

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. M. Glatzel

**Desert Hedgehog Protein als
Neurofibromatose Typ1-assoziiierter Differenzierungsmarker**

Dissertation

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

vorgelegt von:
Carina Rocker
aus Emmerich

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.09.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Reinhard Friedrich

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Christian Hagel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Neurofibromatose Typ 1.....	1
1.1.1 Merkmale der NF1.....	2
1.1.2 Tumoren der peripheren Nerven bei NF1	7
1.1.3 Genetik und Ätiopathogenese der NF1 und ihrer Merkmale.....	16
1.2 Untersuchte Antigene.....	23
1.2.1 Zelltypspezifische Marker	23
1.2.2 Desert Hedgehog Signalmolekül	25
2. Arbeitshypothese und Fragestellung	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 Patientenkollektiv.....	30
3.1.2 Antikörper	34
3.1.3 Reagenzien	35
3.1.4 Lösungen und Puffer	35
3.1.5 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	35
3.1.6 Software	36
3.2 Methoden	37
3.2.1 Schnittherstellung.....	37
3.2.2 Automatisierte Immunhistochemische Markierungen	37
3.2.3 Evaluation.....	40
3.2.4 Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	44
4.1 Kapselüberschreitendes Wachstum.....	44
4.2 Desert-Hedgehog Markierung.....	46
4.2.1 Semiquantitative DHH-Auswertung	49
4.2.2 Quantitative DHH-Auswertung:	52
4.3 Doppelmarkierungen.....	57

5. Diskussion.....	62
5.1 Kapselüberschreitendes Wachstum.....	62
5.2 DHH-Expression in peripheren Nervenscheidentumoren.....	66
5.3 Mögliche Beteiligung des DHH an der Malignisierung von Neurofibromen	70
5.4 Methodenkritik.....	72
5.4.1 Auswahl der Stichprobe nach Tumortyp.....	72
5.4.2 Analyse der Stichprobenzusammensetzung	73
5.4.3 DHH-Markierung als immunhistologische Untersuchung	77
5.4.4 Auswertungsmethoden der untersuchten DHH-Markierung	78
5.4.5 Auswahl der Antikörper für die Doppelmarkierungen	80
5.5 Ausblick.....	82
6. Zusammenfassung	84
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	86
7.1 Abbildungen:	86
7.2 Tabellen:	87
8. Abkürzungsverzeichnis.....	89
9. Literaturverzeichnis.....	92
10. Anhang	123
11. Danksagung	129
12. Lebenslauf.....	130
13. Eidesstattliche Erklärung.....	131

1. Einleitung

In der Einleitung wird zunächst eine Einführung in die Erkrankung der Neurofibromatose Typ 1 gegeben und insbesondere auf die peripheren Nervenscheidentumore (PNST), die gehäuft bei dieser Erkrankung auftreten, eingegangen. Im Anschluss wird die Genetik und Pathogenese der NF1 erläutert. Zudem werden die Antigene und besonders das Desert Hedgehog Protein aufgeführt, welche in der vorliegenden Studie genauer untersucht wurden.

1.1 Neurofibromatose Typ 1

Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1 (NF1) wurde, lange bevor der Begriff ‚Neurofibrom‘ erstmals verwendet wurde, in Illustrationen und Fallberichten beschrieben, welche bis ins 13. Jahrhundert zurückreichen (Zanca und Zanca 1980). Doch dabei handelte es sich zunächst um klinische Fallbeschreibungen ohne Kenntnisse über die pathologischen Grundlagen der Erkrankung. Erst im Jahre 1882 beschrieb der Pathologe Daniel Friedrich von Recklinghausen gutartige Tumore, welche aus dem Endoneurium peripherer Nerven entstehen und bezeichnete sie als Neurofibrome. Seither wurde die Erkrankung als Neurofibromatose oder Morbus Recklinghausen bezeichnet (von Recklinghausen 1882). Die heutige Nomenklatur der NF1 und somit die Abgrenzung zu weiteren Formen der Neurofibromatose sowie ähnlichen Krankheitsbildern wurde 1987 auf der ‚National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Conference‘ festgelegt (Stumpf et al. 1988). Heutzutage unterscheidet man drei Formen der Neurofibromatosen, die NF1, die Neurofibromatose Typ 2 und die Schwannomatose (Korf 2013). Diese Krankheiten werden auch zu den neurokutanen Syndromen gezählt, einer heterogenen Gruppe verschiedener multisystemischer Erkrankungen, welche sich überwiegend an der Haut und im Nervensystem manifestieren (Rosser 2018).

Bei der NF1 handelt es sich mit einer Inzidenz von 1:2500 - 1:4300 (Clementi et al. 1990, Littler und Morton 1990, Lammert et al. 2005) um die häufigste der bekannten hereditären neurokutanen Erkrankungen (Rosser 2018).

1.1.1 Merkmale der NF1

Die NF1 ist eine multisystemische Erkrankung, die in erster Linie die Haut, die Augen, das muskuloskeletale System und das Nervensystem betrifft (Rosser 2018). Die Beeinträchtigung verschiedener Körpersysteme führt zu einer Vielfalt von möglichen Krankheitsmanifestationen (Carey und Viskochil 1999). Es besteht nicht nur intraindividuell, sondern auch innerhalb betroffener Familien eine große Variabilität im Erscheinungsbild (Easton et al. 1993, Huson und Korf 2013). Dies führt meist zu einem unvorhersehbaren und variablen Krankheitsverlauf (Evans et al. 2017).

Bereits 1987 wurden auf der NIH Consensus Development Conference, die in Tabelle 1 (S. 2) aufgelisteten, klinischen Diagnosekriterien für NF1 festgelegt (Stumpf et al. 1988), welche sich für erwachsene NF1-Patienten als hoch spezifisch und sensitiv erwiesen haben (Boyd et al. 2009).

Tabelle 1: Diagnosekriterien der NF1

Zwei oder mehr der untenstehenden Kriterien sind für die klinische Diagnose einer NF1 notwendig (Stumpf et al. 1988, Gutmann 1997).

Diagnosekriterien der Neurofibromatose Typ 1 (NIH consensus development conference 1987)	
	≥ 6 Café-au-lait Flecken
1.	> 1,5 cm im Erwachsenenalter (postpubertär) > 0,5 cm im Kindesalter (präpubertär)
2.	≥ 2 Neurofibrome jeden Typs oder 1 Plexiformes Neurofibrom
3.	Freckling im axillären oder inguinalen Bereich
4.	Optikusgliom
5.	≥ 2 Lisch-Knötchen
6.	Eine charakteristische Knochenläsion (wie Keilbeinflügeldysplasie, Dysplasie des Kortex der langen Röhrenknochen mit oder ohne Pseudarthrose)
7.	Betroffener Verwandter 1. Grades

Anhand dieser klinischen Merkmale erfolgt auch heute noch überwiegend die Diagnosestellung der NF1 (Rosser 2018). Auf Grund einer altersabhängigen Ausprägung einiger der NF1-Merkmale (Korf 1992), kann man jedoch erst ab dem 8. Lebensjahr den Großteil der Patienten (etwa 95 %) mit Hilfe dieser Kriterien diagnostizieren (DeBella et al. 2000). Ergänzend wurde ein Gentest zur Detektion von Keimbahnmutationen im NF1 verursachenden Gen (*NF1*-Gen;

vergleiche (vgl.) Unterkapitel „Tumorsuppressor-Gen NF1“, S. 16) entwickelt (Messiaen et al. 2000). Dieser kann bei jungen Kindern mit nur einem der in Tabelle 1 (S. 2) genannten Merkmale, in atypischen Fällen, oder zur Abgrenzung von verschiedenen Syndromen mit ähnlichen Symptomen eingesetzt werden (Evans et al. 2017).

Wie in Tabelle 1 (S. 2) sichtbar, gehören zu den Kardinalsymptomen der NF1 einige Pigmentanomalien. Hierzu zählen die Café-au-lait Flecken (CALs), wobei es sich um scharf begrenzte, hyperpigmentierte Flecken der Haut handelt, deren Farbe an Milchkaffee erinnert (Rassner und Steinert 2009). Diese können in 99 % der NF1-Patienten gefunden werden und treten in der Regel bereits bei Geburt, bzw. in den ersten Lebensjahren auf (DeBella et al. 2000). Die Anzahl der CALs nimmt meist während der Kindheit noch zu (Boyd et al. 2009) und mit zunehmendem Alter verblassen sie häufig (Huson et al. 1988, Duong et al. 2011). Es besteht kein Zusammenhang zwischen Anzahl, Größe, sowie Lokalisation der CALs und dem Schweregrad der NF1-Erkrankung (Korf 2013) und in der Regel verursachen sie keine Komplikationen (Ferner et al. 2007).

In etwa 80-90 % der Fälle tritt ein Freckling auf (Obringer et al. 1989, Friedman und Birch 1997, DeBella et al. 2000). Hierbei handelt es sich um sommersprossenartige Pigmentierungen in Hautregionen, welche der Sonne üblicherweise nicht ausgesetzt sind, meist in den Achselregionen und inguinal (Evans et al. 2017). Freckling tritt in der Regel bei Kleinkindern auf (Korf 1992, DeBella et al. 2000) und ist ein sehr spezifisches Zeichen für die NF1 (Boyd et al. 2009). Diese Hauterscheinung verursacht in der Regel ebenfalls keine Komplikationen (Ferner et al. 2007).

Eine weitere Pigmentveränderung bei NF1 findet sich in den Augen. Diese gutartigen Hamartome der Iris werden nach Ihrem Entdecker als ‚Lisch-Knötchen‘ bezeichnet (Lisch 1937). Es handelt sich um kuppelförmige, pigmentierte Läsionen, die eine Größe von bis zu 2 mm erreichen können (Ragge et al. 1993). Die Lisch-Knötchen sind ein spezifisches Merkmal der NF1 (Kinori et al. 2018) und können bei mehr als 90 % der erwachsenen NF1-Patienten gefunden werden (Lubs et al. 1991, Huson et al. 1988). Sie verursachen weder Symptome noch Komplikationen (Hirbe und Gutmann 2014).

Weiterhin sind Tumoren des peripheren und zentralen Nervensystems mit der NF1 assoziiert (Rubin und Gutmann 2005). Hierzu gehören die initial von D.F. von Recklinghausen beschriebenen Neurofibrome, welche der Erkrankung Ihren Namen gaben (vgl. Kapitel 1.1.2, S. 7) (von Recklinghausen 1882).

Eine weitere häufige Tumormanifestation ist das Optikusgliom, welches man auch als „*optic pathway glioma*“ (OPG) bezeichnet, wobei bei letzterem in die Begrifflichkeit - neben dem Sehnerv - auch die Beteiligung anderer Regionen des optischen Systems einbezogen wird (Listernick et al. 1997). Hierbei handelt es sich um einen benignen Tumor, in der Regel um ein pilozytisches Astrozytom, graduiert als WHO Grad I (Louis et al. 2016). Ein OPG tritt bei 15-20 % der NF1-Patienten auf, bleibt jedoch in einer Vielzahl der Fälle asymptomatisch (Listernick et al. 1989, Listernick et al. 1994). Es entwickeln sich jedoch bei etwa 34–47 % der Fälle teils behandlungsbedürftige Symptome wie verminderte Sehschärfe, Papillenatrophie oder eine frühzeitige Pubertät durch Hypothalamusbeeinträchtigung (Blanchard et al. 2016, Balcer et al. 2001). Das größte Risiko für NF1-Patienten ein OPG zu entwickeln liegt in den ersten 6 Lebensjahren (Listernick et al. 1994, Prada et al. 2015), doch auch bei älteren Kindern oder Erwachsenen wurde gelegentlich die Entwicklung von OPGs und deren Symptome beobachtet (Listernick et al. 2004). Optimale therapeutische Maßnahmen mit suffizienter Verbesserung der Symptome wurden bislang nicht gefunden. In der Regel erfolgt bei symptomatischen OPGs eine Chemotherapie, vereinzelt wurden und werden auch eine operative oder radiologische Therapie angewandt (Listernick et al. 2007, Campen und Gutmann 2018).

Auch das Skelettsystem ist bei NF1-Patienten häufig betroffen (Crawford und Schorry 1999). Grundsätzlich kann man hier zwischen generalisierten (Osteoporose, Kleinwuchs usw.) und lokalisierten Skelettveränderungen (Tibiadysplasie, Keilbeinflügeldysplasie, Skoliose usw.) unterscheiden, wobei letztere zwar seltener auftreten, aber mit einer erhöhten Morbidität assoziiert sind (Elefteriou et al. 2009). Als charakteristische Knochenläsionen bei NF1 werden in den Diagnosekriterien von 1987 die Keilbeinflügeldysplasie und die Dysplasie der Kortikalis der langen Röhrenknochen mit oder ohne Pseudarthrose gezählt, zu den Hauptmerkmalen gehört auch die Skoliose (Stumpf et al. 1988).

Eine Keilbeinflügeldysplasie wurde bei 4-11 % der NF1-Patienten gefunden (White et al. 1986, Friedman und Birch 1997). Häufig handelt es sich hierbei um einen asymptomatischen Befund, doch teils kann es zu einer Herniation von Hirngewebe durch den Knochendefekt kommen (Karwacki und Wozniak 2012). Eine Dysplasie der langen Röhrenknochen betrifft meist die Tibia und tritt bei 3-6 % der NF1-Patienten, in der Regel im ersten Lebensjahr, auf (Friedman und Birch 1997, Obringer et al. 1989). Häufig kommt es zu pathologischen Frakturen mit anschließender unzureichender Heilung und folgender Ausbildung einer Pseudarthrose (Stevenson et al. 1999, Elefteriou et al. 2009).

Der häufigste knöcherne Defekt bei NF1-Patienten ist mit 10-20 % die Skoliose, die in ihrer Ausprägung stark variieren kann. Bei NF1-Patienten treten verschiedene Formen der Skoliose auf. So liegt meist eine milde Form ähnlich der idiopathischen Adoleszentskoliose vor, während die häufig schwere Form der dystrophen Skoliose rasch fortschreitend und schwierig zu therapieren ist (Crawford und Herrera-Soto 2007).

Diese Diagnosekriterien und weitere mögliche Krankheitsmanifestationen sind nach ihrer Häufigkeit in Tabelle 2 (S. 6) zusammengefasst.

Tabelle 2: Häufigkeit der klinischen Merkmale bei NF1 in absteigender Häufigkeit.

Wenn nicht anders bezeichnet: nach Huson et al. 1988, Obringer et al. 1989, DeBella et al. 2000 und/oder McCaughan et al. 1999.

Klinisches Merkmal	Frequenz (in %)
Café-au-lait Flecken	95 - > 99
Dermale Neurofibrome	94 - > 99 ¹
Lisch-Knötchen	90 – 99 ²
Choroidale Anomalien	82 – 97 ³
Freckling (axillär und/oder inguinal)	80 - 90
Lernbehinderung	30 – 65 ⁴
Plexiforme Neurofibrome (klinisch/mit MRT diagnostiziert)	30 ⁵ /50 - 60 ⁶
Osteoporose / Osteopenie	20 - 25 ⁷ / 47 - 48 ⁷
Makrozephalie	45
Aufmerksamkeitsdefizit - Hyperaktivitätsstörung	30 - 38 ⁸
Kleinwuchs (Körperhöhe unterhalb der 3. Perzentile)	15 – 34 ⁹
Gastrointestinaler Stromatumor	5 – 25 ¹⁰
Optikusgliom (symptomatisch)	15 – 20 (4) ¹¹
MPNST (Lebenszeitrisiko)	8-13 ¹²
Keilbeinflügeldysplasie (symptomatisch)	4 - 11 ¹³ (<1)
Fortgeschrittene Skoliose	10
Kognitive Beeinträchtigung (Intelligenzquotient <70)	4,8 – 8 ³
Epilepsie	5,6 – 7,4
Kongenitale Herzfehler	0,4 – 6,4 ¹⁴
Brustkrebs bei Frauen im 20.-50. LJ	3,2 – 4,6 ¹⁵
Tibiadysplasie (mit Ausbildung einer Pseudarthrose)	0,7 – 3,8 (2,2 – 3,0) ¹⁶
Weitere seltene Krankheitsmanifestationen:	
Zerebrovaskuläre Störung (2,5 %) ¹⁷ Zerebrales Gliom (1,5-2,2 %), Gastrointestinales Karzinoid (1,5-2 %), Aquäduktstenose (1,2-1,5 %), Phäochromozytom (0,7-1,5 %), Nierenarterienstenose (0,6-1,5%), Embryonales Rhabdomyosarkom (0,2-1,5 %), Glomustumor (<1 %), Multiple Sklerose (<1 %), Juvenile myelomonozytäre Leukämie (<1 %) ¹⁸ , Xanthogranulom (0,7 %), Kongenitales Glaukom (0,6-0,7 %)	

¹aus: North 1993 und Huson et al. 1988; ²aus: Lubs et al. 1991 und Huson et al. 1988; ³aus: Viola et al. 2012 und Moramarco et al. 2018; ⁴aus: North et al. 1997; ⁵aus: Darrigo et al. 2007 und Huson et al. 1988; ⁶aus: Mautner et al. 2008 und Plotkin et al. 2012; ⁷aus: Brunetti-Pierri et al. 2008 und Tucker et al. 2009b; ⁸aus: Hyman et al. 2005 und Payne et al. 2011; ⁹aus: Clementi et al. 1999 und Huson et al. 1988; ¹⁰aus: Garrouche et al. 2018; ¹¹aus: Listernick et al. 1989 und Listernick et al. 1994; ¹²aus: Evans et al. 2002 und McCaughan et al. 2007; ¹³aus: White et al. 1986 und Friedman und Birch 1997; ¹⁴aus: Friedman et al. 2002; ¹⁵aus: Sharif et al. 2007 und Madanikia et al. 2012; ¹⁶aus: Friedman und Birch 1997 und Huson et al. 1988; ¹⁷aus: Rosser et al. 2005 ¹⁸aus: Burgdorf und Zelger 2004.

1.1.2 Tumoren der peripheren Nerven bei NF1

Bei den NF1-assoziierten Tumoren der peripheren Nerven handelt es sich um grundsätzlich gutartige Nervenscheidentumore, welche aus den Hüllzellen der Nerven entstehen (Paulus und Hasselblatt 2012). Doch Neurofibrome können erhebliche Komplikationen verursachen, beispielsweise eine kosmetische Entstellung, neurologische Defizite, Schmerzen oder eine maligne Entartung (Dombi et al. 2016). Die bösartigen Tumore der Nervenscheiden, die Malignen Peripheren Nervenscheidentumore (MPNST), entwickeln sich bei NF1 meist aus vorbestehenden plexiformen Neurofibromen (Farid et al. 2014).

Klassifikation der peripheren Nervenscheidentumore

Die Neurofibrome kann man entsprechend ihres Erscheinungsbildes und ihres Wachstumsverhaltens in verschiedene Subtypen unterteilen (Longo et al. 2018). Generell lassen sich dermale und plexiforme Neurofibrome sowie MPNSTs unterscheiden (Carroll und Ratner 2008, Miller et al. 2009). Darüber hinaus gibt es nach klinischem Erscheinungsbild, Radiologie und Histologie weitere Klassifikations-Schemata (Stemmer-Rachamimov und Nielsen 2012).

Lange Zeit wurde vornehmlich eine klinisch, deskriptive Unterteilung der Neurofibrome vorgenommen, wobei in kutane, subkutane, plexiforme oder spinale Neurofibrome unterschieden wurde (Huson et al. 1988, Ferner 2011).

Durch die WHO erfolgte eine Einteilung in fünf verschiedene Subtypen nach dem Wachstumsmuster der Tumore: die lokalisierten kutanen Neurofibrome, die diffusen kutanen Neurofibrome, die lokalisierten intraneuralen Neurofibrome, plexiforme Neurofibrome und ‚*massive soft tissue neurofibromas*‘ (Perry et al. 2016). Auf Grund der Vielzahl verschiedener Definitionen bei der Klassifikation von Neurofibromen ist eine Verwirrung, beispielsweise bei der Interpretation von wissenschaftlichen Studien, möglich (Carroll und Ratner 2008).

Auf dem ‚*consensus meeting on Pathology of NF1-associated atypical nerve sheath tumors*‘ des ‚*National Cancer Institute*‘ (NCI) wurde 2016 versucht, ein verbessertes und allseits akzeptiertes Klassifikationsschema für NF1-assoziierte Nervenscheidentumore zu entwickeln, welches auch die malignen Tumore und die Entwicklungsstufen dorthin berücksichtigt. Von den Experten dieses

‚consensus meetings‘ wurde die in Tabelle 3 (S. 8) dargestellte Nomenklatur empfohlen (Miettinen et al. 2017).

Tabelle 3: Vorgeschlagene Nomenklatur für das Spektrum der NF1-assoziierten Nervenscheidentumore (übersetzt aus dem ‚Consensus Overview‘ des NCI (Miettinen et al. 2017))

Diagnose	Vorgeschlagene Definition
Neurofibrom	Benigne Schwannzell-Neoplasie mit dünnen, häufig gewellten Zellkernen, zarten Zellfortsätzen und einer myxoiden bis kollagenen Matrix. Die IHC beinhaltet eine ausgedehnte, aber nicht diffuse S100 und SOX10 Positivität und ein rasterartiges CD34+ Fibroblasten-Netzwerk
Plexiformes Neurofibrom	Neurofibrom, welches einen Nerv diffus aufweitet und ersetzt; häufig sind multiple Nervenfaszikel betroffen. Abgrenzbar durch EMA+ Perineuralzellen
Neurofibrom mit Atypie	Neurofibrom ausschließlich mit Zellkernatypien, meist klinisch manifest als vereinzelte bizarr veränderte Zellkerne
Zelluläres Neurofibrom	Neurofibrom mit Hyperzellularität, aber erhaltener Neurofibrom-Architektur und einer Mitoserate <1/50 HPF
Atypisches Neurofibrom mit unklarem malignem Potential (ANNUBP)	Schwannzell-Neoplasie mit ≥ 2 folgender Eigenschaften: Zellkeratypie, Verlust der Neurofibrom-Architektur, Hyperzellularität, Mitoserate >1/50 HPF und <3/10 HPF
Low-grade MPNST	Eigenschaften eines ANNUBP, aber mit einer Mitoserate von 3-9/10 HPF, keine Nekrosen
High-grade MPNST	MPNST mit: einer Mitoserate von $\geq 10/10$ HPF, oder einer Mitoserate von 3-9/10 HPF kombiniert mit Nekrosen

Abkürzungen: IHC = Immunhistochemie; S100 = S100 Calcium-bindendes Protein; SOX10 = SRY-box-Transkriptionsfaktor 10; CD = ‚Cluster of Differentiation‘; EMA = Epitheliales Membranantigen; HPF = Haupt Gesichtsfeld

Hier werden die kutanen und subkutanen Neurofibrome, sowie die diffusen kutanen Neurofibrome als Neurofibrome zusammengefasst. Hiervon unterschieden werden die Plexiformen Neurofibrome, welche in peripheren Nerven/Nervenstämmen entstehen und die low-grade oder high-grade MPNST. Zudem werden Neurofibrom-Formen unterschieden, welche sich potenziell zu einem MPNST entwickeln könnten, die Neurofibrome mit Atypien, Neurofibrome mit Hyperzellularität und die atypischen Neurofibrome mit unklarem malignem Potential (ANNUBP) (Miettinen et al. 2017).

Histopathologie der peripheren Nervenscheidentumore

Grundsätzlich werden Neurofibrome histologisch dem WHO Grad I zugeordnet (Perry et al. 2016) und mikroskopisch kann man bei allen Neurofibromen, egal welchen Subtyps, ein ähnliches Erscheinungsbild erkennen (Longo et al. 2018). Sie bestehen aus S100-positiven Schwannzell-artigen Tumorzellen. Diese Zellen sind oftmals langgestreckt mit schmalen, ovalen bis spindelförmigen Zellkernen (Miettinen 2016). Zudem finden sich in den Tumoren Perineuralzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen und Makrophagen (Stemmer-Rachamimov und Nielsen 2012). Diese zelluläre Komponente ist in einer kollagenreichen extrazellulären Matrix und mukoider Substanz eingebettet (Perry et al. 2016). In plexiformen Neurofibromen finden sich häufig Residuen von teils bemerkten Axonen (Paulus und Hasselblatt 2012).

MPNSTs besitzen ein sehr heterogenes histologisches Erscheinungsbild. In der Regel zeigen sich jedoch ebenfalls langgestreckte, wellige Tumorzellen mit länglichen und spindelförmigen Zellkernen (Reuss et al. 2016). Die Tumorzellen weisen hier allerdings in weniger als 50 % der Fälle eine S100-Expression auf (Olsen et al. 2006), obwohl sie in der Regel aus plexiformen Neurofibromen hervorgehen (Farid et al. 2014). Auch in den malignen Tumoren können sich - insbesondere in frühen Wachstumsstadien - nicht-tumoröse Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen usw. finden (Antonescu et al. 2013a). Histologisch liegen hier zudem Zeichen der Anaplasie mit erhöhter Mitoserate, wechselnder Zelldichte und Nekrotisierungstendenz, sowie ein infiltratives destruierendes Wachstum vor (Paulus und Hasselblatt 2012).

1.1.2.1 Dermale Neurofibrome

Als dermale Neurofibrome (dNF) werden kleine, umschriebene, teils gestielte Tumore im Bereich der Kutis oder Subkutis bezeichnet (Fritsch und Schwarz 2018).

Sie treten bei 94 % bis > 99 % der erwachsenen NF1-Patienten auf (North 1993, Huson et al. 1988) und entwickeln sich meist während bzw. nach der Pubertät (North 1993, Ehara et al. 2018). Mit zunehmendem Alter wird in Zusammenhang mit der NF1 häufig auch eine Zunahme der dNF beobachtet (Duong et al. 2011, Ehara et al. 2018) und die Anzahl der einzelnen Tumoren kann zwischen einigen wenigen und tausenden variieren (Miettinen et al. 2017). Zudem kann während

einer Schwangerschaft ein deutliches Wachstum der Tumoren auftreten (Dugoff und Sujansky 1996), weshalb vielfach ein hormoneller Einfluss auf das Wachstum und die Bildung von dNF angenommen wurde (Le et al. 2009). Grundsätzlich zeigen die einzelnen dNF jedoch ein langsames und normalerweise auf eine Tumorgöße von bis zu 3 cm begrenztes Wachstum (Peltonen et al. 2012).

Die Tumore können jucken oder schmerzen, die größte Belastung für NF1-Patienten liegt jedoch in der kosmetischen Entstellung durch die teils hohe Tumorlast und damit verbundenen psychischen Problemen (Wolkenstein et al. 2001, Granström et al. 2012). Eine maligne Transformation tritt in der Regel nicht auf (Ferner und Gutmann 2002).

Entstehung dermalen Neurofibrome

Die Entstehung der dNFs ist noch nicht vollständig geklärt. So sind bislang weder die auslösenden Ereignisse, welche zur Tumorentstehung führen, noch die so genannte ‚*Cell-of-origin*‘ oder Ursprungszelle der Tumore sicher identifiziert (Allaway et al. 2018). Da gezeigt wurde, dass die Schwannzellen in dNFs eine biallelische Inaktivierung des *NF1*-Gens aufweisen (Serra et al. 2000), werden diese als neoplastisches Element der Tumore angesehen (Carroll 2012). Initial wurde analog zur Entstehung der plexiformen Neurofibrome (vgl. Unterkapitel „Entstehung plexiformer Neurofibrome“, S. 12) und auf Grund der histologischen Zusammensetzung der Tumore, von einem Hervorgehen aus den kleinen Nervenästen der Haut ausgegangen (Buchstaller et al. 2012). Da eine Assoziation der Tumore mit kleinen Hautnerven und deren Schwannzellen jedoch nicht immer nachzuweisen war, wurde nach anderen möglichen Ursprungszellen gesucht (Carroll 2012). So wurden Schwannzell-ähnliche Vorläuferzellen in der Haut (englisch (engl.): *Skin-derived Precursors*, SKP's) gefunden, welche von der Neuralleiste abgeleitet sind und in Studien kleine dermale Knoten formen konnten (Le et al. 2009). In aktuellen Studien werden verschiedene andere Zellen der Schwannzelllinie, zum Beispiel Zellen innerhalb der HOXB7 Linie von SKPs (Chen et al. 2019), oder subepidermale Gliazellen (Radomska et al. 2019) als die möglichen Ursprungszellen von dNF diskutiert. Zudem wurden Einflüsse aus der Tumormikroumgebung (engl: ‚*tumor microenvironment*‘) für die Entstehung der Neurofibrome untersucht. Bezüglich

dieser Einflüsse liegen bislang ebenfalls kontroverse Ergebnisse vor (Allaway et al. 2018).

Therapieoptionen bei dermalen Neurofibromen

Als therapeutische Option bei dNFs stehen nur die chirurgische oder interventionelle (Laserablation, Elektrodesikkation usw.) Resektion störender Läsionen zur Verfügung (Lutterodt et al. 2016). Effektive wachstumshemmende Therapieformen existieren bislang nicht (Allaway et al. 2018).

1.1.2.2 Plexiforme Neurofibrome

Die plexiformen Neurofibrome (pNF) treten primär als intraneural wachsende, komplett von Endoneurium umschlossene Tumore auf. Dabei können sie lokalisiert einen einzelnen Nerv fusiform aufweiten (noduläres Wachstum), oder sich über multiple Nervenfaszikel/-äste netzartig ausbreiten (langstreckiges Wachstum) (Antonescu et al. 2013b). Zudem gibt es diffuse Neurofibrome mit enthaltenen Elementen von pNFs, welche sich als flächige Läsionen ausbreiten können (Miettinen 2016).

Bei der NF1 lassen sich bei etwa 30 % der Patienten pNFs klinisch diagnostizieren (Darrigo et al. 2007, Huson et al. 1988). Wenn eine Diagnostik mittels MRT erfolgt, können sogar bei etwa 50-60 % der Patienten pNFs nachgewiesen werden (Mautner et al. 2008, Plotkin et al. 2012).

pNFs werden in der Regel als kongenital angesehen (Stemmer-Rachamimov und Nielsen 2012). Ihr Wachstum beziehungsweise ihre Entwicklung ist nicht vorhersehbar, so können einige der Tumore lange Zeit oder dauerhaft inaktiv bleiben, während andere schon frühzeitig ein ausgeprägtes Wachstum zeigen (Tucker et al. 2009a). Grundsätzlich zeigt sich vorwiegend im Kinder- und Jugendalter ein schnelleres Wachstum (Nguyen et al. 2012). Die Tumore können überall am Körper auftreten und Ihre Verteilung variiert in verschiedenen Studien je nach Untersuchungsmethode oder verwendeten Diagnosekriterien (Huson et al. 1988, Needle et al. 1997, Tucker et al. 2009a, Miettinen 2016).

Symptome durch die pNFs sind abhängig von ihrer Lokalisation und der Tumorgöße (Prada et al. 2012) und sie entstehen insbesondere durch das verdrängende Wachstum der Tumore. Aufgrund Ihres Wachstums in enger Beziehung zu Nerven treten beispielsweise motorische Dysfunktionen, neurologische Defizite oder Schmerzen auf (Nguyen et al. 2011). Oberflächlich

wachsende pNFs können auch zu kosmetischer Entstellung führen, während große tiefliegende Tumore durch eine Kompression verschiedener Organe starke Beschwerden verursachen können (Prada et al. 2012). Zudem besteht bei den pNFs das Risiko einer malignen Transformation zu malignen peripheren Nervenscheidentumoren (vgl. Kapitel 1.1.2.3, S. 13) (Ferner und Gutmann 2002).

Entstehung plexiformer Neurofibrome

Die Entstehung von pNFs ist ähnlich wie die von dNFs noch teilweise ungeklärt. Auch hier wurde eine biallelische Inaktivierung des *NF1*-Gens in Schwannzellen nachgewiesen (Rasmussen et al. 2000, Kluwe et al. 1999, Maertens et al. 2006, Carrió et al. 2019) und somit der Verlust der Heterozygotie (engl: ‚*loss of heterozygosity*‘, LOH) in Schwannzellen oder Ihren Vorläuferzellen als Tumor-initiiierendes Ereignis angesehen (Zhu et al. 2002, Pemov et al. 2017). Welche Zellen der Schwannzelllinie bei pNFs die Ursprungszellen der Tumore sein können, wird nach wie vor diskutiert (Buchstaller et al. 2012, Carrió et al. 2019). Meist gab es entweder Hinweise auf eine Entstehung aus unreifen Schwannzellen bzw. Schwannzell-Vorläuferzellen (Wu et al. 2008, Chen et al. 2014), oder aus abnorm differenzierten, nicht-myelinisierenden Schwannzellen (Zheng et al. 2008). Bei vielen Tumoren wurde zudem ein Einfluss der Tumormikroumgebung auf die Tumorgenese entdeckt (Hui und Chen 2015). So wird bei pNFs neben der initialen *NF1*-Gen Inaktivierung in der Ursprungszelle eine Folge von Interaktionen mit *NF1*-heterozygoten (*NF1* +/-) nicht-Tumorzellen in der Tumorumgebung als essenziell zur Tumorgenese angesehen (Zhu et al. 2002, Liao et al. 2016). Es gibt jedoch Studien in denen eine Entwicklung von pNFs auch unabhängig von der heterozygoten Mikroumgebung gezeigt wurde (Wu et al. 2008, Chen et al. 2014). Dies kann am ehesten auf das experimentelle Setting der Studien zurück geführt werden (Chen et al. 2014, Brosseau et al. 2018). Die bislang best-verstandene Zell-Interaktion in der Entstehung von pNFs ist die zwischen homozygot *NF1*-defizienten (*NF1* -/-) Schwannzellen und *NF1* +/- Mastzellen. So konnte gezeigt werden, dass tumoröse Schwannzellen das Protein Stammzellfaktor (engl: ‚*stem cell factor*‘; SCF) exprimieren, welches in pNFs eine Mastzellmigration in den Tumor induziert (Liao et al. 2018). Diese rekrutierten heterozygoten Mastzellen sollen wichtig für die Tumorgenese sein (Yang et al. 2008). Zudem werden die *NF1* +/- Mastzellen durch das SCF zur

Sekretion des Zytokins ‚*Transforming growth factor beta*‘ (TGF β) angeregt, welches *NF1* +/- Fibroblasten zur gesteigerten Proliferation, Migration und Kollagensynthese stimuliert (Yang et al. 2006). Das sezernierte Kollagen ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix der Neurofibrome und macht damit einen Großteil der Tumormasse aus (Jaakkola et al. 1989). Auch andere bislang unentdeckte parakrine Signalwege scheinen die Zellen, welche typischerweise in Neurofibromen gefunden werden können, zu vernetzen und damit die Pathogenese von Neurofibromen zu beeinflussen (Longo et al. 2018).

Therapie bei plexiformen Neurofibromen

Bei pNFs gilt als Standardtherapie seit langem die chirurgische Resektion der Tumore (Blakeley und Plotkin 2016, Carrió et al. 2019). Aufgrund ihres Wachstums in engem Bezug zu Nerven, gelingt jedoch eine komplette Entfernung des veränderten Gewebes nur selten, Rezidive treten daher häufig auf (Needle et al. 1997).

Somit wurden vielfach Versuche unternommen effektive medikamentöse Therapieoptionen für pNFs zu finden. Hierbei wurde zumeist versucht in den Ras-Signalweg einzugreifen, oder auf Elemente in der Tumormikroumgebung einzuwirken (Blakeley und Plotkin 2016). Bislang konnte noch kein Medikament alle Phasen einer klinischen Studie durchlaufen und hierbei eine signifikante Wirksamkeit zeigen (Kraniak et al. 2018). Allerdings zeigte kürzlich der MEK-Inhibitor Selumetinib in einer Phase I Studie vielversprechende Erfolge (Dombi et al. 2016). Viele weitere Studien sind noch nicht abgeschlossen (Blakeley und Plotkin 2016, National Library of Medicine 2019).

1.1.2.3 Maligne periphere Nervenscheidentumore

Bei MPNSTs handelt es sich um seltene maligne Tumore, mit lokal-invasivem Wachstum, weitläufiger Metastasierung und einer schlechten Prognose (Le Guellec et al. 2016).

Die Tumore leiten sich von Zellen der peripheren Nervenscheiden ab und gehen somit in der Regel aus einem peripheren Nerven oder dem extraneuralen Weichteilgewebe hervor. Zudem weisen sie meist Anzeichen einer Schwannzell- oder Perineuralzellendifferenzierung auf (Reuss et al. 2016). MPNSTs können histopathologisch bezüglich Ihrer Entwicklung eine ausgeprägte Heterogenität aufweisen (Rodriguez et al. 2012). So können neben dem überwiegend

vorliegenden ‚spindelzelligen‘ MPNST auch MPNSTs mit andersartiger Differenzierung auftreten, beispielsweise epitheloide MPNST, glanduläre MPNST, maligne Tritontumore oder MPNSTs mit osteosarkomatöser, chondrosarkomatöser oder angiosarkomatöser Differenzierung (Antonescu et al. 2013a). Ein Grading der Tumore ist auf Grund dieser Divergenz schwierig, man spricht jedoch in etwa 85 % der Fälle von ‚*high-grade*‘ Tumoren (Rodriguez et al. 2012), welche in der Regel mit einer sehr schlechten Prognose verbunden sind (Le Guellec et al. 2016).

Auch wenn MPNSTs zu den seltenen malignen Tumoren zählen und nur etwa 5 % aller Weichteilsarkome ausmachen (Antonescu et al. 2013a), nehmen Sie bei NF1-Patienten eine besondere Rolle ein, da etwa 50 % der diagnostizierten MPNSTs mit einer NF1-Erkrankung assoziiert sind (Reuss et al. 2016). MPNSTs entstehen bei NF1-Patienten in der Regel aus vorbestehenden plexiformen Neurofibromen (Ferner und Gutmann 2002) und das Lebenszeitrisiko liegt hier bei 6-13 % (Evans et al. 2002, McCaughan et al. 2007). Damit handelt es sich um das häufigste Malignom bei Patienten, die an einer NF1 erkrankt sind (Brems et al. 2009). Zudem können sich diese Malignome grundsätzlich in jedem Alter ausbilden, bei NF1-Patienten treten sie jedoch häufiger in jüngeren Jahren auf (Evans et al. 2002, Widemann 2009).

Trotz multimodaler Therapie kommt es nach einer chirurgischen Exzision häufig zu lokalen Rezidiven und ebenso häufig zu einer Fernmetastasierung (in einzelnen Studien in etwa 40 % der Fälle) (Ducatman et al. 1986, Zou et al. 2009). Metastasen treten meist in der Lunge, aber beispielsweise auch in Leber, Gehirn, Knochen oder dem Weichteilgewebe auf (Ducatman et al. 1986). Die ermittelte 5-Jahre-Überlebensrate variiert zwischen 16 % und 35 % bei Patienten mit NF1 und liegt bei sporadischen MPNSTs etwas höher, bei etwa 50 % (Ducatman et al. 1986, Evans et al. 2002, Le Guellec et al. 2016).

