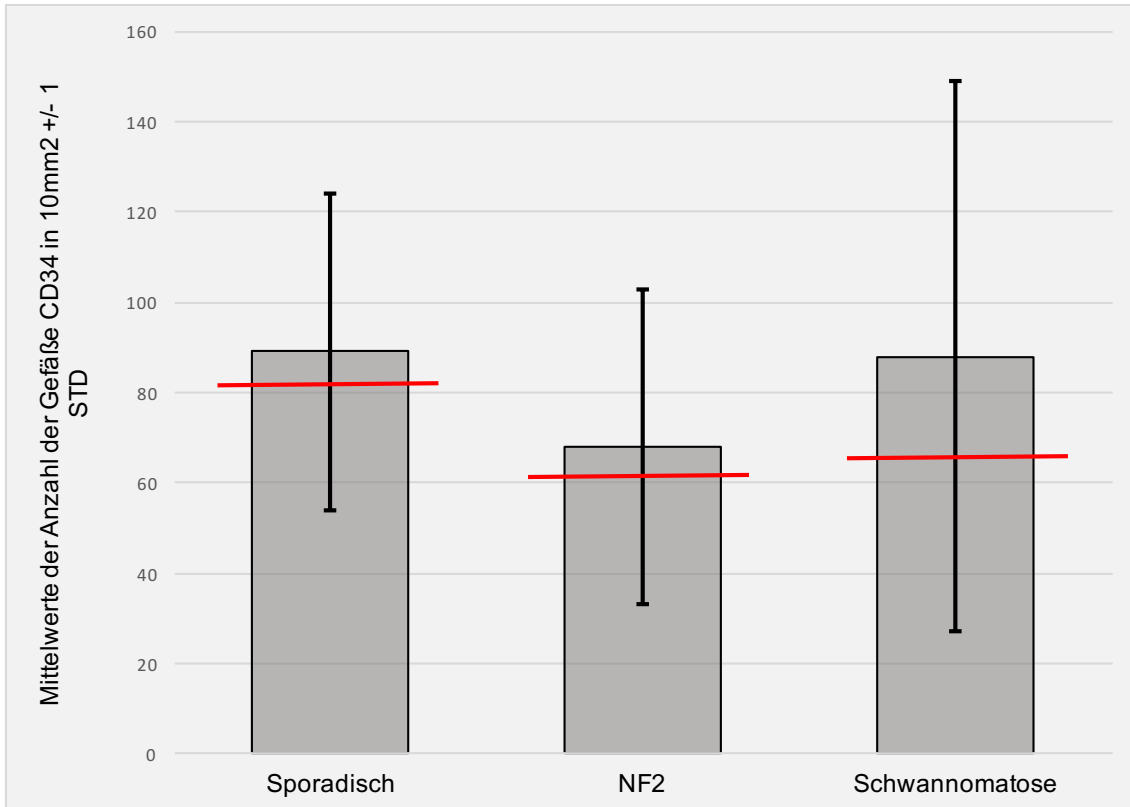


Abbildung 12 – Durchschnittliche Anzahl an CD34 positiven Gefäßen in 10mm² Fläche +/- 1 STD, rot kennzeichnet den Median

Die immunhistochemisch mit der CD34-Markierung ermittelte Anzahl der Gefäße korrelierte mit der Anzahl der Gefäße in der v.G. Auswertung ($r=0,445$, $p=0,0001$). Zwischen den einzelnen Tumorgruppen ergaben sich in den alterskorrigierten Vergleichen für die CD34-Markierung jedoch keine Unterschiede.

Tabelle 16 – Auswertung: Anzahl der Gefäße bei CD34 in n/10mm² Fläche

	Mittelwert	N	STD	Median
Sporadisch	89,2	27	35,1	82
NF2	67,8	20	35,0	61
Schwannomatose	87,7	18	60,9	63,5

5.3.2 Gefäßradius

Die Auswertung des durchschnittlichen Radius der vermessenen Gefäße ergab für die sporadischen Schwannome 11µm, bei NF2 10µm und für die Schwannomatose-assoziierten Schwannome 10µm (Tabelle 17, Abbildung 14). In der Korrelationsanalyse zeigte sich die Abhängigkeit von dem Radius der Gefäße in der CD34-Markierung und dem in der van Gieson Färbung gemessenen Lumen der Gefäße ($r=0,393$, $p=0,001$). In der alterskorrigierten ANOVA ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Subgruppen.

Tabelle 17 – Auswertung: Durchschnittlicher Radius der Gefäße in der CD34-Markierung

	Mittelwert (µm)	N	STD (µm)	Median (µm)
Sporadisch	11	27	5,2	9
NF2	10	21	2,7	9
Schwannomatose	10	18	4,9	9

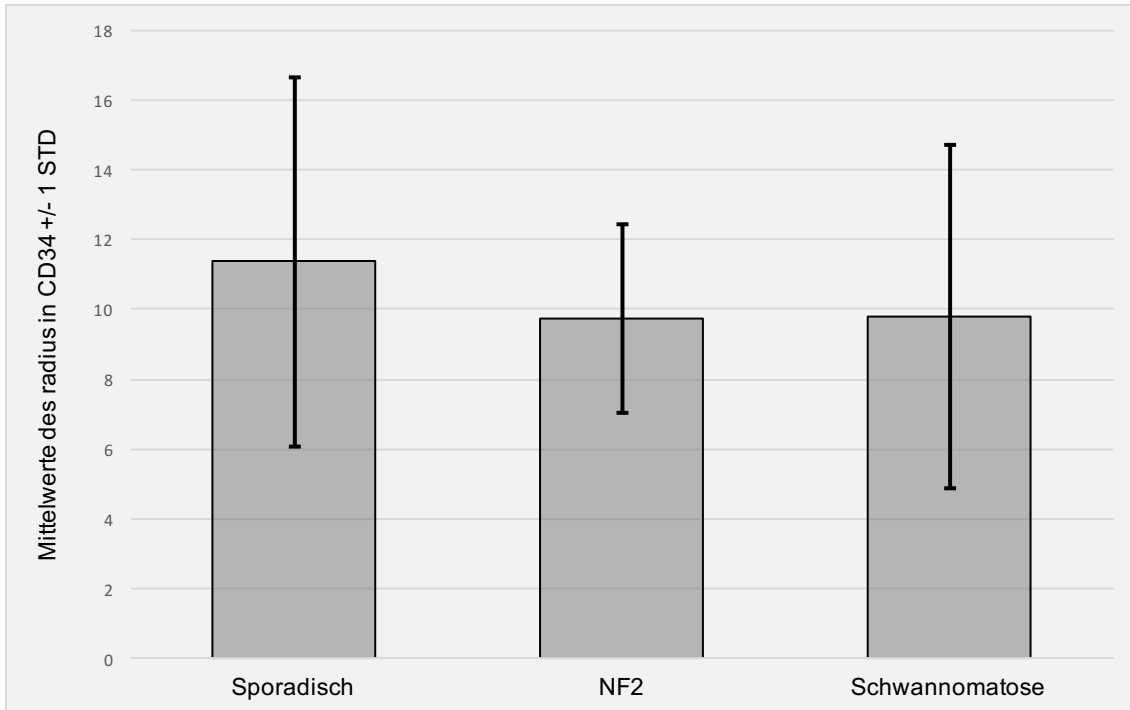


Abbildung 13 – Mittelwerte der Gefäßradien in der CD34-Markierung für alle Gruppen in μm , +/- eine STD

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die Beispiele der Gefäßdarstellung für die verschiedenen Tumorguppen in der CD34 Darstellung.

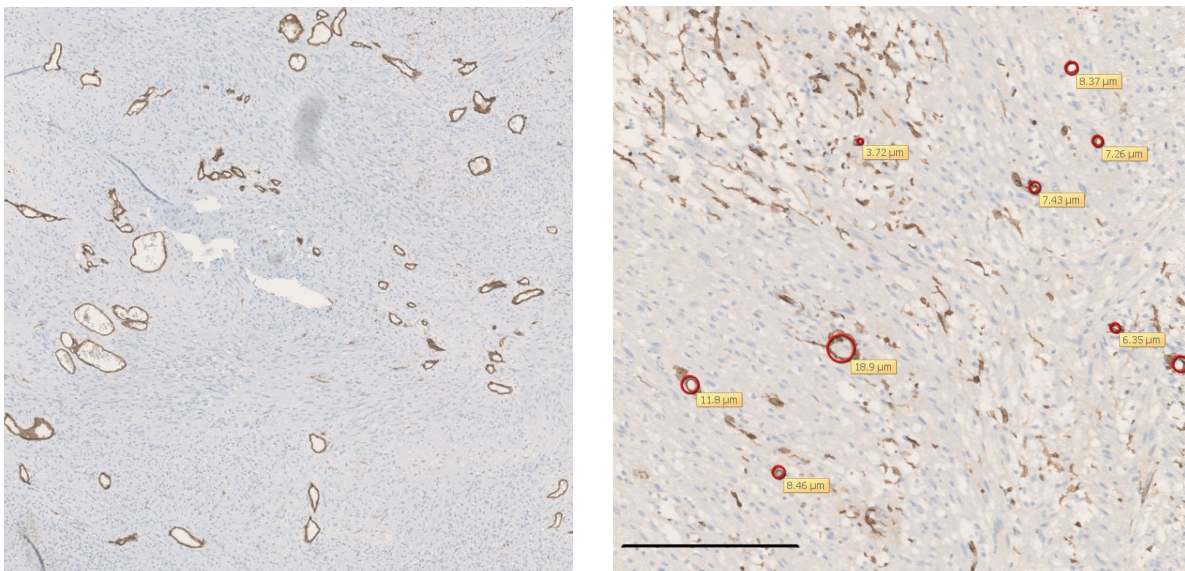


Abbildung 14 – Beispiel eines sporadischen Schwannoms, **links** Gefäßdarstellung in der CD34-Markierung, **rechts** zusätzlich mit morphometrischer Analyse des Gefäßradius, Maßstab=250 μm

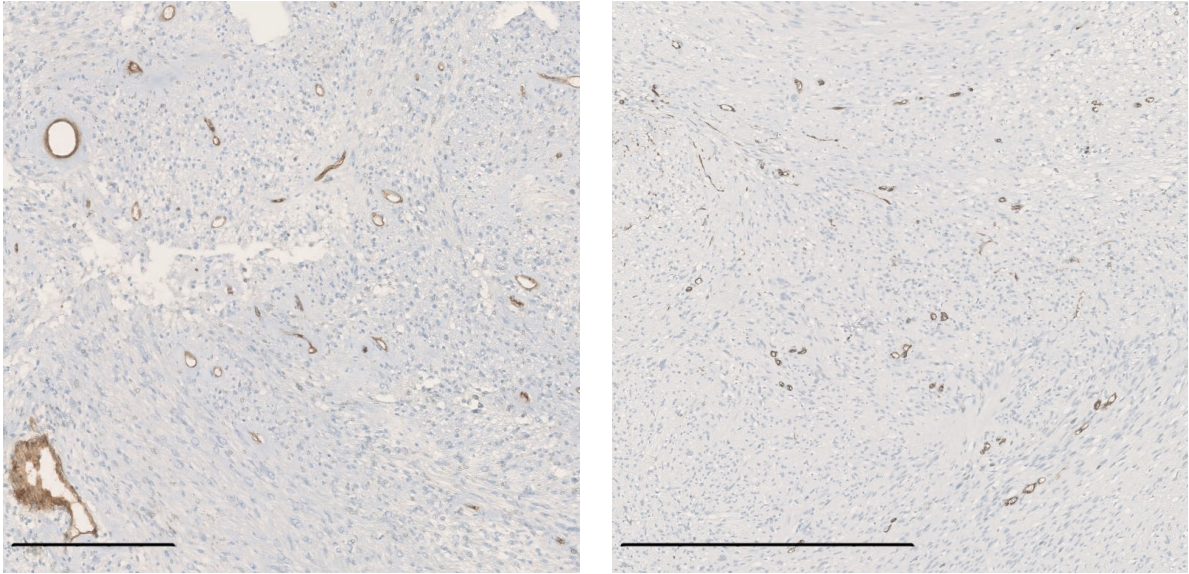


Abbildung 15 – Beispiele der Gefäßdarstellung mit CD34-Antikörpern, **links:** in einem NF2-assoziierten Schwannom und **rechts:** in einem Schwannomatose-assoziierten Schwannom, Maßstab= 250µm

5.4 Auswertung der Ki-67-Markierung

5.4.1 Proliferationsindex der Tumorzellen

Die Auswertung der Ki-67 Färbung mit n=67 Fällen ergab unterschiedliche Ki-67-Indizes für die jeweiligen Gruppen. Der kleinste Index war mit 6,5% (STD +/- 3,2%) bei den NF2 Präparaten zu finden. Die sporadischen Tumore wiesen im Mittel einen Index von 10,0% (STD +/-4,8%) und die Schwannomatose-Präparate einen Ki-67-Index von 12,2% (STD +/- 7,1%) auf (Tabelle 18). Die alterskorrigierte ANOVA ergab eine signifikant höhere Proliferation bei den sporadischen Schwannomen gegenüber den NF2-assoziierten Schwannomen (p=0,034) und zwischen den NF2-assoziierten gegenüber den Schwannomatose-assoziierten Tumoren (p= 0,001). Abbildungen 16 und 17 verdeutlichen die Ergebnisse.

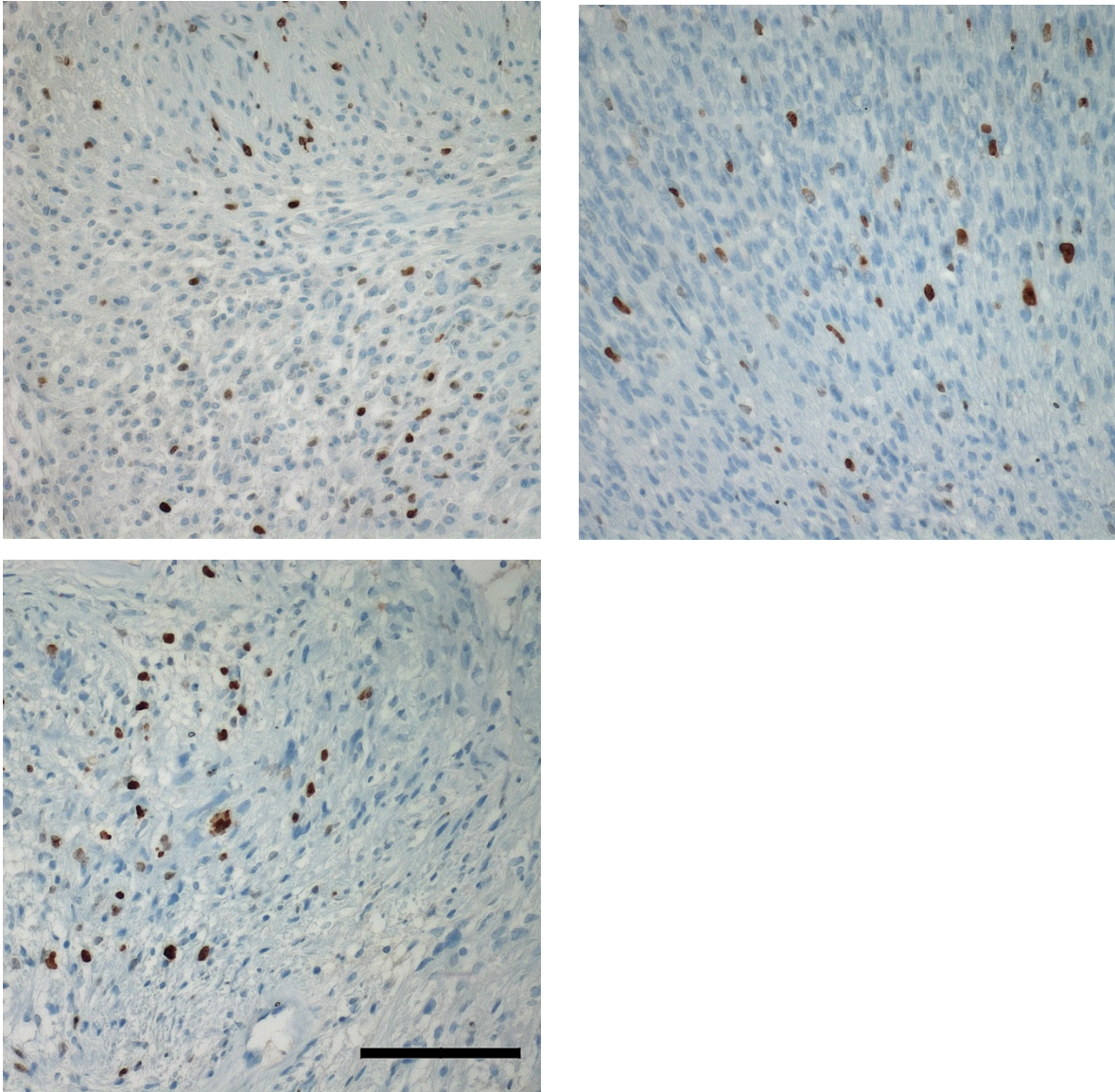


Abbildung 16 – Beispiele für Ki-67-markierte Präparate, **oben links**: sporadisches Schwannom, **oben rechts**: NF2-assoziiertes Schwannom, **unten**: Schwannomatose-assoziiertes Schwannom, Maßstab=100µm

5.4.2 Proliferation der Endothelzellen

Neben der Proliferation der Tumorzellen wurde die Endothelproliferation untersucht, die erhebliche Unterschiede in den einzelnen Kohorten zeigte (Tabelle 19). In den sporadischen Schwannomen fanden sich 8/27 (29,6%) Präparate mit proliferierende Endothelien, bei der NF2-Kohorte nur 2/22 (9,1%) und bei der Schwannomatose-Kohorte 4/19 (21,053%) positive Präparate. Die Ergebnisse für die Endothelproliferation korrelierten mit den Ki-67-Indizes für die

Tumorzellen ($p= 0,011$, $r= 0,310$), die auch bei der NF2-Kohorte am niedrigsten waren (Abbildung 17). Abbildung 18 zeigt ein sporadisches Schwannom mit Ki-67-positiven Endothelzellen.

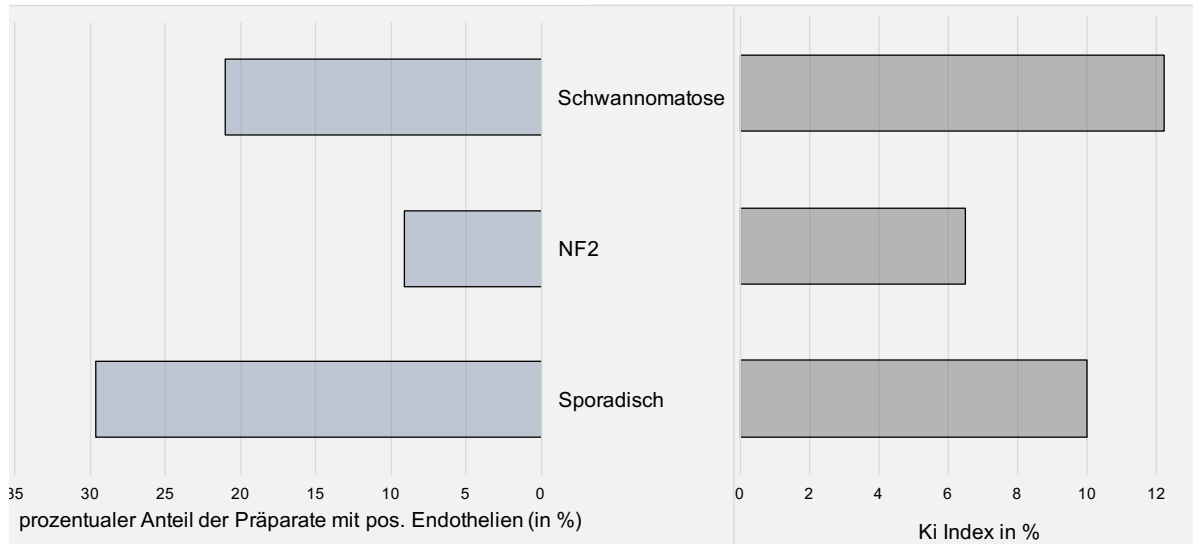


Abbildung 17 – Ki-67-Index im Tumor in % (gemessen in $0,1\text{mm}^2$ Fläche) im Vergleich zum prozentualen Anteil an Tumoren mit Ki-67-positiven Endothelien

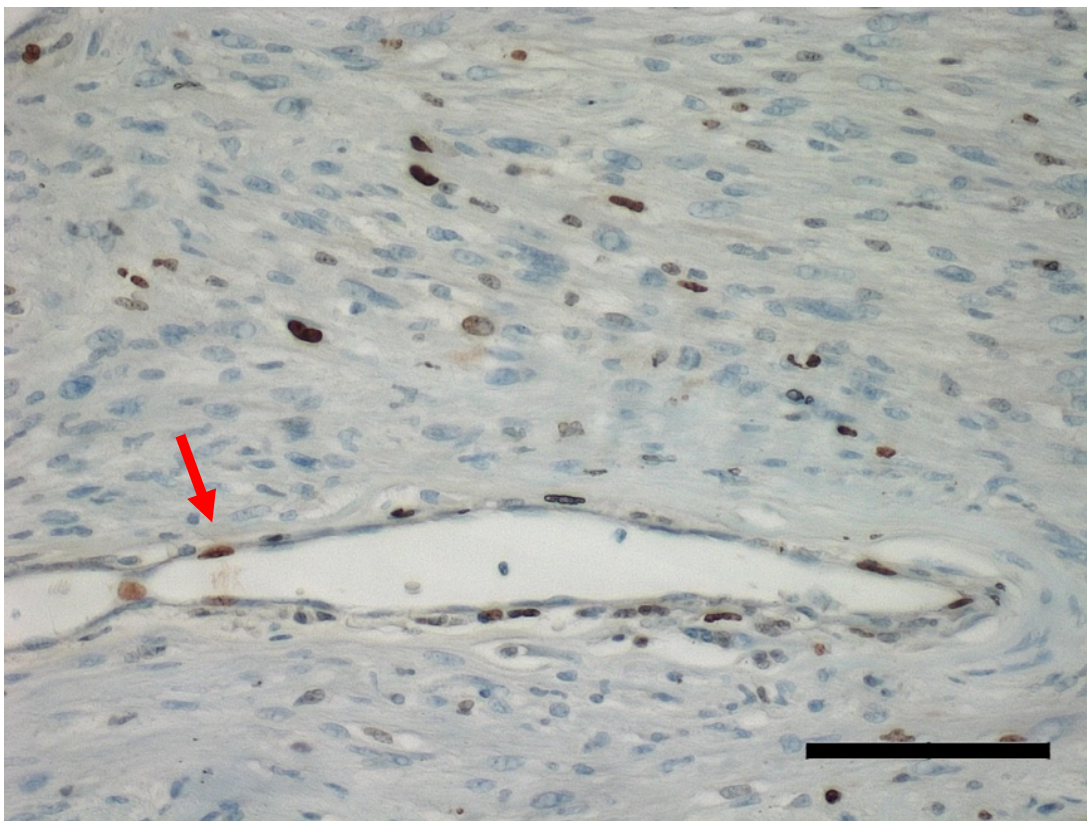


Abbildung 18 – Sporadisches Schwannom mit proliferierenden Endothelien, Maßstab=100µm

In der Korrelationsanalyse ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Proliferation der Endothelzellen und der in der van Gieson-Färbung gemessenen Wanddicke ($p=0,05$, $r= 0,243$).

Weiterhin zeigte sich eine Korrelation zwischen Endothelproliferation und dem in der CD34-Markierung ermittelten Gefäßradius ($p=0,018$, $r=0,289$) und Tumore mit proliferierenden Endothelien zeigten auch eine hohe proliferative Aktivität im Tumor (mittlerer Ki-67-Index in Tumoren ohne Endothelproliferation $n=53$, 8,6%; mit Endothelproliferation $n=14$, 12,7%; $p = 0,011$).

Tabelle 18 – Auswertung: Ki-67-Index in %

	Mittelwert (%)	N	STD (%)	Median (%)
Sporadisch	10,0	27	4,8	9,3
NF2	6,5	22	3,2	5,8
Schwannomatose	12,2	18	7,1	12,0

Tabelle 19 – Auswertung: Anzahl Präparate mit positiven Endothelien in Ki67

	Anzahl pos. Präparate	N
Sporadisch	8	27
NF2	2	22
Schwannomatose	4	18

5.5 Tumorzellichte

Die verschiedenen Tumorgruppen zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Zelldichte (Mittelwerte: sporadische Schwannome 1713 Kerne/mm² (STD +/- 380 Kerne/mm²), NF2-assoziierte Schwannome 1664 Kerne/mm² (STD +/- 373 Kerne/mm²), Schwannomatose-assoziierte Schwannome 1635 Kerne/mm² (STD +/- 357 Kerne/mm²)).

5.6 Auftreten von Tumorblutungen

Die Auswertung der Turnbull-Färbung mit n=67 Fällen ergab für die sporadischen Schwannome Hämosiderinablagerungen in 13/27 Fällen, für die NF2 assoziierten-Schwannome in 6/22 Fällen und in den Schwannomatose-assoziierten Schwannomen in 2/18 Fällen. Da sich in der Korrelationsanalyse eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Tumorblutungen und dem Patientenalter ($p=0,0001$, $r=0,452$) zeigte, wurde eine alterskorrigierte ANOVA durchgeführt, die einen schwach signifikanten Unterschied bezüglich des Auftretens von Blutungen zwischen der NF2- und Schwannomatosekohorte ($p=0,044$) ergab.

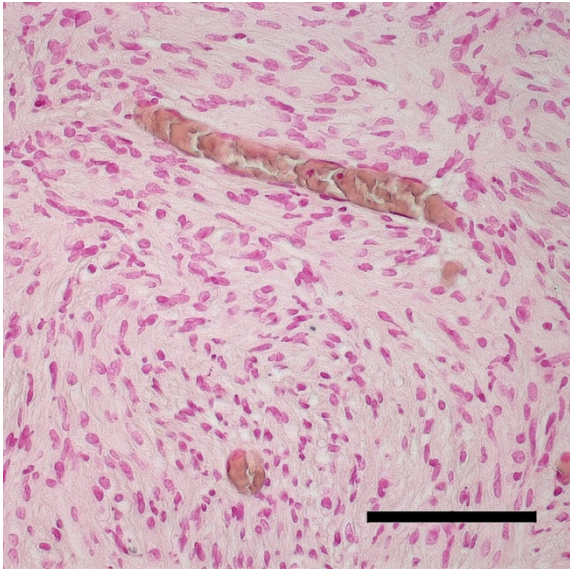
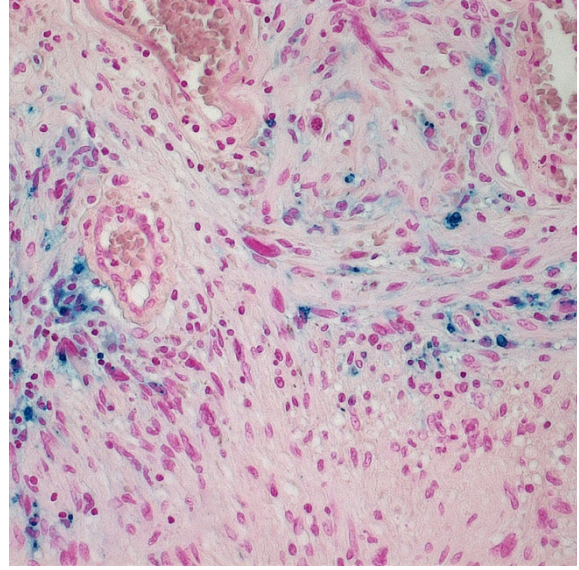
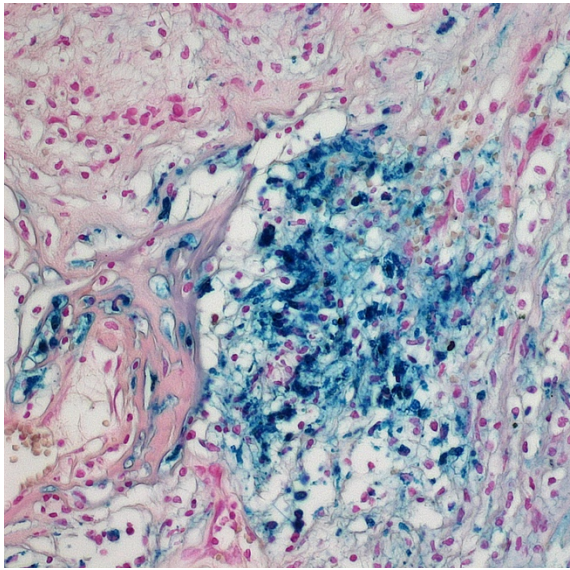


Abbildung 19 – Darstellung von Hämosiderin als Residuum alter Blutungen in Schwannomen mittels der Turnbullfärbung, **oben links**: Sporadisches Schwannom, **oben rechts**: NF2-assoziiertes Schwannom, **unten**: Schwannomatose-assoziiertes Schwannom, Maßstab=100µm

5.7 Auswertung der VEGFR-1-Markierung

Die Auswertung der VEGFR-1 Präparate mit n=61 Proben ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Die sporadischen Schwannome enthielten im Mittel 55,9% VEGFR-1 positive Gefäße, die NF2-assoziierten Tumore 55,1% und die Schwannomatose-assoziierten Tumore 52,2%. Beispiele für die Immunreaktion der verschiedenen Tumore zeigt Abbildung 20.

In der Korrelationsanalyse ergaben sich keine signifikanten Korrelationen mit den anderen Parametern.

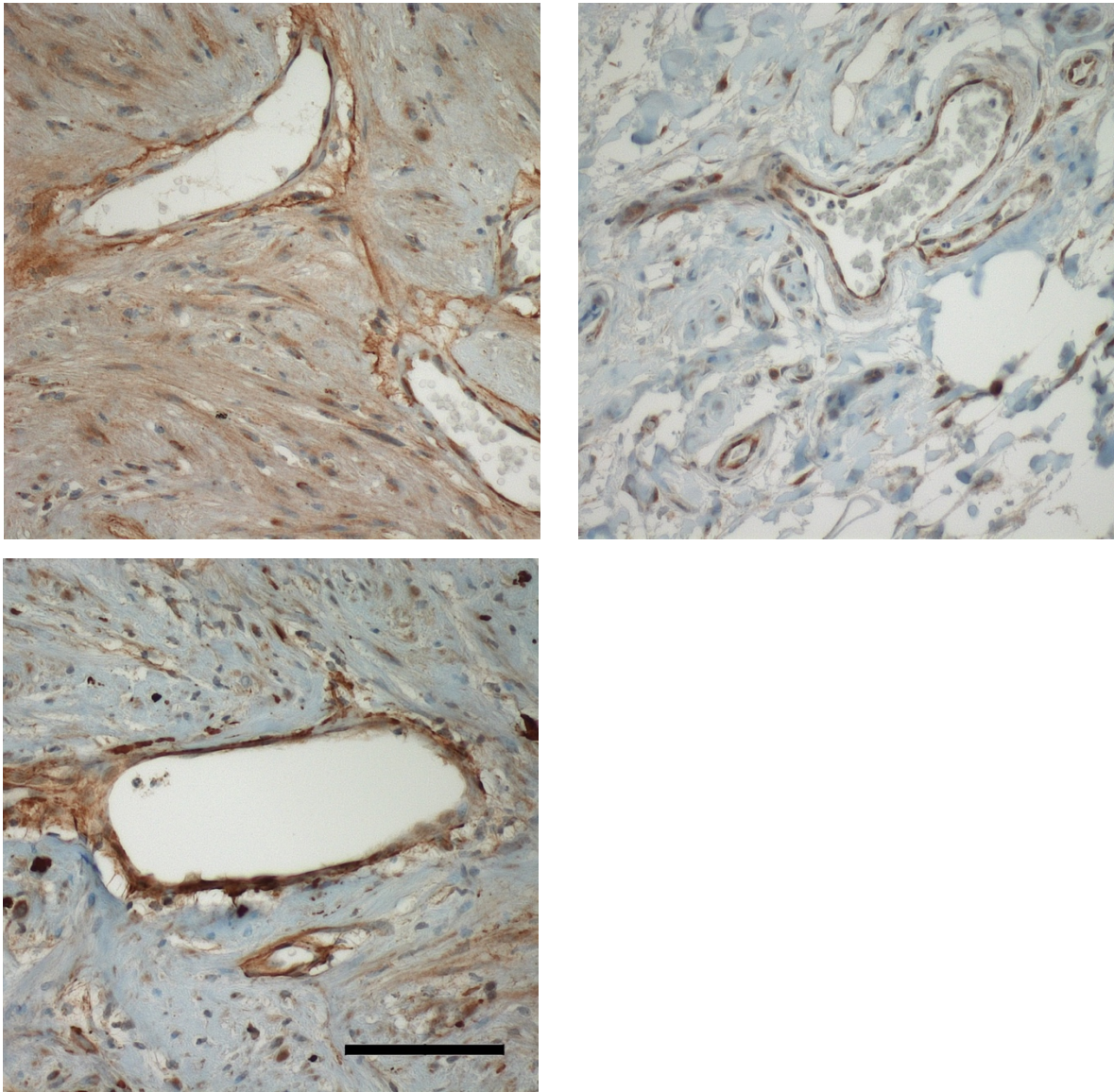


Abbildung 20 – Ausschnitte der mit VEGFR-1-Antikörpern markierten Präparate, **oben links:** Sporadisches Schwannom, **oben rechts:** NF2-assoziiertes Schwannom, **unten:** Schwannomatose-assoziiertes Schwannom, Maßstab=100µm

5.8 Auswertung der VEGFR-2-Markierung

Bei der Auswertung der VEGFR-2 Färbung mit n=67 Präparaten ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Sporadische Schwannome wiesen in 24,7% der Fälle VEGFR-2-positive Endothelien auf, für NF2-assoziierte Tumore in 19,4% und Schwannomatose-assoziierte Tumore in 22,5%. Beispiele der VEGFR-2 Färbungen zeigt Abbildung 21. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zu den anderen Parametern.

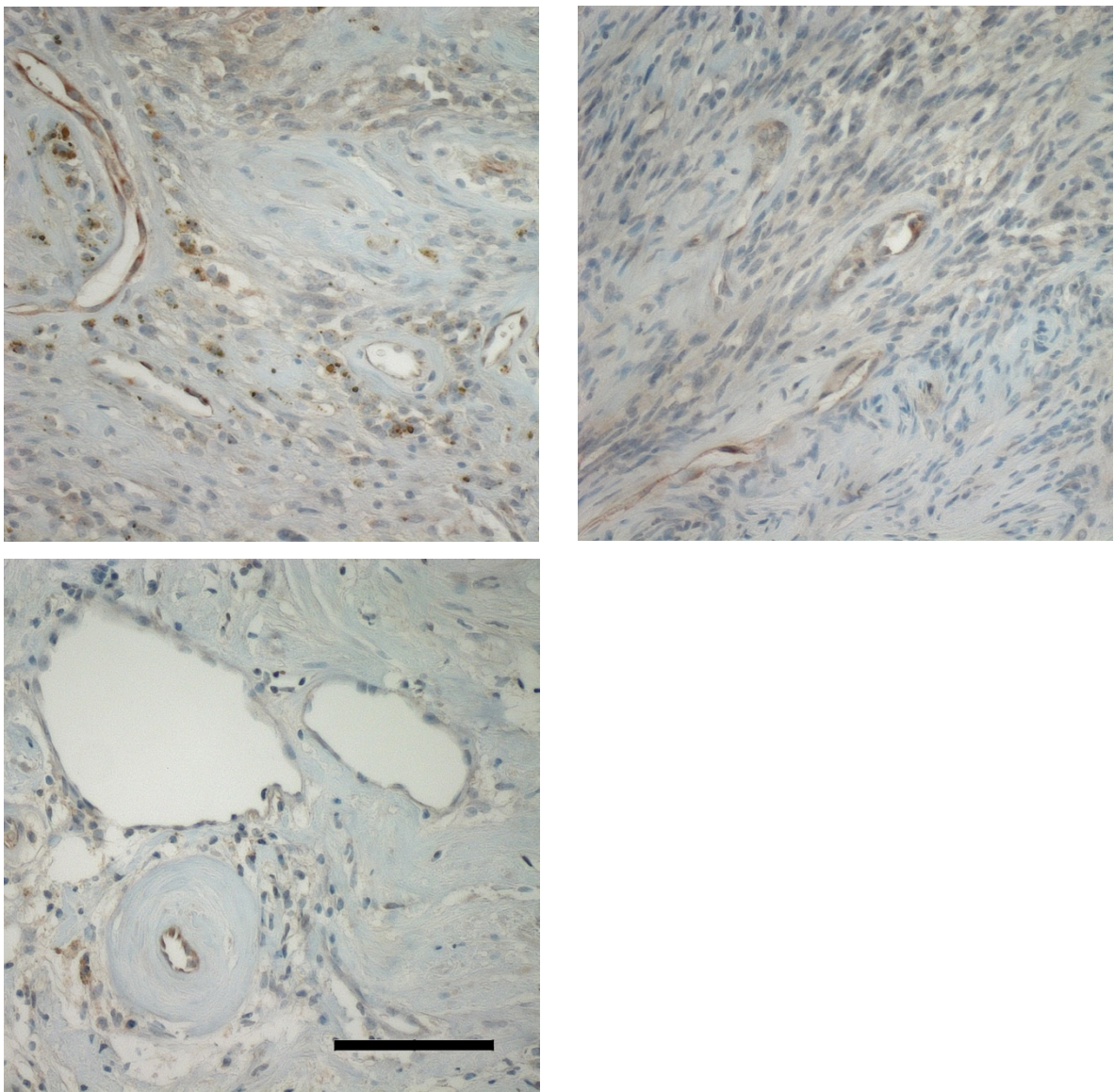


Abbildung 21 – VEGFR-2 markierte Präparate, **oben links:** Sporadisches Schwannom, **oben rechts:** NF2-assoziiertes Schwannom, **unten:** Schwannomatose-assoziiertes Schwannom, Maßstab=100µm

Bezüglich der VEGFR-2-Expression und dem Ki-67-Proliferationsindex zeigte sich eine Korrelation der beiden Variablen im Gesamtkollektiv ($p = 0,018$).
Bezüglich der einzelnen Tumorgruppen erreichten nur die sporadischen Tumoren eine signifikante Korrelation von Proliferationsindex und VEGFR-2-Expression ($p = 0,049$)

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, ob sich periphere Schwannome mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund bezüglich der Vaskularisation unterscheiden. Die überwiegend benignen (WHO Grad I) Schwannome sind neben Neurofibromen die häufigsten peripheren Nervenscheidentumoren. Die Tumoren treten sporadisch auf oder in Zusammenhang mit den Tumordispositions-Syndromen Neurofibromatose Typ 2 und Schwannomatose. Die Vaskularisation der Schwannome ist in den letzten Jahren zu einem Fokus der Forschung geworden, nachdem gezeigt werden konnte, dass neben der üblichen operativen Exzision und/oder Radiatio auch eine Therapie mit Angiogenesehemmern (Bevacizumab) bei NF2-assoziierten Tumoren wirksam ist (Plotkin et al. 2009).

Nach heutiger Studienlage sind kaum histomorphologische bzw. histochemische Unterschiede zwischen Schwannomen unterschiedlicher Herkunft bekannt. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden deshalb 27 sporadische Schwannome, 22 NF2-assoziierte Tumoren und 19 Schwannomatose-assoziierte Schwannome bezüglich der Gefäßdichte, Gefäßwanddicke, des Gefäßlumens und – Durchmessers sowie der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und der Rezeptoren für die vasoendothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptoren 1 und 2 (VEGFR-1 und -2) analysiert.

Bezüglich der Lokalisation der Tumoren und des Alters der Patienten bei Operation entsprach die Kohorte den in der Literatur mitgeteilten Altersangaben. Das mittlere Alter beträgt laut der Literatur bei NF2 und bei der Schwannomatose ca. 30 Jahre. Die sporadischen Schwannome treten in der Regel später, gehäuft zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr auf (Scheithauer BW 1999). Dies konnte mit einem durchschnittlichen Alter von 46,7 Jahren bei den Patienten mit sporadischen Schwannomen, 27,5 Jahren bei den NF2-assoziierten Schwannomen und 39 Jahren bei den Schwannomatose-assoziierten Tumoren in dieser Studie bestätigt werden.

Ein histomorphologischer Vergleich der Gefäßdichte und des Durchmessers wurde bereits von Plotkin et al. (2009) wie auch in einer Dissertation aus dem hiesigen Institut für Neuropathologie (Naber 2012) für sporadische und NF2-

assoziierte Schwannome erhoben. Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20 – Vergleich verschiedener Studien zur Vaskularisation in Schwannomen

Untersuchung	Gefäßdichte (mm ²)		Gefäßdurchmesser (µm)	
	sporadisch	NF2	Sporadisch	NF2
Diese Studie v.Gieson	1,35	2,2	27*	19*
Diese Studie CD34	9	6,8	11	10
Naber 2012	18	17	25	12
Plotkin et al. 2009	32	22	12	14

* errechnet aus dem Lumen

Es wird deutlich, dass die in dieser Studie in der van Gieson-Färbung erhobenen Daten etwa um den Faktor 10 niedriger ausfallen, wohingegen die anderen Daten in der Größenordnung vergleichbar sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nur Gefäße mit einem eindeutigen Lumen erfasst wurden, welches in der Trichrom-Färbung, insbesondere bei kleinen Gefäßen, vielfach nicht sicher auszumachen war. Die CD34-Markierung liefert für diese Parameter hingegen validere Werte. Trotz der Unterschiede zwischen den Studien wird deutlich, dass die Gefäßdichte in den sporadischen Schwannomen höher ausfällt als in NF2-assoziierten Tumoren. Weiterhin wiesen sporadische Schwannome in der Studie von Naber (2012) ebenso wie in dieser Studie einen größeren Durchmesser auf als NF2-assoziierte Tumore; die Studie von Plotkin et al. (2009) zeigte diesen Trend allerdings nicht. Die Werte für die Schwannomatose-assoziierten Tumoren waren vergleichbar mit denen der NF2-Kohorte.

Bezüglich der Wanddicke und der Hämosiderinablagerungen wurden in der Literatur keine Daten gefunden. Eine mögliche Erklärung für die breiteren Gefäßwände der sporadischen Schwannome könnte in dem größeren Gefäßdurchmesser im Vergleich zu den NF2- und Schwannomatose-assoziierten Tumoren begründet sein. Eine Erklärung für die häufiger beobachteten Hämosiderinablagerungen in NF2-assoziierten Tumoren gegenüber Schwannomatose-assoziierten Schwannomen lässt sich nicht ohne

weiteres ableiten und müsste an größeren Fallzahlen und nach Ausschluss anderer Blutungsursachen (Voroperationen) überprüft werden.

Der im Tumorgewebe mit Ki-67-Antikörpern immunhistochemisch ermittelte Proliferationsindex unterschied sich nicht signifikant von den in der Literatur mitgeteilten Werten (Kindblom et al. 1995). Bemerkenswert ist, dass die sporadischen und insbesondere die Schwannomatose-assoziierten Tumore eine signifikant höhere Proliferation aufwiesen als die NF2-assoziierten. Diese erreichte bei den Schwannomatose-assoziierten Schwannomen in Einzelfällen bis zu 25% (siehe Rohdaten im Anhang). Hohe Proliferationsindizes bei Schwannomen könnten damit möglicherweise auf eine Schwannomatose hinweisen.

In allen Tumorgruppen ließen sich Fälle mit proliferierenden Endothelien nachweisen, dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Korrelation zwischen Proliferation der Endothelzellen und der in der van Gieson-Färbung gemessenen Wanddicke sowie zwischen Endothelproliferation und dem in der CD34-Markierung ermittelten Gefäßradius deuten darauf hin, dass sich die Endothelproliferation in erster Linie auf das Wachstum der Gefäße und nicht auf eine Zunahme der Gefäßdichte auswirkt. In der Studie von Naber (2012) zeigten die Schwannome eine mit normalen Nerven vergleichbare Gefäßdichte (18 und 17/mm² vs. 14/mm² im normalen Nerven).

Als einer der Proliferations-Stimuli in Schwannomen wurde der vasoendotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) identifiziert, der in Schwannomen überexprimiert wird (Kiliç et al. 2000). Bezüglich der Expression der entsprechenden Rezeptoren VEGFR-1 und -2 in den Tumoren ist die Datenlage spärlich; in der Literatur fanden sich nur zwei relevante Arbeiten. Uesaka et al. (2007) konnten in 40 intrakraniellen Schwannomen sowohl VEGF-mRNA als auch VEGFR-2-mRNA und in geringer Menge VEGFR-1-mRNA nachweisen. Zusätzlich berichteten die Autoren, dass einige Schwannom-Zellen auch in der Immunhistochemie positiv für VEGFR-1 gewesen seien. In der vorliegenden Arbeit wiesen 32 Tumore eine geringe und 26 eine mittelgradige bis starke VEGFR-1-Expression auf, dagegen waren 30 Tumore negativ in der Darstellung von VEGFR-2 und 33 gering positiv. Somit konnten sowohl in der zitierten Arbeit von Uesaka et al. (2007) als auch in dieser Studie VEGFR-1 und -2 in Schwannomen nachgewiesen werden. Die

deutlich höhere Nachweisfrequenz in dieser Arbeit für VEGFR-1 könnte in der Verwendung eines Färbeautomaten begründet sein, denn andere wichtige Parameter der Immunreaktion wie der Antikörper (polyklonal, C-17, Santa Cruz) und die Art der Vorbehandlung (Mikrowelle, Citratpuffer) stimmten überein.

In einer weiteren Untersuchung von Cayé-Thomasen et al. (2005) konnte VEGFR-1 mittels eines Enzym-gekoppelten Immun-Assays (ELISA) in Schwannomhomogenaten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation der VEGF- und VEGFR-1-Konzentration mit der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren. In der vorliegenden Studie konnte auf histologischer Ebene eine Korrelation der Proliferationsrate der Tumore mit der VEGFR-2-Expression nachgewiesen werden, nicht jedoch für VEGFR-1. VEGFR-2 wurde leider in der o.g. Studie nicht untersucht. Besonders interessant vor dem Hintergrund der Fragestellung dieser Arbeit erscheint, dass die Korrelation der Proliferation mit der VEGFR-2 Expression sich nur in der Gruppe der sporadischen Schwannome zeigen ließ, nicht jedoch in den syndromal-assoziierten Schwannomen (vgl.5.8). Die entscheidenden Proliferationsstimuli scheinen in syndromal assoziierten Schwannomen damit unabhängig von dem VEGF-Signalweg, was jedoch nicht bedeutet, dass VEGF-Antagonisten nicht auf die Gefäße in den Schwannomen wirken.

Bezüglich der Zusammenhänge zwischen Merlin, VEGF und der Proliferation scheint von Bedeutung, dass Merlin normalerweise RAC1 hemmt, was zu einer Sekretion des anti-angiogenetischen Faktors SEMA3F, einem Semaphorin, führt. Es konnte gezeigt werden, dass SEMA3F in Schwannomen verringert ist und sich damit das Gleichgewicht in Richtung der pro-angiogenetischen VEGF-Wirkung verschiebt (London und Gurgel 2014). Eine Behandlung mit VEGF-Antikörpern könnte somit dazu beitragen, das gestörte Gleichgewicht wiederherzustellen.

Ein weiteres, für die mögliche therapeutische Intervention wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die erhöhte Proliferation von Tumoren bei denen proliferative Endothelien nachgewiesen wurden (vgl. 5.4.2). Dies könnte darauf hindeuten, dass anti-angiogenetische Substanzen besonders effektiv bei hochproliferativen Läsionen wirken wie sie insbesondere bei der Schwannomatose-Gruppe beobachtet wurden.

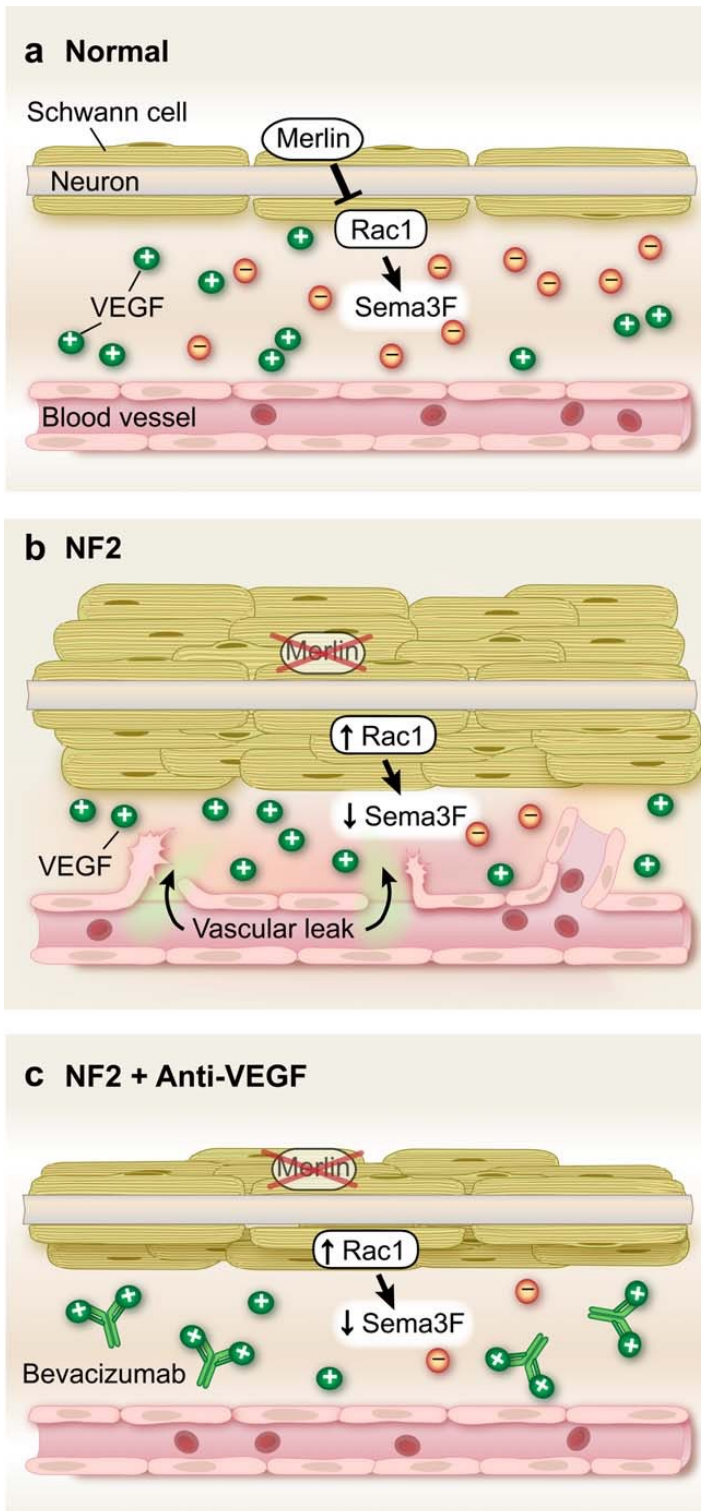


Abbildung 22 – Behandlung von Schwannomen mit Anti-VEGF, a) unter Normalbedingungen hemmt Merlin Rac1, wodurch es zu einer Sekretion von Sema3F kommt. Dieser inhibitorische Faktor steht mit VEGF im Gleichgewicht. b) bei dem Verlust von Merlin kommt es zu einem Anstieg von Rac1, wodurch Sema3F abfällt und vermehrt VEGF vorliegt. Dies induziert eine Angiogenese. c) Mit Bevacizumab wird durch Blockierung von VEGF das Gleichgewicht wiederhergestellt, (London und Gurgel 2014)

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, ob sich periphere sporadische und syndromal-assoziierte Schwannome bezüglich der Vaskularisation unterscheiden. Wie bereits in der Dissertation von Naber (2012) wurde auch in dieser Studie gezeigt, dass die Gefäßdichte in sporadischen Schwannomen höher ausfällt als in den NF2-assoziierten Tumoren. Zusätzlich zeigten sporadische Schwannome in dieser Studie breitere Gefäßwände.

Die syndromalen Schwannome waren durch eine höhere Gefäßdichte gekennzeichnet.

Des Weiteren wiesen sporadische und Schwannomatose-assoziierte Tumore eine signifikant höhere Proliferation auf als die NF2-assoziierten Schwannome, die höchsten Werte wurden bei Schwannomatose-assoziierten Tumoren beobachtet. Eine hohe Proliferationsrate könnte folglich ein Hinweis auf eine Schwannomatose sein und einen Unterschied zur NF2 darstellen.

Es zeigte sich, dass die VEGFR-2 Expression nur bei den sporadischen Schwannomen mit der Proliferation korrelierte, nicht jedoch bei den syndromal-assoziierten Tumoren.

Besonders bei Tumoren mit hohen Proliferationsindizes wurden proliferierende Endothelien gefunden, sodass die vermehrt hoch proliferativen Schwannome der Schwannomatose-Gruppe sich möglicherweise besonders für eine anti-angiogenetische Therapie eignen könnten.

8 Summary

In the present work, the hypothesis was to be examined as to whether peripheral sporadic and syndrome-associated schwannomas differ in terms of vascularization. As in the PhD thesis of Naber (2012), this study also showed that the vascular density in sporadic schwannomas is higher than in the NF2-associated tumors. In addition, sporadic schwannomas in this study showed broader vascular walls. In contrast, the syndrome-associated schwannomas were characterized by a higher vascular density. Furthermore, sporadic and Schwannomatosis-associated tumors showed significantly higher proliferation than NF2-associated schwannomas, with highest levels observed in Schwannomatosis-associated tumors. A high rate of proliferation could therefore be an indication of Schwannomatosis and a difference to NF2. It was shown that VEGFR-2 expression only correlates with proliferation in sporadic schwannomas, but not in syndrome-associated tumors. Especially in tumors with high proliferation indices proliferating endothelia were found, so that the increasingly highly proliferative schwannomas of the Schwannomatosis group might possibly be particularly suitable for anti-angiogenic therapy.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	bone morphogenetic protein
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CPI-17	ein spezifischer Myosin Phosphatase Inhibitor
ERM	Actin bindene Proteine nach Ezrin, Radixin und Moesin
g	Gramm
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
LZTR-1	Leucine zipper like transcription regulator 1
Merlin	moezin-ezrin-radixin-like protein
min	Minute
ml	Milliliter
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidtumor
MRT	Magnetresonanztomographie
MYP-1	Myopia 1 Gen
n	number (engl.: Anzahl)
NF1	Neurofibromatose 1
NF2	Neurofibromatose 2
NIH	National Institute of Health
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannten
p-Wert	probability value (Signifikanzwert)
PAK	Serin/Threonin-Proteinkinase
PLGF	placental growth factor
RAC	Untergruppe der Rho GTPase-Familie
RTK	Rezeptorthyrosinkinase
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator or Chromatin Subfamily B Member 1

SWI/SNF	Switch/Sucrose Non-Fermentable
sog.	sogenannten
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor beta
T.o.V.	Vorbehandlung ohne Citratpuffer
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR-1	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 1
VEGFR-2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2
v.G.	van Gieson
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Figure 1B (Cooper und Giancotti 2014)	10
Abbildung 2 – 4-hits/3-steps-model, nach Figure 1 (Plotkin et al. 2013)	15
Abbildung 3 – Aufbau Chromosom22 (Kehrer-Sawatzki et al. 2017)	16
Abbildung 4 – Fig. 1 (Bae et al. 2015), Interaktion von VEGF mit VEGF-R	23
Abbildung 5 – Fig. 3 (Niu und Chen 2010), VEGF Bindung	24
Abbildung 6 – Durchschnittliche Anzahl der Gefäße in 20mm ² Fläche	38
Abbildung 7 – Mittelwerte der Lumengröße aller Gruppen +/- 1 STD	40
Abbildung 8 – Durchschnittliche Wanddicke aller Gruppen +/- 1 STD, in µm	41
Abbildung 9 – Ausschnitt aus Präparat mit Lumengröße und Wanddicke	42
Abbildung 10 – NF2-assozierten Schwannoms, Maßstab=250 µm	42
Abbildung 11 – Schwannomatose Präparat, Maßstab=500µm	43
Abbildung 12 – Durchschnittliche Anzahl an CD34 positiven Gefäßen	44
Abbildung 13 – Mittelwerte der Gefäßradien in CD34 Gruppen +/- eine STD	46
Abbildung 14 – Sporadisches Schwannom ohne und mit Messungen	46
Abbildung 15 – Ausschnitte CD34 mit unterschiedlicher Gefäßmorphologie	47
Abbildung 16 – Ausschnitte Ki-67-markierte Präparate, Maßstab=100µm	49
Abbildung 17 – Ki-67 (links:NF2, rechts:Schwannomatose) Maßstab=100µm	50
Abbildung 18 – Sporadisches Schwannom mit proliferierenden Endothelien	50
Abbildung 19 – Ausschnitte Turnbullpräparate, Maßstab=100µm	53
Abbildung 20 – Ausschnitte VEGFR-1-Präparate	54
Abbildung 21 – Ausschnitte VEGFR-2 Präparate	54
Abbildung 22 – Behandlung Schwannome mit Anti-VEGF, (London und Gurgel 2014)	61

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Manchester Kriterien modifiziert nach Baser et al. 2003	9
Tabelle 2 – Diagnostische Kriterien Schwannomatose MacCollin et. al. 2003	13
Tabelle 3 – Diagnostische Kriterien nach Plotkin et. al. 2013	14
Tabelle 4 – Durchschnittsalter der Patientenkollktive	25
Tabelle 5 – Aufteilung des Kollektivs auf die untersuchten Gruppen	26
Tabelle 6 – Verwendete Reagenzien, alphabetisch sortiert	27
Tabelle 7 – Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen	28
Tabelle 8 – verwendeten Lösungen für die v.G., alphabetisch sortiert	29
Tabelle 9 – verwendete Lösungen für Turnbull, alphabetisch sortiert	29
Tabelle 10 – Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen	30
Tabelle 11 – verwendete Laborgeräte, alphabetisch sortiert	30
Tabelle 12 – verwendete Verbrauchsmaterialien, alphabetisch sortiert	31
Tabelle 13 – Auswertung: Anzahl der Gefäße in 20mm ²	39
Tabelle 14 – Auswertung: Lumengröße	40
Tabelle 15 – Auswertung: Durchschnittliche Gefäßwanddicke	41
Tabelle 16 – Auswertung: Anzahl der Gefäße bei CD34 in n/10mm ² Fläche	44
Tabelle 17 – Auswertung: Durchschn. Radius der Gefäße CD34-Markierung	45
Tabelle 18 – Auswertung: Ki-67-Index in %	51
Tabelle 19 – Auswertung: Anzahl Präparate mit positiven	51
Tabelle 20 – Vergleich verschiedener Studien zur Vaskularisation	58

12 Literaturverzeichnis

- Adani, R., A. Baccarani, E. Guidi, and L. Tarallo. 2008. "Schwannomas of the upper extremity: diagnosis and treatment." *Chir Organi Mov* 92 (2):85-8. doi: 10.1007/s12306-008-0049-0.
- Bae, O. N., M. Noh, Y. J. Chun, and T. C. Jeong. 2015. "Keratinocytic vascular endothelial growth factor as a novel biomarker for pathological skin condition." *Biomol Ther (Seoul)* 23 (1):12-8. doi: 10.4062/biomolther.2014.102.
- Baser, M. E., J. M. Friedman, and D. G. Evans. 2006. "Increasing the specificity of diagnostic criteria for schwannomatosis." *Neurology* 66 (5):730-2. doi: 10.1212/01.wnl.0000201190.89751.41.
- Baser, M. E., J. M. Friedman, H. Joe, A. Shenton, A. J. Wallace, R. T. Ramsden, and D. G. Evans. 2011. "Empirical development of improved diagnostic criteria for neurofibromatosis 2." *Genet Med* 13 (6):576-81. doi: 10.1097/GIM.0b013e318211faa9.
- Baser, M. E., L. Kuramoto, H. Joe, J. M. Friedman, A. J. Wallace, J. E. Gillespie, R. T. Ramsden, and D. G. Evans. 2004. "Genotype-phenotype correlations for nervous system tumors in neurofibromatosis 2: a population-based study." *Am J Hum Genet* 75 (2):231-9. doi: 10.1086/422700.
- Boocock, C. A., D. S. Charnock-Jones, A. M. Sharkey, J. McLaren, P. J. Barker, K. A. Wright, P. R. Twentyman, and S. K. Smith. 1995. "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 87 (7):506-16.
- Boyd, C., M. J. Smith, L. Kluwe, A. Balogh, M. Maccollin, and S. R. Plotkin. 2008. "Alterations in the SMARCB1 (INI1) tumor suppressor gene in familial schwannomatosis." *Clin Genet* 74 (4):358-66. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01060.x.

- Cayé-Thomasen, P., K. Werther, A. Nalla, T. C. Bøg-Hansen, H. J. Nielsen, S. E. Stangerup, and J. Thomsen. 2005. "VEGF and VEGF receptor-1 concentration in vestibular schwannoma homogenates correlates to tumor growth rate." *Otol Neurotol* 26 (1):98-101.
- Cooper, J., and F. G. Giancotti. 2014. "Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function." *FEBS Lett* 588 (16):2743-52. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.001.
- Culy, C. 2005. "Bevacizumab: antiangiogenic cancer therapy." *Drugs Today (Barc)* 41 (1):23-36. doi: 10.1358/dot.2005.41.1.875776.
- Dilwali, S., S. Y. Kao, T. Fujita, L. D. Landegger, and K. M. Stankovic. 2015. "Nonsteroidal anti-inflammatory medications are cytostatic against human vestibular schwannomas." *Transl Res* 166 (1):1-11. doi: 10.1016/j.trsl.2014.12.007.
- Evans, D. G., E. Howard, C. Giblin, T. Clancy, H. Spencer, S. M. Huson, and F. Laloo. 2010. "Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service." *Am J Med Genet A* 152A (2):327-32. doi: 10.1002/ajmg.a.33139.
- Evans, D. G., S. M. Huson, D. Donnai, W. Neary, V. Blair, V. Newton, and R. Harris. 1992. "A clinical study of type 2 neurofibromatosis." *Q J Med* 84 (304):603-18.
- Evans, D. G., S. M. Huson, D. Donnai, W. Neary, V. Blair, D. Teare, V. Newton, T. Strachan, R. Ramsden, and R. Harris. 1992. "A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity." *J Med Genet* 29 (12):841-6.
- Evans, D. G., A. Moran, A. King, S. Saeed, N. Gurusinghe, and R. Ramsden. 2005. "Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: higher incidence than previously thought." *Otol Neurotol* 26 (1):93-7.
- Evans Dg, Bourn D, Wallace A, Ramsden RT, Mitchell JD, Strachan T. 1995. Diagnostic issues in a family with late onset type 2 neurofibromatosis.

- Farschtschi, S., V. L. Merker, D. Wolf, M. Schuhmann, J. Blakeley, S. R. Plotkin, C. Hagel, and V. F. Mautner. 2016. "Bevacizumab treatment for symptomatic spinal ependymomas in neurofibromatosis type 2." *Acta Neurol Scand* 133 (6):475-80. doi: 10.1111/ane.12490.
- Ferrara, N., and W. J. Henzel. 1989. "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 161 (2):851-8.
- Fina, L., H. V. Molgaard, D. Robertson, N. J. Bradley, P. Monaghan, D. Delia, D. R. Sutherland, M. A. Baker, and M. F. Greaves. 1990. "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells." *Blood* 75 (12):2417-26.
- Fontanella, C., E. Ongaro, S. Bolzonello, M. Guardascione, G. Fasola, and G. Aprile. 2014. "Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors." *Ann Transl Med* 2 (12):123. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.14.
- Gerdes, J., U. Schwab, H. Lemke, and H. Stein. 1983. "Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation." *Int J Cancer* 31 (1):13-20.
- Gusella, J. F., V. Ramesh, M. MacCollin, and L. B. Jacoby. 1999. "Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor." *Biochim Biophys Acta* 1423 (2):M29-36.
- Hagel, C., C. Dornblut, A. Schulz, U. Wiehl, R. E. Friedrich, T. Huckhagel, V. F. Mautner, and H. Morrison. 2016. "The putative oncogene CPI-17 is up-regulated in schwannoma." *Neuropathol Appl Neurobiol* 42 (7):664-668. doi: 10.1111/nan.12330.
- Hagel, C., A. O. Stemmer-Rachamimov, A. Bornemann, M. Schuhmann, C. Nagel, S. Huson, D. G. Evans, S. Plotkin, C. Matthies, L. Kluwe, and V. F. Mautner. 2012. "Clinical presentation, immunohistochemistry and electron microscopy indicate neurofibromatosis type 2-associated gliomas to be spinal ependymomas." *Neuropathology* 32 (6):611-6. doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01306.x.
- Halliday, A. L., R. A. Sobel, and R. L. Martuza. 1991. "Benign spinal nerve sheath tumors: their occurrence sporadically and in neurofibromatosis types 1 and 2." *J Neurosurg* 74 (2):248-53. doi: 10.3171/jns.1991.74.2.0248.

- Hirbe, A. C., and D. H. Gutmann. 2014. "Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care." *Lancet Neurol* 13 (8):834-43. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70063-8.
- Hulsebos, T. J., A. S. Plomp, R. A. Wolterman, E. C. Robanus-Maandag, F. Baas, and P. Wesseling. 2007. "Germline mutation of INI1/SMARCB1 in familial schwannomatosis." *Am J Hum Genet* 80 (4):805-10. doi: 10.1086/513207.
- Hutter, S., R. M. Piro, D. E. Reuss, V. Hovestadt, F. Sahm, S. Farschtschi, H. Kehrer-Sawatzki, S. Wolf, P. Lichter, A. von Deimling, M. U. Schuhmann, S. M. Pfister, D. T. Jones, and V. F. Mautner. 2014. "Whole exome sequencing reveals that the majority of schwannomatosis cases remain unexplained after excluding SMARCB1 and LZTR1 germline variants." *Acta Neuropathol* 128 (3):449-52. doi: 10.1007/s00401-014-1311-1.
- Johnson, M. D., A. D. Glick, and B. W. Davis. 1988. "Immunohistochemical evaluation of Leu-7, myelin basic-protein, S100-protein, glial-fibrillary acidic-protein, and LN3 immunoreactivity in nerve sheath tumors and sarcomas." *Arch Pathol Lab Med* 112 (2):155-60.
- Jokinen, C. H., S. S. Dadras, J. R. Goldblum, M. van de Rijn, R. B. West, and B. P. Rubin. 2008. "Diagnostic implications of podoplanin expression in peripheral nerve sheath neoplasms." *Am J Clin Pathol* 129 (6):886-93. doi: 10.1309/M7D5KTVYYE51XYQA.
- Kehrer-Sawatzki, H., S. Farschtschi, V. F. Mautner, and D. N. Cooper. 2017. "The molecular pathogenesis of schwannomatosis, a paradigm for the co-involvement of multiple tumour suppressor genes in tumorigenesis." *Hum Genet* 136 (2):129-148. doi: 10.1007/s00439-016-1753-8.
- Kiliç, T., M. N. Pamir, S. Küllü, F. Eren, M. M. Ozek, and P. M. Black. 2000. "Expression of structural proteins and angiogenic factors in cerebrovascular anomalies." *Neurosurgery* 46 (5):1179-91; discussion 1191-2.
- Kindblom, L. G., M. Ahldén, J. M. Meis-Kindblom, and G. Stenman. 1995. "Immunohistochemical and molecular analysis of p53, MDM2, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in benign and malignant peripheral nerve sheath tumours." *Virchows Arch* 427 (1):19-26.

- Kluwe, L., V. Mautner, B. Heinrich, R. Dezube, L. B. Jacoby, R. E. Friedrich, and M. MacCollin. 2003. "Molecular study of frequency of mosaicism in neurofibromatosis 2 patients with bilateral vestibular schwannomas." *J Med Genet* 40 (2):109-14.
- Kong, X., J. Guan, W. Ma, Y. Li, B. Xing, Y. Yang, Y. Wang, J. Gao, J. Wei, Y. Yao, Z. Xu, W. Dou, W. Lian, C. Su, Z. Ren, and R. Wang. 2016. "CD34 Over-Expression is Associated With Gliomas' Higher WHO Grade." *Medicine (Baltimore)* 95 (7):e2830. doi: 10.1097/MD.0000000000002830.
- Linda, X. W., and L. D. Recht. 2016. "Bevacizumab for Treatment-Refractory Pain Control in Neurofibromatosis Patients." *Cureus* 8 (12):e933. doi: 10.7759/cureus.933.
- London, N. R., and R. K. Gurgel. 2014. "The role of vascular endothelial growth factor and vascular stability in diseases of the ear." *Laryngoscope* 124 (8):E340-6. doi: 10.1002/lary.24564.
- Lüllmann-Rauch, Renate. 2003. *Histologie*. Vol. 5. Georg Thieme Verlag.
- MacCollin, M., E. A. Chiocca, D. G. Evans, J. M. Friedman, R. Horvitz, D. Jaramillo, M. Lev, V. F. Mautner, M. Niimura, S. R. Plotkin, C. N. Sang, A. Stemmer-Rachamimov, and E. S. Roach. 2005. "Diagnostic criteria for schwannomatosis." *Neurology* 64 (11):1838-45. doi: 10.1212/01.WNL.0000163982.78900.AD.
- MacCollin, M., C. Willett, B. Heinrich, L. B. Jacoby, J. S. Acierno, A. Perry, and D. N. Louis. 2003. "Familial schwannomatosis: exclusion of the NF2 locus as the germline event." *Neurology* 60 (12):1968-74.
- MacCollin, M., W. Woodfin, D. Kronn, and M. P. Short. 1996. "Schwannomatosis: a clinical and pathologic study." *Neurology* 46 (4):1072-9.
- Mautner, V. F., R. Nguyen, H. Kutta, C. Fuensterer, C. Bokemeyer, C. Hagel, R. E. Friedrich, and J. Panse. 2010. "Bevacizumab induces regression of vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2." *Neuro Oncol* 12 (1):14-8. doi: 10.1093/neuonc/nop010.
- McClatchey, A. I., and M. Giovannini. 2005. "Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin." *Genes Dev* 19 (19):2265-77. doi: 10.1101/gad.1335605.

- Merker, V. L., S. Esparza, M. J. Smith, A. Stemmer-Rachamimov, and S. R. Plotkin. 2012. "Clinical features of schwannomatosis: a retrospective analysis of 87 patients." *Oncologist* 17 (10):1317-22. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0162.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak. 1999. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." *FASEB J* 13 (1):9-22.
- NIH Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol* 1988, 45 (5):575-8.
- Niu, G., and X. Chen. 2010. "Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy." *Curr Drug Targets* 11 (8):1000-17.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh. 2006. "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (5):359-71. doi: 10.1038/nrm1911.
- Paganini, I., V. Y. Chang, G. L. Capone, J. Vitte, M. Benelli, L. Barbetti, R. Sestini, E. Trevisson, T. J. Hulsebos, M. Giovannini, S. F. Nelson, and L. Papi. 2015. "Expanding the mutational spectrum of LZTR1 in schwannomatosis." *Eur J Hum Genet* 23 (7):963-8. doi: 10.1038/ejhg.2014.220.
- Phalen, G. S. 1976. "Neurilemmomas of the forearm and hand." *Clin Orthop Relat Res* (114):219-22.
- Plotkin, S. R., J. O. Blakeley, D. G. Evans, C. O. Hanemann, T. J. Hulsebos, K. Hunter-Schaedle, G. V. Kalpana, B. Korf, L. Messiaen, L. Papi, N. Ratner, L. S. Sherman, M. J. Smith, A. O. Stemmer-Rachamimov, J. Vitte, and M. Giovannini. 2013. "Update from the 2011 International Schwannomatosis Workshop: From genetics to diagnostic criteria." *Am J Med Genet A* 161A (3):405-16. doi: 10.1002/ajmg.a.35760.
- Plotkin, S. R., A. O. Stemmer-Rachamimov, F. G. Barker, C. Halpin, T. P. Padera, A. Tyrrell, A. G. Sorensen, R. K. Jain, and E. di Tomaso. 2009. "Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2." *N Engl J Med* 361 (4):358-67. doi: 10.1056/NEJMoa0902579.

- Recklinghausen, FD von. 1882. die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehungen zu den multiplen Neuomen. Festschrift zur Feier des fünfundzwanzigjährigen Bestehens des pathologischen Instituts zu Berlin, Herrn Rudolf Virchow dargebracht. Hirschwald, Berlin.
- Rodriguez, F. J., A. L. Folpe, C. Giannini, and A. Perry. 2012. "Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems." *Acta Neuropathol* 123 (3):295-319. doi: 10.1007/s00401-012-0954-z.
- Rodriguez, H. A., and M. Berthrong. 1966. "Multiple primary intracranial tumors in von Recklinghausen's neurofibromatosis." *Arch Neurol* 14 (5):467-75.
- Rouleau, G. A., J. L. Haines, A. Bazanowski, A. Colella-Crowley, J. A. Trofatter, N. S. Wexler, P. M. Conneally, and J. F. Gusella. 1989. "A genetic linkage map of the long arm of human chromosome 22." *Genomics* 4 (1):1-6.
- Scheithauer, BW. 2007. World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System. edited by S Hunter DN Louis, JM Woodruff, CR Antonescu. IARC Press.
- Scheithauer BW, Woodruff JM, Erlandson RA. 1999. Schwannoma. Atlas of tumor pathology, tumors of the peripheral nervous system. Third series, fascicle 24: Armed Forces Institute of Pathology.
- Scholzen, T., and J. Gerdes. 2000. "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182 (3):311-22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
- Schulz, A., P. Grafe, C. Hagel, P. Bäumer, H. Morrison, V. F. Mautner, and S. Farschtschi. 2017. "Neuropathies in the setting of Neurofibromatosis tumor syndromes: Complexities and opportunities." *Exp Neurol*. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.006.
- Seizinger, B. R., G. A. Rouleau, L. J. Ozelius, A. H. Lane, A. G. Faryniarz, M. V. Chao, S. Huson, B. R. Korf, D. M. Parry, and M. A. Pericak-Vance. 1987. "Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene." *Cell* 49 (5):589-94.
- Smith, G. A., G. W. Fearnley, D. C. Tomlinson, M. A. Harrison, and S. Ponnambalam. 2015. "The cellular response to vascular endothelial growth factors requires co-ordinated signal transduction, trafficking and proteolysis." *Biosci Rep* 35 (5). doi: 10.1042/BSR20150171.

- Smith, M. J., B. Isidor, C. Beetz, S. G. Williams, S. S. Bhaskar, W. Richer, J. O'Sullivan, B. Anderson, S. B. Daly, J. E. Urquhart, A. Fryer, C. F. Rustad, S. J. Mills, A. Samii, D. du Plessis, D. Halliday, S. Barbarot, F. Bourdeaut, W. G. Newman, and D. G. Evans. 2015. "Mutations in LZTR1 add to the complex heterogeneity of schwannomatosis." *Neurology* 84 (2):141-7. doi: 10.1212/WNL.0000000000001129.
- Smith, M. J., J. A. Walker, Y. Shen, A. Stemmer-Rachamimov, J. F. Gusella, and S. R. Plotkin. 2012. "Expression of SMARCB1 (INI1) mutations in familial schwannomatosis." *Hum Mol Genet* 21 (24):5239-45. doi: 10.1093/hmg/ddc370.
- Smith, M. J., A. J. Wallace, N. L. Bowers, H. Eaton, and D. G. Evans. 2014. "SMARCB1 mutations in schwannomatosis and genotype correlations with rhabdoid tumors." *Cancer Genet* 207 (9):373-8. doi: 10.1016/j.cancergen.2014.04.001.
- Trofatter, J. A., M. M. MacCollin, J. L. Rutter, J. R. Murrell, M. P. Duyao, D. M. Parry, R. Eldridge, N. Kley, A. G. Menon, and K. Pulaski. 1993. "A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor." *Cell* 75 (4):826.
- Uesaka, T., T. Shono, S. O. Suzuki, A. Nakamizo, H. Niino, M. Mizoguchi, T. Iwaki, and T. Sasaki. 2007. "Expression of VEGF and its receptor genes in intracranial schwannomas." *J Neurooncol* 83 (3):259-66. doi: 10.1007/s11060-007-9336-0.
- Ulfig, N. 2015. *Kurzlehrbuch Histologie*. 4. korrigierte Auflage ed. Georg Thieme Verlag KG.
- Ulrich Welsch, Wolfgang Kummer, Thomas Deller. 2014. *Lehrbuch Histologie*: Elsevier.
- Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C. H. Heldin. 1994. "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor." *J Biol Chem* 269 (43):26988-95.
- Wishart. 1822 Case of tumors in the skull, dura mater, and brain. *Edinburgh Med Surg J*.

- Woodruff, J. M., B. W. Scheithauer, O. Kurtkaya-Yapicier, C. Raffel, S. S. Amr, M. P. LaQuaglia, and C. R. Antonescu. 2003. "Congenital and childhood plexiform (multinodular) cellular schwannoma: a troublesome mimic of malignant peripheral nerve sheath tumor." *Am J Surg Pathol* 27 (10):1321-9.
- Zachary, I. 2003. "VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology." *Biochem Soc Trans* 31 (Pt 6):1171-7. doi: 10.1042/.

13 Anhänge

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse für die morphologischen Untersuchungen aufgelistet.

Bei dem Geschlecht versteht sich unter

- (1) weiblich
- (2) männlich.

Für die Tumorgruppe gilt

- (1) sporadisches Schwannom
- (2) NF2
- (3) Schwannomatose.

Für das Endothel aus Ki67-Endothel gilt

- (0) Kein positives Endothel
- (1) Positives Endothel.

Für den Färbegrad bei Turnbull gilt:

- (0) keine Hämosiderinablagerungen vorhanden
- (1) geringe Hämosiderinablagerungen vorhanden
- (2) mittelstarke Hämosiderinablagerungen vorhanden
- (3) viele Hämosiderinablagerungen vorhanden

E-Nummer	Tumorart	Geschlecht	Alter	Anzahl Gefäße	Lumengröße in μm^2	Wanddicke in μm	Anzahl in CD34	Lumen-Durchmesser in μm	Färbegrad Turnbull	Ki Index in %	Ki67 Endothel
37-98	1	2	70	15	1412,62	11,41	148	9,35	2	19,08	0
208-99	1	2	49	46	3009,53	14,13	133	12,66	1	8,51	0
482-00	1	1	69	25	4519,45	10,33	143	12,40	3	3,64	0
808-01	1	2	34	31	2800,05	9,23	103	14,00	0	11,22	0
180-03	1	2	25	26	8395,96	19,43	106	5,34	0	5,91	0
734-03	1	1	50	45	4346,25	16,89	133	12,57	1	10,75	0
408-04	1	1	30	17	2493,82	24,89	81	6,74	0	4,17	0
680-05	1	1	77	24	3302,57	25,98	48	7,29	4	9,26	0
28-06	1	1	76	32	582,22	13,93	154	12,79	2	12,57	0
784-06	1	1	62	29	13280,25	22,98	81	9,89	2	6,62	0
1117-08	1	1	68	19	8906,19	19,74	105	21,07	0	9,40	1
520-08	1	1	9	32	1819,04	10,13	35	9,47	0	9,09	0

E-Nummer	Tumorart	Geschlecht	Alter	Anzahl Gefäße	Lumengröße in μm^2	Wanddicke in μm	Anzahl in CD34	Lumen-Durchmesser in μm	Färbegrad Turnbull	Ki Index in %	Pos. Endothel
1389-09	1	1	55	18	3462,26	16,54	60	13,37	0	6,63	0
465-09	1	1	33	17	7230,75	33,82	52	6,64	0	7,43	0
66-10	1	1	39	48	4396,08	10,28	82	21,40	0	12,50	1
923-10	1	1	33	22	4658,78	12,44	104	8,65	0	7,74	0
645-11	1	2	44	21	2086,45	15,01	42	7,70	0	10,67	0
1377-12	1	1	53	25	4865,41	19,93	82	6,93	3	18,39	1
1736-12	1	2	43	22	7655,24	19,40	59	26,18	3	7,11	1
486-12	1	2	36	22	2681,86	17,30	107	8,92	1	2,56	1
1243-13	1	1	31	22	1298,29	23,50	61	4,92	0	13,64	0
1281-13	1	1	48	19	5779,47	29,37	85	9,13	1	20,97	1
1131-14	1	1	50	31	5076,48	12,93	39	8,55	1	6,75	0
2079-14	1	2	28	17	2359,91	11,37	79	5,32	0	9,62	0
31-14	1	1	40	34	3589,05	14,04	133	16,61	0	16,00	0

E-Nummer	Tumorart	Geschlecht	Alter	Anzahl Gefäße	Lumengröße in μm^2	Wanddicke in μm	Anzahl in CD34	Lumen-Durchmesser in μm	Färbegrad Turnbull	Ki Index in %	Pos. Endothel
927-14	1	1	55	36	2647,66	17,77	60	16,13	0	5,00	1
1623-15	1	2	50	49	6411,47	14,11	93	12,93	1	15,33	1
509-94	2	2	16	27	2459,07	6,51	63	9,26	0	7,05	0
596-96	2	2	23	28	15,21,09	11,81	30	7,68	0	4,29	0
640-96	2	2	34	42	796,61	9,50	56	7,50	0	3,92	0
595-97	2	2	58	85	2558,70	14,64	112	11,12	1	1,26	0
74-97	2	1	26	25	1701,73	8,43	44	7,57	0	3,70	0
750-99	2	1	30	25	1663,43	11,30	27	9,43	0	5,97	0
882-00	2	2	36	35	1222,95	10,91	31	7,61	0	3,29	0
65-02	2	2	34	36	3294,74	11,03	34	9,68	1	4,40	0
742-02	2	1	35	35	1490,67	7,89	63	8,32	2	6,04	0
776-03	2	2	15	61	1449,89	10,87	87	8,28	0	5,32	0
630-04	2	2	14	92	3078,77	9,61	58	11,14	0	10,81	1

E-Nummer	Tumorart	Geschlecht	Alter	Anzahl Gefäße	Lumengröße in μm^2	Wanddicke in μm	Anzahl in CD34	Lumen-Durchmesser in μm	Färbegrad Turnbull	Ki Index in %	Pos. Endothel
21-06	2	1	26	45	3166,96	12,73	93	11,62	3	12,55	0
122-07	2	1	12	29	1296,57	8,52			0	9,56	0
1068-11	2		15	42	6850,38	23,19	83	17,47	3	9,73	0
1301-12	2	2	22	76	2466,99	11,23	169	9,37	0	9,20	0
1715-12	2	2	58	24	3604,49	15,35	28	14,13	0	11,33	0
1815-13	2	2	26	51	924,97	11,278	110	8,74	0	11,35	0
423-13	2	2	30	37	1640,32	14,31	85	7,95	1	5,82	0
890-13	2	1	19	56	1297,87	10,79	86	7,64	0	4,32	0
905-13	2	1	39	35	1284,59	12,48	59	9,85	0	4,85	0
374-15	2	1	9	31	1187,80	13,97	45	6,25	0	2,30	1
399-15	2	1	28	45	4958,14	12,88	61	13,63	0	5,81	0
166-91	3	1	37	65	2347,97	9,99	74	9,05	0	24,47	1
35-99	3	2	41	23	2271,40	11,38					0

E-Nummer	Tumorart	Geschlecht	Alter	Anzahl Gefäße	Lumengröße in μm^2	Wanddicke in μm	Anzahl in CD34	Lumen-Durchmesser in μm	Färbegrad Turnbull	Ki Index in %	Pos. Endothel
5262-03	3	1	41	39	4723,37	10,90	23	21,80	0	8,13	0
829-04	3			91	1249,80	9,13	197	4,95	0	14,89	0
436-05	3	2	38	43	2689,18	24,79	119	9,68	2	20,99	1
6910-05	3	2	47	71	1107,62	7,40	189	10,57	0	11,59	0
46-05	3	1	32	34	1329,38	9,39	37	6,31	0	6,36	0
960-07	3	1	54	26	4607,31	11,06	60	9,42	1	3,36	0
2694-09	3	1	50				36	4,29	0	9,93	0
1029-10	3	2	30	35	2640,26	12,93	34	19,55	0	12,61	0
504-11	3	1	37	30	6429,31	12,55	34	15,98	0	2,68	0
670-13	3			22	4219,42	13,13	37	12,56	0	2,97	1
1355-14	3	2	29	64	2017,07	14,45	65	5,89	0	12,50	0
2275-14	3	1	32	73	1169,03	12,73	205	6,53	0	4,50	0
412-14	3	1	48	45	4810,45	11,76	62	5,58	0	16,88	0

E-Nummer	Tumorart	Geschlecht	Alter	Anzahl Gefäße	Lumengröße in μm^2	Wanddicke in μm	Anzahl in CD34	Lumen-Durchmesser in μm	Färbegrad Turnbull	Ki Index in %	Pos. Endothel
587-14	3	1	36	43	3338,32	8,18	138	8,74	0	14,21	0
2016-15	3	1	28	63	2279,75	14,45	60	9,47	0	25,71	1
2273-15	3	1	29	32	4345,03	14,95	70	6,28	0	17,65	0
939-15	3	2	42	74	989,35	10,26	139	9,65	0	10,48	0

Im Folgenden werden die Ergebnisse der VEGFR1- und VEGFR-2 Auswertung aufgelistet.

Für den Färbegrad versteht sich bei VEGFR-1 und VEGFR-2:

- (0) keine Färbung
- (1) geringe Färbung
- (2) mittelstarke Färbung
- (3) starke Färbung

E-Nummer	Färbegrad VEGFR-1	Positive Gefäße VEGFR-1 (%)	Färbegrad VEGFR-2	Positive Gefäße VEGFR-2 (%)
37-98	1	43,243	0	0,000
208-99	1	25	1	13,889
482-00	1	55,556	1	17,073
808-01	1	36,842	1	10,000
180-03	1	36,842	1	13,333
734-03	2	63,492	1	30,534
408-04	1	0,000	0	0,000
680-05	1	40,000	2	15,385
28-06	2	78,049	2	23,810
784-06	2	72,727	1	20,690
1117-08	1	75,000	0	7,143
520-08	2	39,286	1	27,273
1389-09	1	66,67	0	0,000
465-09	2	33,333	1	29,412
66-10	2	62,069	1	31,034

E-Nummer	Färbegrad VEGFR-1	Positive Gefäße VEGFR-1 (%)	Färbegrad VEGFR-2	Positive Gefäße VEGFR-2 (%)
923-10	2	58,621	1	25,000
645-11	2	38,889	0	0,000
1377-12	2	61,905	0	16,667
1736-12	1	42m308	1	11,765
468-12	2	70,968	0	21,053
1243-13	2	81,081	1	65,517
1281-13	2	38,889	1	68,421
1131-14	2	36,842	1	16,667
2079-14	1	77,273	1	40,000
31-14	3	46,667	1	71,429
927-14	1	73,684	1	13,333
1623-15	1	84,615	1	78,261
509-94	1	39,286	1	25,000
640-96			1	10,526
595-97	1	60,870	1	31,818
74-97	1	42,105	1	25,000
750-99	1	8,696	1	33,333
882-00			1	16,667
65-02	1	73,913	1	16,667
742-02	1	61,111	1	18,750
776-03	1	72,000	0	0,000
630-04	1	73,333	1	10,204
21-06	2	48,857	1	36,364

E-Nummer	Färbegrad VEGFR-1	Positive Gefäße VEGFR-1 (%)	Färbegrad VEGFR-2	Positive Gefäße VEGFR-2 (%)
122-07	2	38,462	1	16,667
1068-11	1	34,783	1	3,704
1301-12	2	40,000	1	36,000
1715-12	1	65,517	1	13,333
1815-13	1	81,132	0	13,636
423-13	1	62,500	1	30,000
890-13	1	86,111	0	0,000
6910-05			0	0,000
905-13	2	56,522	1	31,579
399-15	1	52,941	1	16,667
166-91	2	45,455	1	19,231
5262-03			1	17,647
829-04	2	80,000	1	36,842
436-05	2	20,000	1	10,000
46-05			0	0,000
412-14	2	56,098	1	17,241
960-07			0	0,000
2694-09			1	12,500
1029-10	1	76-190	1	16,667
504-11	1	4,545	1	30,435
670-13	1	76,471		
1355-14	2	52,632	1	14,286
2275-14	2	62,069	1	17,647

E-Nummer	Färbegrad VEGFR-1	Positive Gefäße VEGFR-1 (%)	Färbegrad VEGFR-2	Positive Gefäße VEGFR-2 (%)
587-14			1	38,095
2016-15	1	43,750	1	22,222
2273-15	1	65,517	1	57,143
939-15	2	44,118	1	72,222

14 Danksagungen

Die Danksagung entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

15 Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

16 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: