

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik
Institut für Neuropathologie
Prof. Dr. Markus Glatzel, ärztlicher Leiter und Institutsdirektor

**Zur möglichen Rolle von Zytokinen für den Progress von
Neurofibromatose Typ I assoziierten peripheren Nervenscheidentumoren**

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

vorgelegt von:
Lina Rössig
aus Hannover

Hamburg 2020

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.10.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Hagel

Prüfungsausschuss: zweite Gutachterin: Prof. Dr. Eva Tolosa

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Neurofibromatose Typ 1	2
2.1.1	Klinik der NF1	2
2.1.2	Genetische Grundlage der NF1	4
2.1.3	Neurofibrominsignalweg	4
2.1.4	Neurofibrome.....	5
2.1.4.1	Dermale/kutane Neurofibrome	6
2.1.4.2	Plexiforme Neurofibrome.....	7
2.1.4.3	Diffuse Neurofibrome.....	9
2.1.4.4	Diffus-plexiforme Neurofibrome	10
2.1.4.5	Maligne periphere Nervenscheidentumoren.....	10
2.2	Entzündung und Tumorgenese	12
2.3	Zytokine und ihre Rezeptoren	14
2.3.1.1	Interleukin-8 und CXC-Motiv-Zytokinrezeptor-1.....	14
2.3.1.2	Tumornekrosefaktor- α und Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1.....	17
2.3.1.3	Transformierender Wachstumsfaktor β	18
2.4	Die Rolle der Schwannzelle	20
2.5	Mastzellen und Tumorgenese.....	21
2.5.1	Mastzellen und Neurofibrome	23
3	Material und Methoden	26
3.1	Material.....	26
3.1.1	Tumorproben	26
3.1.2	Reagenzien und Lösungen.....	27
3.1.3	Antikörper.....	29

3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.5	Laborgeräte.....	30
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Herstellung der Schnitte.....	30
3.2.2	Immunhistochemische Färbung.....	31
3.2.3	Evaluation.....	33
3.2.4	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Klinische Daten.....	35
4.2	Mastzellen.....	35
4.3	Antigenexpression in peripheren Nervenscheidentumoren.....	37
4.3.1	Interleukin 8.....	37
4.3.2	CXCR 1.....	38
4.3.3	Tumornekrosefaktor α	39
4.3.4	Rezeptor für Tumornekrosefaktor α vom Typ 1.....	40
4.3.5	Transforming Growth Factor β	41
4.4	Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b.....	44
4.4.1.1	Mit dem Tumortyp assoziierte Variablen.....	45
4.4.1.2	Mit den Mastzellen assoziierte Variablen.....	45
4.4.1.3	Zytokine und Rezeptoren untereinander.....	45
5	Diskussion.....	50
5.1	Mastzellen in verschiedenen Tumortypen bei NF1-Patienten.....	50
5.2	Expression von Zytokinen sowie ihren Rezeptoren und ihre Rolle bei der Dedifferenzierung gutartiger Neurofibrome.....	50
5.2.1	IL-8.....	51
5.2.2	CXC-Motiv-Zytokinrezeptors Typ 1.....	53
5.2.3	TNF- α	53

5.2.4	TNFR1	55
5.2.5	TGF- β	55
5.2.5.1	TGF- β und der Neurofibrominsignalweg	57
5.3	Tumorsuppressive Wirkung von Entzündung und ihren Mediatoren	59
5.4	Fazit	60
	Deutsche Zusammenfassung	62
	English summary	63
	Abkürzungsverzeichnis	64
	Abbildungsverzeichnis	66
	Tabellenverzeichnis	68
	Literatur	69
	Anhang	80
	Danksagung	81

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Neurofibromatosen sind neurogenetische Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal das Auftreten peripherer Nervenscheidentumore ist. Bisher klassifiziert wurden die Neurofibromatosen Typ 1 und Typ 2 sowie die Schwannomatose (Kissil et al. 2010). Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) stellt mit 85 % aller Neurofibromatosen den größten Anteil dar (Riccardi & Lewis 1988). Bei Patienten mit NF1 sind Neurofibrome und maligne periphere Nervenscheidentumore die Hauptkennzeichen (Antonescu et al. 2013a; Perry et al. 2016). Bei den benignen Neurofibromen sind gehäuft Mastzellen zu finden, je nach Tumorsubtyp in unterschiedlicher Konzentration. In der Literatur werden Mastzellen wiederholt für den Progress dieser Tumoren verantwortlich gemacht (Yang et al. 2008; Zhu et al. 2002).

Vor dem Hintergrund oben genannter Daten sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Wie hoch ist und wie stark unterscheidet sich die Mastzellkonzentration bei verschiedenen Neurofibromsubtypen bei NF1-Patienten?
2. Lassen sich Zytokine bzw. deren Rezeptoren in den Tumorzellen von Neurofibromen von NF1-Patienten nachweisen?
3. Korreliert die Expression der Zytokine bzw. deren Rezeptoren mit der Proliferation oder der Dignität dieser Tumoren?
4. Kann den Zytokinen bzw. deren Rezeptoren eine Rolle bei der Dedifferenzierung gutartiger Neurofibrome zugeschrieben werden?

In der vorliegenden Studie werden dazu mit immunhistochemischen Methoden verschiedene Subtypen von Neurofibromen untersucht, die Patienten mit einer gesicherten NF1-Diagnose entstammen. Bei den Neurofibromsubtypen wird zunächst die Mastzell-dichte bestimmt. Im nächsten Schritt wird die Expression der Zytokine bzw. ihrer Rezeptoren evaluiert.

2 Einleitung

2.1 Neurofibromatose Typ 1

Die Neurofibromatose Typ 1 gehört mit einer Inzidenz von etwa 1:3500 zu den häufigsten neurogenetischen Erkrankungen. Sie weist einen autosomal-dominanten Erbgang auf, wobei die Penetranz im Alter von 20 Jahren bei nahezu 100 % liegt (Lynch & Gutmann 2002) und die Rate spontaner Mutationen und vererbter Keimbahnmutationen jeweils etwa 50 % beträgt (Riccardi & Lewis 1988; Boyd et al. 2009). Von Recklinghausen beschreibt 1882 erstmals das gemeinsame Auftreten zahlreicher Fibrome und „Neurome“ bei dieser Multisystemerkrankung (v. Recklinghausen 1882). Seitdem gelten Neurofibromatosen, zu denen auch die NF1 zählt, als definierte Störung (Boyd et al. 2009). Klinisch zeigen sich bei der NF1 vor allem neurologische und dermatologische Auffälligkeiten sowie eine hohe Anzahl an Tumoren (Boyd et al. 2009). Aktuell wird die NF1 nach den 1988 durch die *National Institutes of Health* (NIH) festgelegten Kriterien diagnostiziert, wobei mindestens zwei für die Diagnosestellung erfüllt sein müssen:

- a. ≥ 6 Café-au-lait-Flecken ($> 0,5$ cm vor und $> 1,5$ cm nach der Pubertät)
- b. Axilläres oder inguinales Freckling
- c. ≥ 2 Neurofibrome jeden Typs oder
- d. ein plexiformes Neurofibrom
- e. ≥ 2 Lisch-Knötchen (Irishamartome bei Spaltlampenuntersuchung)
- f. Optikusgliom
- g. Dysplasien des Keilbeinflügels, Pseudarthrosen, Kortikalisatrophie in den langen Knochen
- h. Verwandtschaft 1. Grades mit einem NF1-Patienten

2.1.1 Klinik der NF1

Der Verlauf der NF1 ist sehr variabel (Ruggieri 1999). Aufgrund des ubiquitären Auftretens der genetischen Veränderung des NF1-Gens kann fast jedes Organ von der NF1 betroffen sein (Gutmann & Collins 1993). Es handelt sich bei der NF1 um eine klinische Diagnose nach den oben genannten Kriterien, welche die Kardinalsymptome der Erkrankung darstellen. Zu den Störungen der Pigmentierung gehören die Café-au-lait-Flecken. Sie sind die häufigste Pigmentstörung der Haut und homogene, gut abgrenzbare, bräunliche Verfärbungen. Aufgrund des frühen Auftretens (manchmal bereits kon-

genital) sind sie oft das erste Zeichen der NF1. Bei NF1-Patienten weisen sie eine erhöhte Konzentration an Melanin und Riesenmelanosomen sowie eine gesteigerte Anzahl an Melanozyten im Vergleich zum umliegenden Gewebe auf (Martuza et al. 1985; Kaufmann et al. 1989; Boyd et al. 2009). Diese Melanozyten haben wie die Tumorzellen in Neurofibromen ebenfalls einen Funktionsverlust des verbleibenden aktiven Allels für das NF1-Gen, einen *loss of heterozygosity* (Maertens et al. 2007; de Schepper et al. 2008). Weitere kutane Manifestationen sind axilläres und inguinales Freckling bei etwa 90 % der Drei- bis Fünfjährigen (Antonescu et al. 2013c), eine generelle Hyperpigmentierung (Boyd et al. 2009; Antonescu et al. 2013c) sowie Lisch-Knötchen bei 95 % der NF1-Patienten (Lisch 1937). Weiterhin leiden die Patienten häufig unter Pruritus, was vermutlich auf eine erhöhte Mastzellanzahl in Neurofibromen und damit verbundener Histaminfreisetzung zurückzuführen ist (Boyd et al. 2009). Eine Besserung bei Gabe von Mastzellstabilisatoren stärkt diese Vermutung (Riccardi 1992).

Sehr charakteristisch für die NF1 sind benigne und maligne periphere Nervenscheidentumore, die prinzipiell zu jedem Zeitpunkt auftreten können (Antonescu et al. 2013c). In Abschnitt 2.1.4 werden diese ausführlich besprochen. Für die malignen peripheren Nervenscheidentumoren wird im Verlauf die Abkürzung MPNST verwendet. Zu häufigen Neoplasien des zentralen Nervensystems gehören ein- oder beidseitige Optikusgliome (bei 15–20 % der NF1-Patienten; Blatt et al. 1986).

Weitere NF1-assoziierte Läsionen sind skelettale Abnormalitäten wie die Skoliose und die Dysplasie der langen Röhrenknochen oder des Sphenoids (Antonescu et al. 2013c) sowie blau-rote und pseudoatrophische Flecken (Westerhof & Konrad 1982). Zu den NF1-assoziierten Tumoren gehören bilaterale Phäochromozytome, Melanome (de Schepper et al. 2005) und Glomustumoren (de Smet et al. 2002). Assoziierte Malignitäten sind vor allem die juvenile myelomonozytäre Leukämie (Boyd et al. 2009; Kehrer-Sawatzki & Mautner 2009; Mautner 2017). Häufig sind auch neurologische bzw. psychische Manifestationen wie Lern- und Konzentrationsschwierigkeiten, aber auch motorische Probleme, Kopfschmerzen und epileptische Anfälle (Boyd et al. 2009; Kehrer-Sawatzki & Mautner 2009; Mautner 2017). Insbesondere aufgrund des vermehrten Auftretens von MPNST ist die Lebenserwartung nach heutigem Wissen bei etwa 10 % der NF1-Patienten reduziert (Mautner 2017), sodass der Erforschung der Entstehungsweise dieser Tumoren eine enorme Bedeutung zukommt.

2.1.2 Genetische Grundlage der NF1

Der NF1 liegt ein genetischer Defekt zu Grunde. Das betroffene Gen liegt auf dem Chromosom 17q11.2 und kodiert für das Protein Neurofibromin. Dieses Tumorsuppressorprotein wird in zahlreichen Zellarten exprimiert, vor allem findet man es in Neuronen, Glia- und Schwannzellen sowie in frühen Stadien von Melanozyten (Stocker et al. 1995; Boyd et al. 2009). Neurofibromin ist mit 320 kDa ein großes Protein (Welti et al. 2008) und greift an verschiedenen Stellen regulatorisch in die Zellproliferation und -differenzierung ein (Dhillon et al. 2007; Boyd et al. 2009; Gutmann et al. 2012; Berridge 2014).

2.1.3 Neurofibrominsignalweg

Über eine Bindung von Wachstumsfaktoren beispielsweise aus der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren (*transforming growth factors* = TGF; Wakefield & Hill 2013; Neuzillet et al. 2015) oder der Neureguline (Falls 2003; Mei & Xiong 2008) kommt es zur Aktivierung des entsprechenden Rezeptors, der das Signal von extrazellulär intrazellulär über die Phosphorylierung von Tyrosinresten weiterleitet (Berridge 2014). Das *rat sarkoma protein* (Ras-Protein) wird phosphoryliert und damit aktiviert (Berridge 2014). Davon ausgehend werden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst, die die Zellproliferation, die Transkription und den Umbau des Zytoskeletts regulieren (Dhillon et al. 2007; Berridge 2014). *Ras homologue* (Rho), *mitogen-activated protein kinase / extracellular-signal regulated kinase* (MEK) und *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) sind wesentliche Bestandteile dieser Signalwege (Dhillon et al. 2007; Berridge 2014), die in Abbildung 1 graphisch dargestellt werden.

Neurofibromin sorgt unter normalen Bedingungen zum einen für die Inaktivierung des Ras-Proteins und nimmt zum anderen Einfluss auf die Bildung und Ausschüttung von zyklischem Adenosinmonophosphat im Signalweg der Proteinkinase A (Dasgupta et al. 2003; Gutmann et al. 2012), in Abbildung 1 nicht dargestellt. Liegt wie bei der NF1 eine nicht oder nur eingeschränkt funktionierende Form dieses Proteins vor, resultiert ein unkontrolliertes Zellwachstum in entsprechenden Arealen durch eine verstärkte Aktivierung des Ras-Proteins (Boyd et al. 2009; Gutmann et al. 2012).

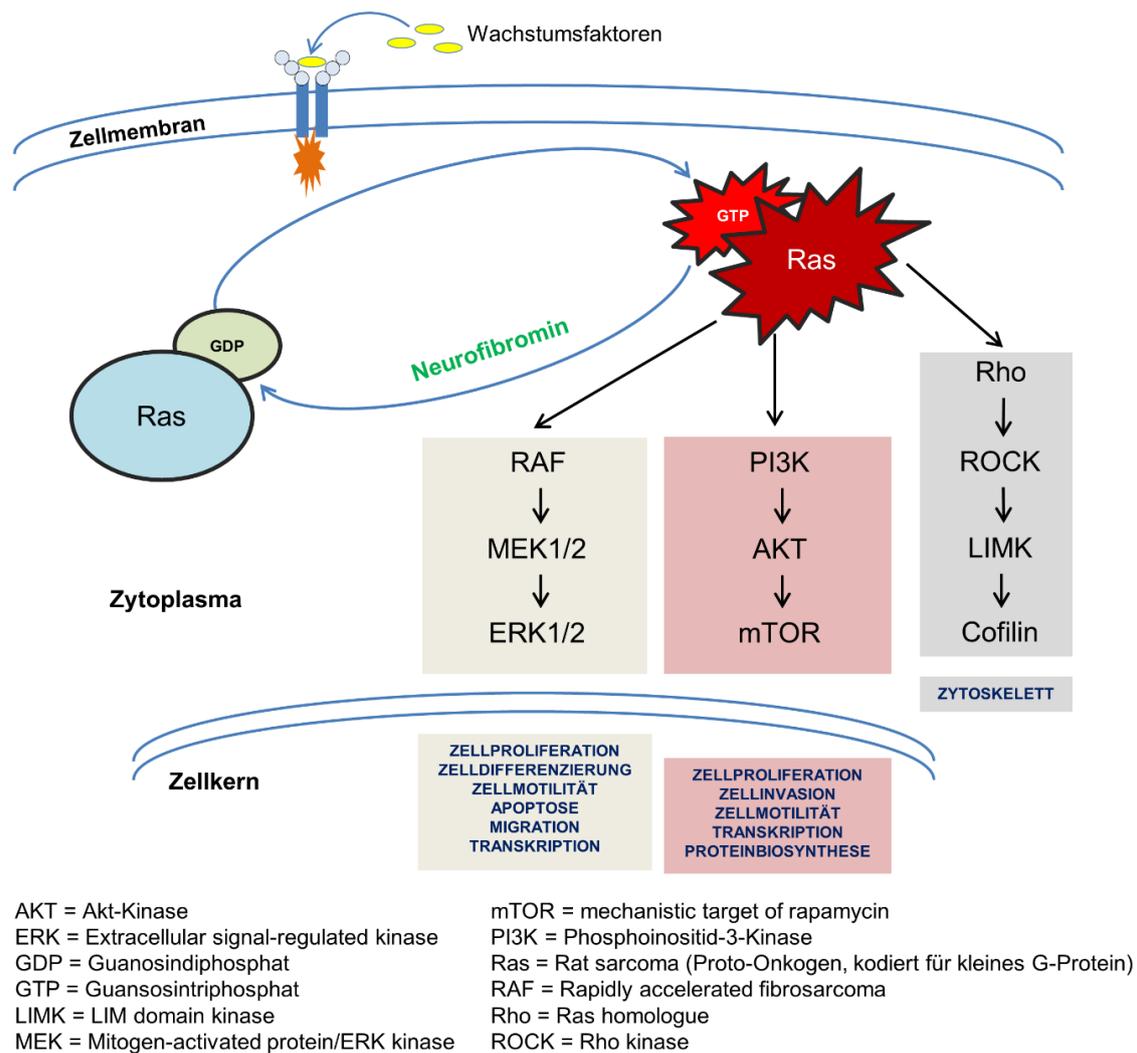


Abbildung 1: Neurofibrominsignalweg nach Boyd et al. (2009: S. 3); Dhillon et al. (2007: S. 3280); Gutmann et al. (2012: S. 14088); Berridge (2014: S. 12, 16).

2.1.4 Neurofibrome

Neurofibrome sind meist gutartige periphere Nervenscheidentumore, die stark mit der NF1 assoziiert sind, aber auch sporadisch vorkommen (Antonescu et al. 2013a; Perry et al. 2016). Es werden verschiedene Neurofibromsubtypen unterschieden. Diese Tumormanifestationen können nach Typ und Lokalisation sehr variieren und sind im Wachstumsverhalten nicht vorhersagbar (Kehrer-Sawatzki & Mautner 2009). Als gemeinsame Ursprungszellen für diese Neoplasien werden Schwannzellen angesehen, die einen vollständigen Verlust der NF1-Genfunktion aufweisen (Serra et al. 2000; Zhu et al. 2002; Antonescu et al. 2013a). Außerdem zeigen sich haploinsuffiziente Zellen in der Tumormikroumgebung (de Schepper et al. 2008; Maertens et al. 2007; Zhu et al. 2002) wie Mastzellen (Yang et al. 2008; Zhu et al. 2002), aber auch Perineuralzellen und Fibroblasten sowie vereinzelte residuale myelinisierte und nicht-myelinisierte Nervenfasern

(Antonescu et al. 2013a; Perry et al. 2016). Die genaue zelluläre Zusammensetzung sowie das maligne Potenzial, also der Progress zu einem MPNST, sind jedoch variabel (Erlandson & Woodruff 1982; Zhu et al. 2002; Hirose et al. 2003; McClatchey 2007; Jokinen & Argenyi 2010). Die mitotische Aktivität steigt mit dem Malignitätsgrad (Erlandson & Woodruff 1982).

Die Neurofibrommanifestationen sind in der Literatur nicht einheitlich klassifiziert. Im Folgenden wird ein Überblick über die gängigste Einteilung gegeben, wobei üblicherweise nach histologischem Wachstumsmuster und Lokalisation eingeteilt wird.

2.1.4.1 *Dermale/kutane Neurofibrome*

Kutane Neurofibrome (KNF) sind die häufigsten Tumore bei NF1, ein sporadisches Auftreten, dann meist als solitäres KNF, ist möglich (Antonescu et al. 2013a). Kennzeichnend ist ihr umschriebenes Wachstum in Form nodulärer bis polypenartiger, weicher, leicht erhabener Strukturen in der Kutis und Subkutis (Perry et al. 2016). In der Regel bereiten sie keine Schmerzen, aber Brennen und Juckreiz (Huson et al. 1988). Ihr Auftreten beginnt oft erst mit der Pubertät und das Wachstumsverhalten variiert stark. So ist in einer Schwangerschaft teilweise eine deutliche Zunahme in Größe und Zahl der Neurofibrome zu verzeichnen (Huson et al. 1988; Dugoff & Sujansky 1996), während sie generell eher durch langsames Wachstum charakterisiert sind (Antonescu et al. 2013a). Bei den KNF handelt es sich um benigne Tumore ohne Entartungstendenz (Carroll 2012; Antonescu et al. 2013a). Aufgrund der Sichtbarkeit und des häufig zahlreichen Auftretens können sie sehr entstehend sein und werden aus kosmetischen Gründen reseziert (Page et al. 2006; Boyd et al. 2009; Kehrer-Sawatzki & Mautner 2009).

Der Ursprung der KNF sind vermutlich sogenannte *skin-derived precursors* (Le et al. 2009; Antonescu et al. 2013a; Perry et al. 2016). Es handelt sich um multipotente Stammzellen, die sich entlang der neuronalen und glialen Zelllinie in Schwannzellen (Toma et al. 2001; Fernandes et al. 2004; Fernandes et al. 2006) und möglicherweise Melanozyten differenzieren können und in Haarfollikeln zu finden sind (Carroll 2012).

Der histologische Aufbau von KNF ähnelt dem anderer Neurofibromsubtypen. Man findet tumoröse Schwannzellen und untermischt in unterschiedlicher Menge nicht-tumoröse Perineuralzellen, Fibroblasten sowie Mastzellen und Lymphozyten (Erlandson & Woodruff 1982; Zhu et al. 2002; Hirose et al. 2003; McClatchey 2007; Jokinen & Argenyi 2010). Die Zellkerne sind typischerweise gebogen oder kommaförmig (Anto-

nescu et al 2013a). Das Wachstum der KNF findet extraneural statt, eine zugrunde liegende Beteiligung eines Nerven ist nicht ersichtlich (Antonescu et al. 2013a; Carroll 2012). Abbildung 2 zeigt beispielhaft ein KNF in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung).

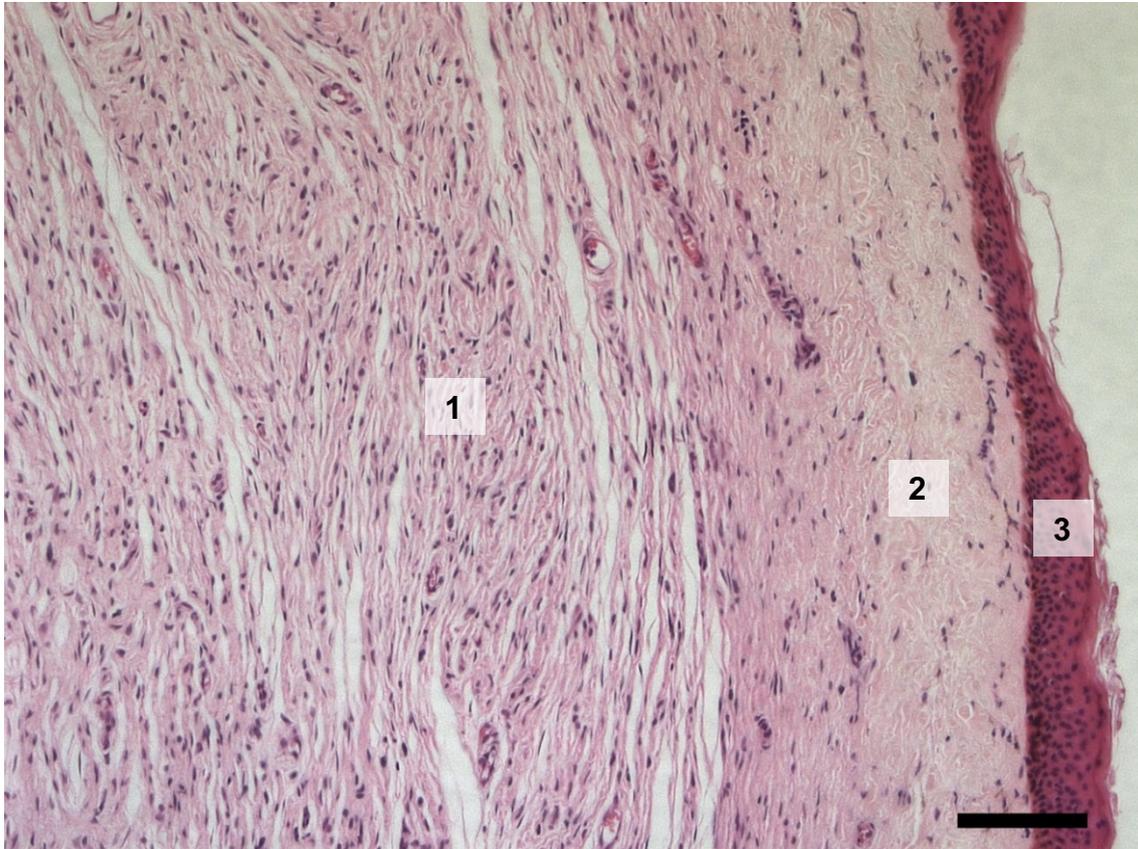


Abbildung 2: Dermales/kutanes Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, 1: Tumor, 2: subepidermales Bindegewebe, 3: mehrschichtiges Plattenepithel, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm

2.1.4.2 Plexiforme Neurofibrome

Die plexiformen Neurofibrome (PNF) sind pathognomisch für die NF1 und treten bei 30 bis 50 % der NF1-Patienten (Hirbe & Gutmann 2014), jedoch nur selten sporadisch auf (MacCarron & Goldblum 1998; Woodruff 1999). Häufig findet man sie bereits kongenital oder während der ersten zwei Lebensjahre (Woodruff 1999; Hirbe & Gutmann 2014). In der Studie von Püschel (2017) weisen die Patienten im Mittel ein Alter von 24,6 Jahren auf. Das Wachstum der PNF geht von multiplen Nervenfaszikeln aus und verläuft dann intraneural entlang der peripheren Nerven unter der Haut oder tief im Körper (Korf 1999; Carroll 2012). Für die Bildung und Proliferation plexiformer Neurofibrome sind vermutlich nicht-myelinisierende Schwannzellen verantwortlich (Zheng et al. 2008). Histologisch sind die PNF gekennzeichnet durch kurze, längliche, leicht gewundene Nuclei der Tumorzellen, die in eine myxoid- und kollagenfaserreiche Mat-

rix eingebettet sind (Woodruff 1999; Antonescu et al. 2013a). Das Perineurium ist stets intakt und in der Tumorperipherie finden sich vor allem in PNF *tight junctions* (Pummi et al. 2006), was ein von der Umgebung unabhängiges Milieu innerhalb des Tumorgewebes schafft. In Abbildung 3 sind charakteristische histomorphologische Merkmale am Beispiel einer der in dieser Arbeit verwendeter PNF-Proben dargestellt.

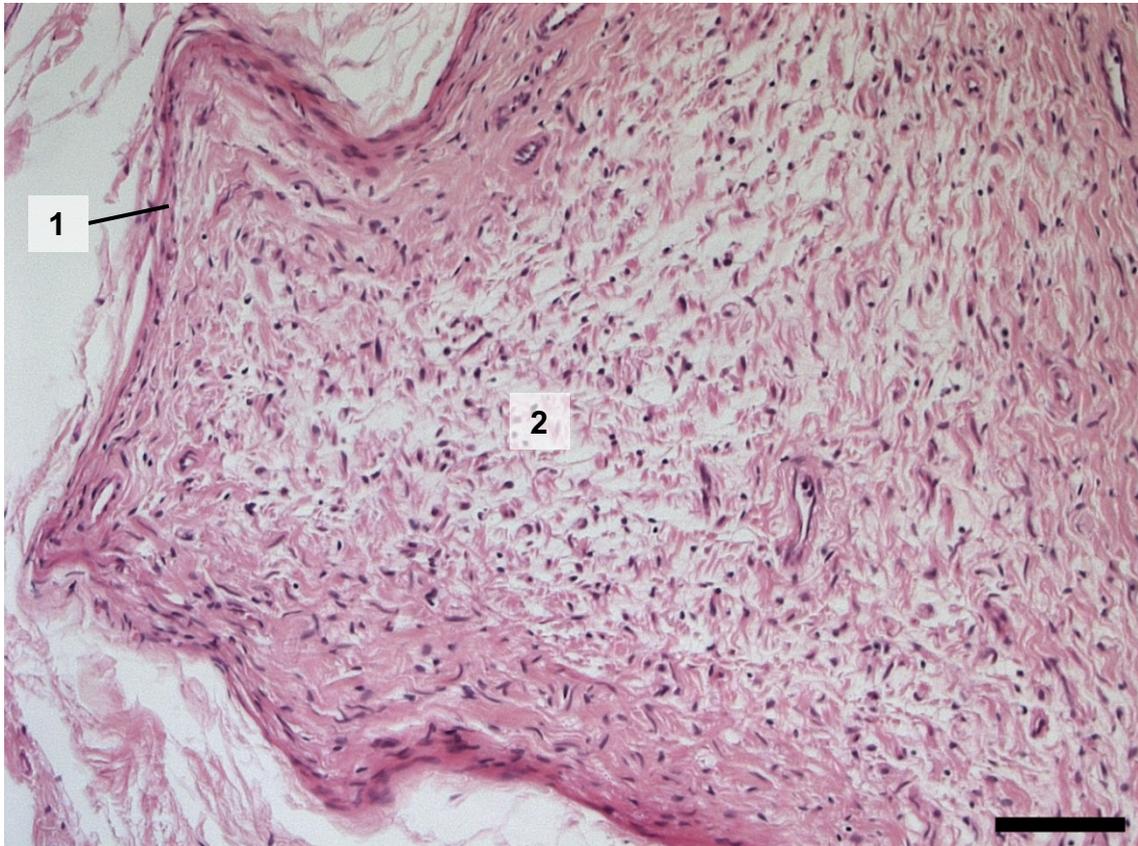


Abbildung 3: Plexiformes Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, 1: Perineurium, 2: Tumor mit myxoidreicher Matrix, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm

Das Tumorstwachstum führt zu einem Konglomerat verdickter Nerven (Korf 1999), das entweder perlschnurartig oder als multinoduläres Knäuel imponieren kann (Perry et al. 2016). PNF können Umgebungsstrukturen infiltrieren und verdrängen, was funktions-einschränkend und schmerzhaft sein sowie zu einer Knochenzerstörung führen kann (Boyd et al. 2009; Hirbe & Gutmann 2014). Das Fehlen einer eindeutigen Begrenzung im Verlauf des betroffenen Nervens macht die komplette chirurgische Exzision oft schwierig bis unmöglich (Hirbe & Gutmann 2014). Aufgrund des Transformationsrisikos vom PNF zum MPNST in etwa 10 % bei NF1-Patienten (Boyd et al. 2009; Kehrer-Sawatzki & Mautner 2009; Hirbe & Gutmann 2014; Perry et al. 2016) kommt der Erforschung der Signalwege und der beteiligten Botenstoffe eine besondere Bedeutung zu.

2.1.4.3 Diffuse Neurofibrome

Diffuse Neurofibrome (DNF) zählen zu den selteneren Neurofibromsubtypen, wobei sich in nur 10 % eine Assoziation zur NF1 feststellen lässt (Antonescu et al 2013a). Sie treten v. a. in der Kopf- und Nackenregion vorwiegend im Kindes- und jungen Erwachsenenalter auf (Antonescu et al. 2013a). In der Studie von Püschel (2017) weisen NF1-Patienten im Mittel ein Alter von 32 Jahren auf, waren also tendenziell älter als Patienten mit sporadischen Tumoren. Wichtige Kennzeichen sind diffuse, unscharf umschriebene, plaqueartige Verdickungen der Kutis und Subkutis (Perry et al. 2016). Histologisch (siehe beispielhaft in Abbildung 4) können die DNF neben den für Neurofibrome typischen Bestandteilen nicht-funktionsfähige Strukturen des Tastsinns (v. a. Pseudo-Meissner-Körperchen) enthalten (Perry et al. 2016). Trotz des diffus-infiltrierenden Wachstums und Umschließen von Hautanhangsgebilden kommt es nicht zur Zerstörung der Hautstrukturen und nur in seltenen Fällen zu einer malignen Entartung der DNF (Antonescu et al. 2013a).

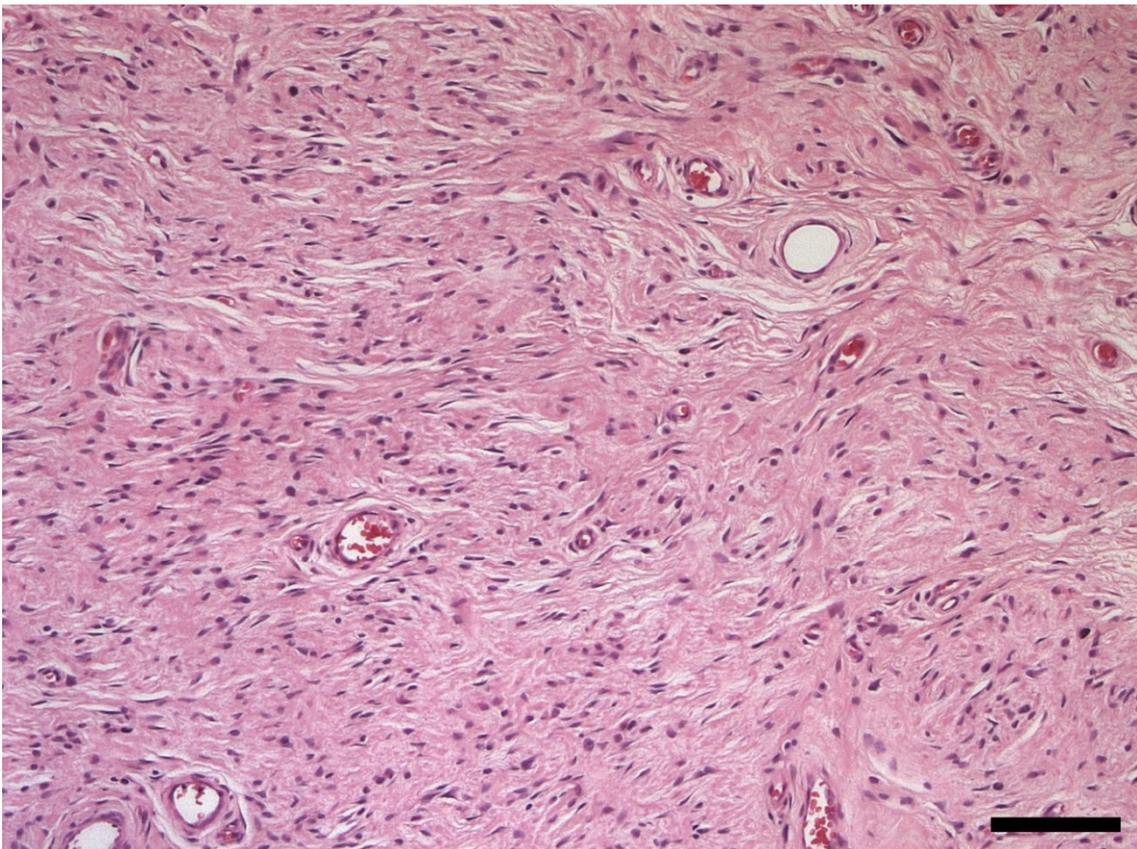


Abbildung 4: Diffuses Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm

2.1.4.4 Diffus-plexiforme Neurofibrome

In der Routinediagnostik lässt sich eine weitere Subgruppe abgrenzen: Die diffus-plexiformen Neurofibrome (DPNF). Die DPNF können in allen innervierten Geweben entstehen. Es werden lange Segmente eines Nervs involviert (Washington et al. 2010). Die DPNF sind histologisch gekennzeichnet durch Merkmale der DNF mit Anteilen, die den PNF zuzuordnen sind (siehe beispielhaft in Abbildung 5). Es finden sich Reste von Nervenfaszikeln und Tumorzellen im umliegenden Gewebe. Das Perineurium ist zwar sichtbar, jedoch an mindestens einer Stelle nicht mehr intakt. Der Zellgehalt in den Faszikeln ist höher als bei den PNF, aber geringer als in der Umgebung der DNF. Das mittlere Alter für Patienten mit DPNF liegt in der Studie von Püschel (2017) bei 25,6 Jahren, also zwischen dem der PNF (24,6 Jahre) und dem der DNF (32 Jahre).

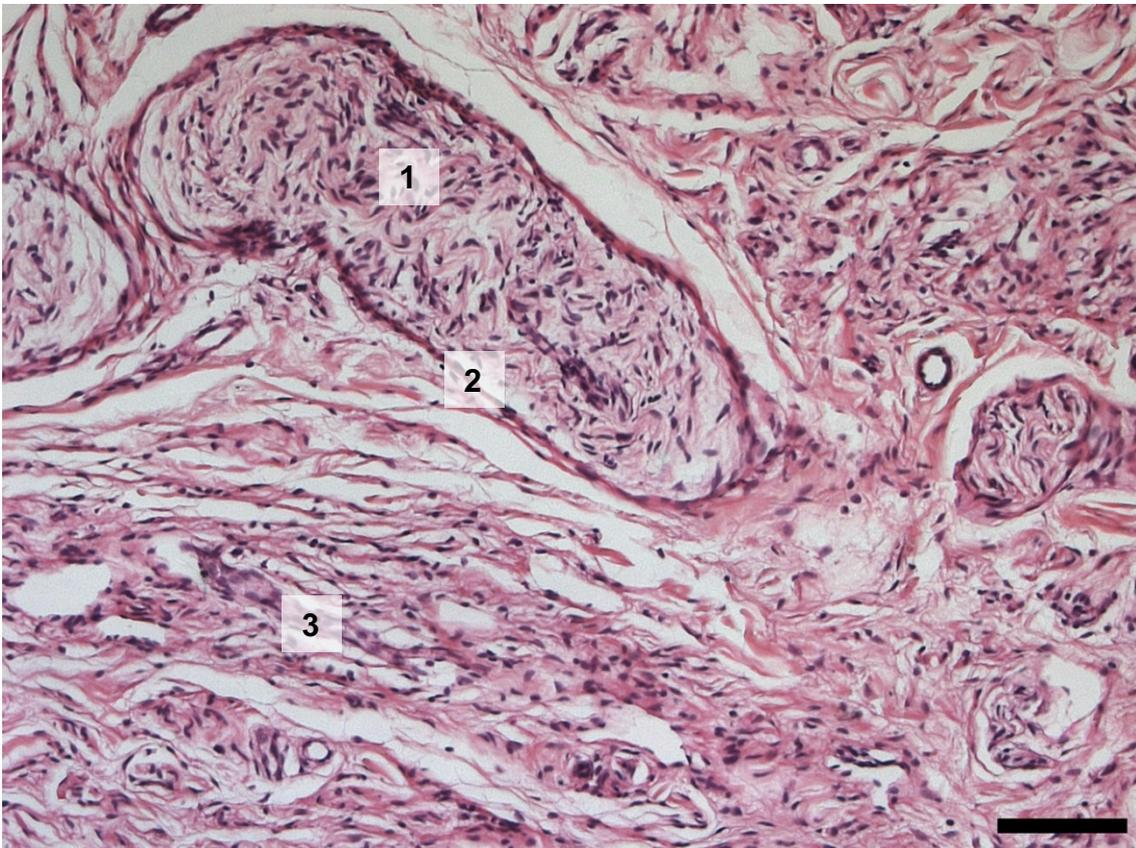


Abbildung 5: Diffus-plexiformes Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, 1: intraneuraler Tumoranteil, 2: Perineurium, 3: diffuser Tumoranteil, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm

2.1.4.5 Maligne periphere Nervenscheidentumoren

Bei den MPNST handelt sich um Neoplasien, die aus Schwannzellen entstehen (Ducatman et al. 1986; Carroll 2012) und etwa 5 % der primären malignen Weichteiltumore ausmachen (Lewis & Brennan 1996). In 50 % der Fälle liegt eine Assoziation mit NF1

vor (Evans et al. 2002). MPNST können *de novo* oder auf Basis eines PNF entstehen (Boyd et al. 2009; Hirbe & Gutmann 2014; Perry et al. 2016). Kehrer-Sawatzki & Mautner (2009) zeigen in einer MRT-Studie, dass die interne Tumorbelastung an Neurofibromen, radiologisch bestimmt, ein wesentlicher Prädiktor für das Auftreten von MPNST ist. Eine auffällige Progression, Schmerzen sowie neurologische Defizite deuten ebenfalls auf eine maligne Entwicklung hin (Boyd et al. 2009).

Die NF1-assoziierten MPNST entwickeln sich meist aus vorbestehenden PNF (Ducatman et al. 1986; Boyd et al. 2009; Kehrer-Sawatzki & Mautner 2009; Hirbe & Gutmann 2014; Perry et al. 2016). In Abbildung 6 ist beispielhaft ein MPNST in H.E.-Färbung zu sehen. Die Kriterien für eine maligne Transformation eines Neurofibroms variieren in der Literatur. Woodruff (1999) und Lai et al. (2006) weisen histologisch vermehrt Mitosen, eine erhöhte Zelldichte und Spindelzellproliferation sowie deutlich vergrößerte und hyperchrome Zellkerne im Vergleich zu gewöhnlichem Neurofibromgewebe nach. Die Tumorzellen in MPNST zeigen neben den deutlich vergrößerten, hyperchromatischen, gewundenen Kernen geringe Mengen an leicht eosinophilem Zytoplasma sowie undeutliche Zellmembranen und Kollagenfasern zwischen den Zellen (Antonescu et al. 2013b). Es lassen sich mehrkernige Riesenzellen sowie nekrotische Tumoranteile beobachten (Woodruff 1999).

Die beschriebenen Merkmale treten jedoch nicht immer und nicht immer alle gemeinsam auf, sodass die Diagnose eines MPNST häufig nicht eindeutig zu stellen und die Abgrenzung zu nicht-neuralen Tumoren schwierig ist (Antonescu et al. 2013b). Hier helfen die Assoziation zur NF1, das Vorbestehen eines benignen Tumors (meist Neurofibrom) und der noch sichtbare nervale Ursprung (Antonescu et al. 2013b). MPNST treten im Gegensatz zu benignen peripheren Nervenscheidentumoren typischerweise einzeln auf, auch wenn sie aus PNF hervorgehen (Woodruff 1999). Sie scheinen vermehrt in tieferen Regionen zu entstehen und seltener aus oberflächlichen PNF hervorzugehen (Evans et al. 2002). Es handelt sich meist um hochgradig aggressive Tumoren (Antonescu et al. 2013b). Es besteht die Tendenz zu Rezidiven und der frühen Metastasierung bei NF1-Patienten (Hagel et al. 2007), vor allem in die Lunge, Knochen, Leber und das Gehirn (Antonescu et al. 2013b). Die Heilung ist daher unter den aktuellen therapeutischen Möglichkeiten, der großzügigen Resektion, nur selten und in sehr frühen Tumorstadien möglich – die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 18–21% (Evans et al. 2002). Dies erklärt die deutlich herabgesetzte Lebenserwartung bei Patienten mit NF1 im Allgemeinen (Evans et al. 2011).

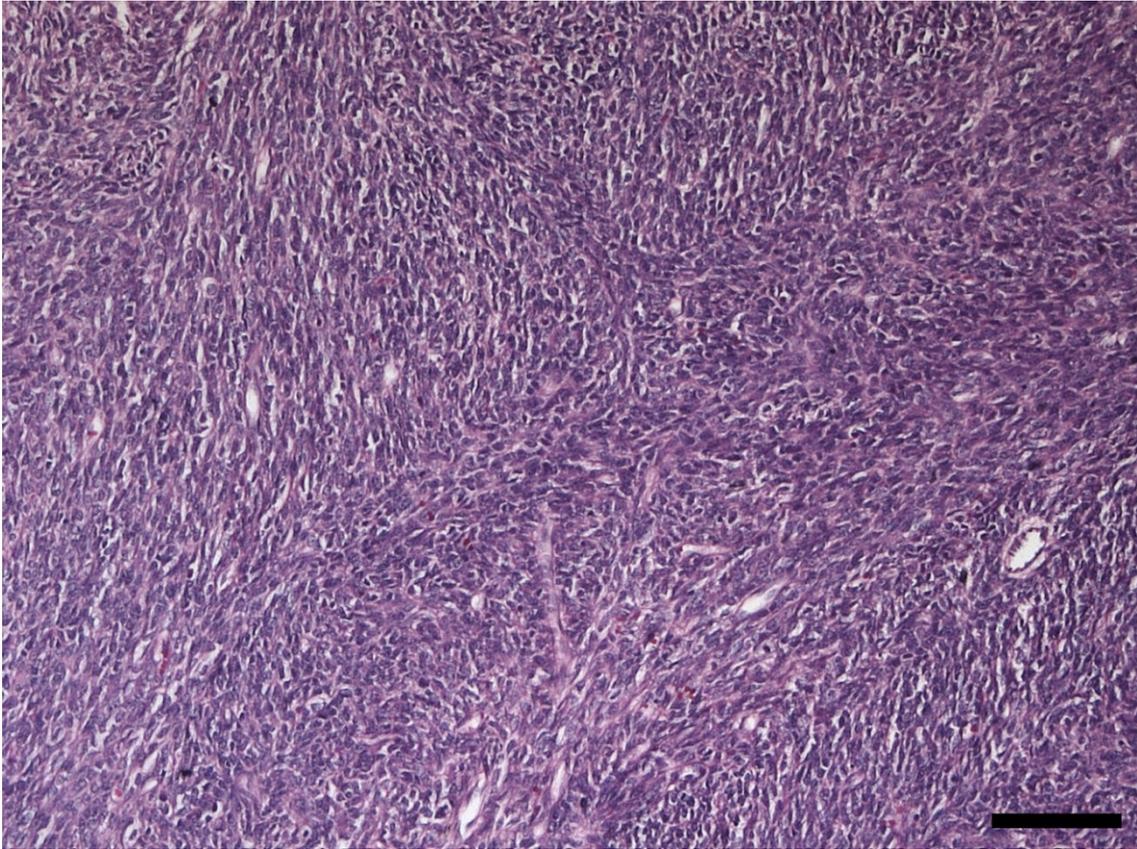


Abbildung 6: Maligner peripherer Nervenscheidentumor in 10-facher Vergrößerung, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm

Es gibt Neurofibrome, die aufgrund ihrer Merkmale schwerer zuzuordnen und von den MPNST abzugrenzen sind. Beim atypischen Neurofibrom findet man degenerative zytologische Atypien – ein Charakteristikum, das auch die MPNST auszeichnet. Beim zellulären Neurofibrom findet sich wie auch bei den MPNST eine erhöhte Zelldichte. Andere Merkmale, die für ein MPNST sprechen, wie durchgängige zelluläre Atypien, mitotische Aktivität oder auffälliges Chromatin, fehlen jedoch bei atypischen und zellulären Neurofibromen (Rodriguez et al. 2012).

Für die Entstehung von Neurofibromen ist das Vorhandensein verschiedener Zytokine in der Mikroumgebung förderlich oder eine möglicherweise notwendige Voraussetzung (Zhu et al. 2002). Es sollen daher im Folgenden einige Zusammenhänge von entzündlichen Reaktionen und Tumorgenese referiert werden.

2.2 Entzündung und Tumorgenese

Die Entzündung ist eine Reaktion des Körpers auf einen potenziell schädlichen Reiz, die durch das Einwandern von Entzündungszellen und deren Sekretion von Entzündungsmediatoren gekennzeichnet ist. Nach erfolgreicher Abwehr des auslösenden Rei-

zes wird das Gewebe wiederhergestellt und die Entzündung beendet. Pathologisch ist die Persistenz dieser Reaktion (Serhan & Savill 2005).

Dvorak (1986) kommt zu dem Ergebnis, dass es viele Gemeinsamkeiten im Wundheilungs- und Tumorgewebebildungsprozess gibt. In beiden Fällen wird Fibrin-Fibronectin gebildet, was als improvisiertes Stroma und so als Basis dient, Makrophagen und Fibroblasten anzulocken und neue Gefäße zu bilden. Dvorak (1986) vermutet, dass Tumoren die Fähigkeit besitzen, die Immunantwort zu untergraben oder zu umgehen, sowie gleichzeitig das veränderte Gewebe als Grundlage für das eigene Wachstum zu nutzen. Die Tumoren lagern extravasal ein Gel aus Fibrin-Fibronectin ein und geben so vor, eine Wunde zu sein. Im Gegensatz zu einer Wunde ist diese Reaktion nicht selbstlimitierend, weshalb Dvorak (1986) von Tumoren als nicht-heilende Wunden spricht. Diese These wird gestützt durch die Tatsache, dass Tumorgewebe – ähnlich wie Narbengewebe – in dedifferenzierten Stadien Areale aus schlecht durchblutetem, hypoxischem Bindegewebe aufweist (Dvorak 1986). Bei chronischer Entzündung bzw. Gewebeschädigung wird die Regeneration nicht adäquat abgeschlossen, was einen möglichen Grund für eine Tumorentwicklung darstellt (Grivennikov 2013; Dmitrieva et al. 2016).

Bereits 1863 weist Virchow auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorbildung hin. Er beobachtet Leukozyten innerhalb verschiedener Tumoren und nimmt an, dass wiederholte Gewebeschädigung der Tumorbildung vorausgeht (Virchow 1863). Entzündungsreaktionen nehmen Einfluss auf die Zusammensetzung des Gewebes und regulieren auf diese Weise auch die Voraussetzungen für eine Tumorbildung (de Visser et al. 2005). Sie können jeden Aspekt eines Tumors und gleichzeitig auch die Effektivität von bestimmten Anti-Tumorthérapien beeinflussen (Terzić et al. 2010). Besonders in der Anfangsphase von Neoplasien wirken Immunzellen förderlich auf das Tumorwachstum: Sie sorgen für eine entsprechende Mikroumgebung, fördern die Angiogenese und die Instabilität des Erbmaterials (Coussens & Werb 2002). De Visser et al. (2005) kommen zu dem Ergebnis, dass B-Zellen durch ihre regulatorische Rolle in chronischen Entzündungen einen wesentlichen Beitrag zur frühen Tumorentwicklung leisten. Bei verschiedenen Karzinomen ist bereits eine Assoziation mit einer vorangegangenen Entzündung bekannt (Mantovani 2005). Eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus hat sich als Grundlage für ein malignes Geschehen im Gebärmutterhals herausgestellt (Coussens et al. 2000) und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind ein nachgewiesener Risikofaktor für die Entwicklung des Kolonkarzinoms (Terzić et al. 2010).

Farrow et al. (2004) messen in ihrer Studie die Konzentration von Interleukin-8 (IL-8) im Pankreasgewebe. Es zeigt sich dabei eine neunfach erhöhte IL-8-Konzentration im Gewebe einer chronischen Pankreatitis im Vergleich zum Normalgewebe. Ähnlich wie im Gewebe einer chronischen Pankreatitis finden sie auch im Tumorgewebe eines Pankreaskarzinoms Faktoren desselben Signalweges über den auch IL-8 wirkt. Es gibt also ähnliche Entzündungskomponenten und Effektoren im Signalweg bei chronischer Pankreatitis wie auch beim Pankreaskarzinom (Farrow et al. 2004).

Betrachtet man also eine (chronische) Entzündung zusammen mit der neoplastischen Transformation auf molekularer Ebene, so scheint es eine Assoziation von Faktoren zu geben. Es zeigen sich eine erhöhte Expression von Zytokinen, die auch bei Entzündungsreaktionen von Bedeutung sind, sowie ein Mangel an Tumorsuppressoren. Durch eine gesteigerte lokale Immunantwort kann auch eine gesteigerte Tumorprogression ausgelöst werden (Dmitrieva et al. 2016).

Im Folgenden wird näher auf einzelne Zytokine und ihre Rezeptoren sowie ihren möglichen Einfluss auf die Tumorentwicklung und -progression eingegangen.

2.3 Zytokine und ihre Rezeptoren

Zytokine sind Proteine, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren. Einige von ihnen werden dementsprechend als Wachstumsfaktoren bezeichnet, andere spielen vor allem bei immunologischen und entzündlichen Prozessen eine Rolle und zählen dann zu den Mediatoren (Paul & Seder 1994; Dinarrello 2000). Insgesamt gliedert man die Zytokine in fünf Gruppen: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Sie binden an den jeweils zugehörigen Zytokinrezeptor, der sowohl in membrangebundener als auch gelöster Form vorliegen kann (Paul & Seder 1994; Luster 1998; Dinarrello 2000).

2.3.1.1 Interleukin-8 und CXC-Motiv-Zytokinrezeptor-1

IL-8 ist ein Zytokin, das vor allem von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen, Fibroblasten sowie Mastzellen (Theoharides et al. 2012) und auch Schwannzellen (Ozaki et al. 2008) exprimiert wird. Es besitzt chemotaktische und aktivierende Fähigkeiten gegenüber neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten und kann so zur Immunmodulation beitragen (Yoshimura et al. 1987; Zachariae et al. 1991). Die Sekretion von IL-8 kann unter anderem durch IL-1 und TNF stimuliert werden (Matsushima & Oppenheim 1989; Zachariae et al. 1991; Watanabe et al. 2002), hier korreliert die

exprimierte Konzentration von IL-8-mRNA mit der ausgeschütteten Menge an IL-8-Protein (Zachariae et al. 1991).

IL-8 bindet mit hoher Affinität an seinen zugehörigen Rezeptor, den CXC-Motiv-Zytokinrezeptor-1 (CXCR1), was eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade auslöst. Es handelt sich bei CXCR1 um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, der zu den Chemokinrezeptoren gehört (Park et al. 2006; Park et al. 2012). Damit spielt der Rezeptor auch eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis und bei normalen sowie pathologischen Immunreaktionen (Hammond et al. 1995). Er wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems wie Neutrophilen (Hammond et al. 1995) und Mastzellen (Lippert et al. 1998; Juremalm & Nilsson 2005) sowie Schwannzellen (Ozaki et al. 2008), aber auch von Tumorzellen (Glioblastomzelllinien) exprimiert (Raychaudhuri & Vogelbaum 2011). Möglicherweise ist IL-8 ein autokriner Wachstumsfaktor maligner Tumoren (Singh et al. 1994). Die Rolle von IL-8 und CXCR1 bei der Tumorgenese und Progression von Tumoren ist bereits seit längerer Zeit Inhalt verschiedener Forschungsprojekte. In Tabelle 1 werden verschiedene Studien zu IL-8 und seinem Rezeptor CXCR1 vorgestellt. Die Ergebnisse dieser Studien machen deutlich, dass IL-8 und CXCR1 von Tumorzellen exprimiert werden und eine Rolle bei der Tumorgenese spielen könnten.

Tabelle 1: Studien zu IL-8 und CXCR1 und Tumorgenese

Studie	Art der Studie	Zellart	Ergebnis
Shi et al. (1999)	Tiermodell (thymusplastische BALB/c-Mäuse) und <i>in vitro</i>	Humane pankreatische Tumorzelllinien	<ul style="list-style-type: none"> – Expression von IL-8 im gesamten Tumorgewebe – höchste IL-8-Konzentration in perinekrotischen Bereichen sowie bei niedrigem pH-Wert und O₂-Gehalt – Hemmung von IL-8 führt zu geringerem Tumorwachstum
Li et al. (2008)	Humane Tumorbiopsien und <i>in vitro</i>	Pankreaskarzinome und humane pankreatische Tumorzelllinien	<ul style="list-style-type: none"> – Anstieg IL-8 und IL-8-mRNA unter hypoxischen Bedingungen – Erhöhte Expression des <i>vascular endothelial growth factors</i> (VEGF) und Neuropilin-2 sowie gesteigerte Aktivierung des Signalwegs aus <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> (Raf), MEK und <i>extracellular-signal regulated</i> Kinase (ERK) bei Behandlung mit IL-8
Yamanaka et al. (1995)	Mausmodell und <i>in vitro</i>	Humane Gliomzelllinien NP-1	<ul style="list-style-type: none"> – IL-8-Sekretion der Tumorzellen – IL-8-dosisabhängiges Wachstum der Tumorzellen – Hemmung der Tumorzellproliferation bei Behandlung mit anti-IL-8-Antikörpern – Höhere Lebenserwartung der Mäuse, denen mit <i>IL-8-antisense-DNA</i> behandelte Tumorzellen implantiert wurden
Watanabe et al. (2002)	<i>In vitro</i>	<i>oral-squamous-cancer-cell</i> -Zelllinien	<ul style="list-style-type: none"> – Kontinuierliche Expression von IL-8 sowie des Rezeptors CXCR1 als auch der IL-8-mRNA – IL-8-mRNA-Expression kann u.a. durch Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) stimuliert werden – Gesteigerte Freisetzung an Matrix-Metallo-Proteinase bei Stimulation mit IL-8; mögliche Interaktion zwischen IL-8 und anderen relevanten Faktoren für das Tumorwachstum – Gesteigerte Migration und Invasion der Zellen zu höheren IL-8-Konzentrationen
Chen et al. (2014)	humane Tumorbiopsien und <i>in vitro</i>	Zelllinien des duktales Adenokarzinoms des Pankreas	<ul style="list-style-type: none"> – Gesteigerte Migration und Invasion der Zellen zu höheren IL-8-Konzentrationen – Bei Neutralisierung von CXCR1 zeigt sich signifikante Hemmung der Migration und Invasion der Tumorzellen – Korrelation zwischen erhöhter CXCR1-Expression und schlechter Prognose

2.3.1.2 Tumornekrosefaktor- α und Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein Zytokin, das an entzündlichen und immunologischen Prozessen beteiligt ist (Dayer et al. 1985; Ramesh & Reeves 2002). Er wird hauptsächlich von Makrophagen, Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Epithelzellen (Rahman & McFadden 2006), aber auch von Mastzellen (Theoharides et al. 2012) und Schwannzellen (Wagner & Myers 1996) ausgeschüttet. Das Zytokin wirkt unter anderem über den zellulären TNF-Rezeptor Typ 1 (TNFR1), der – wie TNF- α selbst – mit Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht wird (Chopra et al. 2013). Durch TNF- α wird der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) aktiviert, wodurch wiederum die Sekretion weiterer Zytokine wie IL-8 angeregt wird (Wakabayashi 2004; Raychaudhuri et al. 2007). Über diesen Mechanismus hat TNF- α Einfluss auf Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung (Rahman & McFadden 2006).

TNFR1 ist ein transmembranöser Rezeptor (Rahman & McFadden 2006) und wird ubiquitär exprimiert (Charles et al. 2009). Er gehört zur TNFR-Superfamilie, die in drei Gruppen gegliedert wird: (1) Rezeptoren mit Todesdomäne, (2) *Decoy*-Rezeptoren und (3) Rezeptoren, die TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren binden (Aggarwal 2003). TNFR1 gehört zur ersten Gruppe, beinhaltet also eine Todesdomäne im zytoplasmatischen Terminus (Hehlhans et al. 2005). Eine Aktivierung von TNFR1 führt bei blockierter Proteinbiosynthese über die Rekrutierung weiterer intrazellulärer Todesdomänen und der sich anschließenden Signalkaskade zur Apoptose (Chinnaiyan et al. 1996; Micheau & Tschopp 2003). Neben der Regulation des Überlebens bzw. der Apoptose einer Zielzelle hat eine Ligandenbindung Auswirkung auf die Zellproliferation und -differenzierung (Rahman & McFadden 2006) und induziert die Aktivierung und Transkription von inflammatorischen Genen (Micheau & Tschopp 2003). Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind aufgrund ihrer Rolle bei Entzündung, Apoptose, Autoimmunität und Organogenese nun wichtige Ziele in Therapien bei Krankheiten wie Osteoporose, Autoimmunstörungen, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Krebs (Aggarwal 2003).

TNFR1 wird als wichtigster Mediator der tumorfördernden Wirkung von TNF- α angesehen (Kitakata et al. 2002; Arnott et al. 2004; Tomita et al. 2004). In der Literatur gibt es Hinweise auf einen Einfluss von TNF- α bzw. seinem Rezeptor TNFR1 auf die Bil-

dung und den Progress von Tumoren. In Tabelle 2 werden verschiedene Studien zu TNF- α und seinem Rezeptor TNFR1 vorgestellt.

Tabelle 2: Studien zu TNF- α und TNFR1 und der Tumorgenese

Studie	Art der Studie	Zellart	Ergebnis
Köck et al. (1990)	<i>In vitro</i>	Humane Keratinozyten und humane Plattenepithelkarzinomzelllinien	– Signifikant erhöhte TNF- α -Produktion in beiden Zelltypen in Stresssituationen (UV, Stimulation mit Lipopolysacchariden)
Moore et al. (1999)	Mausmodell (TNF- α ^{-/-} -Knock-out-Mäuse)	Unterschiedliche benigne und maligne Tumoren	– Geringere Anzahl und Wachstumsgeschwindigkeit benigner und maligner Tumoren im Vergleich zum Wildtyp bei Behandlung mit bekannten Tumorinitiatoren
Pikarsky et al. (2004)	Mausmodell (Mdr2-Knock-out-Mäuse)	Hepatozyten bei Hepatits und hepatozellulärem Karzinom (HCC)	– Bei Hemmung von NF- κ B verringert sich die Progression des Tumors – Keine Unterschiede bei der Tumoringitiation messbar – Apoptose transformierter Hepatozyten sowie Unfähigkeit, zum HCC zu malignisieren bei Neutralisierung von TNF- α
Raychaudhuri et al. (2007)	<i>In vitro</i>	Glioblastomzelllinien	– NF- κ B wird durch TNF- α aktiviert – konstitutive IL-8-Expression – Steigerung der Invasivität der Tumoren durch TNF- α
Charles et al. (2009)	Mausmodell (TNFR1 ^{-/-} -Knock-out-Mäuse)	Ovarialkarzinom	– Geringeres Tumorstadium bei den TNFR1 ^{-/-} -Knock-out-Mäusen
Chopra et al. (2013)	Mausmodell (TNFR1 ^{-/-} -Knock-out-Mäuse)	murine duktales pankreatisches Adenokarzinomzelllinien	– Höhere Tumoralast und T-Zell-Infiltration bei TNFR1 ^{-/-} -Knock-out-Mäuse

Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse weisen darauf hin, dass TNF- α und seinem Rezeptor TNFR1 unterschiedliche Rollen bei der Tumorentwicklung zukommen könnten. Auf der einen Seite trägt TNF- α zur Gewebeumstrukturierung bei, die für das Tumorstadium notwendig ist. Auf der anderen Seite jedoch, möglicherweise im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen, führt die Produktion von TNF- α zu Tumorzellzerstörung und Wachstumsstopp der Tumorzellen (Szlosarek & Balkwill 2003).

2.3.1.3 Transformierender Wachstumsfaktor β

Der transformierender Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor β* = TGF- β) ist ein Zytokin, das über vielfältige Signalkaskaden einen Einfluss auf die Transkription

sowie auf den Zellzyklus bzw. seinen Arrest, die Zellproliferation sowie die Apoptose hat (Wakefield & Hill 2013; Neuzillet et al. 2015). Er spielt eine Rolle bei Entzündungsreaktionen, Angiogenese und Zellinvasion (Neuzillet et al. 2015) sowie bei der Regulation der Schwannzellproliferation und -differenzierung (Einheber et al. 1995; Parkinson et al. 2001). TGF- β beeinflusst die Bildung der Nervenscheide negativ, indem er die Myelinisierung irreversibel hemmt (Guénard et al. 1995). Weiterhin wird er mit der Entwicklung neuronaler Zellen (Mirsky & Jessen 1996) sowie der Wundheilung und Gewebereparatur in Verbindung gebracht (Wakefield & Hill 2013). Gebildet bzw. freigesetzt wird er von einem Großteil der Parenchymzellen sowie infiltrierenden Zellen wie Mastzellen (Theoharides et al. 2012), Lymphozyten (Becker et al. 2004), Monozyten bzw. Makrophagen, Thrombozyten (Branton & Kopp 1999) sowie Schwannzellen und Ganglienzellen der Hinterwurzel (Guénard et al. 1995; Mirsky & Jessen 1996; Ozaki et al. 2008). Aufgrund seiner Funktionen wird ihm eine mögliche Rolle in der Tumorgenese zugesprochen – fördernd sowie supprimierend. In Tabelle 3 werden verschiedene Studien zur Rolle von TGF- β in Tumoren vorgestellt.

Tabelle 3: Studien zu TGF- β und der Tumorgenese

Studie	Art der Studie	Zellart	Ergebnis
Singh et al. (1994)	<i>In vitro</i>	humane Melanomzelllinien	– Niedrige Konzentration an TGF- β
Siegel et al. (2003)	<i>In vitro</i>	<i>human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu)</i> -positive Mammakarzinomzelllinien	– Dosisabhängige Wachstumshemmung bei Behandlung mit TGF- β
Becker et al. (2004)	Mausmodell (FVB/N-, C57 BL/6- und RAG-1-Knock-out-Mäuse) und <i>in vitro</i>	Kolorektales Karzinom	– Tumorwachstum wird gehemmt durch Infiltration TGF- β -exprimierender T-Lymphozyten – TGF- β -Rezeptor wird vermindert exprimiert in dysplastischen Epithelzellen auf der Tumoraußenseite, Signalvermittlung über TGF- β wird so runterreguliert
Watanabe et al. (2001)	Humane Tumorproben	NF1-assoziierte benigne Neurofibrome und MPNST	– Deutlich höhere Konzentration an TGF- β in Bereichen von MPNST im Vergleich zu benignen Neurofibromen
Furuta et al. (2015)	<i>In vitro</i>	<i>Lewis lung carcinoma cells</i>	– Unter hypoxischen im Vergleich zu normalen Bedingungen steigt die TGF- β -Konzentration und die Intensität der zellulären Antwort auf TGF- β an

TGF- β spielt eine wichtige und gleichzeitig divergente Rolle beim Tumorwachstum und der Metastasierung (Siegel et al. 2003; Terzić et al. 2010; Yang et al. 2010; Neuzillet et al. 2015). In frühen Tumorstadien ist eine gesteigerte Expression an TGF- β mit einer günstigen Prognose verbunden, für eine Tumorprogression muss die Konzentration an TGF- β aufgrund seiner tumorsupprimierenden Wirkung unterbunden werden. Kommt es zum Funktionsverlust des TGF- β -Signalwegs, resultiert ein malignerer Phänotyp. In späteren Tumorstadien scheint TGF- β hingegen die Prognose durch eine höhere Aggressivität und Invasivität des Tumors zu verschlechtern (Siegel et al. 2003; Yang et al. 2010; Neuzillet et al. 2015). Zusammenfassend zeigt sich TGF- β zum Teil als Suppressor, zum Teil als Promotor der Tumorgenese.

Als hauptverantwortliches Zytokin für die Induktion einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), die eine zentrale Rolle bei der Zellplastizität, metastatischen Progression und therapeutischen Resistenz von Karzinomen spielt, könnte TGF- β relevant für die Tumorgenese sein (Polyak & Weinberg 2009).

Insgesamt zeigt die Literatur also, dass Zytokine sowohl eine fördernde als auch eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum haben können. Ähnliches gilt für eine Entzündungsreaktion, die je nach Zusammenhang das Tumorwachstum limitieren oder fördern kann. Die besprochenen Zytokine IL-8, TNF- α und TGF- β sowie ihre Rezeptoren CXCR1 und TNFR1 werden von Schwannzellen (Wagner & Myers 1996; Ozaki et al. 2008) und auch von Mastzellen exprimiert (Theoharides et al. 2012). Für die vorliegende Arbeit ist dies interessant, da zum einen Mastzellen als Entzündungszellen vermehrt in Neurofibromen nachgewiesen wurden (Isaacson 1976; Püschel 2017) – auf ihre Bedeutung wird im Kapitel 2.5 eingegangen – und zum anderen Schwannzellen die Tumorzellen der Neurofibrome darstellen (Antonescu et al. 2013a).

2.4 Die Rolle der Schwannzelle

Die Schwannzelle als Tumorzelle in Neurofibromen (Antonescu et al. 2013a) ist in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Durch ihre vielseitigen Funktionen wie Reparatur und Wachstum von Nerven, Nährstoffversorgung entlang der Axone, Produktion extrazellulärer Matrix, Modulation neuromuskulärer Aktivität sowie Antigenproduktion spielen sie auch in Nicht-Schwannzelltumoren wie dem Adenokarzinom des Pankreas gerade in den Frühstadien von Tumoren eine Rolle (Deborde & Wong 2017). Sie besitzen parakrine Funktionen und exprimieren beispielsweise den *brain derived neurotropic factor*, ein Wachstumsfaktor, der die EMT der Tumorzellen fördert (Deborde & Wong

2017). Weiterhin exprimieren Schwannzellen die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9, was das Wachstum von Neuriten fördert (Ferguson & Muir 2000). In Nicht-Schwannzelltumoren finden sich Schwannzellen vor allem in präkanzerösen Läsionen. Sie interagieren mit anderen Zellen in der Tumormikroumgebung und regulieren den Tumorprogress, wobei sie sowohl die Nachbarzellen beeinflussen als auch selbst von ihnen beeinflusst werden (Deborde & Wong 2017). Schwannzellen sind in der Lage, die Umgebung der Tumorzellen anzugreifen (Deborde et al. 2016). Unter anderem durch die Sekretion verschiedener Zytokine können Schwannzellen das angeborene Immunsystem aktivieren (Jessen et al. 2015; Deborde & Wong 2017). Bei Studien an Vestibularisschwannomen können Taurone et al. (2015) zeigen, dass die Zytokine TNF- α , TGF- β , IL-1 β und IL-6 von Schwannzellen deutlich stärker exprimiert werden als in gesundem Nervengewebe. Diese Zytokine werden neben den Schwannzellen auch von aktivierten Leukozyten und Fibroblasten sezerniert. Ihre Beobachtungen machen deutlich, dass Zytokine an der Entwicklung und dem Progress von Vestibularisschwannomen über die Stimulation von Schwannzellproliferation beteiligt sind (Taurone et al. 2015). Die Literatur zeigt, dass das Zusammenspiel und die Stärke der Expression dieser Zytokine und Rezeptoren eine sowohl positive als auch negative Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von Schwannzellen haben kann (Einheber et al. 1995; Chandross et al. 1996; Bonetti et al. 2000; Parkinson et al. 2001). Weiterhin sind Schwannzellen auch selbst dazu in der Lage, durch die Sekretion dieser Zytokine pathologische Zustände beispielsweise durch das Anlocken von Leukozyten zu modifizieren und Axonstörungen voranzutreiben (Rutkowski et al. 1999; Ozaki et al. 2008). Bei entzündlichen Prozessen, die zum Beispiel durch Zerstörung eines Nervs hervorgerufen werden, sind Schwannzellen maßgeblich an der Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine beteiligt (Dubový et al. 2014). Für diese Arbeit leitet sich daraus die Frage ab, inwieweit Zytokine in Neurofibromen exprimiert werden.

2.5 Mastzellen und Tumorgenese

Mastzellen gehen aus blutbildenden Stammzellen des Knochenmarks hervor und werden als unreife Zellen ins Blut abgegeben. Ihre weitere Differenzierung ist abhängig vom komplexen Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren im Zielgewebe (Dahlin & Hallgren 2015). Man findet Mastzellen in hoher Zahl in Bindegeweben bzw. Organen mit hohem Bindegewebsanteil. Sie sind in Entzündungs- und Krankheitsprozesse unterschiedlicher Stadien involviert (Isaacson 1976; Coussens & Werb 2001 und 2002) und

schütten eine Vielzahl von Zytokinen aus, die darauf Einfluss nehmen (Yong 1997), darunter IL-8, TNF- α und TGF- β (Theoharides et al. 2012). Schon lange werden Mastzellen mit der Bildung und dem Wachstum von Tumoren in Verbindung gebracht (Isaacson 1976; Coussens & Werb 2001 und 2002).

Abbildung 7 veranschaulicht die mögliche Rolle von Entzündungszellen im Prozess der Tumorbildung: Eine epitheliale Neoplasie wird durch Mutationen hervorgerufen. Die betroffenen Zellen proliferieren allerdings bis zu einer Aktivierung durch eine Gewebsverletzung oder einen Tumorpromotor nicht. Sind die Zellen aktiviert, sorgt dies letztlich für eine Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen, darunter Mastzellen, polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen. Diese wiederum stimulieren das Wachstum und die Progression der Epithelzellen und somit die Bildung eines benignen Tumors. Im weiteren Verlauf fördern sie eine zusätzliche Entzündungsreaktion sowie Angiogenese und Umbau der extrazellulären Matrix. Diese veränderte Mikroumgebung destabilisiert die Epithelzellen und ermöglicht eine maligne Konversion des Tumors (Coussens & Werb 2001).

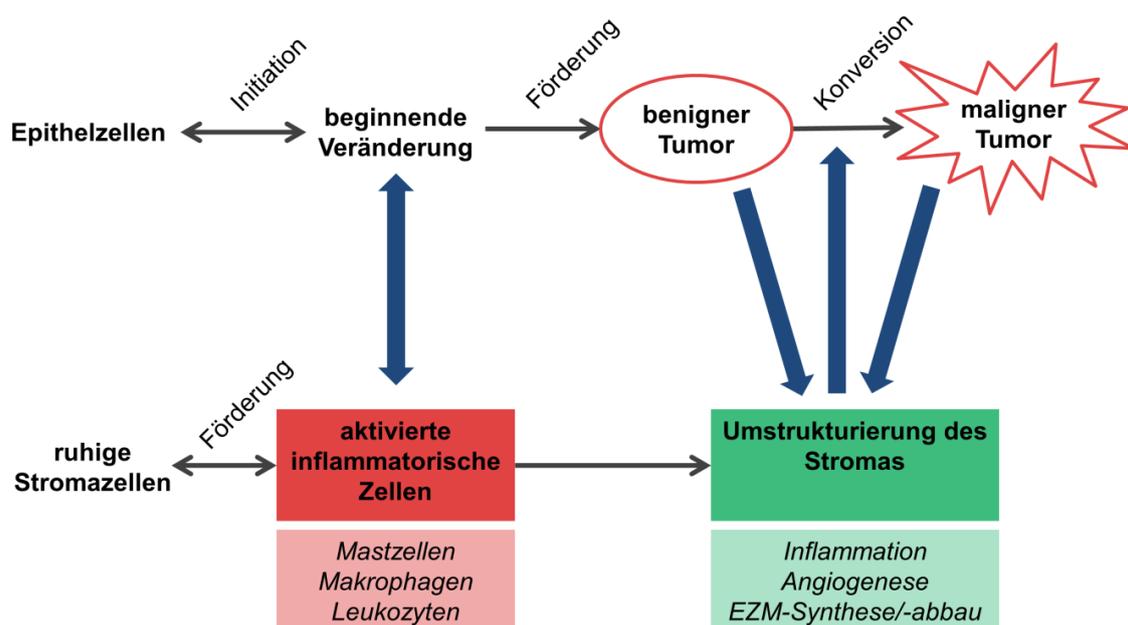


Abbildung 7: Epithelial-stromale Interaktion während der Neoplasiebildung. Nach Coussens & Werb (2001: F24). EZM = extrazelluläre Matrix.

2.5.1 Mastzellen und Neurofibrome

Mastzellen als Zellen des Immunsystems haben also vermutlich Einfluss auf die Tumorgenese. Baroni (1964) findet speziell in Nervenscheidentumoren Mastzellen. Histologisch malignere Tumoren weisen eine geringere Zahl an Mastzellen als ihre Vorläufer auf, es besteht also ein inverser Zusammenhang zwischen Mastzellanzahl und Malignität. Die Beteiligung von Mastzellen beim Tumorwachstum scheint essenziell für die Initiierung und abnehmend bei der Progression zu sein (Baroni 1964). Neurofibrome sind durch eine hohe Anzahl an Mastzellen charakterisiert und ihr Vorhandensein kann als Unterscheidungsmerkmal dienen, wie Isaacson (1976) in seiner Studie an benignen humanen Schwannomen und Neurofibromen, zum Großteil von NF1-Patienten, feststellt.

Johnson et al. (1989) können hohe Mastzellkonzentrationen in humanen Neurofibromen vor allem auch im Vergleich zu anderen neoplastischen oder reaktiven Nervenscheidentumoren (humane Schwannome, MPNST und traumatische Neurome) bestätigen. Die Anzahl an T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen zeigt hingegen keine signifikante Abweichung zu anderen Tumortypen, allerdings findet sich eine moderate Anzahl immunreaktiver Zellen in MPNST. Mastzellen stellen also nicht nur einen zellulären Marker für Neurofibrome dar, sondern scheinen auch an der Entstehung dieser Neoplasien beteiligt zu sein (Johnson et al. 1989).

Die medikamentöse Behandlung mit Mastzellstabilisatoren scheint das Wachstumsverhalten von Neurofibromen zu verändern und zu hemmen (Riccardi 1987). Auch in einer weiteren Studie von Riccardi (1992) ist eine Mastzellinfiltration dieser benignen Nervenscheidentumoren nachweisbar. Er vermutet daher, dass die von Mastzellen ausgeschütteten Faktoren wie IL-8, TNF- α und TGF- β eine Auswirkung auf Schwannzellen, Endothelzellen und Fibroblasten und über diesen Mechanismus eine Rolle bei der Entwicklung und dem Progress von Neurofibromen haben (Riccardi 1992).

Betrachtet man das Wachstum der Mastzellen, so spielt der Stammzellfaktor (SCF) eine wichtige Rolle. Er fördert einerseits das Wachstum der Mastzellen und andererseits die Produktion von Zytokinen und die Degranulierung von Mastzellen (Chen et al. 2005; Theoharides et al. 2012). Bei Untersuchungen an Neurofibromgewebe von NF1-Patienten finden Hirota et al. (1993) nicht nur eine hohe Anzahl an Mastzellen sondern auch eine erhöhte Konzentration an mRNA des SCF-Rezeptors c-kit im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SCF und der c-

kit-Rezeptor an der hohen Mastzellanzahl in Neurofibromen beteiligt sind (Hirota et al. 1993). SCF wird unter anderem von humanen Schwannzelllinien in hohen Mengen sezerniert (Hirota et al. 1993) und ist ein starker Stimulus für die Migration von Wildtyp-, aber vor allem von NF1^{+/-}-Mastzellen (Yang et al. 2003).

Die Ergebnisse von Ingram et al. (2000) legen eine Bedeutung der Mastzellen bei der Bildung von Neurofibromen nahe. Sie zeigen in ihrer Studie, dass die Antwort auf SCF bei NF1-Haploinsuffizienz die Anzahl und das Überleben von Mastzellen sowie den Ras-Protein-Signalweg verändert. Man kann also davon ausgehen, dass die Mastzellfunktion potenziell wichtig für die Bildung von Neurofibromen ist (Ingram et al. 2000).

Zhu et al. (2002) zeigen, dass Mastzellen und verschiedene Zytokine neben Schwannzellen zur notwendigen Mikroumgebung für die Entstehung eines Neurofibroms gehören. Eine maximale Anzahl neoplastischer Veränderungen hin zu einem Neurofibrom beobachten sie bei der Kombination aus NF1^{-/-}-Schwannzellen und NF1^{+/-}-Mastzellen. Haploinsuffiziente Mastzellen sowie möglicherweise die von ihnen sezernierten Zytokine sorgen für eine Stimulation von NF1^{-/-}-Schwannzellen zur Bildung und Wachstum eines Neurofibroms (Zhu et al. 2002).

Packer et al. (2002) sprechen Mastzellen eine Rolle bei der Dedifferenzierung von Neurofibromen zu, im Speziellen bei der Progression vom plexiformen Neurofibrom zum MPNST. Diffuse Neurofibrome von NF1-Patienten weisen im Vergleich zu kapsulären eine signifikant höhere Mastzellendichte auf (Tucker et al. 2011), wobei diffuse von kapsulären Neurofibromen anhand der Integrität des Perineuriums unterschieden werden. Auch die Verteilung unterscheidet sich deutlich: Bei diffusen Neurofibromen finden sich die Mastzellen ubiquitär, bei den kapsulären hingegen vor allem in der Peripherie. Die ebenfalls untersuchte lymphozytäre Infiltration ist bei beiden Neurofibromtypen ähnlich niedrig. Tucker et al. (2011) leiten daraus ab, dass Mastzellen eine unterschiedliche Rolle in verschiedenen Neurofibrommanifestationen zukommt.

Insgesamt zeigt die Literatur also einige Ergebnisse, die Mastzellen mit Neurofibromen in Verbindung bringen. Ergebnisse von Naber (2011) zeigen jedoch auch, dass ein Zusammenhang zwischen Mastzellen und dem Progress von Neurofibromen zum MPNST nicht herzuleiten ist. Naber (2011) untersucht verschiedene Neurofibromsubtypen auf mögliche Prädiktoren einer Tumorprogression. Dabei beobachtet er in Übereinstimmung mit anderen Autoren wie Tucker et al. (2011) eine abnehmende Mastzellanzahl bei KNF, PNF und MPNST. Dies deutet auf einen konträren Zusammenhang zwischen

Mastzellanzahl und maligner Progression der Neurofibrome hin. Diesen inversen Zusammenhang zwischen Mastzellen und Malignität beobachtet auch Baroni (1964) bei seinen Versuchen an Weichteiltumoren (siehe oben).

Es bleibt unklar, welchen Einfluss Mastzellen auf die Entwicklung und die maligne Entartung von Neurofibromen haben. Die Mastzellendichte allein hat keine ausreichende Aussagekraft. In Abbildung 8 sind die Mastzelle und einige der von ihr sezernierten Mediatoren in Kommunikation mit anderen Zellen in der Tumormikroumgebung gezeigt. Die exprimierten Moleküle wiederum nehmen Einfluss auf das Überleben von Tumorzellen sowie auf die Rekrutierung weiterer Immunzellen und den Umbau der umliegenden Gewebestrukturen (Maltby et al. 2009). Möglicherweise spielen diese Zytokine eine Rolle bei der Entwicklung und Progression von Neurofibromen bei Neurofibromatose Typ 1.

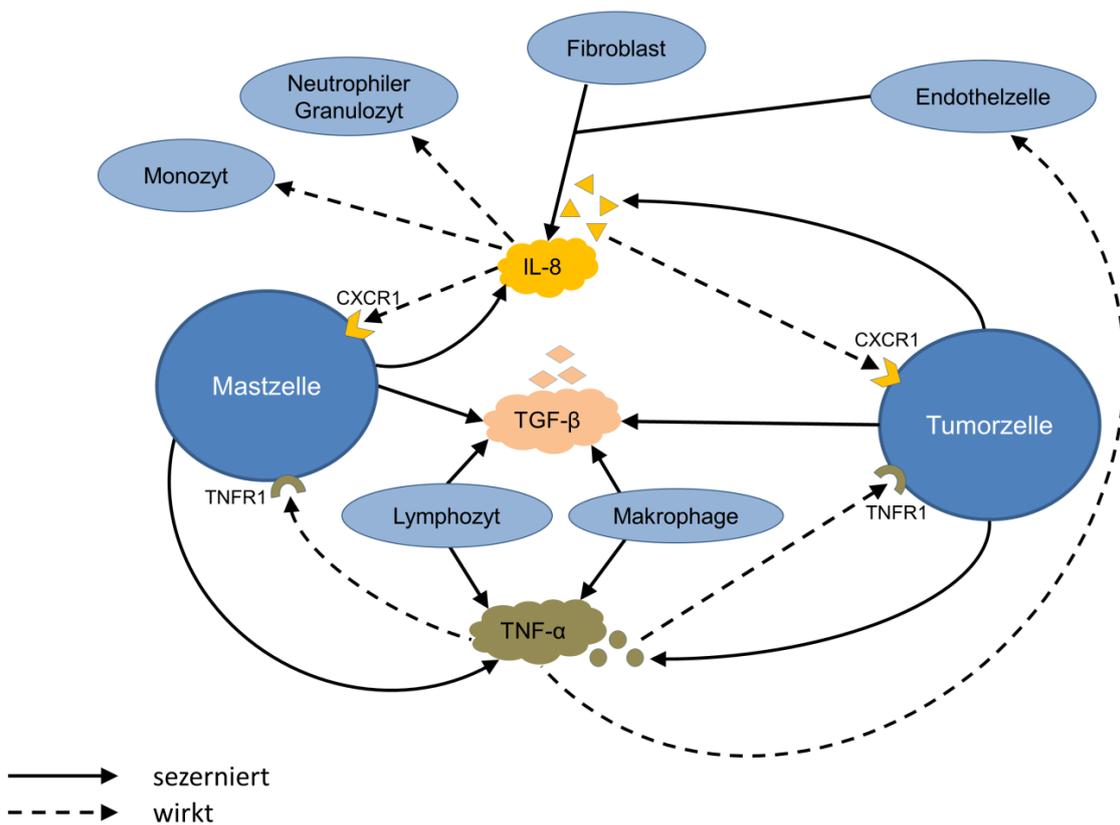


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Mast- und Tumorzelle in der Tumormikroumgebung. Nach Maltby et al. (2009: S. 20); Theoharides et al. (2012: S. 22); Rahman & McFadden (2006: S. 66); Branton & Kopp (1999: S. 1350); Zachariae et al. (1991: S. 595) Raychaudhuri & Vogelbaum (2011: S. 228), Charles et al. (2009: S. 3011); Ozaki et al. (2008: S. 32-34); Wagner & Myers (1996: S. 626)

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tumorproben

Die Neurofibromproben entstammen dem Archiv des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Sie wurden im Zeitraum von 1981 bis 2012 in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKE entnommen, in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Patienten erfüllen alle die NIH-Diagnosekriterien für Neurofibromatose Typ 1 (siehe 2.1). Insgesamt liegen 520 Tumorproben vor, die durch zwei Neuropathologen nach den histomorphologischen Kriterien (siehe 2.1.4) anhand von zwei Standardfärbungen (H.E.-Färbung und Periodsäure-Schiff-Reaktion), zwei histochemischen (Elastika-van-Gieson, Turnbull-Blau) und vier immunhistochemischen Färbungen (S100-Protein, epitheliales Membran-Antigen, Neurofilament, Ki-67-Protein) klassifiziert wurden. Die Sammlung der Tumorproben besteht aus 136 kutanen (Gruppe 1), 128 diffusen (Gruppe 2), 116 diffus-plexiformen (Gruppe 3), 118 plexiformen Neurofibromen (Gruppe 4) und 22 malignen peripheren Nervenscheidentumoren (Gruppe 5). 283 Proben sind weiblichen, 228 männlichen Patienten entnommen worden, in 9 Fällen liegt keine Angabe zum Geschlecht vor.

Am Institut für Pathologie des UKE erfolgte die Herstellung von elf *tissue micro arrays* (TMA) mit bis zu 148 Stanzen. Jedem Tumor wurden dazu zwei Stanzen entnommen. Von den TMA wurden histologische Schnitte erstellt und immunhistochemisch mit dem Färbeautomaten *Ventana BenchMark xt* markiert. Die Rohdaten zu den Tumorproben sind im Institut für Neuropathologie des UKE hinterlegt. Als Kontrollen wurden immunhistochemische Färbungen mit den gleichen Antikörpern an Gewebe des N. suralis von Nicht-NF1-Patienten durchgeführt. In Tabelle 16 im Anhang finden sich zum einen Informationen über die Patienten, denen das Nervengewebe entnommen wurde, zum anderen die Ergebnisse der Evaluation. Die Proben des Nervengewebes wurden ebenfalls vom Institut für Neuropathologie am UKE zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma-Aldrich GmbH, München	#A3648
Aceton	Sigma-Aldrich GmbH, München	#32201
Aqua dest		
Ethanol abs., technisch	Apotheke UKE	
Ethanol, technisch 96%	Apotheke UKE	
Formafix 4 % gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH	#70002-4-10
Formaldehyd		
Glas Mounting Medium	Sakura	#1408
Paraffin	Sakura/Tissue Tek	#4511
Poly-L-Lysine	Sigma-Aldrich GmbH, München	#P8920
TRIS-Buffered Saline, pH 7,6	Dako, Glostrup, Denmark	#S1968
Triton x 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	#3051.3
Xylol	ChemSolute/Th. Geyer	#326.2500

Tabelle 5: Verwendete Lösungen in alphabetischer Reihenfolge

Lösung	Rezeptur
Ethanol 70 %	7 Teile Ethanol abs. + 3 Teile Aqua dest
Ethanol 80 %	8 Teile Ethanol abs. + 2 Teile Aqua dest
Silane-Arbeitslösung	1 Teil 3-Aminopropyltriethoxysilane + 50 Teile Aceton
TRIS-Puffer	1 Paket TRIS-Buffered Saline, pH 7,6 + 5 L H ₂ O + 5 ml Triton x 100

Tabelle 6: Reagenzien für die immunhistochemischen Färbungen im Färbeautomaten
Ventana BenchMark xt

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Bluing Reagent	Ventana Roche	#760-2037
CC1 cell conditioning solution (ready to use)	Ventana Roche	#950-124
CC2 cell conditioning solution (ready to use)	Ventana Roche	#950-123
EZ Prep TM Konzentrat	Ventana Roche	#950-120
Hematoxylin	Ventana Roche	#760-2021
LCS (ready-to use)	Ventana Roche	#650-010
Protease 1	Ventana Roche	#760-2018
Reaction buffer (Konzentrat)	Ventana Roche	#950-300
SSC (Konzentrat)	Ventana Roche	#950-110
Ultraview Universal Alkaline Phosphatase RED	Ventana Roche	#760-501
Detection Kit bestehend aus:		
25ml ultraview Universal AP Red Enhancer		
25ml ultraview Universal AP Red Multimer		
25ml ultraview Universal AP Red Naphthol		
25ml ultraview Universal AP Red Fast Red A		
25ml ultraview Universal AP Red Fast Red B		
Ultraview Universal DAB Detection Kit	Ventana Roche	#760-500
bestehend aus:		
25ml ultraview Universal DAB Inhibitor		
25ml ultraview Universal HRP Multimer		
25ml ultraview Universal DAB Chromogen		
25ml ultraview Universal DAB H2O2		
25ml ultraview Universal DAB Copper		

Tabelle 7: Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen im Färbeautomaten
Ventana BenchMark xt

Lösung	Rezeptur
2xSSC	16 Liter Aqua dest + 4 Liter 2xSSC Konzentrat
EZ Prep	18 Liter Aqua dest + 2 Liter EZ Konzentrat
Reaction buffer	18 Liter Aqua dest + 2 Liter Reaction buffer

3.1.3 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper der immunhistochemischen Färbungen.

Antikörper	Klonalität	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung	Vorbehandlung
IL-8	polyklonal	Antikoerper-online (Aachen)	ABIN728053	1:50	P1 8 min.
CXCR1	polyklonal	Antikoerper-online (Aachen)	ABIN730873	1:50	CC1 m
TNF- α	monoklonal (4C&-H6)	Antikoerper-online (Aachen)	ABIN118949	1:100	CC2 St.
TNFR1	polyklonal	Antikoerper-online (Aachen)	ABIN1105799	1:20	o. V.
TGF- β	monoklonal (TB21)	Antikoerper-online (Aachen)	ABIN2476751	1:400	CC1 St.

Vorbehandlungen im Färbeautomaten: o. V.: ohne Vorbehandlung; P1: Protease; CC1 m: Citratpuffer, 30 min Einwirkzeit; CC1 St: Citratpuffer, 60 min Einwirkzeit; CC2 St: EDTA-Puffer, 60 min Einwirkzeit

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Weiteres
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co KG (Lauda-Königshofen)	REF 0101222, LOT 34726 017, 24 x 50 mm
Einbettkapseln	Biopsy-Uni-Cassette, Tissue Tek	REF 8086
Mikrotomklingen	pfm Medical	
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim v. d. Rhön)	SuperFrost/Plus, No. 2409/1, 75 x 25 mm
Pipettenspitzen	Eppendorf A.G. Hamburg	ep T.I.P.S.
Tubes 1.5 μ l	Safe Seal Gefäß, Aktiengesellschaft & Co Nümbrecht (Sarstedt)	

3.1.5 Laborgeräte

Tabelle 10: Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Laborgerät	Hersteller	Geräte-/Seriennummer
Ausgießformen		
Brutschrank	Heraeus	B6-Typ; 50042301
Einbettautomat	Leica ASP 300S	74319 / 2871
Einbettautomat	Leica ASP 300S	74318 / 2705
Eindeckautomat	Leica CV 5030	1.007.205 / 11076416
Färbeautomat	Ventana Bench Mark XT/LT	1.017.646 / 714005
Gießstation	Leica EG1160	73444 / 3693
Heizpinzette	Leica EG F	
Kühlplatte	Leica EG 1150 C	70747 / 4055
Mikroskop	Olympus BX51	1.003.440
Mikrotom	Leica SM 2000 R	1.003.849 / 3851
Pipetten	Eppendorf A.G. Hamburg	
Wasserbad	GFL 1052	43436

3.2 Methoden

Der folgende Abschnitt beschreibt die in dieser Arbeit verwendeten Methoden. Das Labpersonal des Instituts für Neuropathologie des UKE erstellte die Schnitte (3.2.1) und führte die immunhistochemischen Färbungen durch (3.2.2).

3.2.1 Herstellung der Schnitte

Nach der Entnahme wurden die Tumorproben in Formalinlösung fixiert. Zur Herstellung der Paraffinblöcke wurden die Tumorproben zugeschnitten und in dieser Form in Einbettkapseln in den Einbettautomat gegeben. Zur Entwässerung wurde danach folgendes Programm durchlaufen:

1.	Formalin 4 % gepuffert	90 Minuten
2.	Aqua dest	15 Minuten
3.	Aufsteigende Alkoholreihe	
	70 % Alkohol	30 Minuten
	80 % Alkohol	30 Minuten
	96 % Alkohol	30 Minuten
	96 % Alkohol	45 Minuten
	100 % Alkohol	30 Minuten
	100 % Alkohol	90 Minuten
4.	Xylol	90 Minuten
5.	Xylol	150 Minuten
6.	Paraffin	60 Minuten
7.	Paraffin	150 Minuten
8.	Paraffin	120 Minuten

Die entwässerte und an der Gießstation in Paraffin gegossene Tumorprobe wurde auf der Kühlplatte als Block gekühlt. Als Paraffinblock lagerte die Tumorprobe im Archiv für Neuropathologie des UKE. Zur Herstellung der TMA, die es ermöglichen, eine große Anzahl an Tumorproben unter den gleichen Bedingungen zu behandeln, zu färben und zu evaluieren, wurden aus den 520 in Paraffinblöcken vorliegenden Tumorproben je zwei Stenzen à 1 mm Durchmesser entnommen und in einen neuen Paraffinblock mit bis zu 148 Stenzen eingereiht. So entstanden 11 TMA.

Am Schlittenmikrotom wurden aus den TMA anschließend Schnitte in 2 µm Dicke angefertigt und im kalten Wasserbad gesammelt. Gelungene Schnitte wurden mit dem Objektträger aufgenommen und im heißen Wasserbad gestreckt. Falls die Schnitte nicht hafteten, wurden ein paar Tropfen Poly-L-Lysin-Lösung auf dem Objektträger verstrichen, angetrocknet und der Schnitt bei Raumtemperatur aufgezogen. Als Objektträger wurden Silane-beschichtete SuperFrost/Plus-Objektträger verwendet. Die Silanebeschichtung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Ansetzen der Silane-Arbeitslösung	4 ml 3-Aminopropyltriethoxysilane + 200 ml Aceton mischen
2. Reinigung der Objektträger	2 Minuten in Aceton stellen
3. Trocknen der Objektträger	an der Luft
4. Silane-Benetzung der Objektträger	2 Minuten in Silane-Arbeitslösung stellen
5. Spülen der Objektträger	zweimal mit Aqua dest spülen
6. Trocknen der Objektträger	im Brutschrank trocknen lassen
7. Lagerung der Objektträger	im Dunkeln bei Raumtemperatur

3.2.2 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen der Tumorproben erfolgte im Färbeautomat *Ventana Benchmark xt*. Zur Etablierung der verwendeten Antikörper gegen IL-8, CXCR1, TNF- α , TNFR1 und TGF- β wurden zunächst Färbungen mit verschiedenen Verdünnungen und Vorbehandlungen angesetzt und bewertet. Als Gewebe wurden für die Antikörper gegen IL-8 und CXCR1 ein Teil der Neurofibromproben (Mastzellen dienten als Positivkontrolle) und für die Antikörper gegen TNF- α , TNFR1 und TGF- β Glioblastomproben aus dem Institut für Neuropathologie des UKE verwendet. Die Kombination aus Vorbehandlung und Verdünnung, die in diesem Etablierungsverfahren die besten Färbungen lieferte, wurde im Folgenden an allen Neurofibromschnitten an-

gewandt. Die Antikörper wurden manuell nach folgendem Protokoll angesetzt, die Verdünnung und Vorbehandlung ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

1.	Antikörperansatz: 100 ml Antibody Diluent + 10 ml Ziegenserum + 90 ml TRIS-Puffer
2.	Antikörper mit Antikörperansatz in entsprechender Verdünnung mischen

Die manuell angesetzten Antikörper wurden dem Färbeprotokoll des Automaten *Ventana Benchmark xt* zugewiesen. Der Färbeprozess wurde für alle Antikörper (siehe Tabelle 8) nach folgendem Färbeprotokoll vollautomatisiert durchlaufen:

1.	Deparaffinieren	76°C	4 Minuten
2.	Hitzevorbehandlung	- o. V. (ohne Vorbehandlung) - P1 (Protease) - Cell conditioning solution 1 (Citratpuffer) mildes CC1 (CC1m) standard CC1 (CC1 st) - Cell conditioning solution 2 (EDTA-Puffer) standard CC2 (CC2 st)	8 Minuten 30 Minuten 60 Minuten 60 Minuten
3.	Hemmung endogener Peroxidase	1 Tropfen UV Inhibitor	4 Minuten
4.	Inkubation mit Primärantikörper	1 Tropfen Antikörperansatz	32 Minuten
5.	Inkubation mit Sekundärantikörper	Reagenzien aus Detektionskit (Ultraview Universal DAB) 1 Tropfen ultraview Universal HRP Multimer 1 Tropfen ultraview Universal DAB Chromogen + 1 Tropfen ultraview Universal DAB H2O2 + LCS-Puffer 1 Tropfen ultraview Universal DAB Copper	8 Minuten 8 Minuten 4 Minuten
6.	Gegenfärbung	1 Tropfen H.E. + LCS-Puffer 1 Tropfen Bluing Reagent + LCS-Puffer	4 Minuten 4 Minuten
7.	Aufsteigende Alkoholreihe	70 % Alkohol 80 % Alkohol 96 % Alkohol (3 x) 100 % Alkohol (3 x) Xylol	jeweils wenige Sekunden schwenken
8.	Eindeckeln	Im Eindeckelautomat mit Deckgläschen	

Die Firma *Ventana Medical Systems* gibt die verwendeten Sekundärantikörper und Blocking-Seren in einem Detection Kit heraus. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt, weshalb keine detailliertere Angabe möglich ist.

3.2.3 Evaluation

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Neurofibromschnitte erfolgte quantitativ und semiquantitativ. Es wurde stets die gesamte Fläche eines TMA-Spots (0,79 mm², 1 mm Durchmesser) bewertet. Durch das standardisierte und technisierte Färbeverfahren im Färbeautomaten konnte, im Gegensatz zu manuellen Färbungen, von nahezu identischen Bedingungen für die immunhistochemischen Reaktionen der einzelnen Gewebeproben ausgegangen werden.

Zunächst erfolgte die quantitative Untersuchung der gefärbten Neurofibromschnitte hinsichtlich ihrer Mastzellanzahl. Dazu wurden bei den Färbungen mit dem Antikörper gegen IL-8 und CXCR1 die markierten Mastzellen in allen Tumorproben in der 20er, 40er und 100er Vergrößerung des Lichtmikroskops ausgezählt.

Daraufhin wurde die Intensität der Immunreaktion aller Antikörper in den Neurofibromproben von NF1-Patienten sowie dem N. suralis-Gewebe von Nicht-NF1-Patienten ausgewertet. Hierfür wurde eine semiquantitative Evaluation (0 bis 6) und ordinale Skalierung gewählt:

- 0 keine Färbung
- 1 minimale Färbung
- 2 leichte Färbung
- 3 mittelleichte Färbung
- 4 mittelstarke Färbung
- 5 starke Färbung
- 6 sehr starke Färbung

3.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Version 21 der Statistiksoftware *IBM SPSS Statistics* (IBM 2012) für Windows verwendet. In die statistische Auswertung sind die in dieser Studie erhobenen Daten, hinterlegt im Institut für Neuropathologie des UKE hinterlegt, eingegangen.

Das Alter der Patienten bei Probenentnahme erfüllt hinreichend die Annahme einer Normalverteilung, sodass hier der Mittelwert angegeben wird. Die absolute Mastzellanzahl erfüllt nicht hinreichend die Bedingung einer Normalverteilung. Zur Beschreibung der Verteilung wird der Median gebildet und in den Ergebnissen folgendermaßen ange-

geben: Median (25 %- / 75 %-Quartile). Nach einem deskriptiven Vergleich der Mediane werden die Ergebnisse einer Korrelationsanalyse nach Pearson unterzogen.

Für die Intensität der durch die Antikörper ausgelösten Immunreaktionen wird ebenfalls der Median errechnet. Die erhobenen Daten werden einer nicht-parametrischen Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b unterzogen. In die Analyse fließen die Variablen Mastzellanzahl, Intensität der Antikörperfärbung und Tumorsubtyp ein und sie wird ebenfalls für die unterschiedlichen Subtypen getrennt durchgeführt. Bei der Präsentation der Ergebnisse wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ von einer signifikanten, bei $p < 0,01$ von einer hoch signifikanten Korrelation ausgegangen.

4 Ergebnisse

Es wurden 520 Neurofibrome untersucht, die nach den in der Einleitung beschriebenen histomorphologischen Kriterien in fünf Gruppen eingeteilt wurden: Es handelte sich um 136 dermale (KNF), 128 diffuse (DNF), 116 diffus-plexiforme (DPNF), 118 plexiforme Neurofibrome (PNF) und 22 maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST).

4.1 Klinische Daten

Die 520 untersuchten Proben stammten von 385 Patienten mit der klinisch gesicherten Diagnose einer NF1. 54,4% davon waren weiblich, 43,8% männlich und in 1,7% war das Geschlecht nicht genannt. Der Altersmittelwert bei Probenentnahme der Patienten lag bei 30,9 Jahren ($n = 513$), in 1,8% der Fälle ($n = 7$) gab es keine Altersangabe. Das mittlere Alter bei Betrachtung der Tumorsubtypen lag bei den KNF bei 39,4 Jahren, bei den DNF bei 31,3 Jahren, bei den DPNF bei 26,4 Jahren, bei den PNF bei 24,1 Jahren und bei den MPNST bei 38 Jahren.

4.2 Mastzellen

Die Mastzellanzahl wurde mit Antikörpern gegen IL-8 und Antikörpern gegen den zugehörigen Rezeptor CXCR1 ermittelt. Es zeigte sich eine deutlich erkennbare Markierung mit beiden Antikörpern (siehe Abbildung 9).

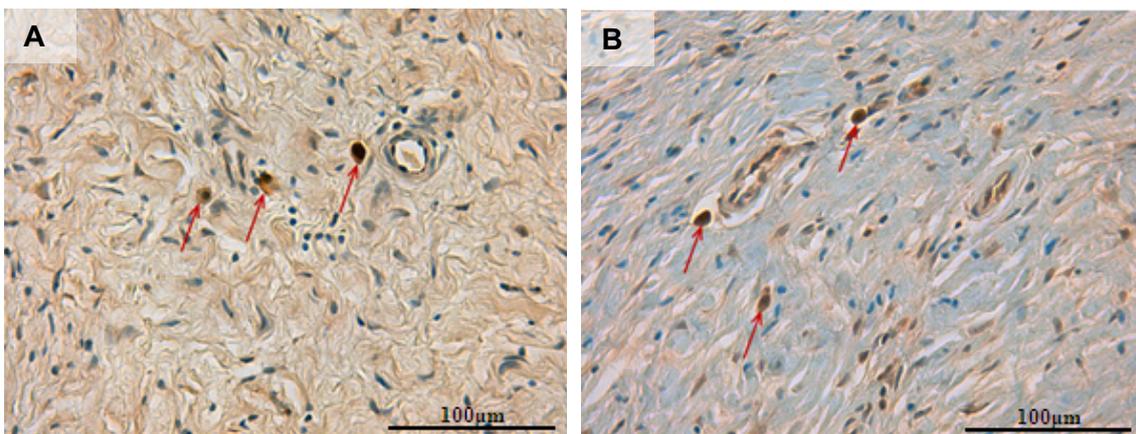


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung eines plexiformen Neurofibroms mit **A** IL-8 (Patient 121) und **B** CXCR1 (Patient 245), roter Pfeil = Mastzelle

Da die Bedingung der Normalverteilung nicht hinreichend erfüllt war, wird die mediane Mastzellanzahl (25%- / 75%-Quartile in Klammern) angegeben.

Bei der separaten Betrachtung der Tumorsubtypen ergab sich bei der Darstellung der Mastzellen mit Anti-IL-8-Antikörper je Gewebespot ein Median von 16 (6 / 28) Mastzellen für die KNF (n = 125/136), von 16,5 (6/27,25) Mastzellen für die DNF (n = 102/128), von 12 (4 / 21,25) Mastzellen für die DPNF (n = 102/116), von 3 (1 / 5) Mastzellen für die PNF (n = 95/118) und von 0 (0 / 5) Mastzellen für die MPNST (n = 21/22). Die Färbung mit Anti-CXCR1-Antikörper lieferte einen Median von 8 (2 / 22) Mastzellen für die KNF (n = 122/136), von 6 (2 / 14,25) Mastzellen für die DNF (n = 98/128), von 7 (2 / 16) Mastzellen für die DPNF (n = 99/116), von 2 (0 / 3) Mastzellen für die PNF (n = 90/118) und von 0 (0 / 1) Mastzellen für die MPNST (n = 22/22).

Der Trend der Mastzellanzahl bei der Färbung mit Antikörpern gegen IL-8 und CXCR1 stimmte dahingehend überein, dass die Anzahl von Mastzellen bei den KNF, DNF und DPNF hoch, bei den PNF und MPNST hingegen niedrig war. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Mastzellanzahl von den PNF zu den DPNF. In Abbildung 10 ist die mediane Mastzellanzahl der verschiedenen Tumortypen für die Bestimmung mit den unterschiedlichen Antigenen in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

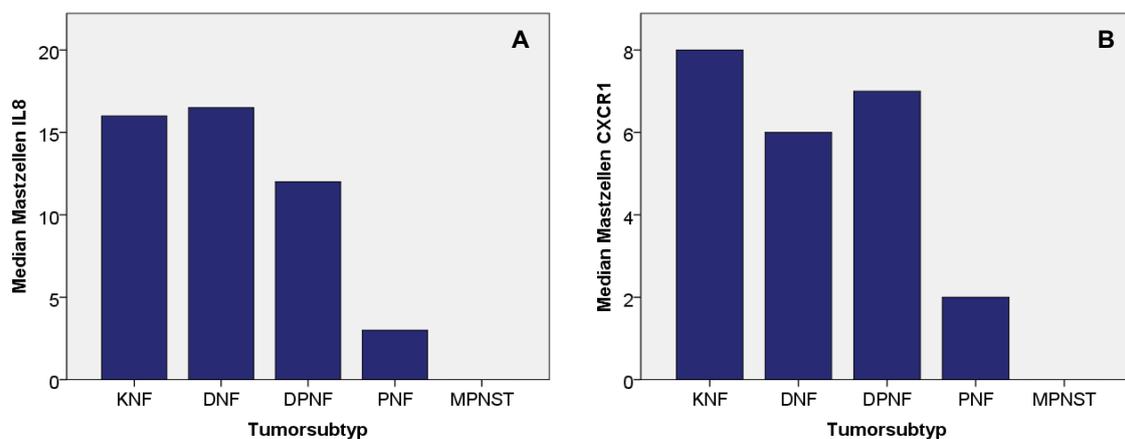


Abbildung 10: Mittlere Anzahl an Mastzellen bei den verschiedenen Neurofibromsubtypen. Färbung der Mastzellen mit Antikörpern gegen **A** IL-8 und **B** CXCR1

Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Mastzellanzahlen, die mittels der unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden (IL-8 ~ CXCR1: $r = 0,717$ $p < 0,01$).

4.3 Antigenexpression in peripheren Nervenscheidentumoren

An den 520 Proben wurde die Expression von fünf Antigenen untersucht (IL-8, CXCR1, TNF- α , TNFR1, TGF- β). Aus technischen Gründen kam es bei der Erstellung der Neurofibromschnitte und immunhistochemischen Färbungen hin und wieder zu Verlust einzelner TMA-Spots. Aus diesem Grund konnten nicht immer alle Tumoren ausgewertet werden, was zu Differenzen in der Gesamtfallzahl führte. Hinter der Angabe des Medians findet sich die 25%- / 75%-Quartile in Klammern.

4.3.1 Interleukin 8

In die Auswertung der Färbeintensität gingen 444 Neurofibromschnitte ein (n = 444/520). Die Immunreaktion aller Tumorsubtypen auf den Anti-IL-8-Antikörper war minimal, der Median lag bei 1 (0 / 2). Die Immunreaktion durch IL-8 beschränkte sich vor allem auf das Tumorzellzytoplasma, aber auch Zellkerne der Tumor- und Mastzellen waren teilweise markiert. Bei getrennter Betrachtung der Neurofibromsubtypen zeigte sich bei den KNF im Median keine messbare Färbung, bei den DNF eine leichte und bei den DPNF eine minimale Färbung. Die PNF sowie die MPNST wiesen keine messbare Färbung auf. Der N. suralis zeigte eine stark variierende Färbung von nicht messbar bis mittelstark. In Abbildung 11 ist beispielhaft an einem DNF die Immunreaktion für IL-8 gezeigt.

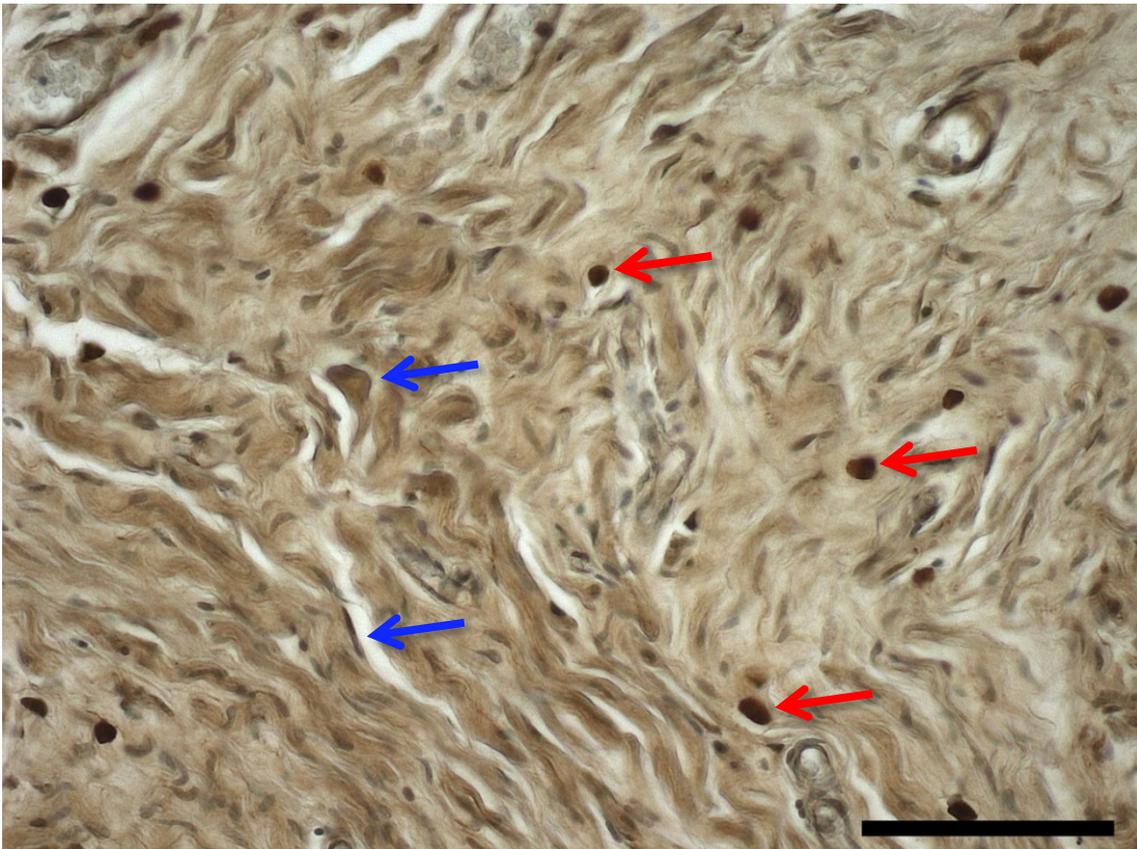


Abbildung 11: Immunreaktion für IL-8 in 20-facher Vergrößerung bei einem DNF, Patient Nummer 586, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 μ m

4.3.2 CXCR 1

In die Evaluation der immunhistochemischen Färbung mit Anti-CXCR1-Antikörper gingen 431 (n = 431/520) Neurofibromschnitte ein. Der Median der Färbeintensität lag insgesamt bei 1 (0 / 2). Die Markierung betraf vor allem die Kerne der Tumorzellen. Es zeigte sich eine minimale Färbung bei den KNF, DNF, DPNF und PNF sowie eine leichte Färbung bei den MPNST. Der N. suralis wies eine nicht messbare Färbeintensität auf. Abbildung 12 zeigt beispielhaft am MPNST die Immunreaktion für CXCR1.

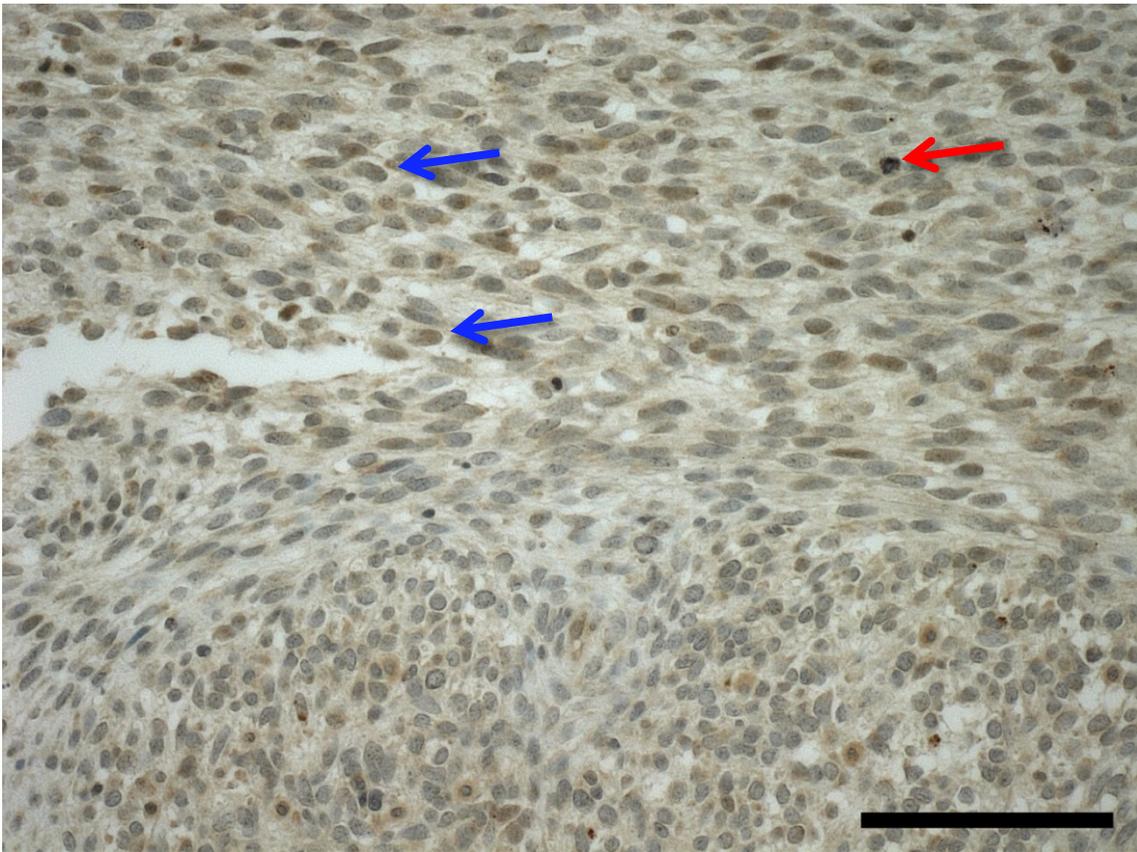


Abbildung 12: Immunreaktion für CXCR1 in 20-facher Vergrößerung bei einem MPNST, Patient Nummer 36, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 μ m

4.3.3 Tumornekrosefaktor α

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-TNF- α -Antikörper konnten 426 (n = 426/520) Neurofibromschnitte ausgewertet werden. Die Färbeintensität aller Tumorproben lag bei einem Median von 5 (4 / 6). Die KNF, DNF, DPNF und PNF zeigten eine starke, die MPNST hingegen eine mittelstarke Färbung. Sehr deutlich waren die Kerne der Tumorzellen markiert. Die Immunreaktion im N. suralis-Gewebe war im Zytoplasma nicht messbar, in den Zellkernen jedoch intensiv. In Abbildung 13 ist am Beispiel eines PNF die Immunreaktion für TNF- α dargestellt.

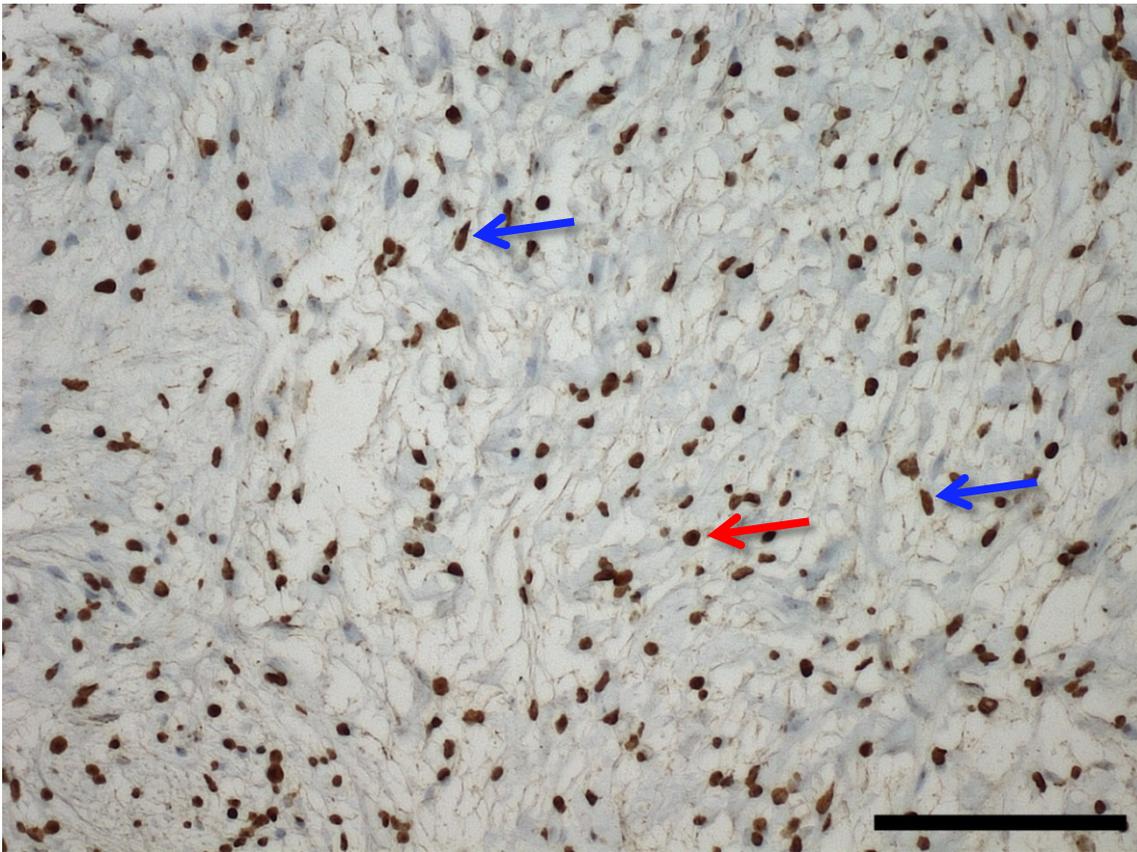


Abbildung 13: Immunreaktion für TNF- α in 20-facher Vergrößerung bei einem PNF, Patient Nummer 92, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 μ m

4.3.4 Rezeptor für Tumornekrosefaktor α vom Typ 1

In die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-TNFR1-Antikörper gingen 432 (n = 432/520) Neurofibromschnitte ein. Der Median der Färbeintensität lag insgesamt bei 5 (4 / 6), wobei hier sowohl die Kerne als auch das Zytoplasma der Tumorzellen markiert waren. Es zeigte sich eine starke Immunreaktion bei allen untersuchten Subtypen (KNF, DNF, DPNF, PNF, MPNST). Die immunhistochemische Färbung des N. suralis mit Anti-TNFR1-Antikörper fiel ebenfalls stark positiv aus. Die Immunreaktion für TNFR1 ist am Beispiel eines KNF in Abbildung 14 dargestellt.

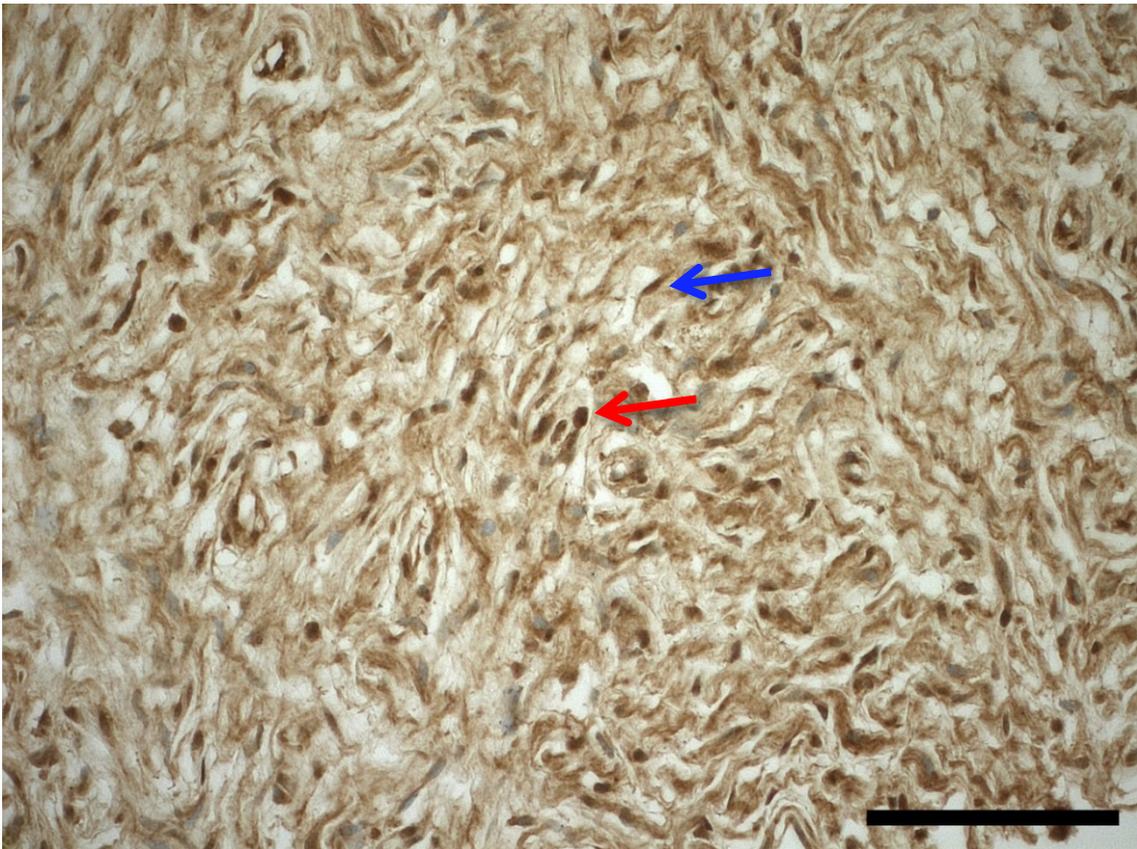


Abbildung 14: Immunreaktion für TNFR1 in 20-facher Vergrößerung bei einem KNF, Patient Nummer 662, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 μ m

4.3.5 Transforming Growth Factor β

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-TGF- β -Antikörper erfolgte an 439 (n = 439/520) der Neurofibromschnitte. Die mediane Färbeintensität betrug insgesamt 0 (0 / 0). Bei den KNF, DNF, DPNF und PNF zeigte sich keine messbare, bei den MPNST hingegen eine minimale bis leichte (1,5) Markierung. Auffällig war insgesamt eine sehr heterogene Färbung, die sich maßgeblich im Zytoplasma zeigte. Es ergab sich im Mittel eine sehr schwache Färbeintensität. Beim Gewebe des N. suralis zeigte sich keine messbare Markierung bei der Färbung mit Anti-TGF- β -Antikörper. Die Abbildung 15 stellt beispielhaft am MPNST die Immunreaktion für TGF- β dar.

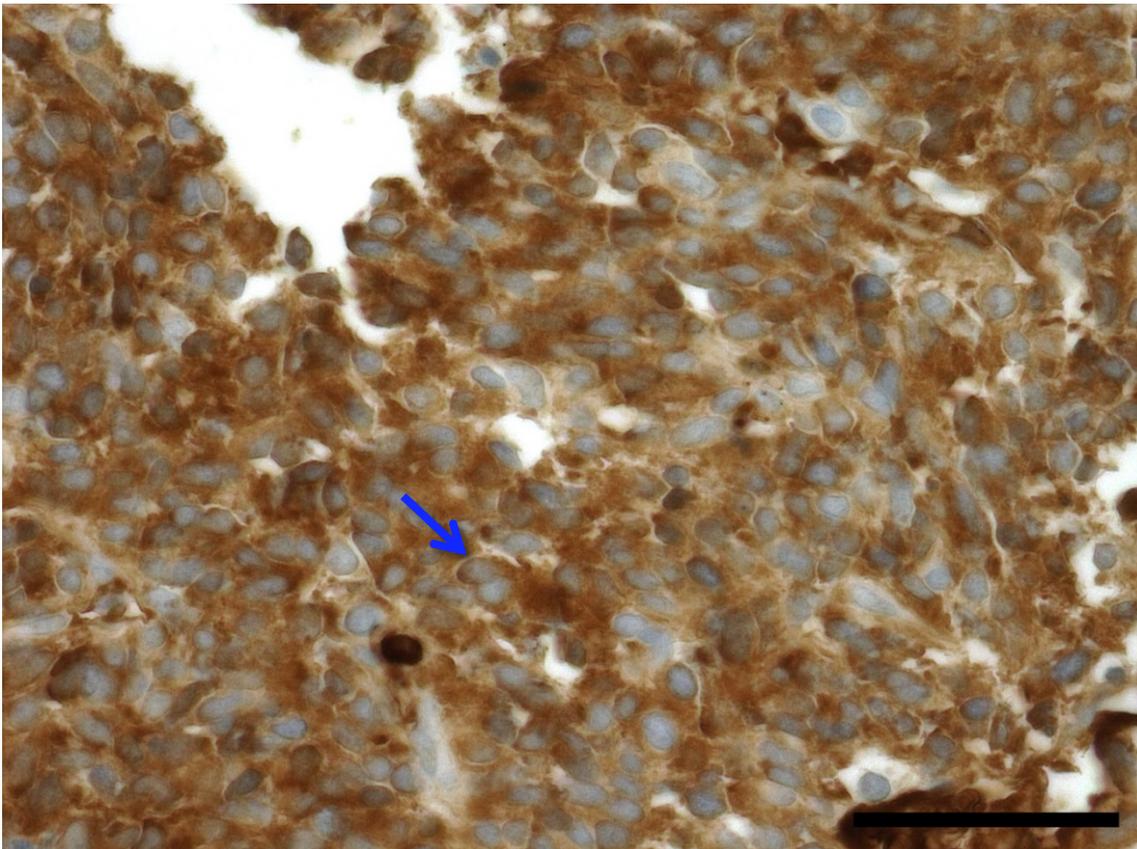


Abbildung 15: Immunreaktion für TGF- β in 40-facher Vergrößerung bei einem MPNST, Patient Nummer 46, blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 50 μ m

Die Abbildung 16 zeigt vergleichend die Medianwerte der Immunreaktionen auf die verwendeten Antikörper bei den unterschiedlichen Tumortypen. Insgesamt war die Reaktion mit Anti-TNF- α - und Anti-TNFR1-Antikörpern deutlich stärker als mit Anti-IL-8, Anti-CXCR1- und TGF- β -Antikörpern. Weiterhin wurde bei der Verwendung von Anti-CXCR1- und Anti-TGF- β -Antikörpern eine intensivere Anfärbung der MPNST im Vergleich zu den restlichen untersuchten peripheren Nervenscheidentumoren deutlich. Bei der Verwendung von Anti-TNF- α -Antikörpern hingegen fiel die Immunreaktion bei den MPNST geringer aus.

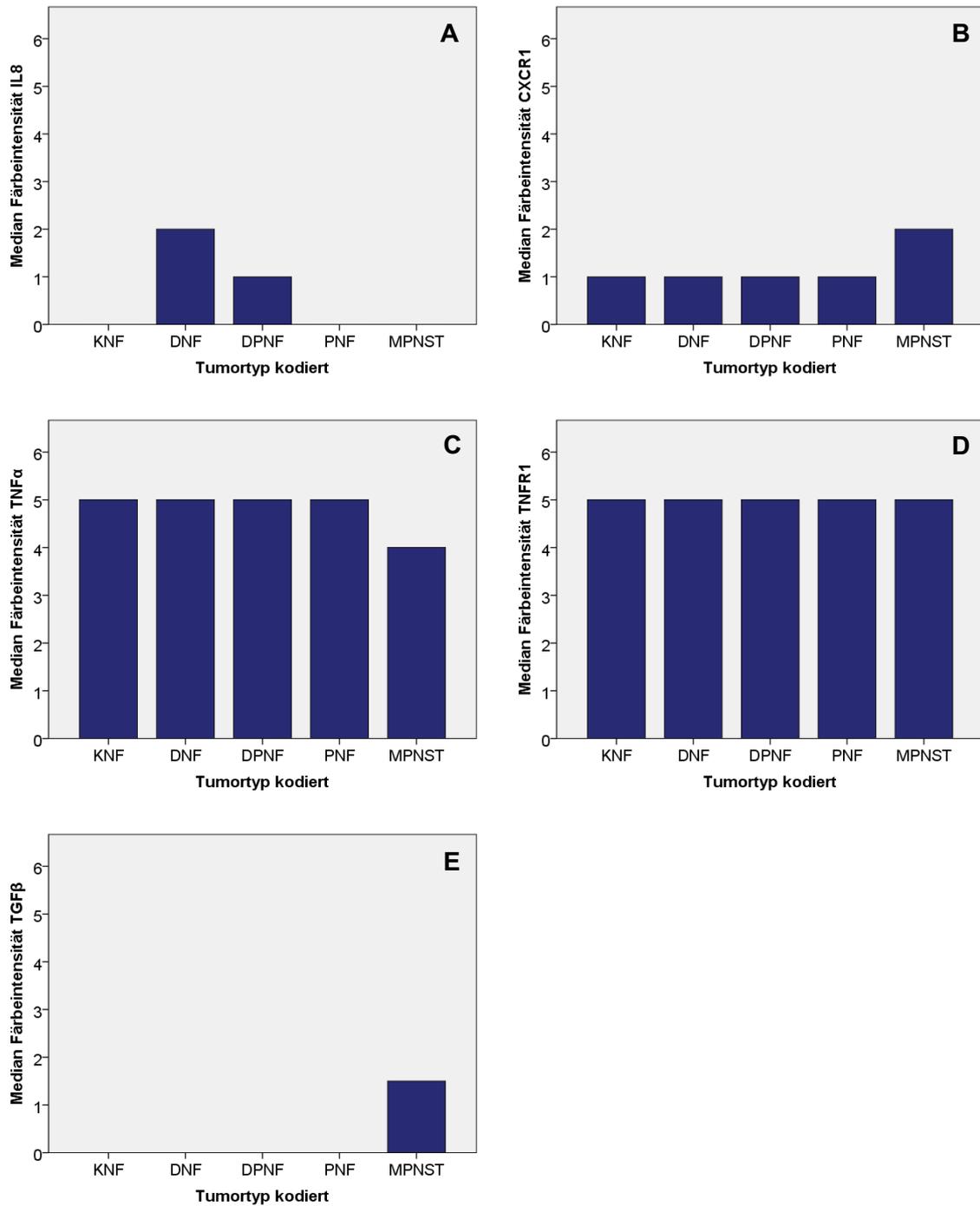


Abbildung 16: Mediane der Färbintensitäten bei der Reaktion mit Antikörpern gegen **A** IL-8, **B** CXCR1, **C** TNF- α , **D** TNFR1 und **E** TGF- β

4.4 Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b

Tabelle 11: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, alle Tumorsubtypen

	Tumortyp kodiert	Mastzellen IL-8	Mastzellen CXCR1	Färbeintensität IL-8	Färbeintensität CXCR1	Färbeintensität TNF- α	Färbeintensität TNFR1
Mastzellen IL-8	τ	-,330**					
	p	0,000	1				
	N	445					
Mastzellen CXCR1	τ	-,288**	,586**				
	p	0,000	2	0,000			
	N	431	428				
Färbeintensität IL-8	τ	-0,062	,110**	,086*			
	p	0,116	0,003	0,022	5	7	
	N	444	442	430			
Färbeintensität CXCR1	τ	0,051	0,048	0,051	,183**		
	p	0,201	0,194	0,173	0,000	9	
	N	431	428	428	430		
Färbeintensität TNF- α	τ	-,106**	0,061	0,074	,168**	0,075	
	p	0,008	0,097	0,051	0,000	0,069	10
	N	426	417	409	418	409	
Färbeintensität TNFR1	τ	0,039	0,072	0,073	0,029	,134**	0,039
	p	0,335	0,055	0,057	0,476	0,001	0,345
	N	432	422	413	422	413	420
Färbeintensität TGF- β	τ	,309**	-,148**	-,134**	-0,022	0,050	-0,065
	p	0,000	0,000	0,001	0,601	0,249	0,125
	N	439	423	414	424	414	422
							0,028
							0,517
							425

Die Kodierung für den Tumortyp 1 = KNF, 2 = DNF, 3 = DPNF, 4 = PNF, 5 = MPNST; τ = Korrelationskoeffizient; p = p-Wert der Korrelationsanalyse (zweiseitig); ** = Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig); * = Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig); signifikante Korrelationen sind gelb hinterlegt.

4.4.1.1 Mit dem Tumortyp assoziierte Variablen

Die statistische Analyse nach Kendall-Tau-b zeigte, wie auch die Analyse nach Pearson, dass die Anzahl an Mastzellen am höchsten in den KNF war und zu den MPNST abnahm (siehe 1 und 2 in Tabelle 11). Ebenso verhielt es sich mit der TNF- α -Expression: Sie war in den MPNST geringer als in den KNF, DNF, DPNF und PNF (siehe 3 in Tabelle 11). Die gegenteilige Beobachtung ließ sich bei TGF- β machen: Eine Expression von TGF- β im Tumorgewebe ließ sich nur bei MPNST, nicht jedoch bei KNF, DNF, DPNF und PNF nachweisen (siehe 4 in Tabelle 11).

4.4.1.2 Mit den Mastzellen assoziierte Variablen

Es zeigte sich weiterhin eine Assoziation der Mastzellanzahl und der IL-8-Expression (siehe 5 und 7 in Tabelle 11): Mit der Anzahl an Mastzellen stieg auch der Nachweis von IL-8 im Tumor. Bei der Expression von TGF- β verhielt es sich entgegengesetzt: Je höher die Mastzellanzahl, desto geringer die TGF- β -Expression im Tumorgewebe (siehe 6 und 8 in Tabelle 11).

4.4.1.3 Zytokine und Rezeptoren untereinander

Die statistische Analyse nach Kendall-Tau-b zeigte außerdem eine Korrelation der Expression von CXCR1 sowie TNF- α mit der IL-8-Expression im Tumor (siehe 9 und 10 in Tabelle 11). Genauso verhielt es sich mit der Expression von CXCR1 und TNFR1 im Tumor (siehe 11 in Tabelle 11).

Um einen möglichen Zusammenhang von Mastzellen und der von ihnen exprimierten Zytokine bzw. Rezeptoren auf den Progress der unterschiedlichen Tumormanifestationen aufzudecken, wurde die Korrelationsanalyse für die Tumortypen getrennt durchgeführt (Tabelle 12, Tabelle 13, Tabelle 14, Tabelle 15). Die Ergebnisse dieser statistischen Auswertung werden im Folgenden präsentiert.

Tabelle 12: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, kutanes Neurofibrom

KNF		Mastzellen IL-8	Mastzellen CXCR1	Färbe- intensität IL-8	Färbe- intensität CXCR1	Färbe- intensität TNF- α	Färbe- intensität TNFR1
Mastzellen CXCR1	τ	,518**					
	p	0,000					
	N	120					
Färbe- intensität IL-8	τ	-,163*	-,185**				
	p	0,020	0,010				
	N	124	121				
Färbe- intensität CXCR1	τ	0,027	0,040	0,080			
	p	0,701	0,569	0,308			
	N	122	122	123			
Färbe- intensität TNF- α	τ	-0,094	-0,111	0,031	0,122		
	p	0,187	0,124	0,703	0,125		
	N	117	115	117	117		
Färbe- intensität TNFR1	τ	,183*	,215**	-,161*	0,064	-0,097	
	p	0,011	0,003	0,049	0,425	0,232	
	N	115	112	114	114	113	
Färbe- intensität TGF- β	τ	-0,058	-0,033	-0,053	-0,039	0,066	-,168*
	p	0,442	0,671	0,531	0,649	0,434	0,050
	N	121	118	121	120	118	116

τ = Korrelationskoeffizient
p = p-Wert der Korrelationsanalyse (zweiseitig)
** = Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)
* = Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)
Signifikante Korrelationen sind gelb hinterlegt.

In den KNF (siehe Tabelle 12) zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl an Mastzellen und der IL-8-Expression: je stärker die Mastzellendichte, desto geringer die IL-8-Expression im Tumor. Genau umgekehrt verhielt es sich mit der Mastzellanzahl und TNFR1: je mehr Mastzellen, desto stärker die TNFR1-Expression im Tumorgewebe. Weiterhin zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der IL-8- und der TNFR1-Expression sowie zwischen der TNFR1- und der TGF- β -Expression im Tumor. Je geringer also die Dichte des TNF- α -Rezeptors TNFR1 im Tumorgewebe, desto höher die Expression von IL-8 und TGF- β im Tumor.

Tabelle 13: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, diffuses/diffus-plexiformes Neurofibrom

DNF/DPNF		Mastzellen IL-8	Mastzellen CXCR1	Färbe- intensität IL-8	Färbe- intensität CXCR1	Färbe- intensität TNF- α	Färbe- intensität TNFR1
Mastzellen CXCR1	τ	,572**					
	p	0,000					
	N	197					
Färbe- intensität IL-8	τ	,109*	0,080				
	p	0,039	0,141				
	N	204	197				
Färbe- intensität CXCR1	τ	0,106	0,095	,202**			
	p	0,054	0,087	0,001			
	N	197	197	197			
Färbe- intensität TNF-α	τ	0,025	0,078	,212**	0,058		
	p	0,642	0,159	0,000	0,348		
	N	195	188	195	188		
Färbe- intensität TNFR1	τ	0,065	0,065	0,115	,194**	,125*	
	p	0,238	0,247	0,056	0,002	0,037	
	N	199	192	199	192	201	
Färbe- intensität TGF-β	τ	-0,071	-0,066	0,060	0,035	-0,017	0,069
	p	0,209	0,253	0,333	0,582	0,777	0,265
	N	198	191	198	191	201	204

τ = Korrelationskoeffizient
p = p-Wert der Korrelationsanalyse (zweiseitig)
** = Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)
* = Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)
Signifikante Korrelationen sind gelb hinterlegt.

Mit steigender Mastzellanzahl wurde in den DNF/DPNF mehr IL-8 exprimiert (siehe Tabelle 13). Es wurde in den DNF/DPNF außerdem eine Assoziation zwischen der Expression von IL-8 und seinem Rezeptor CXCR1 mit der Expression von TNF- α im Tumor deutlich. Darüber hinaus zeigte sich eine Korrelation zwischen TNF- α und seinem Rezeptor TNFR1: je stärker die Expression des Zytokins TNF- α , desto höher die Rezeptordichte von TNFR1 im Tumor. Die Expression von TNFR1 korrelierte zudem mit der Expression von CXCR1 im Tumorgewebe.

Tabelle 14: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, plexiformes Neurofibrom

PNF		Mastzellen IL-8	Mastzellen CXCR1	Färbe- intensität IL-8	Färbe- intensität CXCR1	Färbe- intensität TNF- α	Färbe- intensität TNFR1
Mastzellen CXCR1	τ	,391**					
	p	0,000					
	N	90					
Färbe- intensität IL-8	τ	0,044	0,071				
	p	0,608	0,422				
	N	93	90				
Färbe- intensität CXCR1	τ	-0,013	0,044	,348**			
	p	0,882	0,615	0,000			
	N	88	87	88			
Färbe- intensität TNF-α	τ	-0,078	-0,035	0,113	0,105		
	p	0,350	0,680	0,219	0,247		
	N	85	85	85	83		
Färbe- intensität TNFR1	τ	-0,043	-0,062	-0,158	0,089	-0,025	
	p	0,613	0,481	0,095	0,338	0,785	
	N	87	87	87	85	85	
Färbe- intensität TGF-β	τ	0,132	0,070	-0,088	0,015	0,059	0,022
	p	0,129	0,429	0,354	0,874	0,510	0,817
	N	83	83	83	81	82	83

τ = Korrelationskoeffizient
p = p-Wert der Korrelationsanalyse (zweiseitig)
** = Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)
* = Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)
Signifikante Korrelationen sind gelb hinterlegt.

Bei der statistischen Auswertung der PNF (siehe Tabelle 14) zeigte sich eine Assoziation zwischen der Expression von IL-8 und seinem Rezeptor CXCR1 durch die Mastzellen sowie in den Tumoren.

Tabelle 15: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, maligner peripherer Nervenscheidentumor

MPNST		Mastzellen IL-8	Mastzellen CXCR1	Färbe- intensität IL-8	Färbe- intensität CXCR1	Färbe- intensität TNF- α	Färbe- intensität TNFR1
Mastzellen CXCR1	τ	,420*					
	p	0,032					
	N	21					
Färbe- intensität IL-8	τ	0,295	0,126				
	p	0,142	0,528				
	N	21	22				
Färbe- intensität CXCR1	τ	0,284	0,219	0,348			
	p	0,131	0,240	0,067			
	N	21	22	22			
Färbe- intensität TNF- α	τ	0,007	-0,090	0,218	,540**		
	p	0,970	0,644	0,277	0,004		
	N	20	21	21	21		
Färbe- intensität TNFR1	τ	0,125	-0,197	,457*	0,126	0,187	
	p	0,519	0,306	0,020	0,493	0,336	
	N	21	22	22	22	21	
Färbe- intensität TGF- β	τ	0,047	0,334	0,197	0,028	-0,108	-0,189
	p	0,804	0,075	0,305	0,877	0,566	0,309
	N	21	22	22	22	21	22

τ = Korrelationskoeffizient
p = p-Wert der Korrelationsanalyse (zweiseitig)
** = Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)
* = Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)
Signifikante Korrelationen sind gelb hinterlegt.

In den MPNST (siehe Tabelle 15) wurde zum einen eine Assoziation zwischen der Expression an TNF- α und CXCR1 sowie zwischen IL-8 und TNFR1 deutlich. Eine hohe TNF- α - bzw. IL-8-Expression ging einher mit einer hohen Expression der Rezeptoren CXCR1 bzw. TNFR1 im Tumorgewebe.

5 Diskussion

5.1 Mastzellen in verschiedenen Tumortypen bei NF1-Patienten

In allen in dieser Studie untersuchten Nervenscheidentumoren konnten Mastzellen nachgewiesen werden. Es bestätigten sich zudem die Ergebnisse von Isaacson (1976), Naber (2011), Tucker et al. (2011) und Püschel (2017), dass ein inverser Zusammenhang zwischen der Anzahl an Mastzellen und dem Tumorsubtyp besteht. Die benignen Subtypen KNF, DNF und DPNF sind durch hohe Mastzellzahlen charakterisiert. Die PNF, die ein Entartungsrisiko von etwa 10 % besitzen (Boyd et al. 2009), sind durch signifikant niedrigere Anzahlen an Mastzellen gekennzeichnet und die MPNST selbst zeichnen sich durch sehr vereinzelt Mastzellen aus (siehe 4.2 und Abbildung 10). Über ihre bloße Anzahl lässt sich nicht klären, ob Mastzellen an der Dedifferenzierung oder dem Progress von Neurofibromen beteiligt sind. So exprimieren Mastzellen zahlreiche Zytokine und Zytokinrezeptoren (Lippert et al. 1998; Theoharides et al. 2012), deren Zusammenspiel möglicherweise sogar den Progress bzw. die Malignisierung benigner Tumoren aufhält. Eine mögliche Rolle der Mastzelle ist die des Entzündungsmodulators. Im Folgenden wird diese Möglichkeit genauer beleuchtet.

5.2 Expression von Zytokinen sowie ihren Rezeptoren und ihre Rolle bei der Dedifferenzierung gutartiger Neurofibrome

In der vorliegenden Studie ließen sich IL-8, CXCR1, TNF- α , TNFR1 und TGF- β in peripheren Nervenscheidentumoren von NF1-Patienten nachweisen. Diese untersuchten Zytokine und Rezeptoren werden alle grundsätzlich von Mast- als auch Schwannzellen exprimiert (Wagner & Myers 1996; Lippert et al. 1998; Ozaki et al. 2008; Charles et al. 2009; Theoharides et al. 2012). Die Stärke der Expression variierte je nach Zytokin bzw. Rezeptor und Tumorsubtyp. Da die Mastzellichte mit dem Dedifferenzierungsgrad abnahm (siehe 4.2), ist zu überlegen, ob die Expression der untersuchten Zytokine bzw. Rezeptoren in den maligneren Tumortypen von den Tumorzellen selbst übernommen wird oder möglicherweise bei höhergradig dedifferenzierten Tumoren keine Rolle mehr spielt.

Sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine und Rezeptoren wurden in Tumoren nachgewiesen und mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht (Isaacson 1976; Coussens & Werb 2001 und 2002). Speziell in Neurofibromen konnte eine hohe Kon-

zentration von Mastzellen nachgewiesen werden, die als Entzündungszellen solche Zytokine und Rezeptoren exprimieren (Isaacson 1976; Coussens & Werb 2001; Püschel 2017).

In Abbildung 17 ist die mögliche Histogenese und der Progress bzw. der Malignisierungsprozess peripherer Nervenscheidentumore dargestellt. Es gilt als wissenschaftlich etabliert, dass sowohl KNF, PNF als auch MPNST *de novo* entstehen können (Boyd et al. 2009; Hirbe & Gutmann 2014; Perry et al. 2016). Die PNF gelten als Vorstufe der MPNST (Boyd et al. 2009). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass aus den PNF ebenfalls die benignen Tumortypen DPNF und DNF hervorgehen können (Püschel 2017). Die KNF zeigten bisher keine Entartungstendenz (Carroll 2012; Antonescu et al. 2013a), vermutlich geht das fibröse dermale Neurofibrom, ebenfalls ein benigner Tumortyp, aus ihnen hervor (Püschel 2017).

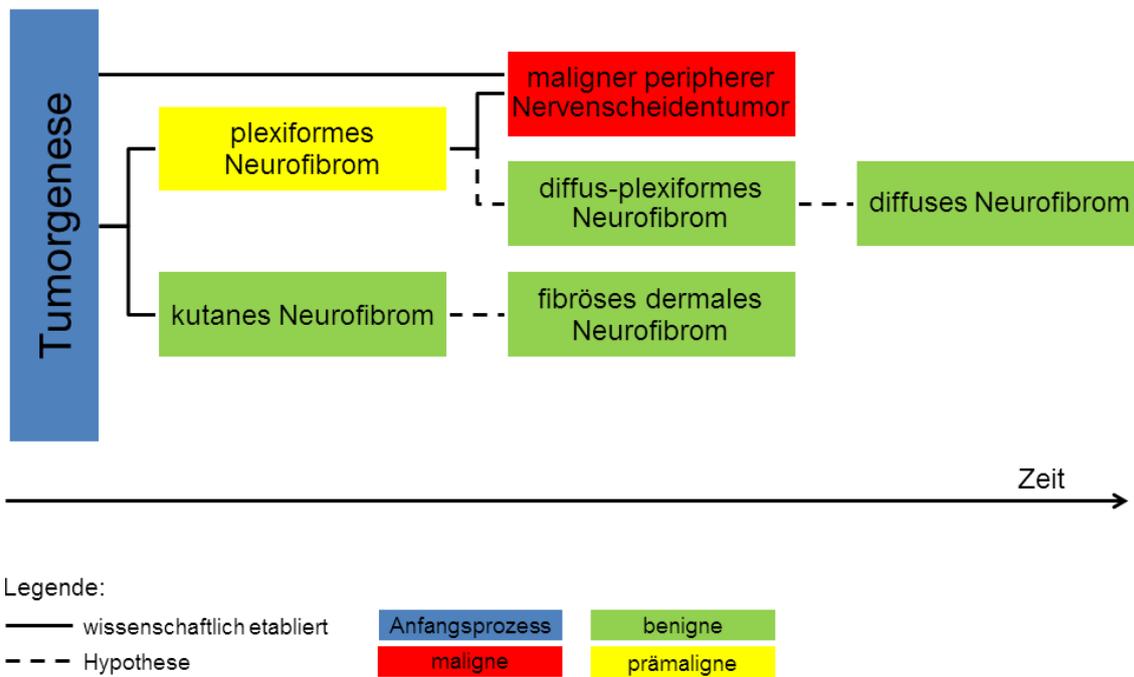


Abbildung 17: Mögliche Histogenese humaner Neurofibrome. Nach Püschel (2017: S. 137)

5.2.1 IL-8

Die in dieser Studie insgesamt niedrige Immunreaktion für IL-8 beschränkte sich vor allem auf das Tumorzellzytoplasma der benignen Tumorsubtypen DNF und DPNF, aber auch Zellkerne der Tumor- und Mastzellen waren teilweise markiert. In den DNF war die IL-8-Expression deutlich stärker als in den DPNF. Wenn man, in Anlehnung an die mögliche Histogenese (Abbildung 17), davon ausgeht, dass die DNF aus den DPNF

entstehen, könnte die deutlich höhere Expression von IL-8 in den DNF auf eine Rolle von IL-8 im Entwicklungsprozess von den DPNF hin zu den DNF hinweisen. Um dies zu überprüfen, müssten zeitversetzte Histologien beider Tumortypen auf ihre IL-8-Expression untersucht werden. Es sollte sich ein Anstieg von IL-8 in den DPNF über die Zeit zeigen. Dabei muss auch geklärt werden, dass es sich um DPNF handelt, die sich zu DNF entwickeln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Bedeutung von IL-8 in den benignen peripheren Nervenscheidentumoren, möglich erscheint sogar, dass IL-8 den Wachstumsprozess hin zu (prä)malignen Tumortypen aufhält. In verschiedenen Studien konnte eine Überexpression von IL-8 in Tumorzellen nachgewiesen werden, vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien (Waugh & Wilson 2008). Betrachtet man die Histogenese peripherer Nervenscheidentumoren (siehe Abbildung 17), gelten DPNF sowie vor allem auch DNF als zeitlich fortgeschrittene Tumorstadien, sodass sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen von Waugh & Wilson (2008) sowie Watanabe et al. (2002) decken. Geht man bei fortgeschrittenen Tumorstadien hingegen von einem malignen Tumortyp aus – in diesem Fall dem MPNST – können die Ergebnisse von Waugh & Wilson (2008) sowie Watanabe et al. (2002) durch diese Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Auch die Vermutung, dass IL-8 ein autokriner Wachstumsfaktor bösartiger Tumoren sei (Singh et al. 1994) lässt sich durch die vorliegende Studie nicht stützen.

Die Ergebnisse der Studien von Shi et al. (1999) und Yamanaka et al. (1995) stimmen nicht mit den Beobachtungen der hier vorliegenden Arbeit überein. Shi et al. (1999) maßen eine deutliche IL-8-Produktion in malignen Tumorzellen sowie ein gesteigertes Tumorstadium durch IL-8. Yamanaka et al. (1995) zeigten ein dosisabhängig gesteigertes Wachstum maligner Gliomzellen (NP-1) durch IL-8 sowie eine dosisabhängige Wachstumshemmung durch Hemmung von IL-8. Die beiden Studien sprechen aufgrund ihrer Ergebnisse von einer fördernden Wirkung von IL-8 auf maligne Tumoren.

Li et al. (2008) maßen in Zellen der malignen Gliomzelllinie NP-1 eine gesteigerte Aktivierung des Signalwegs aus *rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf), MEK und *extracellular-signal regulated* Kinase (ERK) durch IL-8. Dieser Signalweg ist relevant für die Zellentwicklung und -proliferation und damit letztlich auch für das Tumorstadium (Dhillon et al. 2007). Püschel (2017) untersuchte in ihrer Studie auch die Expression eines Proteins dieses Signalwegs. Es zeigte sich in den (prä)malignen Tumortypen eine

signifikant höhere Expression der aktiven, also phosphorylierten MEK (pMEK) als in den benignen Tumortypen. Die pMEK-Expression wies jedoch keine signifikante Korrelation mit der in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten IL-8-Expression. Diese Studie liefert also keinen Hinweis darauf, dass IL-8 über die Aktivierung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs zum Tumorprogress beiträgt.

Insgesamt muss die Aussage der unterschiedlichen Studien also eingeschränkt werden: IL-8 hat für bestimmte maligne Tumortypen eine fördernde Wirkung. Für den Progress gutartiger peripherer Nervenscheidentumoren hin zu (prä)malignen Tumortypen spielt IL-8 jedoch eine untergeordnete Rolle.

5.2.2 CXC-Motiv-Zytokinrezeptors Typ 1

Die Expression von CXCR1 war insgesamt ebenfalls niedrig, die Markierung zeigte sich vor allem in den Zellkernen. Interessant war hier, dass CXCR1 in jedem Tumorsubtyp exprimiert wurde, was sich mit den Ergebnissen von Watanabe et al. (2002) deckt. Am stärksten zeigte sich die Expression von CXCR1 in den MPNST. Inwieweit dem Marker eine negative prognostische Bedeutung zukommt, wie in Pankreaskarzinomen (Chen et al. 2014), konnte hier nicht geklärt werden. Die Expression des Rezeptors CXCR1 in allen Tumortypen, am stärksten jedoch in den MPNST, könnte eine Beteiligung am Dedifferenzierungsprozess vermuten lassen. Im Vergleichsgewebe des N. suralis ließ sich CXCR1 in dieser Studie nicht nachweisen.

5.2.3 TNF- α

TNF- α wurde in allen Tumortypen stark exprimiert. TNF- α könnte eine tumorfördernde Wirkung haben wie in früheren Studien für andere Tumoren gezeigt. Köck et al. (1990) wiesen ein erhöhtes Wachstum humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien beeinflusst durch unter anderem TNF- α nach. Auch Pikarsky et al. (2004) sprachen TNF- α eine Bedeutung sowohl beim Tumorwachstum als auch im Malignisierungsprozess zu (siehe auch Tabelle 2). Bei beiden Studien handelte es sich allerdings um Tumore mit anderen Ursprungszellen als denen in Neurofibromen bzw. peripheren Nervenscheidentumoren, sodass ein Vergleich nur bedingt möglich ist.

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine negative Korrelation der Expression von TNF- α mit dem Tumortyp. Die Expression von TNF- α war in den benignen Neurofibromen hoch wohingegen sie in den MPNST geringer ausfiel. Dies könnte dem Dedifferenzierungsprozess der Schwannzellen geschuldet sein. Sie sind im peripheren Ner-

vensystem unter anderem für die Sekretion von TNF- α verantwortlich (Qin et al. 2008) und könnten diese Fähigkeit mit zunehmender Dedifferenzierung bzw. Malignisierung verlieren. In der Studie von Moore et al. (1999) an Wildtyp- sowie TNF- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich eine Resistenz der TNF- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse gegen bekannte Tumorinitiatoren und eine signifikant stärkere Tumorbildung beim Wildtyp. Bei den Mäusen, bei denen TNF- α funktionslos war, kam es dementsprechend zu einer signifikant geringeren Ausbildung von Tumoren. In fortgeschrittenen Tumorstadien hingegen lies sich kein signifikanter Unterschied des Tumorwachstums zwischen den Wildtyp- und den TNF- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen nachweisen. Nach Moore et al. (1999) ist also von einer Rolle von TNF- α bei der Tumorentstehung und weniger beim Progress bzw. der Malignisierung auszugehen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie.

Bei Messungen von TNF- α -Spiegeln im Serum von NF1-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zeigten Park et al. (2013) signifikant höhere TNF- α -Werte im Serum von NF1-Patienten. Das Zytokin könnte also eine Rolle bei dieser Erkrankung und möglicherweise auch bei der Bildung der mit ihr assoziierten Neurofibrome spielen. Beim Vergleich der TNF- α -Spiegel im Serum von NF1-Patienten mit gegenüber NF1-Patienten ohne MPNST zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Park et al. 2013). Diese Ergebnisse deuten eher nicht darauf hin, dass TNF- α an der Dedifferenzierung bzw. Malignisierung von Neurofibromen beteiligt ist.

In der Studie von Reuss et al. (2013) wurde deutlich, dass TNF- α für eine Hemmung des Tumorwachstums von Bedeutung sein kann. Der *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) ist ein Protein, das durch seine Bindung Apoptose induzieren kann und als Homolog zu anderen Mitgliedern der TNF-Superfamilie gezählt wird (Wiley et al. 1995). Im Vergleich zu normalen Schwannzellen, die eine Resistenz gegen eine TRAIL-Behandlung zeigten, waren MPNST-Zelllinien von NF1-Patienten überwiegend sensibel für TRAIL. Es zeigte sich eine reduzierte Lebensfähigkeit der Zellen und eine verstärkte Apoptose, wobei vermutlich durch den Funktionsverlust von Neurofibromin sowie durch den Signalweg aus Raf, MEK und ERK sowie Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), der Proteinkinase Akt (auch als Proteinkinase B bekannt) und mTOR die TRAIL-Sensitivität gesteigert wird (Reuss et al. 2013). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Bonetti et al. (2000), die Schwannzellen in normalem und in Schwannomgewebe untersuchten. Schwannzellen gelten als Zielzellen von TNF- α und konnten in der Studie von Bonetti et al. (2000) nicht als Auslöser für Apoptose-Signalwege verantwortlich gemacht werden.

5.2.4 TNFR1

Neben der starken Expression von TNF- α zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auch eine durchweg starke Expression seines Rezeptors TNFR1. TNF- α wirkt über eine Aktivierung von TNFR1, welcher von Schwannzellen exprimiert wird (Qin et al. 2008; Charles et al. 2009). Im peripheren Nervensystem wird TNF- α durch aktivierte Schwannzellen ausgeschüttet. Durch Bindung von TNF- α und folgender Aktivierung von TNFR1 wird also die Expression von TNF- α herbeigeführt (Qin et al. 2008). Es kann folglich bei TNF- α und TNFR1 von einer autokrinen *feedback loop* bei der Aktivierung von Schwannzellen ausgegangen werden, was sich auch mit der Hypothese von Riccardi (1992) und Qin et al. (2008) sowie den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie deckt.

Die deutliche Markierung durch TNFR1 in den unterschiedlichen Tumorsubtypen deckt sich mit den Ergebnissen von Charles et al. (2009), dass TNFR1 eine Rolle beim Tumorstadium zukommt (siehe auch Tabelle 2). Weiterhin bewirkt die Aktivierung von TNFR1 auf Schwannzellen zum einen den programmierten Zelltod (Liu et al. 1996), zum anderen indirekt über TNF- α eine erhöhte Zytokinproduktion von IL-6 und IL-10 (Qin et al. 2008). Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob dies auch für andere Zytokine wie IL-8 gilt. TNFR1 wird als wichtigster Mediator der tumorfördernden Wirkung von TNF- α besprochen (Kitakata et al. 2002; Arnott et al. 2004; Tomita et al. 2004). Es ist bei einer solch starken Expression in allen Tumorsubtypen von einer Bedeutung für den Erhalt, eventuell sogar den Progress des Tumors auszugehen, wobei einschränkend hinzugefügt werden muss, dass TNFR1 auch im N. surallis-Gewebe von Nicht-NF1-Patienten stark exprimiert wurde.

5.2.5 TGF- β

TGF- β ließ sich im Mittel nur schwach in den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren nachweisen, allerdings zeigten sich sehr starke Unterschiede der TGF- β -Expression zwischen den Tumorproben. Der insgesamt geringe Nachweis von TGF- β deckt sich mit den Ergebnissen von Singh et al. (1994). Sie stellten bei ihren Untersuchungen an Melanomzelllinien eine geringe Konzentration von TGF- β fest. Während Becker et al. (2004) sowie Yamate et al. (2003) eine Hemmung des Tumorstadiums durch TGF- β feststellten und TGF- β eine tumorsuppressive Wirkung zusprachen, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf eine Bedeutung von TGF- β bei der Dedifferenzierung von Neurofibromen hin. Die Markierung zeigte sich verstärkt in den MPNST. Es resul-

tierte eine positive Korrelation mit dem Tumorsubtyp, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Watanabe et al. (2001) steht, die ebenfalls eine erhöhte Expression von TGF- β in den MPNST im Vergleich zu den benignen Tumorsubtypen beobachteten. Die positive Korrelation von TGF- β mit dem Tumorsubtyp könnte auf eine Beteiligung von TGF- β an der malignen Transformation bzw. Dedifferenzierung hindeuten.

Schon Wu et al. (1993) zeigten mit ihrer Studie an humanen Kolonkarzinomzelllinien, dass die Hemmung von TGF- β zu einer erhöhten Tumorgenität dieser Zellen führte. Die Tumorbildung der TGF- β -supprimierten Zellen war im Vergleich zu den nicht behandelten Tumorzellen um das Achtfache gesteigert. Auch Jakowlew (2006) sprach TGF- β in normalem Gewebe und frühen Tumorstadien suppressive Eigenschaften hinsichtlich tumoröser Entwicklung zu, während in fortgeschrittenen Tumoren das Tumorstadium durch TGF- β gefördert werde und sich die Malignität der Tumoren erhöhe. Die Erkenntnisse von Jakowlew (2006) können grundsätzlich durch die hier vorliegende Arbeit bestätigt werden, wobei Jakowlew (2006) nicht konkret auf den Einfluss von TGF- β bei der Malignisierung gutartiger Tumoren eingegangen ist. Auch Padua & Massagué (2009), Tian et al. (2011) und Neuzillet et al. (2015) betonten die suppressiven Eigenschaften von TGF- β bei der Initiierung sowie in frühen Stadien von Tumoren. In fortgeschrittenen Tumorstadien sprachen sie TGF- β hingegen eine tumorfördernde Wirkung und eine damit einhergehende Prognoseverschlechterung aufgrund einer höheren Tumoraggressivität zu.

Siegel et al. (2003) stellten ebenfalls eine suppressive Wirkung von TGF- β auf die Tumorbildung, jedoch eine Prognoseverschlechterung durch TGF- β in späteren Tumorstadien aufgrund einer höheren Tumoraggressivität fest. Sie führten eine Studie an Mammakarzinomzelllinien durch, bei denen sich vor allem eine erhöhte Metastasierungsneigung durch TGF- β in die Lunge feststellen ließ, während die Hemmung von TGF- β diese herabsetzte. Diese Tumoren in der Lunge zeigten durch TGF- β ein gesteigertes Wachstumsverhalten (Siegel et al. 2003). Bei der Entwicklung von einem Adenom zu einem Karzinom wurden beim Pankreaskarzinom TGFBR2- und SMAD4- Mutationen beobachtet (Jaffee et al. 2002; Jones et al. 2008). Diese Gene kodieren für Proteine des TGF- β -Signalweges, sodass durch ihre Mutation die Wirkung von TGF- β eingeschränkt ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, dass aktives TGF- β kanzerogenes Wachstum einschränken kann (Padua & Massagué 2009). In unterschiedlichen Tumoren wurde für TGF- β eine suppressive Wirkung auf die Tumorbildung und eine för-

dernde Wirkung auf das Tumorwachstum in fortgeschrittenen Tumorstadien gezeigt. Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein.

Das sowohl von Mast- als auch Schwannzellen sezernierte Zytokin TGF- β (Ozaki et al. 2008; Theoharides et al. 2012) wird in den MPNST, die kaum Mastzellen aufwiesen, vermutlich verstärkt durch die Tumorzellen selbst oder ein Zusammenspiel zwischen Mast- und Tumorzellen exprimiert. Möglicherweise spielt dabei auch die regulatorische Wirkung von TGF- β auf die Schwannzellproliferation und -differenzierung eine Rolle (Einheber et al. 1995; Parkinson et al. 2001). Die negative Korrelation zwischen der Anzahl an Mastzellen und der Expression von TGF- β spricht auch für eine untergeordnete Rolle der Mastzellen bei der TGF- β -Sekretion. Der Malignisierungsprozess und die damit einhergehenden Änderungen des Tumormikromilieus können zu einer vermehrten Sekretion und auch Wirkung von TGF- β führen, da auch der TGF- β 1-Rezeptor häufig in Tumorzellen hochreguliert ist (Derynck & Zhang 2003). Es lässt sich weiterhin vermuten, dass TGF- β einen Einfluss auf die Entwicklung von Mastzellen und die Sekretion anderer Zytokine wie z. B. TNF- α hat: Während TGF- β in der vorliegenden Arbeit eine positive Assoziation mit dem Tumorsubtyp zeigte, verhielt sich TNF- α genau entgegengesetzt.

Torres et al. (2016) untersuchten Zytokine im Plasma von NF1-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe. Das Plasma der NF1-Patienten wies im Mittel, verglichen mit der Kontrollgruppe, einen höheren TGF- β -Wert auf. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die Verteilungen der beiden Gruppen in der Form deutlich voneinander abwichen. Bei den NF1-Patienten zeigten sich vier Ausreißer in extrem hohen Werten. Diese Ausreißer trugen erheblich zum Unterschied der Mittelwerte bei. Darunter befanden sich zwei NF1-Patienten mit MPNST und ein Patient mit einem großen PNF. Die Ausreißer mit hohen TGF- β -Plasmaspiegeln zeigten also zum Großteil (prä)maligne Läsionen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie, in der eine höhere TGF- β -Expression mit einem maligneren Tumortyp assoziiert war. Es muss dabei erwähnt werden, dass Torres et al. (2016) TGF- β im Plasma bestimmten, während in der vorliegenden Arbeit die TGF- β -Expression in den peripheren Nervenscheidentumoren von NF1-Patienten bestimmt wurde.

5.2.5.1 TGF- β und der Neurofibrominsignalweg

TGF- β ist als Wachstumsfaktor einer der Mediatoren, die den Neurofibrominsignalweg aktivieren können (Wakefield & Hill 2013; Neuzillet et al. 2015). Signalkaskaden, die

in der Folge zu Stande kommen und relevant für die Zellproliferation, Transkription und den Umbau des Zytoskeletts sind (Dhillon et al. 2007; Berridge 2014), waren in den in der hier vorliegenden Studie untersuchten peripheren Nervenscheidentumoren verstärkt aktiv (Püschel 2017). Eine genauere Besprechung der Signalkaskaden findet sich in Abschnitt 2.1.3. Püschel (2017) verwendete für ihre Studie dieselben Tumorproben wie in der hier vorliegenden Arbeit und untersuchte unter anderem die Enzymaktivität in den Neurofibromen bzw. peripheren Nervenscheidentumoren. Ihre Ergebnisse zeigten eine signifikant stärkere Expression der pMEK in den PNF und MPNST im Vergleich zu den KNF, DNF und DPNF. In den KNF war pMEK gar nicht vorhanden, während sie in den MPNST verstärkt zu finden war. Weiterhin wurde im Neurofibromgewebe wurde das Enzym mTOR nachgewiesen, in physiologischem Nervengewebe jedoch nicht. Zudem war eine signifikant stärkere mTOR-Aktivität in den PNF und MPNST im Vergleich zu den benignen peripheren Nervenscheidentumoren messbar. Auch Rho war in den untersuchten Tumortypen vermehrt aktiv, es könnte also am Wachstum dieser Tumore beteiligt sein. In den MPNST wurde signifikant mehr Rho exprimiert als in den benignen Neurofibromen, sodass davon auszugehen ist, dass der sich anschließende Signalweg in den benignen Neurofibromen tatsächlich weniger aktiv war (Püschel 2017). Die TGF- β -Expression, welche in der hier vorliegenden Studie untersucht wurde, zeigte sich ansteigend von den KNF zu den MPNST. Es verhielt sich also ähnlich wie die oben genannten Schlüsselproteine der Neurofibrominsignalwege (pMEK, mTOR, Rho), welche unter anderem durch TGF- β ausgelöst werden (Wakefield & Hill 2013; Neuzillet et al. 2015). Die Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b zwischen der TGF- β -Expression und den oben besprochenen Schlüsselproteinen der Neurofibrominsignalwege zeigte eine signifikante Korrelation zwischen der TGF- β -Expression und pMEK ($\tau = 0,219$; $p = 0,001$; $n = 207$) sowie Rho ($\tau = 0,244$; $p = 0,002$; $n = 123$). Eine erhöhte TGF- β -Expression ging also mit einer erhöhten Expression von pMEK und Rho einher. Das stützt die Vermutung, dass TGF- β – über die Aktivierung der Neurofibrominsignalwege – zur Dedifferenzierung und Malignisierung von Neurofibromen beitragen könnte.

Der genaue Mechanismus lässt sich allerdings anhand dieser Studie nicht abschließend klären, wobei auch die Literatur diesbezüglich widersprüchliche Resultate liefert: TGF- β wurde schon in normalen Schwannzellen für unterschiedliche Effekte wie Proliferation und Änderung im Phänotyp auf der einen Seite (Mirsky & Jessen 1996) und Apoptose auf der anderen Seite (Parkinson et al. 2001) verantwortlich gemacht. In

Studien an Tumoren werden ebenso unterschiedliche Ergebnisse erzielt: In humanen Neurofibromzelllinien wird durch TGF- β die DNA-Synthese stimuliert (Kadono et al. 1994), während sich in MPNST-Zelllinien von Ratten eher eine Hemmung der Proliferation durch TGF- β nachweisen lässt (Yamate et al. 2003).

5.3 Tumorsuppressive Wirkung von Entzündung und ihren Mediatoren

Bei der Entzündungsreaktion wird sowohl die tumorfördernde als auch die tumorsuppressive Wirkung diskutiert (Bui & Schreiber 2007; Swann et al. 2008). In der hier vorliegenden Studie waren die Mastzellendichte sowie die Expression von Zytokinen und ihren Rezeptoren in den benignen Neurofibromen von NF1-Patienten deutlich höher als in den (prä)malignen Tumortypen. Die Entzündungsreaktion war also besonders stark in den Tumortypen, die keine Entartungstendenz besitzen. Püschel (2017), verwendete, wie bereits erwähnt, für ihre Studie die gleichen Tumorproben wie in der vorliegenden Arbeit. Sie zeigte eine Fibrosierung in den kutanen Neurofibromen, die mit dem Alter zunahm und sich als Anstieg des Fibroblastenanteils zeigte. Die vermutlich durch Mastzellen ausgelöste Entzündungsreaktion hat eine Fibrosierung und Vernarbung des Neurofibromgewebes zur Folge. Die Entzündungsreaktion führte also nicht zum Progress dieser gutartigen Tumore, eher im Gegenteil. In der Literatur gilt auch TNF- α insgesamt als pro-inflammatorisches Zytokin (Torres et al. 2016). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie sprechen ebenfalls dafür. An dieser Stelle soll die Arbeit von Gao et al. (2017) erwähnt werden. Ihre Ergebnisse zeigten, dass TNF- α den Signalweg der *mitogen-activated protein kinase* (MAP-Kinase) aktiviert. Dies wiederum führt zu einer Stabilisierung der Mastzellmembran, sodass die Degranulation der Mastzellen gehemmt wird. Diese negative Wirkung von TNF- α auf die Mastzelldegranulation müsste somit eigentlich in einer verringerten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch Mastzellen resultieren (Gao et al. 2017).

Das periphere Nervensystem ist, ebenso wie das Gehirn, charakterisiert durch Schranken gegenüber dem Blut und dem angrenzenden Gewebe, wobei letztere aus *tight junctions* und einem intakten Perineurium gebildet wird (Pummi et al. 2006). Diese Schranke grenzt auch intraneurale Tumore von der Umgebung ab, es resultiert ein abgeschlossenes Tumormilieu, das einerseits den Eintritt von Entzündungsmediatoren erschweren und andererseits das Anreichern von toxischen Metaboliten erleichtern könnte. Die PNF können sich auf diese Weise dem körpereigenen Immunsystem teilweise entziehen.

Folglich fehlt in diesen Tumoren die tumorsuppressive Wirkung der Entzündungsreaktion, was dem Prozess der Dedifferenzierung dieser Tumore zuträglich sein könnte. In Übereinstimmung zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit eine deutlich geringere Mastzellanzahl und Zytokinexpression in den PNF im Vergleich zu den anderen Neurofibromtypen. Das Anreichern von toxischen Substanzen könnte ebenfalls zur Malignisierung beitragen. Weiterhin waren in MPNST mit vielen Mastzellen weniger Mitosen zu sehen, was dafür sprechen könnte, dass Mastzellen bzw. Entzündungsreaktionen zu weniger proliferativen MPNST führen (Püschel 2017). In Übereinstimmung mit Püschel (2017) ergibt also die hier vorliegende Studie, dass Mastzellen und die lokale Entzündungsreaktion nicht zum Tumorprogress beitragen sondern eventuell sogar der Tumorbekämpfung dienlich sind.

Lee et al. (2006) untersuchten Mechanismen zur Umgehung des körpereigenen Immunsystems an normalen humanen Schwannzellen und an MPNST-Zellen der Linie T265. Zum einen war das Transporter-aktivierende Protein 1 (TAP1) herunterreguliert, welches Antigenpeptide gegenüber dem *major histocompatibility complex*(MHC)-I präsentiert. Zum anderen war CD74, ein Chaperon-Protein, das für die Bildung und den Transport von MHC II zuständig ist, herunterreguliert und wies Splice-Varianten auf, sodass ein nicht verwendbares RNA-Transkript entstand. MHC sind Proteinkomplexe, die von essentieller Bedeutung für das Immunsystem sind (The MHC Sequencing Consortium 1999). Die Studie von Lee et al. (2006) zeigte also zwei Mechanismen, mit denen sich MPNST-Zellen sich dem körpereigenen Immunsystem entziehen. Man könnte nun vermuten, dass der Entzug des Immunsystems für den Progress zum MPNST bedeutsam ist. In der hier vorliegenden Studie zeigten sich in den (prä)malignen Tumoren deutlich weniger Mastzellen und Zytokine. Diese Ergebnisse könnten auch auf einen Entzug des körpereigenen Immunsystems hindeuten.

5.4 Fazit

In der vorliegenden Studie an peripheren Nervenscheidentumoren von NF1-Patienten wurden Mastzellen vor allem in den benignen Tumortypen nachgewiesen. Die Anzahl an Mastzellen korrelierte mit der Expression von IL-8 und TNF- α und auch die Expression der Rezeptoren CXCR1 und TNFR1 war in den benignen Tumortypen sehr deutlich. Es könnte insgesamt vermutet werden, dass Mastzellen als bekannte Entzündungsmediatoren in Interaktion mit den Zytokinen und deren in den benignen Tumortypen eine Rolle spielen. Die Signalwege aus PI3K, Akt (auch Proteinkinase B genannt)

und mTOR sowie aus Raf, MEK und ERK ausgelöst durch IL-8 über CXCR1, die die Translation und Transkription regulieren kommen unter anderem in Frage (Waugh & Wilson 2008). TNF- α wirkt sich über TNFR1 und die folgende Signalkaskade aus verschiedenen Caspasen oder aber über die MAP-Kinase-Kinase und NF- κ B auf Apoptose oder Aktivierung entzündlicher Gene aus (Rahman & McFadden 2006). Die Entzündungsreaktion ist dem Malignisierungsprozess vermutlich nicht dienlich sondern sogar hinderlich.

TGF- β wurde vor allem im malignen Tumortyp gefunden. Da TGF- β die Neurofibromin-signalwege aktivieren kann (Wakefield & Hill 2013; Neuzillet et al. 2015), könnten diese Ergebnisse auf eine Rolle von TGF- β beim Wachstum und Erhalt von MPNST hinweisen. Die positive Korrelation der TGF- β -Expression mit dem Tumorsubtyp, also ein Anstieg der TGF- β -Expression mit zunehmendem Dedifferenzierungsgrad, könnte auch eine Beteiligung von TGF- β im Prozess der Dedifferenzierung vermuten lassen.

Deutsche Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression einiger Zytokine und deren Rezeptoren in peripheren Nervenscheidentumoren von NF1-Patienten zu untersuchen. Dazu wurden 520 Tumorproben benigner und maligner peripherer Nervenscheidentumore von Patienten mit NF1 immunhistochemisch auf die Anzahl an Mastzellen sowie auf die Expression der Zytokine IL-8, TNF- α , TGF- β und der Rezeptoren CXCR1 und TNFR1 untersucht. Als Kontrollen dienten sechs Proben von N. suralis-Gewebe von Nicht-NF1-Patienten. Die Untersuchungen zeigten, dass alle Tumortypen Mastzellen sowie die untersuchten Zytokine und Rezeptoren exprimieren. Die benignen Neurofibrome (KNF, DNF und DPNF) waren durch eine deutlich höhere Anzahl an Mastzellen gekennzeichnet als die (prä)malignen Tumortypen (PNF und MPNST). Die Anzahl an Mastzellen zeigte eine Assoziation mit der Expression von IL-8 und TNF- α . Die Expression von IL-8 und CXCR1 fiel gering, die Expression von TNF- α und TNFR1 hingegen sehr stark aus. Bei TNF- α fiel die Immunreaktion in den benignen deutlich geringer aus als in den malignen Tumortypen. Genau umgekehrt verhielt sich das Zytokin TGF- β : Hier wiesen die MPNST eine stärkere Expression auf als die benignen Tumorproben. Die gewonnenen Ergebnisse machen deutlich, dass die untersuchten Zytokine und Rezeptoren sowohl in Tumor assoziierten Mastzellen als auch in den Tumorzellen benigner und maligner peripherer Nervenscheidentumore von NF1-Patienten selbst exprimiert werden. Da Mastzellen und Zytokine mit Entzündungsreaktionen assoziiert sind, könnte deren Expression in den benignen Tumoren eine Rolle für die Tumorentstehung und das Tumorstadium spielen. Die sehr geringe Anzahl von Mastzellen in den (prä)malignen Tumortypen deutet darauf hin, dass eine Entzündungsreaktion keine Rolle bei der Dedifferenzierung von benignen zu malignen Tumoren spielt. In Zusammenschau mit der hohen Anzahl von Mastzellen in den benignen Tumortypen, könnte der Entzündungsreaktion sogar eine limitierende Wirkung bei der Malignisierung zugeschrieben werden. Als einziges der untersuchten Zytokine zeigte TGF- β eine deutliche Hochregulation im malignen Subtyp, dem MPNST, im Vergleich zu den anderen Tumorsubtypen, eine Beobachtung, die in Übereinstimmung mit früheren Studienergebnissen steht. Dies könnte also auf eine Bedeutung von TGF- β für das Wachstum dieser malignen Tumoren möglicherweise über die Neurofibrominsignalwege, welche durch TGF- β aktiviert werden können, hindeuten.

English summary

The present work investigated the expression of cytokines and their receptors in peripheral nerve sheath tumors of patients with NF1. 520 tumor samples of benign and malignant nerve sheath tumors of patients with NF1 were examined in an immunohistologic study. Of these samples, the numbers of mast cells and the cytokines IL-8, TNF- α , TGF- β as well as the receptors CXCR1 and TNFR1 were analyzed. Six samples of N. suralis tissue from patients without NF1 were used as controls. The results showed that all tumor types – both benign and malignant – express mast cell, the cytokines and receptors under scrutiny. The benign neurofibroma (KNF, DNF and DPNF) were characterized by a substantially higher number of mast cells, compared to the (pre)malignant tumor types (PNF and MPNST). The number of mast cells correlated positively with the expression of IL-8 and TNF- α . In contrast to a low expression of IL-8 and CXCR1, the expression of TNF- α und TNFR1 was observed to be high. A lower expression of TNF- α could be attested in malignant tumors compared to benign tumors. Conversely, the malignant showed a higher expression of TGF- β compared to the benign tumors. These observations reveal that the investigated cytokines and receptors are expressed in tumor associated mast cells as well as by tumor cells of benign and malignant nerve sheath tumors of patients with NF1. Since mast cells and cytokines are generally associated with inflammatory processes, their expression might play a role in the initiation and proliferation of benign tumors. The low number of mast cells in (pre)malignant tumors indicates that inflammation may not be important in the dedifferentiation of benign to malignant tumors. Taken together with the high number of mast cells in benign tumors, inflammation could even be ascribed a limiting role in the process of malignization. Solely TGF- β showed substantially increased expression in malignant (MPNST) compared to all other tumor subtypes. This observation is in line with previous research and might indicate that TGF- β is important for the proliferation in these malignant tumors via signaling pathways of neurofibromin activated by TGF- β .

Abkürzungsverzeichnis

CXCR1 – CXC-Motiv-Zytokinrezeptors Typ 1

DNF – diffuses Neurofibrom

DPNF – diffus-plexiformes Neurofibrom

EMT – epithelial-mesenchymale Transition

ERK – *extracellular-signal regulated* Kinase

EZM – extrazelluläre Matrix

GDP – Guanosindiphosphat

GTP – Guanosintriphosphat

H.E.-Färbung – Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HCC – hepatozelluläres Karzinom

HER2/neu – *human epidermal growth factor receptor 2*

IL – Interleukin

KNF – kutanes/dermales Neurofibrom

MAP – *mitogen-activated protein*

(p)MEK – (phosphorylierte) *mitogen-activated protein kinase / extracellular-signal regulated kinase*

MPNST – maligne periphere Nervenscheidentumoren

mTOR – *mechanistic target of rapamycin*

NF1 – Neurofibromatose Typ 1

NF-κB – *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*

NIH – *National Institutes of Health*

PI3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase

PNF – plexiformes Neurofibrom

Raf – *rapidly accelerated fibrosarcoma*

Ras-Protein – *rat sarcoma protein*

SCF – Stammzellfaktor

TGF – *transforming-growth-factor* (transformierender Wachstumsfaktor)

TGF- β – *transforming-growth-factor β* (transformierender Wachstumsfaktor β)

TMA – *tissue micro arrays*

TNFR1 – Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1

TNF- α – Tumornekrosefaktor α

TRAIL – *tumor-necrosis-factor- α -related apoptosis inducing ligand*

UKE – Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

VEGF – *vascular endothelial growth factor*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neurofibrominsignalweg nach Boyd et al. (2009: S. 3); Dhillon et al. (2007: S. 3280); Gutmann et al. (2012: S. 14088); Berridge (2014: S. 12, 16).	5
Abbildung 2: Dermales/kutanes Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, 1: Tumor, 2: subepidermales Bindegewebe, 3: mehrschichtiges Plattenepithel, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm	7
Abbildung 3: Plexiformes Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, 1: Perineurium, 2: Tumor mit myxoidreicher Matrix, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm.....	8
Abbildung 4: Diffuses Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm	9
Abbildung 5: Diffus-plexiformes Neurofibrom in 10-facher Vergrößerung, 1: intraneuraler Tumoranteil, 2: Perineurium, 3: diffuser Tumoranteil, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm	10
Abbildung 6: Maligner peripherer Nervenscheidentumor in 10-facher Vergrößerung, H.E.-Färbung, Maßstab 100 µm	12
Abbildung 7: Epithelial-stromale Interaktion während der Neoplasiebildung. Nach Coussens & Werb (2001: F24). EZM = extrazelluläre Matrix.....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Mast- und Tumorzelle in der Tumormikroumgebung. Nach Maltby et al. (2009: S. 20); Theoharides et al. (2012: S. 22); Rahman & McFadden (2006: S. 66); Branton & Kopp (1999: S. 1350); Zachariae et al. (1991: S. 595) Raychaudhuri & Vogelbaum (2011: S. 228), Charles et al. (2009: S. 3011); Ozaki et al. (2008: S. 32-34); Wagner & Myers (1996: S. 626).....	25
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung eines plexiformen Neurofibroms mit A IL-8 (Patient 121) und B CXCR1 (Patient 245), roter Pfeil = Mastzelle	35
Abbildung 10: Mittlere Anzahl an Mastzellen bei den verschiedenen Neurofibromsubtypen. Färbung der Mastzellen mit Antikörpern gegen A IL-8 und B CXCR1	36

Abbildung 11: Immunreaktion für IL-8 in 20-facher Vergrößerung bei einem DNF, Patient Nummer 586, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 µm.....	38
Abbildung 12: Immunreaktion für CXCR1 in 20-facher Vergrößerung bei einem MPNST, Patient Nummer 36, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 µm.....	39
Abbildung 13: Immunreaktion für TNF- α in 20-facher Vergrößerung bei einem PNF, Patient Nummer 92, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 µm.....	40
Abbildung 14: Immunreaktion für TNFR1 in 20-facher Vergrößerung bei einem KNF, Patient Nummer 662, roter Pfeil = Mastzelle; blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 100 µm.....	41
Abbildung 15: Immunreaktion für TGF- β in 40-facher Vergrößerung bei einem MPNST, Patient Nummer 46, blauer Pfeil = Tumorzelle; Maßstab = 50 µm.....	42
Abbildung 16: Mediane der Färbeintensitäten bei der Reaktion mit Antikörpern gegen A IL-8, B CXCR1, C TNF- α , D TNFR1 und E TGF- β	43
Abbildung 17: Mögliche Histogenese humaner Neurofibrome. Nach Püschel (2017: S. 137).....	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studien zu IL-8 und CXCR1 und Tumorgenese.....	16
Tabelle 2: Studien zu TNF- α und TFNR1 und der Tumorgenese	18
Tabelle 3: Studien zu TGF- β und der Tumorgenese	19
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge	27
Tabelle 5: Verwendete Lösungen in alphabetischer Reihenfolge	27
Tabelle 6: Reagenzien für die immunhistochemischen Färbungen im Färbeautomaten <i>Ventana BenchMark xt</i>	28
Tabelle 7: Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen im Färbeautomaten <i>Ventana BenchMark xt</i>	28
Tabelle 8: Antikörper der immunhistochemischen Färbungen.	29
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge	29
Tabelle 10: Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge	30
Tabelle 11: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, alle Tumorsubtypen.....	44
Tabelle 12: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, kutanes Neurofibrom	46
Tabelle 13: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, diffuses/diffus-plexiformes Neurofibrom	47
Tabelle 14: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, plexiformes Neurofibrom	48
Tabelle 15: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b, maligner peripherer Nervenscheidentumor	49
Tabelle 16: Rohdaten Vergleichsnervengewebe N. suralis von Nicht-NF1-Patienten..	80

Literatur

Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 3(9): 745-56.

Antonescu CR, Scheithauer BW, Woodruff JM (2013a) Neurofibroma (Chapter 8). In: Tumors of the peripheral nervous system, AFIP atlas of tumor pathology. S.G. Silverberg, R.A. DeLellis, W.A. Gardner, L.H. Sobim (Hrsg.) ARP Press, Silver Spring, Maryland, 211-64.

Antonescu CR, Scheithauer BW, Woodruff JM (2013b) Malignant tumors of the peripheral nerves (Chapter 12). In: Tumors of the peripheral nervous system, AFIP atlas of tumor pathology. S.G. Silverberg, R.A. DeLellis, W.A. Gardner, L.H. Sobim (Hrsg.) ARP Press, Silver Spring, Maryland, 381-474.

Antonescu CR, Scheithauer BW, Woodruff JM (2013c) Neurofibromatosis 1 and 2, and Schwannomatosis (Chapter 15). In: Tumors of the peripheral nervous system, AFIP atlas of tumor pathology. S.G. Silverberg, R.A. DeLellis, W.A. Gardner, L.H. Sobim (Hrsg.) ARP Press, Silver Spring, Maryland, 507-44.

Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Robinson SC, Thompson RG, Balkwill FR (2004) Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene*, 23(10): 1902-10.

Baroni C (1964) On the relationship of mast cell to various soft tissue tumours. *Br J Cancer*, 18(4): 686-91.

Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF (2004) TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*, 21(4): 491-501.

Berridge MJ (2014) Module 2: Cell signalling pathways. *Cell Signalling Biology*, 6. doi:10.1042/csb0001002.

Blatt J, Jaffe R, Deutsch M, Adkins JC (1986) Neurofibromatosis and childhood tumors. *Cancer*, 57(6): 1225-9.

Bonetti B, Valdo P, Stegagno C, Tanel R, Zanusso GL, Ramarli D, Fiorini E, Turazzi S, Carner M, Moretto G (2000) Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(1): 74-84.

Boyd KP, Korf BR, Theos A (2009) Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*, 61(1): 1-14.

Branton MH, Kopp JB (1999) TGF- β and fibrosis. *Microbes Infect*, 1(15): 1349-65.

Bui JD, Schreiber RD (2007) Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol*, 19(2): 203-8.

Carroll SL (2012) Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. *Acta Neuropathol*, 123(3): 321-48.

Chandross KJ, Spray DC, Cohen RI, Kumar NM, Kremer M, Dermietzel R, Kessler JA (1996) TNF alpha inhibits Schwann cell proliferation, connexin46 expression, and gap junctional communication. *Mol Cell Neurosci*, 7(6): 479-500.

- Charles KA, Kulbe H, Soper R, Escorcio-Correia M, Lawrence T, Schultheis A, Chakravarty P, Thompson RG, Kollias G, Smyth JF, Balkwill FR, Hagemann T** (2009) The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest*, 119(10): 3011-23.
- Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ** (2005) Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(32): 11408-13.
- Chen L, Fan J, Chen H, Meng Z, Chen Z, Wang P, Liu L** (2014) The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Sci Rep*, 4(5911).
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM** (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 271(9): 4961-5.
- Chopra M, Lang I, Salzmann S, Pachel C, Kraus S, Bäuerlein CA, Brede C, Jordán Garrote AL, Mattenheimer K, Ritz M, Schwinn S, Graf C, Schäfer V, Frantz S, Einsele H, Wajant H, Beilhack A** (2013) Tumor necrosis factor induces tumor promoting and anti-tumoral effects on pancreatic cancer via TNFR1, *PloS One*, 8(9): e75737.
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z** (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103(3): 481-90.
- Coussens LM, Werb Z** (2001) Inflammatory cells and cancer: think different!. *J Exp Med*, 193(6): F23-6.
- Coussens LM, Werb Z** (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-7.
- Dahlin JS, Hallgren J** (2015) Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol*, 63(1): 9-17.
- 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): 8949-54.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A** (1985) Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*, 162(6): 2163-8.
- De Schepper S, Boucneau J, Lambert J, Messiaen L, Naeyaert JM** (2005) Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type 1: an overview. *Pigment Cell Res*, 18(1): 13-24.
- De Schepper S, Maertens O, Callens T, Naeyaert JM, 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): 1050-3.
- De Smet L, Sciot R, Legius E** (2002) Multifocal glomus tumours of the fingers in two patients with neurofibromatosis type 1. *J Med Genet*, 39(8): e45.
- De Visser KE, Korets LV, Coussens LM** (2005) De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 7(5): 411-23.
- Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, Zhou Y, He S, McNamara WF, Chernenko N, Lee SY, Barajas F, Chen CH, Bakst RL, Vakiani E, He S, Hall A,**

- Wong RJ** (2016) Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *J Clin Invest*, 126(4): 1538-54.
- Deborde S, Wong RJ** (2017) How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. *Cell Mol Life Sci*, 74(24): 4405-20.
- Derynck R, Zhang YE** (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425 (6958): 577-84.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W** (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22): 3279-90.
- Dinarello CA** (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2): 503-8.
- Dmitrieva OS, Shilovskiy IP, Khaitov MR, Grivennikov SI** (2016) Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. *Biochem (Mosc)*, 81(2): 80-90.
- Dubový P, Klusáková I, Hradilová Svíženská I.** (2014) Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury. *Biomed Res Int*, 2014: 691041.
- Ducatman BS, Scheithauer BW, Piegras DG, Reiman HM, Ilstrup DM** (1986) Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer*, 57(10): 2006-21.
- Dugoff L, Sujansky E** (1996) Neurofibromatosis type 1 and pregnancy. *Am J Med Genet*, 66(1): 7-10.
- Dvorak HF** (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma and wound healing. *N Engl J Med*, 315(26): 1650-9.
- Einheber S, Hannocks MJ, Metz CN, Rifkin DB, Salzer JL** (1995) Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J Cell Biol*, 129(2): 443-58.
- Erlandson RA, Woodruff JM** (1982) Peripheral nerve sheath tumors: an electron microscopic study of 43 cases. *Cancer*, 49(2): 273-87.
- Evans DG, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A** (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*, 39(5): 311-4.
- Evans DG, O'Hara C, Wilding A, Ingham SL, Howard E, Dawson J, Moran A, Scott-Kitching V, Holt F, Huson SM** (2011) Mortality in neurofibromatosis 1: in North West England: an assessment of actuarial survival in a region of the UK since 1989. *Eur J Hum Genet*, 19(11): 1187-91.
- Falls DL** (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res*, 284(1): 14-30.
- Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Evers BM** (2004) Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg*, 239(6): 763-71.
- Ferguson TA, Muir D** (2000) MMP-2 and MMP-9 increase the neurite-promoting potential of Schwann cell basal laminae and are upregulated in degenerated nerve. *Mol Cell Neurosci*, 16(2): 157-67.
- Fernandes KJ, Kobayashi NR, Gallagher CJ, Barnabé-Heider F, Aumont A, Kaplan DR, Miller FD** (2006) Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Exp Neurol*, 201(1): 32-48.

Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD (2004) A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*, 6(11): 1082-93.

Furuta C, Miyamoto T, Takagi T, Noguchi Y, Kaneko J, Itoh S, Watanabe T, Itoh F (2015) Transforming growth factor- β signaling enhancement by long-term exposure to hypoxia in a tumor microenvironment composed of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Sci*, 106(11): 1524-33.

Gao Y, Xu B, Zhang P, He Y, Liang X, Liu J, Li J (2017) TNF- α regulates mast cell functions by inhibiting cell degranulation. *Cell Physiol Biochem*, 44(2): 751-62.

Grivennikov SI (2013) Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*, 35(2): 229-44.

Guénard V, Gwynn LA, Wood PM (1995) Transforming growth factor-beta blocks myelination but not ensheathment of axons by Schwann cells in vitro. *J Neurosci*, 15(1 Pt 1): 419-28.

Gutmann DH, Collins FS (1993) Neurofibromatosis type 1. Beyond positional cloning. *Arch Neurol*, 50(11): 1185-93.

Gutmann DH, Parada LF, Silva AJ, Ratner N (2012) Neurofibromatosis type 1: modeling CNS dysfunction. *J Neurosci*, 32(41): 14087-93.

Hagel C, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, Zurakowski D, von Deimling A, Mautner VF (2007) Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol*, 82(2): 187-92.

Hammond MEW, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, Giedlin MA, Mullenbach G, Tekamp-Olson P (1995) IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol*, 155(3): 1428-33.

Hehlhans T, Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1): 1-20.

Hirbe AC, Gutmann DH (2014) Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol*, 13(8): 834-43.

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): 293-8.

Hirota S, Nomura S, Asada H, Ito A, Morii E, Kitamura Y (1993) Possible involvement of c-kit receptor and its ligand in increase of mast cells in neurofibroma tissues. *Arch Pathol Lab Med*, 117(10): 996-9.

Huson SM, Harper PS, Compston DA (1988) Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical population study in south-east Wales. *Brain*, 111(Pt 6): 1355-81.

IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Ingram DA, Yang FC, Travers JB, Wenning MJ, Hiatt K, New S, Hood A, Shannon K, Williams DA, Clapp DW (2000) Genetic and biochemical evidence that hap-

loinsufficiency of the Nf1 tumor suppressor gene modulates melanocyte and mast cell fates in vivo. *J Exp Med*, 191(1): 181-8.

Isaacson P (1976) Mast cells in benign nerve sheath tumours. *J Pathol*, 119(4): 193-6.

Jaffe EM, Hruban RH, Canto M, Kern SE (2002) Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell*, 2(1): 25-8.

Jakowlew SB (2006) Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 25: 435-457.

Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC (2015) Schwann Cells: development and role in nerve repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(7): a020487.

Johnson MD, Kamso-Pratt J, Federspiel CF, Whetsell WO Jr. (1989) Mast cell and lymphoreticular infiltrates in neurofibromas. Comparison with nerve sheath tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 113(11): 1263-70.

Jokinen CH, Argenyi ZB (2010) Atypical neurofibroma of the skin and subcutaneous tissue: clinicopathologic analysis of 11 cases. *J Cutan Pathol*, 37(1): 35-42.

Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T, Traulsen A, Nowak MA, Siegel C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Willis J, Markowitz SD (2008) Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(11): 4283-8.

Juremalm M, Nilson G (2005) Chemokine receptor expression by mast cells. *Chem Immunol Allergy*, 87: 130-44.

Kadono T, Soma Y, Takehara K, Nakagawa H, Ishibashi Y, Kikuchi K (1994) The growth regulation of neurofibroma cells in neurofibromatosis type-1: increased responses to PDGF-BB and TGF-beta 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 198(3): 827-34.

Kaufmann D, Krone W, Hochsattel R, Martin R (1989) A cell culture study on melanocytes from patients with neurofibromatosis-1. *Arch Dermatol Res*, 281(7): 510-3.

Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF (2009) Klinik und Genetik der Neurofibromatose Typ 1. *Med Gen*, 21(4): 519-31.

Kissil J, Blakeley J, Ferner R, Huson S, Kalamarides M, Mautner VF, McCormick F, Morrison H, Packer RJ, Ramesh V, Ratner N, Rauen KA, Stevenson D, Hunter-Schaedle K, North K (2010) What's new in neurofibromatosis? Proceedings from the 2009 NF Conference: new frontiers. *Am J Med Genet A*, 152A(2): 269-83.

Kitakata H, Nemoto-Sasaki Y, Takahashi Y, Kondo T, Mai M, Mukaida N (2002) Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer Res*, 62(22): 6682-7.

Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA (1990) Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor α : evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med*, 172(6): 1609-14.

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

Lai RS, Lin SL, Hsu SS, Wu MT (2006) Intrathoracic paraspinal malignant peripheral nerve sheath tumor. *J Chin Med Assoc* 69(1): 37-41.

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): 453-63.

- Lee PR, Cohen JE, Tendi EA, Farrer R, DE Vries GH, Becker KG, Fields RD** (2004) Transcriptional profiling in an MPNST-derived cell line and normal human Schwann cells. *Neuron Glia Biol*, 1(2): 135-47.
- Lewis JJ, Brennan MF** (1996) Soft tissue sarcomas. *Curr Probl Surg*, 33(10): 817-72.
- Li M, Zhang Y, Feurino LW, Wang H, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C, Yao Q** (2008) Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer Sci*, 99(4): 733-7.
- Lippert U, Artuc M, Grützkau A, Möller A, Kenderessy-Szabo A, Schadendorf D, Norgauer J, Hartmann K, Schweitzer-Stenner R, Zuberbier T, Henz BM, Krüger-Krasagakes S** (1998) Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J Immunol*, 161(5): 2600-8.
- Lisch K** (1937) Ueber Beteiligung der Augen, insbesondere das Vorkommen von Iris-knötchen bei der Neurofibromatose (Recklingshausen). *Z Augenheilkd*, 93(3): 137-43.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M** (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 87(3): 565-76.
- Luster AD** (1998) Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338(7): 436-45.
- Lynch TM, Gutmann DH** (2002) Neurofibromatosis 1. *Neurol Clin*, 20(3): 841-65.
- MacCarron KF, Goldblum JR** (1998) Plexiform neurofibroma with and without associated malignant peripheral nerve sheath tumor: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 54 cases. *Mod Pathol*, 11(7): 612-7.
- Maertens O, De Schepper S, Vandesomepele J, Brems H, Heyns I, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L** (2007) Molecular dissection of isolated disease features in mosaic neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet*, 81(2): 243-51.
- Maltby S, Khazaie K, McNagny KM** (2009) Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta*, 1796(1): 19-26.
- Mantovani A** (2005) Inflammation by remote control. *Nature*, 435(7043): 752-3.
- Martuza RL, Philippe I, Fitzpatrick TB, Zwaan J, Seki Y, Lederman J** (1985) Melanin macroglobules as a cellular marker of neurofibromatosis: a quantitative study. *J Invest Dermatol*, 85(4): 347-50.
- Matsushima K, Oppenheim JJ** (1989) Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine*, 1(1): 2-13.
- Mautner VF** (2017) Neurofibromatose Typ 1 bei Kindern [Online im Internet] URL: <http://bv-nf.de/neurofibromatose/nf-1> [Stand: 16.05.2019, 20:28].
- McClatchey AI** (2007) Neurofibromatosis. *Annu Rev Pathol*, 2: 191-216.
- Mei L, Xiong WC** (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 9(6): 437-52.
- Micheau M, Tschopp J** (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114 (2): 181-90.

- Mirsky R, Jessen KR** (1996) Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol*, 6(1): 89-96.
- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, Holdsworth H, Turner L, Rollins B, Pasparakis M, Kollias G, Balkwill F** (1999) Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*, 5(7): 828-31.
- Naber U** (2011) Potentielle Merkmale für Dedifferenzierung und Tumorprogress in peripheren Nervenscheidentumoren. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.
- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, de Gramont A** (2015) Targeting the TGF- β pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 147: 22-31.
- Ozaki A, Nagai A, Lee YB, Myong NH, Kim SU** (2008) Expression of cytokines and cytokine receptors in human Schwann cells. *Neuroreport*, 19(1): 31-5.
- Packer RJ, Gutmann DH, Rubenstein A, Viskochil D, Zimmermann RA, Vezina G, Small J, Korf B** (2002) Plexiform neurofibromas in NF1. *Neurology*, 58(10): 1461-70.
- Padua D, Massagué J** (2009) Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*, 19(1): 89-102.
- Page PZ, Page GP, Ecosse E, Korf BR, Leplege A, Wolkenstein P** (2006) Impact of neurofibromatosis 1 on quality of life: a cross-sectional study of 176 American cases. *Am J Med Genet A*, 140(18): 1893-8.
- Park SH, Das BB, Casagrande F, Tian Y, Nothnagel HJ, Chu M, Kiefer H, Maier K, De Angelis AA, Marassi FM, Opella SJ** (2012) Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature*, 491(7426): 779-83.
- Park SH, Prytulla S, De Angelis AA, Brown JM, Kiefer H, Opella SJ** (2006) High-resolution NMR spectroscopy of a GPCR in aligned bicelles. *J Am Chem Soc*, 128(23): 7402-3.
- Park SJ, Sawitzki B, Kluwe L, Mautner VF, Holtkamp N, Kurtz A** (2013) Serum biomarkers for neurofibromatosis type 1 and early detection of malignant peripheral nerve-sheath tumors. *BMC Med*, 11:109.
- Parkinson DB, Dong Z, Bunting H, Whitfield J, Meier C, Marie H, Mirsky R, Jessen KR** (2001) Transforming growth factor beta (TGFbeta) mediates Schwann cell death in vitro and in vivo: examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGFbeta-mediated death to Schwann cell differentiation. *J Neurosci*, 21(21): 8572-85.
- Paul WE, Seder RA** (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76(2): 241-51.
- Perry A, von Daimling A, Louis DN, Hunter S, Reuss DE, Antonescu CR** (2016). Tumours of the cranial and paraspinal nerves. Neurofibroma. In: WHO classification of tumours of the central nervous system. D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee (Hrsg.) International Agency for Research on Cancer, Lyon, 219-21.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y** (2004) NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431(7007): 461-6.
- Polyak K, Weinberg RA** (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9(4): 265-73.

- Pummi KP, Aho HJ, Laato MK, Peltonen JT, Peltonen SA** (2006) Tight junction proteins and perineurial cells in neurofibromas. *J Histochem Cytochem*, 54(1): 53-61.
- Püschel LKN** (2017) Faktoren der Tumorbilogie bei peripheren Nervenscheidentumoren: Eine vergleichende immunhistochemische Studie bei Mensch und Hund. Veterinärmedizinische Dissertation. Universität Gießen. VVB Lauferweiler Verlag Gießen.
- Qin Y, Cheng C, Wang H, Shao X, Gao Y, Shen A** (2008) TNF-alpha as an autocrine mediator and its role in the activation of Schwann cells. *Neurochem Res*, 33(6): 1077-84.
- Rahman MM, McFadden G** (2006) Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog*, 2(2): e4.
- Ramesh G, Reeves WB** (2002) TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest*, 110(6): 835-42.
- Raychaudhuri B, Han Y, Lu T, Vogelbaum MA** (2007) Aberrant constitutive activation of nuclear factor κ B in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *J Neurooncol* 85(1): 39-47.
- Raychaudhuri B, Vogelbaum MA** (2011) IL-8 is a mediator of NF- κ B induced invasion by gliomas. *J Neurooncol*, 101(2): 227-35.
- Reuss DE, Mucha J, Hagenlocher C, Ehemann V, Kluwe L, Mautner VF, von Deimling A** (2013) Sensitivity of malignant peripheral nerve sheath tumor cells to TRAIL is augmented by loss of NF1 through modulation of MYC/MAD and is potentiated by curcumin through induction of ROS. *PLoS One*, 8(2): e57152.
- Riccardi VM** (1987) Mast-cell stabilization to decrease neurofibroma growth. Preliminary experience with ketotifen. *Arch Dermatol*, 123(8): 1011-6.
- Riccardi VM** (1992) Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis. 2. Aufl., Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore/London.
- Riccardi VM, Lewis RA** (1988) Penetrance of von Recklingshausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. *Am J Hum Genet*, 42(2): 284-9.
- Rodriguez FJ, Folpe AL, Giannini C, and Perry A** (2012) Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. *Acta Neuropathol*, 123(3): 295-319.
- Ruggieri M** (1999) The different forms of neurofibromatosis. *Childs Nerv Syst*, 15(6-7): 295-308.
- Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL** (1999) Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol*. 101(1): 47-60.
- Serhan CN, Savill J** (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, 6(12): 1191-7.
- 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): 3055-64.
- Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K** (1999) Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res*, 5(11): 3711-21.

- Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massagué J** (2003) Transforming growth factor β signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(14): 8430-5.
- Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ** (1994) Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res*, 54(12): 3242-7.
- Stocker KM, Baizer L, Coston T, Sherman L, Ciment G** (1995) Regulated expression of neurofibromin in migrating neural crest cells of avian embryos. *J Neurobiol*, 27(4): 535-52.
- Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, Smyth MJ** (2008) Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(2): 652-6.
- Szlosarek PW, Balkwill FR** (2003) Tumour necrosis factor α : a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol*, 4(9): 565-73.
- Taurone S, Bianchi E, Attanasio G, Di Gioia C, Ierinó R, Carubbi C, Galli D, Pastore FS, Giangaspero F, Filippo R, Zanza C, Artico M** (2015) Immunohistochemical profile of cytokines and growth factors expressed in vestibular schwannoma and in normal vestibular nerve tissue. *Mol Med Rep*, 12(1): 737-45.
- Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M** (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6): 2101-14.
- The MHC Sequencing Consortium** (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756): 921-3.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D** (2012) Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1822(1): 21-33.
- Tian M, Neil JR, Schiemann WP** (2011) Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cell Signal*, 23(6): 951-62.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD** (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 3(9): 778-84.
- Tomita Y, Yang X, Ishida Y, Nemoto-Sasaki Y, Kondo T, Oda M, Watanabe G, Chaldakov GN, Fujii C, Mukaida N** (2004) Spontaneous regression of lung metastasis in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Int J Cancer*, 112(6): 927-33.
- Torres KC, Lima G, Simões E Silva AC, Lubambo I, Rodrigues LO, Rodrigues L, Silveira KD, Vieira ÉL, Romano-Silva MA, Miranda DM** (2016) Immune markers in the RASopathy neurofibromatosis type 1. *J Neuroimmunol*, 295-296: 122-9.
- 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): 584-90.
- Virchow R** (1863) *Die krankhaften Geschwülste*. Hirschwald, Berlin.
- Von Recklinghausen FD** (1882) *Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuomen*. Hirschwald, Berlin. 72 ff.

- Wagner R, Myers RR** (1996) Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience*, 73(3): 625-9.
- Wakabayashi K, Kambe F, Cao X, Murakami R, Mitsuyama H, Nagaya T, Saito K, Yoshida J, Seo H** (2004) Inhibitory effects of cyclosporin A on calcium mobilization-dependent interleukin-8 expression and invasive potential of human glioblastoma U251MG cells. *Oncogene*, 23(41): 6924-32.
- Wakefield LM, Hill CS** (2013) Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(5): 328-41.
- Washington EN, Placket TP, Gagliano RA, Kavolius J, Person DA** (2010) Diffuse plexiform neurofibroma of the back: report of a case. *Hawaii Med J*, 69(8): 191-3.
- Watanabe H, Iwase M, Ohashi M, Nagumo M** (2002) Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*, 38(7): 670-9.
- Watanabe T, Oda Y, Tamiya S, Masuda K, Tsuneyoshi M** (2001) Malignant peripheral nerve sheath tumour arising within neurofibroma. An immunohistochemical analysis in the comparison between benign and malignant components. *J Clin Pathol*, 54(8): 631-6.
- Waugh DJ, Wilson C** (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 14(21): 6735-41.
- Welti S, D'Angelo I, Scheffzek K** (2008) Structure and function of neurofibromin. *Monogr Hum Genet*, 16: 113-28.
- Westerhof W, Konrad K** (1982) Blue-red macules and pseudoatrophic macules: additional cutaneous signs in neurofibromatosis. *Arch Dermatol*, 118(8): 577-81.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG** (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3(6): 673-82.
- Woodruff JM** (1999) Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *Am J Med Genet*, 89(1): 23-30.
- Wu SP, Sun LZ, Willson JK, Humphrey L, Kerbel R, Brattain MG** (1993) Repression of autocrine transforming growth factor beta 1 and beta 2 in quiescent CBS colon carcinoma cells leads to progression of tumorigenic properties. *Cell Growth Differ*, 4: 115-23.
- Yamanaka R, Tanaka R, Yoshida S, Saitoh T, Fujita K** (1995) Growth inhibition of human glioma cells modulated by retrovirus gene transfection with antisense IL-8. *J Neurooncol*, 25(1): 59-65.
- Yamate J, Yasui H, Benn SJ, Tsukamoto Y, Kuwamura M, Kumagai D, Sakuma S, LaMarre J** (2003) Characterization of newly established tumor lines from a spontaneous malignant schwannoma in F344 rats: nerve growth factor production, growth inhibition by transforming growth factor-beta1, and macrophage-like phenotype expression. *Acta Neuropathol*, 106(3): 221-33.
- Yang FC, Ingram DA, Chen S, Hingtgen CM, Ratner N, Monk KR, Clegg T, White H, Mead L, Wenning MJ, Williams DA, Kapur R, Atkinson SJ, Clapp DW** (2003) Neurofibromin-deficient schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1^{+/-} mast cells. *J Clin Invest*, 112(12): 1851-61.

Yang FC, 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, Hutchings G, Parada LF, Clapp DW (2008) NF1-dependent tumors require a microenvironment containing NF1^{+/-} and c-kit-dependent bone marrow. *Cell*, 135(3): 437-48.

Yang L, Pang Y, Moses HL (2010) TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*, 31(6): 220-7.

Yong LCJ (1997) The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Exp Toxicol Pathol*, 49(6): 409-24.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ (1987) Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci*, 84(24): 9233-7.

Zachariae CO, Thestrup-Pedersen K, Matsushima K (1991) Expression and secretion of leukocyte chemotactic cytokines by normal human melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 97(3): 593-9.

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): 117-28.

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): 920-2.

Anhang

Tabelle 16: Rohdaten Vergleichsnervengewebe N. suralis von Nicht-NF1-Patienten

E-Nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	IL-8	CXCR1	TNF- α	TNFR1	TGF- β
1556-2010	70 Jahre	Weiblich	CIDP (Chronische inflammatorische demyelinierende Polyradikuloneuropathie)	2	0	0 (stark pos. Zellkerne)	6	0
1400-2009	47 Jahre	Männlich	Vaskulitis	3	0	0 (stark pos. Zellkerne)	6	0
1495-2011	69 Jahre	Männlich	Chronische Axonopathie	4	0	0 (stark pos. Zellkerne)	6 (Zellkerne neg.)	0
1321-2010	45 Jahre	Männlich	CIDP/Vaskulitis	1	0	0 (stark pos. Zellkerne)	5 (Zellkerne neg.)	0
1860-2012	38 Jahre	Weiblich	Hochgradige nicht-entzündliche Axonopathie, Vit.B12-Mangel	0	0	0 (stark pos. Zellkerne)	6	0
1568-2011	71 Jahre	Männlich	Chronische Axonopathie, Mikroangiopathie	0	0	0 (stark pos. Zellkerne)	6 (Zellkerne neg.)	0

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. C. Hagel für seine kompetente und freundliche Betreuung, Gespräche und Flexibilität.

Außerdem danke ich dem ärztlichen Leiter und Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. M. Glatzel für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren und für die Überlassung der Proben.

Den Laboratoriumsassistentinnen und -assistenten des Instituts für Neuropathologie danke ich herzlich für die Einführung in die Immunhistochemie und für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.