Diagnostik eines MPNSTs

Eine frühzeitige Diagnose kann helfen, die Prognose eines MPNSTs zu verbessern (Mautner et al. 2003). Klinisch präsentiert sich ein MPNST bei NF1-Patienten meist als eine rasche Größenzunahme eines Neurofibroms, dauerhafter Schmerz, Konsistenzänderung des Tumors von weich nach hart oder unklaren neurologischen Defiziten (Ferner und Gutmann 2002). Dies können

jedoch auch Symptome eines aktiven gutartigen pNFs sein (Tovmassian et al. 2016). Lange galt eine Biopsie-Entnahme aus der suspekten Läsion und eine histopathologische Untersuchung der Probe zur definitiven Diagnosefindung als notwendig (Mautner et al. 2008). Doch auch diese Diagnostik gestaltet sich bei MPNSTs als schwierig, denn bislang gibt es keine pathognomischen immunhistochemischen oder molekularen Untersuchungen zur sicheren Abgrenzung gegenüber anderen Sarkomen (Farid et al. 2014).

Aktuellere Studien untersuchten die Rolle der Flour-Desoxy-Glukose Positronen-Emissions-Tomographie in Kombination mit einer Computertomographie (¹⁸FDG-PET/CT) als nicht-invasive Methode zur Differenzierung gutartiger pNFs von malignen Veränderungen (Ferner et al. 2000). Verschiedene Studien zeigten für diese Methode eine Sensitivität von 90-95 % bei einer Spezifität von 85-95 % und einem negativ prädiktiven Wert von 95-100 % (Ferner et al. 2008, Salamon et al. 2015). Daraufhin schlussfolgerten Simsek und Kollegen, dass eine Biopsie-Entnahme in Läsionen, die im FDG-PET/CT als benigne eingestuft werden, zur Differenzialdiagnose von pNFs und MPNSTs nicht nötig sei (Simsek et al. 2019).

Therapie bei MPNSTs

Der bislang einzige kurative Therapieansatz für Patienten mit einem MPNST ist eine radikale Exzision des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand (Dunn et al. 2013). Eine adjuvante Strahlentherapie wird zudem zur lokalen Kontrolle des Tumors empfohlen (Wong et al. 1998, Ferner und Gutmann 2002), ein Einfluss auf das Langzeit-Überleben konnte jedoch nicht gefunden werden (Kahn et al. 2014). Auch die Chemosensitivität von MPNSTs ist gering, so wurde bislang auf verschiedene Chemotherapeutika bestenfalls ein Ansprechen von 20-30 % gefunden (Higham et al. 2017, Ferner und Gutmann 2002).

Auf Grund dieser unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten wurde vielfach versucht, gezielte Krebstherapien (engl. *targeted therapies*) zu entwickeln. Bisherige klinische Studien erbrachten jedoch keinen signifikanten Erfolg (Farid et al. 2014).

1.1.3 Genetik und Ätiopathogenese der NF1 und ihrer Merkmale

Durch Erkenntnisse bezüglich der Mutationen des *NF1*-Gens und der Funktionen des *NF1*-Genprodukts Neurofibromin konnten bereits große Fortschritte im Verständnis der Entstehung der NF1 und deren Merkmale gewonnen werden (Gutmann et al. 2017). Somit wird im Folgenden ein kurzer Einblick in die Genetik, Ätiologie und die Pathogenese der NF1 und ihrer Merkmale gegeben.

Allgemeine Genetik

Die NF1 wird autosomal-dominant (Huson et al. 1988, Rodenhiser et al. 1991, Poyhonen et al. 2000) mit vollständiger Penetranz vererbt (Riccardi und Lewis 1988, Huson et al. 1989, Rodenhiser et al. 1991). Es lässt sich jedoch lediglich bei etwa der Hälfte der Patienten eine positive Familienanamnese finden, die übrigen 50 % der Fälle beruhen auf einer Neumutation des Gens (Clementi et al. 1990, Littler und Morton 1990, Poyhonen et al. 2000). Aus dieser hohen Anzahl von Spontanmutationen lässt sich eine Mutationsrate von $4,4 - 6,5 \cdot 10^{-5}$ Gameten pro Generation ermitteln (Sergeyev 1975, Clementi et al. 1990, Poyhonen et al. 2000), wobei es sich um eine der höchsten bekannten Mutationsraten einer hereditären menschlichen Erkrankungen handelt (Huson et al. 1989, Lee und Stephenson 2007, Wallis et al. 2018).

Tumorsuppressor-Gen NF1

Schon vor drei Jahrzehnten wurde das *NF1*-Gen, welches bei Mutationen die NF1 verursacht, auf Chromosom 17 lokalisiert (Barker et al. 1987, Seizinger et al. 1987) und im Laufe der Zeit ließ sich der Genlocus auf die Region 17q11.2 eingrenzen (Fountain et al. 1989, Goldgar et al. 1989, O'Connell et al. 1989, Shen et al. 1996). Daraufhin konnte auch das *NF1*-Gen identifiziert werden (Cawthon et al. 1990, Viskochil et al. 1990, Wallace et al. 1990, Gutmann und Collins 1993). Es erstreckt sich über 350 Kilobasen (kb) des Genoms (Marchuk et al. 1991, Shen et al. 1996) und codiert für eine 11-13 kb große Botenribonukleinsäure (engl.: *messenger ribonucleic acid* (mRNA)) (Viskochil et al. 1990, Wallace et al. 1990, Suzuki et al. 1992, Shen et al. 1996).

Neurofibromin

Das *NF1*-Genprodukt, Neurofibromin, ist ein großes Protein, bestehend aus 2818 Aminosäuren (Marchuk et al. 1991, Viskochil et al. 1993). Es wird ubiquitär

exprimiert (Gutmann et al. 1991, Ferner et al. 2007), wurde jedoch in großen Mengen im zentralen Nervensystem (ZNS), insbesondere in Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten, sowie im peripheren Nervensystem (PNS) in nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen und kleinen unmyelinisierten Nervenfasern gefunden (Daston et al. 1992, Gottfried et al. 2010).

Wie es bei großen Genen häufig der Fall ist, wurden Isoformen des *NF1*-Genprodukts beschrieben, welche durch alternatives Splicing entstehen (Yap et al. 2014). Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrer Expression in verschiedenen Geweben, sondern auch funktionell voneinander (Trovó-Marqui und Tajara 2006). Bislang sind die Isoform-spezifischen Eigenschaften und deren Regulation nur unvollständig erforscht (Cui und Morrison 2019).

Auch die Funktionen von Neurofibromin sind noch nicht vollständig verstanden. Es scheint jedoch eine Rolle in verschiedenen Signalwegen menschlicher Zellen zu spielen (Trovó-Marqui und Tajara 2006) und nimmt die Funktion eines Tumorsuppressors ein (Banerjee und Verma 2007).

So wurde schon bald nach der Identifikation des *NF1*-Gens herausgefunden, dass Teile des Neurofibromins einen hohen Grad an Homologie zur Familie der Ras GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) aufweisen (Xu et al. 1990b, Buchberg et al. 1990). Diese katalysieren die Konversion der Ras Proteine von ihrer aktiven, Guanosin triphosphat (GTP)-gebundenen Form in ihre inaktive Guanosin diphosphat (GDP)-gebundene Form (Hayes et al. 2014).

Im Folgenden konnte nachgewiesen werden, dass dieser Anteil des Neurofibromins, welcher auch als GAP-related domain (GRD) bezeichnet wird, funktionell ebenso wie die GAPs eine Ras GTPase-stimulierende Wirkung besitzt (Ballester et al. 1990, Martin et al. 1990, Xu et al. 1990a). Eine Funktion des Neurofibromin stellt somit die Herabregulierung der p21-ras Aktivität dar (Trovó-Marqui und Tajara 2006).

Ras Proteine fungieren als Regulatoren verschiedener zytoplasmatischer Signalwege (s. Abbildung 1, S. 18) und beeinflussen eine Vielzahl biologischer Prozesse, insbesondere Zellproliferation, -überleben und -differenzierung (Hayes et al. 2014).

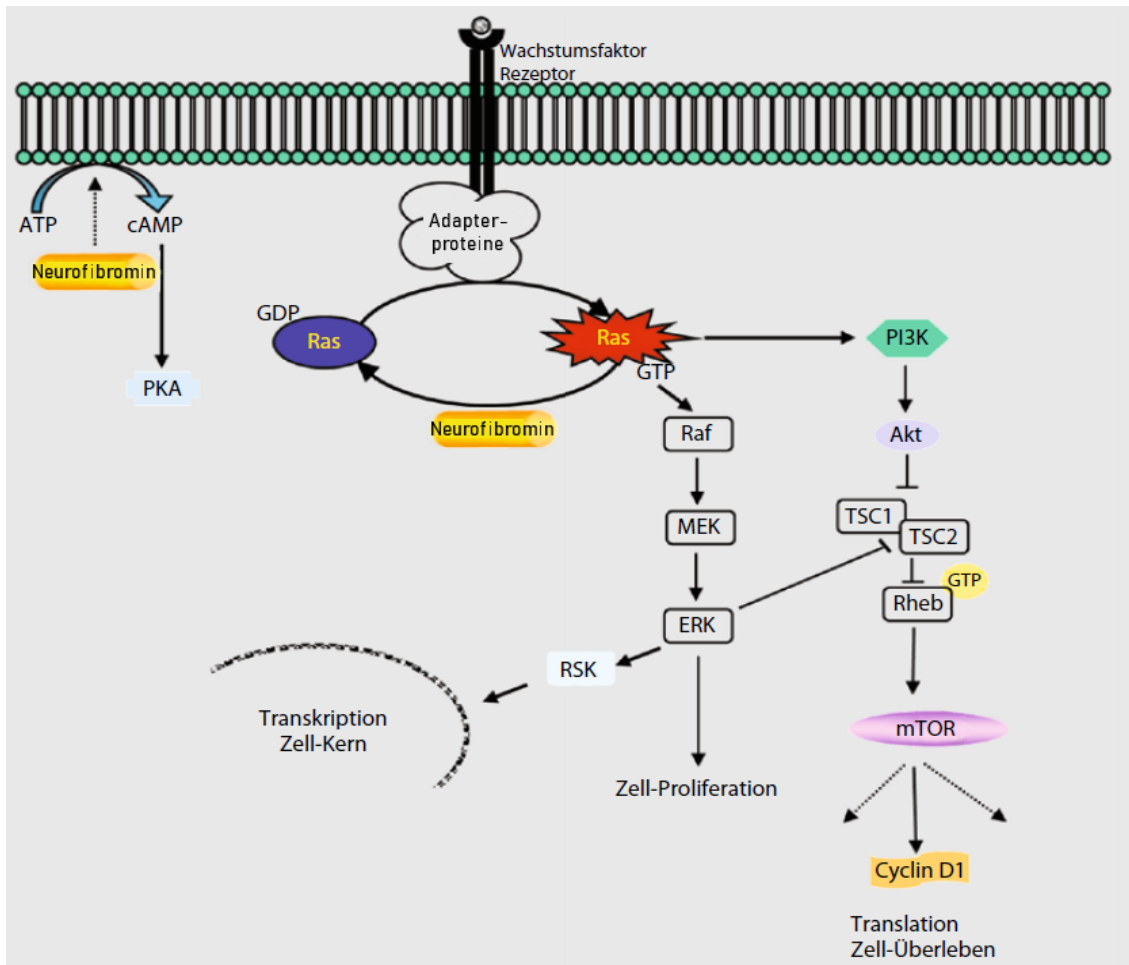


Abbildung 1: Schema der intrazellulären Signalwege welche Neurofibromin beeinflusst

Neurofibromin moduliert zum einen die Adenylatzyklase (engl.: adenylate cyclase, AC)-zyklisches Adenosinmonophosphat(cAMP)-Signalkaskade durch bislang unbekannte Mechanismen (links oben) und fungiert zudem als negativer Regulator der Ras-vermittelten Signaltransduktion (rechts). Ein wichtiger Effektorweg der Ras Proteine führt über die ‚Ras activated factor‘(Raf)/‚mitogen activated extracellular signal regulated kinase‘(MEK)/‚extrazellulär signalregulierte Kinase‘(ERK) Signalkaskade, wodurch insbesondere die Zellproliferation reguliert wird. Ein anderer Signalweg, den Ras Proteine beeinflussen ist der ‚Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)/‚mammalian target of rapamycin‘(mTOR)-Signalweg, über den die Proliferation, Differenzierung und Vermehrung von Zellen reguliert wird.

ATP = Adenosintriphosphat; PKA = Proteinkinase A; RSK = Ribosomal S6 Kinases; Akt = eine Proteinkinase B; TSC1/2 = Tuberous sclerosis proteins 1/2; Rheb = Ras homolog enriched in brain.

Vereinfacht nach: Kehrer-Sawatzki und Mautner, S. 526 (Kehrer-Sawatzki und Mautner 2009).

Doch wie in Abbildung 2 (S. 19) sichtbar, nimmt die GRD nur einen geringen Anteil des Neurofibrominmoleküls ein. Die Architektur des *NF1*-Gens wurde mit der Zeit auf andere funktionelle Domänen untersucht (Isakov et al. 2018) und es wurden neben der GRD verschiedene andere Domänen (s. Abbildung 2, S. 19) identifiziert (Brossier und Carroll 2012).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Neurofibromin mit Angabe ihrer Aminosäuren-Position.

Neurofibromin enthält verschiedene bislang bekannte funktionelle Domänen, dazu gehören die Cystein-/Serin-reiche Domäne (CSRD), die Tubulin-bindende Domäne (TBD), die GAP-related domain (GRD), die Sec14p-ähnliche Domäne (NF1-Sec), die Plextrin-homologe Domäne (NF1-PH) und die Syndecan-bindende Domäne (SBD). Quellen: Welti et al. 2008, Ratner und Miller 2015, Brossier und Carroll 2012, Wallis et al. 2018.

Es wird vermutet, dass die Tubulin-bindende Domäne (TBD) durch eine Bindung an Tubulin (Bollag et al. 1993) und die Cystein-/Serin-reiche Domäne (CSRD) durch eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) (Izawa et al. 1996) bzw. die Proteinkinase C (PKC) (Mangoura et al. 2006) die Fähigkeit der Ras-Regulation von Neurofibromin beeinflussen (Bollag et al. 1993, Mangoura et al. 2006, Brossier und Carroll 2012). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass die Sec14p-ähnliche Domäne (NF1-Sec) Glycerophospholipide bindet (Aravind et al. 1999, D'Angelo et al. 2006, Welti et al. 2007) und die Plextrin-homologe Domäne (NF1-PH) mit NF1-Sec zu interagieren scheint (D'Angelo et al. 2006, Welti et al. 2007). Die funktionelle Signifikanz dieser Phospholipidbindung und die Funktionen der weiteren im Schaubild genannten Domänen sind zum aktuellen Zeitpunkt unklar (Brossier und Carroll 2012).

Ein weiterer Signalweg, den Neurofibromin beeinflusst, ist die Adenylatzyklase (AC) - Cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) – Signalkaskade (Yap et al. 2014). Wie genau diese Modulation funktioniert ist bislang unklar (Coover et al. 2018). So wurde zunächst eine Regulation der AC-Aktivität durch Neurofibromin in *Drosophila* (Guo et al. 1997) und im Verlauf auch bei Säugetieren nachgewiesen (Tong et al. 2002, Dasgupta et al. 2003). In aktuelleren Studien wurde zudem gezeigt, dass die cAMP Homöostase im Gehirn Ras-abhängig reguliert werden kann. Dies geschieht über Aktivierung der Proteinkinase C zeta (PKC ζ) und Modulation des G α_s -Protein gekoppelten Rezeptors, welcher die AC aktiviert (Anastasaki und Gutmann 2014). Verschiedenen Studien zufolge scheint cAMP eine wichtige Rolle für Lernprozesse und das Gedächtnis zu spielen (Yap et al. 2014) und ist als Second

Messenger an einer Vielzahl intrazellulärer Signalübermittlungen beteiligt (Frezza et al. 2018).

Auch durch eine Erforschung der Proteine welche mit Neurofibromin interagieren, können die Funktionen dieses komplexen Proteins besser verstanden werden (Welti et al. 2008). In den vergangenen Jahren konnten neben den oben genannten Proteinen Ras und Tubulin und den Enzymen AC und PKA bzw. PKC eine Vielzahl von weiteren Neurofibromin - Interaktionspartnern gefunden werden (Scheffzek und Welti 2012). Hierzu gehören beispielsweise das Caveolin-1 (Boyanapalli et al. 2006), die Syndekane (Hsueh et al. 2001), die Fokale Adhäsionskinase (Kweh et al. 2009), das Kinesin-1 (Hakimi et al. 2002) und das Amyloid-Precursor-Protein (De Schepper et al. 2006).

Zusammengefasst kann demnach eine Reduktion beziehungsweise der komplette Verlust von Neurofibromin zu einer gesteigerten Zellproliferation und zu verändertem Zellüberleben führen und somit zur Tumorgenese beitragen. Die Ergründung weiterer Funktionen des Neurofibromins ist Bestandteil der aktuellen Forschung.

Mutationen und Verlust der Heterozygotie

In der Literatur werden zahlreiche verschiedene Mutationen im *NF1*-Gen beschrieben (Cooper et al. 2017), doch es wurde nahezu kein Zusammenhang zwischen den jeweiligen Mutation und einer klinischen Ausprägung der Erkrankung gefunden (Shen et al. 1996). Es konnte nur in wenigen Einzelfällen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation hergestellt werden (Trovó-Marqui und Tajara 2006).

Zunächst wurde vermutet, dass die Ausprägung der klinischen Merkmale bei *NF1* ausschließlich der „Two-hit-Hypothese“ nach Knudson folgen würde, nach der eine Kombination von genetischen Veränderungen zur Tumorgenese führt (Knudson 1971, Eisenbarth et al. 2000, Gottfried et al. 2006). Dieser Vermutung lag die Erkenntnis zugrunde, dass die primäre Mutation des *NF1*-Gens einer Keimbahnmutation entspricht, die in allen Zellen des betroffenen Individuums vorkommt (Gutmann und Collins 1993). Es konnte gezeigt werden, dass für die Ausprägung verschiedener klinischer Merkmale, neben der primären Keimbahnmutation, eine somatische Mutation in einer bestimmten Zelle nötig ist,

also tatsächlich in einzelnen Zellen eine biallelische Inaktivierung des *NF1*-Gens vorliegt (Yap et al. 2014). Diese konnte beispielsweise bei der Entwicklung von Neurofibromen (Colman et al. 1995, Serra et al. 1997, Sawada et al. 1996, Kluwe et al. 2007), in Zellen von CALs (De Schepper et al. 2008, Freret et al. 2018) und bei der Entstehung von NF1-assoziierten malignen Tumoren gezeigt werden (Xu et al. 1992, Legius et al. 1993, Cichowski und Jacks 2001).

Im Verlauf wurde die initiale Hypothese jedoch erweitert, da gezeigt werden konnte, dass einige der Manifestationen der NF1 zwar auf einer biallelischen Inaktivierung des *NF1*-Gens beruhen, andere jedoch eine Haploinsuffizienz für NF1 und wieder andere modifizierende Faktoren zur Merkmalsausprägung benötigen (Gutmann et al. 2017).

Ursprungszellen der Merkmalsausprägung

Wie bereits zu Beginn der Einleitung erwähnt (s. S. 2) betrifft die NF1 überwiegend die Haut und das Nervensystem, sowie die Augen und das Skelettsystem (Rosser 2018). Bei vielen Merkmalen der NF1 wurde eine biallelische Inaktivierung des *NF1*-Gens in einzelnen Zellen nachgewiesen (vgl. Unterkapitel „Mutationen und Verlust der Heterozygotie“, S. 20). Bei diesen von Mutationen betroffenen Zellen handelt es sich überwiegend um Schwannzellen (Buchstaller et al. 2012) und Melanozyten (De Schepper et al. 2008), also Zellen die von der Neuralleiste abstammen.

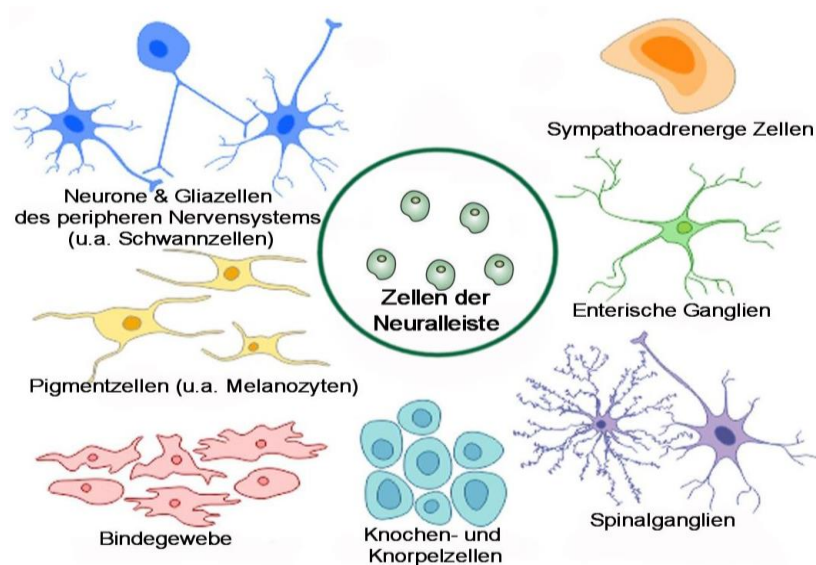


Abbildung 3: Schematische Darstellung einiger der Zellarten, welche aus Neuralleistenzellen hervorgehen.

Aus dem Englischen übersetzt nach: Butler und Bronner, S.136 (Butler und Bronner 2015).

Die Zellen der Neuralleiste entstehen im Rahmen der Embryonalentwicklung. Sie sind in der Lage, sich zu einer Vielzahl verschiedener Zellarten zu entwickeln und haben teilweise das Potential zur Selbsterneuerung (Crane und Trainor 2006).

Wie in Abbildung 3 (S. 21) dargestellt, gibt es viele verschiedene Entwicklungswege einer Neuralleistenzelle (Butler und Bronner 2015). Sie migrieren im Embryo zu spezifischen Regionen und es findet eine Differenzierung zu spezialisierten Zellen – beispielsweise den Melanozyten oder Schwanzzellen – statt (Kipanyula et al. 2014).

Die Entwicklung der Schwanzzellen durchläuft dabei, wie in Abbildung 4 (S. 22) dargestellt, im Wesentlichen zwei Zwischenstufen: die Schwanzzell-Vorläufer und die unreifen Schwanzzellen (Kipanyula et al. 2014). Schlussendlich differenzieren die unreifen Schwanzzellen zum Zeitpunkt der Geburt zu myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Schwanzzellen (Woodhoo und Sommer 2008). Doch auch im adulten Organismus bewahren Schwanzzellen eine Plastizität. So kann eine reife Schwanzzelle im Falle einer Nervenverletzung zu einer Reparatur-Schwanzzelle dedifferenzieren und damit entscheidend zu Reparaturprozessen beitragen (Jessen et al. 2015).

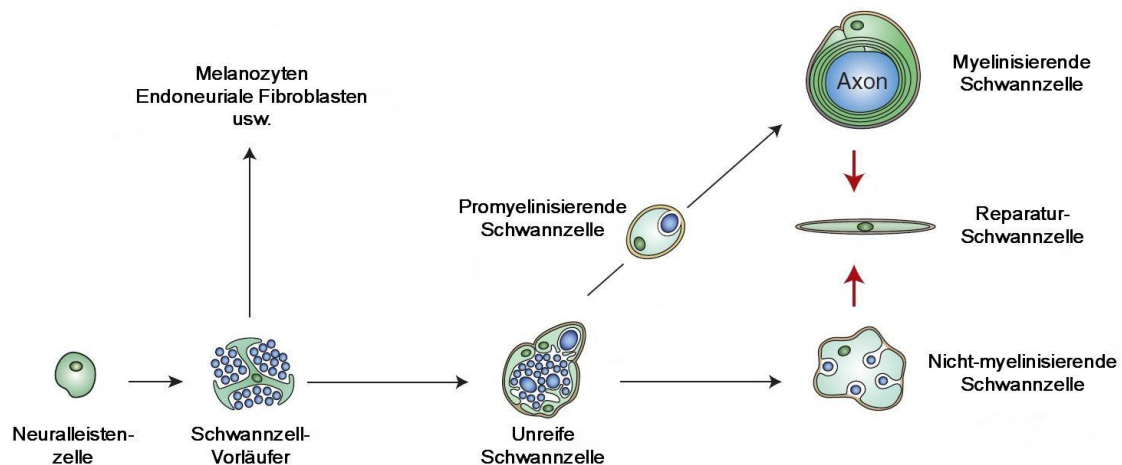


Abbildung 4: Darstellung der Schwanzzell-Entwicklung.

Schwanzzellen stammen von Neuralleistenzellen ab. Bei der Entwicklung zu reifen Schwanzzellen werden im Rahmen der Embryonalentwicklung im Wesentlichen zwei Zwischenstufen durchlaufen. Die Schwanzzell-Vorläufer-Zelle, welche sich zudem auch zu Melanozyten, endoneurialen Fibroblasten usw. entwickeln kann und die unreife Schwanzzelle. Die myelinisierende Schwanzzelle und die nicht-myelinisierende Schwanzzelle können sich im Falle einer Nervenverletzung zu Reparatur-Schwanzzellen dedifferenzieren (→).

Aus dem Englischen Übersetzt nach: Jessen und Kollegen, S. 2 (Jessen et al. 2015).

1.2 Untersuchte Antigene

Zur pathologischen Diagnostik wird unter anderem die Immunhistologie genutzt. Dies ist eine effiziente Methode zur Darstellung von Proteinen oder anderen Strukturen in der feingeweblichen Untersuchung von Gewebeproben. Dabei erfolgt der immunhistochemische Nachweis dieser Strukturen über Antigen-Antikörper-Reaktionen, welche mittels farblicher Markierung sichtbar gemacht und im Anschluss mit dem morphologischen Bild verglichen werden (Hantschke und Palmedo 2015).

Im Folgenden werden die Zellarten und Proteine aufgeführt, welche in der vorliegenden Studie genauer untersucht wurden und mögliche Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung dieser Antigene erläutert.

1.2.1 Zelltypspezifische Marker

Zur Identifikation verschiedener Zellarten im Neurofibrom wurden unterschiedliche immunhistochemische Marker verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der Zelltypen in Neurofibromen sowie der zelltypischen Antigene, die mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden.

Die hervorgehobenen Antigene wurden für die vorliegende Untersuchung mittels Immunhistochemie nachgewiesen.

Zellart	Zelltypische Antigene
Schwannzellen	S100 , NGFR, CD57, MBP, (saures Gliafaserprotein)
Perineuralzellen	EMA , NGFR, GLUT1, Claudin-1
Fibroblasten	CD90 , CD73, CD105, CD71, CD91, CD44, beta-integrin CD49b usw.
Mastzellen	Mastzell-Tryptase , CD43, CD45 (LCA), CD68, CD117 (C-KIT)
Axone	NF , NGFR, Synaptophysin
Myelinisierende Schwannzellen	MPZ , MBP, Sox10, S100, Krox20

Abkürzungen: S100 = S-100 Calcium-bindendes Protein; NGFR = Nerven Wachstumsfaktor Rezeptor; CD = ‚Cluster of Differentiation‘; MBP = Myelinprotein, basisches; EMA = Epitheliales Membranantigen; GLUT1 = Glukose-Transporter 1; LCA = ‚Leukocyte Common Antigen‘; NF = Neurofilament; MPZ = Myelin Protein zero; Sox10 = SRY-box Transkriptionsfaktor 10

Quellen: Hantschke und Palmedo 2015, Lupatov et al. 2015, Nilforoushzadeh et al. 2017, Liu et al. 2015

Wie im Unterkapitel „Histopathologie der peripheren Nervenscheidentumore“ (S. 9) beschrieben, beinhalten Neurofibrome neben den Schwannzell-artigen

Tumorzellen überwiegend nicht tumoröse Perineuralzellen, sowie Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen und residuale - teils bemerkte - Axone (Stemmer-Rachamimov und Nielsen 2012).

Tabelle 4 (S. 23) gibt eine kurze Übersicht über die Antigene, welche mittels IHC zur Darstellung bestimmter Zelltypen genutzt werden können. Die Antigene, die für diese Untersuchung ausgewählt wurden, sind in der Tabelle hervorgehoben.

Zur immunhistologischen Darstellung der Schwannzell-artigen Tumorzellen in Neurofibromen kann S-100 markiert werden (Stefansson et al. 1982). Der S100B Typ wird normalerweise in Astrozyten und Schwannzellen und unter pathologischen Bedingungen von fast allen Nervenscheidentumoren exprimiert. Allerdings zeigt sich bei MPNSTs (siehe auch Kapitel 1.1.2.3, S. 13) nur in 50 % der Fälle eine meist schwache oder fokale Anfärbung (Kuberappa et al. 2016). Des Weiteren kann zur Visualisierung von Perineuralzellen das Epitheliale-Membranantigen (EMA) nachgewiesen werden (Hantschke und Palmedo 2015). Neben der Präsenz von EMA in verschiedenen Epithelien, konnte im peripheren Nerven eine spezifische Expression in Perineuralzellen gezeigt werden (Perentes et al. 1987).

Fibroblasten lassen sich mit Hilfe des Oberflächenproteins CD90 (engl.: *cluster of differentiation 90*), auch Thy-1 (engl. *Thymocyte differentiation antigen 1*) genannt, darstellen. Dieser Marker wird meist zur Identifikation von hämatopoetischen oder stromalen Stammzellen genutzt, wird aber beim Menschen zudem beispielsweise in Neuronen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen exprimiert (Bradley et al. 2009).

Tryptase, Typ AA1, ist ein vorherrschend in Mastzellen vorkommendes Enzym und damit hoch spezifisch für die immunhistochemische Mastzell-Markierung (Walls et al. 1990).

Eine Darstellung residualer Axone in Neurofibromen kann mit Hilfe von Antikörpern gegen Neurofilament (NF) erfolgen (Zhu et al. 2015).

Um zudem myelinisierende von nicht-myelinisierenden Schwannzellen zu unterscheiden, können die myelinisierenden Schwannzellen mit Protein zero (MPZ) - einem Myelinscheiden-spezifischen Strukturprotein - markiert werden (Liu et al. 2015).

1.2.2 Desert Hedgehog Signalmolekül

Desert Hedgehog (DHH) ist ein Gen, welches das gleichnamige Signalmolekül Desert Hedgehog Protein codiert (Pereira et al. 2014). Hierbei handelt es sich um ein Mitglied der Hedgehog Familie, die bei Säugetieren aus Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) und DHH besteht (Sauvage 2010). Diese Signalmoleküle spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und der adulten Gewebemöostase. So kann eine Dysregulation des Hedgehog-Signalwegs zu verschiedenen kongenitalen Syndromen oder Krebserkrankungen führen (Briscoe und Thérond 2013).

Der Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog-Signalweg (s. Abbildung 5, S. 26) ist in seiner Regulation und seinen Interaktionen bislang noch nicht vollständig verstanden (Kong et al. 2019). Bekannt ist, dass die Hedgehog-Proteine an die Rezeptoren Patched (PTCH) 1 oder 2 binden und dadurch Smoothened (SMO) aktivieren. Nachfolgend wird die Hedgehog-Aktivität durch die Transkriptionsfaktoren Gli-Zinkfingerprotein 1, 2 und 3 (Gli1, Gli2 und Gli3) vermittelt (Hui und Angers 2011).

Über 100 Zielgene der Gli-Transkriptionsfaktoren konnten bislang identifiziert und ihre Regulation durch den Hedgehog-Signalweg gezeigt werden (Lee et al. 2010). Einige dieser Zielgene tragen zur Regulation der Zellproliferation, der Spezifizierung von Zellen und der Apoptose, sowie der Kontrolle von Stammzellen bei. Der Hedgehog-Signalweg spielt dadurch in der Tumorgenese einiger maligner Tumore eine wichtige Rolle (Hui und Angers 2011).

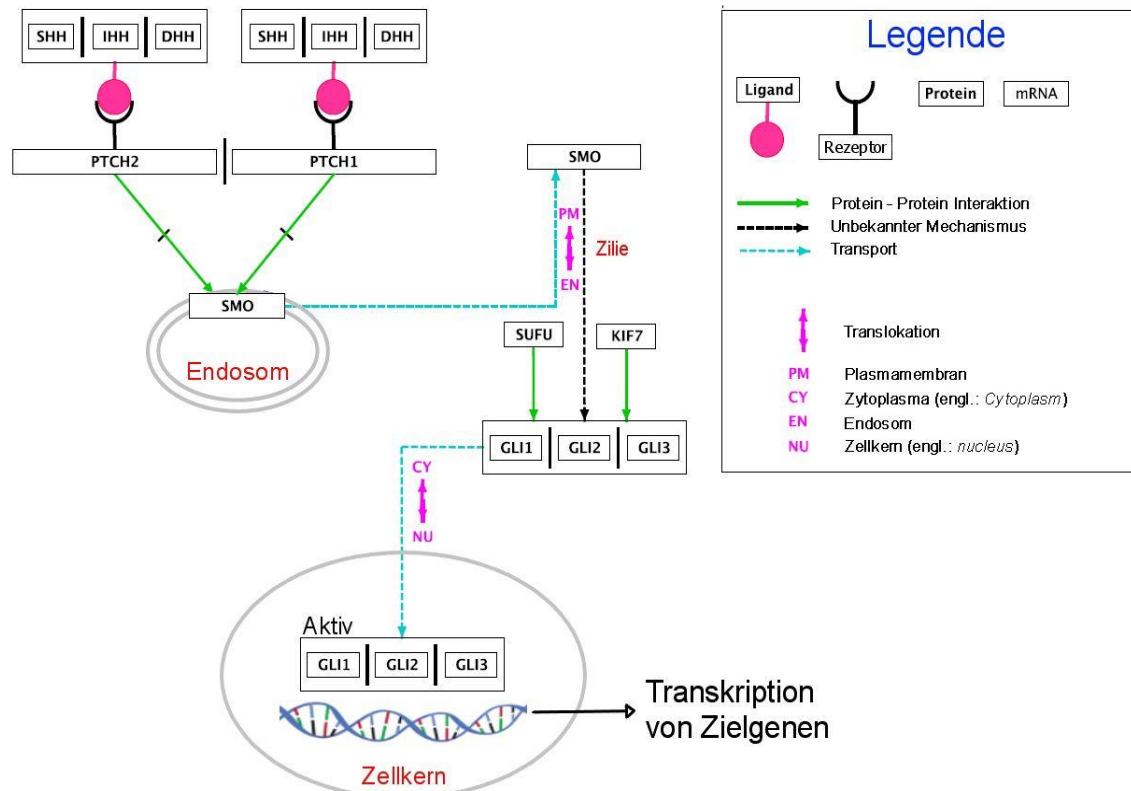


Abbildung 5: Hedgehog Signalweg

Die verschiedenen Mitglieder der Hedgehog Familie SHH, IHH und DHH leiten die Signalübertragung des Hedgehog/Gli-Signalweges durch Bindung an die Rezeptoren Patched 1 oder Patched 2 (PTCH1/PTCH2) ein. In Abwesenheit der Hedgehog-Signalproteine hemmen PTCH1/PTCH2 das membranständige Protein Smoothened (SMO), welches zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, durch bislang unbekannte Mechanismen. Durch Bindung von Hedgehog an PTCH1/PTCH2 erfolgt eine Derepression von SMO und dessen Translokation in die Plasmamembran von Zilien. Die Aktivierung von SMO führt durch eine Downstream-Signaltransduktion zur Dissoziation der Gli-Zinkfingerproteine (Gli1, Gli2 und Gli3) von dem Hedgehog-Signalweg Regulator ‚Suppressor of Fused Homolog‘ (SUFU) und dem Zilien-assoziierten Protein ‚Kinesin Family Member 7‘ (KIF7). Die Proteine SUFU und KIF7 isolieren in Abwesenheit von Hedgehogs die Gli-Proteine und induzieren deren Verarbeitung zu Transkriptionsrepressoren oder markieren sie für den Proteinabbau. Die Smo-vermittelte Aktivierung der Gli-Proteine führt nach Translokation in den Zellkern zur Transkription der Zielgene des Hedgehog-Signalweges.

Verschiedene Regulationsmechanismen des Signalweges wurden zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. Vereinfacht nach: Raju und Kollegen (Raju et al. 2011), NetSlim; modifiziert nach: Kong und Kollegen (Kong et al. 2019).

Expression und Funktionen von Desert Hedgehog

Bei Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die drei Mitglieder der Hedgehog Familie verschiedene Funktionen im Organismus einnehmen, was sich auch in ihrem unterschiedlichen Expressionsmuster zeigt (Pereira et al. 2014). So wurde eine Expression von DHH insbesondere in den männlichen Gonaden und im peripheren Nerven gezeigt (Bitgood und McMahon 1995), während

beispielsweise morphogene Ereignissen im ZNS in erster Linie im Zusammenhang mit SHH stehen (Alvarez et al. 2011).

Im PNS zeigt sich eine DHH-Expression insbesondere in myelinisierenden Schwannzellen (Parmantier et al. 1999, Sharghi-Namini et al. 2006).

Funktionell nimmt es zum einen bei der Entwicklung und Organisation der peripheren Nervenscheide eine wichtige Rolle ein. So fanden sich in DHH $-/-$ Nerven im Mausmodell ein ausgedünntes Perineurium und eine Reduktion des Kollagens im Epineurium (Parmantier et al. 1999). Auch eine Beteiligung am normalen Myelinisierungsprozess in der Nervenentwicklung wurde nachgewiesen (Yoshimura und Takeda 2012). Zudem konnte an murinen DHH $-/-$ Nerven die essenzielle Beteiligung von DHH an der strukturellen und funktionalen Integrität des gesamten peripheren Nervens gezeigt werden, da hier verschiedene Veränderungen, sowohl in myelinisierten, als auch in nicht-myelinisierten Nervenfasern beobachtet wurden (Sharghi-Namini et al. 2006).

Zum anderen konnte eine DHH-Expression im reifen Nerven gezeigt werden (Bajestan et al. 2006). Hier wurde eine Beteiligung von DHH bei der Aufrechterhaltung der Myelinisierung nachgewiesen. So bewirkte in einem *in-vitro*-Modell einer chronischen Nerven-Kompressions-Verletzung eine DHH-Blockade eine gesteigerte Demyelinisierung und die exogene Zufuhr von DHH konnte diese aufhalten (Jung et al. 2015).

Auch wird dem Hedgehog-Signalweg eine besondere Bedeutung zur Aufrechterhaltung einer Barriere zum Schutze der im Nerven herrschenden Mikroumgebung, die aus endoneuralen Blutgefäßen und dem Perineurium besteht (Weerasuriya und Mizisin 2011), zugeschrieben. Zunächst wurde gezeigt, dass DHH $-/-$ Nerven eine defekte Gewebe-Nerven-Barriere besitzen (Parmantier et al. 1999). Später wurde auch bei der Aufrechterhaltung der Blut-Nerven-Barriere eine Beteiligung von DHH demonstriert, da in Zellkulturen durch eine Hemmung des Hedgehog-Signalweges eine Zerstörung eben dieser induziert wurde (Moreau et al. 2016, Chapouly et al. 2016).

Desert Hedgehog in peripheren Nervenscheidentumoren

In Bezug auf PNSTs wurde von Endo und Kollegen die Hypothese aufgestellt, dass der Hedgehog-Signalweg in die Tumorgenese von Neurofibromen involviert sein könnte (Endo et al. 2002b, Endo et al. 2002a, Endo et al. 2004). Es wurde mittels IHC eine PTCH-Expression in Tumorzellen von Neurofibromen und Perineuralzellen von pNFs gezeigt (Endo et al. 2002a), zudem konnte in den Tumorzellen von pNFs mittels IHC eine Gli1-Expression nachgewiesen werden, welche sich im Kontrollnerv nicht darstellen ließ (Endo et al. 2004). Auch in einer aus einem MPNST gewonnenen Zelllinie (Mash-1 Zelllinie) konnte mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und IHC eine Expression von DHH und seinen Rezeptoren PTCH1 und PTCH2 gezeigt werden (Endo et al. 2002b). Analog demonstrierten Levy et al anhand zweier großer RT-PCR Studien eine Hochregulation von Gli1, DHH und PTCH2 (und SHH) in pNFs, die in nachfolgend daraus entstehenden MPNST wieder herabreguliert wurden. Hieraus schlossen die Autoren, dass eine Aktivierung des Hedgehog-Gli-Signalweges sowohl bei der Entstehung von pNFs, als auch bei der malignen Transformation zu MPNSTs eine Rolle spielt (Lèvy et al. 2004a, Lèvy et al. 2004b).

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Ausbreitung primär intraneural wachsender plexiformer Neurofibrome bei Neurofibromatose Typ 1 zu untersuchen. Dies geschah vor dem Hintergrund der Beobachtung, dass es intraneurale Neurofibrome gibt, die im histologischen Schnitt ein invasives, kapselübergreifendes Wachstum zu zeigen scheinen. Ein kapselüberschreitendes Wachstum stellt bei vielen Tumorentitäten ein Zeichen der Dedifferenzierung, teils auch der Malignisierung dar.

Der Übergang eines primär intraneural wachsenden plexiformen Neurofibroms zu einem diffus wachsenden plexiformen Neurofibrom ist so in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Es wurde folglich noch nicht untersucht, ob das kapselüberschreitende Wachstum von primär intraneural wachsenden plexiformen Neurofibromen eine Dedifferenzierung der Zellen und ggf. eine Malignisierung bedeutet. Um das Vorliegen einer Dedifferenzierung im Zuge des kapselüberschreitenden Wachstums zu überprüfen, sollte in der vorliegenden Studie getestet werden, ob bei Kapseldurchbruch ein Abfall eines Differenzierungsmarkers gemessen werden kann.

Als mögliches Differenzierungsantigen wurde das Signalmolekül Desert Hedgehog Protein ausgewählt, da seine Expression in peripheren Nervenscheidentumoren nachgewiesen wurde (Endo et al. 2002b) und eine Beteiligung dieses Proteins an der Aufrechterhaltung der Struktur von Perineurium und Myelinscheide berichtet wurde (Parmantier et al. 1999, Jung et al. 2015, Sharghi-Namini et al. 2006). Die Darstellung von DHH erfolgte mittels Immunhistologie.

Es ergibt sich folgende Fragestellung:

- Gibt es eine Abnahme der Expression von DHH in invasiv wachsenden plexiformen Neurofibromen als Zeichen einer Dedifferenzierung?

Zudem wurde nachfolgende Nebenfragestellung überprüft:

- Welche Zellen in peripheren Nervenscheidentumoren exprimieren DHH?

3. Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden werden die Gewebe, Substanzen und Geräte erläutert, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

3.1.1 Patientenkollektiv

Alle Patienten, die in dieser Studie eingeschlossen waren, erfüllen die diagnostischen Kriterien für NF1, die 1988 vom NIH erarbeitet wurden. Vor Beginn der Untersuchungen wurden alle Patienten-bezogenen Daten anonymisiert. Der gesamte Datensatz der klinischen Daten des Patientenkollektivs findet sich im Anhang in Tabelle A 2 (S. 125).

Gewebeproben

Aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf (UKE) wurden 151 als plexiform-diffuse Neurofibrome, 56 als dermale Neurofibrome und 20 als MPNST diagnostizierte Gewebeproben, die mit NF1 assoziiert waren, entnommen.

Die Proben waren zwischen 1997 und 2012 in der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie des UKE operativ entfernt und im Institut für Neuropathologie untersucht worden. Für die Routinediagnostik war jede paraffin-eingebettete Probe bereits histologisch mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen EMA, NF und S100 markiert worden. Diese Schnitte wurden verwendet und bei der Durchsicht der Fälle wurden die teilweise fehlenden Markierungen ergänzt. Zudem wurden die Paraffinblöcke der Gewebeproben für die weitere Untersuchung genutzt.

Anhand der bereits markierten Gewebeschnitte konnten die Tumore in fünf verschiedene Gruppen unterteilt werden. Es wurden **dermale Neurofibrome** (1), von plexiformen Neurofibromen unterschieden, wobei diese noch in drei Untergruppen: **plexiform-intraneurale** (2), **plexiform-kapselüberschreitende** (3) und **plexiform-diffuse** (4) Neurofibrome unterteilt wurden, zudem wurden **MPNSTs** (5) abgegrenzt. In der Gruppe der dNFs wurde bei Auswahl der Proben darauf geachtet, dass der Tumoranteil gut vom gesunden Gewebe abgrenzbar ist. Bei den pNFs wurden in Gruppe 2 lediglich Proben mit komplett

angeschnittenen Faszikeln und intaktem Perineurium aufgenommen, bei Gruppe 3 wurde explizit auf Regionen geachtet, in denen sich das Perineurium auflöst aber noch durchgehend vorhanden ist und bei Gruppe 4 sollte eine diffuse Gewebsinfiltration bestehen. Die MPNST sollten Malignitätskriterien wie beispielsweise eine deutlich erhöhte Mitose- und Proliferationsaktivität vorweisen. Zusätzlich wurde die Gruppe 2 der pNFs anhand des makroskopischen Befundes in nodulär-intraneurale oder langstreckig-plexiforme Tumore unterteilt.

Stichprobe

Somit wurde aus den gesichteten Gewebeschnitten für die weitere Untersuchung die folgende, in Tabelle 5 (S. 31) dargestellte, Stichprobe zusammengestellt.

Tabelle 5: Stichprobe nach Tumortyp mit Unterscheidung zwischen Anzahl der untersuchten Proben und der Zahl der Patienten, denen die Gewebeproben entnommen wurden.

Tumortyp	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl untersuchter Patienten
Dermale Neurofibrome	20	17
Plexiform-intraneurale Neurofibrome	14	12
- davon noduläres Wachstum	7	5
- davon langstreckiges Wachstum	7	7
Plexiform-kapselüberschreitende Neurofibrome	12	6
Plexiform-diffuse Neurofibrome	20	17
MPNST	17	17
Summe	83	69

Es wurden 20 Gewebeschnitte von **dermalen Neurofibromen**, 14 **plexiform-intraneurale Neurofibromen**, 12 **plexiform-kapselüberschreitende Neurofibromen**, 20 **plexiform-diffusen Neurofibromen** und 17 **MPNSTs** ausgewählt. Die Untergruppe der plexiform-intraneuralen Neurofibrome konnte dabei in je 7 Proben nodulär-intraneuraler, bzw. langstreckig-plexiformer Tumore unterschieden werden. Von einigen Patienten wurden mehrere Proben entnommen, die einzeln untersucht wurden.

Insgesamt wurden 83 Gewebeproben von 69 verschiedenen Patienten untersucht. Zur Anonymisierung der Patientendaten wurde für jede Gewebeprobe eine 4-stellige Proben-Identifikationsnummer (Proben-ID) vergeben.

Geschlechterverteilung

In dieser Stichprobe stammten 49 Gewebeprobe von 41 weiblichen und 34 Proben von 28 männlichen Patienten. In die vorliegende Untersuchung eingeschlossen waren somit 59 % Frauen und 41 % Männer. Unterteilt nach Tumortyp ergibt sich eine Geschlechterverteilung wie in Abbildung 6 (S. 32) gezeigt. Es ergibt sich für die **dNFs** eine Verteilung von 76 % Frauen und 24 % Männern, für die **plexiform-intraneuralen Neurofibrome** waren 58 % Frauen und 42 % Männer eingeschlossen, für die **plexiform-kapselüberschreitende Neurofibrome** 33 % Frauen und 67 % Männer, für die **plexiform-diffusen Neurofibrome** 47 % Frauen und 53 % Männer und bei den **MPNSTs** stammten 65 % der Proben von Frauen und 35 % von Männern. Für die Gesamtgruppe der pNFs ergab sich eine Verteilung von 49 % Frauen und 51 % Männer.

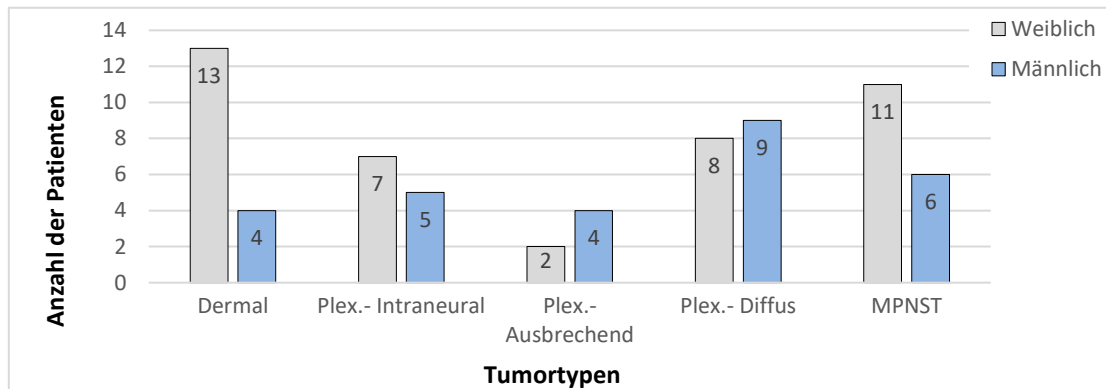


Abbildung 6: Balkendiagramm der Geschlechterverteilung des Patientenkollektives, aufgelistet nach den verschiedenen Tumortypen.

Dermal = Derales Neurofibrom, Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, Plex.-Ausbrechend = Plexiform-kapselüberschreitende Neurofibrom, Plex.-Diffus = Plexiform-diffuses Neurofibrom; Gesamtzahl der Patienten (n) = 69.

Altersverteilung

Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme lag das Patientenalter zwischen 5 und 71 Jahren. Für das Gesamtkollektiv aller Patienten (n = 69) ergab sich bei Operation ein mittleres Alter von 33,28 Jahren.

Nach Tumortypen aufgelistet setzt sich die Altersverteilung zum Zeitpunkt der Operation wie in Abbildung 7 (S. 33) sichtbar zusammen. Es lässt sich für die **dNFs** (n = 17) ein mittleres Alter von 43,9 Jahren ermitteln, für die **plexiform-intraneuralen Neurofibrome** (n = 12) von 21,2 Jahren, für die **plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibrome** (n = 6) von 22,5 Jahren, für die **plexiform-diffusen Neurofibrome** (n = 17) von 32,6 Jahren und in der Gruppe

der **MPNSTs** (n = 17) lag das mittlere Alter bei 35,7 Jahren. Auch hier wird der Tumor-Subtyp der plexiformen Neurofibrome in der vorliegenden Studie teils zusammen betrachtet, damit zeigte sich für die Gruppe der **PNFs** (n = 35) ein mittleres Alter von 26,9 Jahren.

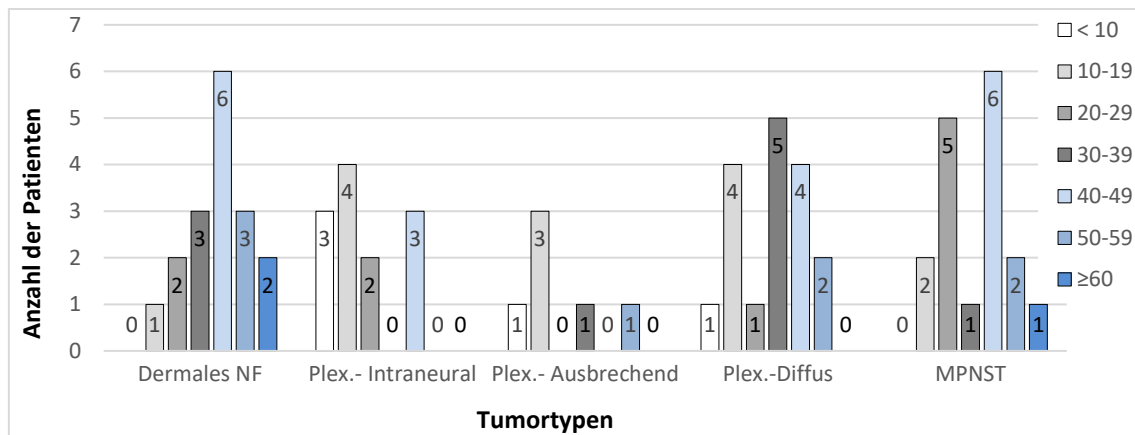


Abbildung 7: Balkendiagramm der Altersverteilung des Patientenkollektives nach Dekaden zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme, aufgelistet nach Tumortypen.

Dermal = Dermales Neurofibrom, Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, Plex.-Ausbrechend = Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom, Plex.-Diffus = Plexiform-diffuses Neurofibrom; Gesamtzahl der Patienten n=69.

Tumorlokalisation

Die untersuchten Gewebeproben wurden den Patienten operativ entfernt, dabei erfolgte die Entnahme aus verschiedensten Körperregionen. Zum Zwecke einer besseren Übersicht wurden die Lokalisationen als Kopf/Hals, Rumpf und Extremitäten zusammengefasst. Von den untersuchten PNSTs (n = 83) konnte bei 8 Proben (9,6 %) die Lokalisation anhand der vorhandenen Aufzeichnungen nicht ermittelt werden. Insgesamt wurden die meisten Proben mit 44 % aus dem Rumpf-Bereich (33/75) entnommen, gefolgt von 30,7 % aus den Extremitäten (23/75) und die wenigsten Proben entstammten mit 25,3 % aus dem Kopf/Hals-Bereich (19/75).

In Abbildung 8 (S. 34) wird die Korrelation zwischen Tumortyp und Tumorlokalisation verdeutlicht. Es zeigte sich, dass die in diese Studie eingeschlossenen **dNF** (n = 17) überwiegend aus dem Rumpfbereich und aus den Extremitäten entnommen wurden. Die **plexiform-intraneuralen Neurofibrome** (n = 14) stammten zumeist aus dem Kopf/Hals-Bereich und aus dem Rumpfbereich; die **plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibrome**

(n = 12) vorwiegend aus dem Rumpfbereich und die **plexiform-diffusen Neurofibrome** (n = 19) aus den Extremitäten; während die **MPNSTs** vor allem im Rumpf-Bereich und in den Extremitäten lokalisiert waren. Für den Tumor-Subtyp der **pNF** zusammengefasst (n = 45) stammten die Tumore etwa zu gleichem Anteil aus den drei Lokalisationen.

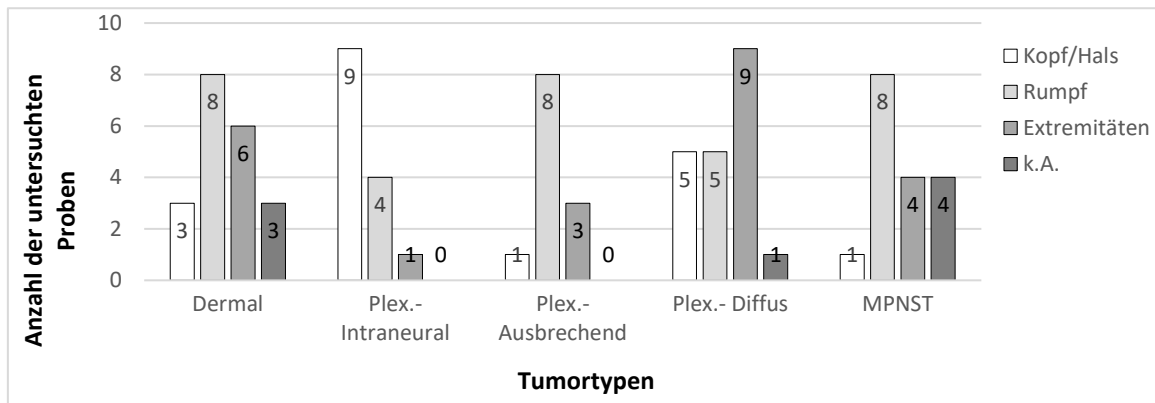


Abbildung 8: Balkendiagramm der Tumortypen unterteilt nach Tumorlokalisation

Hierbei wurde eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Körperregionen (Kopf, Rumpf, Extremitäten) getroffen. Dermal = Dermales Neurofibrom, Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, Plex.-Ausbrechend = Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom, Plex.-Diffus = Plexiform-diffuses Neurofibrom; k.A. = keine Angaben;

Gesamtzahl der untersuchten Proben n=83.

3.1.2 Antikörper

Tabelle 6 (S. 34) gibt einen Überblick über die Antikörper, welche zur Immunhistologischen Färbung verwendet wurden.

Tabelle 6: Antikörper zur Immunhistologischen Färbung

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Anti-Desert Hedgehog protein (DHH), Clone 19D7.2	Millipore	04-967	1:75
Anti-S100	Dako	Z 0311	1:8000
Epithelial Membrane Antigen (EMA)	Dako	M0613	1:200
Anti-CD90/Thy1 Antibody [EPR3132]	Abcam	Ab92574	1:100
Anti-Human Mast Cell Tryptase Clone AA1	Dako	M 7052	1:100
Neurofilament Antibody (NF)	Dako	M0762	1:800
Myelin Protein Zero Antibody	Bioss	BS-0337R	1:300

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 7 (S. 35) gibt einen Überblick über die verwendeten Reagenzien.

Tabelle 7: Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Aqua destillata (Aqua dest.)	UKE, Apotheke	
EZ Prep™ Konzentrat (10x)	Ventana Medical Systems, Roche	05279771001
Liquid Coverslip (LCS; predilute)	Ventana Medical Systems, Roche	05264839001
<i>Sodium Chloride Sodium Citrate buffer</i> (SSC) Konzentrat (10x)	Ventana Medical Systems, Roche	05353947001
Reaction Buffer Konzentrat (10x)	Ventana Medical Systems, Roche	05353955001
Cell Conditioning 1 (CC1) [Puffer auf Tris-Basis]	Ventana Medical Systems, Roche	05279801001
ultraView Universal DAB Detection Kit	Ventana Medical Systems, Roche	05269806001
ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit	Ventana Medical Systems, Roche	05269814001
Bluing Reagent	Ventana Medical Systems, Roche	05266769001
Hematoxylin	Ventana Medical Systems, Roche	05266726001
Protease 1	Ventana Medical Systems, Roche	05266688001
Eukitt Eindeckmedium	Sigma	03989

3.1.4 Lösungen und Puffer

Nachfolgend werden die Lösungen und Puffer aufgelistet, die für die immunhistochemischen Markierungen in der Ventana verwendet wurden.

- **EZ-Prep:** 18 Liter Aqua dest. + 2 Liter EZ Konzentrat
- **SSC:** 10 Liter Aqua dest + 2 Liter SSC Konzentrat
- **Reaction buffer:** 18 Liter Aqua dest + 2 Liter Reaction buffer

3.1.5 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8 (S. 36) und Tabelle 9 (S. 36) geben einen Überblick über die benutzten Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 8: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Kühlplatte	Laica, Typ CV5030
Heizbad	GFL
Mikrotom	Jung HN40
Wärmeschrank	Heraeus instruments
Binokularmikroskop (Modell BH-2)	Olympus
Vollautomatischer Färbeautomat Ventana benchmark xt	Ventana Medical Systems, Roche
Etikettendrucker EBAR II	Ventana Medical Systems, Roche
Zoom Kamera	Canon
Slide-Scanner (NanoZoomer 2.0-HAT)	Hamamatsu

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Bestellnummer
Hochtransparentes Zeichenpapier (Pergamentpapier)	Hahnemühle	10620602
Objektträger Superfrost Assistent	Hecht Assistent	2409/1
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co KG	0107242
Mikrotomklingen	Microtom Blade A35, Feather Safety Razor Co, LTD	207500011
Etiketten Label Kit	Ventana Medical Systems, Roche	1418702

3.1.6 Software

Die durch die nachfolgend beschriebenen Methoden erfassten Rohdaten wurden mit folgenden Programmen erfasst oder bearbeitet.

- **Ventanaprogramm** (NexES Version 9.30)
- **Programm zur Bildverarbeitung** (ImageJ Version 1.52a)
- **Programm zur Bildbearbeitung** (Krita Version 4.1.7)
- **Programm zur Erstellung von Abbildungen** (FigureJ; Quelle: Mutterer und Zinck 2013)
- **Programm zur Verarbeitung der gescannten Objektträger** (NDPview2, Version 2.7.39 von Hamamatsu)
- **Programm zur statistischen Auswertung** (IBM SPSS Statistics, Version 25)

3.2 Methoden

Neben einer mikroskopischen Begutachtung der für die Routinediagnostik bereits mit HE, EMA, NF und S100 gefärbten Gewebeschnitte der Stichprobe wurden Gewebepräparate hergestellt, an denen eine immunhistochemische Färbung mit DHH und den in Kapitel 3.1.2 (S. 34) genannten Antikörpern erfolgte. Im Folgenden wird dies genauer erläutert.

3.2.1 Schnittherstellung

Nach Vorbereitung der Arbeitsmaterialien und einem Vorkühlen der Paraffinblöcke auf der Kühlplatte, wurden mit einem Schlittenmikrotom 4 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden in einer Schale mit kaltem Aqua dest. geglättet und nach Möglichkeit ohne Einschluss von Luftblasen auf einem Superfrost Objektträger aufgefangen. Anschließend wurden sie im 56 °C warmen Wasserbad - gefüllt mit Aqua dest. - gestreckt, auf den Objektträger aufgezogen und zwischen feuchtem Pergamentpapier fest angedrückt und glattgestrichen. Danach erfolgte die Trocknung der Präparate in einem Brutschrank für 30 min bei 59 °C.

3.2.2 Automatisierte Immunhistochemische Markierungen

Die Immunhistochemische Markierung der Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe des Ventana benchmark xt-Färbeautomaten nach einem standardisierten Protokoll. Antikörperspezifische Vorbehandlungen und Einwirkzeiten können spezifisch verändert, spezielle Schritte ggf. per Hand durchgeführt werden.

Etablierung der DHH-Markierung

Bevor ein Antikörper in der Immunhistochemie eingesetzt werden kann, muss der Immunnachweis etabliert und ein Färbeprotokoll validiert werden.

Zur Etablierung und Validierung des DHH-Nachweises wurden Gewebeschnitte eines normalen Nervens (Biopsie eines Nervus suralis) gemeinsam mit einer Positiv-Kontrolle - entsprechend der Angaben im Datasheet des Antikörpers wurde hierbei ein malignes Teratom verwendet - ausgewählt. Es wurden verschiedene Vorbehandlungen mit einem Puffer (CC1 mit 1 h Einwirkzeit/ CC1 mit 30 min Einwirkzeit/ ohne Vorbehandlung) mit verschiedenen Verdünnungen des DHH-Antikörpers (1:75/1:100/1:300/1:500) kombiniert. Die Behandlung der

Gewebeschnitte wurden mit dem Färbeautomat durchgeführt und es erfolgte eine Unterbrechung des Programms, damit der DHH-Antikörper in den verschiedenen Verdünnungen per Hand aufgetragen werden konnte.

Im Anschluss wurde die Intensität der Färbung sowohl von der Autorin als auch von Ihrem Betreuer unter dem Mikroskop beurteilt.

Die Kombination von Vorbehandlung und Antikörperverdünnung, welche die deutlichste Reaktion (Sensitivität) und die geringste Hintergrundfärbung (Spezifität) zeigte, wurde für das Färbeprotokoll ausgewählt.

Färbeprotokoll der vollautomatischen DHH-Markierung

Die für die DHH-Markierung verwendeten Antikörper, Reagenzien, Lösungen und Puffer sind in Tabelle 6 (S. 34), Tabelle 7 (S. 35) und im Kapitel 3.1.4 (S. 35) aufgeführt.

- Entparaffinierung der Gewebeschnitte: Aufheizen der Objektträger auf 75 °C und 76 °C für jeweils 4 min unter Verwendung von EZ Prep zur Minderung der Oberflächenspannung
- Vorbehandlung des Gewebes zur Antigendemaskierung: Auftragen des Puffers (CC1) und Aufheizen des Objektträgers auf bis zu 95 °C für 8 min, dann erneutes Auftragen von CC1 und Aufheizen auf bis zu 100 °C für insgesamt 30 min
- Blockade der endogenen Peroxidase durch Auftragen von Universal DAB Inhibitor und Inkubation für 4 min bei Raumtemperatur (RT)
- Auftragen des Primär-Antikörpers DHH (Verdünnung 1:75) und Inkubation für 32 min bei RT
- Auftragen der Peroxidase Universal HRP Multimer und Inkubation für 8 min bei RT
- Visualisierung durch das Chromogen Universal DAB gemeinsam mit DAB H₂O₂-Lösung zur Aktivierung und Inkubation für 8 min bei RT
- Auftragen des Universal DAB Copper für 4 min bei RT
- Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin (engl.: Hematoxylin); Inkubation für 4 min bei RT
- Nach-Gegenfärbung mit Bluing Reagent zur Intensivierung der blau-Färbung der Zellkerne; Inkubation für 4 min bei RT

Die Zwischenschritte, wie beispielsweise Waschen, Spülen oder die Zugabe von Coverslip Lösung wurden abgekürzt (s. Tabelle A 1, S. 123 für das ausführliche Ventana-Färbeprotokoll der DHH-Markierung). Nach abgeschlossenem Färbelauf wurden die Gewebeschnitte mit Eukitt eingedeckt.

Immunhistochemische Doppelmarkierungen
für DHH und S100, DHH und EMA, DHH und CD90/Thy1, DHH und Tryptase, DHH und NF sowie DHH und MPZ

Die immunhistochemischen Doppelmarkierungen wurden lediglich bei einer beispielhaften Auswahl verschiedener Gewebeproben durchgeführt. Grundsätzlich wurden für die Doppelmarkierungen Proben genutzt, die in der DHH-Markierung eine kräftige Anfärbung und eine gute Qualität des Gewebeschnittes zeigten. Für die Doppelmarkierungen mit DHH und S100, DHH und Tryptase sowie DHH und CD90 wurde jeweils eine Probe je Tumortyp ausgewählt. Eine Doppelmarkierung mit DHH und EMA erfolgte für je eine Probe jedes Tumortyps, bei denen ein Perineurium vorhanden war (plexiform-intraneurales und plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom) sowie vergleichend für einen peripheren Nerv. Für eine Probe eines plexiform-intraneuralen Neurofibroms, in der Zellen residualer Axone vorhanden waren, sowie vergleichend in einem peripheren Nerven wurden zudem Doppelmarkierungen mit DHH und NF sowie DHH und MPZ angefertigt.

Die Doppelmarkierungen wurden nach dem gleichen Prinzip wie die DHH-Markierung (s. oben) mit Hilfe des vollautomatischen Färbeautomaten hergestellt. Nach einer Vorbehandlung mit dem Puffer (CC1) für 30 min wurde bei den Doppelmarkierungen als erster Primär-Antikörper DHH (Verdünnung 1:75) aufgetragen und mit dem Chromogen DAB visualisiert. Nach einer Antikörper Denaturierung für 12 min bei 95 °C erfolgte das Auftragen des zweiten Primär-Antikörpers S100 (Verdünnung 1:8000), EMA (Verdünnung 1:200), CD90/Thy1 (Verdünnung 1:100), Tryptase (Verdünnung 1:100), NF (Verdünnung 1:800) oder MPZ (Verdünnung 1:300). Zur farblichen Darstellung dieser Antikörper wurde das Chromogen Fast Red (Alkaline Phosphatase Red Detection Kit) benutzt. Im Anschluss erfolgten die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, sowie eine Nach-Gegenfärbung mit Bluing Reagent zur Darstellung von Zellkernen. Lediglich bei der Doppelmarkierung mit DHH und MPZ wurde zur besseren Beurteilbarkeit auf eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Bluing Reagent verzichtet.

Die doppelmarkierten Gewebeschnitte wurden nach Abschluss der Färbung mit Eukitt eingedeckt und nach entsprechender Trocknungszeit zur weiteren Auswertung und Dokumentation mit Hilfe des Slide Scanners digitalisiert.

3.2.3 Evaluation

Die mit Antikörper markierten Gewebeschnitte wurden von der Autorin und ihrem Betreuer unabhängig voneinander unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Dabei wurde je nach Gewebeprobe unterschieden zwischen Arealen mit Tumorzellen, wenn vorhanden Zellen des Perineuriums (bei den plexiform-intraneuralen und plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibromen) und ggf. Zellen residualer Axone (teilweise bei den plexiform-intraneuralen und plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen). Hierzu wurden Areale mit Zellen des Perineuriums in den EMA-markierten Schnitten und Areale mit Zellen der residualen Axone in den NF-gefärbten Proben ermittelt.

Histomorphologische Begutachtung

Zur Darstellung des Kapselüberschreitenden Wachstumsmusters von intraneuralen Neurofibromen, wurden EMA gefärbte Gewepräparate mikroskopisch beurteilt. Regionen, in denen sich das Perineurium dünner darstellte oder Tumorzellen es bereits auflösten, wurden markiert und mit Hilfe des Fotomikroskopes (Mikroskop in Verbindung mit der Canon zoom Kamera) dokumentiert.

Semiquantitative Auswertung der DHH-Markierung

Zunächst wurden die mit Anti-DHH markierten Gewebeschnitte semiquantitativ nach der Intensität der Färbung beurteilt. Dabei wurde unterschieden in 0 = keine Färbung, 1 = schwach angefärbt, 2 = mittelstark angefärbt und 3 = stark angefärbt (vgl.: Abbildung 14, S. 49). Bei Vorhandensein von Zellen des Perineuriums oder residualer Axone wurde für jeden Bereich einzeln eine Färbeintensität bestimmt. Danach wurde für jeden Fall der Median der DHH-Intensität (Mdn) ermittelt. Falls also ein Perineurium und ggf. residuale Axone in der Gewebeprobe vorhanden waren, wurde aus diesen drei Werten der fallbezogene Median bestimmt. Aus diesen fallbezogenen Medianen konnte nun der Median je Tumortyp berechnet werden. Diese Werte wurden in den Ergebnissen wie folgt angegeben: Median (25 %-Perzentil / 75 %-Perzentil). Zur Darstellung der Verteilung wurde hier zudem der prozentuale Anteil der jeweiligen Ausprägung bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Proben je Tumortyp berechnet.

Quantitative Auswertung der DHH-Markierung

Im Anschluss an die semiquantitative Auswertung erfolgte zusätzlich eine quantitative Auswertung der DHH-gefärbten Tumorzellen. Hierzu wurden von zuvor per Lichtmikroskop ausgewählten Ausschnitten der mit Anti-DHH gefärbten Gewebeschnitte mit Hilfe einer Canon Zoom Kamera Fotos von Tumorarealen angefertigt. Auf diesen $360 \times 270 \mu\text{m}^2$ großen Bildern wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ zum einen die gesamte Anzahl der Tumorzellen und zum anderen die Zahl der DHH positiven Tumorzellen ermittelt. Mit Hilfe dieser Zahlen konnte für jeden Fall der prozentuale Anteil der DHH positiven Tumorzellen an der Gesamttumorzellzahl errechnet werden. Aus diesem prozentualen Anteil DHH-positiver Zellen je Fall konnte ein Mittelwert (M) der DHH-positiven Zellen für jeden Tumortyp berechnet werden. Zu diesen Mittelwerten wurde stets die jeweilige Standard-Abweichung (SD) angegeben. Mit Hilfe der statistischen Auswertung (siehe Kapitel 3.2.4, S. 41) wurde nun überprüft, ob zwischen den verschiedenen Tumortypen ein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der DHH-positiven Zellen besteht.

Auswertung der doppelmarkierten Gewebeschnitte

Um zu prüfen welche der Zellen im Neurofibrom das DHH exprimieren, wurden beispielhaft doppelmarkierte Gewebeschnitte mit DHH und den im Kapitel 1.2.1 (S. 23) beschriebenen Antikörpern angefertigt. Die Scans der Doppelmarkierungen wurden mit Hilfe des digitalen Objektträger-Betrachters NDPview2 von der Autorin und ihrem Betreuer beurteilt und geeignete Tumorareale markiert, in denen beide Primärantikörper eine gute Anfärbung zeigten. Es wurde für jeden Beispielschnitt in drei verschiedenen Gesichtsfeldern ermittelt, ob das untersuchte Antigen (s. Kapitel 1.2.1, S. 23) eine Doppelmarkierung mit dem jeweiligen Antikörper und DHH aufweist oder nicht.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Statistik- und Analyse-Software SPSS (siehe Kapitel 3.1.6, S. 36) unter der Beratung durch A. Hot und L. Schmitz aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie am UKE. Es handelt sich um eine rein explorative statistische Analyse.

Es wurde untersucht, ob es innerhalb der fünf Tumortypen einen signifikanten Unterschied in der DHH-Expression – gemessen an dem prozentualen Anteil DHH-positiver Tumorzellen (quantitative Auswertung) – gab.

Da innerhalb der Tumortypen von einigen Patienten Gewebeproben aus verschiedenen Tumoren untersucht wurden, musste die Untersuchung für den Clustereffekt bezüglich des Patienten adjustiert werden.

Somit wurde ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell berechnet. Dieses Modell berücksichtigt zum einen den zufälligen Effekt, der durch die Verwendung mehrerer Proben einzelner Patienten vorliegen könnte. Zum anderen werden in diesem Modell neben dem Einfluss des Tumortyps auf die DHH-Expression zusätzlich mögliche Effekte durch das Patientenalter, das Patientengeschlecht und die Tumorlokalisierung einbezogen.

Als abhängige Variable wurde der prozentuale Anteil DHH-positiver Tumorzellen definiert. Als feste Effekte wurden der Tumortyp, das Patientenalter, das Patientengeschlecht und die Tumorlokalisierung festgelegt. Als Zufallseffekt wurde die Patientennummer gewählt.

In dem angewandten Modell wurden in der Tabelle ‚Feste Effekte‘ für das Gesamtmodell und die einzelnen Modelleffekte die geschätzten Mittelwerte des Anteils DHH-positiver Tumorzellen verglichen. Dabei wurde jeweils der F-Test (F) angewandt, bei dem es sich um eine Teststatistik handelt, die F-verteilt ist. Mit diesem F-Test wurden jeweils als Signifikanzwerte die globalen p-Werte berechnet. In den Ergebnissen wurden jeweils die Werte des F-Tests mit ihren Freiheitsgraden (df1 und df2) und ihrer Signifikanz (Sig.) angegeben.

Zusätzlich wurden die paarweisen Kontraste zwischen den einzelnen Tumortypen evaluiert. Hier wird jeweils der geschätzte Mittelwert des Anteils DHH-positiver Tumorzellen innerhalb der Tumortypen inklusive Konfidenzintervall ausgegeben. Bei den paarweisen Vergleichen wird der T-Test (T), ein Hypothesentest mit t-Verteilung, gerechnet. Hierbei muss bedacht werden, dass die paarweisen Schätzer durch paarweise Tests zustande kommen und man damit eventuell den Fehler 1. Art verzerrt. Beim Vergleich zwischen den Gruppen der Tumortypen wurde stets der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Kontrastschätzer) mit zugehörigem 95 %-Konfidenzintervall (95 %-CI) angegeben.

Zum Vergleich der Mittelwerte des prozentualen Anteils DHH-positiver Tumorzellen zwischen intraneural-nodulärem und langstreckig-plexiformen Wachstum wurde ebenfalls der T-Test gerechnet. Auch hier kann eine Verzerrung des Fehlers 1. Art nicht ausgeschlossen werden.

4. Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird zunächst auf das Wachstumsverhalten intraneuraler Neurofibrome eingegangen und im zweiten Teil werden die Ergebnisse der DHH-Markierung dargestellt.

4.1 Kapselüberschreitendes Wachstum

Bei Zusammenstellung der Stichprobe wurden, wie in Kapitel 3.1.1 (S. 30) beschrieben, unter anderem 151 als plexiform/diffuse Neurofibrome gekennzeichnete Gewebeproben gesichtet. Hierbei fiel in ein einigen Fällen ein invasiver Charakter der Neurofibrome auf, ohne dass Anzeichen für eine maligne Veränderung (z.B. Zellkernatypien oder eine erhöhte Mitoserate) vorgelegen hätten.

Wie in Abbildung 9 (S. 44) sichtbar, wird bei einem gesunden Nerv jeder Nervenfaszikel von mehreren zirkulär angeordneten Perineuralzell-Schichten - dem Perineurium - umgeben.

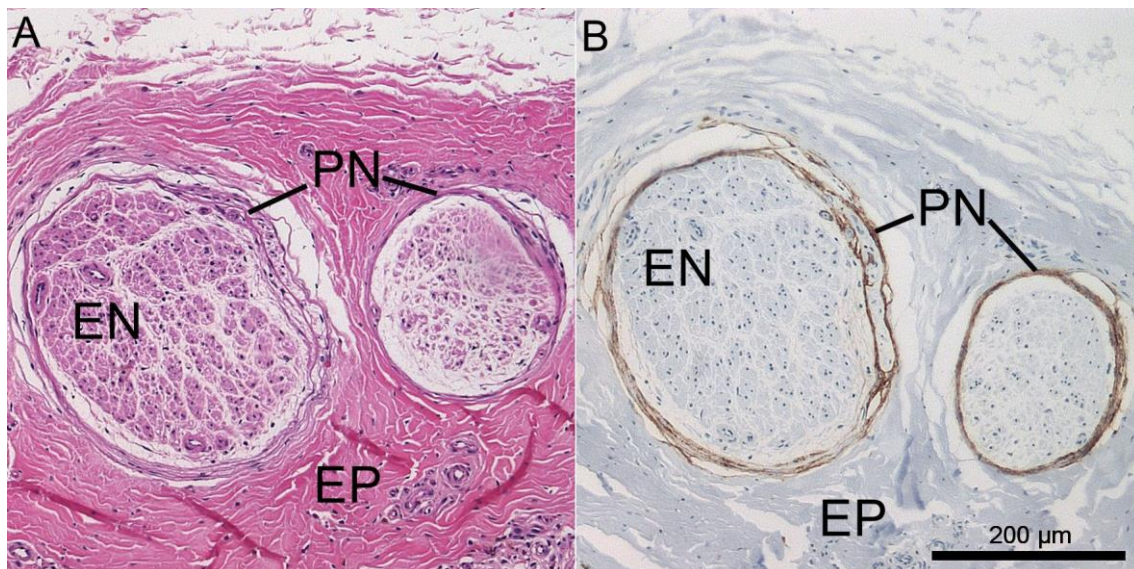


Abbildung 9: Darstellung eines gesunden peripheren Nervens

Proben ID: 720-0; **A:** Periphere Nerven werden durch verschiedene Bindegewebsschichten organisiert. Das Endoneurium (EN) umhüllt locker einzelne Nervenfasern. Mehrere Nervenfasern werden vom Perineurium (PN) zu Faszikeln zusammengefasst und das Bindegewebe, das den Gesamtnerv umhüllt, wird als Epineurium (EP) bezeichnet. (HE-Färbung) **B:** Das Perineurium kann mit Antikörpern gegen EMA dargestellt werden. Es bildet konzentrische Schichten um die Nervenfaszikel und besteht je nach Größe des Nervenfaszikels meist aus mehreren Zellschichten.

In einigen Neurofibromen, die im Rahmen dieser Studie gesichteten Gewebeproben, zeigten sich nicht nur die normale Architektur des Nervenfaszikel, sondern auch die Perineuralzell-Schichten verändert.

Wie in Abbildung 10 (S. 45) gezeigt, wurde bei einigen Neurofibromen in einer immunhistochemischen Markierung mit EMA stellenweise eine Ausdünnung des Perineuriums bis hin zur fokalen Auflösung deutlich.

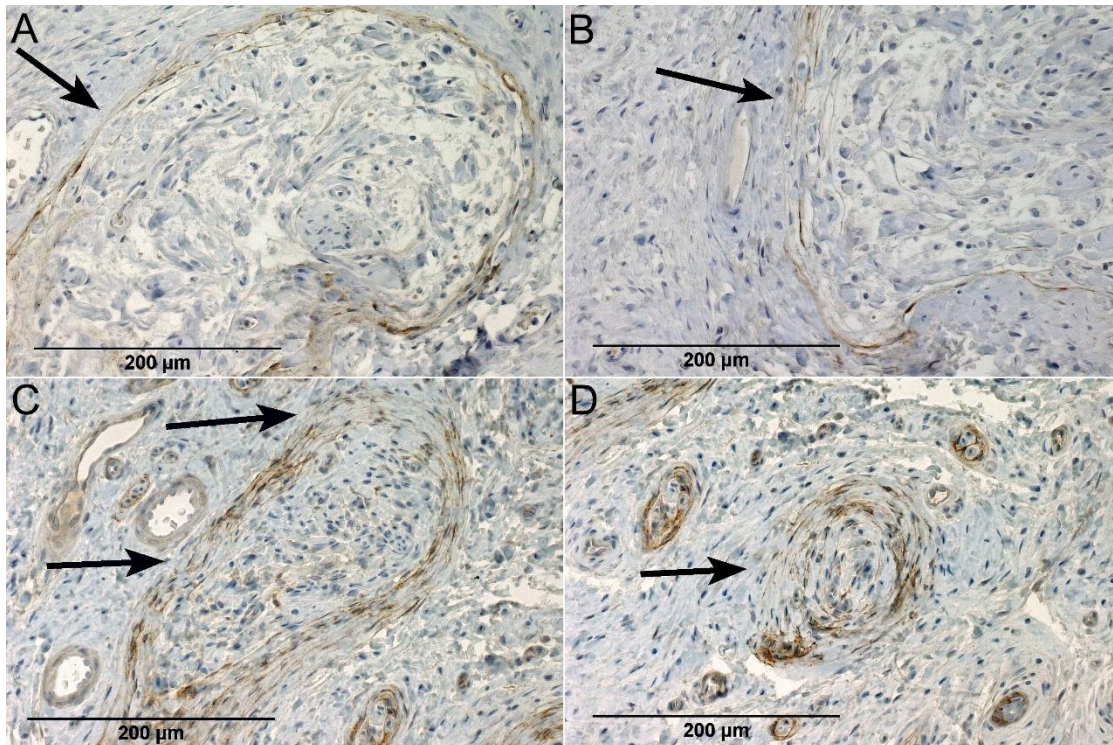


Abbildung 10: Kapselüberschreitendes Wachstum von Neurofibromen mit ausgedünntem Perineurium

A und B: Verschiedene Areale eines Plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibroms mit nur noch einer durchgehend darstellbaren Lamelle aus Perineuralzellen um die Tumorzellen (Pfeile; Proben-ID: 312-3), **C und D:** Unterschiedliche Faszikel eines Neurofibroms mit fast vollständig unterbrochener Kontinuität der Perineuralzelllamellen (Pfeile; Proben-ID: 320-3).

Braun gefärbte Areale markieren EMA, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau).

In Abbildung 11 (S. 46) schienen Tumorzellen durch das lokal unterbrochene Perineurium aus dem Faszikel hinauszutreten.

In keinem der hier gefundenen Neurofibrome zeigten sich Zellkernatypien oder Anzeichen für eine deutlich erhöhte Mitoserate der Tumorzellen. Zusammenfassend wurde hiermit das Wachstumsmuster des plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibroms ohne Anhalt für eine Änderung der Zytomorphologie oder der proliferativen Aktivität demonstriert.

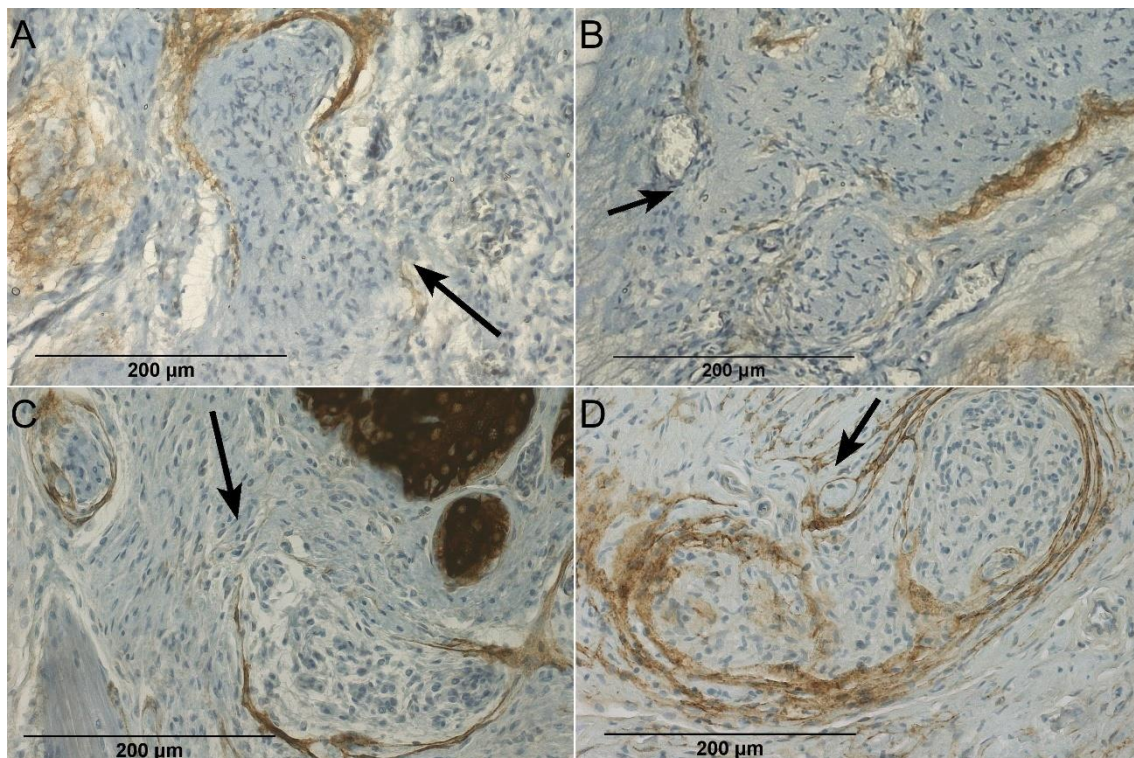


Abbildung 11: Kapselüberschreitendes Wachstum von Neurofibromen mit Durchtritt von Tumorzellen durch das Perineurium

*Verschiedene Beispiele von Plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen mit Heraustreten der Tumorzellen in das den Faszikel umgebende Gewebe (Pfeile). **A und B:** Proben-ID: 352-3; **C:** Proben-ID: 330-3; **D:** Proben-ID: 321-3. Braun gefärbte Areale markieren EMA, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau).*

4.2 Desert-Hedgehog Markierung

Untersucht wurde in dieser Studie insbesondere die DHH-Expression in PNSTs. Hierzu wurde wie im Kapitel 3.2.2 (S. 37) beschrieben eine immunhistochemische Markierung der Gewebeschnitte mit DHH durchgeführt.

Bei der Etablierung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Desert Hedgehog Protein Antikörper ließ sich in dem untersuchten Nervengewebe das beste Färbeergebnis bei einer Antikörperverdünnung von 1:75 in Kombination mit einer Vorbehandlung mit mildem Puffer (CC1 mit einer Einwirkzeit von 30 min) erzielen. Die mitgeführte Positivkontrolle eines malignen Teratoms zeigte wie erwartet eine Markierung der Plasmamembran mit diffuser zytoplasmatischer Färbung.

Wie in Abbildung 12 (S. 47) sichtbar, zeigte sich in den primär getesteten peripheren Nervenbündeln insbesondere eine perinukleäre DHH-Anfärbung der Zellen. Eine DHH-Anfärbung von Zellen zeigte sich sowohl im Nervenfaszikel als auch im Perineurium und im umgebenden Epineurium.

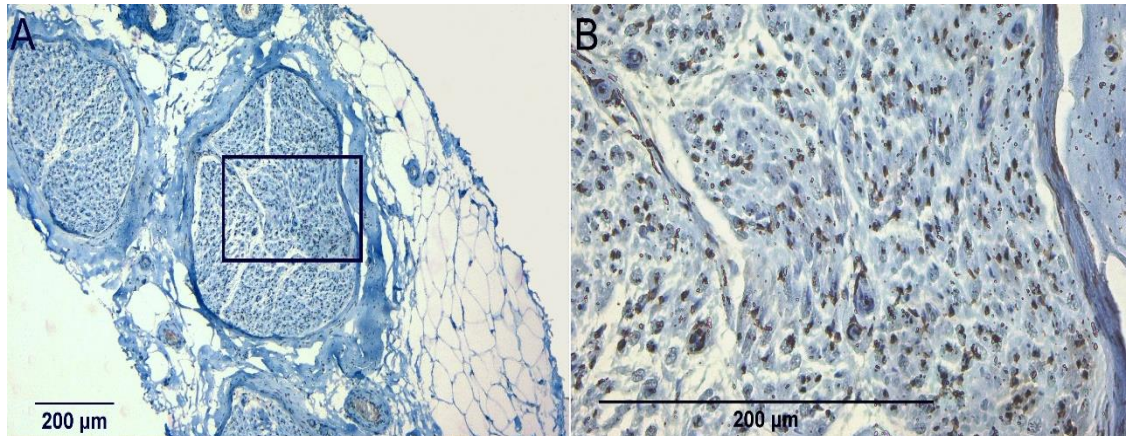


Abbildung 12: Immunhistochemische DHH-Markierung eines peripheren Nervenbündels

Biopsie eines Nervus suralis (Proben-ID: 700-0). Es zeigt sich sowohl im Nervenfaszikel als auch im Perineurium und im umgebenden Epineurium eine perinukleäre DHH-Anfärbung der Zellen. A: 5fache Vergrößerung; B: 20fache Vergrößerung des markierten Ausschnittes.

Braun gefärbte Areale zeigen das Vorliegen von DHH, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau).

Auch in den Gewebeschnitten aus den in Kapitel 3.1.1 (S. 30) genannten Tumorgruppen der Neurofibrome zeigte sich, wie in Abbildung 13 (S. 48) exemplarisch sichtbar, in allen Proben eine perinukleäre Anfärbung der Zellen. Bei 9 der 17 Proben aus der Gruppe der MPNSTs zeigte sich keine Anfärbung der Zellen mit Anti-DHH, obwohl die mitgeführte Positivkontrolle (peripherer Nerv) wie erwartet positiv ausfiel.

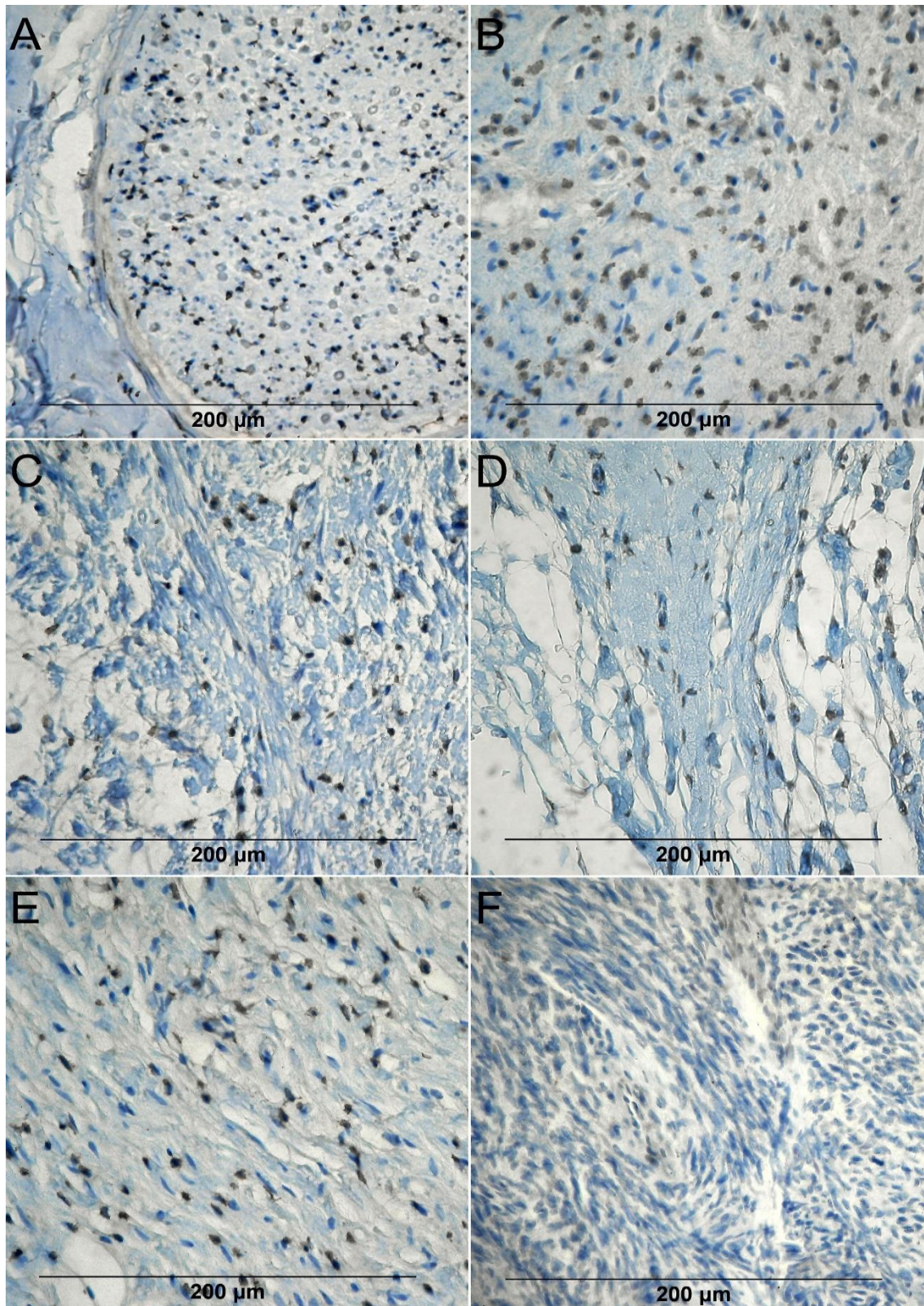


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung mit DHH von Gewebeschnitten der verschiedenen Tumorgruppen.

A: Nerv (Proben-ID: 710-0); **B:** Dermales Neurofibrom (Proben-ID: 040-1); **C:** Plexiform-intraneurales Neurofibrom (Proben-ID: 191-2); **D:** Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom (Proben-ID: 353-3); **E:** Plexiform-diffuses Neurofibrom (Proben-ID: 390-4); **F:** MPNST (Proben-ID: 600-5). Braun gefärbte Areale zeigen das Vorliegen von DHH, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau).

4.2.1 Semiquantitative DHH-Auswertung

In den verschiedenen Schnitten konnte wie in Abbildung 14 (S. 49) sichtbar eine unterschiedliche Intensität der Anti-DHH-Färbung gezeigt werden.

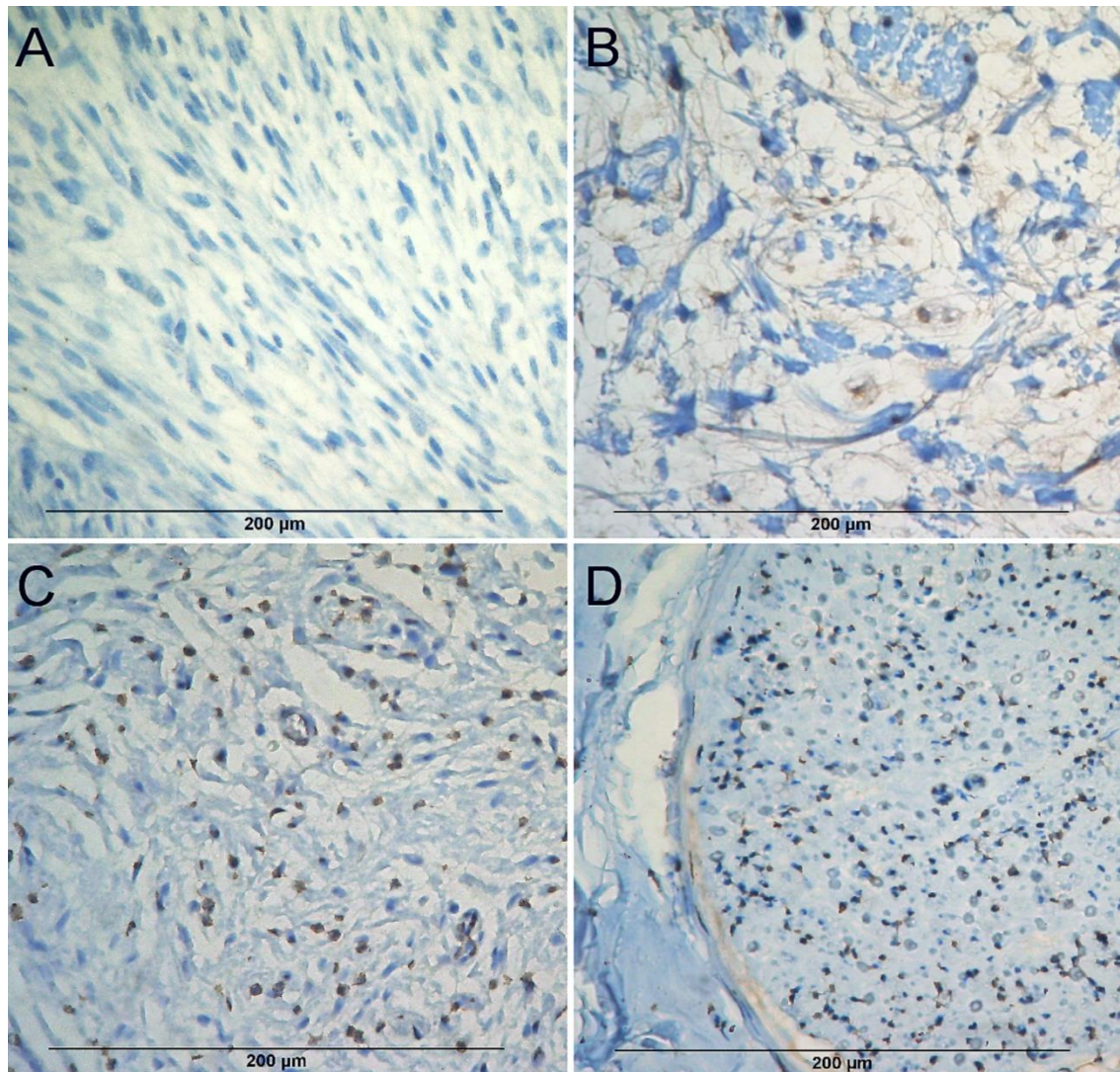


Abbildung 14: Darstellung der unterschiedlichen Färbeintensitäten der DHH-Markierung

A: Probe eines MPNST (Proben-ID: 640-5) ohne DHH-Anfärbung (Stärke 0). **B:** Probe eines Plexiform-intraneuralen Neurofibroms (Proben-ID: 191-2) mit schwach angefärbten Zellen (Stärke 1). **C:** Probe eines Dermalen Neurofibroms (Proben-ID: 130-1) mit mittelstark angefärbten Zellen (Stärke 2). **D:** Probe eines Nervs (Proben-ID: 710-0) mit stark angefärbten Zellen innerhalb des Faszikels (Stärke 3). Braun gefärbte Areale zeigen das Vorliegen von DHH, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau).

Zur Beurteilung der Intensität der DHH-Markierung und damit dem Ausmaß der DHH-Expression in den verschiedenen Tumortypen wurden die mit DHH-Antikörper markierten Gewebeschnitte, wie in Kapitel 3.2.3 (S. 40) beschrieben, nach Färbeintensitäten beurteilt. Die Daten der Färbeintensität jedes einzelnen Falles finden sich im Anhang in Tabelle A 2 (S. 125).

Die Mediane der DHH-Intensität sind in Abbildung 15 (S. 50) dargestellt. So zeigten sich beispielsweise von den 20 untersuchten dNF die Tumorzellen in 6 der Proben schwach (Stärke 1) und in 14 Fällen mittelstark (Stärke 2) angefärbt. Hieraus ergab sich der Median der DHH-Intensität von $Mdn = 2,0$ ($1,0/2,0$). Bei den plexiform-intraneuralen und den plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen wurde zunächst ein fallbezogener Median der DHH-Intensität berechnet (vgl. Tabelle A 2, S. 125 im Anhang), woraus sich für diese Tumortypen ein Median der DHH-Intensität von $Mdn = 2,0$ ($2,0/2,0$) bzw. $Mdn = 2,0$ ($1,625/2,0$) ermitteln ließ. Der Median der DHH-Intensität für plexiform-diffuse Neurofibrome und MPNSTs wurde mit $Mdn = 2,0$ ($2,0/2,0$) bzw. $Mdn = 0,0$ ($0,0/1,0$) berechnet. Um zu untersuchen ob die verschiedenen Wachstumsmuster der plexiform-intraneuralen Neurofibrome eine unterschiedliche DHH-Expression zeigen, wurden für diese Untergruppen separat der Median der DHH-Intensitäten für intraneural-noduläre und langstreckig-plexiforme Tumore mit $Mdn = 2,0$ ($1,5/3,0$) bzw. $Mdn = 2,0$ ($1,5/3,0$) berechnet.

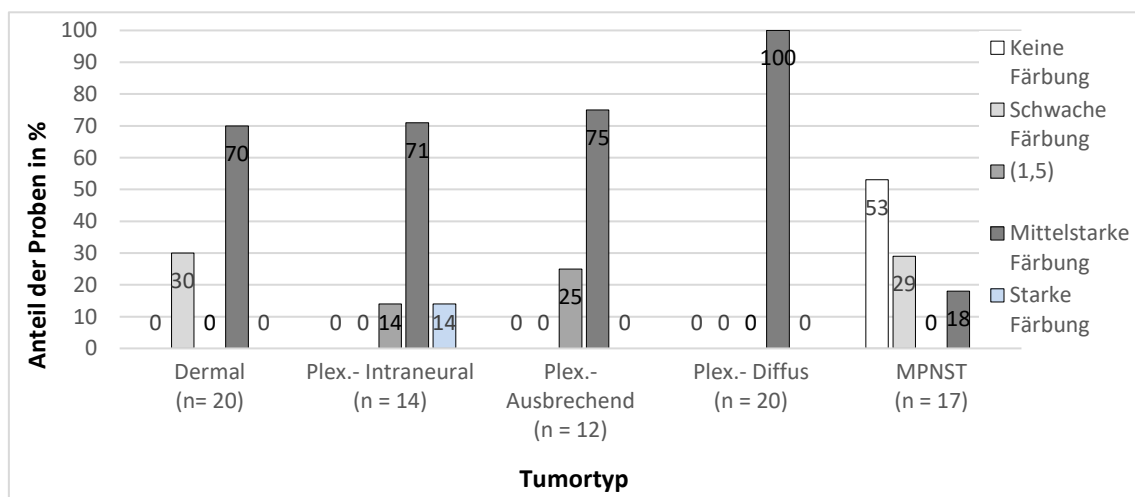


Abbildung 15: Balkendiagramm des prozentualen Anteils der verschiedenen DHH-Intensitäten je Tumortyp

Es wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen DHH-Färbeintensitäten der je Tumortyp in einem Balkendiagramm dargestellt. Da bei den plexiform-intraneuralen und den plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen bereits zuvor der fallbezogene Median der DHH-Intensität berechnet wurde, liegt hier eine Färbeintensität von 1,5 also zwischen schwach und mittelstark angefärbt vor.

Dermal = Derales Neurofibrom, Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, Plex.-Ausbrechend = Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom, Plex.-Diffus = Plexiform-diffuses Neurofibrom; Gesamtzahl der Proben $n = 83$.

Insgesamt zeigte sich für die benignen Neurofibrome der gleiche Median der Färbeintensitäten: eine überwiegend mittelstarke DHH-Intensität. Bei den dNFs, welche auch überwiegend eine mittelstarke DHH-Expression zeigten, lag dabei - anders als bei den pNFs - in 30 % der Fälle eine schwache Färbeintensität vor. Die MPNSTs zeigten mit einem Median von 0 eine deutlich geringere DHH-Intensität. Bei den nodulär-intraneuralen und den langstreckig-plexiformen Tumoren zeigten sich keine Unterschiede im Median der DHH-Intensitäten.

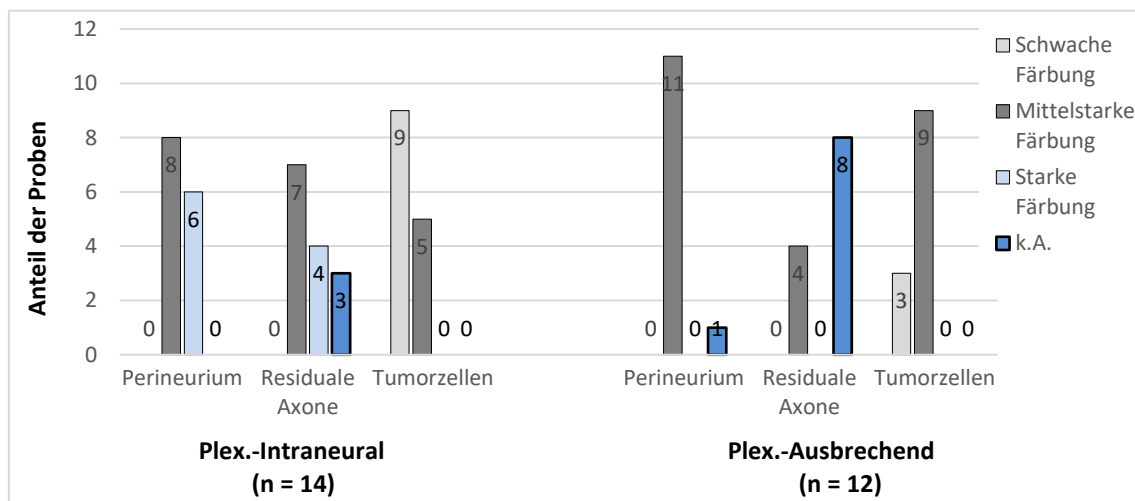


Abbildung 16: Balkendiagramm der DHH-Intensitäten einzelner Areale in plexiform-intraneuralen und plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen

Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, *Plex.-Ausbrechend* = Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom. Gesamtzahl der Proben $n = 26$.

Bei Betrachtung der einzelnen Areale (Perineurium, residuale Axone, Tumorzellen) innerhalb der plexiform-intraneuralen und der plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibrome (s. Abbildung 16, S. 51) zeigte das Tumorgewebe bei den plexiform-intraneuralen Neurofibromen häufiger eine schwache Färbeintensität, wogegen die plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibrome häufiger eine mittlere Färbeintensität zeigten. Das Perineurium wies bei den plexiform-intraneuralen Neurofibromen teils eine starke Färbeintensität auf, während bei den plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen durchweg eine mittlere Färbeintensität vorlag. Da in den plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen häufig keine residualen Axone darstellbar waren, ließ sich über dieses Areal keine Aussage treffen.

4.2.2 Quantitative DHH-Auswertung:

Um in den verschiedenen Tumortypen den Anteil der Tumorzellen zu erfassen, welche DHH exprimieren, wurden, wie in Kapitel 3.2.3 (S. 40) beschrieben, die Zahl der DHH positiven Tumorzellen und die Gesamt-Tumorzellzahl ermittelt. Eine Darstellung von der Auszählung positiver Tumorzellen im Vergleich zur Gesamt Tumorzellzahl ist in Abbildung 17 (S. 52) sichtbar.

Die vollständige Tabelle mit den Daten der quantitativen Auszählung ist im Anhang in Tabelle A 2 (S. 125) dargestellt.

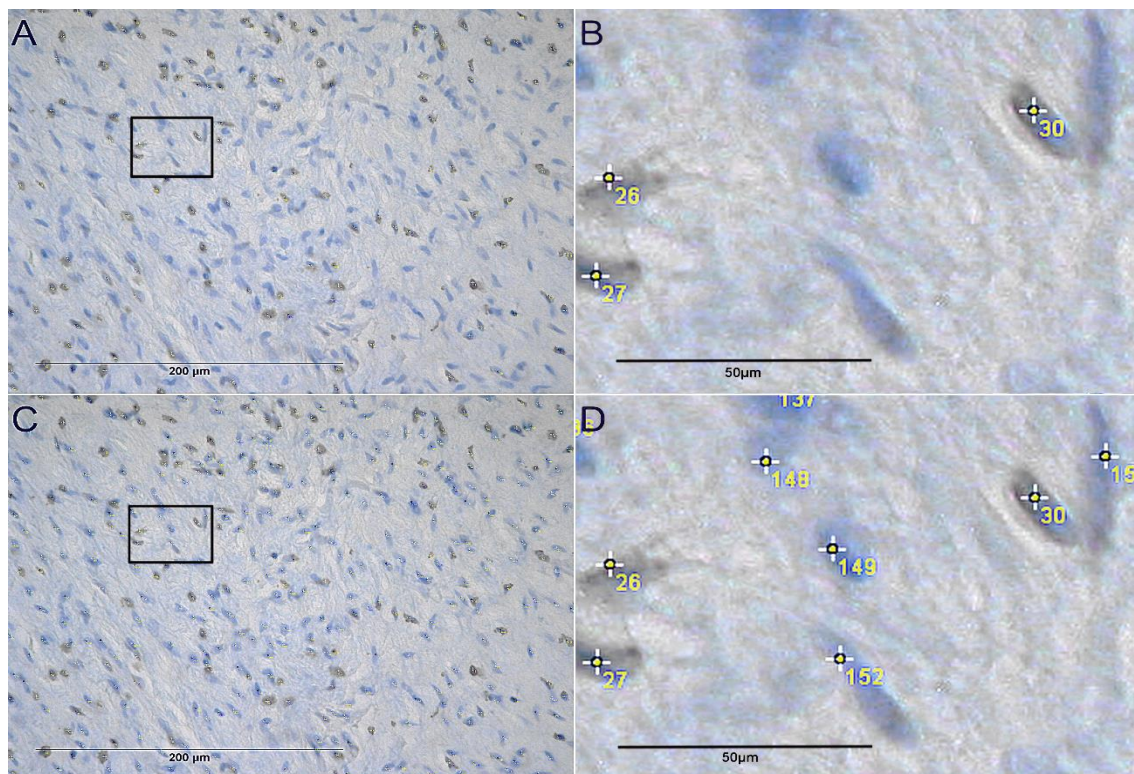


Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der Auszählung DHH-positiver Tumorzellen

In **A-D** ist die Probe eines plexiform-diffusen Neurofibroms (Proben-ID: 380-4) dargestellt. **A:** Teil eines $360 \times 270 \mu\text{m}^2$ großen Ausschnittes der Gewebeprobe mit Auszählung der DHH-positiven Tumorzellen; **B:** vergrößertes Areal des in Bild A mittels Rahmen markierten Bereiches, deutlich sichtbar werden hier die mit kleinen gelben Kreuzen markierten und fortlaufend nummerierten DHH-positiven Tumorzellen. **C:** Gleicher $360 \times 270 \mu\text{m}^2$ großer Ausschnitt, hier mit Auszählung der Gesamttumorzellzahl; **D:** Vergrößerungen des gleichen Areals (in Bild C mittels Rahmen markierter Bereich). Hier sind sowohl DHH-positive als auch negative Zellen markiert. Braun gefärbte Areale zeigen das Vorliegen von DHH, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau).

Nun wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS der prozentuale Anteil DHH-positiver Tumorzellen an der Gesamttumorzellzahl für jeden Fall errechnet (vgl. Tabelle A 2, S. 125 im Anhang) und im nächsten Schritt für jeden Tumortyp ein Mittelwert der DHH-positiven Zellen bestimmt. Diese Mittelwerte sind

tabellarisch in Tabelle 10 (S. 53) und graphisch in Abbildung 18 (S. 53) dargestellt.

Tabelle 10: Durchschnittlicher Anteil DHH-positiver Tumorzellen nach Tumortyp

Dargestellt sind die mit Hilfe von SPSS erhobenen Mittelwerte des prozentualen Anteils DHH-positiver Tumorzellen an der Gesamtumorzellzahl für jeden Tumortyp (Mittelwert, M) mit Angabe der Standardabweichung (SD) und dem Standardfehler des Mittelwertes (Std.-Fehler von M). n = Anzahl der Datensätze in jeder Gruppe. Dermal = dNF, Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, Plex.-Ausbrechend = Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom, Plex.-Diffus = Plexiform-diffuses Neurofibrom; Gesamtzahl der Proben n = 83.

	Tumortyp	n	Mittelwert (M)	SD	Std.-Fehler von M
Anteil DHH-positiver Zellen	Dermal	20	51,22 %	9,14 %	2,04 %
	Plex.-Intraneural	14	37,28 %	11,65 %	3,11 %
	Plex.-Ausbrechend	12	45,49 %	10,70 %	3,09 %
	Plex.-Diffus	20	41,19 %	11,36 %	2,54 %
	MPNST	17	9,63 %	12,37 %	3,00 %

Es zeigte sich, dass der durchschnittliche Anteil DHH-positiver Tumorzellen in der Gruppe der dNFs am höchsten war (M = 51,22 %, SD = 9,14 %). Die drei pNF-Gruppen unterschieden sich geringgradig voneinander (s. Tabelle 10, S. 53). Am wenigsten DHH-positive Tumorzellen zeigten die MPNSTs (M = 9,63 %, SD = 12,37%).

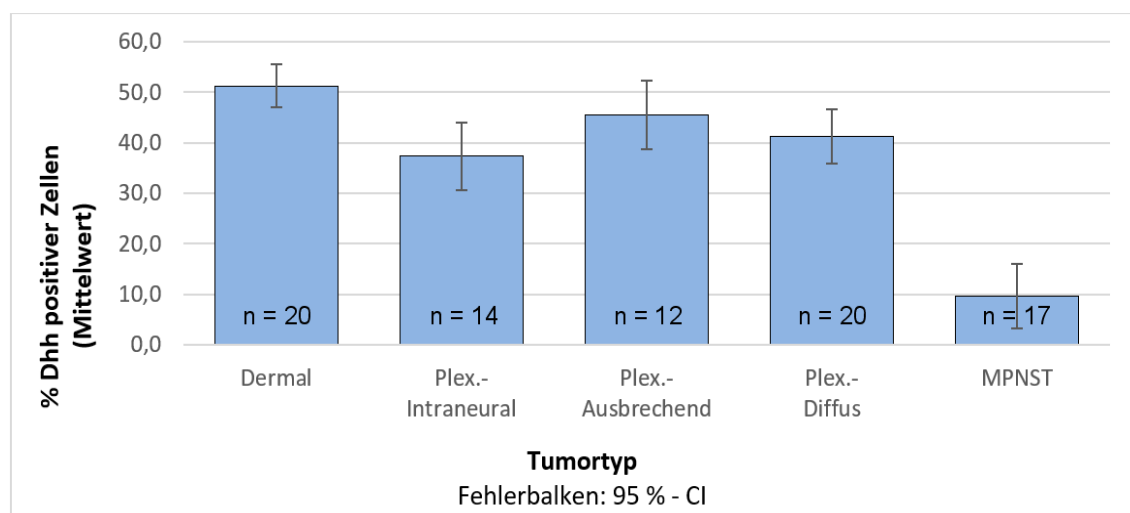


Abbildung 18: Durchschnittlicher Anteil DHH-positiver Tumorzellen nach Tumortyp

Darstellung in einem Balkendiagramm mit 95%-CI. Dermal = dNF, Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, Plex.-Ausbrechend = Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom, Plex.-Diffus = Plexiform-diffuses Neurofibrom; Gesamtzahl der Proben n = 83.

Statistische Auswertung

Mit SPSS (s. Kapitel 3.2.4, S. 41) wurde im Folgenden überprüft, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied im Anteil der DHH-positiven Zellen in den verschiedenen Tumortypen gab und welche der erhobenen Parameter sonst möglicherweise einen Einfluss auf den prozentualen Anteil DHH-positiver Tumorzellen hatten.

Hierzu wurde auch für die quantitative DHH-Auswertung ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell berechnet. Auf Grund fehlender Werte für die Lokalisation wurden bei dieser Analyse 8 Datensätze ausgeschlossen, es ergibt sich eine Grundgesamtheit von $n = 75$.

In Tabelle 11 (S. 54) ist die Berechnung der F-Tests für das Gesamtmodell und die einzelnen Modelleffekte dargestellt. Hier wurde deutlich, dass sich die durchschnittliche DHH-Expression (gemessen an dem prozentualen Anteil DHH-positiver Tumorzellen) statistisch signifikant für die verschiedenen Tumortypen unterschied, $F(4; 66) = 32,68$; $p < 0,001$. Zudem zeigt das Patientengeschlecht hier zunächst einen signifikanten Zusammenhang mit der DHH-Expression, $F(1; 66) = 6,10$; $p = 0,016$. Im Gegensatz zeigten weder das Patientenalter noch die Tumorlokalisierung einen signifikanten Einfluss auf den Anteil der DHH-positiven Tumorzellen.

Tabelle 11: Im Rahmen der statistischen Auswertung des Anteils DHH-positiver Tumorzellen mit SPSS abgebildete Tabelle der Festen Effekte
Dargestellt werden hier die F-Tests für das Gesamtmodell und die einzelnen Modelleffekte, welche im verallgemeinerten linearen gemischten Modell berechnet wurden. F: F-Test; df1/df2: Parameter die die Grenze der Signifikanz beeinflussen; Signifikanz: dargestellt als p-Wert.

Quelle	F	df1	df2	Signifikanz
Korrigiertes Modell	17,77	8	66	0,000
Tumortyp	32,68	4	66	0,000
Alter	0,07	1	66	0,798
Geschlecht	6,10	1	66	0,016
Tumorlokalisierung	0,29	2	66	0,748

Wahrscheinlichkeitsverteilung: Normal
a. Ziel: Anteil DHH-positiver Zellen

Im Folgenden wurden die einzelnen Tumortypen miteinander verglichen und die ‚Paarweisen Kontraste‘ wie in Tabelle 12 (S. 55) sichtbar ausgegeben.

Tabelle 12: Paarweise Kontraste im verallgemeinert linearen gemischten Modell für den Gehalt an DHH-positiven Zellen in verschiedenen NF1-assoziierten Tumor(sub)typen

Kontrastschätzer: Differenz zwischen den verglichenen Gruppen; Std.-Fehler: Standardfehler des Kontrastschätzers; Korr. Sig.: Der angepasste p-Wert, der angibt ob der Kontrast signifikant ist; 95 %-CI: 95 %-Konfidenzintervall. Dermal = Dermales Neurofibrom, Plex.-Intraneural = Plexiform-intraneurales Neurofibrom, Plex.-Ausbrechend = Plexiform-kapselüberschreitendes Neurofibrom, Plex.-Diffus = Plexiform-diffuses Neurofibrom

Tumortyp	Kontrast-schätzer	Std.-Fehler	Korr. Sig.	95 %-CI	
				Unterer Wert	Oberer Wert
Dermal – Plex.-Intraneural	16,96	4,83	0,001	7,32	26,60
Dermal – Plex.-Ausbrechend	7,09	5,35	0,189	-3,58	17,77
Dermal – Plex.-Diffus	12,70	3,99	0,002	4,74	20,65
Dermal – MPNST	43,72	4,06	0,000	35,60	51,83
Plex.-Intraneural – Plex.-Ausbrechend	-9,87	5,23	0,063	-20,30	0,57
Plex.-Intraneural – Plex.-Diffus	-4,26	4,24	0,319	-12,73	4,21
Plex.-Intraneural – MPNST	26,76	4,76	0,000	17,26	36,26
Plex.-Ausbrechend – Plex.-Diffus	5,60	4,87	0,254	-4,13	15,33
Plex.-Ausbrechend – MPNST	36,62	5,17	0,000	26,30	46,95
Plex.-Diffus - MPNST	31,02	4,00	0,000	23,03	39,01

Das anhand der geringsten signifikanten Differenz angepasste Signifikanzniveau ist 0,05.

Der mittlere Unterschied des prozentualen Anteils DHH-positiver Tumorzellen zwischen allen Gruppen der benignen Neurofibrome (dermale, plexiform-intraneurale-, plexiform-kapselüberschreitende- und plexiform-diffuse Neurofibrome) und der Gruppe der MPNSTs zeigte sich signifikant ($p < 0,001$), wobei die benignen Tumore eine stärkere DHH-Expression (gemessen an dem prozentualen Anteil DHH-positiver Tumorzellen) als die MPNSTs zeigten. Im Detail lag der größte mittlere Unterschied beim Vergleich von dNFs und MPNSTs von 43,72 % (95%-CI [35,60 %; 51,83 %]) vor, bei plexiform-intraneuralen Neurofibromen und MPNSTs wurde ein mittlerer Unterschied von 26,76 % (95 %-CI [17,26 %; 36,26 %]) ermittelt, plexiform-kapselüberschreitende Neurofibrome und MPNSTs wiesen einen mittleren Unterschied von 36,62 % (95 %-CI [26,30 %; 46,95 %]) auf und plexiform-diffuse Neurofibrome und MPNSTs zeigten einen mittleren Unterschied von 31,02 % (95%-CI [23,03 %; 39,01 %]).

Es gab zudem einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,001$) zwischen den dNFs und den plexiform-intraneuralen Neurofibromen (16,96 %, 95 %-CI [7,32 %, 26,60 %]), sowie einen signifikanten Unterschied ($p = 0,002$) zwischen den dNFs und den plexiform-diffusen Neurofibromen (12,70 %, 95 %-CI [4,74 %, 20,65 %]). Es zeigte sich also eine signifikant höhere DHH-Expression in den dNFs im Vergleich zu plexiform-intraneuralen und plexiform-diffusen Neurofibromen.

In den drei Gruppen der plexiformen Neurofibrome zeigten sich untereinander keine signifikanten Unterschiede.

Zusätzlich wurde überprüft, ob es in der Gruppe der plexiform-intraneuralen Neurofibrome einen Zusammenhang zwischen der Form ihrer Ausbreitung innerhalb des Nervs und der DHH-Expression gab. Hierzu wurde das intraneural-noduläre und das plexiform-langstreckige Wachstum mittels T-Test für die Mittelwerte des prozentualen Anteils DHH-positiver Tumorzellen verglichen (s. Abbildung 19, S. 56).

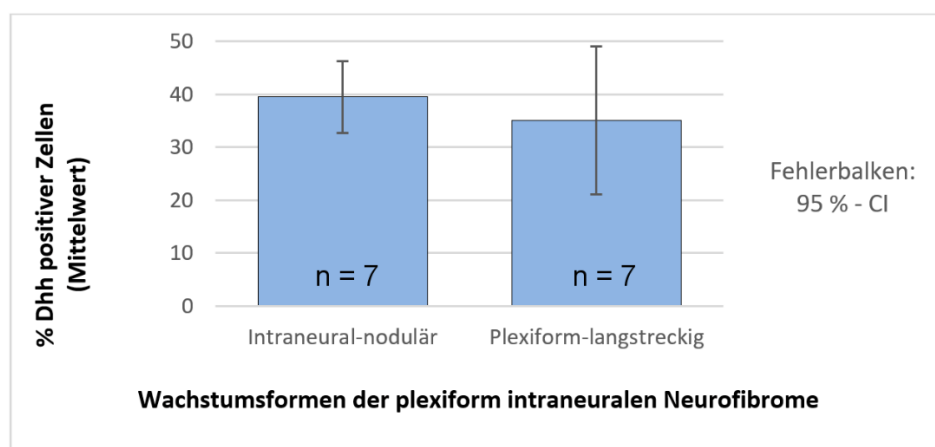


Abbildung 19: Prozentualer Anteil DHH-positiver Tumorzellen nach den Wachstumsmustern plexiform-intraneuraler Neurofibrome

Darstellung in einem Balkendiagramm mit 95%-CI. Gesamtzahl der untersuchten Proben $n = 14$.

Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($T(12) = 0,687$; $p = 0,505$) in der DHH-Intensität dieser beiden Wachstumsmuster.

4.3 Doppelmarkierungen

Da für die bisherigen Auswertungen der DHH-Färbung lediglich eine morphologische Differenzierung der verschiedenen Zellarten erfolgt war, wurden beispielhaft für die einzelnen Tumortypen Doppelmarkierungen von DHH und den in Kapitel 1.2.1 (S. 23) beschriebenen Antigenen angefertigt. Hiermit wurde überprüft, ob DHH ausschließlich von den Tumorzellen, oder auch von anderen in Neurofibromen enthaltenen Zellen exprimiert wird.

Zur besseren Übersicht werden hier für jede durchgeführte Doppelmarkierung die dokumentierten Gewebeausschnitte von je zwei verschiedenen doppelmarkierten Tumortypen dargestellt. Zwischen den einzelnen Tumortypen gab es keine wesentlichen Unterschiede in den Ergebnissen der Doppelmarkierungen. Wenn eine Koexpression vorlag, zeigte sie sich in allen doppelmarkierten Proben der verschiedenen Tumortypen, wenn sich keine Koexpression zeigte, konnte sie in keiner der doppelmarkierten Proben nachgewiesen werden.

DHH – S100

Die Ergebnisse der Doppelmarkierung von DHH und S100 zur Darstellung von Schwannzellen und den Schwannzell-artigen Tumorzellen sind in Abbildung 20 (S. 57) dargestellt.

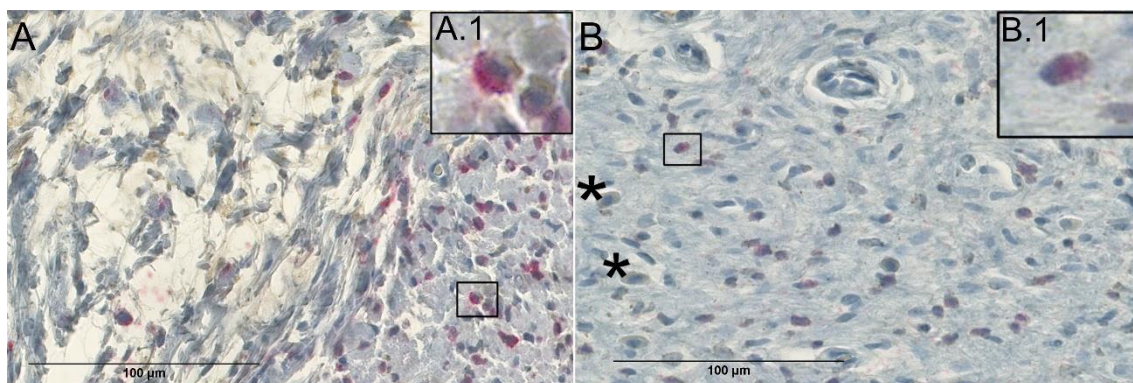


Abbildung 20: Doppelmarkierungen DHH - S100

DHH-Markierung: braun, S100-Markierung: rot, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). A: Probe eines plexiform-intraneuralen Neurofibroms (Proben-ID: 270-2), im linken Anteil der Probe aufgelockertes Tumorgewebe, rechts Anteile residualer Axone. A.1: Insert von A, sichtbar ist hier eine doppelmarkierte Tumor-Schwann-Zelle. B: Probe eines dermalen Neurofibroms (Proben-ID: 020-1). B.1: Insert von B, sichtbar eine doppelmarkierte Tumorzelle. Mit Sternchen () beispielhaft gekennzeichnet: DHH-positive Mastzellen (morphologisch identifiziert).*

Es wurde eine Koexpression von DHH und S100 (s. Ausschnitt B.1 in Abbildung 20, S. 57) in einer Vielzahl der Zellen deutlich. Es gab jedoch auch Zellen, die weder eine DHH- noch eine S100-Markierung aufwiesen (fraglich Fibroblasten), andere zeigten nur eine der beiden Markierungen. Auch in residualen Axonen des plexiform-intraneuralen Neurofibroms zeigte sich eine Doppelmarkierung einiger Schwannzellen (s. Ausschnitt A.1 in Abbildung 20, S. 57).

DHH - EMA

In Abbildung 21 (S. 58) sichtbar sind mit DHH und EMA doppelmarkierte Proben eines plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibroms (B) und zum Vergleich eines peripheren Nerven (A). Sowohl im gesunden Nerven als auch im pNF zeigten sich die Perineuralzellen doppelmarkiert.

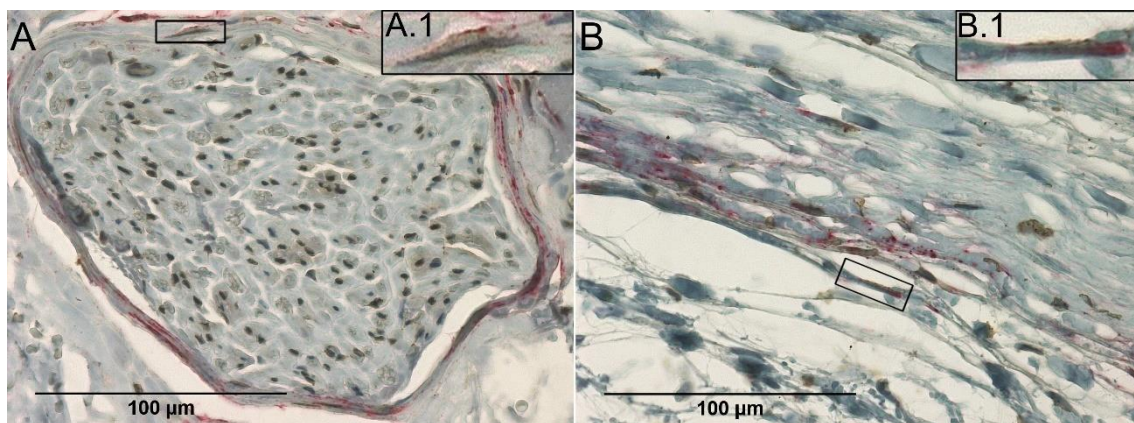


Abbildung 21: Doppelmarkierungen DHH - EMA

DHH-Markierung: braun, EMA-Markierung: rot, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau).
A: Probe eines peripheren Nerven (Proben-ID: 700-0). **A.1:** Insert von A, sichtbar ist hier eine doppelmarkierte Perineuralzelle. **B:** Probe eines plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibroms (Proben-ID: 310-3); im linken-unteren Anteil ist aufgelockertes Tumorgewebe sichtbar, durch das Perineurium getrennt vom Epineurium, sichtbar im rechten-oberen Bildausschnitt. **B.1:** Insert von B, sichtbar eine doppelmarkierte Perineuralzelle.

DHH – CD90/Thy1

Die Ergebnisse der Doppelmarkierung von DHH und CD90/Thy1 zur Identifikation von Fibroblasten sind in Abbildung 22 (S. 59) dargestellt. Es zeigten sich keine DHH-CD90/Thy1-positiven Zellen im Tumorgewebe, lediglich in Gefäßwänden und in dem den Tumor umgebenden Epineurium zeigten sich DHH-CD90/Thy1-positive Zellen.

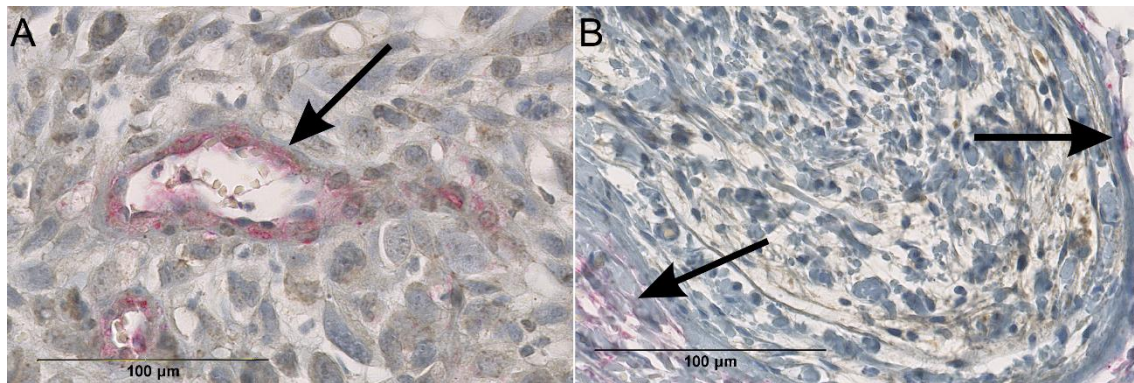


Abbildung 22: Doppelmarkierung DHH - CD90/Thy1

DHH-Markierung: braun, CD90/Thy1-Markierung: rot, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). **A:** Probe eines MPNST (Proben-ID: 530-5), zentral dargestellt ist hier ein Gefäß mit CD90/Thy1-positiven Zellen in der Gefäßwand (Pfeil). **B:** Probe eines plexiform-intraneuralen Neurofibroms (Proben-ID: 270-2); gezeigt ist eine rote CD90/Thy1-Markierung außerhalb des Perineuriums im Epineurium (Pfeile).

DHH - Tryptase

Durch eine Korrelation von morphologischen Kriterien (vgl. Abbildung 20, S. 57) und Auswertung der DHH und Tryptase doppelmarkierten Gewebeschnitte, zeigte sich wie in Abbildung 23 (S. 59) sichtbar eine Koexpression von DHH und Tryptase in Mastzellen.

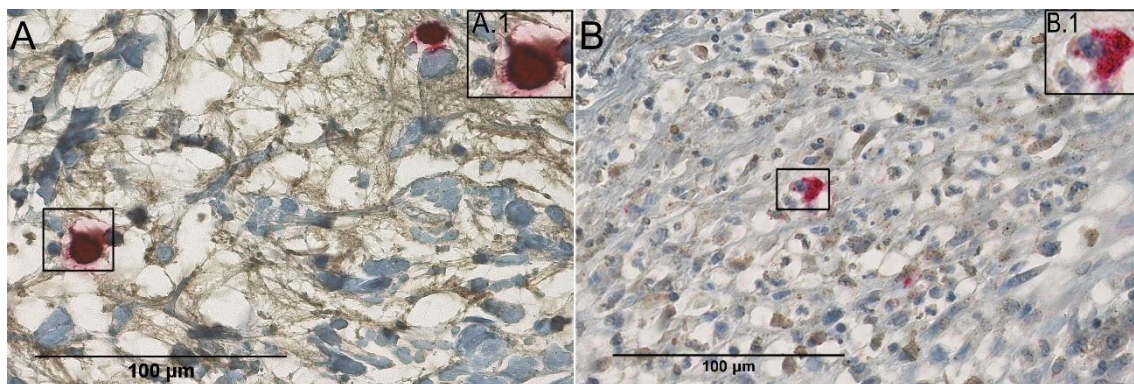


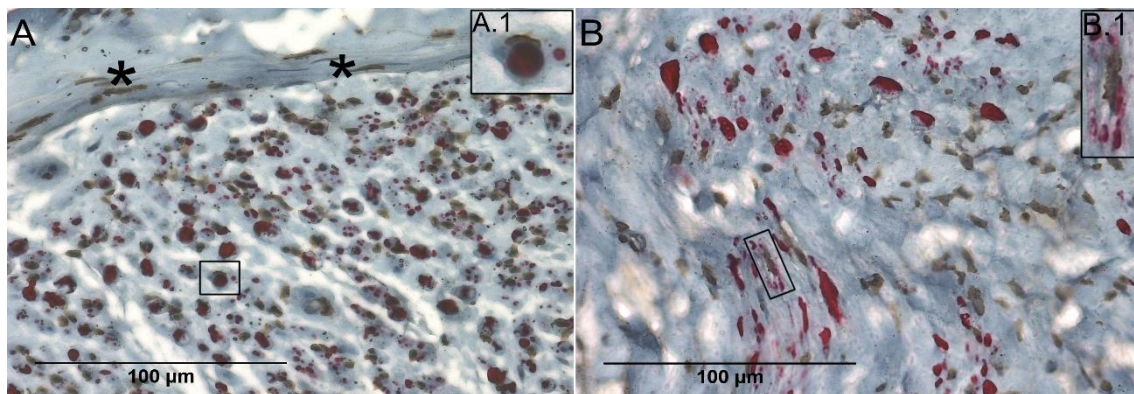
Abbildung 23: Doppelmarkierung DHH - Tryptase

DHH-Markierung: braun, Tryptase-Markierung: rot, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). **A:** Probe eines plexiform-intraneuralen Neurofibroms (Proben-ID: 190-2). **A.1:** Insert von A, sichtbar ist hier eine Doppelmarkierung mit deutlicher Tryptase-Markierung und bräunlich-körniger DHH-Markierung. **B:** Probe eines MPNST (Proben-ID: 530-5). **B.1:** Insert von B, ebenfalls doppelmarkierte Mastzelle sichtbar.

Die höchste Mastzellendichte zeigte sich in dem dermalen Neurofibrom, gefolgt vom plexiform-diffusen Neurofibrom. Die geringste Anzahl pro Fläche zeigte sich im MPNST.

DHH - NF

In einigen pNFs zeigten sich residuale Axone. Die Doppelmarkierungen von NF zur Darstellung von Axonen und DHH sind in Abbildung 24 (S. 60) exemplarisch an einem peripheren Nerven und einem plexiform-intraneuralen Neurofibrom dargestellt. Einige der rot-markierten Axone lagen in enger Nachbarschaft zu einer DHH-positiven Zelle (s. A.1 und B.1 von Abbildung 24, S. 60), während andere DHH-positive Zellen ohne sichtbaren Axon-Kontakt vorlagen. Es zeigte sich in keiner der Proben eine Doppelmarkierung der residualen Axone.

**Abbildung 24: Doppelmarkierung DHH - NF**

DHH-Markierung: braun, NF-Markierung: rot, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). A: Probe eines peripheren Nerven (Proben-ID: 700-0). A.1: Insert von A, sichtbar ist hier ein NF-markiertes Axon mit anliegender DHH-markierter myelinisierender Schwannzelle (morphologisch identifiziert). Mit Sternchen () beispielhaft gekennzeichnet: DHH-positive Perineuralzellen (morphologisch identifiziert). B: Probe eines plexiform-intraneuralen Neurofibroms (Proben-ID: 192-2). B.1: Insert von B, sichtbar ist hier eine neben dem NF-markierten Axon liegende DHH-markierte myelinisierende Schwannzelle.*

DHH – Protein zero

Zur Unterscheidung von myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwannzellen wurde eine Doppelmarkierung mit DHH und Protein zero (MPZ) angefertigt. Wie in Abbildung 25 (S. 61) sichtbar waren die hier im Querschnitt dargestellten Myelinscheiden selbst nicht doppelmarkiert. Es zeigten sich jedoch einige Myelinscheiden, die mit einem DHH-positiven Zellanteil verbunden waren (s. A.1 und B.1 in Abbildung 25, S. 61). Viele DHH-positive Zellen zeigten keinen direkten Kontakt mit einer Myelinscheide.

Deutlich wurde in der Doppelmarkierung mit DHH/MPZ zudem im direkten Vergleich der dargestellten Proben, dass die Myelinscheiden im gesunden

Nerven (A) morphologisch dicker und gleichmäßiger wirkte als im Tumorgewebe (B).

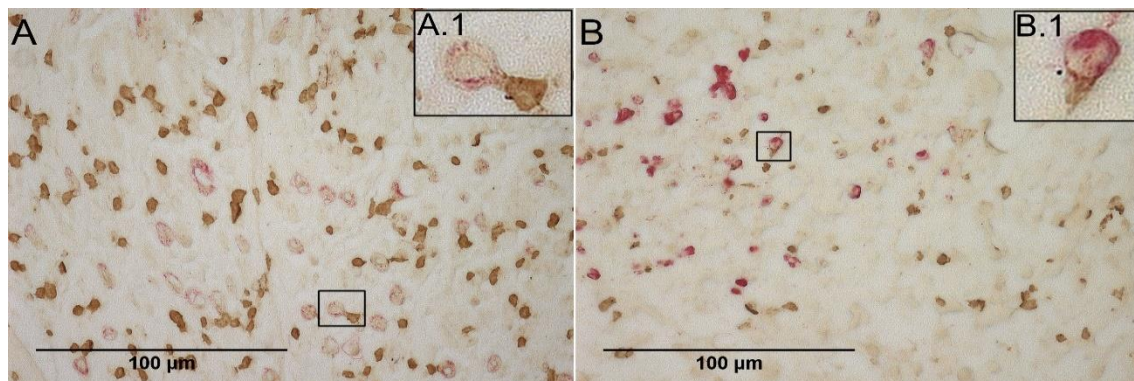


Abbildung 25: Doppelmarkierung DHH - MPZ

DHH-Markierung: braun, Protein zero: rot. A: Probe eines peripheren Nerven (Proben-ID: 700-0). A.1: Insert von A, sichtbar ist hier eine doppelmarkierte myelinisierende Schwannzelle. Das Protein-zero markiert ausschließlich die Myelinscheide und angrenzend markiert DHH am ehesten den perinukleären Bereich. Der Zellkern der Schwannzelle ist ohne Gegenfärbung nicht erkennbar. B: Probe eines plexiform-intraneuralen Neurofibroms (Proben-ID: 180-2); Gewebeausschnitt im Bereich der residualen Axone. B.1: Insert von B, sichtbar ist hier eine doppelmarkierte myelinisierende Schwannzelle mit dem von der Myelinscheide umschlossenen Axon.

Zusammenfassend zeigten sich somit anhand der Doppelmarkierungen in den PNSTs eine DHH-Färbung in Schwannzell-artigen Tumorzellen, Perineuralzellen, Mastzellen und myelinisierenden Schwannzellen. CD90/Thy1-positive Fibroblasten waren im Tumorgewebe nicht sichtbar und weder das Axon noch die Myelinscheide selbst zeigten eine DHH-Markierung.

5. Diskussion

Mit dieser Studie wurde erstmals die Bedeutung von Desert Hedgehog Protein als Differenzierungsmarker in peripheren, NF1-assoziierten Nervenscheidentumoren untersucht. Hierzu wurden intraneural wachsende plexiforme Neurofibrome mit plexiform-diffusen und dermalen Neurofibromen, sowie MPNSTs verglichen. Einen besonderen Fokus bildeten die Tumoren mit kapselüberschreitendem Wachstum, die in der Literatur bislang wenig Beachtung fanden.

Im Anschluss wurde in den beispielhaft angefertigten Doppelmarkierungen nachgewiesen, dass DHH in peripheren Nerven und Nervenscheidentumoren nicht nur in den Schwannzell-artigen Tumorzellen, sondern auch in Perineuralzellen, Mastzellen und myelinisierenden Schwannzellen nachgewiesen werden kann. Es wurde mit Hilfe der Immunhistologie verschiedene Typen peripherer Nervenscheidentumore auf ihre DHH-Expression untersucht, um zu ermitteln, ob dieses Protein einen prädiktiven oder anzeigenden Wert bezüglich der Malignisierung von plexiformen Neurofibromen hat. Außerdem wurde die DHH-Expression in den verschiedenen Tumortypen gemessen und sowohl semiquantitativ anhand der Färbeintensität in den verschiedenen Proben als auch quantitativ anhand des prozentualen Anteils DHH-positiver Tumorzellen je Probe bestimmt. In der semiquantitativen Auswertung, bei der neben den Tumorzellen auch ggf. vorhandene Zellen des Perineuriums oder der residualen Axone berücksichtigt wurden, wie auch in der quantitativen Auswertung zeigte sich eine stärkere DHH-Expression (gemessen an der DHH-Intensität bzw. am prozentualen Anteil DHH-positiver Tumorzellen) in den benignen Tumoren im Vergleich zu den MPNSTs. In der DHH-Expression der verschiedenen pNFs konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

5.1 Kapselüberschreitendes Wachstum

In der Literatur werden verschieden Neurofibrom-Subtypen unterschieden (Longo et al. 2018), doch ein kapselüberschreitendes Wachstum wurde bislang noch nicht dargestellt.

So werden neben den dNFs und den pNFs häufig auch diffus wachsende Neurofibrome als eigener Wachstumstyp betrachtet (Tonsgard 2006, Stemmer-

Rachamimov und Nielsen 2012). Einige Autoren beschreiben außerdem diffuse Neurofibrome mit Anteilen von plexiformen Neurofibromen, die plexiform-diffusen Neurofibrome (Miettinen 2016). Meist werden diese Wachstumstypen als eigene Neurofibrom-Subtypen betrachtet (Ferner und Gutmann 2002, Huson und Korf 2013, Ant6nio et al. 2013).

Es stellt sich jedoch die Frage, ob es einen Übergang von nodulären (plexiform-intraneuralen) zu plexiform-diffusen Neurofibromen gibt, oder ob es sich hier um einzelne nebeneinanderstehende Wachstumsmuster handelt. Als Übergangsform wäre das kapselüberschreitende Wachstum plexiformer Neurofibrome denkbar.

Vor dem Hintergrund der großen Anzahl vorliegender Proben im Archiv des Instituts für Neuropathologie des UKE konnte solch ein kapselüberschreitendes Wachstumsverhalten tatsächlich bei einigen pNFs beobachtet werden. In Kapitel 4.1 (S. 44) wurde mittels immunhistochemischer Markierungen beispielhaft ein Auseinanderweichen bzw. Ausdünnen der den Tumor umgebenden Lamellen aus Perineuralzellen, sowie ein Überschreiten der Hüllschicht durch die Tumorzellen gezeigt (vgl.: Abbildung 10, S. 45 und Abbildung 11, S. 46). Diese Wachstumsmuster wurden als plexiform-kapselüberschreitende Neurofibrome bezeichnet.

Mögliche Abfolge verschiedener Neurofibrom-Wachstumsmuster

Das intraneurale, das kapselüberschreitende und das diffuse Wachstum stellen somit unterschiedliche Wachstumsmuster der pNFs dar. Es erhebt sich die Frage, ob diese Wachstumsmuster einer zeitlichen Abfolge zuzuordnen sind.

Eine mögliche zeitliche Entwicklung der verschiedenen Tumortypen ist in Abbildung 26 (S. 64) dargestellt. Die Auswertung der Altersverteilung in den jeweiligen Subtypen plexiformer Neurofibrome unterstützt die These solch einer zeitlichen Abfolge der Wachstumsmuster. Wie in Kapitel 5.4.2 (S. 75) beschrieben, zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung ein Anstieg des Altersmittelwerts von plexiform-intraneuralen Neurofibromen (M: 21,2 Jahre) über plexiform-kapselüberschreitende Neurofibrome (M: 22,5 Jahre) zu plexiform-diffusen Neurofibromen (M: 32,6 Jahre).

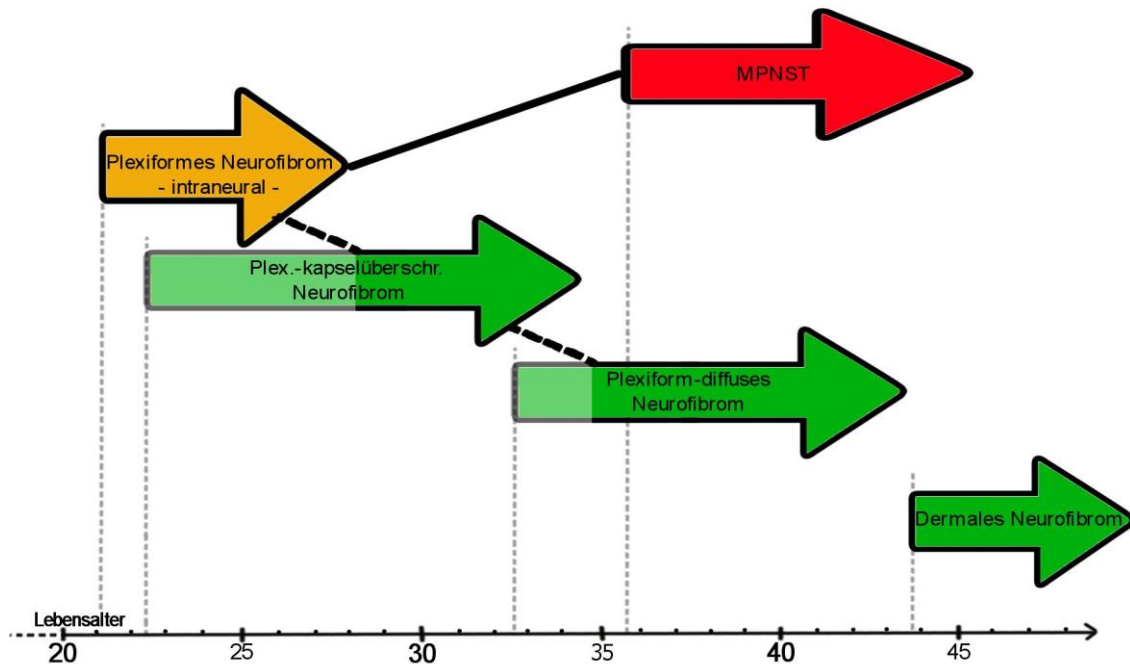


Abbildung 26: Mögliche zeitliche Abfolge der Wachstumsmuster peripherer Nervenscheidentumore bei NF1

Dargestellt sind die in dieser Studie untersuchten Wachstumsmuster peripherer Nervenscheidentumore in ihrer möglichen zeitlichen Abfolge.

Generell werden dermale und plexiforme Neurofibrome unterschieden. Bekannt ist zudem, dass MPNSTs bei NF1-Patienten in der Regel aus vorbestehenden pNFs entstehen. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass es bei pNFs zudem ein kapselüberschreitendes Wachstum gibt. Diese plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibrome könnten sich im Verlauf zu plexiform-diffusen Neurofibromen weiterentwickeln.

Die gestrichelten-grauen Linien zu Beginn der Pfeile demonstrieren das mittlere Alter der verschiedenen Wachstumsmuster zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. Die Malignität der verschiedenen Tumortypen ist farbig dargestellt: grün = benigne, gelb = Risiko einer malignen Transformation, rot = maligne. Gestrichelte-schwarze Verbindungslinien = Hypothesen.

Analog ließ sich in einer Studie von L. Püschel an mehr als 500 NF1-assoziierten Tumoren eine gleichartige Altersverteilung der Tumortypen zeigen (vgl. S. 75). In dieser Studie wurden zusätzlich noch rein-diffuse Neurofibrome unterschieden, die sich entsprechend der von Ihr ermittelten Werte hinter den plexiform-diffusen Neurofibromen einordneten. Dies könnte ein Hinweis für eine weitergehende Auflösung der intraneuralen Anteile sein (Püschel 2017).

Doch sowohl in der vorliegenden Untersuchung als auch in der Studie von L. Püschel wurde das Wachstumsmuster der pNFs nur zu einem Zeitpunkt begutachtet. Eine zeitliche Abfolge konnte somit lediglich anhand verschiedener Beobachtungen postuliert werden. In Nachfolgeuntersuchungen wäre es sinnvoll

die Wachstumsmuster der pNFs prospektiv zu ermitteln oder beispielsweise mit Hilfe von Mausmodellen im zeitlichen Verlauf zu betrachten. Hierzu wäre es nötig Mausmodelle mit spezifischen Subtypen von NF1-assoziierten Tumoren zu züchten (Gutmann 2014), so wurde in der Arbeitsgruppe um Chen und Kollegen bereits ein Mausmodell speziell zur Untersuchung plexiformer Neurofibrome entwickelt (Chen et al. 2014).

Möglicher Mechanismus bei kapselüberschreitendem Wachstum

Wenn in einem Nerv ein plexiformes Neurofibrom entsteht ist der Nerv initial noch intakt und die anfangs gut definierte Läsion von Perineurium umschlossen (Miettinen 2016).

Wie in Abbildung 27 (S. 65) dargestellt, werden in der Literatur zwei Wachstumsmuster plexiformer Neurofibrome beschrieben. Das noduläre Neurofibrom, bei dem der Nerv durch den Tumor zunehmend fusiform aufgeweitet wird und das langstreckige Wachstum entlang der Nervenachse, welches meist multiple Nervenfaszikel betrifft (Carroll und Ratner 2008).

Es wäre denkbar, dass der Tumor bei nodulärem Wachstum zunehmend Druck auf das Perineurium und die durch den Tumor verlaufenden residualen Axone ausübt, sodass beide mehr und mehr degenerieren.

Es kommt zu einem kapselüberschreitenden und nachfolgend diffusen Wachstum. Beim Wachstum entlang der Längsachse des Nervens bleiben die residualen Axone und das Perineurium hingegen lange erhalten.

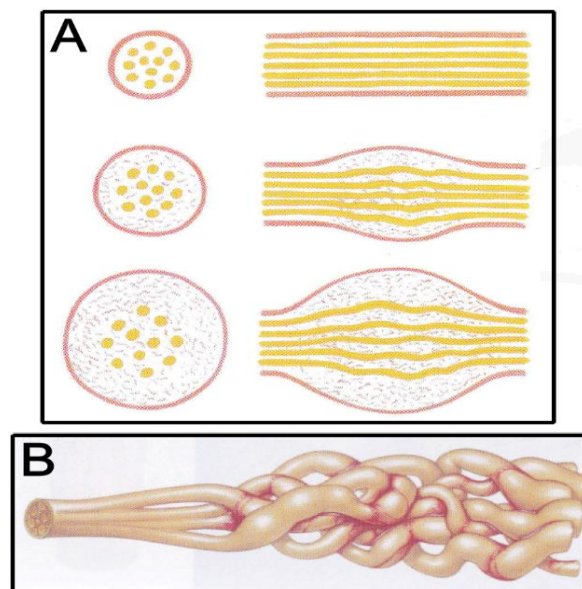


Abbildung 27: Noduläres vs. langstreckiges Wachstum plexiformer Neurofibrome

A: Entwicklungsschritte eines nodulären Neurofibroms mit zunehmend fusiformer Aufweitung des Nervens. B: multiple Nervenfaszikel netzartig aufgetrieben. Geändert nach: Antonescu und Kollegen, S. 218 & S. 227 (Antonescu et al. 2013b).

Invasives Wachstum - eine Eigenschaft plexiformer Neurofibrome

Ein kapselüberschreitendes und invasives Wachstumsverhalten stellt bei vielen Tumoren ein Zeichen der Dedifferenzierung bzw. der Malignisierung dar. Es zeigt sich beispielsweise bei Prostatakarzinomen (Cheng et al. 2012) oder differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (Aiken 2012).

Doch es gibt auch benigne Tumore, die ein invasives Wachstum ohne Anhalt für eine maligne Veränderung zeigen. Hierzu zählen zum Beispiel die invasiven Hypophysenadenome, die gutartig sind, teils jedoch in die Dura mater, die Keilbeinhöhle, den Knochen oder die Nasenschleimhaut einwachsen (Sav et al. 2015). Klinisch zeigen diese Tumore trotz ihres aggressiven Wachstums keine Metastasierung und ein signifikant besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu malignen Hypophysenkarzinomen (Hansen et al. 2014).

Wie oben beschrieben, konnte in der vorliegenden Untersuchung (vgl. Kapitel 4.1, S. 44) ein kapselüberschreitendes Wachstum plexiformer Neurofibrome gezeigt werden. Dabei lagen bei den untersuchten Tumoren keine Anzeichen einer malignen Veränderung (bspw. Zellkernatypien oder eine erhöhte Mitoserate) vor. In der Literatur wird auch ein invasives Wachstum benigner plexiform-diffuser Neurofibrome in Fettgewebe, Muskeln usw. beschrieben (Mautner et al. 2006).

Das kapselüberschreitende Wachstum bei plexiformen Neurofibromen ist somit ähnlich wie beim invasiven Hypophysenadenom eine Eigenschaft des invasiven Wachstums und kann nicht wie bei anderen Tumoren als Zeichen einer Dedifferenzierung gewertet werden.

5.2 DHH-Expression in peripheren Nervenscheidentumoren

Bisher liegen nur wenige Studien vor, die eine DHH-Expression in peripheren Nerven oder Nervenscheidentumoren untersucht haben. Eine DHH-Expression wurde durch verschiedene Methoden (mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) in Mäusen oder Immunfluoreszenz(IF)-Doppelmarkierungen an Nerven) bislang insbesondere in Schwannzellen gezeigt (Bitgood und McMahon 1995, Bajestan et al. 2006). In anderen ISH-Untersuchungen wurde die Expression von DHH auf myelinisierende Schwannzellen begrenzt (Parmantier et al. 1999, Sharghi-

Namini et al. 2006). Durch Endo und Kollegen wurde zudem in einer RT-PCR Studie an einer MPNST-Zelllinie, eine ektopische DHH-Expression in MPNST Tumorzellen gezeigt (Endo et al. 2002b).

Um die DHH-Expression in PNSTs verschiedenen Zellarten im Tumor zuzuordnen, wurde in der vorliegenden Untersuchung mit Hilfe beispielhaft angefertigter immunhistochemischer Doppelmarkierungen eine mögliche Koexpression von DHH und den in Kapitel 1.2.1 (S. 23) beschriebenen Antigenen zur Detektion verschiedener Zellarten im peripheren Nerven, Neurofibrom oder MPNST untersucht.

DHH-Expression in myelinisierenden Schwannzellen

In der vorliegenden Untersuchung konnte wie auch in den oben genannten Studien (Parmantier et al. 1999, Sharghi-Namini et al. 2006) eine DHH Expression in myelinisierenden Schwannzellen dargestellt werden (vgl. Kapitel 4.3, S. 57). Hierbei zeigten die in Abbildung 25 (S. 61) im Querschnitt dargestellten Myelinscheiden keine direkte Doppelmarkierung.

Dies erklärt sich dadurch, dass wie in Abbildung 28 (S. 67) sichtbar bei einer myelinisierenden Schwannzelle der von Zytoplasma umgebene Zellkern neben der Myelinscheide liegt. Die Myelinscheide selbst besteht aus mehreren Zellmembranschichten der Schwannzelle, ohne Einschluss von Zytoplasma (Lemke und Axel 1985). Nun markiert das Protein zero als Myelinscheiden-spezifisches Protein ausschließlich die Myelinscheide von Schwannzellen (Lemke und Axel 1985). Das DHH jedoch lässt sich im Zytoplasma nachweisen (Parmantier et al. 1999).

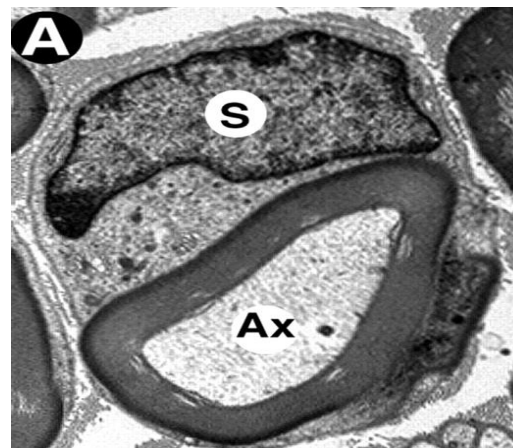


Abbildung 28: Myelinisierende Schwannzelle dargestellt mittels Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopisch aufgenommener Querschnitt einer myelinisierenden Schwannzelle. Die Myelinscheide umgibt hierbei das Axon (Ax), angrenzend ist der Schwannzellnukleus (S) im Zytoplasma der Schwannzelle sichtbar.

Quelle: Corfas und Kollegen, S. 9251 (Corfas et al. 2004).

Die in A.1 von Abbildung 25 (S. 61) gezeigte myelinisierende Schwannzelle kann somit als doppelmarkiert betrachtet werden.

DHH-Expression in Schwannzell-artigen Tumorzellen

Ähnlich wie von Endo und Kollegen, die eine DHH-Expression in MPNST-Zelllinien zeigten (Endo et al. 2002b), wurde in der vorliegenden Studie eine Expression von DHH in benignen Neurofibromen nachgewiesen (vgl. Abbildung 20, S. 57).

Diese ektope DHH-Expression in den Tumorzellen könnte wie von Endo und Kollegen postuliert, einen Einfluss auf die Tumorgenese von Neurofibromen haben (Endo et al. 2002a).

DHH-Expression in Perineuralzellen

In Perineuralzellen wurde von verschiedenen Autoren mit Hilfe verschiedener Untersuchungstechniken (ISH / IHC) bislang lediglich der DHH-Rezeptor Patched nachgewiesen (Parmantier et al. 1999, Endo et al. 2002a).

Die in der vorliegenden Studie angefertigten Doppelmarkierungen (vgl. Abbildung 21, S. 58) weisen auch auf eine DHH-Expression in den Perineuralzellen hin.

DHH-Expression in Mastzellen

Zudem wurde eine DHH-Expression in Mastzellen gezeigt (vgl. Abbildung 23, S. 59). Sie könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung der Tumore haben. Doch es wurde gezeigt, dass die Mastzellichte in plexiform-intraneuralen Neurofibromen deutlich geringer als in diffusen oder dermalen Neurofibromen ist (Tucker et al. 2011, Friedrich et al. 2015). Auch wenn Mastzellen DHH exprimieren, spielt dies vermutlich in plexiform-intraneuralen Neurofibromen auf Grund der geringen Anzahl von Mastzellen für die Differenzierung des Tumors keine Rolle.

DHH-Expression in Fibroblasten

Verwunderlich ist zunächst, dass in den untersuchten PNSTs mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten CD90-Antikörper keine freien Fibroblasten im Tumor nachgewiesen wurden, sondern lediglich eine Anfärbung von Gefäßwänden und dem den Tumor umgebenden Epineurium erfolgte (vgl. Abbildung 22, S. 59). Ein ähnliches Phänomen zeigte sich in einer Studie von L. Püschel, in der unter anderem die zelluläre Zusammensetzung von PNSTs

untersucht wurde. Hier zeigten sich bei einem Großteil der 457 mit CD90-Antikörper untersuchten PNSTs eine perivaskuläre oder perineurale Färbung, während nur 30,7 % der Tumore eine Anfärbung des Tumorgewebes zeigte (Püschel 2017). Da CD90 ein Oberflächenprotein ist, welches von verschiedenen Zelltypen exprimiert wird – unter anderem von Neuronen, Fibroblasten, Gefäßperizyten oder Endothelzellen – (Leyton und Hagood 2014), war die perivaskuläre und perineurale Expression zu erwarten und zeigte die Funktionalität und Spezifität der Immunreaktion an. Einen spezifischen Fibroblastenantikörper gibt es bislang nicht.

In der Literatur wird beschrieben, dass Neurofibrome zu 60-85 % aus Schwannzell-artigen Tumorzellen bestehen, neben verschiedenen anderen Zellarten aber auch Fibroblasten enthalten (Peltonen et al. 1988, Sheela et al. 1990). Dies wurde in verschiedenen Studien mittels Elektronenmikroskopie gezeigt (Kimura et al. 1974). Doch laut Hirose und Kollegen konnten die verschiedenen Zellpopulationen in Neurofibromen bislang noch nicht mit Hilfe immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden (Hirose et al. 2003) und Erlandson und Woodruff fanden in diesen Tumoren in ultrastrukturellen Untersuchungen nur selten klassische Fibroblasten (Erlandson und Woodruff 1982).

Ob und wie viele klassische Fibroblasten in Neurofibromen enthalten sind, gilt es somit noch herauszufinden. Es wäre sinnvoll sie mit Hilfe verschiedener Fibroblasten-Marker darzustellen, beispielsweise dem Fibroblasten-Oberflächenprotein-Antikörper oder dem CD34-Antikörper (Hagel et al. 2012, Hirose et al. 2003).

5.3 Mögliche Beteiligung des DHH an der Malignisierung von Neurofibromen

Als Teil des Hedgehog-Signalweges wurde eine Beteiligung von DHH an der Entwicklung und Organisation des Perineuriums (Parmantier et al. 1999), sowie an der Myelinisierung im PNS gezeigt (Jung et al. 2015). Es ist an der Intaktheit der Nerven beteiligt und könnte somit bei der Entstehung und Malignisierung von PNSTs eine wichtige Rolle spielen.

DHH als Differenzierungsmarker

DHH gilt insbesondere im Rahmen der Schwannzell-Entwicklung als Differenzierungsmarker (Jessen und Mirsky 2005). Als solcher müsste in Neurofibromen bei fortschreitender Dedifferenzierung der Tumorzellen die DHH-Expression abnehmen. Solch ein Prozess wurde beispielsweise für den Schwannzell-Differenzierungsmarker S100 beobachtet, welcher in Neurofibromen vorhanden ist und in MPNSTs auf Grund einer zunehmenden Anaplasie zu großen Teilen verloren geht (Antonescu et al. 2013a).

In der vorliegenden Untersuchung wurde anhand des prozentualen Anteils DHH-positiver Tumorzellen eine signifikant geringere DHH-Expression in den MPNSTs im Vergleich zu den benignen PNSTs ermittelt.

Das DHH zeigt somit einen ähnlichen Verlauf wie das S100 und kann als Differenzierungsmarker zwischen benignen und malignen Nervenscheidentumoren herangezogen werden.

Es stellte sich jedoch die Frage, in welchem Stadium der Tumorentwicklung DHH verloren geht, ob es gegebenenfalls bereits in einem frühen Stadium der malignen Transformation abnimmt und somit einen prädiktiven Wert hat.

Hierzu sollte geprüft werden, ob ein kapselüberschreitendes Wachstum plexiformer Neurofibrome eine Dedifferenzierung und damit eine Malignisierung darstellt (vgl. Unterkapitel „Invasives Wachstum - eine Eigenschaft plexiformer Neurofibrome“, S. 66). Demnach müsste bei einem invasiven Wachstum der plexiformen Neurofibrome die DHH-Expression bereits abnehmen. Bezogen auf die oben postulierte mögliche zeitliche Abfolge der Wachstumsmuster müsste sie also in der Gruppe der pNFs in plexiform-intraneuralen Neurofibromen hoch, in

plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen niedriger und in plexiform-diffusen Neurofibromen am niedrigsten sein.

Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Es zeigte sich weder bei der Intensität der DHH-Markierung noch im durchschnittlichen Anteil DHH-positiver Tumorzellen ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen der pNFs. Entsprechend ergab sich kein Unterschied zwischen den nodulär- oder den langstreckig-wachsenden plexiformen Neurofibromen.

Das kapselüberschreitende, invasive Wachstum ist somit kein Zeichen einer Dedifferenzierung. Dies deckt sich mit den Angaben in der Fachliteratur, dass eine maligne Entartung diffuser Neurofibrome als extrem selten angesehen und bislang allenfalls in vereinzelt Fallberichten beschrieben wurde (Evans 2013, Inoue et al. 2014, Schaefer und Fletcher 2015).

Zusammenfassend besitzt DHH somit einen anzeigenden Wert als Differenzierungsmarker und in Tumoren mit histologisch nicht eindeutiger Dignität kann eine fehlende DHH-Expression möglicherweise als Zeichen der Malignisierung gewertet werden. Dies sollte in zukünftigen Studien an größeren Stichproben noch überprüft werden.

DHH als Faktor für die hämatogene Metastasierung von MPNSTs

Da in der Literatur auch bei der Aufrechterhaltung der Blut-Nerven-Barriere eine Beteiligung von DHH demonstriert wurde (Moreau et al. 2016, Chapouly et al. 2016), könnte der Abfall der DHH-Expression in MPNSTs möglicherweise auch für die hämatogene Metastasierung dieser Malignome eine Rolle spielen.

Ähnliche Hinweise fanden Zou und Kollegen in einer Studie an 140 MPNST-Patienten, für MPNSTs mit fehlender S100-Expression. Hier wurden Prädiktoren für das Outcome dieser Tumore gesucht und es wurde gezeigt, dass MPNSTs mit einer fehlenden S100-Immunreaktivität mit einem erhöhten Risiko für eine Fernmetastasierung verbunden waren (Zou et al. 2009).

Derartige Untersuchungen an einem großen Patientenkollektiv wären auch für die DHH-Immunreaktivität sinnvoll, um die Rolle von DHH bei einer hämatogenen Metastasierung von MPNSTs zu klären.

5.4 Methodenkritik

Die Auswahl der Stichprobe in Bezug auf die angewandte Klassifikation der PNSTs, die Geschlechter- und Altersverteilung, sowie die Lokalisation der untersuchten Tumore sollen im Folgenden hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit diskutiert werden. Zudem wird die immunhistochemische DHH-Markierung der Gewebeproben, die Auswahl der Antikörper für die Doppelmarkierungen und die Anfertigung dieser Färbungen bezüglich Ihrer Vor- und Nachteile erörtert.

5.4.1 Auswahl der Stichprobe nach Tumortyp

In dieser Studie wurden Gewebeproben verschiedener peripherer Nervenscheidentumore von NF1-Patienten untersucht. Hierbei wurde wie in vorherigen Studien (Miller et al. 2009, Carroll 2012) primär eine einfache Unterteilung der Neurofibrome in dermale und plexiforme Neurofibrome, sowie MPNSTs vorgenommen. Zusätzlich wurden die pNFs in das intraneurale, das kapselüberschreitende und das diffuse Wachstum unterteilt. Auf diese Weise konnten unterschiedliche Wachstumsmuster der pNFs berücksichtigt werden.

Grundsätzlich birgt die Anwendung verschiedener Klassifikations-Schemata zur Einteilung der Neurofibrom-Subtypen Probleme bei der Vergleichbarkeit verschiedener Studien (Carroll und Ratner 2008). Es wäre somit für die vorliegende Arbeit sinnvoll gewesen, beispielsweise wie von der WHO empfohlen, eine Klassifikation in fünf verschiedene Subtypen (Perry et al. 2016), vorzunehmen. Oder wie vom NCI auf einem ‚consensus meeting‘ vorgeschlagen, ein Klassifikationsschema anzuwenden, welches auch die Entwicklungsstufen zu einem malignen Tumor berücksichtigt (Miettinen et al. 2017). Bei keinem dieser empfohlenen Schemata werden jedoch plexiform-intraneural wachsende Neurofibrome von plexiform-kapselüberschreitenden oder plexiform-diffus wachsenden Neurofibromen unterschieden.

Daher wurde trotz der schlechteren Vergleichbarkeit die beschriebene Einteilung in insgesamt fünf Tumortypen verwendet.

5.4.2 Analyse der Stichprobenzusammensetzung

Die in dieser Studie untersuchte Stichprobe, welche 83 Gewebeproben von 69 verschiedenen Patienten umfasste, zeigte sich in Ihrer Größe vergleichbar mit anderen Immunhistologischen Studien an Neurofibromen.

So untersuchten Zou und Kollegen beispielsweise mit Hilfe der IHC an insgesamt 93 Proben von benignen Neurofibromen und MPNSTs die Expression verschiedener molekularer Marker, um ihren prognostischen Wert als Biomarker herauszufinden (Zou et al. 2009). Pongpudpunth und Kollegen ermittelten mit Hilfe der IHC an insgesamt 72 dermalen und plexiformen Neurofibromen von 18 NF1-Patienten den Anteil Nestin-positiver Zellen, um damit Vorläuferzellen nachzuweisen (Pongpudpunth et al. 2010). L. Püschel hingegen untersuchte unter anderem an 520 Proben humaner peripherer Nervenscheidentumore (davon 136 dNF, 126 pNF, 113 plexiform-diffuse Neurofibrome, 123 diffuse Neurofibrome und 22 MPNSTs) mittels IHC die zelluläre Zusammensetzung dieser Tumore und mögliche Tumorentstehungs- und Progressionsmechanismen. In dieser Studie wurde somit eine ausgesprochen große Stichprobe untersucht (Püschel 2017).

Die einzige bislang vorliegende DHH-Expressionsstudie an Neurofibromen von Endo und Kollegen hatte mit insgesamt 12 untersuchten Proben einen deutlich geringeren Umfang als die vorliegende Studie (Endo et al. 2002a).

Geschlechts- und Altersverteilung

In der vorliegenden Untersuchung waren insgesamt 59 % Frauen und 41 % Männer eingeschlossen, das Durchschnittsalter des Gesamtkollektivs zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme lag bei 33,28 Jahren.

In Tabelle 13 (S. 74) sind aufgeteilt nach den Tumor-Subtypen die Geschlechtsverteilung und das mediane/mittlere Alter der Patienten verschiedener Vergleichsstudien aufgelistet.

Tabelle 13: Geschlechts- und Altersverteilung von peripheren Nervenscheidentumoren

Ergebnisse verschiedener Studien unterteilt nach Tumor-Subtypen.

w = weiblich, m = männlich. † = Medianes Alter, * = mittleres Alter.

	Ehara et al. (2018)	Tucker et al. (2009a)	Needle et al. (1997)	Ducatman et al. (1986)	Zou et al. (2009)	Püschel (2017)	Eigene Studie
Stichprobe	57 dNF	44 pNF	168 pNF	120 MPNST	140 MPNST	136 dNF 126 pNF 22 MPNST	20 dNF 35 pNF 17 MPNST
dNF	w: 56 % m: 44 % 34Jahre†					w: 58,4 % m: 41,6 % 39,4 Jahre*	w: 76 % m: 24 % 43,9 Jahre*
pNF		w: 44 % m: 56 % 15 Jahre*	w: 44,6% m: 55,4% 10 Jahre*			w: 47,7 % m: 52,3 % 24,6 Jahre*	w: 49 % m: 51 % 26,9 Jahre*
MPNST				w: 57 % m: 43 % 34 Jahre*	w: 36,4% m: 63,6% 35Jahre†	w: 52,9 % m: 47,1 % 38 Jahre*	w: 65 % m: 35 % 35,7 Jahre*

In der Gruppe der dNF waren in der vorliegenden Studie deutlich mehr weibliche als männliche Patienten einbezogen. Eine leichte Dominanz weiblicher Patienten zeigte sich auch bei Ehara und Kollegen sowie bei L. Püschel und M. Miettinen gibt in seiner Abhandlung über die NF1 ebenfalls eine milde weibliche Prädominanz an (Ehara et al. 2018, Püschel 2017, Miettinen 2016).

Bei den pNF zeigte sich durchweg eine leichte männliche Dominanz (s. Tabelle 13, S. 74).

Lediglich in der Gruppe der MPNSTs geben die verschiedenen Studien unterschiedliche Geschlechterprädominanzen an (s. Tabelle 13, S. 74). Auf Grund der in dieser Studie untersuchten relativ kleinen Stichprobe von MPNSTs ist die Geschlechterverteilung in der eigenen Studie nicht aussagekräftig. Doch M. Miettinen spricht in seinem Buch – passend zu der vorliegenden Stichprobe – auch bei den MPNSTs von einer milden weiblichen Prädominanz (Miettinen 2016) und in der großen Stichprobe von L. Püschel fand sich in der Gruppe der MPNSTs ebenfalls ein geringgradig höherer Anteil weiblicher Patienten (Püschel 2017).

Das mittlere Alter der Patienten mit dermalen oder plexiformen Neurofibrom lag in der vorliegenden Studie höher als in den Vergleichsstudien (s. Tabelle 13,

S. 74). Dies kann zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Untersuchung das Alter zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Tumors angegeben wurde, während die Altersangaben in den übrigen Studien unterschiedliche Bezugspunkte hatten, beispielsweise den Zeitpunkt der Erstuntersuchung oder einer Behandlung (Tucker et al. 2009a, Ehara et al. 2018). Da die Anzahl dNFs mit dem Alter zunimmt (Duong et al. 2011) und sie in der Regel aus kosmetischen Gründen entfernt werden (Lutterodt et al. 2016), können zwischen der Erstuntersuchung und einer operativen Therapie viele Jahre vergehen. Bei pNFs erfolgt ebenfalls zunächst eine Verlaufsbeobachtung der Tumore und die operative Entfernung findet meist erst bei Auftreten von beeinträchtigenden Symptomen oder Wachstumszunahme statt (Darrigo et al. 2007). Anders verhält es sich bei den malignen Tumoren, auf Grund der schlechten Prognose, ist eine frühzeitige operative Therapie sinnvoll (Widemann 2009). Die MPNSTs können zwar in jedem Alter auftreten, doch das mediane Alter wird meist mit 35-45 Jahren angegeben (Miettinen 2016). Dies passt zu der Stichprobe der vorliegenden Untersuchung, in der das mittlere Alter bei Entfernung des MPNSTs bei 35,7 Jahren lag.

Eine Betrachtung der Altersverteilung der verschiedenen pNFs zeigte einen Anstieg des Alters von plexiform-intraneuralen Neurofibromen (Altersmittelwert (M): 21,2 Jahre) über die plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibrome (M: 22,5 Jahre) zu den plexiform-diffusen Neurofibromen (M: 32,6 Jahre). Eine ähnliche Beobachtung zeigte sich in einer Studie von L. Püschel, in der Faktoren der Tumorbilogie bei PNSTs untersucht wurden. Hier wurde das Wachstumsmuster des kapselüberschreitenden Wachstums nicht berücksichtigt, wohl aber diffuse von plexiform-diffusen Neurofibromen unterschieden. Es wurde passend zu den vorliegenden Ergebnissen ein Anstieg der Altersmittelwerte von pNF über plexiform-diffuse zu diffusen Neurofibromen beobachtet (Püschel 2017).

Insgesamt spiegelte die hier verwendete Stichprobe somit eine Zusammensetzung wider, die von anderen Stichproben, welche in der Literatur beschrieben werden, keine groben Abweichungen zeigt.

Tumorlokalisation

In der vorliegenden Untersuchung waren die Tumoren für die Gesamtstichprobe überwiegend aus dem Rumpf-Bereich (44 %), gefolgt von den Extremitäten (30,7 %) und dem Kopf/Hals-Bereich (25,3 %) entnommen worden. Hierbei wurde auf Grund fehlender Angaben eine Grundgesamtheit von n = 75 betrachtet. In Tabelle 14 (S. 76) sind aufgeteilt nach den Tumor-Subtypen die Ergebnisse verschiedener Vergleichsstudien und der vorliegenden Untersuchung bezogen auf die Tumorlokalisation der PNSTs aufgelistet.

Tabelle 14: Tumorlokalisation von peripheren Nervenscheidentumoren
Ergebnisse verschiedener Studien unterteilt nach Tumor-Subtypen.
Kopf = Kopf und Hals; Rum. = in- und extern am Rumpf; Extr. = Extremitäten

Stichprobe Lokalisation		Miettinen (2016)	Ehara et al. (2018)	Needle et al. (1997)	Ducatman et al. (1986)	Zou et al. (2009)	Püschel (2017)	Eigene Studie
		595 dNF 278 pNF 65MPNST	41 dNF	168 pNF	120 MPNST	140 MPNST	136 dNF 126 pNF 22MPNST	17 dNF 45 pNF 13 MPNST
dNF	Kopf	32 %	9,2 %				19,3 %	17,6 %
	Rump.	31 %	60,2 %				57 %	47,1 %
	Extr.	37 %	30,5 %				23,7 %	35,3 %
pNF	Kopf	33 %		42,8 %			43,6 %	33,3 %
	Rump.	31 %		29,2 %			32,7 %	37,8 %
	Extr.	36 %		28,0 %			23,6 %	28,9 %
MPNST	Kopf	20 %			19 %	14,3 %	0 %	7,7 %
	Rump.	21 %			46 %	55,0 %	61,5 %	61,5 %
	Extr.	59 %			35 %	30,7 %	38,5 %	30,8 %

Die Lokalisationen der hier untersuchten PNSTs zeigten insgesamt eine sehr ähnliche Verteilung wie in der umfangreichen Studie von L. Püschel (Püschel 2017).

Im Falle der dNFs lag eine Häufigkeitsverteilung übereinstimmend mit den Ergebnissen von Ehara und Kollegen vor. In dieser retrospektiven Studie waren verschiedene Charakteristika dermalen Neurofibrome untersucht worden, unter anderem die Prädilektionsstelle dieser Tumore, mit dem Ergebnis einer hohen Anzahl im Bereich des Rumpfes (s. Tabelle 14, S. 76) (Ehara et al. 2018).

Die in die vorliegende Untersuchung eingeschlossenen pNFs zeigten ähnlich wie bei M. Miettinen eine nahezu ausgeglichene Verteilung (Miettinen 2016). Eine mehrfach in der Literatur beschriebene Prädilektion für Kopf und Nacken, die sich auch in den Daten von Needle und Kollegen zeigte (s. Tabelle 14, S. 76) (Needle et al. 1997, Miettinen 2016), wurde in der vorliegenden Stichprobe lediglich bei einer separaten Betrachtung der Untergruppe der plexiform-intraneuralen Neurofibrome deutlich (s. Abbildung 8, S. 34).

Bei den MPNSTs stimmte die vorliegende Verteilung mit den Werten der Studien von Ducatman und Kollegen sowie Zou und Kollegen überein. Sie treten bevorzugt an Nerven des Rumpfes, gefolgt von Nerven der Extremitäten auf (Ducatman et al. 1986, Zou et al. 2009).

Insgesamt stimmt die Häufigkeitsverteilung der Lokalisation der verschiedenen Tumor-Subtypen somit überwiegend mit den Angaben in der Literatur überein.

5.4.3 DHH-Markierung als immunhistologische Untersuchung

Die Expression von DHH wurde in PNSTs unseres Wissens nach bislang kaum untersucht. In der Literatur findet sich lediglich eine Studie von Endo und Kollegen, die mittels IHC die Expression der Hedgehog-Proteine (SHH, DHH und IHH) und ihrer Rezeptoren (PTCH1 und PTCH2) an nur vier dNFs, zwei pNFs und 6 Kontrollnerven untersucht haben (Endo et al. 2002a). Hier wurde insbesondere eine Patched-Expression in den Tumorzellen der Neurofibrome und in den Schwannzellen der Kontrollnerven gezeigt, eine DHH-Expression wurde in keiner der Proben nachgewiesen.

Zur Untersuchung der DHH-Expression in den verschiedenen Tumortypen wurde in der vorliegenden Studie eine immunhistochemische Markierung mit DHH-Antikörper im Labor etabliert und eine automatisierte immunhistochemische Markierung mit dem Ventana Färbeautomaten durchgeführt.

Der verwendete DHH-Antikörper (Anti-DHH, clone 19D7.2 von Millipore) wurde ausgewählt, da laut Datasheet eine Reaktivität mit menschlichem Gewebe vorliegt und bereits immunhistochemische Untersuchungen mit ihm durchgeführt wurden. In einer PhD-Thesis von V. L. Campbell wurde dieser Antikörper beispielsweise für eine IHC-Untersuchung an formalin-fixiertem paraffin-gebettetem Knochenmarksgewebe genutzt, hier wurde jedoch ein anderes Färbeprotokoll verwendet (Campbell 2018). In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Etablierung der DHH-Markierung durchgeführt und dabei wurden, wie in Kapitel 4.2 (S. 46) demonstriert, adäquate Färbeergebnisse an Gewebeschnitten eines peripheren Nervens und der mitgeführten Positiv-Kontrolle eines malignen Teratoms erzielt.

Dennoch wäre es, wie Saper und Sawchenko empfehlen, sicherlich sinnvoll in zukünftigen Studien mit Hilfe anderer Methoden – beispielsweise der ISH oder der RT-PCR - die Ergebnisse der IHC-Untersuchung zu überprüfen (Saper und Sawchenko 2003). Diese Untersuchungen sollten jedoch nur ergänzend zu der Immunhistochemie angewandt werden, da sie die Antigenexpression auf DNA- oder mRNA-Level untersuchen und daher keine Lokalisation des Antigens innerhalb der Zelle erlauben.

5.4.4 Auswertungsmethoden der untersuchten DHH-Markierung

Wie in Kapitel 3.2.3 (S. 40) beschrieben, wurde eine semiquantitative und eine quantitative Auswertung der DHH-Markierung durchgeführt und im Anschluss mit Hilfe der Statistik- und Analyse-Software SPSS statistisch ausgewertet.

Bei der semiquantitativen Auswertung wurde, wie im ‚*Handbook of Practical Immunohistochemistry*‘ zur Standardisierung der diagnostischen IHC empfohlen, ein auf der Färbeintensität basierendes Scoring-System genutzt (Lin und Shi 2015). Wie auch in einer Studie von Zou und Kollegen, in der MPNSTs mittels IHC untersucht wurden (Zou et al. 2009), wurde in der vorliegenden Studie die Färbeintensität der verschiedenen Schnitte in 4 verschiedene Stufen eingeteilt. Zudem wurden bei der semiquantitativen Auswertung die DHH-Expression in residualen Axonen und dem Perineurium mitberücksichtigt, da diese beiden Strukturen ebenso wie die Tumorzellen einen Einfluss auf das Mikromillieu im Nerven bzw. Tumor haben (Mizisin und Weerasuriya 2011).

In weiteren Studien zu diesem Thema könnte zusätzlich die Menge an DHH in den verschiedenen Arealen der Tumore (beispielsweise mittels Western Blot) bestimmt werden.

Während in der semiquantitativen Auswertung der DHH-Markierung eine Beurteilung direkt unter dem Mikroskop erfolgte, wurde in der quantitativen Auswertung der DHH-markierten Gewebeproben eine Computer-unterstützte Bildanalyse durchgeführt. Eine computergestützte Analyse gilt als objektiver im Vergleich zu einer direkten Begutachtung unter dem Mikroskop (Prasad und Prabhu 2012). Auch Braun und Kollegen betonen die Vorteile digitaler Bildanalysemethoden zur Proteinquantifikation, doch es beständen noch Probleme in der Identifikation von Proteinen, die nicht ausschließlich in Tumorzellen exprimiert werden. Hierbei spielen zur Identifikation der Protein-exprimierenden Tumorzellen zusätzliche Faktoren wie die Morphologie der Zellen und die Tumorarchitektur eine Rolle (Braun et al. 2013). In der vorliegenden Studie zeigte sich eine DHH-Expression, wie in Kapitel 4.3 (S. 57) beschrieben, auch in nicht-Tumorzellen. Daher wurde keine vollständig digitalisierte Quantifizierung durchgeführt, sondern eine Computer-unterstützte Auszählung mit Hilfe des Programmes ImageJ. Laut Girish und Vijayalakshmi könne man bei Verwendung dieses Bildanalyse-Programms genauere und reproduzierbarere Ergebnisse erlangen als mit konventionellem Zählen unter dem Mikroskop (Girish und Vijayalakshmi 2004).

Bei der statistischen Auswertung wurde eine rein explorative statistische Analyse durchgeführt und ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell berechnet. Insgesamt wurde in der vorliegenden Studie eine zu kleine Stichprobe untersucht, um die Ergebnisse der statistischen Analyse als bestätigend anzusehen. Inhomogenitäten in der relativ kleinen Stichprobe können nicht komplett eliminiert, sondern allenfalls reduziert werden. Durch die Verwendung eines gemischten Modells konnten jedoch zufällige Effekte, die durch die Verwendung mehrerer Proben einzelner Patienten vorliegen könnten, reduziert werden. Durch diese Maßnahme konnten die Effekte der Inhomogenität der vorliegenden Stichprobe partiell kompensiert werden, wodurch eine statistische Auswertung erst möglich wurde.

Bei den paarweisen Vergleichen muss zudem bedacht werden, dass der Fehler 1. Art durch das multiple Testen verzerrt sein könnte (Victor et al. 2010). Wie von Victor und Kollegen beschrieben, besteht jedoch die Möglichkeit die Irrtumswahrscheinlichkeit zu kontrollieren. Eine der häufig genutzten Methoden ist die Bonferroni-Korrektur. Hier wird das adjustierte Signifikanzniveau ermittelt, indem das multiple Gesamtniveau durch die Anzahl der durchgeführten Tests geteilt wird (Victor et al. 2010). In der vorliegenden Studie wurden in den paarweisen Kontrasten zehn mögliche Vergleiche gezogen. Das bedeutet, dass das adjustierte Signifikanzniveau nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur bei kleiner gleich 0,005 liegt. Wenn nun die in Tabelle 12 (S. 55) angegebenen p-Werte für die errechneten paarweisen Kontraste mit diesem adjustierten Signifikanzniveau verglichen werden, ändert sich die Signifikanz der Ergebnisse nicht. Auch wenn die Interpretation der paarweisen Vergleiche dennoch mit Zurückhaltung erfolgen sollte, zeigt diese Korrektur, dass die hier erhobenen Daten Hinweise für zukünftige Untersuchungen geben können.

In weiterführenden Untersuchungen sollte vor der Datenerhebung eine Fallzahlplanung durchgeführt werden, um aussagekräftige Ergebnisse in der statistischen Analyse zu erlangen. Zusätzlich ist es in diesem Rahmen sinnvoll, ein Studienprotokoll zu erstellen, in dem ein geeigneter statistischer Test schon vor der Datenerhebung ausgewählt wird. So kann ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse der Studie einen Einfluss auf die Testauswahl haben (Du Prel et al. 2010).

5.4.5 Auswahl der Antikörper für die Doppelmarkierungen

Damit eine Unterscheidung zwischen DHH-exprimierenden Tumorzellen und anderen DHH-exprimierenden Zellen im PNST erleichtert wurde, wurden beispielhaft Doppelmarkierungen mit DHH-Antikörper und Markern verschiedener Zellarten angefertigt (vgl. Tabelle 4, S. 23). Die markierten Zellarten zählen laut Stemmer-Rachamimov und Nielsen zu den Hauptbestandteilen von Neurofibromen (Stemmer-Rachamimov und Nielsen 2012).

Die Doppelmarkierungen wurden teils mit Antikörpern durchgeführt, die in der Routinediagnostik des Institutes für Neuropathologie angewandt werden. Hierzu

zählen der S100-, der EMA-, der NF- und der MPZ-Antikörper. Die anderen Antikörper (CD90/Thy-1 und Tryptase Antibody) wurden in vorherigen Studien im Institut für Neuropathologie bereits etabliert und verwendet (Püschel 2017).

In einigen Fällen bereitete eine unterschiedliche Intensität in der Anfärbung von DHH und zweitem Primär-Antikörper Probleme in der immunhistochemischen Doppelmarkierung eine Koexpression der Antigene zu identifizieren (vgl. Abbildung 23, S. 59). Diese Problematik wurde kürzlich von Petersen und Kollegen thematisiert und empfohlen Antikörper von zwei verschiedenen Spezies zu nutzen, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Zudem sei die Reihenfolge des Auftragens der verschiedenen Chromogene entscheidend für das Färbeergebnis (Petersen et al. 2018).

Grundsätzlich wird empfohlen bei immunhistochemischen Färbungen zur Befundung auch morphologische Kriterien zu berücksichtigen (Hantschke und Palmedo 2015). Beispielsweise war bei der Tryptase-Markierung eine Korrelation mit morphologisch identifizierbaren DHH-positiven Mastzellen in einfach-DHH-markierten Gewebeschnitten hilfreich, um adäquate Aussagen über die DHH-Expression in Mastzellen zu treffen.

In nachfolgenden Untersuchungen wird darauf zu achten sein, optimale Techniken und Antikörper für die Doppelmarkierungen, wie beispielsweise von Petersen und Kollegen empfohlen, zu nutzen (Petersen et al. 2018). Zudem könnten die Doppelmarkierungen mit Hilfe einer IF-Färbung deutlicher dargestellt werden. Hier kann das Signal der Markierung verstärkt und die Färbungen der verschiedenen Antigene einzeln sichtbar gemacht werden (Donaldson 2015). Die Untersuchung einer größeren Stichprobe verschiedener Neurofibrom-Subtypen mittels Doppelmarkierungen zur Identifikation der DHH-exprimierenden Zellen in peripheren Nerven bzw. Nervenscheidentumoren kann allgemeingültigere Ergebnisse liefern.

5.5 Ausblick

Auch nach mehreren Jahrzehnten der Forschung im Bereich der NF1 sind noch viele Fragen ungeklärt. So sind bislang beispielsweise weder die Entstehung noch die Auslöser einer malignen Entartung der charakteristischen PNSTs vollständig bekannt. MPNSTs - die häufigsten Malignome bei NF1-Patienten (Brems et al. 2009) - entstehen meist aus vorbestehenden plexiformen Neurofibromen (Ferner und Gutmann 2002). Ihre Prognose ist schlecht (Hirbe und Gutmann 2014) und bislang existieren nur unbefriedigende Therapiemöglichkeiten (Farid et al. 2014). Daher ist eine Früherkennung der malignen Transformation umso wichtiger. Hierbei könnte es helfen, eine zeitliche Abfolge verschiedener Wachstumsmuster plexiformer Neurofibrome zu ermitteln und Differenzierungsmarker zu finden, die eine Malignisierung frühzeitig anzeigen.

Die vorliegende Studie konnte beispielhaft das bislang kaum beachtete Wachstumsmuster des kapselüberschreitenden Wachstums plexiformer Neurofibrome zeigen (vgl. S. 44 ff.). Doch dieses Wachstumsmuster scheint kein Zeichen einer Dedifferenzierung, sondern eine Eigenschaft des invasiven Wachstums plexiformer Neurofibrome zu sein (vgl. S. 66). Um bezüglich der zeitlichen Abfolge verschiedener Wachstumsmuster plexiformer Neurofibrome und ggf. der zunehmenden Dedifferenzierung der Zellen valide Aussagen treffen zu können, wäre es notwendig Wachstumsmuster der pNFs prospektiv zu ermitteln oder mit Hilfe von Mausmodellen im zeitlichen Verlauf zu betrachten.

In dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass in Neurofibromen das Signalmolekül DHH, nicht nur in den Schwanzzell-artigen Tumorzellen und myelinisierenden Schwanzzellen, sondern auch in Perineuralzellen und Mastzellen exprimiert wird (vgl. S. 57 ff.). Es stellt sich die Frage, welche Rolle die DHH-exprimierenden Perineuralzellen und Mastzellen bei der Malignisierung von pNFs spielen, dies gilt es in zukünftigen Studien herauszufinden.

Zudem scheint DHH als Differenzierungsmarker zwischen benignen und malignen PNSTs fungieren zu können, doch einen prädiktiven Wert scheint es nicht zu haben (vgl. S. 70 ff.). Eine Validierung des DHH als Differenzierungsmarker zwischen benignen und malignen PNSTs war

letztendlich in der vorliegenden Studie aufgrund der geringen Stichprobe nicht möglich. Um diese zu ermöglichen, sollte die DHH-Expression in PNSTs an größeren Stichproben ermittelt werden. Für adäquate Ergebnisse könnten die Ergebnisse der IHC zudem durch andere Methoden wie die ISH, die RT-PCR oder den Western Blot überprüft bzw. ergänzt werden.

Schlussendlich gibt es Hinweise, dass ein Abfall der DHH-Expression in MPNSTs eine Rolle für die hämatogene Metastasierung der Tumore spielt (vgl. S. 71). Um eine Beteiligung von DHH an der hämatogenen Metastasierung von MPNSTs nachzuweisen, könnten zukünftige Studien an großen Patientenkollektiven überprüfen, ob eine geringe DHH-Expression in MPNSTs mit einem erhöhten Risiko für eine Fernmetastasierung einhergeht.

Mit dieser Arbeit wurde nach bestem Wissen die erste Studie zur Bedeutung von Desert Hedgehog Protein als Differenzierungsmarker in PNSTs durchgeführt. Auch wenn DHH keinen prädiktiven Wert im Rahmen der Malignisierung zu haben scheint, wurde seine Rolle als Differenzierungsmarker aufgezeigt. Ob sich damit auch Vorteile in der Routineuntersuchung von NF1-Patienten erschließen, oder neuartige Therapieoptionen entwickelt werden können, bleibt weiteren Studien vorbehalten.

6. Zusammenfassung

Die Neurofibromatose Typ1 ist ein neurokutanes Syndrom, welches sich überwiegend an der Haut und im Nervensystem manifestiert. Ein Hauptmerkmal ist die Entstehung peripherer Nervenscheidentumore (PNST). Diese können in dermale (dNF) und plexiforme Neurofibrome (pNF) unterschieden werden, wobei letztere ein 6-13 prozentiges Risiko der malignen Entartung zu einem malignen PNST (MPNST) bergen. MPNSTs besitzen eine schlechte Prognose und bislang gibt es keine gezielten Therapiemöglichkeiten. Ziel der vorliegenden Studie war es, verschiedene Wachstumsmuster von pNFs zu untersuchen, um mögliche Zeichen einer Dedifferenzierung der Zellen und damit ggf. eine Malignisierung zu detektieren. Hierzu wurde das Signalmolekül Desert Hedgehog Protein (DHH) auf seine potenzielle Beteiligung an der Dedifferenzierung untersucht. An insgesamt 83 Proben fünf verschiedener Wachstumsmuster der PNSTs (dermale, plexiform-intraneurale, plexiform-kapselüberschreitende, plexiform-diffuse Neurofibrome und MPNSTs) wurde mit Hilfe der Immunhistologie die DHH-Expression ermittelt. Dies geschah anhand der Färbeintensität der Proben und anhand des prozentualen Anteils DHH-positiver Tumorzellen je Probe. Die DHH-Intensität bzw. der Anteil DHH-positiver Zellen für jeden Tumortyp wurden verglichen. Zudem wurden doppelmarkierte Gewebeschnitte erstellt, um zu überprüfen welche Zellarten in den Tumoren DHH exprimieren.

Zunächst konnte das in der Literatur bislang kaum beachtete plexiform-kapselüberschreitende Wachstum dargestellt werden. Dieses ist bei pNFs offenbar eine Eigenschaft ihres invasiven Wachstums, nicht wie bei vielen anderen Tumoren ein Zeichen der Dedifferenzierung. Wir fanden heraus, dass DHH nicht nur in Schwanzzell-artigen Tumorzellen und myelinisierenden Schwanzzellen, sondern auch in Perineuralzellen und Mastzellen exprimiert wird. Im Vergleich der DHH-Expression zeigten benigne Tumore eine signifikant stärkere DHH-Expression als MPNSTs. Somit scheint DHH als Differenzierungsmarker zwischen benignen und malignen PNSTs zu fungieren, ein prädiktiver Wert bezüglich der Malignisierung dieser Tumore konnte jedoch nicht gezeigt werden. Diese Rolle und den Stellenwert von DHH in der hämatogenen Metastasierung von MPNSTs gilt es in Studien mit größeren Stichproben noch zu überprüfen.

Summary

Neurofibromatosis type 1 is a neurocutaneous syndrome which involves the nervous system and the skin. One of its hallmarks is the development of peripheral nerve-sheath tumours. These can generally be subdivided into dermal and plexiform neurofibromas. The latter harbour a 6-13 percent risk of a malignant degeneration into a MPNST. MPNSTs are associated with a poor prognosis and lack targeted therapies.

The aim of this study was to investigate different growth types of neurofibromas in order to detect possible signs of the dedifferentiation of cells and thus potential signs of a malignization. Specifically, the role of the signalling protein Desert Hedgehog in dedifferentiation was investigated. DHH-expression was determined in a total of 83 samples belonging to five different growth types (dermal, plexiform-intraneural, plexiform-capsule-exceeding or plexiform-diffuse neurofibromas and MPNSTs) using immunohistology. This was done by determination of the staining intensity of the samples and of the relative abundance of DHH-positive tumour cells in each sample. DHH staining intensity and DHH-positive cell abundance were compared between the different tumour types. We performed double staining of tissue sections to identify the cell types expressing DHH in the tumours.

As a result, the phenotype of plexiform-capsule-exceeding growth, a currently unrecognized type of growth, was described. Unlike in many other tumours, capsule-exceeding growth of plexiform neurofibromas does not seem to be a sign of dedifferentiation but represents a by-product of their invasive growth. We identified DHH expression not only in Schwann cell-like tumour cells and myelinating Schwann cells, but also in perineural cells and mast cells. A comparison between benign tumours and MPNSTs revealed a significantly higher expression of DHH in the former, which might allow the discrimination between benign and malignant peripheral neurofibromas using DHH as a differentiation marker. However, DHH expression does not seem to exert a predictive value in regard of the malignancy of these tumours.

Further studies with larger sample sizes will be required to clarify the role of DHH as a differentiation marker and its possible role in the metastatic spread of MPNSTs by hematogenous dissemination.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen:

Abbildung 1: Schema der intrazellulären Signalwege welche Neurofibromin beeinflusst	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Neurofibromin mit Angabe ihrer Aminosäuren-Position.....	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung einiger der Zellarten, welche aus Neuralleistenzellen hervorgehen.	21
Abbildung 4: Darstellung der Schwanzzell-Entwicklung.	22
Abbildung 5: Hedgehog Signalweg	26
Abbildung 6: Balkendiagramm der Geschlechterverteilung des Patientenkollektives, aufgelistet nach den verschiedenen Tumortypen.	32
Abbildung 7: Balkendiagramm der Altersverteilung des Patientenkollektives nach Dekaden zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme, aufgelistet nach Tumortypen.	33
Abbildung 8: Balkendiagramm der Tumortypen unterteilt nach Tumorlokalisation	34
Abbildung 9: Darstellung eines gesunden peripheren Nervens.....	44
Abbildung 10: Kapselüberschreitendes Wachstum von Neurofibromen mit ausgedünntem Perineurium	45
Abbildung 11: Kapselüberschreitendes Wachstum von Neurofibromen mit Durchtritt von Tumorzellen durch das Perineuriums.....	46
Abbildung 12: Immunhistochemische DHH-Markierung eines peripheren Nervenbündels	47
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung mit DHH von Gewebeschnitten der verschiedenen Tumorguppen.....	48
Abbildung 14: Darstellung der unterschiedlichen Färbeintensitäten der DHH-Markierung	49
Abbildung 15: Balkendiagramm des prozentualen Anteils der verschiedenen DHH-Intensitäten je Tumortyp.....	50
Abbildung 16: Balkendiagramm der DHH-Intensitäten einzelner Areale in plexiform-intraneuralen und plexiform-kapselüberschreitenden Neurofibromen.....	51
Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der Auszählung DHH-positiver Tumorzellen.....	52
Abbildung 18: Durchschnittlicher Anteil DHH-positiver Tumorzellen nach Tumortyp	53

Abbildung 19: Prozentualer Anteil DHH-positiver Tumorzellen nach den Wachstumsmustern plexiform-intraneuraler Neurofibrome	56
Abbildung 20: Doppelmarkierungen DHH - S100	57
Abbildung 21: Doppelmarkierungen DHH - EMA.....	58
Abbildung 22: Doppelmarkierung DHH - CD90/Thy1	59
Abbildung 23: Doppelmarkierung DHH - Tryptase	59
Abbildung 24: Doppelmarkierung DHH - NF.....	60
Abbildung 25: Doppelmarkierung DHH - MPZ.....	61
Abbildung 26: Mögliche zeitliche Abfolge der Wachstumsmuster peripherer Nervenscheidentumore bei NF1	64
Abbildung 27: Noduläres vs. langstreckiges Wachstum plexiformer Neurofibrome.....	65
Abbildung 28: Myelinisierende Schwannzelle dargestellt mittels Elektronenmikroskopie	67

7.2 Tabellen:

Tabelle 1: Diagnosekriterien der NF1	2
Tabelle 2: Häufigkeit der klinischen Merkmale bei NF1 in absteigender Häufigkeit.	6
Tabelle 3: Vorgeschlagene Nomenklatur für das Spektrum der NF1-assozierten Nervenscheidentumore	8
Tabelle 4: Übersicht der Zelltypen in Neurofibromen sowie der zelltypischen Antigene, die mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden.....	23
Tabelle 5: Stichprobe nach Tumortyp mit Unterscheidung zwischen Anzahl der untersuchten Proben und der Zahl der Patienten, denen die Gewebeproben entnommen wurden.....	31
Tabelle 6: Antikörper zur Immunhistologischen Färbung	34
Tabelle 7: Reagenzien	35
Tabelle 8: Laborgeräte	36
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 10: Durchschnittlicher Anteil DHH-positiver Tumorzellen nach Tumortyp	53
Tabelle 11: Im Rahmen der statistischen Auswertung des Anteils DHH-positiver Tumorzellen mit SPSS abgebildete Tabelle der Festen Effekte	54
Tabelle 12: Paarweise Kontraste im verallgemeinert linearen gemischten Modell für den Gehalt an DHH-positiven Zellen in verschiedenen NF1-assozierten Tumor(sub)typen.....	55

Tabelle 13: Geschlechts- und Altersverteilung von peripheren Nervenscheidentumoren	74
Tabelle 14: Tumorlokalisation von peripheren Nervenscheidentumoren	76
Tabelle A 1: Färbeprotokoll der automatisierten DHH-Färbung mittels Ventana benchmark xt Färbemodul	123
Tabelle A 2: Kompletter Datensatz der untersuchten Proben	125

8. Abkürzungsverzeichnis

-/-	<i>homozygot negativ</i>
+/-	<i>heterozygot</i>
AC	<i>Adenylatzyklase (engl.: adenylate cyclase)</i>
ANNUBP	<i>Atypisches Neurofibrom mit unklarem malignem Potential</i>
Aqua dest.	<i>Destilliertes Wasser (lat.: Aqua destillata)</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>
CAL	<i>Café-au-lait-Fleck</i>
cAMP	<i>zyklisches Adenosinmonophosphat</i>
CC1	<i>Cell Conditioning 1 (Puffer auf Tris-Basis)</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CI	<i>Konfidenzintervall (engl.: confidence interval)</i>
CSRD	<i>Cystein-/Serin-reiche Domäne</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
df	<i>Freiheitsgrad des F-Tests</i>
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
dNF	<i>Dermales Neurofibrom</i>
EMA	<i>Epitheliales Membranantigen</i>
engl.	<i>englisch</i>
FDG-PET	<i>Flour-Desoxy-Glukose Positronen-Emissions-Tomographie</i>
F-Test/F	<i>Teststatistik, die F-verteilt ist</i>
GAP	<i>GTPase-aktivierendes Protein</i>
GDP	<i>Guanosindiphosphat</i>
Gli	<i>Gli-Zinkfingerprotein</i>
GRD	<i>GAP-related domain</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HPF	<i>Haupt Gesichtsfeld</i>
IF	<i>Immunfluoreszenz</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
ISH	<i>In-situ-Hybridisierung</i>
kb	<i>Kilobase</i>
KIF7	<i>Kinesin Family Member 7</i>
LOH	<i>Loss of heterocycosity (Verlust der Heterozygotie)</i>
M	<i>Mittelwert</i>

Mdn	<i>Median der DHH-Intensität</i>
MEK	mitogen activated extracellular signal regulated kinase
MPNST	<i>Maligner Peripherer Nervenscheidentumor</i>
MPZ	<i>Myelin Protein zero</i>
mRNA	<i>Botenribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
n	Gesamtzahl der Stichprobe
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF	<i>Neurofilament</i>
NF1	<i>Neurofibromatose Typ 1</i>
NF1-Gen	<i>Neurofibromatose Typ 1 verursachendes Gen</i>
NF1-PH	<i>Plextrin-homologe Domäne bei NF1</i>
NF1-Sec	<i>Sec14p-ähnliche Domäne bei NF1</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OPG	<i>Optikusgliom</i>
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
pNF	<i>Plexiformes Neurofibrom</i>
PNS	<i>Peripheres Nervensystem</i>
PNST	<i>Peripherer Nervenscheidentumor</i>
Proben-ID	<i>Proben-Identifikationsnummer</i>
PTCH	<i>Patched</i>
p-Wert/p	<i>Signifikanzwert</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RT-PCR	<i>Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion</i>
S100	<i>S100 Calcium-bindendes Protein</i>
SCF	<i>Stem cell factor (Stammzellfaktor)</i>
SD	<i>Standard-Abweichung</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
Sig.	<i>Signifikanz</i>
SKP	<i>Skin-derived Precursors (Vorläuferzellen der Haut)</i>
SMO	<i>Smoothened</i>
SOX10	<i>SRY-box Transkriptionsfaktor 10</i>
SSC	<i>Sodium Chloride Sodium Citrate buffer</i>
SUFU	Suppressor of Fused Homolog
TBD	<i>Tubulin-bindende Domäne</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
Thy-1	<i>Thymocyte differentiation antigen 1 (Synonym: CD90)</i>

T-Test/T	<i>Hypothesentest mit t-Verteilung</i>
UKE	<i>Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf</i>
vgl.	<i>vergleiche</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

9. Literaturverzeichnis

- Aiken AH** (2012) Imaging of thyroid cancer. *Semin Ultrasound CT MR.* 33(2):138–149.
- Allaway RJ, Gosline SJC, La Rosa S, Knight P, Bakker A, Guinney J, Le LQ** (2018) Cutaneous neurofibromas in the genomics era: current understanding and open questions. *Br J Cancer.* 118(12):1539–1548.
- Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, Sabbagh M, Wosik K, Bourbonnière L, Bernard M, van Horsen J, De Vries HE, Charron F, Prat A** (2011) The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science.* 334(6063):1727–1731.
- Anastasaki C und Gutmann DH** (2014) Neuronal NF1/RAS regulation of cyclic AMP requires atypical PKC activation. *Hum Mol Genet.* 23(25):6712–6721.
- Antonescu CR, Scheithauer BW, Woodruff JM** (2013a) Malignant Tumors Of The Peripheral Nerves. In: *Tumors of the peripheral nervous system.* Antonescu CR, Scheithauer BW, Woodruff JM (Hrg.) ARP Press, Silver Spring, Md., 381–474.
- Antonescu CR, Scheithauer BW, Woodruff JM** (2013b) Neurofibroma. In: *Tumors of the peripheral nervous system.* Antonescu CR, Scheithauer BW, Woodruff JM (Hrg.) ARP Press, Silver Spring, Md., 211–264.
- Antônio JR, Goloni-Bertollo EM, Trídico LA** (2013) Neurofibromatosis: chronological history and current issues. *An Bras Dermatol.* 88(3):329–343.
- Aravind L, Neuwald AF, Ponting CP** (1999) Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr Biol.* 9(6):R195-R197.
- Bajestan SN, Umehara F, Shirahama Y, Itoh K, Sharghi-Namini S, Jessen KR, Mirsky R, Osame M** (2006) Desert hedgehog-patched 2 expression in peripheral nerves during Wallerian degeneration and regeneration. *J Neurobiol.* 66(3):243–255.

- Balcer LJ, Liu GT, Heller G, Bilaniuk L, Volpe NJ, Galetta SL, Molloy PT, Phillips PC, Janss AJ, Vaughn S, Maguire MG** (2001) Visual loss in children with neurofibromatosis type 1 and optic pathway gliomas: relation to tumor location by magnetic resonance imaging. *Am J Ophthalmol.* 131(4):442–445.
- Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F** (1990) The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell.* 63(4):851–859.
- Banerjee HN und Verma M** (2007) Tumor Suppressor Genes. In: *Tumor Suppressor Genes. Polinsky KR (Hrg.)* Nova Biomedical Books, New York, 19–33.
- Barker D, Wright E, Nguyen K, Cannon L, Fain P, Goldgar D, Bishop DT, Carey J, Baty B, Kivlin J, Willard H, Wayne JS, Greig G, Leinwand L, Nakamura Y, O'Connell P, Leppert M, Lalouel J-M, White R, Skolnick M** (1987) Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science.* 236(4805):1100–1102.
- Bitgood MJ und McMahon AP** (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol.* 172(1):126–138.
- Blakeley JO und Plotkin SR** (2016) Therapeutic advances for the tumors associated with neurofibromatosis type 1, type 2, and schwannomatosis. *Neuro Oncol.* 18(5):624–638.
- Blanchard G, Lafforgue M-P, Lion-François L, Kemlin I, Rodriguez D, Castelnau P, Carneiro M, Meyer P, Rivier F, Barbarot S, Chaix Y** (2016) Systematic MRI in NF1 children under six years of age for the diagnosis of optic pathway gliomas. Study and outcome of a French cohort. *Eur J Paediatr Neurol.* 20(2):275–281.
- Bollag G, McCormick F, Clark R** (1993) Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J.* 12(5):1923–1927.

- Boyanapalli M, Lahoud OB, Messiaen L, Kim B, Anderle de Sylor, Marianna S, Duckett SJ, Somara S, Mikol DD** (2006) Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(4):1200–1208.
- Boyd KP, Korf BR, Theos A** (2009) Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol.* 61(1):1–14.
- Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS** (2009) Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors.* 35(3):258–265.
- Braun M, Kirsten R, Rupp NJ, Moch H, Fend F, Wernert N, Kristiansen G, Perner S** (2013) Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histol Histopathol.* 28(5):605–610.
- Brems H, Beert E, Ravel T de, Legius E** (2009) Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol.* 10(5):508–515.
- Briscoe J und Théron PP** (2013) The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(7):416–429.
- Brosseau J-P, Liao C-P, Wang Y, Ramani V, Vandergriff T, Lee M, Patel A, Ariizumi K, Le LQ** (2018) NF1 heterozygosity fosters de novo tumorigenesis but impairs malignant transformation. *Nat Commun.* 9(1):1–11.
- Brossier NM und Carroll SL** (2012) Genetically engineered mouse models shed new light on the pathogenesis of neurofibromatosis type I-related neoplasms of the peripheral nervous system. *Brain Res Bull.* 88(1):58–71.
- Brunetti-Pierri N, Doty SB, Hicks J, Phan K, Mendoza-Londono R, Blazo M, Tran A, Carter S, Lewis RA, Plon SE, Phillips WA, O'Brian Smith E, Ellis KJ, Lee B** (2008) Generalized metabolic bone disease in Neurofibromatosis type I. *Mol Genet Metab.* 94(1):105–111.

- Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, Copeland NG** (1990) Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway. *Nature*. 347(6290):291–294.
- Buchstaller J, Clapp DW, Parada LF, Zhu Y** (2012) Cell of Origin and the Contribution of Microenvironment in NF1 Tumorigenesis and Therapeutic Implications. In: *Neurofibromatosis Type 1*. Upadhyaya M, Cooper DN (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 549–568.
- Burgdorf WHC und Zelger B** (2004) JXG, NF1, and JMML: alphabet soup or a clinical issue? *Pediatr Dermatol*. 21(2):174–176.
- Butler SJ und Bronner ME** (2015) From classical to current: analyzing peripheral nervous system and spinal cord lineage and fate. *Dev Biol*. 398(2):135–146.
- Campbell VL** (2018) The role of the hedgehog signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *PhD thesis*. University of Glasgow.
- Campen CJ und Gutmann DH** (2018) Optic Pathway Gliomas in Neurofibromatosis Type 1. *J Child Neurol*. 33(1):73–81.
- Carey JC und Viskochil DH** (1999) Neurofibromatosis type 1: A model condition for the study of the molecular basis of variable expressivity in human disorders. *Am J Med Genet*. 89(1):7–13.
- Carrió M, Mazuelas H, Richaud-Patin Y, Gel B, Terribas E, Rosas I, Jimenez-Delgado S, Biayna J, Vendredy L, Blanco I, Castellanos E, Lázaro C, Raya Á, Serra E** (2019) Reprogramming Captures the Genetic and Tumorigenic Properties of Neurofibromatosis Type 1 Plexiform Neurofibromas. *Stem Cell Reports*. 12(3):639–648.
- Carroll SL** (2012) Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. *Acta Neuropathol*. 123(3):321–348.
- Carroll SL und Ratner N** (2008) How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1? *Glia*. 56(14):1590–1605.
- Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, White R** (1990) A major

segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell*. 62(1):193–201.

Chapouly C, Yao Q, Vandierdonck S, Larrieu-Lahargue F, Mariani JN, Gadeau A-P, Renault M-A (2016) Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc Res*. 109(2):217–227.

Chen Z, Liu C, Patel AJ, Liao C-P, Wang Y, Le LQ (2014) Cells of origin in the embryonic nerve roots for NF1-associated plexiform neurofibroma. *Cancer Cell*. 26(5):695–706.

Chen Z, Mo J, Brosseau J-P, Shipman T, Wang Y, Liao C-P, Cooper JM, Allaway RJ, Gosline SJC, Guinney J, Carroll TJ, Le LQ (2019) Spatiotemporal Loss of NF1 in Schwann Cell Lineage Leads to Different Types of Cutaneous Neurofibroma Susceptible to Modification by the Hippo Pathway. *Cancer Discov*. 9(1):114–129.

Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM (2012) Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 60(1):87–117.

Cichowski K und Jacks T (2001) NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*. 104(4):593–604.

Clementi M, Barbujani G, Turolla L, Tenconi R (1990) Neurofibromatosis-1: a maximum likelihood estimation of mutation rate. *Hum Genet*. 84(2):116–118.

Clementi M, Milani S, Mammi I, Boni S, Monciotti C, Tenconi R (1999) Neurofibromatosis type 1 growth charts. *Am J Med Genet*. 87(4):317–323.

Colman SD, Williams CA, Wallace MR (1995) Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. *Nat Genet*. 11(1):90–92.

Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, Philips AD, Evans K, Heywood S, Hayden MJ, Chapman MM, Mort ME, Azevedo L, Mort M (2017) The Human Gene Mutation Database. At the Institute of Medical Genetics in Cardiff [Online im Internet] URL:

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NF1> [Stand: 13.02.2019, 12:50Uhr].

- Coover RA, Healy TE, Guo L, Chaney KE, Hennigan RF, Thomson CS, Aschbacher-Smith LE, Jankowski MP, Ratner N** (2018) Tonic ATP-mediated growth suppression in peripheral nerve glia requires arrestin-PP2 and is evaded in NF1. *Acta Neuropathol Commun.* 6(1:127):1–15.
- Crane JF und Trainor PA** (2006) Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:267–286.
- Crawford AH und Herrera-Soto J** (2007) Scoliosis associated with neurofibromatosis. *Orthop Clin North Am.* 38(4):553-562, vii.
- Crawford AH und Schorry EK** (1999) Neurofibromatosis in children: the role of the orthopaedist. *J Am Acad Orthop Surg.* 7(4):217–230.
- Cui Y und Morrison H** (2019) Construction of cloning-friendly minigenes for mammalian expression of full-length human NF1 isoforms. *Hum Mutat.* 40(2):187–192.
- D'Angelo I, Welti S, Bonneau F, Scheffzek K** (2006) A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep.* 7(2):174–179.
- Darrigo LG, Geller M, Bonalumi Filho A, Azulay DR** (2007) Prevalence of plexiform neurofibroma in children and adolescents with type I neurofibromatosis. *J Pediatr (Rio J).* 83(6):571–573.
- Dasgupta B, Dugan LL, Gutmann DH** (2003) The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *J Neurosci.* 23(26):8949–8954.
- Daston MM, Scrable H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N** (1992) The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron.* 8(3):415–428.
- De Schepper S, Boucneau JMA, Westbroek W, Mommaas M, Onderwater J, Messiaen L, Naeyaert J-MAD, Lambert JLW** (2006)

Neurofibromatosis type 1 protein and amyloid precursor protein interact in normal human melanocytes and colocalize with melanosomes. *J Invest Dermatol.* 126(3):653–659.

De Schepper S, Maertens O, Callens T, Naeyaert J-M, Lambert J, Messiaen L (2008) Somatic mutation analysis in NF1 café au lait spots reveals two NF1 hits in the melanocytes. *J Invest Dermatol.* 128(4):1050–1053.

DeBella K, Szudek J, Friedman JM (2000) Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics.* 105(3 Pt 1):608–614.

Dombi E, Baldwin A, Marcus LJ, Fisher MJ, Weiss B, Kim A, Whitcomb P, Martin S, Aschbacher-Smith LE, Rizvi TA, Wu J, Ershler R, Wolters P, Therrien J, Glod J, Belasco JB, Schorry E, Brofferio A, Starosta AJ, Gillespie A, Doyle AL, Ratner N, Widemann BC (2016) Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1-Related Plexiform Neurofibromas. *N Engl J Med.* 375(26):2550–2560.

Donaldson JG (2015) Immunofluorescence Staining. *Curr Protoc Cell Biol.* 69:4.3.1-4.3.7.

Du Prel J-B, Röhrig B, Hommel G, Blettner M (2010) Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int.* 107(19):343–348.

Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM (1986) Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer.* 57(10):2006–2021.

Dugoff L und Sujansky E (1996) Neurofibromatosis type 1 and pregnancy. *Am J Med Genet.* 66(1):7–10.

Dunn GP, Spiliopoulos K, Plotkin SR, Hornicek FJ, Harmon DC, Delaney TF, Williams Z (2013) Role of resection of malignant peripheral nerve sheath tumors in patients with neurofibromatosis type 1. *J Neurosurg.* 118(1):142–148.

Duong TA, Bastuji-Garin S, Valeyrie-Allanore L, Sbidian E, Ferkal S, Wolkenstein P (2011) Evolving pattern with age of cutaneous signs

in neurofibromatosis type 1: a cross-sectional study of 728 patients. *Dermatology (Basel)*. 222(3):269–273.

Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BA (1993) An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet*. 53(2):305–313.

Ehara Y, Yamamoto O, Kosaki K, Yoshida Y (2018) Natural course and characteristics of cutaneous neurofibromas in neurofibromatosis 1. *J Dermatol*. 45(1):53–57.

Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G (2000) Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet*. 66(2):393–401.

Elefteriou F, Kolanczyk M, Schindeler A, Viskochil DH, Hock JM, Schorry EK, Crawford AH, Friedman JM, Little D, Peltonen J, Carey JC, Feldman D, Yu X, Armstrong L, Birch P, Kendler DL, Mundlos S, Yang F-C, Agiostratidou G, Hunter-Schaedle K, Stevenson DA (2009) Skeletal abnormalities in neurofibromatosis type 1: approaches to therapeutic options. *Am J Med Genet A*. 149A(10):2327–2338.

Endo H, Oikawa A, Utani A, Shinkai H (2004) Plexiform neurofibromas express the transcription factor Gli1. *Dermatology (Basel)*. 209(4):284–287.

Endo H, Utani A, Matsumoto F, Kuroki T, Yoshimoto S, Ichinose M, Shinkai H (2002a) A possible paracrine hedgehog signaling pathway in neurofibromas from patients with neurofibromatosis type 1. *Br J Dermatol*. 148(2):337–341.

Endo H, Utani A, Shinkai H (2002b) Desert hedgehog signalling pathway is involved in the proliferation of a malignant peripheral nerve sheath tumour-derived cell line from neurofibromatosis type 1. *Br J Dermatol*. 147(4):821–822.

Erlandson RA und Woodruff JM (1982) Peripheral nerve sheath tumors: an electron microscopic study of 43 cases. *Cancer*. 49(2):273–287.

Evans D, Baser M, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 39(5):311–314.

- Evans DGR, Salvador H, Chang VY, Erez A, Voss SD, Schneider KW, Scott HS, Plon SE, Tabori U** (2017) Cancer and Central Nervous System Tumor Surveillance in Pediatric Neurofibromatosis 1. *Clin Cancer Res.* 23(12):e46-e53.
- Evans HL** (2013) Sporadic superficial diffuse neurofibromas with repeated local recurrence over many years and a tendency toward malignant change: a report of 3 cases. *Am J Surg Pathol.* 37(7):987–994.
- Farid M, Demicco EG, Garcia R, Ahn L, Merola PR, Cioffi A, Maki RG** (2014) Malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncologist.* 19(2):193–201.
- Ferner RE** (2011) Neurofibromatosis 1. In: *Neurofibromatoses in Clinical Practice.* Ferner RE, Huson SM, Evans DGR (Hrg.) Springer, London, 1–46.
- Ferner RE, Golding JF, Smith M, Calonje E, Jan W, Sanjayanathan V, O'Doherty M** (2008) [18F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG PET) as a diagnostic tool for neurofibromatosis 1 (NF1) associated malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs): a long-term clinical study. *Ann Oncol.* 19(2):390–394.
- Ferner RE und Gutmann DH** (2002) International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res.* 62(5):1573–1577.
- Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, Upadhyaya M, Towers R, Gleeson M, Steiger C, Kirby A** (2007) Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 44(2):81–88.
- Ferner RE, Lucas JD, O'Doherty MJ, Hughes RA, Smith MA, Cronin BF, Bingham J** (2000) Evaluation of (18)fluorodeoxyglucose positron emission tomography ((18)FDG PET) in the detection of malignant peripheral nerve sheath tumours arising from within plexiform neurofibromas in neurofibromatosis 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 68(3):353–357.

- Fountain JW, Wallace MR, Bruce MA, Seizinger BR, Menon AG, Gusella JF, Michels VV, Schmidt MA, Dewald GW, Collins FS** (1989) Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis. *Science*. 244(4908):1085–1087.
- Freret ME, Anastasaki C, Gutmann DH** (2018) Independent NF1 mutations underlie café-au-lait macule development in a woman with segmental NF1. *Neurol Genet*. 4(4):e261.
- Frezza E, Martin J, Lavery R** (2018) A molecular dynamics study of adenylyl cyclase: The impact of ATP and G-protein binding. *PLoS ONE*. 13(4):e0196207.
- Friedman JM, Arbiser J, Epstein JA, Gutmann DH, Huot SJ, Lin AE, McManus B, Korf BR** (2002) Cardiovascular disease in neurofibromatosis 1: report of the NF1 Cardiovascular Task Force. *Genet Med*. 4(3):105–111.
- Friedman JM und Birch PH** (1997) Type 1 neurofibromatosis. A descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients. *Am J Med Genet*. 70(2):138–143.
- Friedrich RE, Naber U, Glatzel M, Hagel C** (2015) Vessel and Mast Cell Densities in Sporadic and Syndrome-associated Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Anticancer Res*. 35(9):4713–4722.
- Fritsch P und Schwarz T** (2018) Erbliche Krankheiten der Haut. In: *Dermatologie Venerologie*. Fritsch P, Schwarz T (Hrg.) 3. vollständig überarbeitete Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 623–711.
- Garrouche N, Ben Abdallah A, Arifa N, Hasni I, Ben Cheikh Y, Ben Farhat W, Ben Amor S, Jemni H** (2018) Spectrum of gastrointestinal lesions of neurofibromatosis type 1: a pictorial review. *Insights Imaging*. 9(5):661–671.
- Girish V und Vijayalakshmi A** (2004) Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*. 41(1):47.
- Goldgar DE, Green P, Parry DM, Mulvihill JJ** (1989) Multipoint linkage analysis in neurofibromatosis type I: an international collaboration. *Am J Hum Genet*. 44(1):6–12.

- Gottfried ON, Viskochil DH, Couldwell WT** (2010) Neurofibromatosis Type 1 and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurosurg Focus*. 28(1):E8.
- Gottfried ON, Viskochil DH, Fults DW, Couldwell WT** (2006) Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromas and surgical implications. *Neurosurgery*. 58(1):1–16.
- Granström S, Langenbruch A, Augustin M, Mautner V-F** (2012) Psychological burden in adult neurofibromatosis type 1 patients: impact of disease visibility on body image. *Dermatology (Basel)*. 224(2):160–167.
- Guo HF, The I, Hannan F, Bernards A, Zhong Y** (1997) Requirement of Drosophila NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science*. 276(5313):795–798.
- Gutmann DH** (1997) The Diagnostic Evaluation and Multidisciplinary Management of Neurofibromatosis 1 and Neurofibromatosis 2. *JAMA*. 278(1):51–57.
- Gutmann DH** (2014) NF GEMMs already! The power and promise of mouse tumor models. *Cancer Cell*. 26(5):596–599.
- Gutmann DH und Collins FS** (1993) The neurofibromatosis type 1 gene and its protein product, neurofibromin. *Neuron*. 10(3):335–343.
- Gutmann DH, Ferner RE, Listernick RH, Korf BR, Wolters PL, Johnson KJ** (2017) Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*. 3:17004.
- Gutmann DH, Wood DL, Collins FS** (1991) Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(21):9658–9662.
- Hagel C, Behrens T, Prehm P, Schnabel C, Glatzel M, Friedrich RE** (2012) Hyaluronan in intra-operative edema of NF1-associated neurofibromas. *Neuropathology*. 32(4):406–414.
- Hakimi M-A, Speicher DW, Shiekhattar R** (2002) The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis. *J Biol Chem*. 277(40):36909–36912.
- Hansen TM, Batra S, Lim M, Gallia GL, Burger PC, Salvatori R, Wand G, Quinones-Hinojosa A, Kleinberg L, Redmond KJ** (2014) Invasive

adenoma and pituitary carcinoma: a SEER database analysis. *Neurosurg Rev.* 37(2):279-286.

Hantschke M und **Palmedo G** (2015) Immunhistologische Techniken. In: *Histopathologie der Haut. Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H (Hrg.)* Living Reference Work, Continuously updated edition, Springer, Berlin, Heidelberg, 1–28.

Hayes TK, Stratford JK, Wang-Gillam A, Der CJ (2014) RAS Genes and Cancer. In: *Ras superfamily small G proteins. Wittinghofer A (Hrg.)* Springer, Wien, 157–171.

Higham CS, Steinberg SM, Dombi E, Perry A, Helman LJ, Schuetze SM, Ludwig JA, Staddon A, Milhem MM, Rushing D, Jones RL, Livingston M, Goldman S, Moertel C, Wagner L, Janhofer D, Annunziata CM, Reinke D, Long L, Viskochil D, Baker L, Widemann BC (2017) SARC006: Phase II Trial of Chemotherapy in Sporadic and Neurofibromatosis Type 1 Associated Chemotherapy-Naive Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Sarcoma.* 2017:8685638.

Hirbe AC und **Gutmann DH** (2014) Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol.* 13(8):834–843.

Hirose T, Tani T, Shimada T, Ishizawa K, Shimada S, Sano T (2003) Immunohistochemical demonstration of EMA/Glut1-positive perineurial cells and CD34-positive fibroblastic cells in peripheral nerve sheath tumors. *Mod Pathol.* 16(4):293–298.

Hsueh YP, Roberts AM, Volta M, Sheng M, Roberts RG (2001) Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J Neurosci.* 21(11):3764–3770.

Hui C-C und **Angers S** (2011) Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:513–537.

Hui L und **Chen Y** (2015) Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 368(1):7–13.

- Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS** (1989) A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet.* 26(11):704–711.
- Huson SM, Harper PS, Compston DAS** (1988) Von Recklinghausen Neurofibromatosis. A clinical and Population Study in South-East Wales. *Brain.* 111(6):1355–1381.
- Huson SM und Korf BR** (2013) The Phakomatoses. In: *Emery & Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics.* Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf B (Hrg.) Elsevier Science, Burlington, 1–45.
- Hyman SL, Shores A, North KN** (2005) The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology.* 65(7):1037–1044.
- Inoue T, Kuwashiro M, Misago N, Narisawa Y** (2014) Superficial malignant peripheral nerve sheath tumor arising from diffuse neurofibroma in a neurofibromatosis type 1 patient. *J Dermatol.* 41(7):631–633.
- Isakov O, Wallis D, Evans DG, Ben-Shachar S** (2018) Exhaustive non-synonymous variants functionality prediction enables high resolution characterization of the neurofibromin architecture. *EBioMedicine.* 36:508–516.
- Izawa I, Tamaki N, Saya H** (1996) Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 382(1-2):53–59.
- Jaakkola S, Peltonen J, Riccardi V, Chu ML, Uitto J** (1989) Type 1 neurofibromatosis: selective expression of extracellular matrix genes by Schwann cells, perineurial cells, and fibroblasts in mixed cultures. *J Clin Invest.* 84(1):253–261.
- Jessen KR und Mirsky R** (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci.* 6(9):671–682.
- Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC** (2015) Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(7):a020487.

- Jung J, Frump D, Su J, Wang W, Mozaffar T, Gupta R** (2015) Desert hedgehog is a mediator of demyelination in compression neuropathies. *Exp Neurol.* 271:84–94.
- Kahn J, Gillespie A, Tsokos M, Ondos J, Dombi E, Camphausen K, Widemann BC, Kaushal A** (2014) Radiation therapy in management of sporadic and neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *Front Oncol.* 4:324.
- Karwacki MW und Wozniak W** (2012) The Skeleton Abnormalities in Patients with Neurofibromatosis Type 1: Important Consequences of Abnormal Gene Function. In: *Osteoporosis. Dionyssiotis Y (Hrg.)* InTech, 323–342.
- Kehrer-Sawatzki H und Mautner V-F** (2009) Klinik und Genetik der Neurofibromatose Typ 1. *medgen.* 21(4):519–531.
- Kimura M, Kamata Y, Matsumoto K, Takaya H** (1974) Electron microscopical study on the tumor of von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Acta Pathol Jpn.* 24(1):79–91.
- Kinori M, Hodgson N, Zeid JL** (2018) Ophthalmic manifestations in neurofibromatosis type 1. *Surv Ophthalmol.* 63(4):518–533.
- Kipanyula MJ, Kimaro WH, Yepnjio FN, Aldebasi YH, Farahna M, Nwabo Kamdje AH, Abdel-Magied EM, Seke Etet PF** (2014) Signaling pathways bridging fate determination of neural crest cells to glial lineages in the developing peripheral nervous system. *Cell Signal.* 26(4):673–682.
- Kluwe L, Friedrich R, Mautner VF** (1999) Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer.* 24(3):283–285.
- Kluwe L, Hagel C, Mautner V** (2007) Nervous system: Neurofibroma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 4(11):344–347.
- Knudson AG** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68(4):820–823.
- Kong JH, Siebold C, Rohatgi R** (2019) Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development.* 146(10):dev166892.

- Korf BR** (1992) Diagnostic outcome in children with multiple café au lait spots. *Pediatrics*. 90(6):924–927.
- Korf BR** (2013) Neurofibromatosis. In: *Pediatric neurology ; Pt. 1. Dulac O, Lassonde M, Sarnat HB, Aminoff MJ (Hrg.) 1*, Elsevier, Edinburgh, 333–340.
- Kraniak JM, Chalasani A, Wallace MR, Mattingly RR** (2018) Development of 3D culture models of plexiform neurofibroma and initial application for phenotypic characterization and drug screening. *Exp Neurol*. 299(Pt B):289–298.
- Kuberappa PH, Bagalad BS, Ananthaneni A, Kiresur MA, Srinivas GV** (2016) Certainty of S100 from Physiology to Pathology. *J Clin Diagn Res*. 10(6):ZE10-15.
- Kweh F, Zheng M, Kurenova E, Wallace M, Golubovskaya V, Cance WG** (2009) Neurofibromin physically interacts with the N-terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Carcinog*. 48(11):1005–1017.
- Lammert M, Friedman JM, Kluwe L, Mautner VF** (2005) Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment. *Arch Dermatol*. 141(1):71–74.
- Le LQ, Shipman T, Burns DK, Parada LF** (2009) Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas. *Cell Stem Cell*. 4(5):453–463.
- Le Guellec S, Decouvelaere A-V, Filleron T, Valo I, Charon-Barra C, Robin Y-M, Terrier P, Chevreau C, Coindre J-M** (2016) Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Is a Challenging Diagnosis: A Systematic Pathology Review, Immunohistochemistry, and Molecular Analysis in 160 Patients From the French Sarcoma Group Database. *Am J Surg Pathol*. 40(7):896–908.
- Lee EY, Ji H, Ouyang Z, Zhou B, Ma W, Vokes SA, McMahon AP, Wong WH, Scott MP** (2010) Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(21):9736–9741.

- Lee MJ** und **Stephenson DA** (2007) Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol.* 20(2):135–141.
- Legius E, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW** (1993) Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nat Genet.* 3(2):122–126.
- Lemke G** und **Axel R** (1985) Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell.* 40(3):501–508.
- Lèvy P, Bièche I, Leroy K, Parfait B, Wechsler J, Laurendeau I, Wolkenstein P, Vidaud M, Vidaud D** (2004a) Molecular Profiles of Neurofibromatosis Type 1-Associated Plexiform Neurofibromas: Identification of a Gene Expression Signature of Poor Prognosis. *Clinical Cancer Research*(10):3763–3771.
- Lèvy P, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G, Parfait B, Wolkenstein P, Vidaud M, Bièche I** (2004b) Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Mol Cancer.* 3:20.
- Leyton L** und **Hagood JS** (2014) Thy-1 Modulates Neurological Cell–Cell and Cell–Matrix Interactions Through Multiple Molecular Interactions. In: *Cell Adhesion Molecules. Berezin V, Walmod PS (Hrg.)* Springer, New York, 3–20.
- Liao C-P, Booker RC, Brosseau J-P, Chen Z, Mo J, Tchegnon E, Wang Y, Clapp DW, Le LQ** (2018) Contributions of inflammation and tumor microenvironment to neurofibroma tumorigenesis. *J Clin Invest.* 128(7):2848–2861.
- Liao C-P, Pradhan S, Chen Z, Patel AJ, Booker RC, Le LQ** (2016) The role of nerve microenvironment for neurofibroma development. *Oncotarget.* 7(38):61500–61508.
- Lin F** und **Shi J** (2015) Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry. In: *Handbook of Practical Immunohistochemistry. Lin F, Prichard J (Hrg.)* 2nd ed. 2015, Springer, New York, 17–30.

- Lisch K** (1937) Ueber Beteiligung der Augen, insbesondere das Vorkommen von Irisknötchen bei der Neurofibromatose (Recklinghausen). *Ophthalmologica*. 93(3):137–143.
- Listernick R, Charrow J, Greenwald M, Mets M** (1994) Natural history of optic pathway tumors in children with neurofibromatosis type 1: a longitudinal study. *J Pediatr*. 125(1):63–66.
- Listernick R, Charrow J, Greenwald MJ, Esterly NB** (1989) Optic gliomas in children with neurofibromatosis type 1. *J Pediatr*. 114(5):788–792.
- Listernick R, Ferner RE, Liu GT, Gutmann DH** (2007) Optic pathway gliomas in neurofibromatosis-1: controversies and recommendations. *Ann Neurol*. 61(3):189–198.
- Listernick R, Ferner RE, Piersall L, Sharif S, Gutmann DH, Charrow J** (2004) Late-onset optic pathway tumors in children with neurofibromatosis 1. *Neurology*. 63(10):1944–1946.
- Listernick R, Louis DN, Packer RJ, Gutmann DH** (1997) Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force. *Ann Neurol*. 41(2):143–149.
- Littler M** und **Morton NE** (1990) Segregation analysis of peripheral neurofibromatosis (NF1). *J Med Genet*. 27(5):307–310.
- Liu Z, Jin Y-Q, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, Wu W, Qi Z, Shen Z** (2015) Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS ONE*. 10(4):e0123278.
- Longo JF, Weber SM, Turner-Ivey BP, Carroll SL** (2018) Recent Advances in the Diagnosis and Pathogenesis of Neurofibromatosis Type 1 (NF1)-associated Peripheral Nervous System Neoplasms. *Adv Anat Pathol*. 25(5):353–368.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O d., Cavenee WK** (2016) WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Lubs ML, Bauer MS, Formas ME, Djokic B** (1991) Lisch nodules in neurofibromatosis type 1. *N Engl J Med*. 324(18):1264–1266.

- Lupatov AY, Vdovin AS, Vakhrushev IV, Poltavtseva RA, Yarygin KN** (2015) Comparative analysis of the expression of surface markers on fibroblasts and fibroblast-like cells isolated from different human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 158(4):537–543.
- Lutterodt CG, Mohan A, Kirkpatrick N** (2016) The use of electrodesiccation in the treatment of cutaneous neurofibromatosis: A retrospective patient satisfaction outcome assessment. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 69(6):765–769.
- Madanikia SA, Bergner A, Ye X, Blakeley JO** (2012) Increased risk of breast cancer in women with NF1. *Am J Med Genet A.* 158A(12):3056–3060.
- Maertens O, Brems H, Vandesompele J, Raedt T de, Heyns I, Rosenbaum T, Schepper S de, Paepe A de, Mortier G, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L** (2006) Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat.* 27(10):1030–1040.
- Mangoura D, Sun Y, Li C, Singh D, Gutmann DH, Flores A, Ahmed M, Vallianatos G** (2006) Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. *Oncogene.* 25(5):735–745.
- Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol R, Swaroop M, Wallace MR, Andersen LB, Mitchell AL, Gutmann DH, Boguski M, Collins FS** (1991) cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. *Genomics.* 11(4):931–940.
- Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, Innis MA, McCormick F** (1990) The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell.* 63(4):843–849.
- Mautner VF, Friedrich RE, Deimling A von, Hagel C, Korf B, Knöfel MT, Wenzel R, Fünsterer C** (2003) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis type 1: MRI supports the diagnosis of malignant plexiform neurofibroma. *Neuroradiology.* 45(9):618–625.

- Mautner VF, Hartmann M, Kluwe L, Friedrich RE, Fünsterer C** (2006) MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology*. 48(3):160–165.
- Mautner V-F, Asuagbor FA, Dombi E, Fünsterer C, Kluwe L, Wenzel R, Widemann BC, Friedman JM** (2008) Assessment of benign tumor burden by whole-body MRI in patients with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol*. 10(4):593–598.
- McCaughan JA, Holloway SM, Davidson R, Lam WW** (2007) Further evidence of the increased risk for malignant peripheral nerve sheath tumour from a Scottish cohort of patients with neurofibromatosis type 1. *J Med Genet*. 44(7):463–466.
- McGaughan JM, Harris DI, Donnai D, Teare D, MacLeod R, Westerbeek R, Kingston H, Super M, Harris R, Evans DG** (1999) A clinical study of type 1 neurofibromatosis in north west England. *J Med Genet*. 36(3):197–203.
- Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, van Roy N, Speleman F, Paepe AD** (2000) Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat*. 15(6):541–555.
- Miettinen M** (2016) Nerve sheath tumors. In: *Modern soft tissue pathology*. Miettinen MM (Hrg.) Second edition, Cambridge University Press, Cambridge, 637–693.
- Miettinen MM, Antonescu CR, Fletcher CDM, Kim A, Lazar AJ, Quezado MM, Reilly KM, Stemmer-Rachamimov A, Stewart DR, Viskochil D, Widemann B, Perry A** (2017) Histopathologic evaluation of atypical neurofibromatous tumors and their transformation into malignant peripheral nerve sheath tumor in patients with neurofibromatosis 1-a consensus overview. *Hum Pathol*. 67:1–10.
- Miller SJ, Jessen WJ, Mehta T, Hardiman A, Sites E, Kaiser S, Jegga AG, Li H, Upadhyaya M, Giovannini M, Muir D, Wallace MR, Lopez E, Serra E, Nielsen GP, Lazaro C, Stemmer-Rachamimov A, Page G, Aronow BJ, Ratner N** (2009) Integrative genomic analyses of

neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. *EMBO Mol Med.* 1(4):236–248.

Mizisin AP und Weerasuriya A (2011) Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol.* 121(3):291–312.

Moramarco A, Giustini S, Nofroni I, Mallone F, Miraglia E, Iacovino C, Calvieri S, Lambiase A (2018) Near-infrared imaging: an in vivo, non-invasive diagnostic tool in neurofibromatosis type 1. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 256(2):307–311.

Moreau N, Mauborgne A, Bourgoin S, Couraud P-O, Romero IA, Weksler BB, Villanueva L, Pohl M, Boucher Y (2016) Early alterations of Hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation, and neuropathic pain development. *Pain.* 157(4):827–839.

Mutterer J und Zinck E (2013) Quick-and-clean article figures with FigureJ. *J Microsc.* 252(1):89–91.

National Library of Medicine (2019) ClinicalTrials.gov. Neurofibromatosis 1 - ongoing Drug Studies [Online im Internet] URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Neurofibromatosis+1+AND+Neurofibromatosis+Type+1+%28NF1%29&cond=Neurofibromatosis+1&intr=Drug&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=Intr&rslt= [Stand: 17.04.2019, 12:36].

Needle MN, Cnaan A, Dattilo J, Chatten J, Phillips PC, Shochat S, Sutton LN, Vaughan SN, Zackai EH, Zhao H, Molloy PT (1997) Prognostic signs in the surgical management of plexiform neurofibroma: the Children's Hospital of Philadelphia experience, 1974-1994. *J Pediatr.* 131(5):678–682.

Nguyen R, Dombi E, Widemann BC, Solomon J, Fuensterer C, Kluwe L, Friedman JM, Mautner V-F (2012) Growth dynamics of plexiform

neurofibromas: a retrospective cohort study of 201 patients with neurofibromatosis 1. *Orphanet J Rare Dis.* 7:75.

Nguyen R, Kluwe L, Fuensterer C, Kentsch M, Friedrich RE, Mautner V-F (2011) Plexiform neurofibromas in children with neurofibromatosis type 1: frequency and associated clinical deficits. *J Pediatr.* 159(4):652-655.e2.

Nilforoushzadeh MA, Ahmadi Ashtiani HR, Jaffary F, Jahangiri F, Nikkhah N, Mahmoudbeyk M, Fard M, Ansari Z, Zare S (2017) Dermal Fibroblast Cells: Biology and Function in Skin Regeneration. *J Skin Stem Cell.* 4(2):e69080.

North K (1993) Neurofibromatosis type 1: review of the first 200 patients in an Australian clinic. *J Child Neurol.* 8(4):395–402.

North KN, Riccardi V, Samango-Sprouse C, Ferner R, Moore B, Legius E, Ratner N, Denckla MB (1997) Cognitive function and academic performance in neurofibromatosis. 1: consensus statement from the NF1 Cognitive Disorders Task Force. *Neurology.* 48(4):1121–1127.

Obringer AC, Meadows AT, Zackai EH (1989) The diagnosis of neurofibromatosis-1 in the child under the age of 6 years. *Am J Dis Child.* 143(6):717–719.

O'Connell P, Leach R, Cawthon RM, Culver M, Stevens J, Viskochil D, Fournier RE, Rich DC, Ledbetter DH, White R (1989) Two NF1 translocations map within a 600-kilobase segment of 17q11.2. *Science.* 244(4908):1087–1088.

Olsen SH, Thomas DG, Lucas DR (2006) Cluster analysis of immunohistochemical profiles in synovial sarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, and Ewing sarcoma. *Mod Pathol.* 19(5):659–668.

Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR, Mirsky R (1999) Schwann Cell-Derived Desert Hedgehog Controls the Development of Peripheral Nerve Sheaths. *Neuron.* 23(4):713–724.

- Paulus W** und **Hasselblatt M** (2012) Tumoren. In: *Neuropathologie*. Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W, Paulus W, Schröder JM (Hrg.) 3, Springer, Berlin, Heidelberg, 481–542.
- Payne JM, Hyman SL, Shores EA, North KN** (2011) Assessment of executive function and attention in children with neurofibromatosis type 1: relationships between cognitive measures and real-world behavior. *Child Neuropsychol.* 17(4):313–329.
- Peltonen J, Jaakkola S, Lebwohl M, Renvall S, Risteli L, Virtanen I, Uitto J** (1988) Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis. *Lab Invest.* 59(6):760–771.
- Peltonen J, Jouhilahti E-M, Peltonen S** (2012) Molecular and Cellular Basis of Human Cutaneous Neurofibromas and Their Development. In: *Neurofibromatosis Type 1*. Upadhyaya M, Cooper DN (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 393–403.
- Pemov A, Li H, Patidar R, Hansen NF, Sindiri S, Hartley SW, Wei JS, Elkahloun A, Chandrasekharappa SC, Boland JF, Bass S, Mullikin JC, Khan J, Widemann BC, Wallace MR, Stewart DR** (2017) The primacy of NF1 loss as the driver of tumorigenesis in neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. *Oncogene.* 36(22):3168–3177.
- Pereira J, Johnson WE, O'Brien SJ, Jarvis ED, Zhang G, Gilbert MTP, Vasconcelos V, Antunes A** (2014) Evolutionary genomics and adaptive evolution of the Hedgehog gene family (Shh, Ihh and Dhh) in vertebrates. *PLoS ONE.* 9(12):e74132.
- Perentes E, Nakagawa Y, Ross GW, Stanton C, Rubinstein LJ** (1987) Expression of epithelial membrane antigen in perineurial cells and their derivatives. An immunohistochemical study with multiple markers. *Acta Neuropathol.* 75(2):160–165.
- Perry A, von Deimling A, Louis DN, Hunter S, Reuss DE, Antonescu CR** (2016) Neurofibroma. In: *WHO classification of tumours of the central nervous system*. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O d., Cavenee WK

(Hrg.) Revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 219–221.

- Petersen KH, Lohse J, Ramsgaard L** (2018) Automated sequential chromogenic IHC double staining with two HRP substrates. *PLoS ONE*. 13(11):e0207867.
- Plotkin SR, Bredella MA, Cai W, Kassanjian A, Harris GJ, Esparza S, Merker VL, Munn LL, Muzikansky A, Askenazi M, Nguyen R, Wenzel R, Mautner VF** (2012) Quantitative assessment of whole-body tumor burden in adult patients with neurofibromatosis. *PLoS ONE*. 7(4):e35711.
- Pongpudpunth M, Bhawan J, Al-Natour SH, Mahalingam M** (2010) Nestin-Positive Stem Cells in Neurofibromas From Patients With Neurofibromatosis Type 1—Tumorigenic or Incidental? *Am J Dermatopathol*. 32(6):574–577.
- Poyhonen M, Kytölä S, Leisti J** (2000) Epidemiology of neurofibromatosis type 1 (NF1) in northern Finland. *J Med Genet*. 37(8):632–636.
- Prada CE, Hufnagel RB, Hummel TR, Lovell AM, Hopkin RJ, Saal HM, Schorry EK** (2015) The Use of Magnetic Resonance Imaging Screening for Optic Pathway Gliomas in Children with Neurofibromatosis Type 1. *J Pediatr*. 167(4):851-856.e1.
- Prada CE, Rangwala FA, Martin LJ, Lovell AM, Saal HM, Schorry EK, Hopkin RJ** (2012) Pediatric plexiform neurofibromas: impact on morbidity and mortality in neurofibromatosis type 1. *J Pediatr*. 160(3):461–467.
- Prasad K und Prabhu GK** (2012) Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research—a review. *J Med Syst*. 36(4):2621–2631.
- Püschel L** (2017) Faktoren der Tumorbologie bei peripheren Nervenscheidentumoren. *Dissertation*. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Radomska KJ, Culpier F, Gresset A, Schmitt A, Debbiche A, Lemoine S, Wolkenstein P, Vallat J-M, Charnay P, Topilko P** (2019) Cellular Origin, Tumor Progression, and Pathogenic Mechanisms of

Cutaneous Neurofibromas Revealed by Mice with Nf1 Knockout in Boundary Cap Cells. *Cancer Discov.* 9(1):130–147.

Ragge NK, Falk RE, Cohen WE, Murphree AL (1993) Images of Lisch nodules across the spectrum. *Eye (Lond)*. 7(Pt 1):95–101.

Raju R, Nanjappa V, Balakrishnan L, Radhakrishnan A, Thomas JK, Sharma J, Tian M, Palapetta SM, Subbannayya T, Sekhar NR, Muthusamy B, Goel R, Subbannayya Y, Telikicherla D, Bhattacharjee M, Pinto SM, Syed N, Srikanth MS, Sathe GJ, Ahmad S, Chavan SN, Kumar GSS, Marimuthu A, Prasad TSK, Harsha HC, Rahiman BA, Ohara O, Bader GD, Sujatha Mohan S, Schiemann WP, Pandey A (2011) NetSlim: high-confidence curated signaling maps [Online im Internet] URL: http://www.netpath.org/netslim/hedgehog_pathway.html [Stand: 20.05.2019, 14:42Uhr].

Rasmussen SA, Overman J, Thomson SAM, Colman SD, Abernathy CR, Trimpert RE, Moose R, Viridi G, Roux K, Bauer M, Rojiani AM, Maria BL, Muir D, Wallace MR (2000) Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer*. 28(4):425–431.

Rassner G und Steinert U (2009) Dermatologie. 9., durchges. und aktualisierte Aufl., Elsevier Urban & Fischer, München.

Ratner N und Miller SJ (2015) A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*. 15(5):290–301.

Reuss DE, Louis DN, Hunter S, Perry A, Hirose T, Antonescu CR (2016) Malignant peripheral nerve sheath tumour. In: *WHO classification of tumours of the central nervous system*. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O d., Cavenee WK (Hrg.) Revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 226–229.

Riccardi VM und Lewis RA (1988) Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. *Am J Hum Genet*. 42(2):284–289.

- Rodenhiser DI, Coulter-Mackie MB, Jung JH, Singh SM** (1991) A genetic study of neurofibromatosis 1 in south-western Ontario. I. Population, familial segregation of phenotype, and molecular linkage. *J Med Genet.* 28(11):746–751.
- Rodriguez FJ, Folpe AL, Giannini C, Perry A** (2012) Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. *Acta Neuropathol.* 123(3):295–319.
- Rosser T** (2018) Neurocutaneous Disorders. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 24(1, Child Neurology):96–129.
- Rosser TL, Vezina G, Packer RJ** (2005) Cerebrovascular abnormalities in a population of children with neurofibromatosis type 1. *Neurology.* 64(3):553–555.
- Rubin JB und Gutmann DH** (2005) Neurofibromatosis type 1 - a model for nervous system tumour formation? *Nat Rev Cancer.* 5(7):557–564.
- Salamon J, Papp L, Tóth Z, Laqmani A, Apostolova I, Adam G, Mautner VF, Derlin T** (2015) Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis Type 1: Assessment of Whole-Body Metabolic Tumor Burden Using F-18-FDG PET/CT. *PLoS ONE.* 10(12):e0143305.
- Saper CB und Sawchenko PE** (2003) Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 465(2):161–163.
- Sauvage F de** (2010) Hedgehog Signaling in Development and Disease. In: *Handbook of cell signaling. Dennis EA, Bradshaw RA (Hrg.)* 2nd ed., Elsevier/Academic Press, Amsterdam, Boston, 1879–1884.
- Sav A, Rotondo F, Syro LV, Di Ieva A, Cusimano MD, Kovacs K** (2015) Invasive, atypical and aggressive pituitary adenomas and carcinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 44(1):99–104.
- Sawada S, Florell S, Purandare SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D** (1996) Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. *Nat Genet.* 14(1):110–112.
- Schaefer IM und Fletcher CD** (2015) Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) arising in diffuse-type neurofibroma: clinicopathologic

characterization in a series of 9 cases. *Am J Surg Pathol.* 39(9):1234–1241.

- Scheffzek K und Welti S** (2012) Neurofibromin: Protein Domains and Functional Characteristics. In: *Neurofibromatosis Type 1*. Upadhyaya M, Cooper DN (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 305–326.
- Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Faryniarz AG, Chao MV, Huson S, Korf BR, Parry DM, Pericak-Vance MA, Collins FS, Hobbs WJ, Falcone BG, Iannazzi JA, Roy JC, St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Bothwell MA, Upadhyaya M, Harper P, Goldstein AE, Hoover DL, Bader JL, Spence MA, Mulvihill JJ, Aylsworth AS, Vance JM, Rossenwasser GOD, Gaskell PC, Roses AD, Martuza RL, Breakefield XO, Gusella JF** (1987) Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell.* 49(5):589–594.
- Sergeyev AS** (1975) On the mutation rate of neurofibromatosis. *Humangenetik.* 28(2):129–138.
- Serra E, Puig S, Otero D, Gaona A, Kruyer H, Ars E, Estivill X, Lázaro C** (1997) Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum Genet.* 61(3):512–519.
- Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, Lenard HG, Lázaro C** (2000) Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum Mol Genet.* 9(20):3055–3064.
- Sharghi-Namini S, Turmaine M, Meier C, Sahni V, Umehara F, Jessen KR, Mirsky R** (2006) The Structural and Functional Integrity of Peripheral Nerves Depends on the Glial-Derived Signal Desert Hedgehog. *J Neurosci.* 26(23):6364–6376.
- Sharif S, Moran A, Huson SM, Iddenden R, Shenton A, Howard E, Evans DG** (2007) Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *J Med Genet.* 44(8):481–484.

- Sheela S, Riccardi VM, Ratner N** (1990) Angiogenic and invasive properties of neurofibroma Schwann cells. *J Cell Biol.* 111(2):645–653.
- Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M** (1996) Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet.* 33(1):2–17.
- Simsek FS, Akarsu S, Narin Y** (2019) Can we differentiate malignant peripheral nerve sheath tumor from benign neurofibroma without invasive sampling. *World J Nucl Med.* 18(1):66–68.
- Stefansson K, Wollmann R, Jerkovic M** (1982) S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes. *Am J Pathol.* 106(2):261–268.
- Stemmer-Rachamimov A und Nielsen GP** (2012) Pathologic and Molecular Diagnostic Features of Peripheral Nerve Sheath Tumors in NF1. In: *Neurofibromatosis Type 1. Upadhyaya M, Cooper DN (Hrg.)* Springer, Berlin, Heidelberg, 429–443.
- Stevenson DA, Birch PH, Friedman JM, Viskochil DH, Balestrazzi P, Boni S, Buske A, Korf BR, Niimura M, Pivnick EK, Schorry EK, Short MP, Tenconi R, Tongsgard JH, Carey JC** (1999) Descriptive analysis of tibial pseudarthrosis in patients with neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet.* 84(5):413–419.
- Stumpf DA, Alksne JF, Annegers JF, Brown SS, Conneally PM, Housman D, Leppert M, Miller J. Philip, Moss ML, Pileggi AJ, Rapin I, Strohman RC, Swanson LW, Zimmerman A** (1988) Neurofibromatosis. Conference Statement. *Arch Neurol.* 45(5):575–578.
- Suzuki H, Takahashi K, Kubota Y, Shibahara S** (1992) Molecular cloning of a cDNA coding for neurofibromatosis type 1 protein isoform lacking the domain related to ras GTPase-activating protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 187(2):984–990.
- Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernardis A, Zhong Y** (2002) Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nat Neurosci.* 5(2):95–96.
- Tongsgard JH** (2006) Clinical manifestations and management of neurofibromatosis type 1. *Semin Pediatr Neurol.* 13(1):2–7.

- Tovmassian D, Abdul Razak M, London K** (2016) The Role of [18F]FDG-PET/CT in Predicting Malignant Transformation of Plexiform Neurofibromas in Neurofibromatosis-1. *Int J Surg Oncol.* 2016:6162182.
- Trovó-Marqui AB und Tajara EH** (2006) Neurofibromin. A general outlook. *Clin Genet.* 70(1):1–13.
- Tucker T, Friedman JM, Friedrich RE, Wenzel R, Fünsterer C, Mautner V-F** (2009a) Longitudinal study of neurofibromatosis 1 associated plexiform neurofibromas. *J Med Genet.* 46(2):81–85.
- Tucker T, Riccardi VM, Sutcliffe M, Vielkind J, Wechsler J, Wolkenstein P, Friedman JM** (2011) Different patterns of mast cells distinguish diffuse from encapsulated neurofibromas in patients with neurofibromatosis 1. *J Histochem Cytochem.* 59(6):584–590.
- Tucker T, Schnabel C, Hartmann M, Friedrich RE, Frieling I, Kruse H-P, Mautner V-F, Friedman JM** (2009b) Bone health and fracture rate in individuals with neurofibromatosis 1 (NF1). *J Med Genet.* 46(4):259–265.
- Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M** (2010) Judging a plethora of p-values: how to contend with the problem of multiple testing. Part 10 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int.* 107(4):50–56.
- Viola F, Villani E, Natacci F, Selicorni A, Melloni G, Vezzola D, Barteselli G, Mapelli C, Pirondini C, Ratiglia R** (2012) Choroidal abnormalities detected by near-infrared reflectance imaging as a new diagnostic criterion for neurofibromatosis 1. *Ophthalmology.* 119(2):369–375.
- Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, White R, O'Connell P** (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell.* 62(1):187–192.
- Viskochil D, White R, Cawthon R** (1993) The neurofibromatosis type 1 gene. *Annu Rev Neurosci.* 16:183–205.

- von Recklinghausen DF** (1882) Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen, August Hirschwald Verlag, Berlin.
- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, Brownstein BH, Collins FS** (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*. 249(4965):181–186.
- Wallis D, Li K, Lui H, Hu K, Chen M-J, Li J, Kang J, Das S, Korf BR, Kesterson RA** (2018) Neurofibromin (NF1) genetic variant structure-function analyses using a full-length mouse cDNA. *Hum Mutat*. 39(6):816–821.
- Walls AF, Jones DB, Williams JH, Church MK, Holgate ST** (1990) Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol*. 162(2):119–126.
- Weerasuriya A und Mizisin AP** (2011) The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol*. 686:149–173.
- Welti S, D'Angelo I, Scheffzek K** (2008) Structure and Function of Neurofibromin. In: *Neurofibromatoses*. Kaufmann D (Hrg.) KARGER, Basel, New York, 113–128.
- Welti S, Fraterman S, D'Angelo I, Wilm M, Scheffzek K** (2007) The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J Mol Biol*. 366(2):551–562.
- White AK, Smith RJ, Bigler CR, Brooke WF, Schauer PR** (1986) Head and neck manifestations of neurofibromatosis. *Laryngoscope*. 96(7):732–737.
- Widemann BC** (2009) Current status of sporadic and neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *Curr Oncol Rep*. 11(4):322–328.

- Wolkenstein P, Zeller J, Revuz J, Ecosse E, Leplège A** (2001) Quality-of-life impairment in neurofibromatosis type 1: a cross-sectional study of 128 cases. *Arch Dermatol.* 137(11):1421–1425.
- Wong WW, Hirose T, Scheithauer BW, Schild SE, Gunderson LL** (1998) Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 42(2):351–360.
- Woodhoo A und Sommer L** (2008) Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia.* 56(14):1481–1490.
- Wu J, Williams JP, Rizvi TA, Kordich JJ, Witte D, Meijer D, Stemmer-Rachamimov AO, Cancelas JA, Ratner N** (2008) Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. *Cancer Cell.* 13(2):105–116.
- Xu G, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R, Tamanoi F** (1990a) The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell.* 63(4):835–841.
- Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R** (1990b) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell.* 62(3):599–608.
- Xu W, Mulligan LM, Ponder MA, Liu L, Smith BA, Mathew CG, Ponder BA** (1992) Loss of NF1 alleles in pheochromocytomas from patients with type 1 neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer.* 4(4):337–342.
- Yang F-C, Chen S, Clegg T, Li X, Morgan T, Estwick SA, Yuan J, Khalaf W, Burgin S, Travers J, Parada LF, Ingram DA, Clapp DW** (2006) Nf1^{+/-} mast cells induce neurofibroma like phenotypes through secreted TGF-beta signaling. *Hum Mol Genet.* 15(16):2421–2437.
- Yang F-C, Ingram DA, Chen S, Zhu Y, Yuan J, Li X, Yang X, Knowles S, Horn W, Li Y, Zhang S, Yang Y, Vakili ST, Yu M, Burns D, Robertson K, Hutchins G, Parada LF, Clapp DW** (2008) Nf1-dependent tumors

require a microenvironment containing Nf1+/- and c-kit-dependent bone marrow. *Cell*. 135(3):437–448.

Yap Y-S, McPherson JR, Ong C-K, Rozen SG, Teh B-T, Lee ASG, Callen DF (2014) The NF1 gene revisited - from bench to bedside. *Oncotarget*. 5(15):5873–5892.

Yoshimura K und Takeda S (2012) Hedgehog signaling regulates myelination in the peripheral nervous system through primary cilia. *Differentiation*. 83(2):S78-S85.

Zanca A und Zanca A (1980) Antique Illustrations of Neurofibromatosis. *Int J Dermatol*. 19(1):55–58.

Zheng H, Chang L, Patel N, Yang J, Lowe L, Burns DK, Zhu Y (2008) Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. *Cancer Cell*. 13(2):117–128.

Zhu S, Miettinen MM, Lin G (2015) Soft Tissue and Bone Tumors. In: *Handbook of Practical Immunohistochemistry*. Lin F, Prichard J (Hrg.) 2nd ed. 2015, Springer, New York, 557–589.

Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF (2002) Neurofibromas in NF1: Schwann Cell Origin and Role of Tumor Environment. *Science*. 296(5569):920–922.

Zou C, Smith KD, Liu J, Lahat G, Myers S, Wang W-L, Zhang W, McCutcheon IE, Slopis JM, Lazar AJ, Pollock RE, Lev D (2009) Clinical, pathological, and molecular variables predictive of malignant peripheral nerve sheath tumor outcome. *Ann Surg*. 249(6):1014–1022.

10. Anhang

Tabelle A 1: Färbeprotokoll der automatisierten DHH-Färbung mittels Ventana benchmark xt Färbemodul

Schritt-Nr	Protokollschritt
1	***** EZ Prep Auswählen *****
2	***** Getimete Schritte Starten *****
3	***** Mischer Aus *****
4	Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C, und für 4 Minuten inkubieren
5	EZPrep Vol. ausgleichen
6	Objektträger waschen
7	EZPrep Vol. ausgleichen
8	Objektträger waschen
9	EZPrep Vol. ausgleichen
10	Coverslip auftragen
11	Aufheizen des Objektträgers bis 76 °C, und für 4 Minuten inkubieren
12	Objektträger waschen
13	Deparaffinierung Vol. ausgleichen
14	Coverslip auftragen
15	Objektträger-Heizung ausschalten
16	***** Mischer An *****
17	[Kurz- 8 Minuten Conditioning]
18	Objektträger waschen
19	Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
20	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
21	***** SSC Wash Auswählen *****
22	Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C, und für 8 Minuten inkubieren
23	[Mild- 30 Minuten Conditioning]
24	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
25	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
26	Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C, und für 4 Minuten inkubieren
27	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
28	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
29	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
30	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
31	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
32	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
33	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
34	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
35	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
36	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
37	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
38	Objektträger-Heizung ausschalten
39	Inkubieren für 8 Minuten
40	Spülen mit Reaktionspuffer
41	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
42	Coverslip auftragen
43	Spülen mit Reaktionspuffer
44	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
45	Coverslip auftragen

- 46 ***** Synchronisieren der Prozeduren
- 47 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 48 Spülen mit Reaktionspuffer
- 49 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 50 1 Tropfen UV INHIBITOR auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
- 51 Spülen mit Reaktionspuffer
- 52 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 53 Coverslip auftragen
- 54 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 55 Spülen mit Reaktionspuffer
- 56 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 57 Coverslip auftragen
- 58 1 Tropfen [PREP KIT 138] (Antikörper), und für [0 Stunden 32 Min] inkubieren.
- 59 Spülen mit Reaktionspuffer
- 60 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 61 Coverslip auftragen
- 62 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 63 Spülen mit Reaktionspuffer
- 64 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 65 1 Tropfen UV HRP UNIV MULT auftragen, Coverslip auftragen, und für 8 Minuten inkubieren.
- 66 Spülen mit Reaktionspuffer
- 67 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 68 Coverslip auftragen
- 69 Spülen mit Reaktionspuffer
- 70 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 71 1 Tropfen UV DAB und einen Tropfen UV DAB H2O2 auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
- 72 Spülen mit Reaktionspuffer
- 73 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 74 1 Tropfen UV COPPER auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
- 75 Spülen mit Reaktionspuffer
- 76 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 77 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 78 Spülen mit Reaktionspuffer
- 79 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 80 Coverslip auftragen
- 81 Spülen mit Reaktionspuffer
- 82 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 83 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 84 Spülen mit Reaktionspuffer
- 85 Coverslip auftragen
- 86 Objektträger-Heizung ausschalten
- 87 ***** Optionalen Waschvorgang Auswählen *****
- 88 ***** SSC Wash Auswählen *****
- 89 ***** Getimete Schritte Starten *****
- 90 Spülen mit Reaktionspuffer

Tabelle A 2: Kompletter Datensatz der untersuchten Proben

Proben-ID	Patient	Tumor -typ	Zusatz _Int	Alter	Geschl.	Lokali- sation	Quantitative DHH-Auswertung (Anzahl pos. Zellen)			Semiquantitative DHH-Auswertung (Färbeintensität)			
							DHH- positive Zellen	Gesamt zellzahl	Anteil DHH pos. Zellen	Peri- neurium	Resi- duale Axone	Tumor -zellen	Median DHH- Intens.
010-1	1	1		46	1	2	345	580	59,5%	-	-	2	2
020-1	2	1		22	1	2	319	807	39,5%	-	-	1	1
030-1	3	1		56	1	3	331	679	48,7%	-	-	1	1
040-1	4	1		19	1	3	379	581	65,2%	-	-	2	2
050-1	5	1		61	1	2	166	519	32,0%	-	-	1	1
060-1	6	1		38	1	2	148	316	46,8%	-	-	1	1
061-1	6	1		38	1	2	121	288	42,0%	-	-	1	1
070-1	7	1		40	2	2	250	453	55,2%	-	-	2	2
080-1	8	1		48	1	1	188	384	49,0%	-	-	2	2
090-1	9	1		26	1	-9	225	492	45,7%	-	-	2	2
100-1	10	1		49	2	3	285	405	70,4%	-	-	2	2
110-1	11	1		71	1	1	256	501	51,1%	-	-	2	2
120-1	12	1		49	1	2	223	358	62,3%	-	-	2	2
130-1	13	1		41	1	2	257	413	62,2%	-	-	2	2
140-1	14	1		32	1	-9	415	803	51,7%	-	-	2	2
150-1	15	1		57	2	1	246	519	47,4%	-	-	1	1
160-1	16	1		58	2	-9	157	328	47,9%	-	-	2	2

170-1	17	1	1	33	1	3	185	389	47,6%	-	-	2	2
171-1	17	1	1	33	1	3	237	465	51,0%	-	-	2	2
172-1	17	1	1	33	1	3	217	441	49,2%	-	-	2	2
180-2	18	2	2	8	2	1	86	173	49,7%	3	2	2	2
190-2	19	2	2	14	2	1	39	125	31,2%	3	3	1	3
191-2	19	2	2	14	2	1	31	99	31,3%	2	3	1	2
192-2	19	2	2	14	2	2	71	160	44,4%	3	3	2	3
200-2	20	2	2	13	2	2	53	194	27,3%	2	2	1	2
210-2	21	2	2	8	2	1	203	317	64,0%	2	3	2	2
220-2	22	2	2	18	1	1	57	175	32,6%	2	2	1	2
230-2	23	2	2	40	1	3	67	170	39,4%	3	2	2	2
240-2	24	2	2	46	1	2	41	118	34,7%	2	-	1	1,5
250-2	25	2	2	21	1	1	20	44	45,5%	2	-	1	1,5
260-2	26	2	2	45	1	1	46	158	29,1%	2	-	2	2
270-2	27	2	2	5	1	1	60	140	42,9%	3	2	1	2
280-2	28	2	2	10	1	1	15	95	15,8%	2	2	1	2
290-2	29	2	2	26	2	2	36	106	34,0%	3	2	1	2
300-3	30	3	3	17	2	3	166	286	58,0%	2	-	1	1,5
310-3	31	3	3	13	1	2	105	302	34,8%	2	-	1	1,5
311-3	31	3	3	13	1	3	109	284	38,4%	2	-	1	1,5
312-3	31	3	3	13	1	2	171	438	39,0%	2	-	2	2
320-3	32	3	3	36	1	3	329	548	60,0%	2	-	2	2
321-3	32	3	3	36	1	1	493	916	53,8%	2	-	2	2
330-3	33	3	3	6	2	2	135	237	57,0%	-	2	2	2

340-3	34	3	51	2	2	2	160	323	49,5%	2	-	2	2	2
350-3	35	3	12	2	2	2	88	269	32,7%	2	2	2	2	2
351-3	35	3	12	2	2	2	59	209	28,2%	2	-	2	2	2
352-3	35	3	12	2	2	2	144	306	47,1%	2	2	2	2	2
353-3	35	3	12	2	2	2	96	203	47,3%	2	2	2	2	2
360-4	36	4	35	2	2	3	99	158	62,7%	-	-	2	2	2
370-4	37	4	40	1	1	1	179	513	34,9%	-	-	2	2	2
380-4	38	4	46	1	1	3	120	378	31,7%	-	-	2	2	2
390-4	39	4	36	1	1	1	177	349	50,7%	-	-	2	2	2
400-4	40	4	38	1	1	2	211	439	48,1%	-	-	2	2	2
410-4	41	4	16	2	2	3	174	343	50,7%	-	-	2	2	2
420-4	42	4	50	2	2	3	165	377	43,8%	-	-	2	2	2
430-4	43	4	46	2	2	2	170	411	41,4%	-	-	2	2	2
440-4	44	4	48	2	2	3	137	313	43,8%	-	-	2	2	2
450-4	45	4	37	2	2	-9	62	344	18,0%	-	-	2	2	2
451-4	45	4	37	2	2	2	67	278	24,1%	-	-	2	2	2
460-4	46	4	12	2	2	3	178	314	56,7%	-	-	2	2	2
470-4	47	4	24	1	1	1	163	499	32,7%	-	-	2	2	2
480-4	48	4	15	1	1	3	246	593	41,5%	-	-	2	2	2
481-4	48	4	15	1	1	3	158	368	42,9%	-	-	2	2	2
490-4	49	4	38	1	1	1	127	379	33,5%	-	-	2	2	2
500-4	50	4	55	1	1	3	175	475	36,8%	-	-	2	2	2
501-4	50	4	55	1	1	2	123	282	43,6%	-	-	2	2	2

510-4	51	4	12	2	2	81	277	29,2%	-	-	2	2	2
520-4	52	4	6	2	1	265	465	57,0%	-	-	2	2	2
530-5	53	5	40	1	2	0	277	0,0%	-	-	0	0	0
540-5	54	5	51	1	2	35	430	8,1%	-	-	1	1	1
550-5	55	5	17	1	2	86	613	14,0%	-	-	1	1	1
560-5	56	5	63	2	1	72	296	24,3%	-	-	1	1	1
570-5	57	5	40	2	2	70	369	19,0%	-	-	1	1	1
580-5	58	5	22	2	3	0	1327	0,0%	-	-	0	0	0
590-5	59	5	52	2	-9	0	373	0,0%	-	-	0	0	0
600-5	60	5	20	1	-9	0	1522	0,0%	-	-	0	0	0
610-5	61	5	23	1	-9	343	836	41,0%	-	-	2	2	2
620-5	62	5	46	1	2	0	479	0,0%	-	-	0	0	0
630-5	63	5	41	1	2	142	703	20,2%	-	-	1	1	1
640-5	64	5	26	2	-9	0	567	0,0%	-	-	0	0	0
650-5	65	5	19	1	3	0	136	0,0%	-	-	0	0	0
660-5	66	5	25	1	2	53	367	14,4%	-	-	2	2	2
670-5	67	5	40	1	3	0	1038	0,0%	-	-	0	0	0
680-5	68	5	47	2	2	56	248	22,6%	-	-	2	2	2
690-5	69	5	35	1	3	0	782	0,0%	-	-	0	0	0
700-0	70	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
710-0	71	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
720-0	72	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Hagel für die umfassende Betreuung bedanken. Seine ständige Ansprechbarkeit, die Geduld und Muße, mit der er mich während des gesamten Promotionsverfahrens unterstützt hat, waren mir stets eine große Hilfe.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei der Von Recklinghausen Gesellschaft für die Förderung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

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

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Diagnostiklabors im Institut für Neuropathologie, insbesondere Kendra Richter, Sandra Deutsch und Ulrike Rumpf, welche mich stets im Labor unterstützt und mir die nötigen Schnitt- und Färbetechniken beigebracht haben, sowie Birgit Williams für den organisatorischen Beistand.

Zudem danke ich A. Hot und L. Schmitz aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie am UKE für die statistische Beratung.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester für die sorgfältige Durchsicht und Korrektur der Dissertationsschrift sowie meinen Eltern und meinem Freund, die mich stets tatkräftig unterstützt und immer wieder motiviert haben.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Kommilitonen und Freunden, mit denen ich viele gemeinsame Stunden während der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit verbracht habe.

12. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13. Eidesstattliche Erklärung

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: