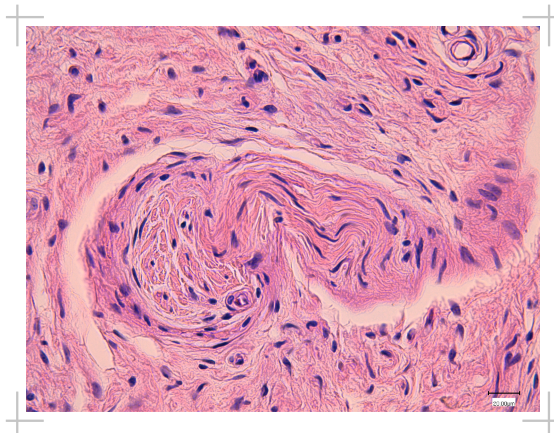


LOUISA PÜSCHEL

FAKTOREN DER TUMORBIOLOGIE BEI PERIPHEREN NERVENSCHEIDENTUMOREN:

Eine vergleichende immunhistochemische
Studie bei Mensch und Hund



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christiane Herden am FB Veterinärmedizin

und

dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Betreuer: Prof. Dr. med. Christian Hagel

**Faktoren der Tumorbilogie bei peripheren Nervenscheidentumoren:
Eine vergleichende immunhistochemische Studie bei Mensch und Hund**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Louisa Katharina Nora Püschel

Tierärztin aus Hamburg

Gießen, 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. habil. Christiane Herden, Fachbereich Veterinärmedizin der JLU Gießen

Prof. Dr. Christian Hagel, Institut für Neuropathologie des UKE, Hamburg

Tag der Disputation: 22.02.2017

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG UND ZIEL DER STUDIE	4
2 LITERATURÜBERSICHT.....	5
2.1 Neurofibromatose Typ 1 beim Menschen.....	5
2.1.1 Dermales/kutanes Neurofibrom.....	7
2.1.2 Plexiformes Neurofibrom	8
2.1.3 Diffuses Neurofibrom.....	9
2.1.4 Plexiform-diffuses Neurofibrom	10
2.1.5 Maligner peripherer Nervenscheidentumor	11
2.2 Periphere Nervenscheidentumore in der Veterinärmedizin	12
2.3 Periphere Nervenscheidentumore beim Hund	14
2.4 Immunologische Expressionsproteine.....	16
2.4.1 Expressionsmuster peripherer Nervenscheidentumore	16
2.4.1.1 S100-Protein.....	17
2.4.1.2 Epitheliales Membranantigen	17
2.4.1.3 Claudin-1	18
2.4.1.4 CD90.....	18
2.4.1.5 Mastzelltryptase.....	19
2.4.1.6 Neurofilament	19
2.4.2 Faktoren des Tumorwachstums	20
2.4.2.1 Die acht Kennzeichen der Tumorentstehung	20
2.4.2.2 Proliferationsmarker Ki-67	23
2.4.2.3 Wachstumsfaktorrezeptoren und Neuregulin-1	23
Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2.....	25
Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3.....	25
Neuregulin-1	25
2.4.2.4 CD44.....	27
2.4.2.5 Neurofibromin-Signalweg	27
mTor	28
Rho	29
MEK1/2.....	29
2.4.2.6 Transkriptionsfaktoren	29

Inhaltsverzeichnis

Pax7	30
Sox9	30
2.4.3 Differenzierungsmarker caniner PNST	30
2.4.3.1 Periaxin	31
2.4.3.2 α -Smooth Muscle Actin	31
2.4.3.3 Saures Gliafaserprotein	32
2.4.3.4 Nervenwachstumsfaktorrezeptor	32
3 MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 Material	33
3.1.1 Patientenkollektiv – Menschen	33
3.1.2 Patientenkollektiv – Hunde	33
3.1.3 Antikörper	35
3.1.4 Lösungen und immunhistochemische Reagenzien	36
3.1.5 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	36
3.1.6 Geräte	36
3.2 Methoden	36
3.2.1 Schnittherstellung	36
3.2.2 Protokoll Silan-Beschichtung	36
3.2.3 Tissue-Microarray-Herstellung	37
3.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	37
3.2.5 Immunhistochemie	38
3.2.5.1 Ansatz Antikörper	38
3.2.5.2 Protokoll Immunhistochemie, Einfachfärbung	38
3.2.5.3 Protokoll Immunhistochemie, Doppelfärbung	39
3.2.6 Evaluationsmethoden	40
3.2.6.1 Qualitativ	41
3.2.6.2 Semiquantitativ	43
3.2.6.3 Quantitativ	44
3.2.6.4 Graduierungsschema Sarkome	45
3.2.7 Statistische Auswertung	46
4 ERGEBNISSE	50
4.1 Klinische Daten	50
4.1.1 Humane Neurofibrome	50
Tumorsubtypen und Alter bei Probenentnahme	50
Tumorsubtypen und Lokalisation	51
4.1.2 Canine maligne periphere Nervenscheidentumore	52

4.1.3	Vergleich Mensch – Hund: Tumortypen und Lokalisation	53
4.1.4	Vergleich Mensch – Hund: Tumortypen und Alter	54
4.2	Histomorphologie.....	54
4.2.1	Humane Neurofibrome	54
4.2.2	Canine maligne periphere Nervenscheidentumore	55
4.3	Immunhistologie	58
4.3.1	Mensch: Expressionsmuster humaner PNST	59
4.3.1.1	S100-Protein.....	59
4.3.1.2	Epitheliales Membranantigen	60
4.3.1.3	CD90.....	62
4.3.1.4	Mastzelltryptase.....	64
4.3.1.5	Neurofilament	65
4.3.2	Mensch: Differenzierungsmarker caniner MPNST	68
4.3.2.1	Periaxin.....	68
4.3.2.2	α -Smooth Muscle Actin	70
4.3.2.3	Saures Gliafaserprotein.....	71
4.3.2.4	Nervenwachstumsfaktorrezeptor.....	72
4.3.3	Hund: Expressionsmuster caniner PNST	73
4.3.3.1	S100-Protein.....	73
4.3.3.2	Epitheliales Membranantigen	74
4.3.3.3	Claudin-1	74
4.3.3.4	CD90.....	76
4.3.3.5	Mastzellen	77
4.3.3.6	Neurofilament	78
4.3.4	Hund: Differenzierungsmarker caniner MPNST	79
4.3.4.1	Periaxin.....	79
4.3.4.2	α -Smooth Muscle Actin	80
4.3.4.3	Saures Gliafaserprotein.....	82
4.3.4.4	Doppelfärbung α -SMA und GFAP	83
4.3.4.5	Nervenwachstumsfaktorrezeptor.....	84
4.3.5	Vergleich Mensch – Hund: Expressionsmuster	85
4.3.5.1	S100-Protein.....	85
4.3.5.2	CD90.....	86
4.3.5.3	Mastzelltryptase.....	87
4.3.5.4	Neurofilament	88
4.3.5.5	Periaxin.....	89
4.3.5.6	Saures Gliafaserprotein.....	90
4.3.5.7	Nervenwachstumsfaktorrezeptor.....	91
4.3.6	Mensch: Faktoren des Tumorwachstums	91

Inhaltsverzeichnis

4.3.6.1	Ki-67-Index	91
4.3.6.2	Zellularität	93
4.3.6.3	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2.....	93
4.3.6.4	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3.....	95
4.3.6.5	Neuregulin-1	97
	Neuregulin-1 und Anzahl von Axonen.....	99
4.3.6.6	CD44.....	100
4.3.6.7	mTor	103
4.3.6.8	Rho	105
4.3.6.9	MEK.....	106
4.3.6.10	pMEK.....	108
4.3.6.11	Sox9.....	109
4.3.6.12	Pax7.....	111
4.3.7	Hund: Faktoren des Tumorwachstums	114
4.3.7.1	Ki-67-Index	114
4.3.7.2	Zellularität	115
4.3.7.3	Neuregulin-1	115
4.3.8	Vergleich Mensch – Hund: Faktoren des Tumorwachstums.....	116
4.3.8.1	Ki-67-Index	116
4.3.8.2	Zellularität	116
4.3.8.3	Neuregulin-1	117
4.4	Mensch: weitere Auswertung.....	118
4.4.1	FNCLCC-Grading	118
4.4.2	Korrelationsberechnungen Variablen untereinander.....	118
	Dermale/Kutane Neurofibrome.....	119
	Plexiforme Neurofibrome.....	120
	Diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome	121
	Maligne periphere Nervenscheidentumore	122
4.5	Hund: weitere Auswertung	123
4.5.1	FNCLCC-Grading	123
4.5.2	Gradingversuch	123
	Strategie 1: Gradierung nach klassierten Variablen.....	124
	Strategie 2: Gradierung nach Grenzwerten	126
	Vergleich Gradingstrategien untereinander	127
	Vergleich Gradingstrategien und FNCLCC	128
	Vergleich Gradierungsstrategien und Tumordifferenzierung	129
4.6	Vergleich Mensch – Hund: weitere Auswertung	130
4.6.1	FNCLCC-Grading	130
	Auftreten von Nekrosen in hMPNST und cMPNST.....	131

Mitoseanzahl in hMPNST und cMPNST	131
5 DISKUSSION	133
5.1 Vergleich humaner und caniner MPNST	134
5.1.1 Klinische Daten.....	134
Alter	134
Lokalisation.....	135
Rasseprädisposition	136
5.1.2 Histomorphologie.....	136
5.1.2.1 Histogenese humaner Neurofibrome	137
5.1.3 Tumorverhalten von MPNST	138
Gradierungsansätze Hund	140
5.1.4 Expressionsmuster peripherer Nervenscheidentumore	141
S100-Protein.....	142
Epitheliales Membranantigen	143
Claudin-1	143
CD90	144
Mastzellen	145
Neurofilament	146
Fazit.....	146
5.2 Diagnose und Differentialdiagnosen von cMPNST	147
Saures Gliafaserprotein.....	148
Nervenzwachstumsfaktorrezeptor.....	148
Claudin-1	148
Periaxin.....	149
α -SMA.....	149
Fazit.....	150
5.2.1 Abschließende Bewertung: Vergleich Mensch - Hund.....	151
5.3 Tumorwachstum in humanen PNST	151
5.3.1 Wachstumsfaktoren und Rezeptoren	152
Epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren-2 und -3, Neuregulin-1	152
CD44	154
5.3.2 Intrazelluläre Signalwege	155
mTor	155
Rho	156
MEK1/2.....	156
Fazit.....	157
5.3.3 Transkriptionsfaktoren	157

Inhaltsverzeichnis

Pax7	157
Sox9	159
5.4 Hypothetische Signalwege in humanen PNST	160
Dermale/kutane Neurofibrome	160
Diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome	161
Plexiforme Neurofibrome	163
Maligne periphere Nervenscheidentumore	164
Fazit	165
5.5 Ausblick	166
6 ZUSAMMENFASSUNG	168
7 SUMMARY	170
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	172
9 TABELLENVERZEICHNIS	176
10 LITERATURVERZEICHNIS	177
11 DANKSAGUNG	195
12 ERKLÄRUNG	196
13 ANHANG	197
13.1 Lösungen und immunhistochemische Reagenzien	197
13.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	198
13.3 Geräte	198
13.4 Evaluierungsschemata der verwendeten Antikörper	200
13.5 Rohdaten canine periphere Nervenscheidentumore	202
13.6 Rohdaten humanen peripheren Nervenscheidentumore	204

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
α -SMA (α -2-Aktin)	<i>smooth muscle actin</i>
BPNST	benigner peripherer Nervenscheidentumor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CD90	<i>Cluster of differentiation 90</i>
cPNST	caniner peripherer Nervenscheidentumor
cMPNST	caniner maligner peripherer Nervenscheidentumor
cHP	canines Hämangioperizytom
c-Kit	Tyrosinkinase Kit
Cl1	Claudin-1
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukelinsäure
DNF	diffuses Neurofibrom
DPNF	plexiform-diffuses Neurofibrom
DPTD	<i>Devil facial tumor disease</i>
ELISA	<i>Ezyme linked immunosorbent assay</i>
EMA	Epitheliales Membranantigen
e. g.	<i>for example</i>
EGFR/ErbB1	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGF-Ligand	Epidermaler Wachstumsfaktor-Ligand
ErbB2 (Her2)	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2
ErbB3 (Her3)	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3
ErbB4 (Her4)	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-4
ERK	Extrazelluläre-signal-regulierende Kinase
FNCLCC	Fédération nationale des Centres de lutte contre le cancer
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GEF	<i>Guanin nucleotide exchange factors</i>
GAP	Guanintriphosphatase aktivierendes Protein
GDP	Guanindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanintriphosphat
GTPase	Guanintriphosphatase

Abkürzungsverzeichnis

HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HMG-box	<i>high mobility group box</i>
hMPNST	humaner maligner peripherer Nervenscheidentumor
hPNST	humane periphere Nervenscheidentumore
HPF	<i>high power field</i>
i. d. R.	in der Regel
JLU	Justus-Liebig-Universität
KNF	kutanes/dermales Neurofibrom
kDa	Kilo Dalton
LIMK2	LIM domain Kinase 2
LOH	<i>loss of heterozygosis</i>
M	Median
MAPK	Mitogen-aktivierende Protein Kinase
MEK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase Kinase
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
MRT	Magnetresonanztomographie
mTor	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NF2	Neurofibromatose Typ 2
NF	Neurofibrom
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NSE	Neuronen spezifische Enolase
n.u.Z.	nach unserer Zeitrechnung
NRG1-4	Neuregulin-1 bis -4
NGFR (p75NTR)	Nervenwachstumsfaktorrezeptor
od.	oder
p53	Tumorprotein p53
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
P70S6K	Ribosomale p70S6 Kinase
Pax7	<i>Paired box</i> Protein 7
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pMEK (1/2)	phosphorylierte Mitogen-aktivierende Proteinkinase Kinase
PN	Perineurium
PNF	plexiformes Neurofibrom
PNST	peripherer Nervenscheidentumor

Abkürzungsverzeichnis

Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Rac	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Rb1	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
Rho	<i>Ras homologue</i>
Rock	<i>Rho associated protein kinase</i>
sog.	sogenannt
Sox9	<i>Sry-related high mobility group box</i> Protein 9 (Transkriptionsfaktor)
TMA	<i>Tissue-Microarray</i>
TSC1/2	<i>Tuberous sclerois protein</i>
TGF α	Transformierender Wachstumsfaktor α
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
u.	und
u. a.	unter anderem
urspr.	ursprünglich
v. a.	vor allem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vergr.	Vergrößerung
v. d.	von der
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung und Ziel der Studie

Neurofibromatosen sind in der Humanmedizin eine Gruppe neurogenetischer Erkrankungen mit unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Bisher sind drei verschiedene Typen sicher klassifiziert: Die Neurofibromatose Typ 1 und 2 und die Schwannomatose (Kissil et al. 2010). Bei allen drei Krankheiten können Neoplasien (u. a. Neurofibrome und Schwannome) vorkommen. Für die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist das Auftreten von peripheren Nervenscheidentumoren charakteristisch. Diese werden in verschiedene Subgruppen untergliedert die vorwiegend gutartig sind. Jedoch entwickeln 8-12% der NF1-Patienten einen malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST); (Boyd et al. 2009), welcher die Haupttodesursache dieser Krankheit darstellt (Ferner und Gutmann 2002; Ferrari et al. 2007). Der Aufdeckung der Pathomechanismen, die für die maligne Transformation der humanen peripheren Nervenscheidentumore verantwortlich sind, kommt eine wichtige Bedeutung in der Bekämpfung der mit NF1-assoziierten Neoplasien zu.

In der Tiermedizin tritt ein Neurofibromatose-ähnliches Krankheitsbild beim Rind auf, bei dem multiple Tumore im Körper vorkommen (Koestner et al. 1999; Goldschmidt und Hendrick 2002). Darüber hinaus sind spontan auftretende periphere Nervenscheidentumore (PNST) bei Hund, Katze und Pferd beschrieben (Goldschmidt und Hendrick 2002). Die Klassifikation und Beschreibung der PNST in der Veterinärmedizin orientiert sich an den Tumoren der humanen Neurofibromatosen. In der Tiermedizin wird indes nur zwischen benignen und malignen PNST unterschieden. MPNST sind am häufigsten beim Hund beschrieben (Koestner et al. 1999) und machen dort 4,3% aller Hauttumoren aus (Hauck 2013).

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt:

- Sporadische canine MPNST mit NF1-assoziierten humanen MPNST anhand verschiedener Kriterien (Klinik, Histomorphologie, biologisches Verhalten, Immunreaktivität) zu vergleichen,
- Mögliche diagnostische Immunmarker (GFAP, NGFR, Claudin-1, Periaxin, α -SMA) auf ihre Spezifität für cMPNST hin zu untersuchen,
- Die zelluläre Zusammensetzung der humanen peripheren Nervenscheidentumoren und caninen MPST zu quantifizieren und ihre Rolle für eine mögliche Tumorprogression zu untersuchen,
- Zelluläre Signalwege in humanen NF1-assoziierten Tumoren zu untersuchen und ihren Beitrag zur Tumorbilogie aufzuzeigen.

2 Literaturübersicht

2.1 Neurofibromatose Typ 1 beim Menschen

Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine autosomal dominant vererbte neurokutane Erkrankung (Panteliadis et al. 2009) mit einer Inzidenz von 1: 2.500 - 3.000 und damit eines der am häufigsten vererbten genetischen Syndrome (Burger und Scheithauer 2012; Rodriguez et al. 2012b). 50% der Erkrankungen entstehen durch Neumutationen (Burger und Scheithauer 2012), 50% sind vererbt (Boyd et al. 2009).

Berichte und bildliche Darstellungen von Neurofibromen existieren schon seit dem zweiten Jahrhundert n. u. Z. (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001), jedoch war es Friedrich Daniel von Recklinghausen, der 1882 in seiner Arbeit „*Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuomen*“ (Recklinghausen 1882) erstmals die Krankheit beschrieb und den Namen Neurofibromatose prägte (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Ab 1882 waren Neurofibromatosen dann als definierte Störung anerkannt (Boyd et al. 2009).

Die Vielzahl, Variabilität und Unvorhersehbarkeit der Symptome macht die NF1 zu einer Erkrankung, die schwer zu diagnostizieren und zu behandeln ist (Ruggieri 1999). Zu den Hauptsymptomen zählen Pigmentstörungen (Café-au-lait-Flecken, Flecken in den Achseln und Leisten, sog. *skinfold freckling* und Lisch-Knötchen) und periphere Nervenscheidentumore (Ruggieri 1999; Burger und Scheithauer 2012). Mögliche Komplikationen können weitere Tumore (v. a. Optikusgliome, aber auch Medulloblastome und Ependymome), skelettale Veränderungen (Kleinwüchsigkeit, Makrozephalie, Skoliose, Pseudoarthrose u. a.) und beeinträchtigte intellektuelle Fähigkeiten (z. B. Defizite bei der räumlichen Orientierung) bzw. Verhaltensanomalien (Hyperaktivität, Konzentrationsschwäche) sein (Ruggieri 1999; Krone und Kehrer-Sawatzki 2001; McClatchey 2007; Boyd et al. 2009).

Das *National Institute of Health* (NIH) entwickelte 1987 ein Diagnoseschema für NF1 (Tabelle 1), welches sieben Kriterien festlegt, von denen mindestens zwei zutreffen müssen, damit die Neurofibromatose Typ 1 diagnostiziert werden kann.

Tabelle 1: Diagnosekriterien der Neurofibromatose Typ 1

Mindestens zwei Kriterien müssen erfüllt sein, damit NF1 diagnostiziert werden kann (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001)

NIH-Kriterien der Neurofibromatose Typ 1	
a)	6 oder mehr Café-au-lait-Flecken mit einem maximalen Durchmesser von > 5 mm bei präpubertären und > 15 mm bei postpubertären Individuen
b)	2 oder mehr Neurofibrome beliebigen Typs oder 1 plexiformes Neurofibrom
c)	Gesprenkelte axilläre oder inguinale Hyperpigmentierung (<i>skinfold freckling</i>)
d)	1 Optikusgliom
e)	2 oder mehr Lisch-Knötchen (Irishamartome)
f)	Eine umschriebene Knochenläsion wie Keilbeinflügeldysplasie oder Auflockerung der langen Röhrenknochen (Rarefatio) mit oder ohne Pseudoarthrose
g)	1 Verwandter I. Grads mit NF1, den obigen Kriterien entsprechend

1990 wurde das NF1-Gen identifiziert und ein Jahr später dessen Genprodukt Neurofibromin (Gutmann 1998). Das große NF1-Gen (350 Kilobasen) liegt auf dem Chromosomen 17q11.2 (McClatchey 2007). Es hat eine der höchsten bekannten Mutationsraten des menschlichen Genoms (Valero et al. 2011). Der Grund dafür ist noch ungeklärt, möglicherweise liegt es an der Größe des Gens (McClatchey 2007). Patienten mit NF1-Gendefekt weisen eine heterozygote NF1-Genmutation in allen Körperzellen auf. Kommt es zum Verlust des zweiten Allels (*loss of heterozygosis*, LOH), verliert Neurofibromin seine Funktion und das Risiko der Tumorentstehung steigt bis zu einer Penetranz von 100% an (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001; Panteliadis et al. 2009; Gottfried et al. 2010). Eine große Anzahl von Studien hat bisher die Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp nicht herstellen können. Zur Tumorgenese von peripheren Nervenscheidentumoren und deren maligner Progression zum malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST) gibt es jedoch bereits eine Vielzahl von Daten.

Das Genprodukt Neurofibromin hat eine Größe von 220-289 kDa (McClatchey 2007). Es ist ein Tumorsuppressor, der in vielen Zellen exprimiert wird, vor allem jedoch in Neuronen, Glia- und Schwann-Zellen und während der frühen Melanozytenentwicklung. Es besitzt eine homologe Region mit den negativen Regulatoren der Ras-Proteine und reguliert somit die Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Boyd et al. 2009). Auf die Einzelheiten dieses Signalweges wird unter 2.4.2.5 weiter eingegangen.

Studien haben weitere Funktionen für Neurofibromin aufgezeigt. So hat ein Neurofibrominverlust Auswirkungen auf den cAMP-Spiegel in Schwann-Zellen (Kim et al. 2001; Dang und DeVries 2011) und Astrozyten (Dasgupta et al. 2003) sowie auf den Kalziumstoffwechsel (Korkiamäki et al. 2002; Carroll 2012).

Man ist sich jedoch darüber einig, dass eine Aktivierung von Ras-Proteinen infolge von Neurofibrominverlust nicht ausreichend für die Entstehung von peripheren Nervenscheidentumoren ist (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass mehrere aufeinanderfolgende Mutationsergebnisse dafür verantwortlich sind (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Eine Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine Rb1 und p53 sowie die vermehrte Expression von Wachstumsrezeptoren (u. a. der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor) unterstützen z. B. die Tumormalignisierung zum malignen peripheren Nervenscheidentumor (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001).

Ein besseres Verständnis der Pathomechanismen von NF1 ist daher wichtig für die Eröffnung neuer therapeutischer Möglichkeiten.

Periphere Nervenscheidentumore sind eines der Hauptmerkmale der Neurofibromatose Typ 1. Es sind vorrangig gutartige Nervenscheidentumore, die aus Schwann-Zellen, Perineurialzellen und Fibroblasten bestehen. Reste von Nervenfasern sind oft enthalten (Scheithauer et al. 1999a). Man teilt sie nach Wachstumsmuster und Lokalisierung in verschiedene Subtypen ein, jedoch gibt es keine einheitliche Klassifikation. In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über die in der Literatur gängigste Einteilung gegeben, ergänzt durch einen weiteren für uns relevanten Subtyp (2.1.4).

2.1.1 Dermales/kutanes Neurofibrom

Kutane Neurofibrome (KNF) sind die am häufigsten vorkommenden Tumore bei der Neurofibromatose Typ 1, können aber auch sporadisch vorkommen (Ruggieri 1999; Scheithauer et al. 1999a; Rodriguez et al. 2012a; Kumar et al. 2015b). Sie treten solitär oder multipel in der Dermis und Subcutis überall am Körper auf. Sie sind weich, leicht erhaben, nodulär oder polypoid, in der Regel schmerzlos und wachsen langsam (Scheithauer et al. 1999a). Häufig treten sie erst in der Pubertät auf und ihr Wachstumsverhalten kann zwischen schnellem Wachstum, z. B. während einer Schwangerschaft, und Perioden relativer Ruhe abwechseln (Ruggieri 1999). Sie entarten nicht und bleiben gutartig (Carroll 2012). Eine Resektion wird aus kosmetischen Gründen durchgeführt, kann aber auf Grund ihrer Vielzahl problematisch bis unmöglich sein.

Über den Ursprung kutaner Neurofibrome gibt es verschiedene Theorien. Lange wurde davon ausgegangen, dass sie aus den Nervenendigungen in der Haut entstehen. Jedoch sind sie i. d. R. nicht mit einem Nerven assoziiert, oder der Ursprung aus diesem Nerven kann nicht eindeutig bewiesen werden (Carroll 2012). Eine neue Hypothese besagt, dass KNF aus *Skin-derived-Precursors* entstehen. Das sind multipotente Vorläuferzellen der

Neuralleiste, die sich entweder zu Schwann-Zellen oder Melanozyten entwickeln können und in Haarfollikeln vorkommen (Carroll 2012).

Histologisch sind die kutanen Neurofibrome häufig von der umgebenden Epidermis relativ scharf abgegrenzt (Grenzregion), ohne dass jedoch eine richtige Tumorkapsel vorkommt (Abb. 1); (Kumar et al. 2015b). Die Zellularität ist relativ gering (Kumar et al. 2015b). Die Tumorzellen sind überwiegend in kurzen gewellten Bündeln angeordnete. Die gestreckten spindelförmigen Kerne sind von Kollagen mit einem variablen Anteil myxoider Matrix umgeben (Scheithauer et al. 2007).

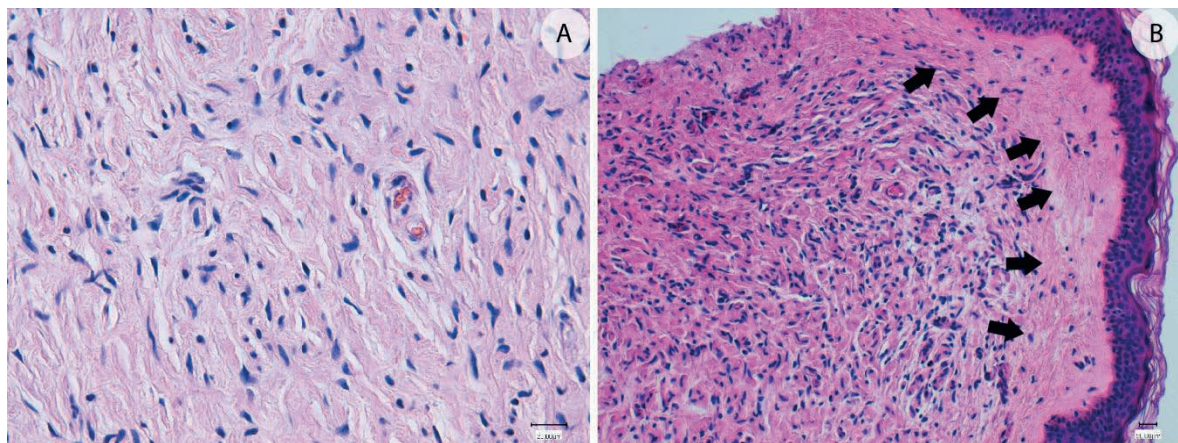


Abb. 1: Kutanen Neurofibrom, H. E.

A: Spindelzellen in myxoider Matrix, Patient 85; **B:** Grenzregion (schwarze Pfeile), Patient 462/2

2.1.2 Plexiformes Neurofibrom

Plexiforme Neurofibrome (PNF) treten bei 25-30% der NF1-Patienten auf (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001) und sind hoch charakteristisch für die Neurofibromatose Typ 1 (Scheithauer et al. 1999a; Love et al. 2008). Sie sind häufig kongenital vorhanden oder entstehen in der Kindheit. PNF liegen intraneural, entstehen aus peripheren Nerven (Carroll 2012; Kumar et al. 2015b) und wachsen in Nervenfaszikeln unter der Haut oder tief im Körper. Darüber hinaus können auch Organe Entstehungsorte der PNF sein. Prädispositionsstellen sind die große Nerven des Rumpfes, der Extremitäten und des Kopfes (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Aufgrund ihrer teilweise unregelmäßigen Begrenzung und der Vielzahl betroffener Nerven („*bag of worms*“, Scheithauer et al. 1999a; Kumar et al. 2015b) kann die radikale chirurgische Exzision schwierig sein und wiederholte Eingriffe erfordern (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Plexiforme Neurofibrome können entarten und sich zu malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) entwickeln. Das Entstehungsrisiko von MPNST bei NF1-Patienten liegt bei 8-12% (Boyd et al. 2009). Anzeichen für eine Entartung können anhaltende Schmerzen oder ein plötzliches schnelles Wachstum der Tumoren sein (Boyd et al. 2009).

Histologisch erkennt man PNF an ihrem deutlich intrafaszikulären Wachstum. Das Perineurium ist noch intakt und umgibt die aufgeblähten Nervenfaszikel (Abb. 2). Der Tumor ist zellarm, auch wenn die Zelldichte variieren kann. In einer myxoiden Matrix befinden sich wellige spindelförmige Nuclei und ein variabler Anteil von Kollagenbündeln (Scheithauer et al. 1999a; Love et al. 2008).

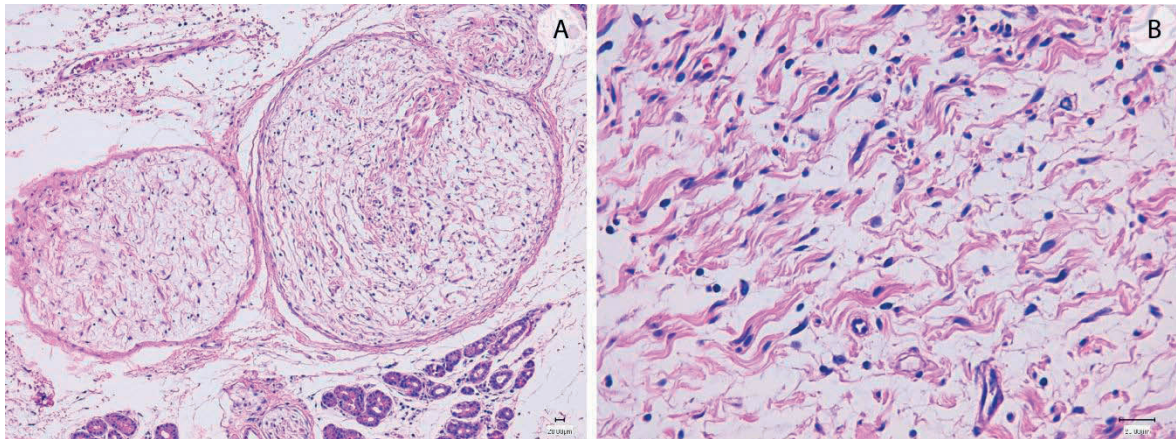


Abb. 2: Plexiformes Neurofibrom, H. E.

A: Aufgeblähte Nervenfaszikel, Patient 695; **B:** Hypozellularität und spindelförmige, wellige Zellen, Patient 695

2.1.3 Diffuses Neurofibrom

Das diffuse Neurofibrom (DNF) bildet plaqueartige Verdickungen in der Dermis und Subkutis, i. d. R. an Kopf und Nacken (Scheithauer et al. 1999a). Zum Teil können Reste von Perineurium vorhanden sein. Dieser Subtyp bleibt, trotz seines invasiven Verhaltens, gutartig (Scheithauer et al. 1999a).

Histologisch zeigen sich ausgedehnte plaqueartige Tumorzellinfiltrate in der Dermis und Subkutis (Kumar et al. 2015b). Der Tumor zerstört dabei nicht die Hautstrukturen, sondern umspannt die Adnexen und breitet sich an subkutanen Strukturen entlang bis in das Fettgewebe und die Skelettmuskulatur aus (Scheithauer et al. 1999a; Kumar et al. 2015b); (Abb. 3). Als Besonderheit können Pseudo-Meissner-Körperchen auftreten (Abb. 3 D); (Kumar et al. 2015b). Diese sind kugelige, ballenförmige Strukturen, die S100-Protein exprimieren und deren Rand durch das epitheliale Membranantigen (EMA) angefärbt wird. Sie haben keine Funktion, ähneln aber von ihrem Erscheinungsbild den Mechanorezeptoren der Haut (Scheithauer et al. 1999a).

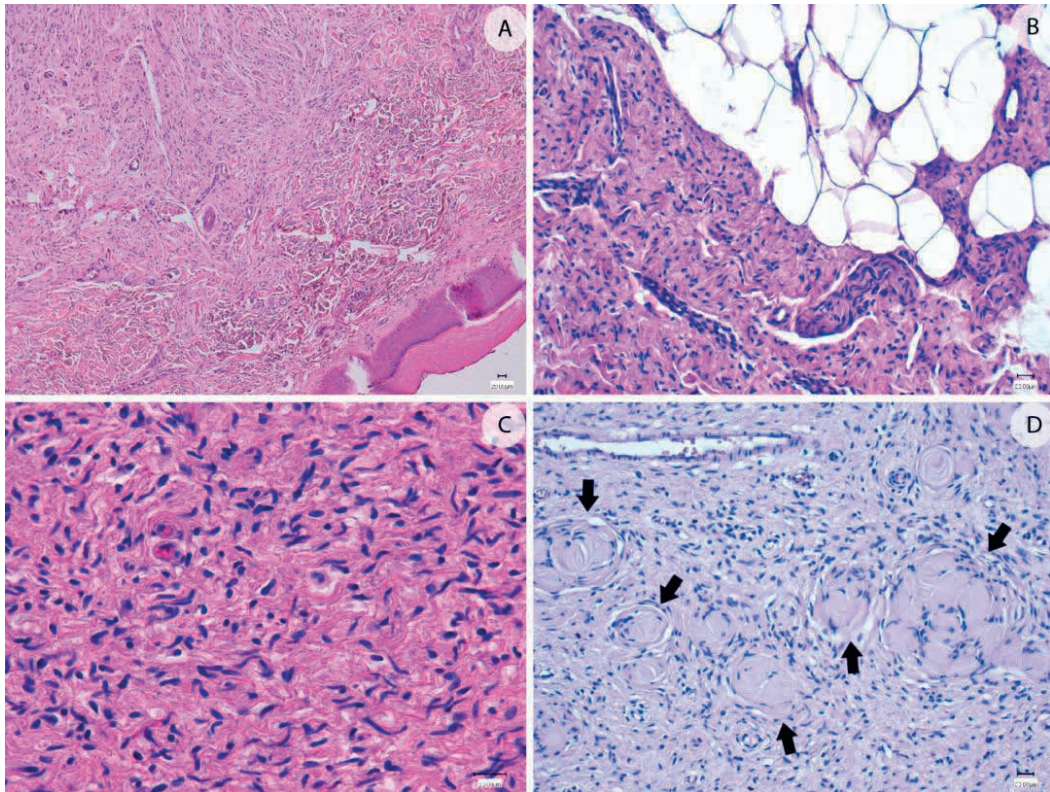


Abb. 3: Diffuses Neurofibrom, H. E.

A: Tumorinfiltration in die Haut, Patient 536; **B:** Tumorinfiltration in das Fettgewebe, Patient 95;
C: Tumorzellen, Patient 455; **D:** Pseudo-Meissner-Körperchen (schwarze Pfeile), 610/2

2.1.4 Plexiform-diffuses Neurofibrom

Plexiform-diffuse Neurofibrome (DPNF) werden in der bestehenden Literatur nicht von den diffusen Neurofibromen unterschieden. Im dem Institut für Neuropathologie des UKE wird diese Entität hingegen als eigenständiger Subtyp angesehen (Hagel, persönliche Mitteilung 2013). DPNF zeichnen sich histologisch durch Reste von Nervenfaszikeln und Tumorzellen im umliegenden Gewebe aus. Das Perineurium ist zwar sichtbar, jedoch an mindestens einer Stelle nicht mehr intakt (Abb. 4). Der Zellgehalt in den Faszikeln ist höher als bei plexiformen Neurofibromen, liegt aber immer noch unter dem der Umgebung und dem der diffusen Neurofibrome. Es zeigt sich das Bild eines rupturierten Nervenfaszikels, von dem aus spindelförmige Zellen das umliegende Gewebe infiltrieren (Abb. 4).

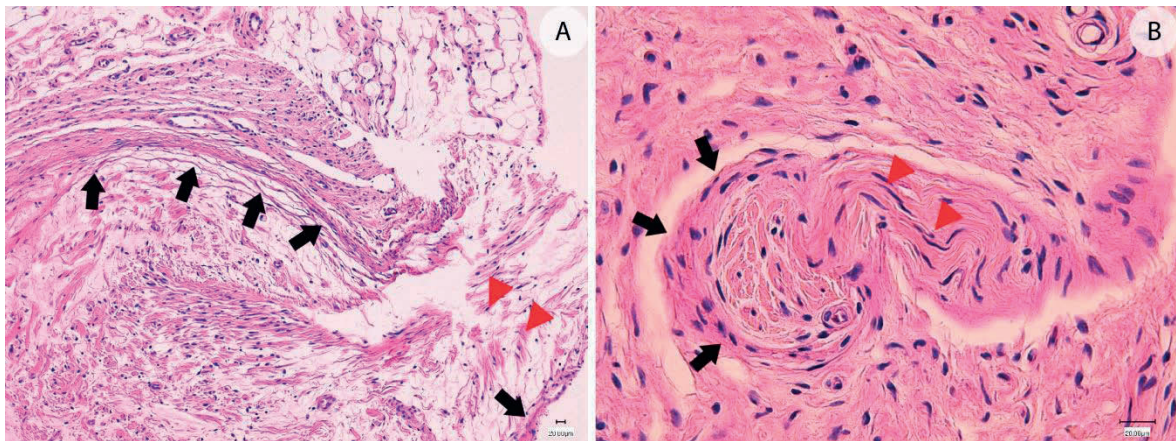


Abb. 4: Plexiform-diffuses Neurofibrom, H. E.

A, B: Nervenfaszikel mit defektem Perineurium (rote Pfeile) und mit teilweise noch intaktem Perineurium (schwarze Pfeile), Patient 78 (A); Patient 370 (B)

Dieser Subtyp ist insofern interessant, als das das Ausbrechen eines Tumors aus einer Kapsel i. d. R. ein Malignitätskriterium darstellt. Bei dem Plexiform-diffusen Neurofibrom ist das jedoch nicht der Fall.

2.1.5 Maligner peripherer Nervenscheidentumor

Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) haben einen Anteil von ca. 5-10% an den Weichteilsarkomen des Menschen (Weiss und Goldblum 2001). 50% der MPNST entstehen bei NF1-Patienten (Scheithauer et al. 1999b), 50% sporadisch (Zou et al. 2009). Sporadische und NF1-assoziierte MPNST ähneln sich stark, auch wenn in Studien unterschiedliche Tendenzen aufgedeckt werden konnten (Zou et al. 2009; Barnard et al. 2011). MPNST sind Neoplasien, die von peripheren Nerven oder anderen Zellen der Nervenscheide (Schwann-Zellen, Perineurialzellen, Fibroblasten) ausgehen (Weiss und Goldblum 2001). Die häufigsten Vorläufer der NF1-assoziierten MPNST sind plexiforme Neurofibrome (Rodriguez et al. 2012a), im Gegensatz zu den sporadische MPNST, die de novo in peripheren Nerven entstehen. Die bevorzugte Lokalisation beider MPNST-Typen sind die großen Nervenäste in den Extremitäten und dem Rumpf (Scheithauer et al. 1999b; Love et al. 2008; Zou et al. 2009; Panigrahi et al. 2013), auch wenn NF1-assoziierte MPNST etwas häufiger in den Extremitäten auftreten (Zou et al. 2009). MPNST entstehen im Erwachsenenalter, Patienten mit sporadischen MPNST sind durchschnittlich älter (Zou et al. 2009). MPNST sind hoch maligne und metastasieren schnell in Lunge, Knochen und Gehirn (Scheithauer et al. 1999b). Strahlen- und Chemotherapie haben keine oder wenig Auswirkungen auf das Langzeitüberleben (Ferner und Gutmann 2002; Ferner und O'Doherty 2002). Daher ist eine Resektion des Tumors mit weiten Grenzen die Therapieoption der Wahl (Eckert et al. 2009). Die Prognose ist allerdings ungünstig, da die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei 40-68% liegt (Scheithauer et al. 1999b). In

einer Studie von Ferrari et al. wurde die 5-Jahres-Überlebensrate bei MPNST-Patienten mit 19-28% angegeben (Ferrari et al. 2007).

Histomorphologisch sind MPNST hochzelluläre, invasiv wachsende spindelzellige Proliferationen. Die Kerne sind hyperchromatisch und weisen eine hohe mitotische Aktivität auf (Scheithauer et al. 1999b); (Abb. 5). Nekrosezonen können vorkommen (Kumar et al. 2015b). Die meisten MPNST sind hochgradig maligne. Nur 15% werden als geringgradig maligne eingestuft (Scheithauer et al. 1999b).

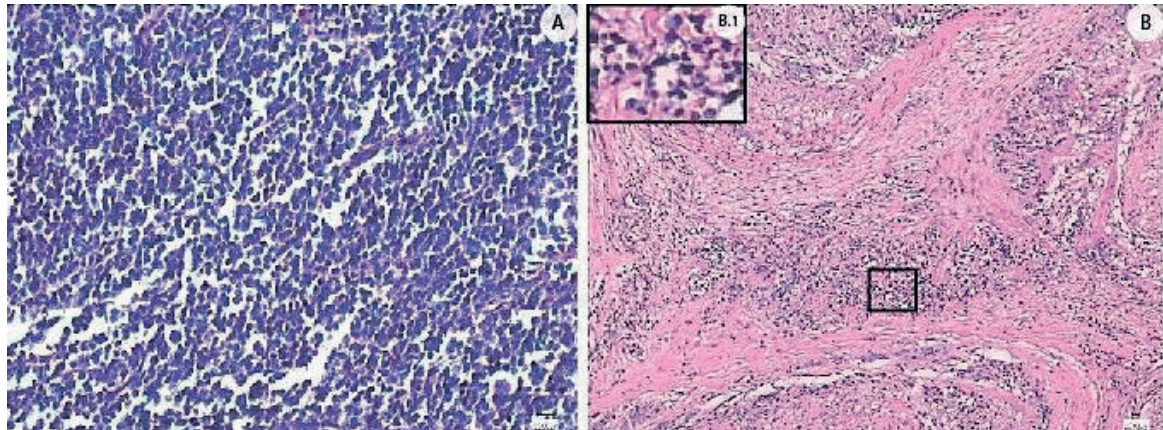


Abb. 5: Maligner peripherer Nervenscheidentumor, H. E.

A: Hochzellulärer Tumor, hyperchromatische Zellkerne, Patient 1016; **B:** Invasiv wachsender Tumor, Patient 1008; **B.1:** Insert von B, positive Tumorzellen, ursprüngliche Vergrößerung 10x

Ein besonderes Phänomen in MPNST ist die so genannte divergente Differenzierung, bei der Zellen in einzelnen Arealen eine glanduläre, osseäre oder rhabdomyolastische Morphologie zeigen (Kumar et al. 2015b). Letztere werden als Triton-Tumore bezeichnet (Kumar et al. 2015b).

Auf Grund der Tatsache, dass MPNST eine wenig eindeutige Morphologie aufweisen, ist ihre Identifikation teilweise schwierig. Hilfreich bei NF1-assoziierten MPNST ist ein Gentest, mit dem bei Patienten NF1 diagnostiziert werden kann. In dieser Studie wurden ausschließlich NF1-assoziierte MPNST untersucht.

Aufgrund der hohen Mortalität von NF1-Patienten durch MPNST kommt der Erforschung der Tumorentstehung und der malignen Transformation eine große Bedeutung zu. Ein Ansatz ist, verlässliche diagnostische Biomarker zu identifizieren, die für die Progression verantwortlich sind bzw. den Progress forcieren.

2.2 Periphere Nervenscheidentumore in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin existieren viele Fallberichte von peripheren Nervenscheidentumoren (Brower et al. 2005; Sugiyama et al. 2008; Park et al. 2011; Tavasoly et al. 2013). Ihre diagnostischen Kriterien, die Histogenese, Subklassifikation

und immunhistochemischen Eigenschaften sind bisher jedoch weniger erforscht (Suzuki et al. 2013) als die der humanen peripheren Nervenscheidentumore.

Hauck gibt den Anteil von caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren (cMPNST) an den Neoplasien der Haut beim Hund mit 4,3% an (Hauck 2013). Auf das Buch *Small Animal Clinical Oncology*, (Withrow et al. 2007) verweisen verschiedene Studien (Park et al. 2011; Tavasoly et al. 2013). Dort ist der Anteil von cMPNST an den Nerventumoren des Hundes jedoch mit 28% angegeben (LeCouteur und Withrow 2007).

Die Gründe für die wenigen verfügbaren Angaben über die Häufigkeit von peripheren Nervenscheidentumoren (PNST) in der Tiermedizin liegen u. a. in der unklaren Klassifikation und schweren Diagnostizierbarkeit dieser Tumorentität beim Tier. Auch die 1999 veröffentlichte WHO-Klassifikation weist auf die ungeklärte Definition, Histogenese und Beziehung dieser Entität zu anderen Weichteilsarkomen hin (Koestner et al. 1999). In den letzten 15 Jahren haben sich dennoch die einheitlichen Begriffe benigner peripherer Nervenscheidentumor (BPNST) und maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST) etablieren können (Koestner und Higgins 2002; McGavin und Zachary 2007; Jubb et al. 2008b; Vandeveldel et al. 2012). Bisher gibt es jedoch keine Studien, die die Assoziation der histomorphologischen Eigenschaften von BPNST und MPNST mit ihrem biologischen Verhalten bestätigen (Dennis et al. 2011).

Unter dem Begriff der benignen peripheren Nervenscheidentumore werden in der Tiermedizin Schwannome, Neurofibrome (Koestner et al. 1999) und Perineuriome (Vandeveldel et al. 2012) zusammengefasst. Die WHO beschreibt BPNST bei Hund und Katze als extrem selten (Koestner et al. 1999). Beim Rind treten vereinzelt multiple Tumore auf, die dem Krankheitsbild der Neurofibromatose am nächsten kommen (Koestner et al. 1999; Goldschmidt und Hendrick 2002). Beim Pferd kommen BPNST ebenfalls selten vor und das Augenlid ist als häufigste Lokalisation beschrieben (Goldschmidt und Hendrick 2002).

Als maligne periphere Nervenscheidentumore werden in der Tiermedizin Tumore bezeichnet, die aus Bestandteilen der Nervenscheide entstehen und ein invasives und aggressives Verhalten zeigen (McGavin und Zachary 2007; Vandeveldel et al. 2012). Sie treten am häufigsten beim Hund auf (Koestner et al. 1999). Bevorzugte Lokalisation sind der Brachial- und Lumbaosakralplexus (Kessler 2012), aber auch craniale Nerven (McGavin und Zachary 2007), Hautnerven (Goldschmidt und Hendrick 2002) oder sogar innere Organe wie die Leber (Park et al. 2011) können betroffen sein.

2.3 Periphere Nervenscheidentumore beim Hund

Unter dem Begriff caniner peripherer Nervenscheidentumor (cPNST) werden Neoplasien zusammengefasst, die aus einem oder mehreren der folgenden Zelltypen bestehen: Schwann-Zellen, Fibroblasten und Perineurialzellen (Koestner und Higgins 2002; Gaitero et al. 2008). Eine genetische Prädisposition, wie sie bei der Neurofibromatose Typ 1 beschrieben ist, existiert beim Hund nicht (Summers et al. 1995). cMPNST treten beim Hund häufiger auf als cBPNST (Koestner et al. 1999).

Canine periphere Nervenscheidentumore kommen bevorzugt bei großen Rassen mittleren Alters vor (Kessler 2012). Eine Rasse- oder Geschlechterprädisposition konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Gaitero et al. 2008). Das Verhalten der cPNST ähnelt dem anderer Weichteilsarkome: sie sind lokal invasiv, haben eine hohe Rezidivrate und metastasieren selten (Kessler 2012; Avallone et al. 2013), auch wenn beim caninen malignen peripheren Nervenscheidentumor (cMPNST) Lungen- und Lymphknotenmetastasen beschrieben sind (Gross et al. 2005). Symptome können sich in progressiver, intermittierender Lahmheit und Muskelatrophie äußern (Kessler 2012), wenn die Gliedmaßenplexus betroffen sind. Sind craniale Nerven befallen, treten Muskelatrophien und Sensibilitätsstörungen am Kopf auf (Summers et al. 1995). Zur Kompression von Rückenmark mit Hinterhandlahmheit (Kessler 2012) oder des Gehirns (Summers et al. 1995) kann es kommen, wenn der Tumor durch Foramina invadiert. Häufig geht er jedoch von Hautnerven aus, so dass umschriebene kutane Knoten entstehen (Gross et al. 2005).

Die Resektion des Tumors ist die Therapiemethode der Wahl (Goldschmidt und Hendrick 2002). Eine Amputation der Gliedmaße kann dabei nötig werden (Kessler 2012), außerdem ist die Gefahr eines Rezidivs relativ hoch (Goldschmidt und Hendrick 2002; Jubb et al. 2008a). Die Überlebenszeit nach Resektion wird mit zwei Monaten bis zwei Jahren angegeben (Kessler 2012).

In der Histologie unterscheidet man zwischen dem caninen benignen und malignen PNST, auch wenn eine eindeutige Unterscheidung nicht immer möglich ist.

cBPNST ähneln histologisch den Schwannomen und Neurofibromen des Menschen (Koestner et al. 1999; Vandeveldel et al. 2012). Es sind gut umschriebene, von einer Kapsel umgebene Tumore, die sowohl in spinalen und cranialen Nerven, als auch in der Haut vorkommen können (Koestner et al. 1999; Goldschmidt und Hendrick 2002; Vandeveldel et al. 2012). Sie bestehen aus Bündeln spindelförmiger Zellen, die sich überlagern, Wirbel und teilweise fischgrätenartige Muster bilden (sog. Antoni A-Muster). Die Kerne sind ovoid bis länglich und der Anteil an extrazellulärem Kollagen kann

variieren. Seltener kommen Bereiche mit wenigen plumpen oder sternförmigen Zellen und einem großen Anteil extrazellulärer Matrix vor (sog. Antoni B-Muster); (Vandevelde et al. 2012). Die Zellularität der cBP NST ist gering und der Mitoseindex kann variieren, ist aber normalerweise niedrig bis moderat (Goldschmidt und Hendrick 2002).

cMP NST verhalten sich histologisch deutlich bösartiger als cBP NST. Sie haben keine Kapsel und invadieren z. T. aggressiv das umliegende Gewebe (Koestner und Higgins 2002). Sie kommen ebenfalls sowohl in der Haut als auch in spinalen, seltener in cranialen Nerven vor (McGavin und Zachary 2007). Die Tumorzellen zeigen anaplastische Differenzierungen (Koestner und Higgins 2002), sind pleomorph, plump bis spindelzellig und können z. T. rhabdomyoblastische, chondrale und ossäre Differenzierungen aufweisen (Summers et al. 1995; Koestner et al. 1999). Die Tendenz Bündeln, Wirbeln und Palisaden zu bilden, nimmt ab (Jubb et al. 2008a). Fingerartige Proliferationen wachsen entlang von Faszikeln und Nerven und sind für die häufige Rekurrenz verantwortlich (Gross et al. 2005). Die Zellularität der cMP NST ist erhöht, Nekrosen treten auf (Summers et al. 1995) und es zeigen sich vermehrt Mitosefiguren (Gross et al. 2005; Jubb et al. 2008a).

Die Immunhistochemie der caninen peripheren Nervenscheidentumore ist unspezifisch und zeigt bei cBP NST und cMP NST dasselbe Bild (Koestner et al. 1999; Gross et al. 2005). Die Tumore sind in der Regel positiv für Vimentin (Koestner et al. 1999; Gross et al. 2005), welches ein Marker für alle mesenchymalen Neoplasien ist. Die Expression von neuronalen Markern wie dem S100-Protein, sauren Gliafaserprotein (GFAP), der Neuronen spezifischer Enolase (NSE) und dem Nervenwachstumsfaktor (NGFR) kann variieren. In der Literatur ist beschrieben, dass 45-100% der cPNST das S100-Protein, 0-67% GFAP, 45-100% NSE und 70% den NGFR exprimieren (Chijiwa et al. 2004; Gaitero et al. 2008; Schöniger und Summers 2009; Suzuki et al. 2013; Jakab et al. 2012). Ein weiterer neuerer Marker, Periaxin, wird zu 40% in cMP NST exprimiert (Suzuki et al. 2013).

Als Differentialdiagnose für cPNST kommen verschiedene Spindelzelltumore in Frage. Vor allem die Abgrenzung zum Fibrosarkom und Hämangioperizytom, welches seit neustem von einigen Autoren zur Gruppe der perivaskulären Wandtumore gezählt wird, kann schwierig sein (Jubb et al. 2008a).

Fibrosarkome sind bösartige Tumore ausgehend von Fibroblasten, die häufig bei Hund und Katze vorkommen (Jubb et al. 2008a). Sie bestehen aus plumpen Spindelzellen, die in verwobenen Faszikeln angeordnet sind, ohne ein konzentrisches oder perivaskuläres Wachstumsmuster mit Wirbeln oder Palisaden zu zeigen (Gross et al. 2005; Klopffleisch et

al. 2013). Sie rekurren häufig und können metastasieren (Jubb et al. 2008a). Immunhistologisch sind sie Vimentin positiv, können aber auch S100 und α -SMA (*α -smooth muscle actin*) exprimieren (Jubb et al. 2008a; Klopffleisch et al. 2013).

Hämangioperizytome sind in der aktuellen WHO-Klassifikation als Tumore unbekannter Histogenese beschrieben (Hendrick 1998). Der Ursprung aus Perizyten, der beim Menschen durch Elektronenmikroskopie bestätigt wurde, ist beim Hund noch ungeklärt (Perez et al. 1996). Es gibt eine kontroverse Diskussion ob Hämangioperizytome als separate Entität oder als Subgruppe der perivaskulären Wandtumore anzusehen sind (Avallone et al. 2007; Dennis et al. 2011; Klopffleisch et al. 2013; Suzuki et al. 2013). Perivaskuläre Wandtumore sind definiert als Neoplasien, die abgesehen von der inneren Endothelschicht von den verschiedenen zellulären Bestandteilen der Gefäßwand (subendotheliale Zellen, Basalmembran, glatte Muskelzellen, Adventitia) abstammen (Weiss und Goldblum 2001; Avallone et al. 2007).

Canine Hämangioperizytome (cHP) kommen normalerweise in der Dermis und Subkutis der Extremitäten älterer Hunde vor (Jubb et al. 2008a). Histologisch sind es Spindelzellneoplasien, deren charakteristischstes Wachstumsmuster konzentrische Wirbel um zentrale Gefäße, sog. „*fingerprint*“, ist (Perez et al. 1996; Jubb et al. 2008a). Die Zellen können in kurzen verknoteten Bündeln, radspeichenartig oder als Palisaden angeordnet sein und myxoide Bereiche können vorkommen (Perez et al. 1996). cHP exprimieren Vimentin, häufig Aktin (α -SMA), manchmal S100 und selten Desmin (Jubb et al. 2008a; Avallone et al. 2007). Sie metastasieren selten, neigen aber zur Rekursion und es ist beschrieben, dass sie mit jedem erneuten Auftreten bösartiger werden (Perez et al. 1996; Koestner et al. 1999).

2.4 Immunologische Expressionsproteine

Im Folgenden wird auf die verschiedenen Immunmarker eingegangen, die in dieser Studie getestet wurden. Dabei wird zuerst auf den Marker selbst eingegangen, dann auf seine Expression und Funktion in humanen PNST und am Ende auf seine Rolle bei caninen PNST.

2.4.1 Expressionsmuster peripherer Nervenscheidentumore

Periphere Nervenscheidentumore, exklusiv der Schwannome, werden sowohl in der Human- als auch Tiermedizin als zusammengesetzte Tumore (Schwann-Zellen, Perineurialzellen und Fibroblasten) beschrieben (Scheithauer et al. 1999a; Koestner und Higgins 2002). Wie hoch der jeweilige Anteil der verschiedenen Zelltypen an der Tumorgesamtzellzahl ist, sollte in dieser Studie untersucht und die Ergebnisse von

Mensch und Hund gegenüber gestellt werden. Die folgenden Immunmarker wurden jeweils von einem der zellulären Bestandteile der PNST exprimiert.

2.4.1.1 S100-Protein

Die Familie der S100-Proteine umfasst 24 verschiedene Subtypen, die in unterschiedlichen Zellen exprimiert werden (Donato et al. 2013). Sie binden Kalzium und übernehmen vielfältige Aufgaben in der Regulierung extra- und intrazellulärer Prozesse wie der Phosphorylierung von Proteinen, Enzymaktivität und der Funktion von Zytoskelettbestandteilen (Donato et al. 2013). Die jeweiligen S100-Untertypen werden zellspezifisch exprimiert (Donato 2001) und eignen sich daher zur Diagnostik von Zelltypen, wie z. B. den Astrozyten, Schwann-Zellen und Melanozyten (Donato et al. 2013). Diese exprimieren S100 und daher wird ein Antikörper gegen das S100-Protein u. a. als Schwann-Zellmarker in der Tumordiagnostik eingesetzt (Scheithauer et al. 1999b). In allen humanen benignen peripheren Nervenscheidentumoren exprimiert ein variabler Anteil von Tumorzellen S100 (Scheithauer et al. 1999a, S. 190). Bei den humanen MPNST exprimieren nur 50-70% der Tumore S100 (Louis et al. 2007). Das S100-Protein ist somit ein sensibler Marker bei humanen Nervenscheidentumoren (Scheithauer et al. 1999b).

In der Veterinärmedizin wird S100 ebenfalls als Marker zur Diagnose peripherer Nervenscheidentumore verwendet (Jubb et al. 2008b). 45-83% der gut- und bösartigen Tumore beim Hund exprimieren S100 (Chijiwa et al. 2004; Gaitero et al. 2008; Schöninger und Summers 2009).

2.4.1.2 Epitheliales Membranantigen

Das Epitheliale Membranantigen (EMA oder MUC1) ist ein Glykoprotein, welches an der Oberfläche von vielen epithelialen Zellen vorkommt (Miettinen 2014). Es wird als Immunmarker für verschiedene Karzinome genutzt, sowie um epitheliale Differenzierungen von Weichteiltumoren nachzuweisen (Miettinen 2014). Darüber hinaus wird es als Screening-Marker für Perineuriome eingesetzt, da EMA auch von Perineurialzellen exprimiert wird (Miettinen 2014).

Im Gegensatz zu Perineuriomen enthalten humane Neurofibrome nur wenige EMA-positive Zellen. In den plexiformen Subtypen zeigen Reste des Perineuriums eine EMA-Expression (Louis et al. 2007). Unter dem Elektronenmikroskop können bei humanen peripheren Nervenscheidentumoren perineurialzell-ähnliche Zellen identifiziert werden, denen bisher jedoch noch keine Reaktivität mit EMA nachgewiesen werden konnte (Scheithauer et al. 1999a).

Laut Literatur gibt es zurzeit keinen EMA-Antikörper, der mit Hundegewebe reagiert (Ramos-Vara et al. 2010). Es gibt jedoch einen Fallbericht eines caninen Synovialsarkoms, bei dem im Tumorgewebe eine EMA-Expression detektiert wurde (Loukopoulos et al. 2004). Ein anderer möglicher Marker für Perineurialzellen beim Hund ist Claudin-1, der im nächsten Abschnitt besprochen wird.

2.4.1.3 Claudin-1

Claudine sind integrale Membranproteine, die einen wichtigen Bestandteil von tight junctions darstellen (Folpe et al. 2002). Ihre Expression ist auf Zellen limitiert, die tight junctions bilden wie Epithel-, Endothel- und Perineurialzellen (Folpe et al. 2002). Folpe et al. (2002) entdeckten die starke Expression von Claudin-1 (Cl1) in Perineurialzellen von normalen humanen Nerven. Sie untersuchten daraufhin die Expression von Claudin-1 in humanen mesenchymalen Neoplasien (Folpe et al. 2002) und fanden eine Präsenz dieses Proteins in 92% der Perineuriome und in 66% der Neurofibrome (Folpe et al. 2002). Auch MPNST zeigten Cl1-Expression, das genaue Verhältnis wurde allerdings in der Studie von Folpe et al (2002) nicht veröffentlicht. Folpe et al. bewerten Claudin-1 daher als gleich sensitiven Marker für Perineurialzellen wie EMA.

Perineurialzellen von Hundennerven exprimieren ebenfalls Cl1 (Jakab et al. 2012). In der Tiermedizin wurde Claudin-1 das erste Mal von Cornelis et al. (2009) zur Diagnose eines Perineurioms beim Hund verwendet. Jakab et al. (2012) untersuchten die Expression von Cl1 in peripheren Nervenscheidentumoren, Perineuriomen und Hämangioperizytomen des Hundes. Neurofibrome (als Teilgruppe der cBPNST), cMPNST und Perineuriome zeigten alle zu 100% eine positive Färbung (Jakab et al. 2012). Suzuki et al. (2013) bestätigen diese Ergebnisse in Perineurialzellen von Hundennerven. Dort zeigten die untersuchten cMPNST jedoch nur zu 70% eine positive Färbung für Cl1 (Suzuki et al. 2013).

2.4.1.4 CD90

CD90 (Thy-1) ist ein Zelloberflächenprotein, welches auf vielen verschiedenen Zellen wie Fibroblasten, Neuronen, Blutstammzellen und Endothelien vorkommt (Leyton und Hagood 2014). Es ist ein wichtiger Regulator in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und übernimmt verschiedenste Funktionen, u. a. in der T-Zell-Aktivierung (Barboni et al. 1991), dem Neuritenwachstum, der Fibroblastenproliferation und Migration (Rege und Hagood 2006). CD90-Homologe sind in verschiedenen Spezies beschrieben worden, u. a. auch beim Hund (McKenzie und Fabre 1981; Williams und Gagnon 1982).

In der Veterinärmedizin wird CD90 als Immunmarker bei der Diagnose von histiozytären Erkrankungen (Moore 2014) und Lymphomen (Reggeti und Bienzle 2011) eingesetzt.

2.4.1.5 Mastzelltryptase

Tryptasen sind Enzyme, die in großen Mengen in Mastzellen enthalten sind (Vanderslice et al. 1990). Die Mastzelltryptase ist in der Granula von Mastzellen zu finden und reguliert u. a. den Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (Berger et al. 2001). Darüber hinaus ist sie ein potenter Wachstumsfaktor von Epithelzellen und Fibroblasten (Cairns und Walls 1996, 1997). In der Immunhistochemie wird sie als spezifischer Marker für Mastzellen eingesetzt (Vanderslice et al. 1990).

In peripheren Nervenscheidentumoren ist die Existenz von Mastzellen schon lange beschrieben (Yang et al. 2008; Staser et al. 2012). Verschiedene Autoren sehen sie als potentielle Promotoren der Tumorentstehung an (Yang et al. 2008; Carroll 2012). Es wird vermutet, dass Mastzellen über die Sekretion diverser Zytokine und Mitogene die Tumorexpansion, Invasion und Metastasierung vorantreiben (Staser et al. 2012). In verschiedenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass Mastzellen einerseits die Tumorentstehung fördern, andererseits eine Inhibition des Tyrosinkinase Kit (c-Kit) Rezeptors, der viele Aspekte der Mastzellaktivität kontrolliert, zu einer Reduktion des Tumorwachstums bei Nervenscheidentumoren führt (Zhu et al. 2002; Yang et al. 2008).

Bei Hunden werden Mastzellen vorrangig durch einen Antikörper gegen die Tyrosinkinase Kit (c-Kit) nachgewiesen (Ozaki et al. 2002; Kawarai et al. 2010). c-Kit ist ein Transmembranprotein, das durch den Stammzellfaktor aktiviert wird und essentiell für die Entwicklung, das Wachstum und Überleben von Mastzellen ist (Kawarai et al. 2010). Seine Rolle in der Pathogenese von caninen Mastzelltumoren wird diskutiert (Webster et al. 2006). Ozaki et al. (2002) wiesen die Expression von Mastzelltryptase und c-Kit in Mastzelltumoren des Duodenums beim Hund nach (Ozaki et al. 2002).

2.4.1.6 Neurofilament

Neurofilamente sind die wichtigsten Intermediärfilamente in Neuronen und deren Axonen (Perrot et al. 2008). Sie sind für die Stabilität des Zytoskeletts und des Axondurchmessers verantwortlich (Perrot et al. 2008). Da Neurofilamente ausschließlich in neuronalen Zellen vorkommen, sind sie potente Marker zur Kennzeichnung von Schäden in Neuronen und Axonen (Petzold 2005).

In humanen Neurofibromen, v. a. im plexiformen Subtyp, kommen Neurofilament-positive Axone vor (Louis et al. 2007).

Suzuki et al. (2013) zeigten, dass Axone in normalen Hundennerven ebenfalls Neurofilament exprimieren.

2.4.2 Faktoren des Tumorwachstums

2.4.2.1 Die acht Kennzeichen der Tumorentstehung

Die Tumorentstehung ist ein komplexer Prozess, bei dem viele verschiedene Mechanismen zusammenwirken. Im Folgenden wird eine Übersicht der Tumorentstehungsmechanismen nach Kumar et al. (2015a) gegeben und es werden die weiteren in dieser Arbeit untersuchten Immunmarker den beschriebenen Mechanismen zugeteilt.

Nach Kumar et al. (2015a) kommt es in der Zellphysiologie von Tumorzellen zu acht fundamentalen Veränderungen, die kennzeichnend für die Tumorentstehung sind (Abb. 6).

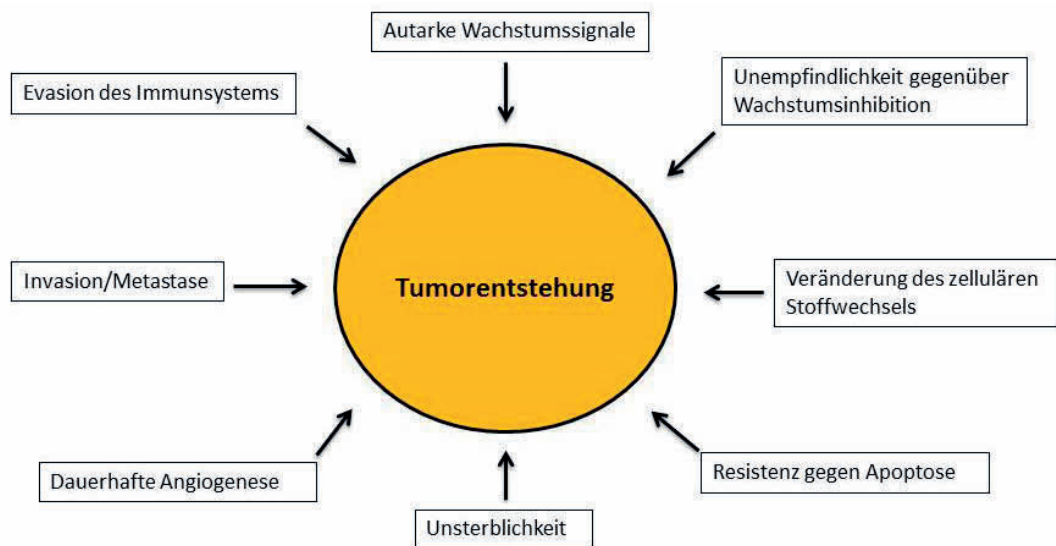


Abb. 6: Die 8 Kennzeichen der Tumorentstehung, modifiziert nach Kumar et al. (2015a)

Ein wichtiger Punkt sind unabhängige Wachstumssignale (sog. Onkogene), die es den Tumorzellen ermöglichen ohne externe Stimuli zu proliferieren (Kumar et al. 2015a). Onkogene entstehen durch Mutation aus Proto-Onkogenen und codieren für Onkoproteine, die über Signalkaskaden die Proliferation unterstützen (Kumar et al. 2015a). Viele Bestandteile von physiologischen Signalwegen agieren als Onkoproteine, wenn sie mutiert sind. Dazu gehören Wachstumsfaktoren (PDGF- β , TGF- α u. a.), Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor-Familie u. a.), Proteine die in die Signaltransduktion involviert sind (GTP-bindende Proteine, Ras-Signaltransduktion u. a.) und Transkriptionsfaktoren sowie Zellzyklus-Proteine (Kumar et al. 2015a). Durch eine Mutation sind diese Proteine durchgehend aktiv und es kommt zu einer autarken Proliferation (Kumar et al. 2015a). In dieser Arbeit wurden die folgenden Onkoproteine untersucht: Die Wachstumsrezeptoren ErbB-2, ErbB-3 und der Wachstumsfaktor NGR1,

Bestandteile des Ras-Signalweges (mTor, Rho, MEK1/2) und die Transkriptionsfaktoren Pax7 und Sox9.

Eine weitere Fähigkeit, die Tumorzellen auszeichnet, ist ihre Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibitorischen Signalen. In der physiologischen Zelle verhindern Tumorsuppressorgene und ihre Produkte eine ungehinderte Proliferation der Zelle (Kumar et al. 2015a). Kommt es zu einer Mutation der Tumorsuppressoren sind die Zellen nicht mehr responsiv gegenüber Molekülen, die die Proliferation inhibieren. In vielen genetisch vererbaren Syndromen kommt es zur Mutation von Tumorsuppressoren (Kumar et al. 2015a). Die Neurofibromatose Typ 1 und ihr Tumorsuppressor Neurofibromin sind ein Beispiel dafür. Die Mutation eines Allels des Tumorsuppressors wird vererbt, wodurch die Chance steigt, dass es zu einer Mutation des zweiten Allels kommt und ein Tumor entsteht (Kumar et al. 2015a).

Ein weiteres Phänomen, welches Tumorzellen auszeichnet ist die Veränderung der zellulären Energiegewinnung weg von der oxidativen Phosphorylierung hin zur Glykolyse (sog. Warburg-Effekt); (Kumar et al. 2015a). Durch die Glykolyse wird nicht nur Energie in Form von ATP gewonnen, sondern es werden auch metabolische Zwischenprodukte produziert, die für die Synthese zellulärer Bestandteile und die angestrebte Zellteilung essentiell sind (Kumar et al. 2015a). Diese metabolische Umstellung wird durch dieselben Onkogenen und Tumorsuppressoren vermittelt, die in Tumoren mutiert sind (Kumar et al. 2015a).

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein wichtiger carcinoprotektiver Mechanismus der gesunden Zelle (Kumar et al. 2015a). Sie wird in der physiologisch arbeitenden Zelle durch einen ex- und einen intrinsischen Weg eingeleitet (Kumar et al. 2015a). Im Falle von DNA-Schäden kann die Apoptose durch proapoptotische Faktoren induziert werden. In vielen Tumoren werden antiapoptotische Proteine vermehrt produziert, um dem programmierten Zelltod zu entgehen (Kumar et al. 2015a). In anderen Tumoren wird der Fas-Rezeptor vermindert exprimiert, der für die extrinsische Aktivierung der Apoptose zuständig ist (Kumar et al. 2015a).

Wenigstens einige Zellen in einem Tumor müssen stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen, damit sie die natürliche Seneszenz und die mitotische Krise umgehen können und somit unsterblich werden (Kumar et al. 2015a). Sie haben ein unlimitedes replikatorisches Potential, was ihnen einen Vorteil verschafft. Normale Zellen werden nach 60-70 Teilungen seneszent und können sich nicht mehr teilen (Kumar et al. 2015a). Passiert das nicht, treten sie in die sog. mitotische Krise ein, die vermutlich durch eine progressive Kürzung von Telomeren (DNA-Sequenzen am Ende der Chromosomen)

eingeleitet wird. Telomerasen verlängern Telomere und sind in Stammzellen und 85-95% der existierenden Tumore enthalten (Kumar et al. 2015a).

Die Vaskularisierung des Tumorgewebes ist essentiell für sein Wachstum. Ohne Gefäßversorgung können keine Nährstoffe und Sauerstoff zu den Zellen gebracht und der metabolische Abfall wegtransportiert werden (Kumar et al. 2015a). Die Angiogenese wird durch ein Gleichgewicht von pro- und antiangiogenetischen Faktoren gesteuert (Kumar et al. 2015a). Z. B. stimuliert Hypoxie die Transkription des proangiogenetischen Faktors *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Zum anderen induziert p53 als Tumorsuppressor die Synthese von angiogenetischen Inhibitoren wie Thrombospondin-1 (Kumar et al. 2015a).

Ein wichtiges Kennzeichen der Malignität ist die Invasion und Metastasierung einer Tumorzelle. Die Metastasierung ist ein hochkomplexer Prozess, in den viele Rezeptoren und Signalproteine involviert sind (Kumar et al. 2015a). Er läuft in vier Schritten ab: 1.) Die Tumorzelle verliert den Kontakt zu anderen Tumorzellen, 2.) die Tumorzelle dringt durch die Basalmembran und das Bindegewebe in das Gefäß- oder Lymphsystem ein, 3.) die Tumorzelle heftet sich an neue Bestandteile der extrazellulären Matrix und 4.) migriert schließlich in das umgebende Gewebe und vervielfältigt sich zu einem neuen Tumor (Kumar et al. 2015a). Um das Gefäßsystem wieder zu verlassen, muss es zu einer Adhäsion der Tumorzellen an das Endothelium kommen. Daran beteiligt sind verschiedene Adhäsionsmoleküle (Kumar et al. 2015a). Von besonderem Interesse ist das Adhäsionsmolekül CD44, welches in normalen T-Lymphozyten zur Migration genutzt wird. Dies geschieht, indem CD44 eine Verbindung mit dem auf vaskulärem Endothel befindlichen Hyaluron eingeht. Solide Tumoren exprimieren häufig CD44 und verstärken dadurch vermutlich ihre Ausbreitung (Kumar et al. 2015a). In dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil des Adhäsionsmoleküls CD44 in humanen peripheren Nervenscheidentumoren untersucht.

Als letztes Kennzeichen steht die Fähigkeit von Tumorzellen dem Immunsystem auszuweichen (Kumar et al. 2015a). Tumorzellen können von dem körpereigenen Immunsystem erkannt und zerstört werden (Kumar et al. 2015a). Die Mechanismen, mit denen Tumorzellen dem Immunsystem ausweichen sind noch nicht vollständig entschlüsselt (Kumar et al. 2015a). Mögliche Mechanismen sind eine selektive Produktion von Antigen-negativen Zellvarianten, der Verlust oder die reduzierte Expression von Histokompatibilitätsantigenen oder die Produktion von immunsupprimierenden Faktoren (z. B. TGF- β , PD-1 Ligand) durch die Tumorzellen (Kumar et al. 2015a).

Die acht oben beschriebenen Kennzeichen der Tumorentstehung werden durch eine genomische Instabilität und eine tumorbedingte Entzündung unterstützt (Kumar et al. 2015a).

Im Folgenden, wird auf in dieser Arbeit untersuchte Immunmarker eingegangen, die in Tumorzellen die Proliferation (ErbB-2, ErbB-3, NRG1, mTor, Rho, MEK1/2, Pax7, Sox9) und Metastasierung (CD44) forcieren.

2.4.2.2 Proliferationsmarker Ki-67

Das Ki-67-Protein ist ausschließlich in proliferierenden Körperzellen während der G1-, G2-, S-Phase und Mitose vorhanden (Scholzen und Gerdes 2000). Somit eignet sich ein Antikörper gegen dieses Protein, um den Anteil von proliferierenden Zellen zu bestimmen (Scholzen und Gerdes 2000). Aufgrund ihrer Eigenschaft werden Ki-67-Antikörper routinemäßig als diagnostische Werkzeuge zur Bestimmung des Proliferationsindex bei vielen verschiedenen Neoplasien eingesetzt (Scholzen und Gerdes 2000). Der Ki-67-Index, als prozentualer Anteil Ki-67-positiver Kerne an der Gesamtkernzahl, wird bestimmt (Whitfield et al. 2006). Er korreliert bei vielen Tumoren mit deren klinischem Verlauf und der Prognose (Scholzen und Gerdes 2000; Whitfield et al. 2006).

Bei humanen peripheren Nervenscheidentumoren korreliert der Ki-67-Index mit der Malignität des Tumors (Friedrich et al. 2003).

In der Tiermedizin wird MIB-1 als Antikörper gegen das Ki-67-Protein eingesetzt und ebenfalls als prognostischer Faktor in der Tumordiagnostik u. a. von caninen malignen Lymphomen und caninen Melanomen verwendet (Laprie et al. 2001; Sánchez et al. 2007; Ponce et al. 2010).

2.4.2.3 Wachstumsfaktorrezeptoren und Neuregulin-1

Bei der Entstehung von Neurofibromen und hMPNST vermutet man neben dem Verlust des Tumorsuppressors Neurofibromin noch weitere Mechanismen, die zur Tumorprogression beitragen (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Ein Ansatz sind die epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Liganden.

Die Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF- oder ErbB-Familie) besteht aus 4 Mitgliedern: dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR/ErbB1), dem ErbB2 (Her2), ErbB3 (Her3) und ErbB4 (Her4); (Yarden 2001). Alle sind transmembranöse Rezeptoren, welche durch eine extrazelluläre Ligandenbindung Signale über eine enzymatische Domäne in das Zellinnere vermitteln (Yarden 2001). Sie bilden untereinander Homo- oder Heterodimere und aktivieren je nach Dimerpartner

verschiedene intrazelluläre Signalwege (Doherty et al. 2008). Abb. 7 zeigt eine Übersicht der vier epidermalen Wachstumsfaktoren, ihrer Dimerpartner und einige ihrer Funktionen.

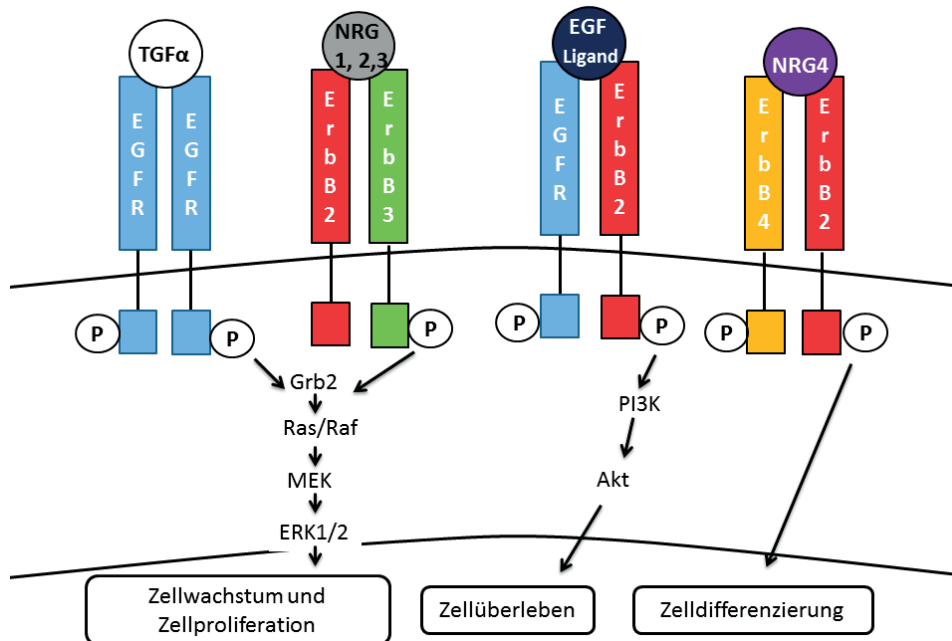


Abb. 7: Signalwege von Wachstumsfaktorrezeptoren, modifiziert nach Doherty et al. (2008)

Die vier Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR (blau), ErbB2 (rot), ErbB3 (grün) und ErbB4 (orange) bilden nach Ligandenbindung (TGFα = Transformierender Wachstumsfaktor; NRG1-4 = Neuregulin-1-4; EGF-Ligand = Epidermaler Wachstumsfaktor-Ligand) untereinander Heterodimere und aktivieren die nachfolgenden Signalwege; P = phosphorylierter Tyrosinrest (weist auf aktiven Status hin); Grb2 = Growth factor receptor-bound protein 2; Ras = Rat sarcoma, kleines G-Protein; Raf = rat fibrosarcoma, Familie von Proteinkinasen; MEK = Mitogen-aktivierende Proteinkinase Kinase; ERK = extrazelluläre-signal-regulierende Kinase; PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase; Akt = Proteinkinase B

Epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren werden i. d. R. von benachbarten Zellen parakrin aktiviert (Kumar et al. 2015a) und haben viele physiologische Funktionen. Unter anderem sind sie für das Überleben, die Proliferation, Migration und Differenzierung von Schwann-Zellen in der Embryonalentwicklung und der frühen postnatalen Phase verantwortlich (Heermann et al. 2011; Chen et al. 2006). Darüber hinaus werden sie bei vielen Tumorarten auf einem erhöhten Level exprimiert (Earp et al. 2003). Als Liganden der ErbBs wurden bisher verschiedene epidermale Wachstumsfaktoren und vier Neureguline beschrieben. Sie werden vor allem während der Entwicklung variabel und zellspezifisch exprimiert und können einen oder mehrere ErbBs aktivieren (Earp et al. 2003).

In der Tumorentstehung spielen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren als Onkoproteine eine wichtige Rolle (Kumar et al. 2015a). Normalerweise werden Wachstumsfaktoren von benachbarten Zellen sezerniert und wirken parakrin an deren Nachbarzellen. In einigen Tumoren erlangen Zellen durch Mutation die Fähigkeit selbstständig die benötigten Faktoren zu synthetisieren (sog. *autocrinen loop*); (Kumar et al. 2015a). Zum anderen kommt es vor, dass Wachstumsrezeptorgene mutieren und mutierte Wachstumsfaktorrezeptoren bilden. Daraufhin sind die Wachstumsrezeptoren

durchgängig aktiv und vermitteln proliferative Signale in das Zellinnere (Kumar et al. 2015a).

Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2

Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor-2 (ErbB2) ist ein wichtiger Heterodimerpartner für andere Mitglieder der ErbB-Familie (Yarden 2001; Burden und Yarden 1997). Anders als ErbB1, 3 und 4 bindet ErbB2 nicht direkt an Liganden und braucht die Zusammenlagerung, sog. Heterodimerisation, mit anderen ErbB-Rezeptoren um aktiviert zu werden (Earp et al. 2003; Doherty et al. 2008; Reinhard et al. 2009).

ErbB2 wird in 20-25% von Mammakarzinomen stark überexprimiert und korreliert dort mit einer schlechten Prognose (Earp et al. 2003). ErbB2 wird des Weiteren in sich entwickelnden und adulten Schwann-Zellen exprimiert (Meyer und Birchmeier 1995). Kommt es während der Embryogenese oder auch sonst zu einer Blockierung des ErbB2, führt das zu massiven Störungen in der Entwicklung und der Myelinisierung von Axonen (Birchmeier 2009; Schulz et al. 2014). Eckert et al. (2009) wiesen den ErbB2 in humanen MPNST-Zelllinien nach und Stonecypher et al. (2005) in humanen Neurofibromen und MPNST.

Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3

ErbB3 (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3) hat keine Kinaseaktivität im Zellinneren und benötigt daher die Heterodimerisation mit anderen Wachstumsrezeptoren um deren enzymatische Aktivität zu nutzen (Earp et al. 2003). Die präferierte Verbindung geht er mit ErbB2 ein (Earp et al. 2003). Stonecypher et al. (2005) haben nachgewiesen, dass ErbB3 in Neurofibromen und MPNST exprimiert wird. Auf Grund der Colokalisation von ErbB3 mit anderen Wachstumsrezeptoren und Neuregulin-1 (NRG1) an der Zellmembran von Invadopodien in MPNST-Zellkultur vermuten Eckert et al. (2009) einen Beitrag zur Tumorinvasion durch den ErbB3-NRG1-Signalweg.

Neuregulin-1

Neureguline (NRG) sind Wachstumsfaktoren, die von Axonen gebildet werden (Sherman et al. 2000). Es wurden bisher vier Mitglieder identifiziert, von denen drei membrangebunden und einer frei im Interzellularraum vorkommt (Birchmeier 2009). Alle NRG besitzen eine EGF-ähnliche Domäne, über die sie an Wachstumsfaktorrezeptoren binden und Signale in das Zellinnere vermitteln (Buonanno und Fischbach 2001; Birchmeier 2009). Neuregulin-1 (NRG1) ist das am besten untersuchte Mitglied der NRG-Familie (Birchmeier 2009) und hat viele verschiedene Isoformen, die auf Grund unterschiedlichen Spleißens entstehen (Reinhard et al. 2009). Die zwei wichtigsten Isoformen sind NRG1 α und NRG1 β (Reinhard et al. 2009). Bisher geht man davon aus,

dass NRG1 vorrangig an die Heterodimere ErbB3/2 und ErbB4/2 bindet (Massa et al. 2006).

Die NRG1-Familie ist wichtig für die Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems (Reinhard et al. 2009). Sie unterstützt das Überleben, die Proliferation und Migration von sich entwickelnden Schwann-Zellen in der Embryogenese und frühen postnatalen Phase (Sherman et al. 2000; Corfas et al. 2004) und ist essentiell für die Myelinisierung von Axonen (Birchmeier 2009).

Die Rolle von NRG1 für die Tumorentstehung, im Besonderen von peripheren Nervenscheidentumoren, ist schon lange ein wichtiger Bestandteil der Forschung. Die Funktion von NRG1 in der Schwann-Zell-Entwicklung wurde bisher in vielen *in vitro*-Studien belegt (Meyer und Birchmeier 1995; Riethmacher et al. 1997; Lin et al. 2000). Daraus ergab sich die Hypothese, dass NRG1 auch bei der Entstehung von peripheren Nervenscheidentumoren wichtige Aufgaben übernimmt (Carroll und Stonecypher 2005; Eckert et al. 2009; Schulz et al. 2014). Schulz et al. (2014) zeigten in ihrer Studie zur Neurofibromatose Typ 2 (NF2) anhand von NF2-Knockoutmäusen und Suralnerven von NF2-Patienten, dass es zu einer NRG1-Reduktion im neuronalen Kompartiment und einem Anstieg des ErbB2 kommt. Stonecypher et al. (2005) wiesen phosphorylierte NRG1-Isoformen in Kombination mit ErbBs in Proben von humanen Neurofibromen, MPNST und humanen MPNST-Zelllinien nach. In Zellkultur konnte man des Weiteren durch Inhibition der ErbBs auch eine Verminderung der Phosphorylierung erreichen (Stonecypher et al. 2005). Zusätzlich wiesen Carroll et al. (2005) *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell nach, dass NRG1 und ErbBs das MPNST- und Neurofibromwachstum unterstützen. Eckert et al. (2009) wiesen immunhistologisch ebenfalls NRG1, ErbB3 und 4 in humanen MPNST nach. Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass NRG1 β die Migration von MPNST-Zellen aus Zellkultur unterstützt (Eckert et al. 2009).

Die genannten Studien haben die Expression und Funktionen von Wachstumsrezeptoren und deren Faktoren bisher vor allem an MPNST-Zelllinien und im Mausmodell untersucht. Als Weiterführung sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression der genannten Wachstumsrezeptoren und Faktoren an humanen PNST-Proben untersucht werden.

In der Tiermedizin wurde NRG1 als cardioprotektiver Wachstumsfaktor (Doggen et al. 2009) und als proapoptotischer Faktor in Spindelzelltumoren der Gesäugeleiste beim Hund beschrieben (Krol et al. 2009). Nach unserem Wissen wurde die Expression von Neuregulin-1 bisher noch nicht an caninen peripheren Nervenscheidentumoren getestet. Dies sollte in dieser Studie nachgeholt werden.

2.4.2.4 CD44

CD44 ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein, das mit vielen extrazellulären Komponenten interagiert. Es gehört zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle, findet sich auf vielen Zellen (Riddle et al. 2010; Hagel et al. 2012) und hat mehrere Isoformen, die durch verschiedenes RNA-Spleißen zustande kommen. Es übernimmt wichtige Aufgaben in der Zell-Zell-Adhäsion und kann die Aktivierung von Wachstumsrezeptoren verstärken (Riddle et al. 2010). Studien haben gezeigt, dass CD44 eine wichtige Rolle beim Wachstum, der Zellinvasion und dem metastatischen Verhalten von Neoplasien übernimmt (Su et al. 2003; Wiranowska et al. 2006; Riddle et al. 2010; Hagel et al. 2012). CD44 geht eine Verbindung mit Hyaluronsäure ein (Hagel et al. 2012), die sich u. a. auf vaskulären Endothelien befindet und unterstützt so die Migration von Tumorzellen aus dem Gefäßsystem in die extrazelluläre Matrix (Kumar et al. 2015a). Darüber hinaus wurde die Wichtigkeit von CD44 für die Bindung von Neuregulinen an die Heterodimerere ErbB2/3 in Schwann-Zellkultur nachgewiesen (Sherman et al. 2000). Ein reduzierter CD44-Spiegel führte zu einer verminderten Singalantwort von Neuregulinen über ErbB2/3 in Schwann-Zellen von Ratten (Sherman et al. 2000). Somit könnte eine vermehrte Expression von CD44 in Tumoren die Aktivierung von Wachstumsrezeptor-Signalwegen unterstützen.

Riddel et al. (2010) haben die Expression von CD44 in gut- und bösartigen Neoplasien bei Neurofibromatose Typ 1 untersucht. Es zeigte sich, dass CD44 nicht mit dem Malignitätsgrad der Tumore korrelierte, allerdings auf eine invasive und infiltrative Aktivität der Neoplasien hinweist. Zellen weniger gut umschriebener Neurofibrome und invasiven MPNST zeigten eine diffuse CD44-Expression (Riddle et al. 2010).

2.4.2.5 Neurofibromin-Signalweg

Bei der Neurofibromatose Typ 1 ist das NF1-Gen mutiert, sodass dessen Genprodukt Neurofibromin nicht mehr produziert wird (Ruggieri 1999). Neurofibromin ist ein Negativregulator der kleinen GTPase Ras und damit ein Tumorsuppressor (Gutmann 1998). Ras unterstützt über verschiedene Signalkaskaden die Zellproliferation, das Zellüberleben und die Umgestaltung des Zytoskeletts (Carroll 2012). Es wird durch GEFs aktiviert (GTP-gebunden) und durch GAPs inaktiviert (GDP-gebunden); (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Neurofibromin besitzt eine homologe Domäne mit GAP und unterstützt somit die Inaktivierung von Ras (McClatchey 2007). Bei der NF1 ist die Bildung von Neurofibromin gestört, sodass weniger Neurofibromin zum Inaktivieren von Ras vorhanden ist. Daher gibt es mehr aktiviertes Ras, was seinerseits eine vermehrte Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade bewirkt (Basu et al. 1992; DeClue et al. 1992). Diese Mechanismen und die Ras-nachfolgenden Signalwege sind in Abb. 8 als Graphik dargestellt.

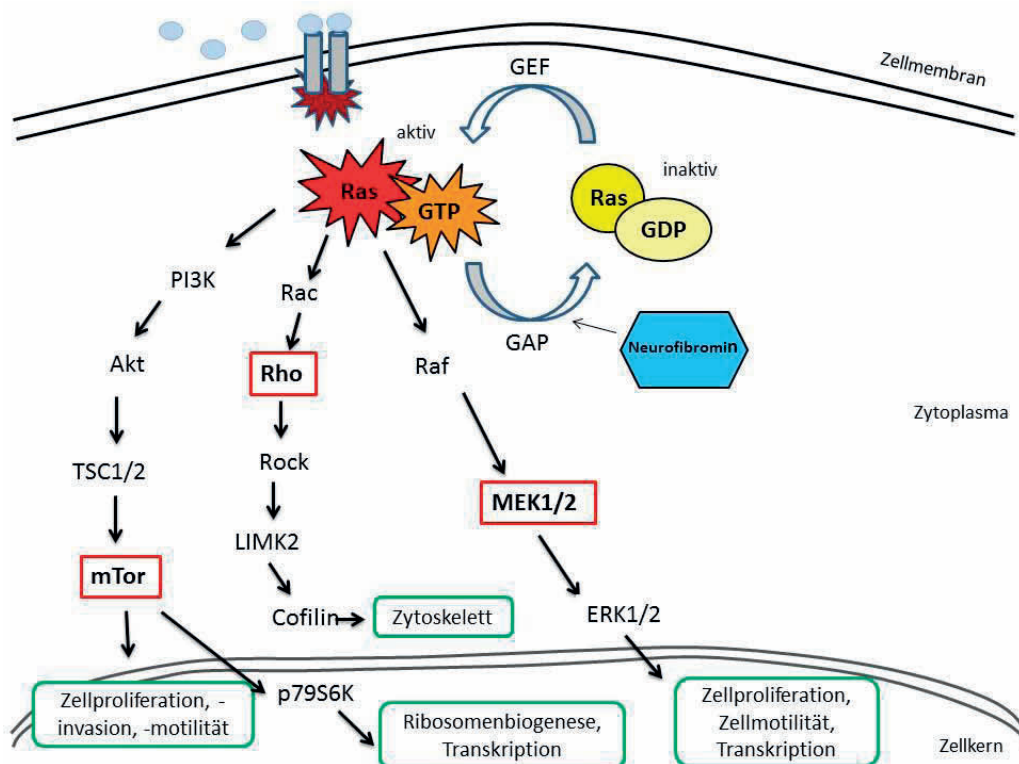


Abb. 8: Neurofibromin-Signalweg, modifiziert nach Dobashi et al. (2009), Gottfried et al. (2010), Barkan et al. (2011), Berridge (2012)

Die kleine GTPase Ras (rot unterlegt) unterstützt über verschiedene Signalkaskaden die Zellproliferation, das Zellüberleben und die Umgestaltung des Zytoskeletts. mTor, Rho und MEK (rot umrandet) sind zentrale Proteine der verschiedenen Signalwege. Neurofibromin (blau unterlegt), das Genprodukt, das bei NF1 mutiert ist, unterstützt die Inaktivierung von Ras. Ist es mutiert, führt dies dazu, dass mehr aktives Ras vorhanden ist. Akt = Proteinkinase B; ERK1/2 = extrazelluläre-signal-regulierende Kinase; LIMK2 = LIM domain kinase 2; MEK1/2 = Mitogen-aktiviertes Protein Kinase; mTor = *mammalian target of Rapamycin*; p70S6K = Ribosomale p70S6 Kinase; PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase; Rac = G-Protein; Raf = Proteinkinase; Rho = Ras homologue; Rock = *Rho associated protein kinase*; TSC1/2 = *Tuberous sclerosis proteins 1/2*

mTor

mTor (*mammalian Target of Rapamycin*) ist ein Enzym, das ein Bestandteil des Ras-PI3K-Akt-TSC1/2-mTor-p70S6K-Signalweges ist (Jessen et al. 2013). Es unterstützt u. a. die Proliferation, Invasion, Motilität und den Metabolismus von Zellen (Hsieh et al. 2012). Außerdem kann mTor über p70S6K die Ribosomen-Biogenese und die Transkription regulieren (Rosner et al. 2008).

Die Inhibition von mTor wurde in diversen MPNST-Zelllinien (Dasgupta et al. 2005; Johannessen et al. 2005; Endo et al. 2013) und MPNST-Mausmodellen (Johannessen et al. 2008) getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass es in der Folge zu einer verminderten Proliferation der Zellen bzw. einem verminderten Wachstum der Tumore kommt (Carroll 2012). Daher vermutet man, dass mTor eine wichtige Rolle in der Entstehung und dem Wachstum von MPNST spielt.

Rho

Rho (*Ras homologue*) gehört wie Ras zur Familie der kleinen GTPasen und ist GTP-gebunden aktiv und GDP-gebunden inaktiv (Berridge 2012). Rho ist Teil des Ras-Rac-Rho-Rock-LIMK2-Cofilin-Signalweges, der vor allem am Umbau und der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist (Vallée et al. 2012). Diese Mechanismen werden bei vielen zellulären Ereignissen wie der Zellbewegung, Zelladhäsion und Zellteilung benötigt (Ozawa et al. 2005). Ozawa et al. (2005) zeigten in einer Studie, dass es in Neurofibromin-defizienten Zellen zu einer Aktivierung des Rho-Rock-LIMK2-Cofilin-Signalweges und daraufhin zu einer vermehrten Motilität, Invasion und Bildung von Zellaggregaten der Zellen in Zellkultur kam. Diese Vorgänge sind für die Tumorentstehung essentiell. Weiterhin hat die Studie gezeigt, dass Neurofibromin auch in die Regulation der Zytoskeletts involviert ist (Ozawa et al. 2005).

MEK1/2

MEK1 und MEK2 sind Teil des MAPK (Mitogen-*activated* Protein Kinase)-Signalweges: Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. MEK1/2 sind Proteinkinasen, die durch die Raf-Familie phosphoryliert und somit aktiviert werden (Ambrosini et al. 2008). Die phosphorylierten p-MEK1/2 phosphorylieren wiederum Serin- bzw. Threoninreste anderer Proteine (Berridge 2012) und regulieren somit verschiedene Zellfunktionen wie Gentranskription, Zellproliferation und Zellmotilität (Berridge 2012). Zusätzlich unterstützt der MAPK-Signalweg die Proliferation und Differenzierung von neuronalem Gewebe während der Embryonalentwicklung (Furthauer et al. 2002; Corson et al. 2003).

Studien haben gezeigt, dass der MAPK-Signalweg in verschiedenen Sarkomen (Santen et al. 2002; Tomita et al. 2006; Dobashi et al. 2007) und in MPNST (Zou et al. 2009) überaktiviert ist. Daher wird vermutet, dass dieser Signalweg die Proliferation in Tumoren unterstützt. Ambrosini et al. (2008) wiesen in Zellkultur nach, dass die Inhibition des MAPK-Signalweges in MPNST-Zellen zu einer Reduktion des Zellwachstums führt.

2.4.2.6 Transkriptionsfaktoren

Transkriptions- und Entwicklungsfaktoren sind in der Embryogenese für die Regulierung der Neuralleistenzellen verantwortlich (Pytel et al. 2010). Diese sind proliferativ, migratorisch aktiv, invasiv und leisten einen Betrag zur Bildung von diversen Geweben und Zellen wie z. B. den Schwann-Zellen (Jessen und Mirsky 2005). Entwicklungsfaktoren, welche die normale Embryonalentwicklung regulieren, spielen häufig auch eine Rolle in der Biologie von Tumoren. Sie agieren als Transkriptionsfaktoren im Nukleus und transkribieren Proto-Onkogene, die u. a. das Wachstum des Tumors forcieren (Kumar et al. 2015a). Diese Theorie wurde beim Medulloblastom (Morotti et al. 2006), Rhabdomyosarkom (Goding 2000) und Melanom

(Marino 2005) bestätigt. Bei Nervenscheidentumoren ist die Bedeutung von Entwicklungsfaktoren bisher noch wenig untersucht (Pytel et al. 2010).

Pax7

Pax7 ist ein Transkriptionsfaktor, gehört zur Gruppe der Pax (*Paired box*)-Proteine (Thompson et al. 2004) und reguliert während der Embryonalentwicklung viele Prozesse. Unter anderem ist Pax7 an der Entstehung der dorsalen Polarität des Neuralrohrs, der Bildung der Nuclei im Hirnstamm (Thompson et al. 2004) und der Entwicklung der Skelettmuskulatur (Buckingham und Relaix 2007) beteiligt.

Gershon et al. (2005) und Pytel et al. (2010) haben gezeigt, dass die Pax7-Expression mit der malignen Transformation von Neurofibromen korreliert. Beide konnten via Immuncytochemie bzw. Immunhistochemie nachweisen, dass Pax7 ausschließlich in MPNST und nicht in Neurofibromen oder Schwannomen exprimiert wird (Gershon et al. 2005; Pytel et al. 2010).

Sox9

Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor, der zur SoxE-Gruppe der Sox-Gene gehört (*Sry-related HMG Box*). Sox-Faktoren sind Transkriptionsfaktoren, die über ihre DNA Bindungsdomäne, die HMG-box (High Mobility Group), charakterisiert werden (Bowles et al. 2000).

Sox9 übernimmt multiple Funktionen in der Entwicklung verschiedener Organe, wie der Entwicklung des Hodens (Kobayashi et al. 2005), des Pankreas (Seymour et al. 2007) und des Knorpels (Zhao et al. 1997). Studien haben außerdem die zentrale Rolle von Sox9 in der Entwicklung der Neuralleiste aufgezeigt (Cheung und Briscoe 2003).

Verschiedene Studien haben belegt, dass Sox9 in Schwann-Zell-Tumoren exprimiert wird (Miller et al. 2006; Pytel et al. 2010; Carbonnelle-Puscian et al. 2011). Miller et al. (2006) und Carbonelle-Puscian et al. (2011) haben nachgewiesen, dass Sox9 auf RNA- und Proteinniveau signifikant stärker in MPNST exprimiert wird als in Neurofibromen. Somit wurde eine Korrelation der Sox9-Expression mit dem Histologietyp postuliert (Carbonnelle-Puscian et al. 2011). In der Studie von Pytel et al. (2010) zeigten sich keine Unterschiede zwischen Neurofibromen und MPNST in der Expression von Sox9. Allerdings wiesen in dieser Studie Schwannome im Vergleich zu Neurofibromen und MPNST eine höhere Expression von Sox9 auf (Pytel et al. 2010).

2.4.3 Differenzierungsmarker caniner PNST

In der Literatur werden verschiedene Immunmarker für die Diagnose von caninen peripheren Nervenscheidentumoren diskutiert (Chijiwa et al. 2004; Tovar et al. 2011;

Suzuki et al. 2013). Im Folgenden werden die vier vielversprechendsten Differenzierungsmarker beschrieben.

2.4.3.1 Periaxin

Periaxin ist ein Protein (147 kDa), das bei allen Spezies ausschließlich im peripheren Nervensystem vorkommt (Gillespie et al. 1994). Es gibt zwei Isoformen: L- und S-Periaxin (Han und Kursula 2013). L-Periaxin befindet sich an der periaxonalen Plasmamembran der ersten Lage Myelin, welches von Schwann-Zellen um Axone herum gebildet wird (Gillespie et al. 1994). S-Periaxin ist gleichmäßig im Schwann-Zell-Zytoplasma und im Kern verteilt (Han und Kursula 2013). Die Lage von Periaxin in der ersten Myelinschicht lässt darauf schließen, dass es schon in den frühen Phasen der Myelinisierung gebildet wird und bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielt (Gillespie et al. 1994). Bei der neuromuskulären Charcot-Marie-Tooth-Krankheit ist Periaxin mutiert (Han und Kursula 2013). Die Myelinisierung ist dort gestört, und es kommt zu einer Demyelinisierung der Axone (Auer-Grumbach 2008).

In einer Studie über die *Devil Facial Tumor Disease* (DFTD) des Tasmanischen Teufels, zeigten die Autoren, dass ein Antikörper gegen Periaxin ein hoch sensibler Marker für den bei dieser Krankheit charakteristischen Schwann-Zell-Tumor ist (Tovar et al. 2011). Sie schlugen Periaxin auch als potentiellen Marker für andere Schwann-Zell-Neoplasien vor (Tovar et al. 2011).

2.4.3.2 α -Smooth Muscle Actin

Das α -2-Aktin oder *α -smooth muscle actin* (α -SMA) gehört zur Gruppe der Aktine, die ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts sind (Miettinen 2014). Sie wahren als Aktinfilamente die Stabilität der Zellen und sind für ihre Motilität essentiell. *α -smooth muscle actin* kommt in Zellen der glatten Muskulatur und in ihnen verwandten Zellen wie Perizyten oder Myofibroblasten vor (Miettinen 2014). α -SMA wird als Marker für Tumore der glatten Muskulatur, myofibroblastische Tumore und andere verwandte Neoplasien eingesetzt (Perez-Montiel et al. 2006; Miettinen 2014).

Beim Hund wird α -SMA in Rhabdomyosarkomen, Leiomyomen, Leiomyosarkomen und Myoepitheliomen exprimiert (Jakab et al. 2012). Suzuki et al. (2013) wiesen die Expression von α -SMA im Perineurium von Hundennerven und in glatten Muskelzellen der Gefäßwände nach (Suzuki et al. 2013). Chijiwa et al. (2004) zeigten, dass 80% der untersuchten caninen Hämangioperizytome (cHP) und keine cPNST positiv für α -SMA waren. Eine Unterscheidung dieser beiden Entitäten scheint über diesen Marker möglich (Chijiwa et al. 2004).

2.4.3.3 Saures Gliafaserprotein

Das saure Gliafaserprotein (GFAP = *glial fibrillary acidic protein*) ist ein Hauptbestandteil der Intermediärfilamente in Gliazellen (u. a. Astrozyten, Schwann-Zellen); (Jessen et al. 1984). Es wird als Marker zur Diagnose von glialen Tumoren im ZNS eingesetzt (Bonnin und Rubinstein 1984).

In humanen PNST wird GFAP vorrangig in Schwannomen exprimiert (Gaitero et al. 2008). Untersuchte Neurofibrome zeigen eine Expression von 11-40%, MPNST 7% und Schwannome von 33-38% (Kawahara et al. 1988; Gray et al. 1989).

Die Expression von GFAP in caninen peripheren Nervenscheidentumoren wurde in diversen Studien belegt (Sawamoto et al. 1999; Chijiwa et al. 2004; Sugiyama et al. 2008; Bergmann et al. 2009; Volmer et al. 2010). Chijiwa et al. (2004) zeigten, dass auch beim Hund die Expression von GFAP in benignen PNST höher (67%) als in cMPNST (18%) ist (Chijiwa et al. 2004).

2.4.3.4 Nervenwachstumsfaktorrezeptor

Der Nervenwachstumsfaktorrezeptor (NGFR = *nerve growth factor receptor* oder p75NTR) ist ein Transmembranprotein, welches verschiedene Mitglieder der Neurotrophinfamilie bindet, unter anderem den Nervenwachstumsfaktor (Chen et al. 2009). Die Signaltransduktion des NGFR ist extrem variabel und von vielen Faktoren abhängig. Er nimmt u. a. Einfluss auf das Zellüberleben, die Apoptose, das übermäßige Wachstum von Neuriten und die Myelinisierung von Axonen (Tomellini et al. 2014). Der NGFR wird im Perineurium von humanen Nerven und in 73% der humanen peripheren Nervenscheidentumoren exprimiert (Perosio und Brooks 1988; Hoshi et al. 1994). Auch in peripheren Nervenscheidentumoren des Hundes lässt sich der NGFR nachweisen (Chijiwa et al. 2004). Chijiwa et al (2004) zeigen in ihrer Studie, dass 70% der cPNST und nur ein canines Hämangioperizytom (20%) positiv für NGFR waren. Somit könnte NGFR hilfreich sein um cPNST von anderen Spindelzelltumoren zu differenzieren (Chijiwa et al. 2004).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv – Menschen

Die humanen Tumorproben wurden aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) entnommen. Insgesamt wurden 520 Proben untersucht. Davon waren 136 dermale, 123 diffuse, 113 plexiform-diffuse, 126 plexiforme Neurofibrome und 22 maligne periphere Nervenscheidentumore. Diese Einteilung wurde von zwei Neuropathologen anhand von 8 Standardfärbungen (Hämatoxylin-Eosin (H.E.), *Periodic acid-Schiff reaction* (PAS), Elastika-van-Gieson, *Turnbull-Blau*, S100-Protein, Epitheliales Membranantigen (EMA), Neurofilament, Ki-67-Protein) vorgenommen. 228 Proben stammten von Männern und 283 von Frauen, zu 9 Proben lagen keine Angaben zum Geschlecht vor.

Alle Patienten erfüllten die NIH-Kriterien für Neurofibromatose Typ 1 (Tabelle 1, Seite 6). Die Gewebeproben wurden in der Zeit von 1981 bis 2012 in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKE entnommen, in Formaldehyd fixiert und routinemäßig in Paraffin eingebettet. Die daraus entstanden Blöcke wurden im Archiv der Neuropathologie gelagert.

Von jedem Paraffinblock wurde zu Beginn dieser Forschungsarbeit ein Histologieschnitt erstellt und manuell mit der Hämatoxylin-Eosin-Standardfärbung (3.2.4) gefärbt. Danach wurden alle Schnitte von Professor Christian Hagel und der Autorin der Studie durchgemustert und nach den erstellten Kriterien (4.2.1) in Subgruppen unterteilt. Auf jedem Objektträger wurden charakteristische Tumoranteile mit einem Stift markiert. Daraufhin wurden in dem Institut für Pathologie des UKE elf *Tissue-Microarrays* (TMA) mit bis zu 148 Stanzen je Block hergestellt. Dabei wurden je Tumor zwei Stanzen entnommen. Von den TMAs wurden Schnitte erstellt, die immunhistochemisch im Institut der Neuropathologie des UKE mit dem Färbeautomaten „Ventana benchmark xt“ (3.2.5) gefärbt wurden.

Die Rohdaten zu den humanen Proben sind im Anhang unter 13.6 aufgeführt.

3.1.2 Patientenkollektiv – Hunde

Die caninen Tumorproben stammen aus dem Archiv des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität (JLU) in Gießen. 75 Proben wurden mithilfe eines Suchfilters aus dem Programm easy Vet (IFS Informationssysteme GmbH, Hannover) ausgewählt. Die Differentialdiagnose oder Diagnose lautete „peripherer Nervenscheidentumor“. Die

Proben stammen aus den Jahren 2009 bis Frühjahr 2014. Auch diese Gewebeproben wurden routinemäßig in Formaldehyd fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet im Archiv gelagert. Von jedem Block wurden fünfzehn Schnitte angefertigt, von denen je einer in einem Hämatoxylin-Eosin-Färbeautomaten in Gießen (3.2.4) gefärbt wurde. Der Rest der Schnitte wurde immunhistochemisch im Institut der Neuropathologie des UKE mit dem Färbeautomaten „Ventana benchmark xt“ (3.2.5) gefärbt.

Die Rohdaten zu den caninen Proben sind im Anhang unter 13.5 aufgeführt.

3.1.3 Antikörper

Die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper, sind in der folgenden Tabelle alphabetisch geordnet aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper
(alphabetisch geordnet)

Antikörper	Clone	Klonalität	Verdünnung	Vorbehandlung	Firma	Bestellnummer
α-SMA	1A4	monoklonal	1:1000	cc1m	Zytomed Systems GmbH (Berlin)	Mob 001-05
CD44	DF1485	monoklonal	1:50	cc1m	Dako (Glostrup, DK)	M 7082
CD90/Thy	EPR3132	monoklonal	1:100	cc1st	Abcam (Cambridge, UK)	ab92574
c-kit/CD117	k.A.	polyklonal	1:100	cc1m	Dako (Glostrup, DK)	A4502
Claudin-1	k.A.	polyklonal	1:200	cc1st	Antikörper-online (Aachen)	ABIN373294
EMA	E29	monoklonal	1:200	cc1m	Dako (Glostrup, DK)	M 0613
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (Hund)	k.A.	polyklonal	1:200	cc1m	Dako (Glostrup, DK)	Z 0334
Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein	6F2	monoklonal	1:200	cc1m	Dako (Glostrup, DK)	M 0761
Her2/c-erbB2 Oncoprotein	k.A.	polyklonal	1:400	cc1m	Dako (Glostrup, DK)	A 0485
Her3 (ErbB3)	3F10F6	monoklonal	1:200	cc1st	LSBio (Seattle USA)	LS-B3896
Ki-67	SP6	monoklonal	1:1000	cc1st	Cell Marque (Rocklin, USA)	275R-14
Mast Cell Tryptase	AA1	monoklonal	1:500	cc1m	Dako (Glostrup, DK)	M 7052
MEK1/2 (MAPKK1)	k.A.	polyklonal	1:100	cc1m	Antikörper-online (Aachen)	ABIN736791
p-MEK1/2	Ser221	monoklonal	1:100	cc1st	Cell Signalling (Leiden, NL)	2338
mTor/FRAP1	k.A.	polyklonal	1:100	cc1m	Antikörper-online (Aachen)	ABIN747158
Neurofilament	2F11	monoklonal	1:800	cc1m	Dako (Hamburg)	M 0762
NRG1	k.A.	polyklonal	1:200	cc1st	Acris GmbH (Herford)	AP 06168PU-N
Nerve Growth Factor Receptor (gp75)	7F10	monoklonal	1:100	cc1m	Leica Biosystem (Newcastle, UK)	NCL-NGFR
Pax7 (Paired Box 7)	k.A.	polyklonal	1:100	cc1m	Antikörper-online (Aachen)	ABIN739905
Periaxin	k.A.	polyklonal	1:100	cc1st	Antikörper-online (Aachen)	ABIN719516
Rho/RhoA	k.A.	polyklonal	1:100	cc1m	Antikörper-online (Aachen)	ABIN738846
S100-Protein	k.A.	polyklonal	1:8000	cc1m (Hund)	Dako (Glostrup, DK)	Z 0311
Sox9	k.A.	polyklonal	1:100	Keine (Mensch)		
Zu Vorbehandlungen cc1m, cc1st siehe Protokoll Immunhistochemie (3.2.5.2); k.A. = keine Angaben				cc2st	Antikörper-online (Aachen)	ABIN754963

3.1.4 Lösungen und immunhistochemische Reagenzien

Für die manuelle Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) im Institut für Neuropathologie des UKE sind die verwendeten Reagenzien und Lösungen im Anhang unter Punkt 13.1 alphabetisch aufgelistet.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung im Institut für Veterinär-Pathologie der JLU in Gießen wurde mit einem Varistain 24-3 der Firma Shandon durchgeführt. Die dabei verwendeten Lösungen und Reagenzien sind im Anhang unter Punkt 13.1 alphabetisch aufgelistet.

Für die immunhistochemischen Färbungen mit dem Ventana-Färbeautomaten, der Firma Ventana Medical Systems, Inc. im Institut für Neuropathologie des UKE sind die verwendeten Reagenzien und Lösungen im Anhang unter 13.1 alphabetisch aufgelistet.

3.1.5 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Eine Liste aller verwendeten Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien befindet sich im Anhang unter 13.2.

3.1.6 Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind im Anhang unter 13.3 alphabetisch aufgelistet.

3.2 Methoden

3.2.1 Schnittherstellung

Die Paraffinblöcke wurden gekühlt und mit einem Schlitten-Mikrotom (Modell Leica SM200 R, Wetzlar); (UKE, Hamburg) bzw. Rotationsmikrotom (Modell Leica RM2255, Wetzlar); (JLU, Gießen) wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einem Wasserbad gestreckt und auf einen Glas-Objektträger aufgezogen. Standardmäßig wurden dafür 72 SuperFrost/Plus-Objektträger der Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG in Sondheim v. d. Rhön verwendet. Bei den TMAs wurden nach einigen Versuchen Silan-beschichtete Objektträger verwendet, da das Gewebe besser anhaftete. Dafür wurden ebenfalls 72 SuperFrost/Plus-Objektträger der Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG in Sondheim v. d. Rhön verwendet, die im Histologielabor der Neuropathologie in Hamburg mit Silan, der Firma Sigma-Aldrich GmbH aus München, beschichtet wurden.

3.2.2 Protokoll Silan-Beschichtung

- 1) Herstellung Silan-Arbeitslösung: 3-Aminopropylthriethoxysilan (#A3648, Sigma-Aldrich GmbH, München) mit 1:50 Aceton mischen

- 2) Reinigung Objektträger: 2 Minuten in Aceton stellen
- 3) Objektträger an der Luft trocknen
- 4) Objektträger 2 Minuten in Silan-Arbeitslösung tauchen
- 5) Objektträger 2x mit Aqua dest spülen
- 6) Objektträger im Ofen bei 50°C trocknen (ca. 15 Minuten)
- 7) Lagerung der Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur

3.2.3 Tissue-Microarray-Herstellung

Aus den 520 humanen Proben wurden 11 TMAs hergestellt. Dabei wurden aus jedem Paraffinblock jeweils zwei Stenzen von je 1 mm Durchmesser entnommen und zusammen mit bis zu 148 Stenzen in einen neuen Paraffinblock verbracht. Dies wurde im Institut für Pathologie des UKE durchgeführt.

3.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die humanen Proben wurden von Hand nach folgendem Protokoll gefärbt:

Deparaffinieren	20 Minuten im Brutschrank bei 63°C 20 Minuten in Xylol
Rehydratation	Absteigende Ethanolreihe (jeweils eintauchen für 1 Sekunde) 3 x 100% 3 x 96% 1 x 80% 1 x 70% 1 x Aqua dest. (jeweils schwenken)
Färbereihe	5 Minuten in Hämatoxilin 5 Minuten wässern 5 x in HCl-Wasser tunken (Differenzieren) 5 Minuten wässern (Bläuen) 2 Minuten in 70% Alkohol 2 Minuten in Eosin 3 x tunken in 100% Alkohol (nicht gebundenen Farbstoff herauswaschen) 2 Minuten in Xylol
Eindeckeln	mit Deckgläschen der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co KG

Die caninen Tumورproben wurden mit dem Färbeautomaten Varistain 24-3 der Firma Shandon nach folgendem Protokoll gefärbt.

Deparaffinieren	1. Station	2 Minuten in Xylol
	2. Station	2 Minuten in Xylol
Rehydratation	3. Station	2 Minuten in 100% Alkohol (Isopropanol)
	4. Station	2 Minuten in 100% Alkohol
	5. Station	2 Minuten in 96% Alkohol
	6. Station	1 Minuten in 96% Alkohol
	7. Station	30 Sekunden in 70% Alkohol
	8. Station	4 Minuten Kardasewitsch-Lösung
	9. Station	4 Minuten in Aqua dest.
	10. Station	2 Minuten in Aqua dest.
Färbereihe	11. Station	4 Minuten in Papanicolaou
	12. Station	1 Sekunde in 0,1%igem Salzsäure-Alkohol
	13. Station	5 Minuten in Leitungswasser
	14. Station	1 ½ Minuten in Eosin

Material und Methoden

15. Station	1 Minute in 96% Alkohol
16. Station	30 Sekunden in 96% Alkohol
17. Station	30 Sekunden in 96% Alkohol
18. Station	30 Sekunden in 100% Alkohol
19. Station	30 Sekunden in 100% Alkohol
20. Station	30 Sekunden in Xylol
21. Station	30 Sekunden in Xylol
22. Station	30 Sekunden in Xylol

3.2.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Färbeautomat „Ventana benchmark xt“ durchgeführt.

3.2.5.1 Ansatz Antikörper

Die verwendeten Antikörper (Tabelle 2, Seite 35) wurden nach folgendem Protokoll angesetzt:

- 1) 100 ml Antibody Diluent + 10 ml Zigenserum + 90 ml TRIS-Puffer
- 2) Je nach Verdünnung (Tabelle 2, Spalte 4) Antikörper mit obigen Ansatz verdünnen

3.2.5.2 Protokoll Immunhistochemie, Einfachfärbung

Alle in Tabelle 2 aufgelisteten Antikörper wurden mit dem Färbeautomat „Ventana benchmark xt“ nach folgendem Protokoll gefärbt. Die Hitzevorbehandlung variierte je nach Antikörper. Aus der Tabelle 2, Spalte 4 (Vorbehandlung) ist die jeweilige Hitzevorbehandlung zu entnehmen. In dem folgenden Protokoll sind unter dem Punkt „2. Hitzebehandlung“ die verschiedenen Möglichkeiten (cc1m, cc1st, cc2st, ohne), das verwendete Reagenz und die Zeitdauer der Behandlung aufgeführt.

1. Deparaffinieren	76°C	4 Minuten
2. Hitzevorbehandlung	- Cell conditioning solution 1 (Citratpuffer) mildes cc1 (cc1m) standard cc1 (cc1st) - Cell conditioning solution 2 (Citratpuffer) standard cc2 (cc2st) - ohne	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	<i>Reagenzien aus Detektionskit:</i> 1 Tropfen ultraview Universal HRP Multimer 1 Tropfen ultraview Universal DAB Chromogen + 1 Tropfen ultraview U. H ₂ O ₂ + LCS-Puffer 1 Tropfen ultraview Universal 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 Etanolreihe	70% Alkohol 80% Alkohol 96% Alkohol 100% Alkohol	(jeweils schwenken)

Material und Methoden

8. Eindeckeln	Mit Eindeckelautomat und Deckgläschen
----------------------	---------------------------------------

3.2.5.3 Protokoll Immunhistochemie, Doppelfärbung

Es wurde eine Doppelfärbung mit dem gegen α -SMA gerichteten Antikörper (erster Primärantikörper) und dem gegen GFAP gerichteten Antikörper (zweiter Primärantikörper) durchgeführt. Das Protokoll für diese Doppelfärbung ist im Folgenden aufgeführt.

1. Deparaffinieren	76°C	4 Minuten
2. Hitzevorbehandlung	- Cell conditioning solution1 (Citratpuffer) mildes cc1 (cc1m)	30 Minuten
3. Hemmung endogener Peroxidase	1 Tropfen UV Inhibitor	4 Minuten
4. Inkubation mit erstem Primärantikörper	1 Tropfen Antikörperansatz	32 Minuten
5. Inkubation mit erstem Sekundärantikörper	<i>Reagenzien aus Detektionskit:</i>	
	1 Tropfen ultraview Universal HRP Multimer	8 Minuten
	1 Tropfen ultraview Universal DAB Chromogen + 1 Tropfen ultraview U. H ₂ O ₂ + LCS-Puffer	8 Minuten
	1 Tropfen ultraview Universal Copper	4 Minuten
6. Antikörperdenaturierung	90°C	12 Minuten
7. Inkubation mit zweitem Primärantikörper	1 Tropfen Antikörperansatz	32 Minuten
8. Inkubation mit zweitem Sekundärantikörper	<i>Reagenzien aus AP Red Detektionskit:</i>	
	1 Tropfen ultraview Universal Multimer	12 Minuten
	1 Tropfen ultraview Universal Red Enhancer	4 Minuten
	1 Tropfen ultraview Universal Red A + 1 Tropfen ultraview Universal Red Naphthol	8 Minuten
	1 Tropfen ultraview Universal Red B + 1 Tropfen ultraview Universal Red Naphthol	8 Minuten
9. Gegenfärbung	1 Tropfen H.E. + LCS-Puffer	4 Minuten
	1 Tropfen Bluing Reagent + LCS-Puffer	4 Minuten
7. Aufsteigende Etanolreihe	70% Alkohol	
	80% Alkohol	
	96% Alkohol	
	100% Alkohol	
	(jeweils schwenken)	
8. Eindeckeln	mit Eindeckelautomat und Deckgläschen	

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

Die Antikörper wurden zunächst validiert, in dem an ganzen Blöcken geprüft wurde, ob die PNSTs das Antigen exprimieren.

3.2.6 Evaluationsmethoden

Die immunhistologischen Färbungen wurden quantitativ, semiquantitativ oder qualitativ ausgewertet. Eine Färbung wurde als positiv gewertet, wenn die Braunfärbung in einer Ebene auftrat und deutlich einer Struktur zugeordnet werden konnte.

In dieser Arbeit wurden immunhistologische Färbungen auch nach ihrer Farbintensität beurteilt, da es sich bei dem Färben mit einem Färbeautomaten (Ventana benchmark xt) um einen technisierten und standardisierten Vorgang handelt. Alle Färbungen mit einem Antikörper wurden möglichst in einem Durchgang durchgeführt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es zu wenigen bis keinen Abweichungen in der Färbeintensität kommt, wie dies bei manuellen Färbungen der Fall sein kann.

Bei Färbungen, bei denen eine quantitative Auswertung möglich war, wurde diese Methode zur Auswertung genutzt. Dazu gehörten Kernfärbungen, bei denen die positiven und negativen Kerne auf einer definierten Fläche bestimmt wurden. Zum anderen wurde die einfache Anzahl von positiven Strukturen pro Fläche bestimmt, wenn deren Färbung eindeutig war (Mastzellen, Axone). Die Fläche wurde je nach dem gewählt, wie viele Strukturen angefärbt wurden. Waren wenige Strukturen angefärbt, wie z. B. bei den Mastzellen, wurde, um möglichst viel Fläche auszuwerten, die Fläche eines TMA-Spots ($0,79 \text{ mm}^2$) gewählt. Waren viele Strukturen wie z. B. die Tumorzellen angefärbt, wurde ein Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung als Fläche ($0,12 \text{ mm}^2$) gewählt. Die quantitativ ausgewerteten Variablen wurden intervallskaliert.

War eine quantitative Auswertung nicht möglich, da die gefärbten Strukturen nicht deutlich gezählt werden konnten oder weil die Färbeintensität in die Evaluation mit einfließen sollte, wurde semiquantitativ (0 bis 3 bzw. 4) bewertet. Die beschriebenen semiquantitativen Variablen wurden ordinalskaliert.

War eine semiquantitative Auswertung nicht möglich bzw. sollten zusätzliche Informationen über den Ort der Färbung erfasst werden, wurde deskriptiv (qualitativ) bewertet. Waren keine Abstufungen in der Färbeintensität zu erkennen, wurde zwischen positiv und negativ unterschieden. Die qualitativen Variablen wurden nominalskaliert.

Die folgende Tabelle 3 gibt eine Übersicht der Auswertungsmethoden der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen.

Tabelle 3: Auswertungsmethoden immunhistochemischer Färbungen

k.A.: Antikörper, die beim Hund bzw. Menschen nicht untersucht wurden, sind mit k.A. (keine Angaben) markiert

Antigene	Auswertung Mensch	Auswertung Hund
<u>Zelluläre Bestandteile von Neurofibromen</u>		
S100-Protein	qualitativ + quantitativ	qualitativ
EMA (Epitheliales Membranantigen)	qualitativ	k.A.
Claudin-1	k.A.	semiquantitativ
CD90 (Thy-1)	qualitativ	semiquantitativ
Mastzell-Tryptase	quantitativ	quantitativ
Neurofilament	qualitativ + quantitativ	qualitativ + quantitativ
<u>Faktoren der Tumorbilogie</u>		
Ki-67-Protein	quantitativ	quantitativ
ErbB2/Her2	qualitativ	k.A.
ErbB3/Her3	semiquantitativ	k.A.
NRG1 (Neuregulin-1)	semiquantitativ	semiquantitativ
CD44	semiquantitativ	k.A.
<u>Neurofibromin Signalweg</u>		
mTOR	quantitativ	k.A.
Rho	semiquantitativ	k.A.
MEK	qualitativ	k.A.
pMEK	semiquantitativ	k.A.
<u>Transkriptionsfaktoren</u>		
Sox9	quantitativ	k.A.
Pax7	quantitativ	k.A.
<u>Sarkom-Differenzierung</u>		
α -SMA (α -smooth muscle actin)	qualitativ	qualitativ
GFAP	qualitativ	qualitativ
NGFR	semiquantitativ	semiquantitativ
Periaxin	semiquantitativ	qualitativ

Im Folgenden werden die Auswertungsschemata der verschiedenen Antikörper im Detail aufgeführt, dabei sind die Antikörper alphabetisch geordnet. Zur besseren Übersicht ist im Anhang unter 13.4 eine tabellarische Auflistung (Tabelle 15, Seite 200) der Evaluierungsschemata zu finden.

3.2.6.1 *Qualitativ*

Für alle folgenden Marker wurde bei den humanen Proben die gesamte Fläche des TMA-Spots (0,79 mm²) bewertet. Bei den Hundeproben wurde immer der gesamte Schnitt bewertet. Durch die variable Größe der Hundeschnitte kann die Bewertung der Hundefärbungen Fehlern unterliegen. Bei GFAP, Periaxin und dem S100-Protein wurde zwischen einer positiven und negativen Anfärbung unterschieden, demnach ist die Größe des Schnittes hier nicht entscheidend. Bei Neurofilament und α -SMA wurden positive Strukturen bewertet und ggf. gezählt. Hier kann es zu möglichen Verfälschungen der Auswertung aufgrund der variierenden Schnittgröße gekommen sein.

CD90 wurde bei den humanen Proben folgendermaßen gradiert: keine Anfärbung (0), perivaskuläre und/oder perineuriale Anfärbung (1), perivaskuläre und/oder perineuriale Anfärbung und Tumorzellen gefärbt (2), Anfärbung nur von Tumorzellen (3). Für die

Korrelationsanalyse unter 4.4.2 wurden 0 und 1 zu 0 (keine CD90-positiven Zellen vorhanden) und 2 und 3 zu 2 (CD90-positive Zellen vorhanden) zusammengefasst.

Bei **EMA** (humane Proben) wurde nach folgender Gradierung eingeteilt: keine Anfärbung (0), Perineurium und umwickelnde Strukturen gefärbt (1), multifokal Tumorzellen (2), Perineurium und Tumorzellen (3) gefärbt.

ErbB2 (Her2); (humane Proben) wurde folgendermaßen gradiert: keine Anfärbung (0), perineuriale oder perivaskuläre Anfärbung (1), Färbung von einzelnen Zellen oder netzartig (2).

GFAP wurde bei beiden Spezies nach negative (0) und positive Anfärbung (1) von Tumorzellen gradiert.

MEK wurde bei den humanen Tumoren nach negative (0) und positive Anfärbung (1) von Tumorzellen gradiert.

Neurofilament wurde sowohl beim Menschen als auch beim Hund nach keine Anfärbung (0), positive Axone in intakten Nerven (1) und einzelne Axone im Tumorgewebe (2) gradiert. Die positiven Axone im Tumorgewebe (2) wurden zusätzlich quantitativ bewertet (3.2.6.3).

Periaxin beim Hund wurde nach negativ (0), schwach positiv (1), deutlich multifokal oder diffus positiv (2) und diffus stark positiv (3) gradiert. 0 und 1 wurden im Anschluss zu negativ und 2 und 3 zu positiv zusammengefasst.

Die **S100-Protein-Färbung** wurde bei beiden Spezies folgendermaßen gradiert: keine Anfärbung (0) und positive Färbung von Tumorzellen (1). Die positiven Zellen wurden zusätzlich quantitativ bewertet (3.2.6.3).

Die **α -SMA-Färbung** beim Hund wurde zweifach bewertet. Zum einen wurde die Färbung des Tumorgewebes bewertet: keine Anfärbung (0) oder positive Färbung (1). Zum anderen wurde die Anfärbung weiterer Strukturen bewertet: keine weiteren Strukturen angefärbt (0), positives Perineurium außen oder innen am Tumor (1), zwiebelschalenartige Färbung um Gefäße (2), positives Granulationsgewebe um Nekrosezonen (3), sowohl Perineurium als auch Granulationsgewebe positiv (4), sowohl Perineurium angefärbt als auch Färbung um Gefäße (5). Beim Menschen wurde zwischen keine Anfärbung (0), Gefäßwände positiv (1) und zusätzlich zu Gefäßwänden Perineurium positiv (2) unterschieden.

3.2.6.2 *Semiquantitativ*

Für alle folgenden Marker wurde bei den humanen Proben die gesamte Fläche des TMA-Spots (0,79 mm²) bewertet. Bei den Hundeproben wurde immer der gesamte Schnitt bewertet. Durch die variable Größe der Hundeschnitte kann die Bewertung der Hundefärbungen Fehlern unterliegen. Die Expression von CD90, Claudin-1, Neuregulin-1 und dem NGFR wurde anhand ihrer Intensität und Ausdehnung bewertet.

Bei **CD90** (canine Proben) wurde zwischen keine Anfärbung (0), schwache Färbung von 100% der Zellen (1), schwach bis mittelstarke Färbung von 33-66% der Tumorzellen (2), mittlere bis starke Anfärbung von > 66% bis < 100% der Tumorzellen (3) und 100% starke Färbung der Tumorzellen (4) unterschieden.

CD44 wurde beim Menschen wie folgt gradiert: negativ, d.h. 0% der Tumorzellen positiv (0), schwach, d.h. 0-20% Tumorzellen positiv (1), mittel, d.h. > 20% bis < 100% der Tumorzellen positiv (2), stark, d.h. 100% der Tumorzellen positiv (3).

Bei **Claudin-1** (canine Proben) wurde sowohl die Färbeintensität als auch die Färbeverteilung bewertet. Die Färbeintensität wurde nach keine (0), schwache (1), mittelstarke (2) und starke (3) Färbung der Tumorzellen gradiert. Bei der Verteilung wurde zwischen multifokal (1) und diffus (2) unterschieden.

ErbB3 (Her3); (humane Proben) wurde wie folgt eingeteilt: negativ, d.h. 0% der Kerne positiv (0), schwach, d.h. 0-80% der Kerne positiv (1), mittel, d.h. > 80% bis < 100% der Kerne positiv (2), stark, d.h. 100% der Kerne positiv (3).

pMEK wurde bei den humanen Tumoren nach keine Anfärbung (0), schwach, d.h. > 0% bis 70% der Tumorzellen positiv (1), mittel, d.h. > 70% der Tumorzellen schwach bis mittelmäßig intensiv positiv (2), stark, d.h. > 70% der Tumorzellen mit einer starken Intensität positiv (3) eingeteilt.

Neuregulin-1 und Periaxin beim Menschen wurden wie folgt nach der Färbeintensität gradiert: keine Anfärbung (0), schwache (1), mittelstarke (2) und starke (3) Tumorzellfärbung.

Neuregulin-1 beim Hund wurde wie folgt gradiert: keine Anfärbung (0), schwache Färbung von 100% der Tumorzellen (1), schwach bis mittelstarke Färbung von 33-66% der Tumorzellen (2), mittlere bis starke Anfärbung von > 66% bis < 100% der Tumorzellen (3) und starke Färbung von 100% der Tumorzellen (4).

Nervenwachstumsfaktorrezeptor (NGFR) wurde bei beiden Spezies sowohl nach der Färbeintensität als auch nach der Verteilung bewertet. Die Intensität nach negativ (0),

schwach (1), mittel (2) und stark (3), die Färbeverteilung nach negativ (0), einzelne Zellen (0-20%); (1), fokal (20-50%); (2), multifokal (> 50 bis < 100%); (3), diffus (100%); (4).

Rho (humane Proben) wurde nach keine Anfärbung (0), schwach, d.h. 0-33% der Zellen positiv (1), mittel, d.h. > 33% bis 70% der Zellen positiv (2), stark, d.h. > 70-100% der Tumorzellen positiv (3) gradiert.

3.2.6.3 Quantitativ

Für die Mastzellichte wurden bei den humanen Proben alle **Mastzellen** pro TMA-Spot (0,79 mm²) ausgezählt. Fehlte ein Teil der Untersuchungsfläche oder wurde er durch andere Strukturen (z. B. Fett) verdrängt, wurde die Anzahl der Zellen auf die Gesamtfläche des TMA-Spots hochgerechnet. Bei den caninen Proben wurde eine Stelle mit hoher Mastzellichte gesucht und dort alle Mastzellen in einem Gesichtsfeld in der 20-fachen Vergrößerung (0,46 mm²) ausgezählt. Um die Anzahl der Mastzellen vergleichbar zu machen, wurde die Anzahl der Mastzellen bei den cMPNST mit 1,72 multipliziert (Anzahl Mastzellen * (0,79 mm² / 0,46 mm²)).

Die Anzahl der **Mitosefiguren** wurden bei den caninen und humanen Proben auf 10 Gesichtsfeldern in der 40-fachen Vergrößerung (0,19 mm²) bestimmt.

Die freien **Neurofilament**-positiven Axone (2) wurden bei den humanen Proben pro TMA-Spot (0,79 mm²) ausgezählt. Bei den caninen Proben wurde eine Stelle mit hoher Axondichte gesucht und dort alle positiven, einzeln liegenden Axone (2) in einem Gesichtsfeld der 20-fachen Vergrößerung (0,46 mm²) ausgezählt. Um die Anzahl der freien Neurofilament-positiven Axone vergleichbar zu machen, wurde die Anzahl Axone bei den cMPNST mit 1,72 multipliziert (Anzahl Axone * (0,79 mm² / 0,46 mm²)).

Die Proliferation und die Zelldichte wurde in der Region der höchsten Dichte **Ki-67**-positiver Nuclei bestimmt. Bei den humanen und caninen Proben wurden alle positiven und negativen Nuclei in einem Gesichtsfeld der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²) ausgezählt. Der Proliferationsindex (Ki-67-Index) wurde als Prozentzahl der Ki-67-gefärbten Zellkerne im Verhältnis zu allen Zellkernen in dem Gesichtsfeld ermittelt.

Die **S100**-positiven Tumorzellen (1) wurden bei den humanen Proben auf einem Gesichtsfeld der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²) ausgezählt. Zusätzlich wurde ein Index berechnet, als Prozentzahl der S100-gefärbten Zellkerne im Verhältnis zu allen Zellkernen in dem entsprechenden Gesichtsfeld.

Bei der **Sox9**-, **mTor**- und **Pax7**-Färbung (humane Proben) wurden in einem Bereich hoher Färbedichte alle positiven und negativen Nuclei in einem Gesichtsfeld der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²) ausgezählt. Zusätzlich wurden für alle drei Marker

Indices berechnet als Prozentzahl der Sox9- bzw. mTor- bzw. Pax7-gefärbten Zellkerne im Verhältnis zu allen Zellkernen in dem entsprechenden Gesichtsfeld. Da die verschiedenen Tumorsubtypen einen unterschiedlich hohen Gehalt an Tumorzellen aufweisen, wurde darüber hinaus ein Index berechnet, der sich auf den Anteil der S100-positiven Zellen - somit der Tumorzellen - bezieht. Die MPNST sind davon ausgeschlossen, da sie häufig S100-negativ sind.

Berechnung der auf S100-bezogenen Indices:

$$\text{Sox9_vs_}\%S100 = \text{Sox9- Index} \times \frac{\text{S100pos}}{\text{S100pos} + \text{S100neg}}$$

$$\text{mTor_vs_}\%S100 = \text{mTor-Index} \times \frac{\text{S100pos}}{\text{S100pos} + \text{S100neg}}$$

$$\text{Pax7_vs_}\%S100 = \text{Pax7-Index} \times \frac{\text{S100pos}}{\text{S100pos} + \text{S100neg}}$$

Zur Bestimmung der **Zellularität** wurden bei den caninen und humanen Proben alle positiven Zellkerne in einem Gesichtsfeld der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²) ausgezählt.

3.2.6.4 Graduierungsschema Sarkome

Alle in dieser Studie untersuchten Sarkome, sowohl humane als auch canine, wurden nach den Kriterien der *Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer*, kurz FNCLCC-*Grading* System, eingestuft (Fletcher et al. 2002).

Tabelle 4 : FNCLCC-Grading, nach Fletcher et al. (2002)

FNCLCC grading system: definition of parameters	
Tumor differentiation	
Score 1	Sarcomas closely resembling normal adult mesenchymal tissue (e. g., low grade leiomyosarcoma).
Score 2:	Sarcomas for which histological typing is certain (e. g., myxoid liposarcoma).
Score 3:	Embryonal and undifferentiated sarcomas, sarcomas of doubtful type, synovial sarcomas, osteosarcomas
Mitotic count	
Score 1:	0-9 mitoses per 10 HPF*
Score 2:	10-19 mitoses per 10 HPF
Score 3:	>=20 mitoses per 10 HPF
Tumour necrosis	
Score 0:	no necrosis
Score 1:	< 50% tumour necrosis
Score 2:	>= 50% tumour necrosis
Histological grade	
Grade 1:	total score 2,3
Grade 2:	total score 4,5
Grade 3:	total score 6, 7, 8
Modified from Trojani et al. *A high power field (HPF) measures 0.1734 mm ²	

Das FNCLCC System basiert auf einer Punktzahl, die durch die Evaluation von drei Parametern berechnet wird: das Ausmaß der Tumordifferenzierung, die Mitoserate und der Umfang der Nekrose. Jeder Parameter wird für sich bewertet und eine Punktzahl wird jeweils vergeben. Am Ende werden die entsprechenden Zahlen addiert. Das Ergebnis ist eine summierte Punktzahl, auf Grund derer ein Tumorgad (I-III) vergeben wird (Fletcher et al. 2002). Höher gradierte Tumore neigen dazu schneller zu wachsen und zu metastasieren als niedrig gradierte.

3.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Ehningen).

Zur Beschreibung der Verteilung wurden bei metrischen Variablen, mit einer Ausnahme, der Median und die Quartile berechnet, da die Annahme einer Normalverteilung nicht hinreichend erfüllt war. Diese Werte wurden in den Ergebnissen wie folgt angegeben: Median (25%-Perzentil/75%-Perzentil). Für das Alter bei Probenentnahme konnte die Annahme einer Normalverteilung hinreichend erfüllt werden, so dass bei dieser Variablen der Mittelwert angegeben wurde.

Zur Beschreibung der Verteilung wurden für nominal- und ordinalskalierte Variablen die Prozente der jeweiligen Ausprägung bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten

Tumore und Tumorsubtypen berechnet. Zusätzlich sind hinter den Prozentzahlen in Klammern die absoluten Zahlen im Verhältnis zur Gesamtzahl angegeben. Da es bei den immunhistochemischen Färbungen der Histoschnitte immer wieder zu Gewebsverlusten kam, konnten in den meisten Fällen nicht alle in dieser Studie untersuchten Proben ausgewertet werden. Die Prozentzahlen beziehen sich daher auf die ausgewerteten Proben und werden mit „n“ angegeben. Um deutlich zu machen, welcher Anteil der Grundgesamtheit nicht ausgewertet werden konnte, wird die absolute und die Prozentzahl bezogen auf die Grundgesamtheit an der jeweiligen Stelle aufgeführt.

Die statistische Hypothese „die Ergebnisse der fünf Tumorsubgruppen folgen im Mittel der gleichen Verteilung“ wurde bei nominal- und ordinalskalierten Variablen standardgemäß mit dem χ^2 -Test überprüft. Bei den metrischen Variablen wurden standardmäßig nicht-parametrische Tests (Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U-Test) zur Auswertung herangezogen, da die Annahme einer Normalverteilung nicht hinreichend erfüllt war. Bei mittlerem Alter bei Probenentnahme wurde der Welch-Test statt des t-Tests als statistischer Test angewandt, da man zwar von einer Normalverteilung ausgehen konnte, jedoch nicht von einer Varianzgleichheit. Das Signifikanzniveau wurde für alle Analysen auf 5% festgelegt.

Um Unterschiede zwischen Tumorgruppen zu analysieren, wurden Kreuztabellen betrachtet, die nur jeweils 2 zu vergleichende Gruppen enthielten. Die Gruppen wurden als unterschiedlich bewertet, wenn der p-Wert des χ^2 -Tests unter 0,05 lag.

Der Kruskal-Wallis-Test überprüft die Nullhypothese, dass die Verteilung von mehr als 2 Gruppen im Mittel übereinstimmt. Wenn die Nullhypothese abgelehnt werden konnte, wurden die Tumorsubgruppen zu Untergruppen (KNF/DNF/DPNF vs. PNF oder MPNST) zusammengefasst und paarweise Unterschiede mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Die Korrelation (r) wurde bei nominal- und ordinalskalierten Variablen nach Kendall-Tau-b berechnet. Der Korrelationswert liegt dabei zwischen - 1 und + 1. - 1 spricht für einen vollständig negativen linearen Zusammenhang, + 1 für einen vollständig positiven linearen Zusammenhang. Bei metrischen Daten wurde die Korrelation (r) nach Pearson berechnet. Auch hier liegt der Korrelationswert zwischen - 1 und + 1. Eine Korrelation wurde als gut bzw. stark bewertet, wenn sie bei $\geq 0,5$ lag und als gering bzw. schlecht, wenn sie bei $< 0,5$ lag.

Auf eine α -Korrektur wurde verzichtet, da alle Analysen im Sinne einer explorativen Statistik zu verstehen sind. Aus diesem Grund, und weil es sich bei den Daten nicht um

eine repräsentative Stichprobe handelt, können die Ergebnisse nicht ohne weiteres verallgemeinert werden.

Für die graphische Darstellung wurden entweder Balkendiagramme oder Boxplots verwendet. Signifikante Unterschiede wurden in den Graphen als Sterne dargestellt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wird mit einem Stern, ein p-Wert von $< 0,01$ mit zwei Sternen und ein p-Wert von $< 0,001$ mit drei Sternen angegeben. Diese Sterne wurden oberhalb eines horizontalen Strichs gezeichnet, der sich über den betreffenden Balken bzw. Boxen befindet. Betreffen die signifikanten Unterschiede nur zwei Tumorguppen, zeigen vertikale Striche an den Enden des horizontalen Strichs die betroffenen Gruppen an. Betreffen die signifikanten Unterschiede mehrere Gruppen zusammen gegenüber einer einzelnen Gruppe, befinden sich nur ein vertikaler Strich über der einzelnen Gruppe.

Ein Boxplot beschreibt die Verteilung der Werte, es werden der Median, Quartile, sowie Ausreißer und Extremwerte visualisiert. Er besteht aus einem Rechteck (Box) und zwei Linien (Whisker), die das Rechteck verlängern. Exemplarisch wird in der folgenden Abbildung (Abb. 9) ein Boxplot dargestellt und erläutert.

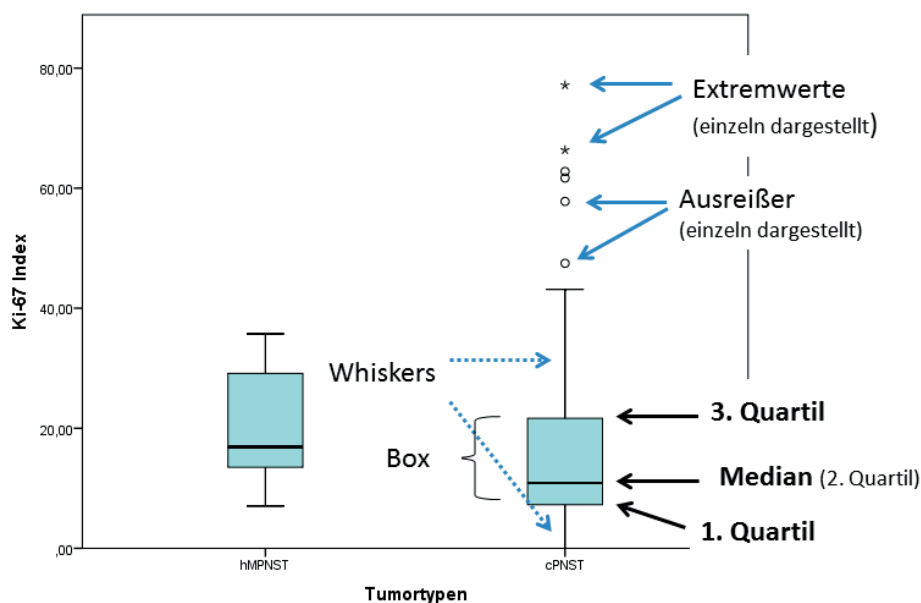


Abb. 9: Beispielbild Boxplot

Die Box bildet den Bereich der 50% mittleren Werte ab. Der Median wird als zentraler Strich in der Box angegeben. Der obere und untere Grenzstrich der Box stellen das 1. Quartil (25% der Werte sind kleiner) und das 3. Quartil (75% der Werte sind kleiner) dar. Die Whiskers kennzeichnen den größten bzw. kleinsten Wert, der noch nicht zu den Ausreißern oder Extremwerten gerechnet wird. Ausreißer sind Werte, deren Abstand vom 1. Quartil nach unten bzw. vom 3. Quartil nach oben zwischen dem 1,5- und 3-fachen der Boxhöhe liegt und werden als Kreise dargestellt. Extreme Werte haben einen Abstand

von mehr als dem Dreifachen der Boxhöhe von dem 1. bzw. 3. Quartil und werden als Sternchen dargestellt. Diese befinden sich über den Whiskers und unterscheiden sich somit von den Sternen, die die signifikanten Unterschiede anzeigen.

4 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der durchgeführten histologischen und immunhistologischen Untersuchungen und deren statistische Auswertung aufgeführt. Die numerischen Werte werden zur besseren Übersicht jeweils mit Bildern und Graphen ergänzt. Wenn keine Signifikanzen oder Korrelationen angegeben sind, waren die statistischen Tests nicht signifikant.

4.1 Klinische Daten

4.1.1 Humane Neurofibrome

Die 520 untersuchten humanen peripheren Nervenscheidentumore stammten von 385 Patienten, davon waren 54,4% Frauen und 43,8% Männer. Zu 9 Fällen (1,7%) lagen keine Angaben zum Geschlecht vor.

Tumorsubtypen und Alter bei Probenentnahme

Das mittlere Alter aller Patienten ($n = 513$) lag bei 30,9 Jahren. Zu 7 Fällen (1,8%) gab es keine Altersangaben. Betrachtet man die Tumortypen separat, lag der Altersmittelwert der KNF ($n = 136$) bei 39,4, für DNF ($n = 123$) bei 32, für DPNF ($n = 113$) bei 25,6, für PNF ($n = 125$) bei 24,6, für MPNST ($n = 16$) bei 38 Jahren. Diese Werte sind in Abb. 10 als Säulendiagramm dargestellt.

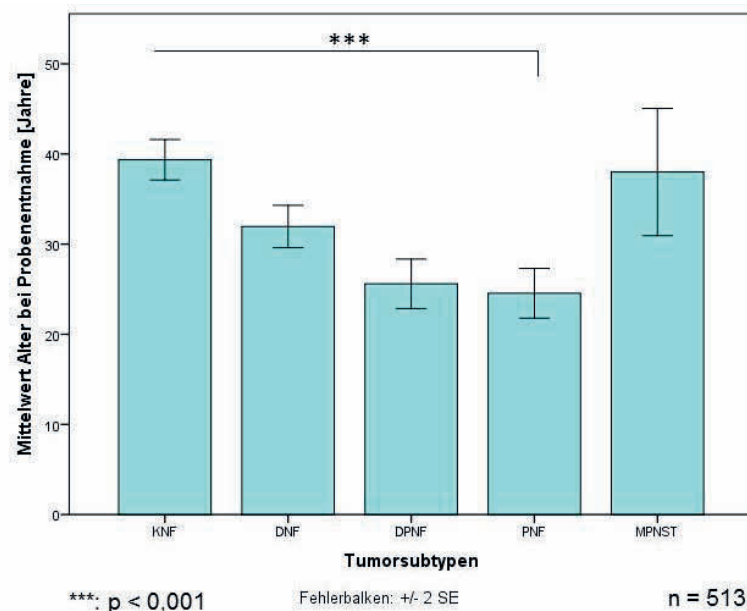


Abb. 10: Säulendiagramm; mittleres Alter in humanen PNST

Der Welch-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den gutartigen Neurofibromen (KNF/DNF/DPNF) und den PNF ($p < 0,001$). Patienten mit plexiformen Neurofibromen waren somit signifikant jünger als Patienten, die einen der anderen

gutartigen Neurofibrome (KNF, DNF, DPNF) aufwiesen. Der t-Test konnte nicht angewendet werden, da der Levene-Test signifikant war (Signifikanz > 0,05) und man somit nicht von einer Varianzgleichheit ausgehen konnte.

Tumorsubtypen und Lokalisation

Bei der Lokalisation der Tumore wurde zwischen Kopf/Hals, Rumpf und den Extremitäten unterschieden. Von den in dieser Studie untersuchten humanen Neurofibromen und MPNST (n = 520), lagen zu 66 Fällen (12,7%) keine Angaben zur Lokalisation vor. Daraus ergibt sich eine Grundgesamtheit von n = 454, von denen sich 33% (150/454) an Kopf/Hals, 40,5% (184/454) am Rumpf und 26,4% (120/454) an den Extremitäten befanden.

Im Vergleich der Tumorsubtypen untereinander kommen die **KNF** (n = 114) zu 19,3% (22/114) an Kopf/Hals, zu 57% (65/114) am Rumpf und zu 23,7% (27/114) an den Extremitäten vor; die **DNF** (n = 109) zu 41,3% (45/109) an Kopf/Hals, 22,9% (25/109) am Rumpf und zu 35,8% (39/104) an den Extremitäten; die **DPNF** (n = 108) zu 32,4% (35/108) an Kopf/Hals, 46,3% (50/108) am Rumpf und zu 21,3% (23/108) an den Extremitäten; die **PNF** (n = 110) zu 43,6% (48/110) an Kopf/Hals, zu 32,7% (36/110) am Rumpf und zu 23,6% (26/110) an den Extremitäten; die **MPNST** (n = 13) zu 0% an Kopf/Hals, 61,5% (8/13) am Rumpf und 38,5% (5/13) an den Extremitäten. Diese Werte sind in Abb. 11 dargestellt.

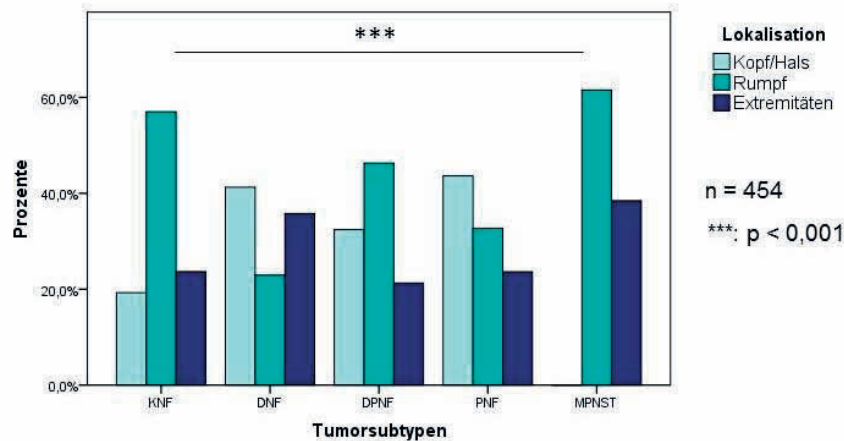


Abb. 11: Säulendiagramm; Tumorlokalisierung in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der Tumorlokalisierung innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Tumorsubtypen in Bezug auf die Lokalisation (p < 0,001). Das heißt die Lokalisation der verschiedenen gutartigen humanen Neurofibrome und der MPNST unterschied sich signifikant.

4.1.2 Canine maligne periphere Nervenscheidentumore

Es wurden 75 canine Spindelzelltumore aus dem Archiv des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen untersucht. Aufgrund der Histomorphologie, der Anzahl von Mitosen und dem Vorkommen von Nekrosen wurden alle 75 Spindelzelltumore als Sarkome eingestuft.

An allen Tumoren wurden 12 verschiedenen Antikörpern getestet. Nach der Evaluation der Färbeergebnisse wurde entschieden, dass alle Tumore, die positiv für das saure Gliafaserprotein (GFAP) waren, als canine periphere Nervenscheidentumore einzustufen sind. GFAP ist ein Hauptbestandteil von Intermediärfilamenten, die ausschließlich in Gliazellen vorkommen, und somit ausschließend für die infrage kommenden differenzialdiagnostischen Tumorentitäten sind. Alle 75 Spindelzellsarkome waren positiv für GFAP und wurden somit in die Evaluation als canine maligne periphere Nervenscheidentumore (cMPNST) aufgenommen.

Die cMPNST stammten von 75 verschiedenen Hundepatienten. 48% (36/75) waren weiblich und 48% (36/75) männlich, zu 3 Fällen (4%) lagen keine Angaben zum Geschlecht vor.

Das mittlere Alter bei Tumorresektion (n = 68) lag bei 10,8 Jahren, das Maximum bei 16 und das Minimum bei einem halben Jahr. Zu 7 Fällen (10,3%) lagen keine Altersangaben vor.

Bei der Lokalisation der Tumoren wurde zwischen Kopf/Hals, Rumpf und den Extremitäten unterschieden. Von allen cMPNST (n = 74) befanden sich 9,3% (7/74) an Kopf/Hals, 21,3% (16/74) am Rumpf und 68% (51/75) an den Extremitäten. Zu einem Fall (1,3%) lagen keine Angaben zur Lokalisation vor.

Von den untersuchten Hunden (n = 75) gehörten 45,3% 27 verschiedenen Rassen an. 36% waren Mischlinge und zu 14 Fällen (18,7%) lagen keine Angaben zur Rassezugehörigkeit vor. Eine detaillierte Übersicht der verschiedenen Rassen ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Ergebnisse

Tabelle 5: Übersicht Rassen cMPNST
(alphabetisch geordnet)

Rasse	Häufigkeit	Prozente (%)
American Bulldog	1	1,3
Appenzeller Sennenhund	1	1,3
Australian Shepherd	4	5,3
Beagle	1	1,3
Berner Sennenhund	1	1,3
Border Collie	1	1,3
Briard	2	2,7
Cocker Spaniel	1	1,3
Deutscher Schäferhund	1	1,3
Dobermann	1	1,3
Fox Terrier	1	1,3
Galgo Espanol	1	1,3
Großer Münsterländer	1	1,3
Harzer Fuchs	1	1,3
Hovawart	1	1,3
Husky	1	1,3
Jack Russel Terrier	1	1,3
Kleiner Münsterländer	2	2,7
Langhaardackel	1	1,3
Magyar Vizsla	1	1,3
Mischling	27	36
Rhodesian Ridgeback	1	1,3
Rottweiler	2	2,7
Siberian Husky	1	1,3
Tibet Terrier	2	2,7
Welsh Terrier	1	1,3
West Highland White Terrier	1	1,3
Yorkshire Terrier	1	1,3
Keine Rasseangaben	14	18,7
Gesamt	75	100

4.1.3 Vergleich Mensch – Hund: Tumortypen und Lokalisation

Vergleicht man die Tumorlokalisationen von humanen MPNST (hMPNST); (n = 13) und caninen MPNST (cMPNST); (n = 74), ergeben sich folgende Werte: 0% der **hMPNST** waren an Kopf/Hals lokalisiert, 53,8% (8/13) am Rumpf und 46,2% (5/13) an den Extremitäten. Von den **cMPNST** waren 9,5% (7/74) an Kopf/Hals, 21,6% (16/74) am Rumpf und 68,9% (51/75) an den Extremitäten lokalisiert. Diese Werte sind in Abb. 12 dargestellt.

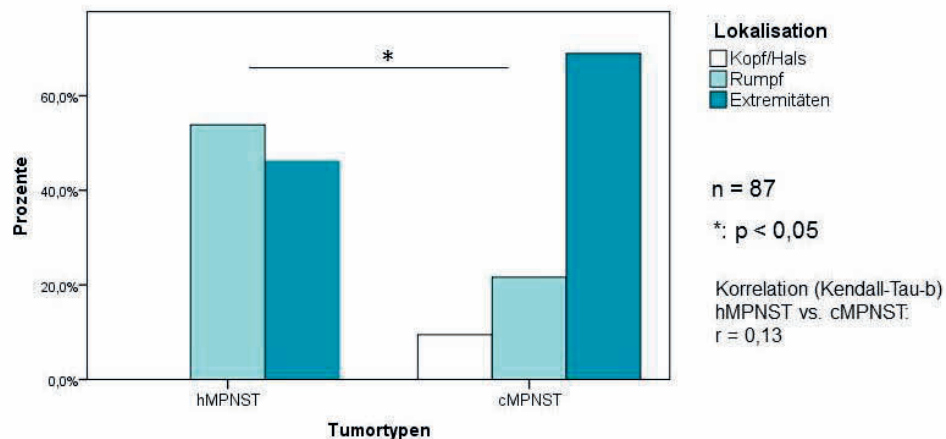


Abb. 12: Säulendiagramm; Vergleich der Tumorlokalisation in hMPNST und cMPNST
 Prozent = prozentualer Anteil der Lokalisation innerhalb der einzelnen MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Tumorlokalisation bei hMPNST und cMPNST ($p = 0,04$). Das heißt cMPNST kamen v. a. an den Extremitäten und hMPNST v. a. am Rumpf und den Extremitäten vor.

Die Korrelation (nach Kendall-Tau-b) zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und Tumorlokalisation lag bei $r = 0,13$. Somit korrelierte die Tumorlokalisation wenig mit dem Auftreten von hMPNST und cMPNST.

4.1.4 Vergleich Mensch – Hund: Tumortypen und Alter

Der Vergleich der Altersmittelwerte bei Tumoresektion zwischen Mensch und Hund ist schwierig, da verschiedene Spezies verglichen werden und Menschen viel älter als Hunde werden. Der Altersmittelwert bei Probenentnahme der humanen MPNST lag bei 38 Jahren, für die cMPNST bei 10,8 Jahren. Geht man davon aus, dass eher mittelgroße bis große Hunderassen Neurofibrome bekommen und rechnet den Altersmittelwert von 10,8 Hundejahren auf verschiedenen Internetseiten¹ in Menschenjahre um, ergibt sich ein Altersmittelwert der Hunde von 69 – 80 Menschenjahren.

4.2 Histomorphologie

4.2.1 Humane Neurofibrome

In dieser Studie wurden die humanen Neurofibrome ($n = 520$) in fünf Subtypen eingeteilt. Dabei wurden zum einen die in der Literaturübersicht beschriebenen Kriterien und Einteilungen (2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 und 2.1.5) verwendet. Darüber hinaus wurde das

¹ <http://www.talkteria.de/forum/topic-21054.html>, <http://rechneronline.de/hunde-katzen-jahre/>, <http://www.hundeseite.de/hundealter-rechner/>, <http://www.kirasoftware.com/Hundealter.php>

plexiform-diffuse Neurofibrom (2.1.4) als Subtyp angesehen, wie dies im Institut für Neuropathologie des UKE üblich ist.

Gemäß der beschriebenen Einteilung ergaben sich folgende Zahlen: 136 dermale (KNF), 123 diffuse (DNF), 113 plexiform-diffuse (DPNF), 126 plexiforme (PNF), und 22 maligne (MPNST) periphere Nervenscheidentumore.

4.2.2 Canine maligne periphere Nervenscheidentumore

Die WHO-Klassifikation beschreibt die Histomorphologie der cMPNST mit in Büscheln und Wirbeln wachsenden spindelförmigen Zellen, die in einem Stroma mit einem variablen Anteil kollagener Matrix angeordnet sind (Koestner et al. 1999). Diese Angaben treffen allerdings auch auf andere Spindelzelltumore zu (Mazzei et al. 2002; Klopffleisch et al. 2013).

In der aktuellen Literatur wird immer wieder zwischen verschiedenen Wachstumsmustern der cMPNST unterschieden und diese in Anlehnung an die Humanmedizin in verschiedene Subgruppen eingeteilt (Chijiwa et al. 2004; Schöniger und Summers 2009). Diese Einteilung ist jedoch uneinheitlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die untersuchten Tumorproben in drei verschiedene Gruppen nach ihrem Wachstumsmuster eingeteilt. Die Einteilung verlief in Anlehnung an die Parameter der Tumordifferenzierung des FNCLCC-*Gradings*.

In allen drei Gruppen kam ein variabler Anteil von Fibrose und myxoider Matrix vor, auch das Vorkommen von Nekrosen konnte bei keiner Gruppe eindeutig ausgeschlossen werden. Die prozentuale Verteilung des Vorkommens von Nekrosen sowie die mediane Mitoseanzahl ist bei dem jeweiligen Wachstumsmuster angegeben.

Zum **Wachstumsmuster-1** wurden Tumore zugeordnet, deren Wachstumsmuster weder Wirtel oder Wirbel noch eine Palisadenbildung der Kerne oder ein radspeichenartiges Wachstum der Zellen zeigte. Die Zellularität war mittel- bis geringgradig und es zeigte sich ein homogenes Bild spindelförmiger Zellen (Abb. 13).

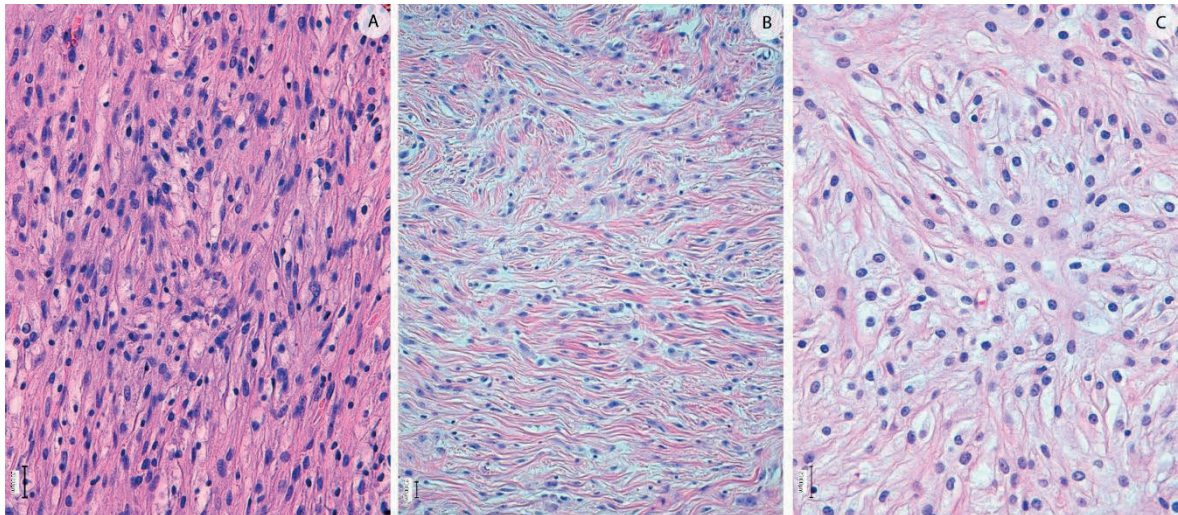


Abb. 13: Canine maligne periphere Nervenscheitentumore, Wachstumsmuster-1, H.E.

A: homogenes Bild spindelförmiger Zellen, Patient 06; **B:** Patient 25; **C:** Patient 72

Diesem Wachstumsmuster wurden 6,7% (5/75) der untersuchten cMPNST zugeordnet. 60% (3/5) zeigten keine und 40% (2/5) eine Nekrose. Die mediane Anzahl von Mitosen auf 10 Gesichtsfeldern in der 40-fachen Vergrößerung (0,19 mm²) lag bei 1 Mitose.

Die Tumore, die zum **Wachstumsmuster-2** zugeordnet wurden, zeigten in wenigstens einem kleinen Bereich Wirtel- und Wirbelbildung, radspeichenartiges Wachstum, Fischgrätenmuster und Palisadenbildung der Zellen und Kerne. Diese Wachstumsmuster sind als typisches Bild der cMPNST beschrieben (Goldschmidt und Hendrick 2002). Bei einigen Fällen trat plexiform-diffus-anmutendes Wachstum auf. Die Zellularität war variabel; Bereiche mit hoher Zellularität wechselten sich ab mit retikulären Bereichen geringer Zellularität (Abb. 14).

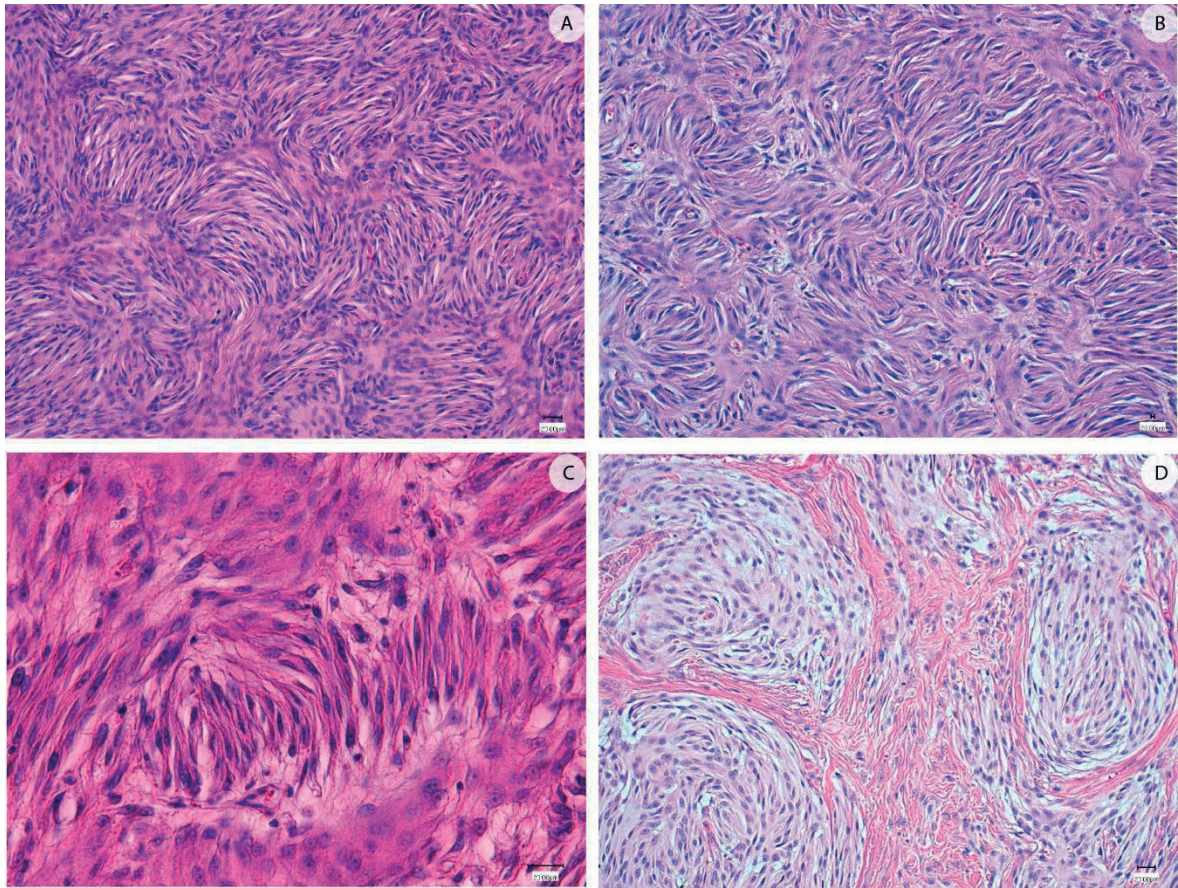


Abb. 14: Canine maligne periphere Nervenscheitentumore, Wachstumsmuster-2, H.E.

A: Wirtelbildung in cMPNST, Patient 67; **B:** kleine Wirtel und Fischgrätenmuster, Patient 08;

C: Pallisadenbildung der Zellen, Patient 08; **D:** plexiform-diffuses Wachstum, Patient 33

Diesem Wachstumsmuster wurden 70,7% (53/75) der cMPNST zugeordnet. 77,4% (41/53) zeigten keine und 22,6% (12/53) eine Nekrose. Die mediane Anzahl von Mitosen auf 10 Gesichtsfeldern in der 40-fachen Vergrößerung (0,19 mm²) lag bei 5.

In **Wachstumsmuster-3** wurden Tumore eingeordnet, deren Wachstumsbild homogen war und in dem keine für cMPNST typischen Wachstumsmuster auftraten. Die Zellularität war in mehr als 70% des Tumors hoch und die Zellkerne waren i. d. R. dicht gepackt, eher oval und basophil (Abb. 15).

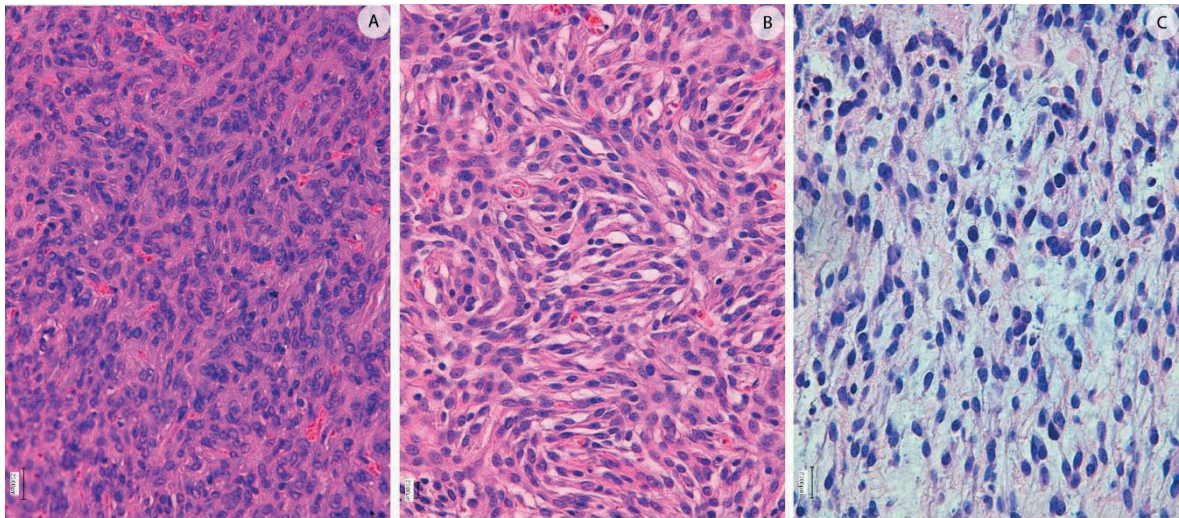


Abb. 15: Canine maligne periphere Nervenscheidentumore, Wachstumsmuster-3, H.E.

A: hohe Zellularität, blauzellig, Patient 04; **B:** hohe Zellularität, Patient 22; **C:** hohe Zellularität, Patient 27

Diesem Wachstumsmuster wurden 18,7% (17/75) der cMPNST zugeordnet. 82,4% (14/17) zeigten keine und 17,6% (2/17) eine Nekrose. Die mediane Anzahl von Mitosen auf 10 Gesichtsfeldern in der 40-fachen Vergrößerung (0,19 mm²) lag bei 7.

4.3 Immunhistologie

An den humanen peripheren Nervenscheidentumoren wurden 21 verschiedene Antikörper getestet, an den caninen peripheren Nervenscheidentumoren 12.

Aus technischen Gründen kam es bei den immunhistochemischen Färbungen immer wieder zu einem Gewebsverlust einzelner TMA-Spots. Auf Grund dessen konnten nicht immer alle Tumore ausgewertet werden und daher kommt es im Folgenden immer wieder zu Differenzen in der Gesamtfallzahl.

Tabelle 6 zeigt übersichtlich, welche zellulären Strukturen der Tumorzellen bei Menschen und Hunden von den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern angefärbt wurden.

Ergebnisse

Tabelle 6: Übersicht der gefärbten Strukturen der Tumorzellen je Antikörper
(alphabetisch geordnet)

Antikörper	Nukleus	Zytoplasma	Zellmembran
CD44			x
CD90		x	x
EMA			x
ErbB2		x	x
ErbB3		x	
GFAP		x	
Ki-67-Protein	x		
MEK		x	
pMEK		x	
mTor	x		
Neurofilament		x	
NGFR			x
NRG1			x
Pax7	x		
Periaxin		x	
Rho		x	
S100-Protein	x	x	
α -SMA		x	
Sox9	x		
Tryptase		x	

4.3.1 Mensch: Expressionsmuster humaner PNST

4.3.1.1 S100-Protein

Die humanen Neurofibrome und MPNST zeigten eine S100-Protein-Expression im Zytoplasma und den Kernen der Tumorzellen. Es wurde zwischen einer positiven und negativen Färbung unterschieden (Abb. 16).

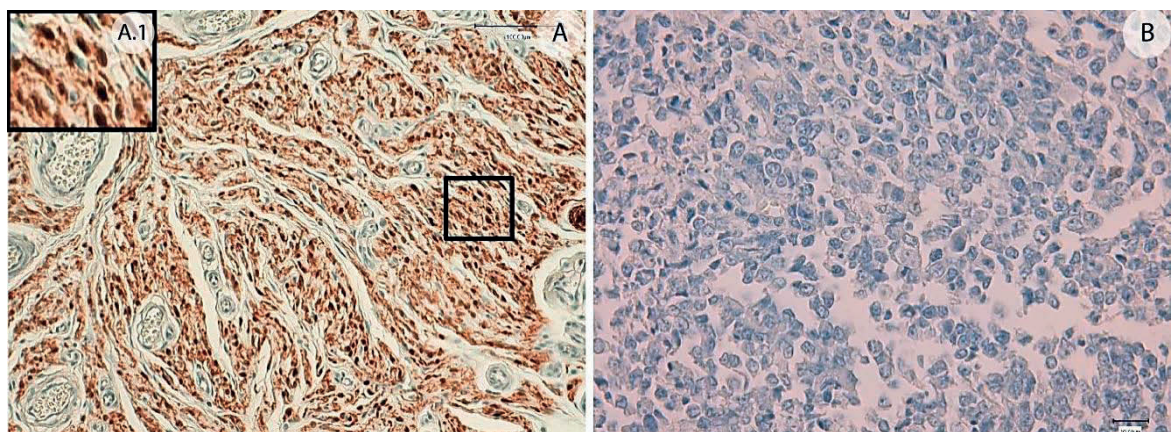


Abb. 16: S100-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: diffuses NF, S100-positiv, Patient 157; **A.1:** Insert von A, positive Tumorzellen, ursprüngliche Vergrößerung 20x; **B:** MPNST, S100-negativ, Patient 1016

Von den in dieser Studie untersuchten humanen Neurofibromen ($n = 498$) lagen aus technischen Gründen zu 30 Fällen (6,4%) keine Ergebnisse vor. Somit ergibt sich eine neue Grundgesamtheit von $n = 468$. 99,8% (467/468) der benignen waren S100-positiv, 0,2% (1 diffuses NF) negativ. Von den untersuchten MPNST ($n = 22$) waren 81,8% (18/22) positiv und 18,2% (4/22) negativ für das S100-Protein.

Der mediane Anteil der S100-positiven Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl pro ausgewerteten Fläche (0,12 mm²), lag bei den benignen und malignen Neurofibromen (n = 490) bei 73,8% (65,9%/79,7%). Betrachtet man die einzelnen Tumorsubgruppen für sich, lag der mediane Anteil S100-positiver Zellen für die **KNF** (n = 134) bei 74,5% (67,9%/80,3%), für die **DNF** (n = 108) bei 75,3% (68,1%/80,8%), für die **DPNF** (n = 107) bei 76,5% (69,2%/80%), für **PNF** (n = 119) bei 71,3% (65,8%/79,6%) und für die **MPNST** (n = 22) bei 7,8% (1,1%/23,9%). Diese Daten sind in Abb. 17 als Boxplot dargestellt.

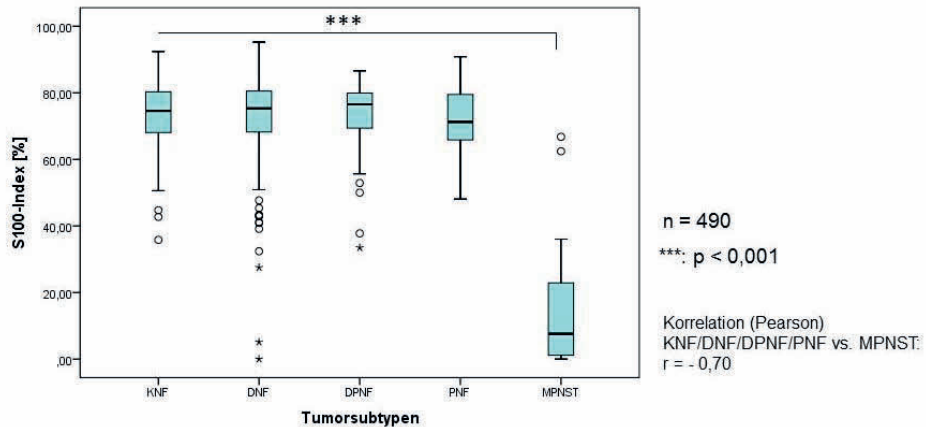


Abb. 17: Boxplot; S100-Index in humanen PNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den gutartigen Tumoren (KNF/DNF/DPNF/PNF) und den MPNST ($p < 0,001$) in Bezug auf die medianen Anteile der S100-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl pro ausgewertete Fläche. Das heißt MPNST hatten signifikant weniger S100-positive Zellen als die gutartigen Neurofibrome. Zwischen den gutartigen Subtypen gab es allerdings keine Unterschiede.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF/PNF vs. MPNST) und S100-Index lag bei $r = - 0,70$ (Pearsons Korrelationskoeffizient). Demnach bestand eine relativ hohe Korrelation zwischen einem hohen S100-Index und dem Vorkommen von gutartigen Neurofibromen.

4.3.1.2 Epitheliales Membranantigen

In den untersuchten Tumoren zeigten das Perineurium, unspezifische von uns so genannte „umwickelnde Strukturen“ und multifokal Zellen im Tumorgewebe eine Expression des Epithelialen Membranantigens (EMA); (Abb. 18). Bei den so genannten „umwickelnden Strukturen“ war nicht immer ersichtlich, was für Gebilde umwickelt wurden. Zum Teil handelte es sich um Gefäße oder Nerven.

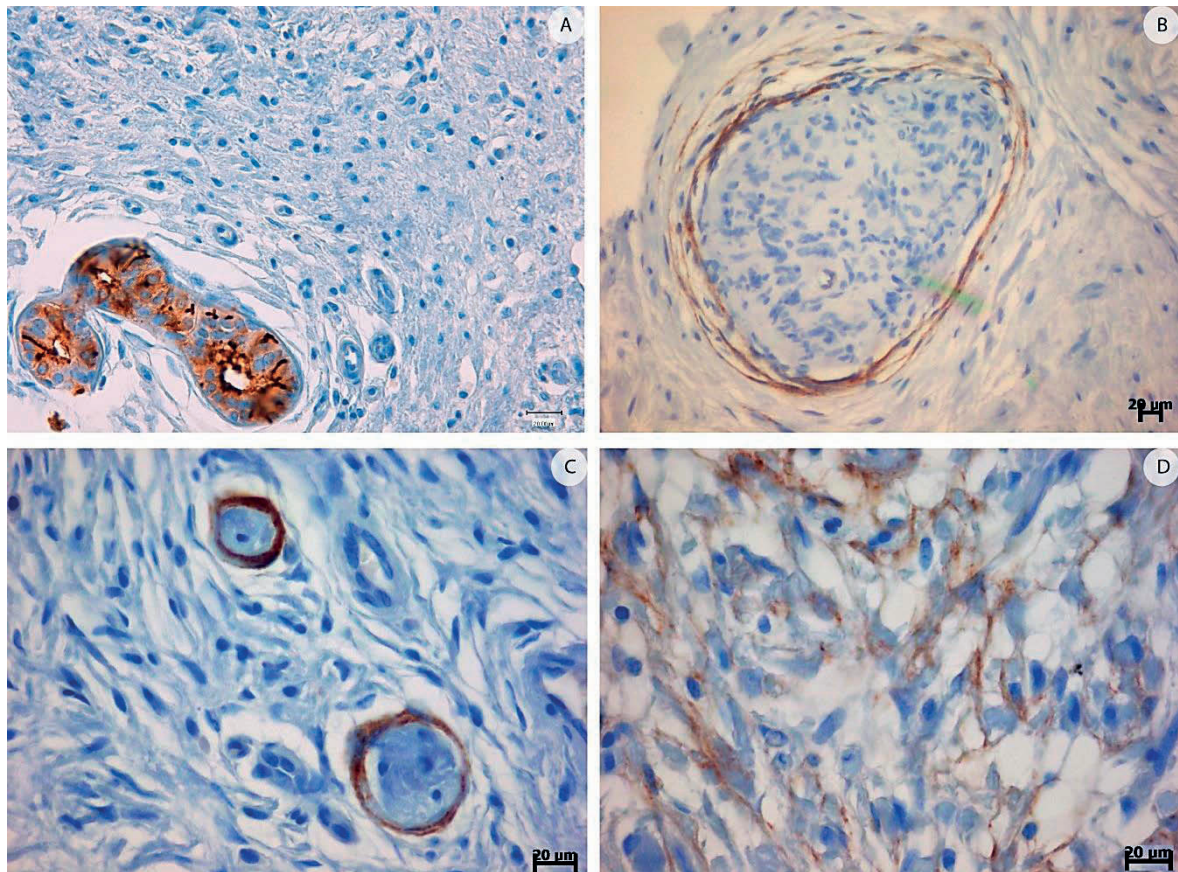


Abb. 18: EMA-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: diffuses NF, negativ, Drüsen positiv, Patient 314; **B:** plexiform-diffuses NF, positives Perineurium, Patient 370; **C:** diffuses NF, umwickelnde Strukturen, Patient 32; **D:** plexiformes NF, multifokale Membranfärbung von Zellen im Tumorgewebe, Patient 463

Von den in dieser Studie untersuchten humanen PNST (n = 520) lagen aus technischen Gründen zu 41 Fällen (7,9%) keine Ergebnisse vor. Daraus ergibt sich eine Grundgesamtheit von n = 479. Der größte Anteil (47,4%); (227/479) der humanen PNST (n = 479) zeigte keine EMA-Expression. Bei 29,9% (143/479) der Tumore zeigten das Perineurium oder andere umwickelnde Strukturen eine EMA-Expression. 14% (67/479) zeigten eine Färbung im Tumorgewebe. 8,8% (42/479) aller hPNST zeigten perineuriale Färbungen und zusätzlich Färbungen im Tumor.

PNF und KNF wiesen die meisten EMA-positiven Zellen im Tumorgewebe auf (Abb. 19). Bei den PNF (n = 115) waren es 21,7% und bei den KNF (n = 133) 17,3%. Betrachtet man die Tumortypen im Detail waren 36,8% (49/133) der **KNF** (n = 133) negativ für EMA, 26,3% (35/133) zeigten eine EMA-Expression im Perineurium (PN) u./od. umwickelnde Strukturen, bei 17,3% (23/133) zeigten Tumorzellen eine positive Membranfärbung und bei 19,5% (26/133) zeigten PN und Tumorzellen eine positive EMA-Reaktion. Bei den **DNF** (n = 105) waren 59% (62/105) negativ, bei 23,8% (25/105) zeigte das PN u./od. umwickelnde Strukturen, bei 12,4% (13/105) Tumorzellen und bei 4,8% (5/105) das PN und das Tumorgewebe eine positive Expression von EMA. Bei den **DPNF** (n = 106) waren

32,1% (34/106) negativ, 56,6% (60/106) zeigte eine EMA-Expression im PN u./od. umwickelnde Strukturen, 4,7% (5/106) zeigten eine EMA-Expression der Tumorzellen und bei 6,6% (7/106) waren PN und Tumorzellen positiv für EMA. Bei den **PNF** (n = 115) waren 54,8% (63/115) negativ, bei 20% (23/115) zeigten PN u./od. umwickelnde Strukturen, bei 21,7% (25/115) Tumorzellen und bei 3,5% (4/115) das PN und Tumorzellen eine positive Reaktion für EMA. Bei den **MPNST** (n = 20) waren 95% (19/20) negativ, bei 0% zeigten PN oder umwickelnde Strukturen, bei 5% (1/20) Tumorzellen und bei 0% PN und Tumorzellen eine positive EMA-Expression. Diese Werte sind in Abb. 19 dargestellt.

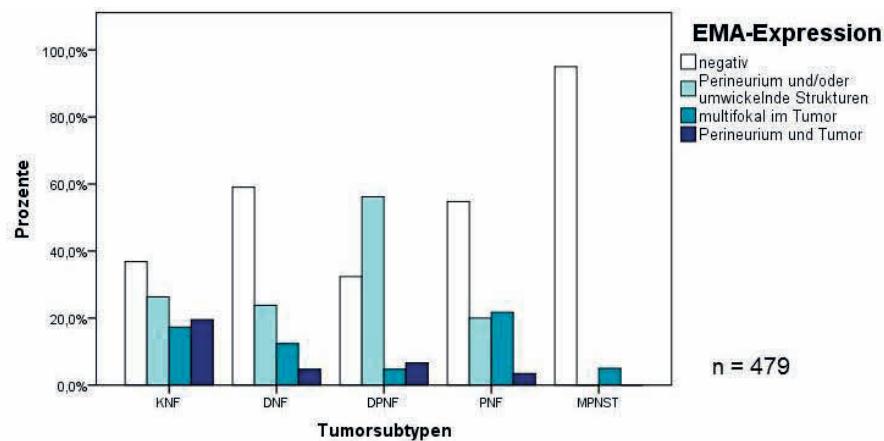


Abb. 19: Säulendiagramm; EMA-Expression in humanen PNST
 Prozent = prozentualer Anteil der EMA-Expressionsmuster innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Die statistischen Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede der EMA-Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Subtypen.

4.3.1.3 CD90

Eine CD90-Expression fand sich in den untersuchten Tumoren perivaskulär um Gefäße, in perineurialen Strukturen und multifokal in Tumorzellen (Abb. 20).

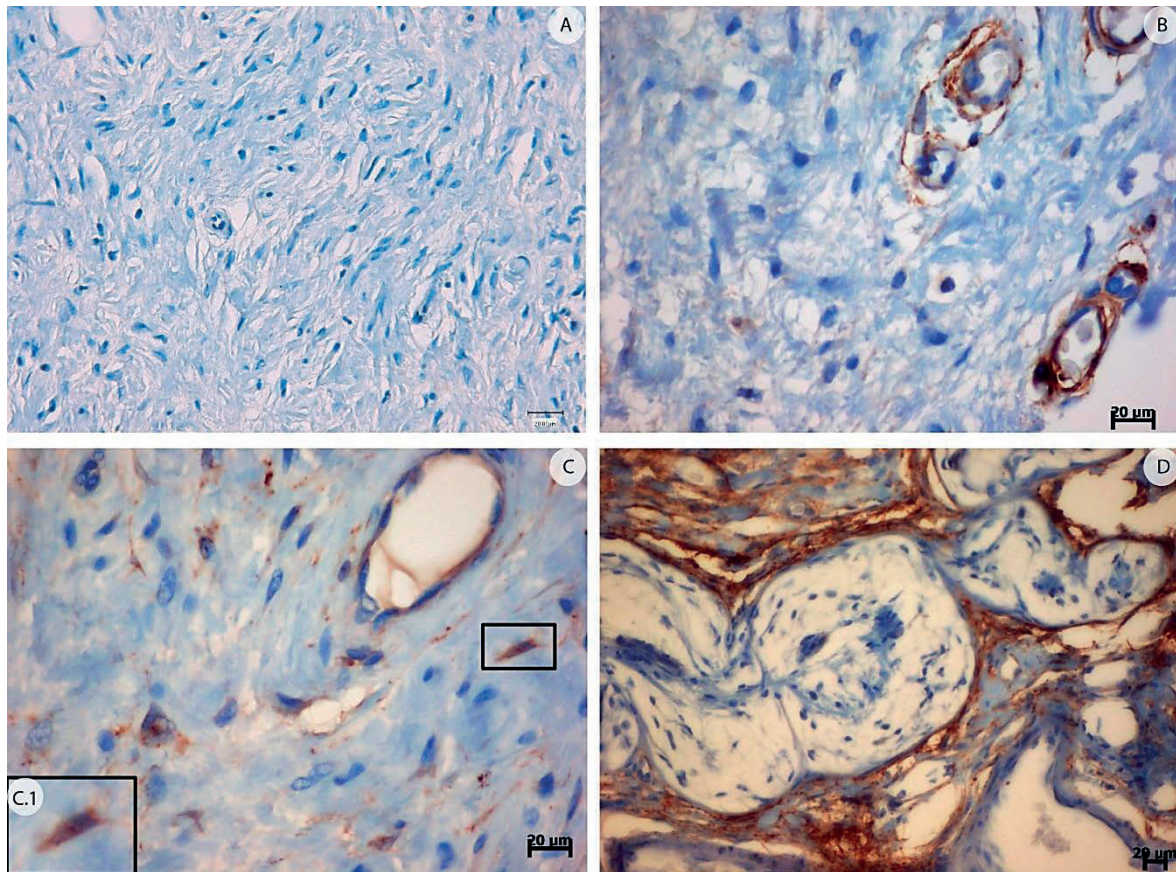


Abb. 20: CD90-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: kutanes NF, negativ, Patient 505; **B:** diffuses NF, perivaskuläre Färbung, Patient 435; **C:** diffuses NF, perivaskulär und Tumorzellen angefärbt, Patient 504/1; **C.1:** Insert von C, positives Zytoplasma einer Tumorzelle, ursprüngliche Vergrößerung 40x; **D:** plexiformes NF, perineuriale Anfärbung, Patient 381/2

Von den in dieser Studie untersuchten humanen benignen Neurofibromen und MPNST (n = 520) lagen aus technischen Gründen zu 45 Fällen (8,7%) keine Ergebnisse vor. Daraus ergibt sich eine Grundgesamtheit von n = 475, von denen 68,8% (327/475) eine Anfärbung für CD90 zeigten. 31,2% (148/475) der Tumore waren negativ für CD90.

Auf eine detaillierte Darstellung der verschiedenen CD90-Expression bezogen auf die Subtypen wird an dieser Stelle verzichtet, da mit dem Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD90 die Frage beantwortet werden sollte, wie groß die Fibroblastenfraktion in peripheren Nervenscheidentumoren ist. Somit weicht auch der Graph in Abb. 21 von der normalerweise in dieser Arbeit verwendeten Darstellungsweise ab.

Von den untersuchten peripheren Nervenscheidentumoren zeigte der Großteil (38,1%); (181/457) eine perivaskuläre/perineuriale Färbung. 22,7% (108/457) der Tumore zeigten eine perivaskuläre/perineuriale und eine netzartige Anfärbung des Tumorgewebes. Nur in 8% (38/457) der Fälle zeigten ausschließlich Tumorzellen eine CD90-Expression. Abb. 21 zeigt die Verteilung der Tumorsubtypen bezogen auf die verschiedenen Ausprägungen.

Fasst man die Tumorgruppen zusammen, in denen Tumorgewebe mit CD90 angefärbt wurde (perivaskuläre/perineurale und eine netzartige Anfärbung des Tumorgewebes), waren in 30,7% (108/475) der hPNST CD90-positive Tumorzellen enthalten, in 69,3% (367/475) der hPNST zeigten keine Tumorzellen eine CD90-Expression.

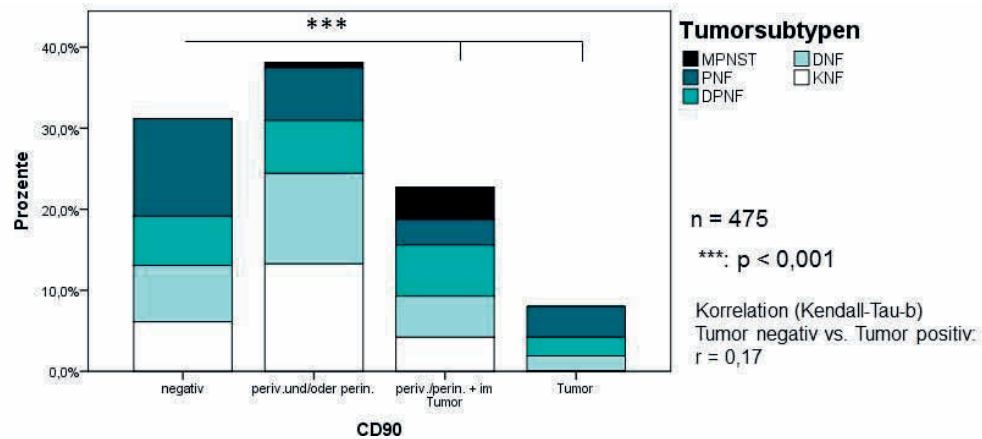


Abb. 21: Säulendiagramm; CD90-Expression in humanen PNST

periv. = perivaskulär, perin. = perineurial; Prozent = prozentuale Verteilung der PNST-Subtypen innerhalb der CD90-Expressionsmuster

Der Chi²-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den CD90-negativen und den CD90-positiven (perivaskuläre/perineurale und eine netzartige Anfärbung des Tumorgewebes) Tumoren ($p < 0,001$). Das heißt es gab signifikant mehr Tumore, die eine negative oder perivaskuläre/perineurale CD90-Expression zeigten als Tumore, mit CD90-positiven Tumorzellen.

4.3.1.4 Mastzelltryptase

Mastzellen wurden durch den gegen die Mastzelltryptase gerichteten Antikörper angefärbt und alle positiven Zellen auf einer Fläche von 0,79 mm² bestimmt (Abb. 22).

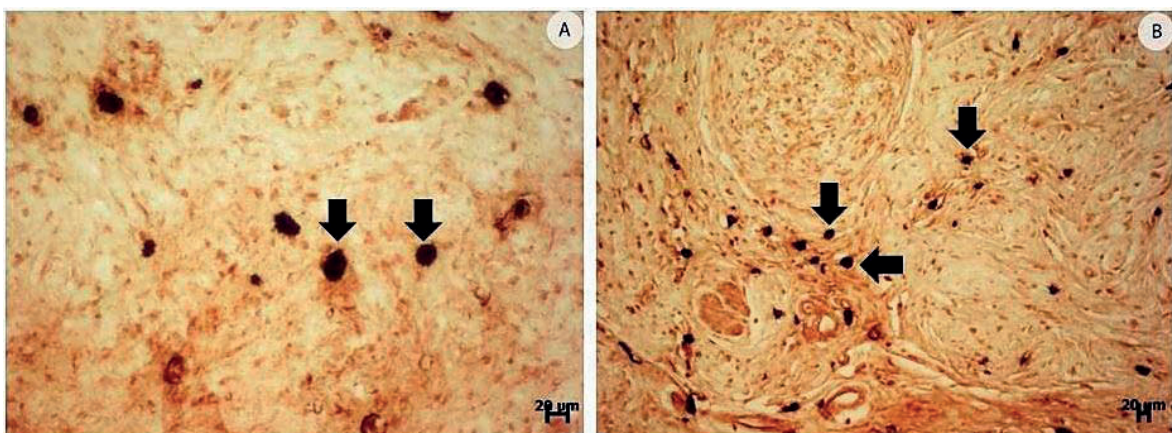


Abb. 22: Mastzellen in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: kutanes NF, Mastzellen (Pfeile), Patient 47/1; B: plexiform-diffuses NF, Mastzellen (Pfeile), Patient 486

Für alle benignen Neurofibrome und MPNST (n = 485) lag der Median bei 45 (13,8/66,8) Mastzellen. Für 35 Fälle (6,7%) lagen aus technischen Gründen keine Ergebnisse vor.

Betrachtet man die Tumorsubgruppen separat, lag der Median der Mastzellanzahl für die **KNF** (n = 131) bei 57 (41,5/73), die **DNF** (n = 117) bei 56,5 (44,75/78,25), die **DPNF** (n = 98) bei 58,5 (33,1/76,6), die **PNF** (n = 118) bei 8 (4/12) und für die **MPNST** (n = 21) bei 9 (0,5/28) Zellen. Diese Daten sind in Abb. 23 als Boxplot dargestellt.

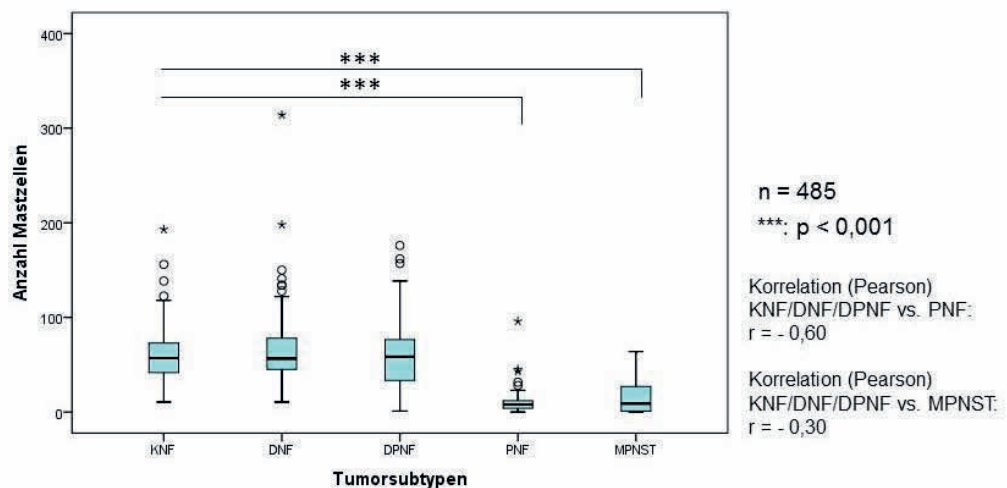


Abb. 23: Boxplot; Anzahl Mastzellen in humanen PNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte hoch signifikante Unterschiede zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) im Hinblick auf die mediane Anzahl von Mastzellen und zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p < 0,001$). Somit wiesen die plexiforme Neurofibrome und MPNST signifikant weniger Mastzellen als die gutartigen Neurofibrome auf einer Fläche von 0,79 mm² auf.

Die Korrelation (nach Pearson) zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und Anzahl der Mastzellen lag bei $r = -0,60$ und zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und Anzahl der Mastzellen bei $r = -0,30$. Somit korrelierte die Anzahl der Mastzellen relativ gut mit dem Vorkommen gutartiger Neurofibrome im Vergleich mit den PNF und relativ schlecht mit dem Vorkommen gutartiger Neurofibromen im Vergleich zu den MPNST.

4.3.1.5 Neurofilament

In den humanen peripheren Nervenscheidentumoren (hPNST) zeigten Axone in intakten Nerven, bei denen die Nervenstruktur inklusive Nervenfaszikel deutlich zu erkennen war, eine positive Neurofilament-Expression (Abb. 24 A). Darüber hinaus zeigten auch freie Axone ohne Nervenfaszikel eine positive Neurofilament-Reaktion (Abb. 24 B).

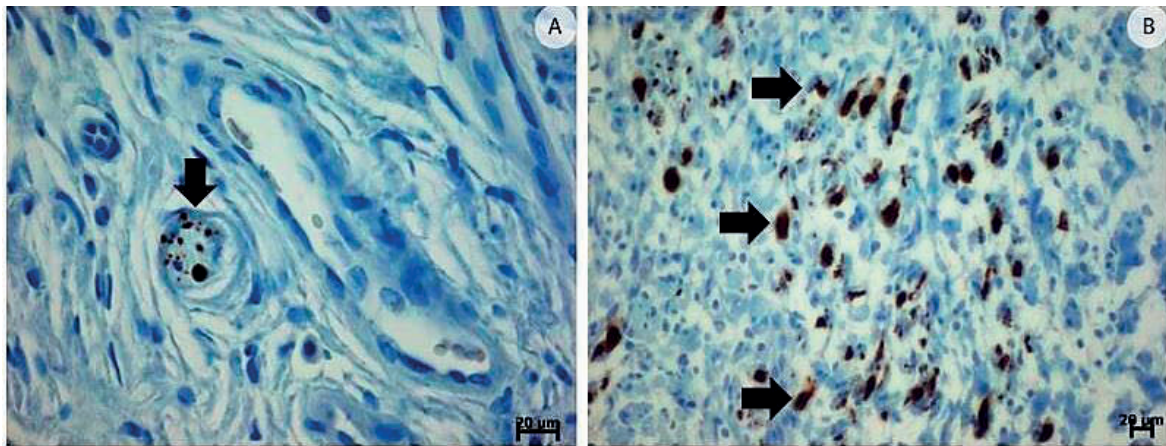


Abb. 24: Neurofilament-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: diffuses NF, Axone in intakten Nerven (Pfeil), Patient 32/3; **B:** plexiformes NF, einzelne Axone im Tumorgewebe (Pfeile), Patient 274

Zu 18 (3,4%) Fällen, der in dieser Studie untersuchten hPNST (n = 520), lagen aus technischen Gründen keine Ergebnisse vor. Von der sich daraus ergebenden Grundgesamtheit (n = 502), waren 45,6% (229/502) negativ für den gegen Neurofilament gerichteten Antikörper, 13,7% (69/502) hatten intakte Nerven im Tumorgewebe, und 40,6% (204/502) wiesen einzelne freie Axone im Tumorgewebe auf.

Innerhalb der einzelnen Tumorsubtypen zeigten 45,4% der KNF (n = 130), 13,9% der DNF (n = 122), 41,3% der DPNF (n = 109), 66,4% der PNF (n = 119) und 18,2% der MPNST (n = 22) freie Axone im Tumor. Im Detail betrachtet waren 33,8% (44/130) der **KNF** (n = 130) negativ, 20,8% (27/130) hatten Neurofilament-positive Nerven im Tumor und 45,4% (59/130) wiesen Neurofilament-positive freie Axone auf. Von den **DNF** (n = 122) waren 61,5% (75/122) negativ, 24,6% (30/122) hatten Neurofilament-positiv Nerven und 13,9% (17/122) freie Neurofilament-positive Axone im Gewebe. Von den **DPNF** (n = 109) waren 47,7% (52/109) negativ, 11% (12/109) wiesen positive Neurofilament-positive Nerven und 41,3% (45/109) freie Neurofilament-positive Axone im Gewebe auf. Von den **PNF** (n = 119) waren 33,6% (40/119) negativ, 0% zeigten Neurofilament-positive Nerven und 66,4% (79/119) freie Neurofilament-positive Axone im Tumor auf. Die **MPNST** (n = 22) waren zu 81,8% (18/22) negativ, wiesen 0% Neurofilament-positive Nerven und 18,2% (4/22) Neurofilament-positive Axone im Tumor auf. In Abb. 25 sind diese Werte als Säulendiagramm dargestellt.

Ergebnisse

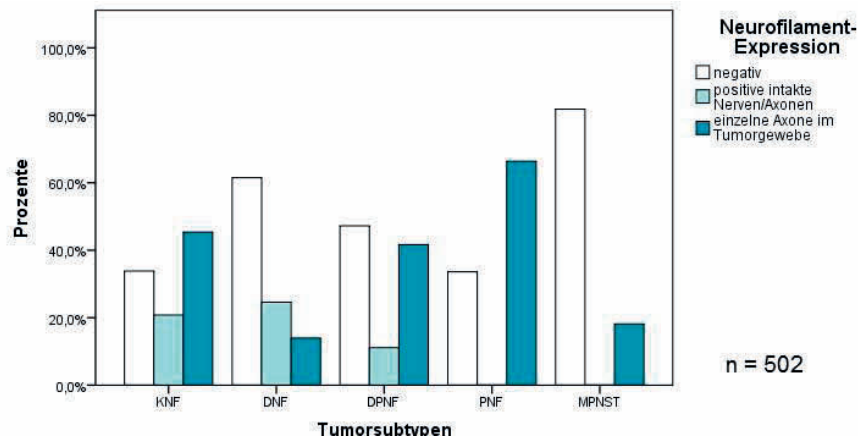


Abb. 25: Säulendiagramm; Neurofilament-Expression in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der Neurofilament-Expressionsmuster innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Die statistischen Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede der Neurofilament-Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Subtypen.

Bei den Tumoren, die einzelne freie Axone im Tumorgewebe zeigten ($n = 221$), wurde die Anzahl der Axone auf einer Fläche von $0,79 \text{ mm}^2$ bestimmt. Der Median der angefärbten Axone in diesen Neurofibromen lag bei 12 (5/35,5).

Betrachtet man auch hier die Tumorsubgruppen separat, haben **KNF** ($n = 69$) einen Median von 6 (3/11,5), **DNF** ($n = 23$) von 11 (5/40), **DPNF** ($n = 45$) von 12 (5/25), **PNF** ($n = 80$) von 35 (7/93,5) und **MPNST** ($n = 4$) von 33 (13,8/51,5) Axonen. Diese Werte sind in Abb. 26 als Boxplot dargestellt.

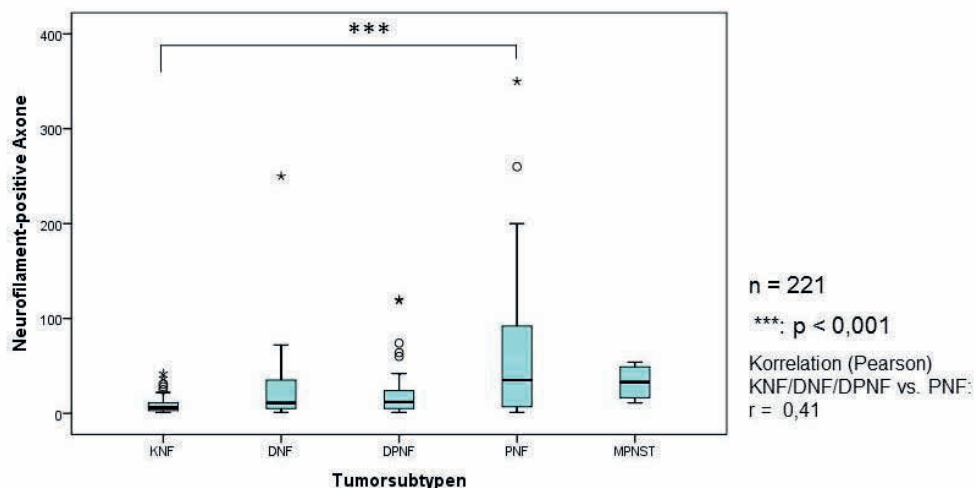


Abb. 26: Boxplot; Anzahl Neurofilament-positive Axone in humanen PNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen KNF und PNF im Hinblick auf die mediane Anzahl von Axonen ($p < 0,001$). Somit wiesen die kutanen Neurofibrome signifikant weniger Neurofilament-positive Axone als die plexiformen Neurofibrome auf einer Fläche von $0,79 \text{ mm}^2$ auf.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und Anzahl Neurofilament-positiven Axonen lag bei $r = 0,41$ (Pearsons Korrelationskoeffizient). Somit korrelierte die Axonanzahl, nach der in den Methoden festgelegten Kriterien, relativ gering mit dem Vorkommen von PNF.

4.3.2 Mensch: Differenzierungsmarker caniner MPNST

Zur Differenzierung der caninen malignen peripheren Nervenscheidentumore (cMPNST) von differenzialdiagnostischen Tumorentitäten (z. B. Hämangioperizytom, Fibrosarkom), wurden die folgenden vier Marker am Hund getestet. Um eine Aussage über das Vorkommen dieser Proteine in den humanen peripheren Nervenscheidentumoren machen zu können und zur besseren Vergleichbarkeit, wurden diese Marker auch an humanen Neurofibromen und hMPNST getestet.

4.3.2.1 *Periaxin*

Periaxin fand sich im Zytoplasma eines Großteils der humanen peripheren Nervenscheidentumore und zeigte eine negative bis starke Expression (Abb. 27). In DPNF wurden plexiforme Bereiche stärker angefärbt als diffuse (Abb. 27 C).

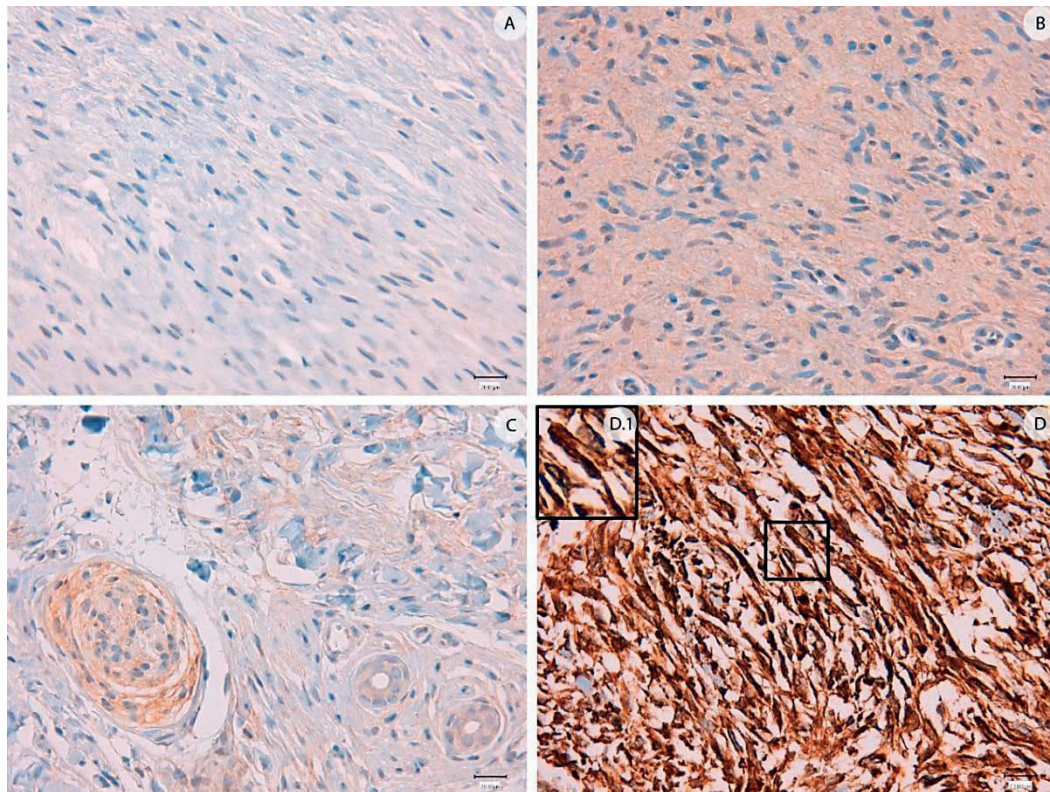


Abb. 27: Periaxin-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: diffuses NF, negativ, Patient 527/1; **B:** kutanes NF, schwach positiv, 698; **C:** plexiform-diffuses NF, mittel positiv, Patient 566; **D:** MPNST, stark positiv, Patient 1003; **D.1:** Insert von D, positives Zytoplasma, ursprüngliche Vergrößerung 40x

Von den in dieser Studie untersuchten humanen benignen Neurofibromen und MPNST (n = 520) lagen präparationsbedingt zu 19 Fällen (3,7%) keine Ergebnisse vor. Daraus ergibt sich eine Grundgesamtheit von n = 501, von denen 34,5% (173/501) keine Periaxin-Färbung zeigten, 34,5% (173/501) waren schwach, 24,2% (121/501) mittel und 6,8% (34/501) stark gefärbt.

Betrachtet man die Tumorsubtypen separat, zeigten die **KNF** (n = 129) zu 34,9% (45/129) eine negative und zu 65,1% (84/129) eine positive Periaxin-Expression. 43,4% (56/129) zeigten eine schwache, 17,1% (22/129) eine mittlere und 4,7% (6/129) eine starke Expression. Unter den **DNF** (n = 119) war fast die Hälfte (49,6%); (59/119) der Tumore negativ für Periaxin, 50,4% (60/119) waren positiv. 26,1% (31/129) der Tumoren zeigten eine schwache, 18,5% (22/129) eine mittlere und 5,9% (7/129) eine starke Periaxin-Expression. Die **DPNF** (n = 108) zeigten zu 36,1% (39/108) eine negative, zu 36,1% (39/119) eine schwache, zu 24,1% (26/129) eine mittlere und zu 3,7% (4/129) eine starke Periaxin-Reaktion (insgesamt 63,9% (69/108) positiv). Die **PNF** (n = 123) wiesen zu 22% (27/123) eine negative, zu 34,1% (42/123) eine schwache, zu 31,7% (39/123) eine mittlere und zu 12,2% (15/123) eine starke Periaxin-Reaktion auf (insgesamt 88% (96/123) positiv). Innerhalb der **MPNST** (n = 22) zeigten 13,6% (3/22) eine negative und 86,4% (19/22) eine positive Periaxin-Reaktion. 22,7% (5/22) wiesen eine schwache,

54,5% (12/22) eine mittlere und 9,1% (2/22) eine starke Periaxin-Expression auf. In Abb. 28 sind diese Werte als Säulendiagramm dargestellt.

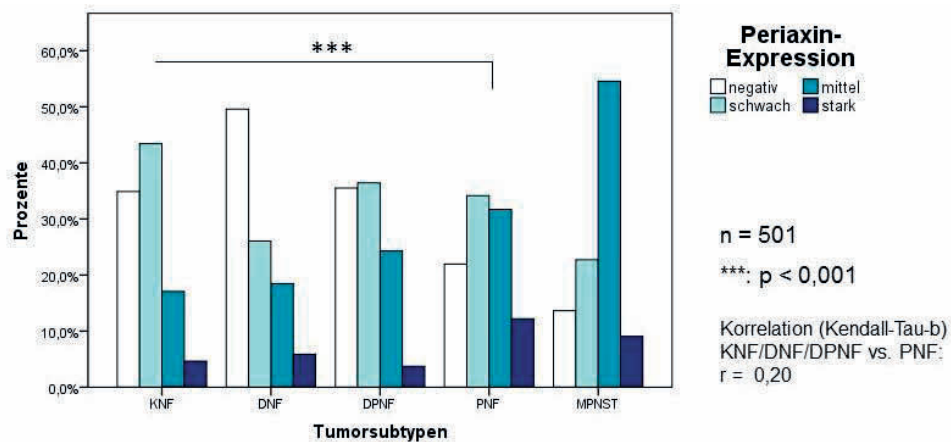


Abb. 28: Säulendiagramm; Periaxin-Expression in humanen PNST
 Prozent = prozentualer Anteil der Periaxin-Expressionsmuster innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF in Bezug auf die Periaxin-Expression ($p < 0,001$). Somit wiesen die plexiformen Neurofibrome meist eine stärkere Periaxin-Expression als die anderen benignen Neurofibrome auf.

Die Korrelation (Kendall-Tau-b) zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und der Periaxin-Expression lag bei $r = 0,2$. Somit korrelierte eine starke Periaxin-Expression relativ schlecht mit dem Vorkommen plexiformen Neurofibromen.

Weitere Strukturen und Zellen, die im Tumorgewebe eine unspezifische Periaxin-Reaktion zeigten, waren Mast- und Endothelzellen, Drüsen und Nervenfaszikel.

4.3.2.2 α -Smooth Muscle Actin

Zum Vergleich mit den Hundetumoren wurde ein TMA mit plexiformen Neurofibromen mit α -smooth muscle actin (α -SMA) gefärbt. Es wurden plexiforme Neurofibrome zum Vergleich mit den caninen MPNST gewählt, um zu testen, ob das Perineurium in humanen Neurofibromen eine α -SMA-Expression aufwies.

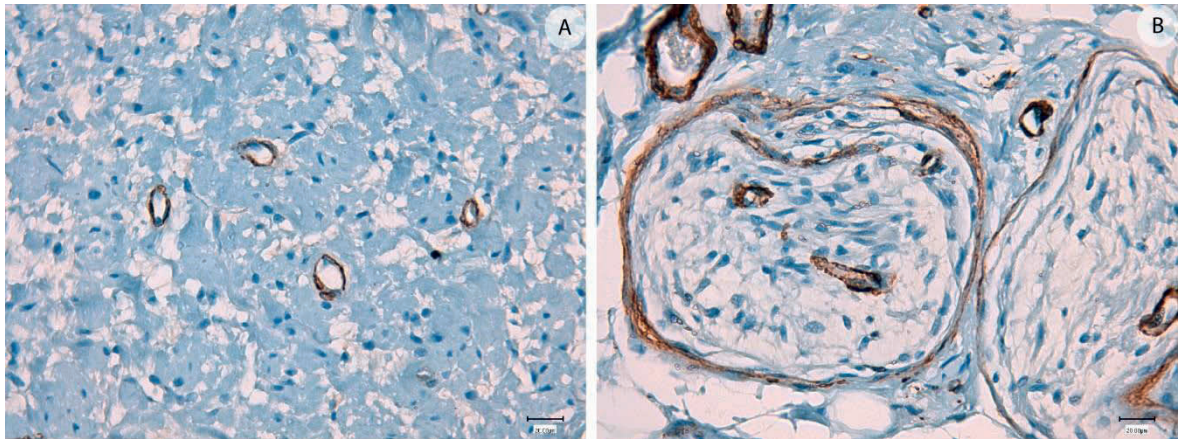


Abb. 29: α-SMA-Expression in plexiformen Neurofibromen

A: plexiformes NF, positive Gefäßwände, Patient 468; **B:** plexiformes NF, positives Perineurium, Patient 381/2

In 75,4% (49/65) der untersuchten plexiformen Neurofibrome ($n = 65$) wurden Gefäßwände angefärbt und in 23% (15/65) der Tumore war zusätzlich das Perineurium positiv. 1,6% (1/65) zeigte gar keine Anfärbung für α-SMA.

4.3.2.3 Saures Gliafaserprotein

Zum Vergleich mit den Hundetumoren wurde ein TMA mit jeweils 10 Tumoren jeder Tumorsubgruppe mit dem gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) gerichteten Antikörper gefärbt. Hier wurde eine Auswahl aus allen Subtypen getroffen, um einen Vergleich der cMPNST zu allen humanen Subtypen zu haben.

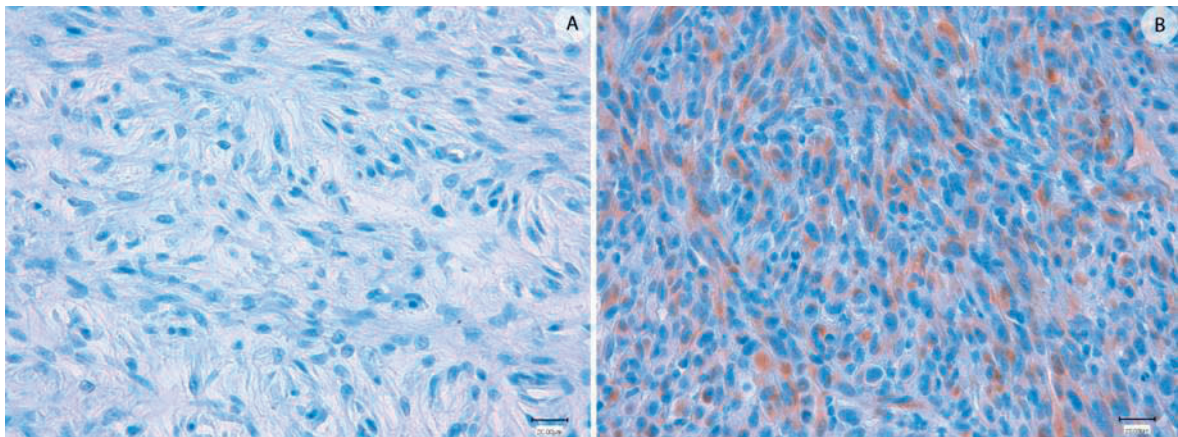


Abb. 30: GFAP-Expression in peripheren Nervenscheidentumoren

A: plexiform-diffuses NF, negativer Tumor, Patient 555/3; **B:** MPNST, positives Zytoplasma in Tumorzellen, Patient 1006

Während in 14,3% (1/7) der MPNST ($n = 7$) eine positive zytoplasmatische GFAP-Expression nachgewiesen wurde, konnte bei den KNF ($n = 9$), DNF ($n = 10$), DPNF ($n = 10$) und PNF ($n = 10$) keine positive GFAP-Reaktion nachgewiesen werden.

Vereinzelt färbte GFAP unspezifisch Mast- und Epithelzellen in den humanen PNST.

4.3.2.4 Nervenwachstumsfaktorrezeptor

Zum Vergleich mit den Hundetumoren wurde ein TMA mit jeweils 10 Tumoren jeder Tumorsubgruppe mit einem Antikörper, der den Nervenwachstumsfaktorrezeptor (NGFR) detektieren sollte, gefärbt. Es wurde eine Auswahl aus allen Neurofibromsubtypen getroffen, um einen Vergleich der NGFR-Expression in allen Subtypen mit den cMPNST machen zu können. Bei der Auswertung wurde zwischen Färbeintensität und Färbeverteilung unterschieden.

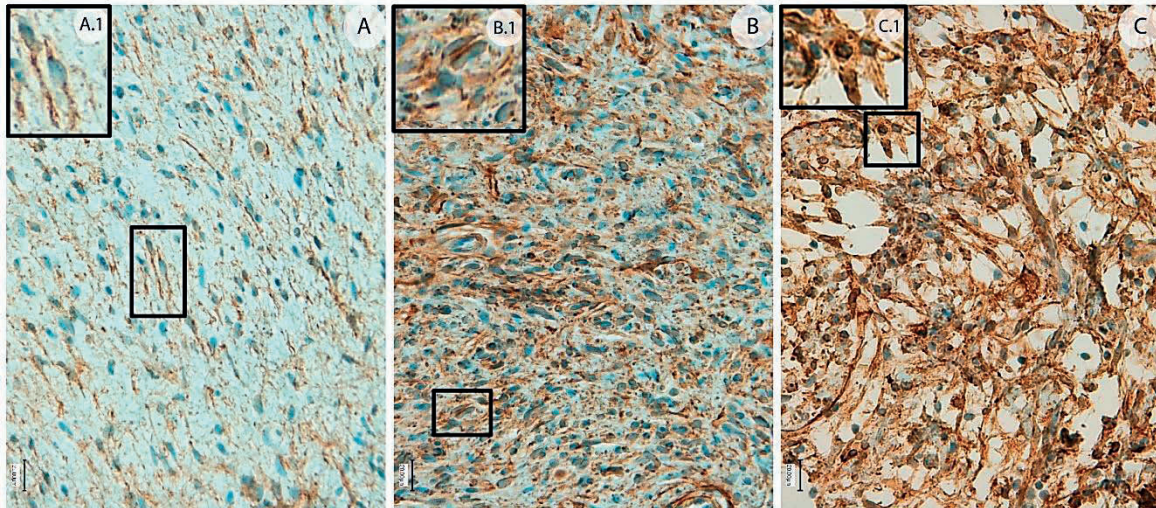


Abb. 31: NGFR-Expression in peripheren Nervenscheidentumoren

A: kutanes NF, schwach positiv, Patient 47/1; **A.1:** Insert von A, positives Zytoplasma, ursprüngliche Vergrößerung 40x; **B:** kutanes NF, mittel positiv, Patient 278/3; **B.1:** Insert von B, positives Zytoplasma, ursprüngliche Vergr. 40x; **C:** plexiformes NF, stark positiv, Patient 92; **C.1:** Insert von C, positives Zytoplasma, ursprüngliche Vergrößerung 40x

0% der humanen peripheren Nervenscheidentumore ($n = 38$) zeigten eine negative, 100% eine positive NGFR-Expression. 18,4% (7/35) zeigten eine schwache, 31,6% (12/35) eine mittlere und 50% (19/35) eine starke Expression des NGFR.

Betrachtet man die Tumorsubtypen einzeln, zeigten 28,6% (2/7) der **KNF** ($n = 7$) eine schwache, 57,1% (4/7) eine mittlere und 14,3% (1/7) eine starke Färbung. Bei den **DNF** ($n = 8$) zeigten 37,5% (3/8) eine schwache, 37,5% (3/8) eine mittlere und 25% (2/8) eine starke Färbung. Die **DPNF** ($n = 8$) waren zu 25% (2/8) schwach, 62,5% (5/8) mittel und 12,5% (1/8) stark gefärbt. Bei den **PNF** ($n = 10$) und den **MPNST** ($n = 5$) waren 100% stark gefärbt. Diese Werte sind in Abb. 32 dargestellt.

Bei der Färbeverteilung zeigten 10,8% (4/37) der hPNST ($n = 37$) eine fokale Anfärbung von 20-50% der Zellen, bei 43,2% (16/37) waren multifokal > 50 bis < 100% der Zellen gefärbt und 45,9% (17/37) zeigten eine 100% diffuse Anfärbung der Zellen.

Betrachtet man die einzelnen Tumorsubtypen separat, zeigten die **KNF** ($n = 7$) zu 14,3% (1/7) eine fokale, zu 85,7% (6/7) eine multifokale und zu 0% eine diffuse Anfärbung. Bei

den **DNF** (n = 8) waren 100% der Tumore diffus gefärbt. Die **DPNF** (n = 8) waren zu 12,5% (1/8) fokal, zu 62,5% (5/8) multifokal und zu 25% (2/8) diffus gefärbt. Die **PNF** (n = 9) zeigten zu 22,2% (2/9) eine fokale, zu 55,6% (5/9) eine multifokale und zu 22,2% (2/9) eine diffuse Anfärbung. Bei den **MPNST** waren 100% diffus gefärbt.

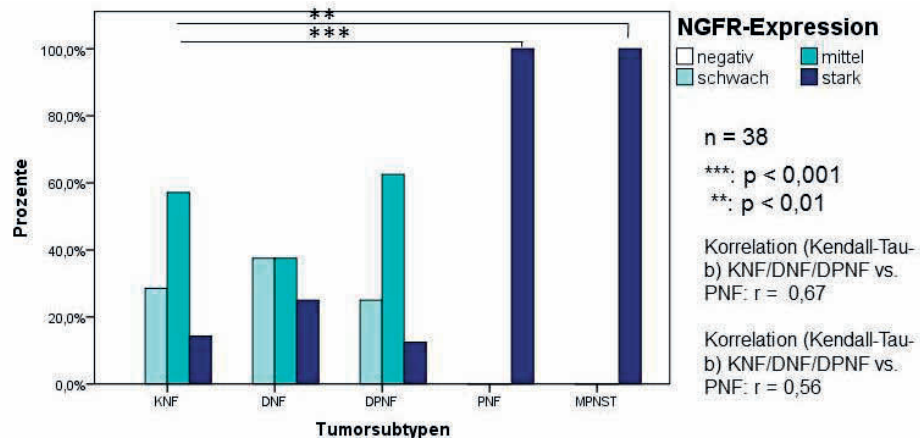


Abb. 32: Säulendiagramm; NGFR-Expression in humanen PNST
 Prozent = prozentualer Anteil der NGFR-Expressionsmuster innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte hoch signifikante Unterschiede zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF im Hinblick auf die NGFR-Expression (p < 0,001) und zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST (p = 0,002). Somit zeigten die plexiformen Neurofibrome und hMPNST eine signifikant stärkere NGFR-Expression.

Die Korrelation (Kendall-Tau-b) zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und NGFR-Expression lag bei r = 0,67 und zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und NGFR-Expression bei r = 0,56. Somit korrelierte die NGFR-Expression relativ gut mit dem Vorkommen von PNF und MPNST.

4.3.3 Hund: Expressionsmuster caniner PNST

4.3.3.1 S100-Protein

In den caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren (cMPNST) konnte das S100-Protein im Zytoplasma eines Teils der Tumorzellen nachgewiesen werden. Es wurde zwischen einer positiven oder negativen Färbung unterschieden (Abb. 33). Die S100-Expression war bei den caninen MPNST schwächer ausgeprägt als bei den humanen Neurofibromen.

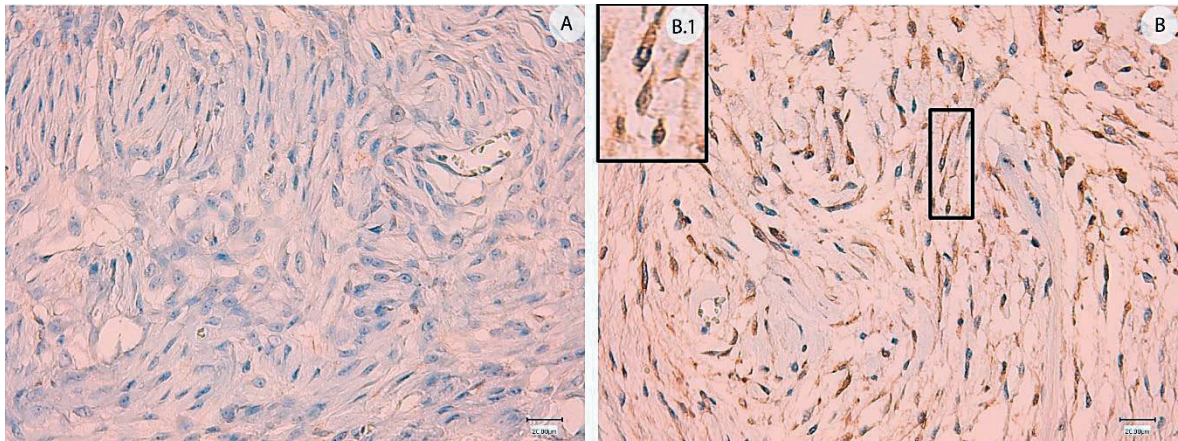


Abb. 33: S100-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: Tumor negativ, Patient 01; **B:** Tumor positiv, Patient 26; **B.1:** Insert von B, positives Zytoplasma; Maßstab = 25 µm

44% (33/75) der cMPNST (n = 75) zeigte eine negativ, 56% (42/75) eine positive S100-Protein-Reaktion.

Zum Teil wurden Mastzellen mit dem S100-Protein angefärbt.

4.3.3.2 Epitheliales Membranantigen

Im Hundennerv konnte mittels des verwendeten Antikörpers das Epitheliale Membranantigen (EMA) nicht nachgewiesen werden. Es kam zu keiner positiven Färbung des Perineuriums.

4.3.3.3 Claudin-1

Claudin-1 sollte als Alternative zu EMA das Perineurium in den cMPNST nachweisen. Im caninen Nervus ischiadicus und in Hautnerven konnte eine Claudin-1 Färbung nachgewiesen werden, bei der das Perineurium und die Schwann-Zellen angefärbt waren (Abb. 34).

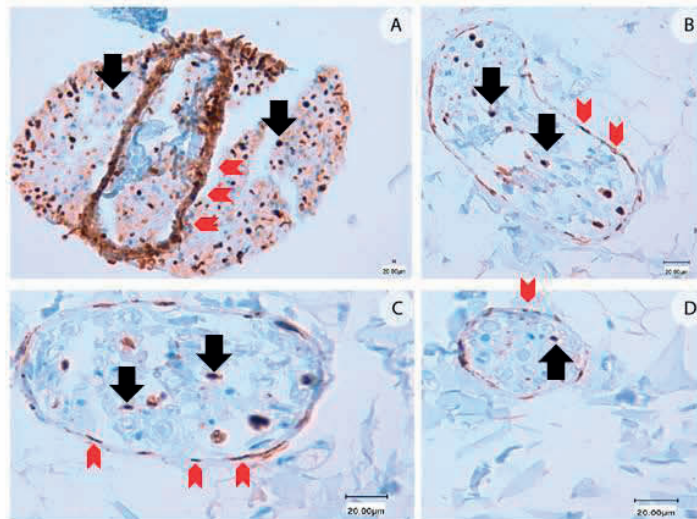


Abb. 34: Claudin-1-Expression in caninen Nerven

A: Nervus ischiadicus, positives Perineurium (rote Pfeile) und positive Schwann-Zellen (schwarze Pfeile); **B-D:** Hautnerven beim Hund, positive Perineurialzellen (rote Pfeile) und positive Schwann-Zellen (schwarze Pfeile)

In den cMPNST zeigten Perineurialzellen eine kaum sichtbare Cl1-Expression und somit war das Perineurium schwer zu identifizieren. Dahingegen zeigte die Zellmembran und teilweise das Zytoplasma der Tumorzellen eine gute Claudin-1-Reaktion. Häufig exprimierten konzentrische Strukturen Claudin-1 (Abb. 35 D) oder es kam zu einer multifokal fleckigen Expression im Tumor (Abb. 35 C). Die wirtelig wachsenden Bereiche des Tumors zeigten generell eine stärkere Cl1-Expression.

Bei der Auswertung wurde zwischen Expressionsintensität und Expressionsverteilung unterschieden.

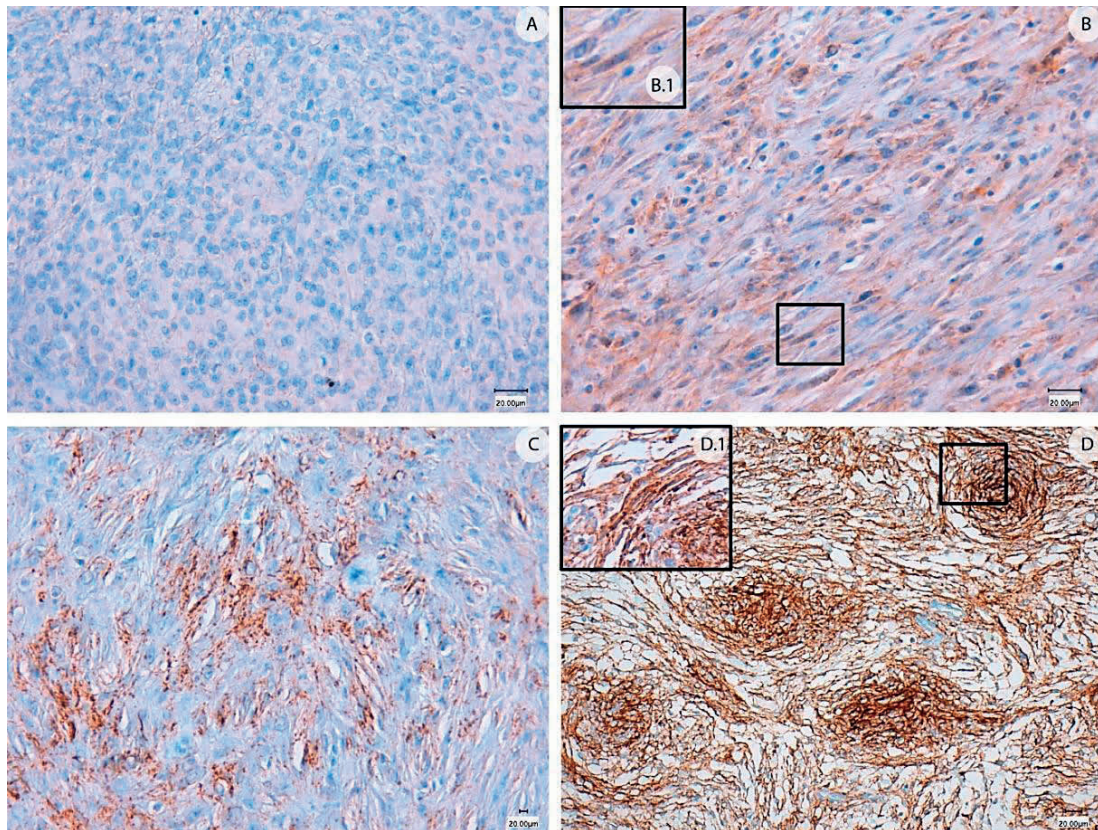


Abb. 35: Claudin-1-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: negativ, Patient 35; **B:** diffus schwach positiv, Patient 06; **B.1:** Insert von B, positives Zytoplasma, urspr. Vergr. 40x; **C:** multifokal mittel positiv, Patient 79; **D:** diffus stark positiv und konzentrische Strukturen, Patient 54; **D.1:** Insert von D, konzentrische Struktur, ursprüngliche Vergrößerung 40x

21,3% (16/75) der cMPNST (n = 75) waren negativ, 78,7% (59/75) positiv für Claudin-1. Bei 20% (15/75) der Tumoren war eine schwache Expression, 44% (33/75) eine mittlere und bei 14,6% (11/75) eine starke Expression zu erkennen. Von den positiven Tumoren (n = 59) waren 76,3% (45/59) multifokal und 23,7% (14/59) diffus gefärbt.

Weitere Strukturen, die eine unspezifische Claudin-1-Reaktion in cMPNST zeigten, waren Drüsen, Haarfollikel, Epithel-, Entzündungs- und Mastzellen.

4.3.3.4 CD90

Der verwendete Antikörper konnte eine CD90-Expression in den untersuchten Tumoren nachweisen. Die Zellmembran exprimierte mit einer Abstufung von negativ bis diffus stark CD90 (Abb. 36). Die Reaktion war besonders stark in Arealen mit einer deutlichen Wirbelbildung (Abb. 36 E).

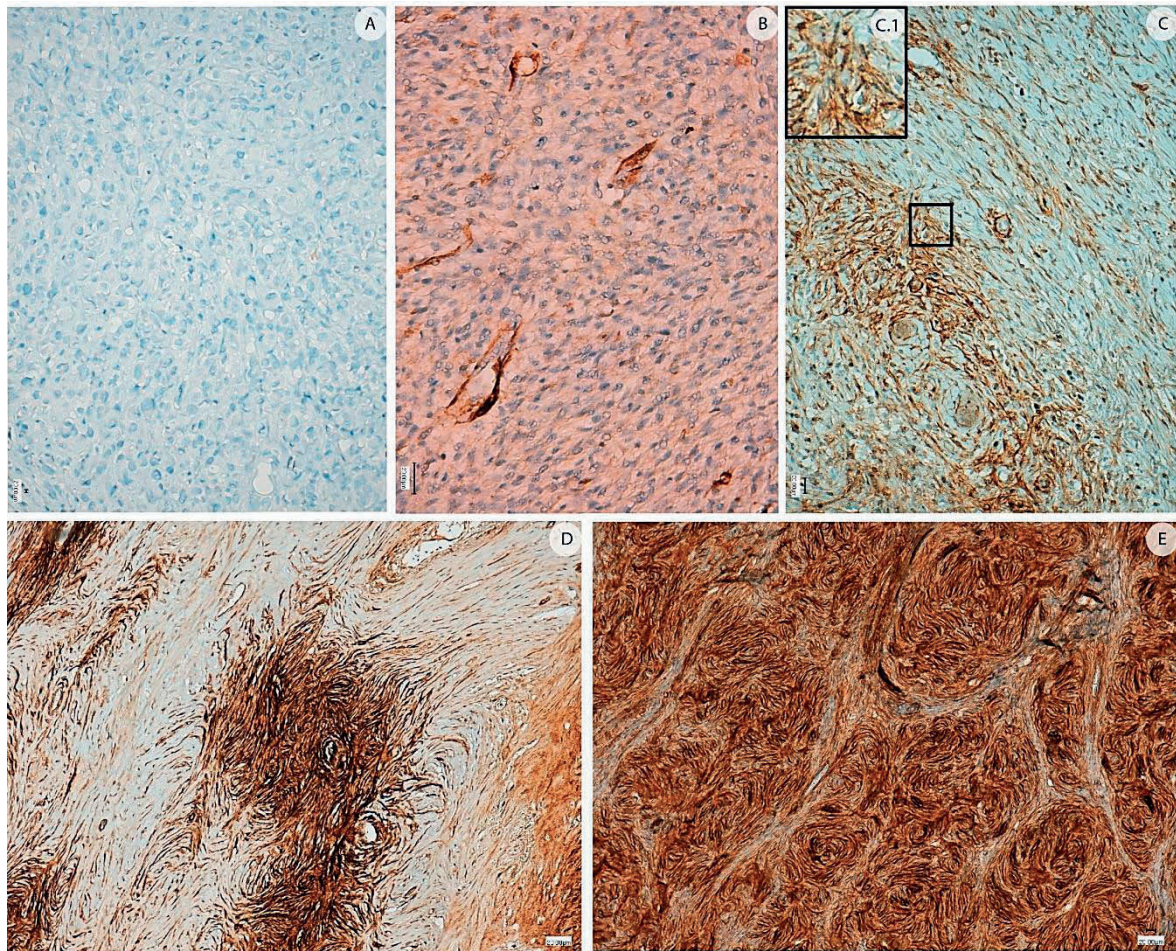


Abb. 36: CD90-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: negativ, Patient 50; **B:** schwach positiv mit Anfärbung der Gefäßwand, Patient 88; **C:** multifokal mittel positiv, Patient 21; **C.1:** Insert von C, multifokal mittel positiv, urspr. Vergr. 20x; **D:** multifokal stark positiv, Patient 48; **E:** diffus stark positiv, Patient 81

1,3% (1/75) der cMPNST (n = 75) waren CD90-negativ, 2,7% (2/75) schwach, 14,7% (11/75) multifokal schwach-mittel, 49,2% (37/75) multifokal stark und 32% (24/75) diffus stark gefärbt (insgesamt waren 98,7% (74/75) positiv).

Die Adventitia zeigte darüber hinaus eine unspezifische CD90-Reaktion (Abb. 36 B).

4.3.3.5 Mastzellen

Zur Darstellung von Mastzellen wurden beim Hund zwei Antikörper getestet. Der eine (Mast Cell Tryptase, AA1, Dako) sollte die Tryptase, der andere (c-kit/CD117, Dako) die Tyrosinkinase Kit (c-Kit) in Mastzellen nachweisen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den menschlichen Proben wurden nur in einigen Hundeproben die c-kit-Expression und in allen die Tryptase-Expression untersucht. Die Färbungen mit dem Antikörper gegen die Mastzelltryptase zeigten einen deutlichen Hintergrund und eine weniger deutliche Anfärbung der Mastzellen im Vergleich zum Menschen (Abb. 37).

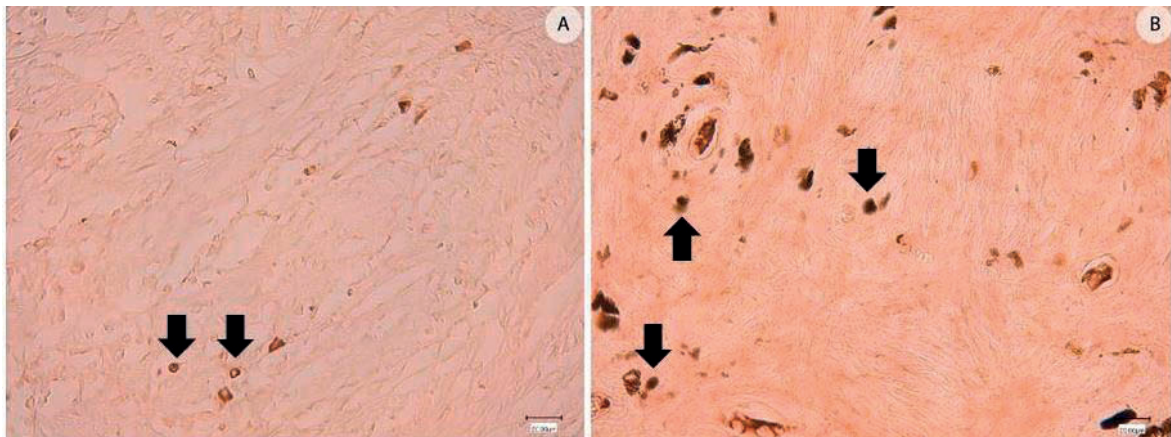


Abb. 37: Mastzelltryptase-Expression in malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: Mastzellen (Pfeile), Patient 28; **B:** Mastzellen (Pfeile), Patient 53

Die mediane Mastzellanzahl aller cMPNST ($n = 75$) auf einer Fläche von $0,46 \text{ mm}^2$ lag bei 2 (0/12) Mastzellen.

Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Tumore in drei Mastzellgruppen gruppierte. Auf einer Fläche von $0,46 \text{ mm}^2$ hatten 82,7% (62/75) der Tumore ≤ 10 Mastzellen, 9,3% (7/75) $> 10-20$ und 8% (6/75) > 20 . Diese Werte sind in Abb. 38 als Säulendiagramm dargestellt.

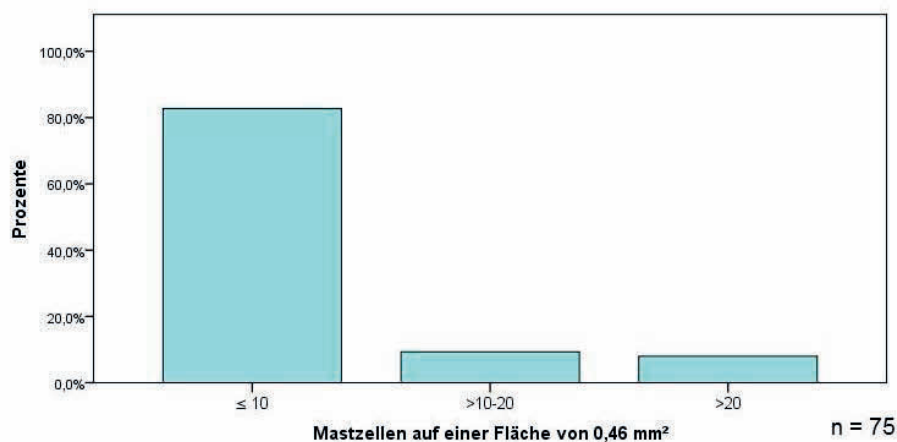


Abb. 38: Säulendiagramm; Mastzellen in cMPNST

4.3.3.6 Neurofilament

In den cMPNST konnte eine Neurofilament-Expression in Axonen intakter Nerven und in freien Axone im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Abb. 39).

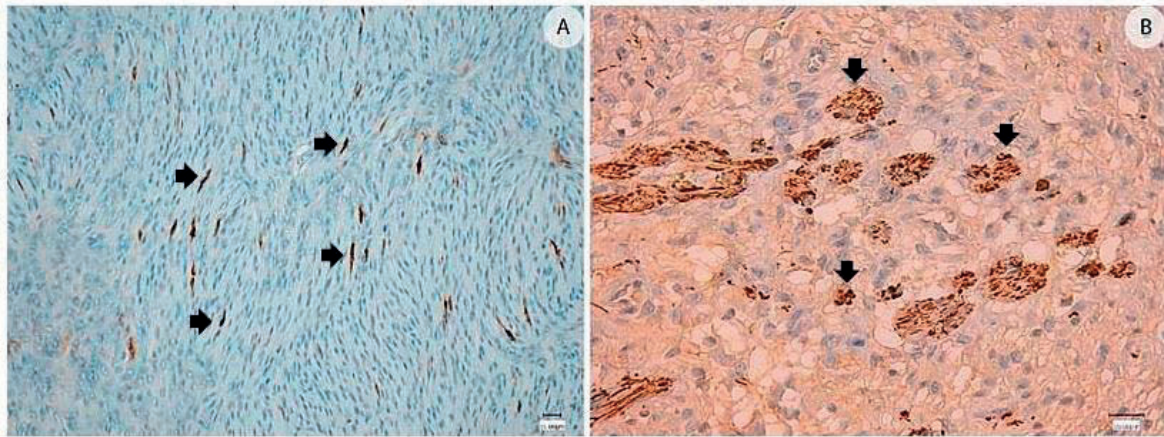


Abb. 39: Neurofilament-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: positive freie Axone im Tumorgewebe (Pfeile), Patient 69; **B:** Reste eines ehemaligen Nervis (Pfeile), Patient 86

10,7% (8/75) der cMPNST (n = 75) zeigten eine negative Neurofilament-Expression, 89,3% (67/75) eine positive. Bei 2,7% (2/75) konnten Axone in intakten Nerven und in 86,7% (73/75) freie Axone im Gewebe nachgewiesen werden.

Bei den Tumoren, in denen einzelne Axone im Tumorgewebe eine positive Neurofilament-Expression zeigten (n = 73), wurde die Anzahl der Axone auf einer Fläche von 0,46 mm² bestimmt. Der Median der angefärbten Axone in diesen cMPNST lag bei 52 (11/124).

4.3.4 Hund: Differenzierungsmarker caniner MPNST

Wie in der Literaturübersicht unter 2.4.3 beschrieben, werden zum jetzigen Stand der Forschung die folgenden Marker als die besten Differenzierungsantikörper für cMPNST angesehen.

4.3.4.1 Periaxin

In cMPNST konnte eine positive Periaxin-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen werden. Retikuläre Bereiche zeigten häufiger eine stärker positive Reaktion als zelldichte Partien. Es wurde zwischen einer Expressionsintensität von negativ bis stark unterschieden (Abb. 40). In der Endauswertung wurden negativ und schwach zu negativ und mittel und stark zu positiv zusammengefasst.

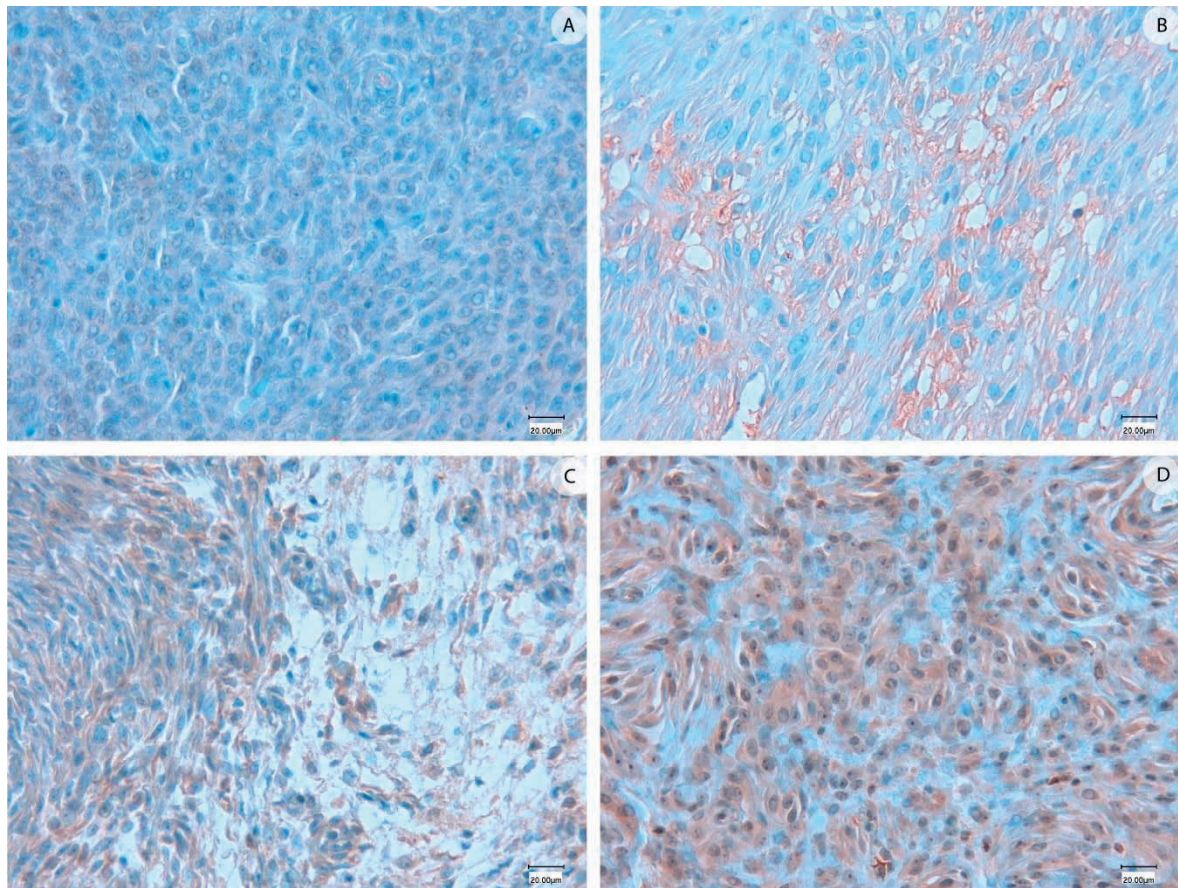


Abb. 40: Periaxin-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: negativer Tumor, Patient 15; **B:** schwach positiv, Patient 34; **C:** mittel positiv, Patient 54; **D:** stark positiv, Patient 56

54,7% (41/75) der cMPNST (n = 75) zeigten eine negative und 45,3% (34/75) eine positiv Periaxin-Reaktion.

In den cMPNST zeigten Mastzellen eine unspezifische Periaxin-Reaktion.

4.3.4.2 α -Smooth Muscle Actin

Der Antikörper gegen das α -smooth muscle actin (α -SMA) zeigte in den cMPNST eine Reaktion in dem Zytoplasma der Tumorzellen. Bei der Auswertung wurde zum einen bewertet, ob Tumorzellen angefärbt wurde (Tumorvariable); (Abb. 41 A, B). Zum anderen wurde die Anfärbung weiterer Strukturen (Färbevariable) bewertet. Dazu zählten zwiebelschalenartige Färbung um Gefäße (Abb. 41 C), Anfärbung von Granulationsgewebe um eine Nekrose (Abb. 41 D) und Perineurium (Abb. 41 E).

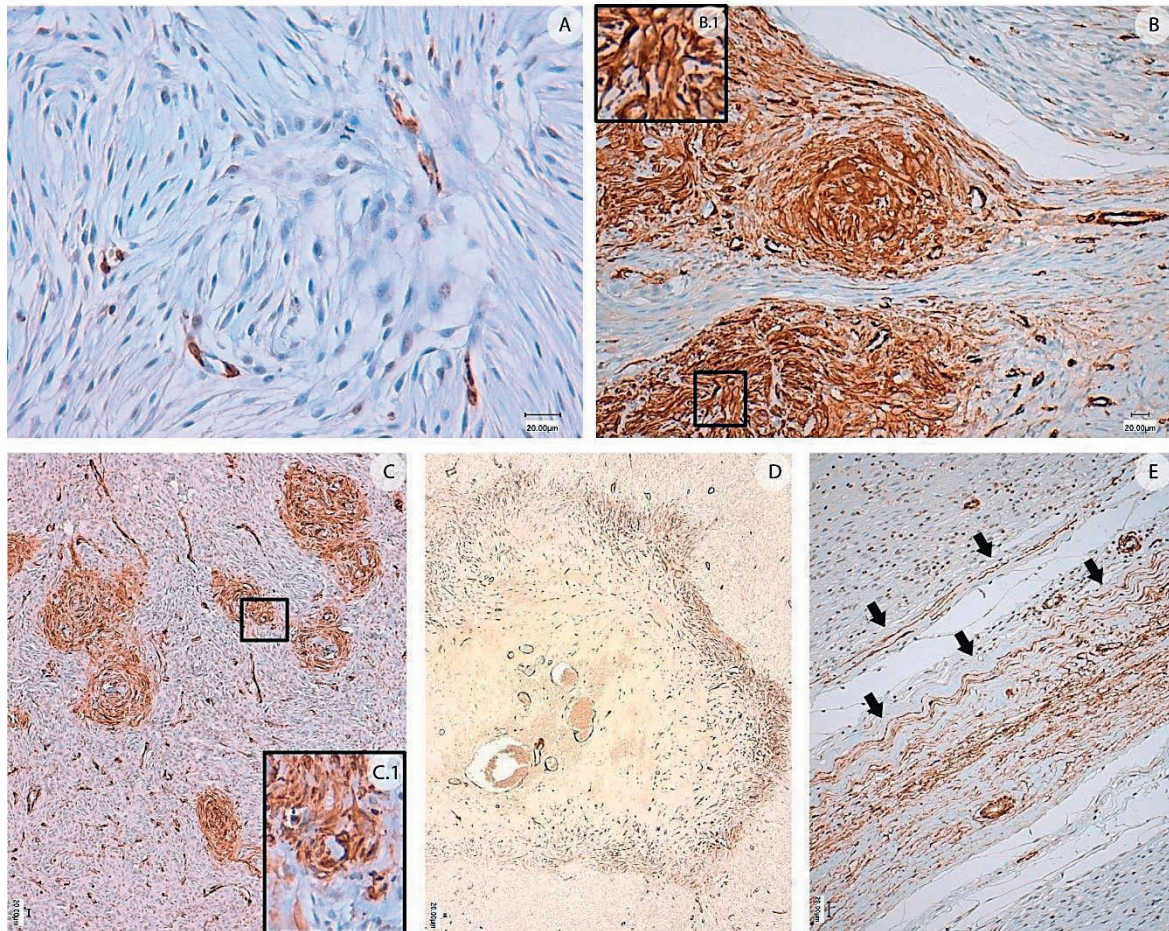


Abb. 41: α -SMA-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: negativer Tumor, einzelne positive Gefäßwände, Patient 26; **B:** positive Tumorzellen, Patient 69; **B.1:** Insert von B, positive Tumorzellen, ursprüngliche Vergrößerung 40x; **C:** starke zwiebelschalenartige Färbung um Gefäße, Patient 58; **C.1:** Insert von C, Färbung um Gefäße, ursprüngliche Vergrößerung 40x; **D:** positives Granulationsgewebe, Patient 26; **E:** positives Perineurium (Pfeile), Patient 48

Von den untersuchten cMPNST ($n = 75$) zeigten 80% (60/75) eine negative und 20% (15/75) eine positive α -SMA-Expression.

Bei 52% (39/75) der cMPNST zeigten keine weiteren Strukturen eine α -SMA-Expression. In 48% (36/75) der cMPNST kam es zu einer α -SMA-Expression einzelner Strukturen: in 5,3% (4/75) der Tumore zeigten sich zwiebelschalenartige perivaskuläre α -SMA-Reaktionen, bei 5,3% (4/74) zeigte das Granulationsgewebe, in 29,3% (22/75) das Perineurium, in 5,3% (4/75) das Perineurium und Granulationsgewebe und in 2,7% (2/75) das Perineurium und perivaskuläres Gewebe eine α -SMA-Expression.

Innerhalb der 80% (60/75) α -SMA-negativen Tumore ($n = 60$) zeigten 55% (33/60) keine und 45% (27/60) eine Anfärbung von weiteren Strukturen. Bei 1,7% (1/60) der Tumore zeigte perivaskuläres Gefäße, bei 3,3% (2/60) das Granulationsgewebe, bei 33,3% (20/60) das Perineurium und bei 6,7% (4/60) das Perineurium und Granulationsgewebe eine α -SMA-Reaktionen.

Innerhalb der 20% (15/75) α -SMA-positiven Tumoren ($n = 15$) zeigten 40% (6/15) keine weitere Reaktion, bei 20% (3/15) zeigte das perivaskuläre Gewebe, bei 13,3% (2/15) das Granulationsgewebe, bei 13,3% (2/15) Perineurium und bei 13,3% (2/15) Perineurium und perivaskuläres Gewebe eine α -SMA-Expression. In Abb. 42 sind diese Werte als Säulendiagramm dargestellt. Zur besseren Darstellbarkeit wurden in diesem Diagramm die Anfärbung von Perineurium und perivaskulärem Gewebe zu einer Ausprägung zusammengefasst.

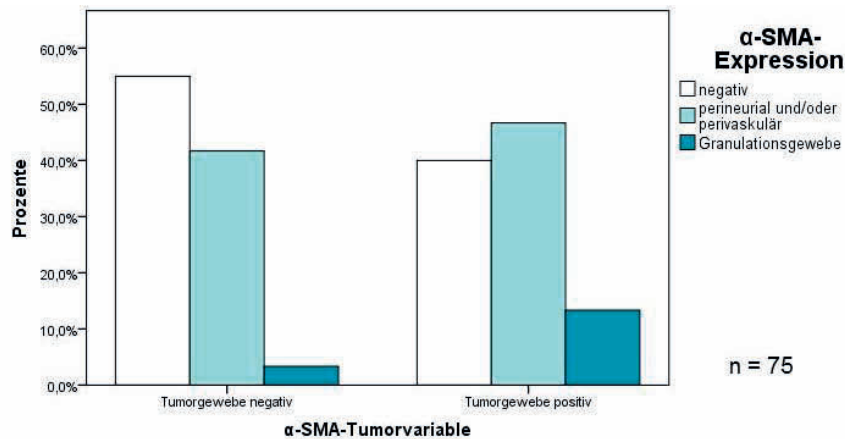


Abb. 42: Säulendiagramm; α -SMA-Expression und Tumorvariable in cMPNST

Prozent = prozentualer Anteil der α -SMA-Expressionsmuster innerhalb der α -SMA-Tumorvariable

Die statistischen Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede der α -SMA-Expressionsmuster innerhalb der α -SMA-Tumorvariable.

In den cMPNST zeigten Endothelzellen, Drüsen und die Muskulatur um Haarfollikel eine α -SMA-Expression.

4.3.4.3 Saures Gliafaserprotein

In allen untersuchten cMPNST wurde eine zytoplasmatische Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP) in den Tumorzellen nachgewiesen. Diese war i. d. R. stark und diffus (Abb. 43).

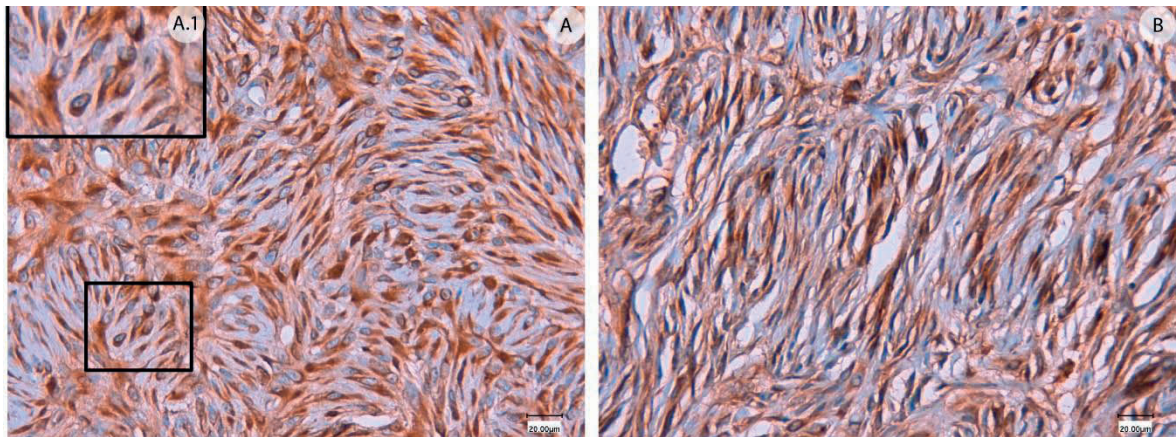


Abb. 43: GFAP in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: positiver Tumor, Patient 01; **A.1:** Insert von A, positives Zytoplasma in Tumorzellen, urspr. Vergr. 40x;
B: positiver Tumor, Patient 61

100% der untersuchten cMPNST (n = 75) zeigten eine positive GFAP-Expression.

Weiterhin zeigten Fett- und Drüsengewebe eine unspezifische GFAP-Anfärbung.

4.3.4.4 Doppelfärbung α -SMA und GFAP

20% (15/75) der untersuchten cMPNST (n = 75) exprimierte sowohl α -SMA als auch GFAP. Zur besseren Darstellbarkeit wurde eine Doppelfärbung mit beiden Markern durchgeführt (GFAP = rot, α -SMA = braun).

Es konnte zwischen zwei verschiedenen Färbemustern unterschieden werden. Bei **Muster-1** bestanden die Tumore zu 90% aus GFAP-positiven Zellen. Multifokal traten α -SMA-positive Areale auf (Abb. 44). 53,3% (8/15) der α -SMA-positiven Tumore (n = 15) zeigten dieses Bild.

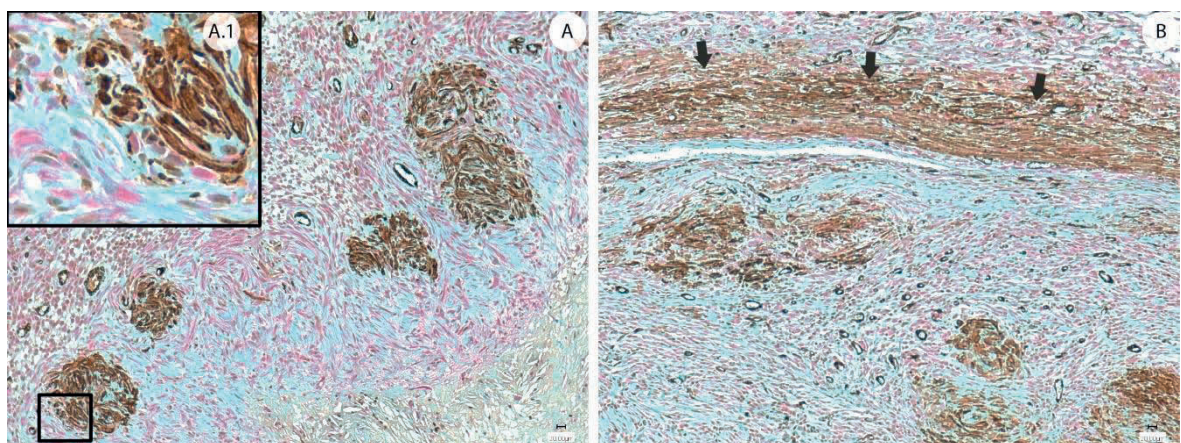


Abb. 44: Doppelfärbung zur Darstellung von GFAP (rot) und α -SMA (braun) in cMPNST

A: GFAP-positive Zellen mit multifokalen α -SMA-positiven Arealen, Patient 51; **A.1:** Insert von A, α -SMA-positive Struktur, Patient 51; **B:** GFAP-positive Zellen mit multifokalen α -SMA-positiven Strukturen und α -SMA-positiven Perineurium (schwarze Pfeile), Patient 67

Bei dem **Muster-2** waren GFAP-positive und α -SMA-positive Zellen diffus gemischt (Abb. 45). Es kamen Zellen vor, die jeweils einen der Marker exprimierten, aber auch Zellen, die für beide Marker positiv waren. 46,7% (7/15) der α -SMA-positiven Tumore ($n = 15$) zeigte dieses Muster.

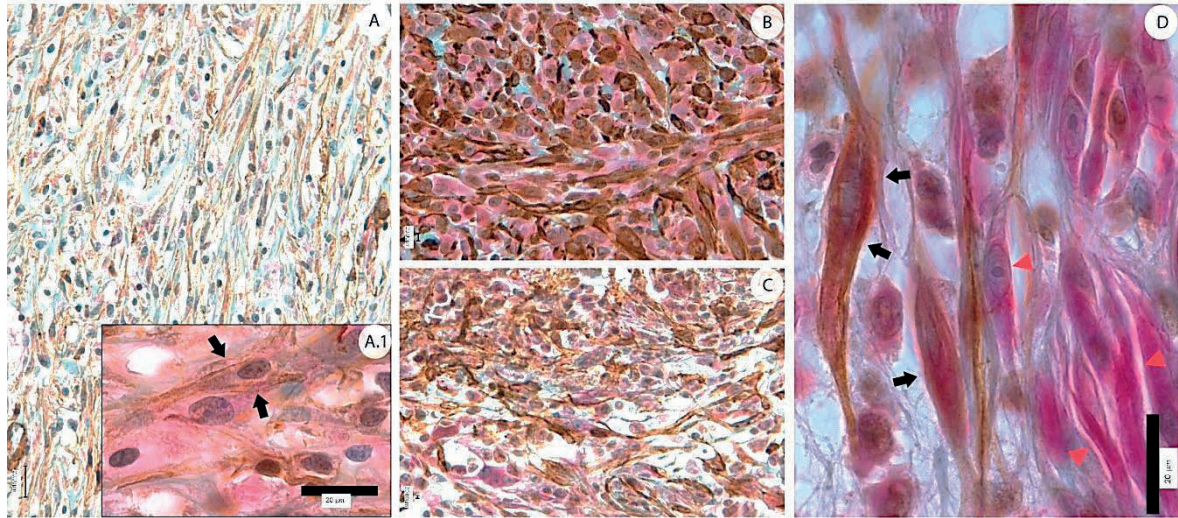


Abb. 45: Doppelfärbung zur Darstellung von GFAP (rot) und α -SMA (braun) in cMPNST

A: GFAP- und α -SMA-positive Ko-Expression, Patient 06; **A.1:** Insert von A, Zellen, die sowohl α -SMA (streifenartig am Zellrand), als auch GFAP (zytoplasmatisch) exprimierten (schwarze Pfeile), Patient 06; **B:** GFAP- und α -SMA-positive Zellen gemischt, Patient 50; **C:** GFAP- und α -SMA-positive Zellen gemischt, Patient 21; **D:** GFAP-positive Zellen (rote Pfeile) und GFAP/ α -SMA-gemischt positive Zellen (schwarze Pfeile), 100x, Patient 21

Bezogen auf die Gesamtzahl aller cMPNST ($n = 75$) zeigten 10,7% (8/75) das umschriebene **Muster-1** und 9,3% (7/75) das diffuse **Muster-2**.

4.3.4.5 Nervenwachstumsfaktorrezeptor

In den cMPNST wurde der Nervenwachstumsfaktorrezeptor (NGFR) von der Zellmembran der Tumorzellen exprimiert. Dabei exprimierten bevorzugt retikuläre Bereiche den NGFR. Bei der Auswertung wurde zwischen Expressionsintensität und Expressionsverteilung unterschieden (Abb. 46).

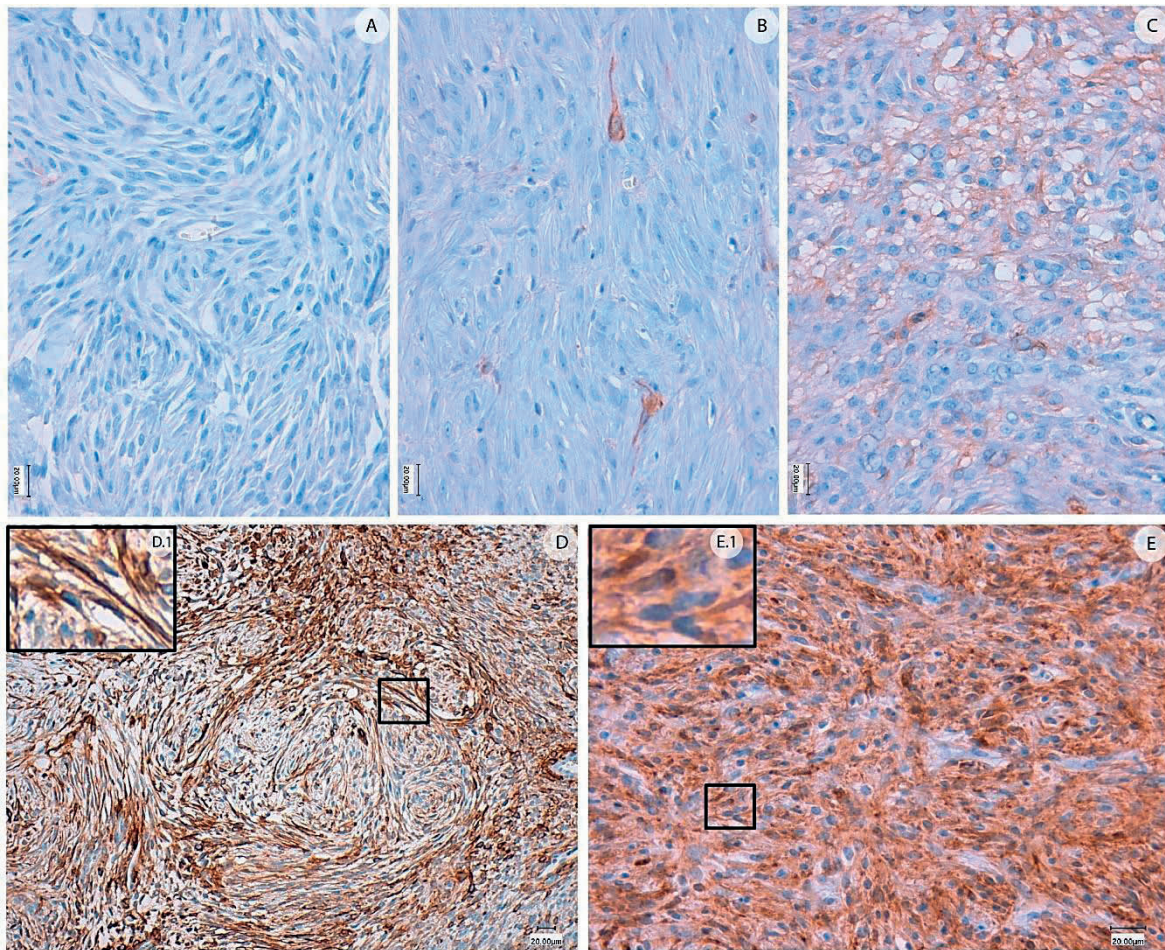


Abb. 46: NGFR-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: negativ, Patient 05; **B:** einzelne Zellen positiv, Patient 34; **C:** multifokal (20-50%) mittel positiv, Patient 63; **D:** multifokal (> 50%) stark positiv, Patient 74; **D.1:** Insert v. D, positives Zytoplasma, urspr. Vergr. 20x; **E:** 100% stark positiv, Patient 86; **E.1:** Insert von E, positives Zytoplasma, urspr. Vergr. 40x

25,3% (19/75) der cMPNST (n = 75) zeigten eine negative, 74,7% (56/75) eine positive NGFR-Expression. 9,3% (7/75) zeigten eine schwache, 38,7% (29/75) eine mittlere und 26,7% (20/75) eine starke NGFR-Expression. In 26,8% (15/56) der NGFR-positiven Tumore zeigten einzelne Zellen (0-20%) eine NGFR-Expression, 30,4% (17/56) zeigten eine fokale (20-50%), 26,8% (15/56) eine multifokale (50-100%) und 16% (9/56) eine diffuse (100%) NGFR-Expression.

Weitere Strukturen und Zellen, die eine unspezifische NGFR-Reaktion zeigten, waren Mastzellen und Gefäßwände.

4.3.5 Vergleich Mensch – Hund: Expressionsmuster

4.3.5.1 S100-Protein

Vergleicht man die Expression von S100-Protein zwischen humanen MPNST (hMPNST) (n = 22) und caninen MPNST (cMPNST); (n = 75), waren 18,2% (4/22) der hMPNST S100-negativ und 81,8% (18/22) S100-positiv. Von den cMPNST waren 44% (33/75)

negativ und 56% (42/75) positiv für S100. Diese Werte sind als Säulendiagramm in Abb. 47 dargestellt.

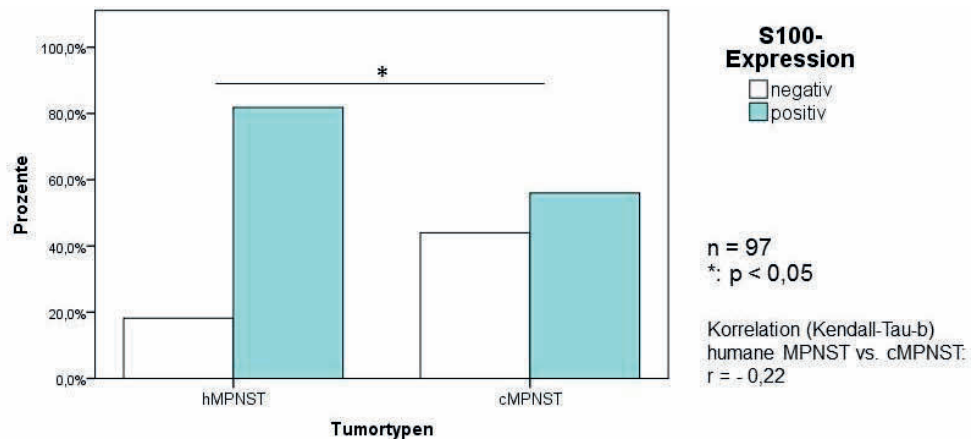


Abb. 47: Säulendiagramm; Vergleich S100-Expression in hMPNST und cMPNST
Prozent = prozentualer Anteil der S100-Expression innerhalb einzelner MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied ($p = 0,03$) zwischen den hMPNST und den cMPNST. Somit waren die hMPNST signifikant häufiger S100-positiv als die cMPNST.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und dem S100-Protein lag bei $r = -0,22$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die Expression von S100 und das Vorkommen von hMPNST relativ gering.

4.3.5.2 CD90

Um die Expression von CD90 in hMPNST ($n = 22$) und cMPNST ($n = 75$) vergleichen zu können, wurde die CD90-Expression in beiden Tumorentitäten umkodiert. Es wurde zwischen einer positiven und negativen CD90-Expression des Tumorgewebes unterschieden. 13,6% (3/22) der **hMPNST** waren negativ, 86,4% (19/22) positiv für CD90. Bei den **cMPNST** waren 1,3% (1/75) negativ und 98,7% (74/75) positiv für CD90. In Abb. 48 sind diese Werte dargestellt.

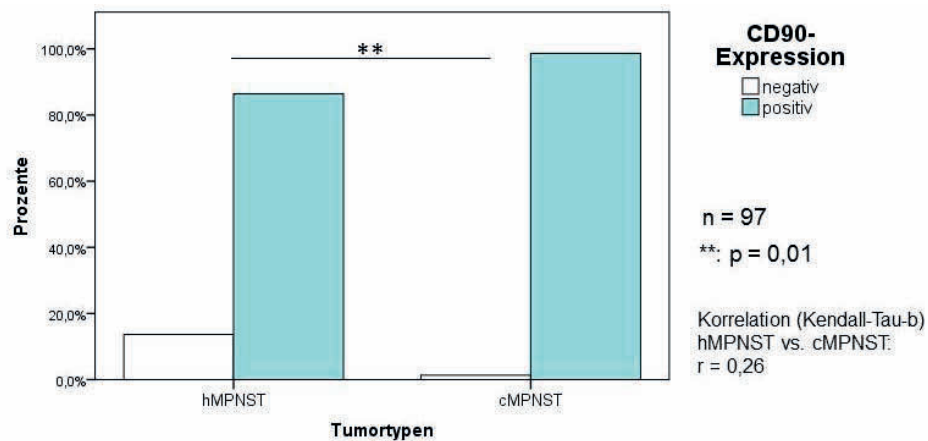


Abb. 48: Säulendiagramm; Vergleich CD90-Expression in hMPNST und cMPNST
 Prozent = prozentualer Anteil der CD90-Expression innerhalb einzelner MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen hMPNST und cMPNST in Bezug auf die Expression von CD90 ($p = 0,01$). Somit waren die cMPNST signifikant häufiger CD90-positiv als die hMPNST.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und CD90 lag bei $r = 0,26$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die Expression von CD90 relativ schwach mit dem Vorkommen von cMPNST.

4.3.5.3 Mastzelltryptase

Die Anzahl der Mastzellen wurde bei der Auswertung der hMPNST auf einer Fläche von 0,79 mm² und bei den cMPNST auf einer Fläche von 0,46 mm² bestimmt. Um die Anzahl der Mastzellen vergleichbar zu machen, wurde die Anzahl der Mastzellen der cMPNST mit 1,72 multipliziert (Anzahl Mastzellen * (0,79/0,46)). Mit diesen errechneten Werten wurden die folgenden Werte und Graphiken erstellt.

Vergleicht man die Anzahl an Mastzellen in hMPNST ($n = 21$) und cMPNST ($n = 75$), lag der Median der Mastzellen der **hMPNST** bei 9 und der **cMPNST** bei 3,4. Diese Werte sind in Abb. 49 als Boxplot dargestellt.

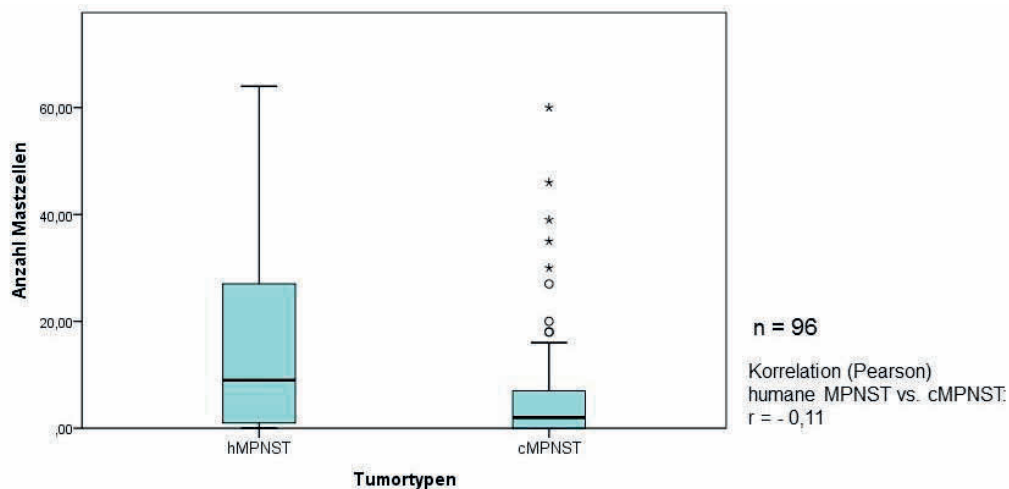


Abb. 49: Boxplot; Vergleich Mastzellanzahl in hMPNST und cMPNST

Die statistischen Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede der Mastzellanzahl zwischen den verschiedenen MPNST-Subtypen aufgrund der weiten Streuung der Werte.

4.3.5.4 Neurofilament

Vergleicht man die Expression von Neurofilament in hMPNST (n = 22) und cMPNST (n = 75) zeigte sich, dass in 81,8% der hMPNST (18/22) keine Strukturen Neurofilament exprimierten, 0% zeigten intakte Nerven im Tumor und 18,2% (4/22) wiesen freie Axone im Tumorgewebe auf. Bei den cMPNST waren 10,7% (8/75) negativ, 2,7% (2/75) zeigten intakte Nerven im Tumor und 86,7% (65/75) wiesen freie Axone im Tumorgewebe auf. Diese Werte sind in Abb. 50 dargestellt.

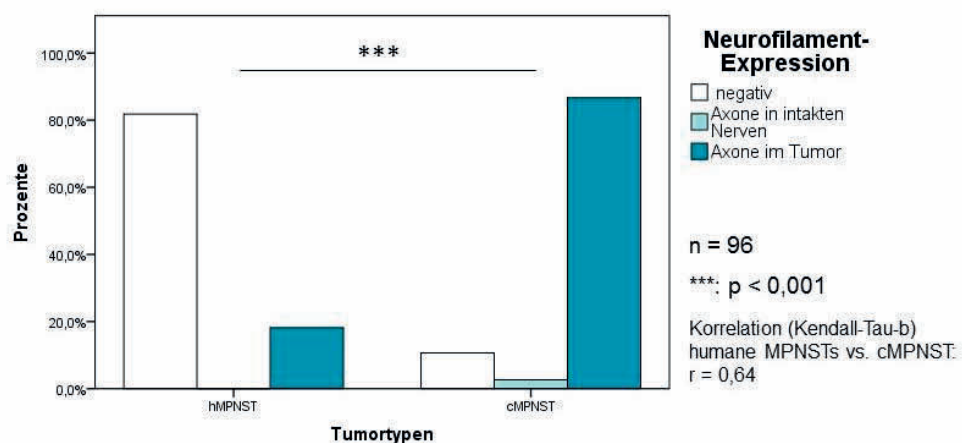


Abb. 50: Säulendiagramm; Vergleich Neurofilament-Expression in hMPNST und cMPNST
Prozent = prozentualer Anteil der Neurofilament-Expression innerhalb einzelner MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen hMPNST und cMPNST (p < 0,001) in Bezug auf die Ausprägung der Neurofilament-Expression. Das heißt die cMPNST hatten signifikant häufiger freie Axone im Tumor als die hMPNST.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und Neurofilament lag bei $r = 0,64$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte das Vorkommen von vielen freien Axonen relativ gut mit dem Vorkommen von cMPNST.

Die Anzahl der Neurofilament-positiven Axone wurde bei der Auswertung der hMPNST auf einer Fläche von $0,79 \text{ mm}^2$ und bei den cMPNST auf einer Fläche von $0,46 \text{ mm}^2$ bestimmt. Um die Anzahl der Axone vergleichbar zu machen, wurde die Anzahl der Axone der cMPNST mit 1,72 multipliziert (Anzahl Axone * $(0,79/0,46)$). Mit diesen errechneten Werten wurden die folgenden Werte und Graphiken erstellt.

Vergleicht man die Anzahl an Axone in hMPNST ($n = 4$) und cMPNST ($n = 75$), lag der Median der Axone der **hMPNST** bei 33 ($13,8/51,5$) und der **cMPNST** bei 79 ($15/210$). Diese Werte sind in Abb. 51 als Boxplot dargestellt.

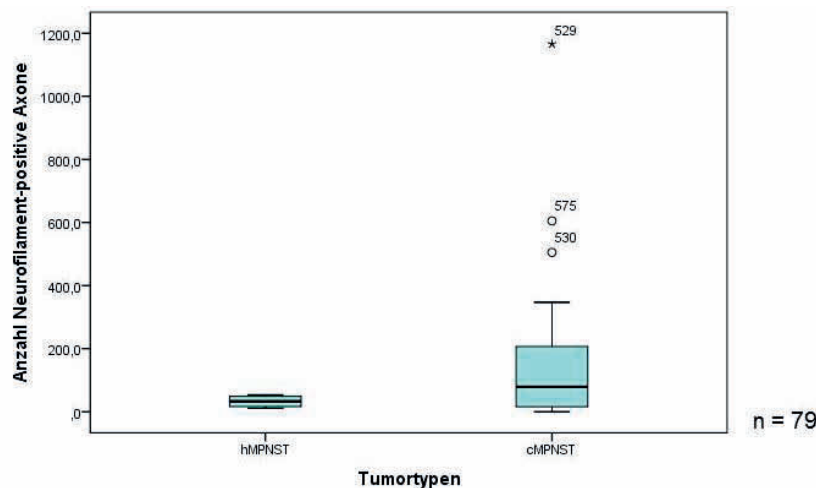


Abb. 51: Boxplot; Vergleich Neurofilament-positive Axone in hMPNST und cMPNST

Die statistischen Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede der Anzahl Neurofilament-positiver Axone innerhalb der MPNST-Typen.

4.3.5.5 Periaxin

Um die Expression von Periaxin in hMPNST ($n = 19$) und cMPNST ($n = 75$) vergleichen zu können, wurde die Periaxin-Expression beim Menschen umkodiert, so dass nur zwischen negativ und positiv unterschieden wurde. 15,8% ($3/22$) der **hMPNST** waren negativ, 84,2% ($16/75$) positiv für Periaxin. Bei den cMPNST waren 54,7% ($41/75$) negativ und 45,3% ($34/75$) positiv für Periaxin. Diese Werte sind in Abb. 52 dargestellt.

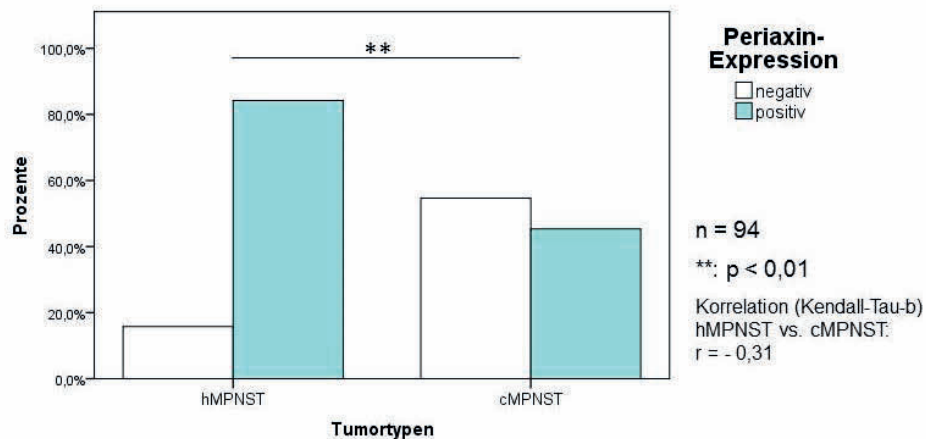


Abb. 52: Säulendiagramm; Vergleich Periaxin-Expression in hMPNST und cMPNST
Prozent = prozentualer Anteil der Periaxin-Expression innerhalb einzelner MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen hMPNST und cMPNST in Bezug auf die Periaxin-Expression ($p = 0,002$). Somit waren die hMPNST signifikant häufiger Periaxin-positiv als die cMPNST.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und Periaxin lag bei $r = - 0,31$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die Periaxin-Expression relativ schlecht mit dem Vorkommen von hMPNST.

4.3.5.6 Saures Gliafaserprotein

Vergleicht man die Expression des Sauren Gliafaserproteins (GFAP) in hMPNST ($n = 7$) und cMPNST ($n = 75$), waren 14,3% (1/7) der hMPNST positiv und 85,7% (6/7) negativ. Bei den cMPNST waren 100% positiv für GFAP. In Abb. 53 sind diese Werte dargestellt.

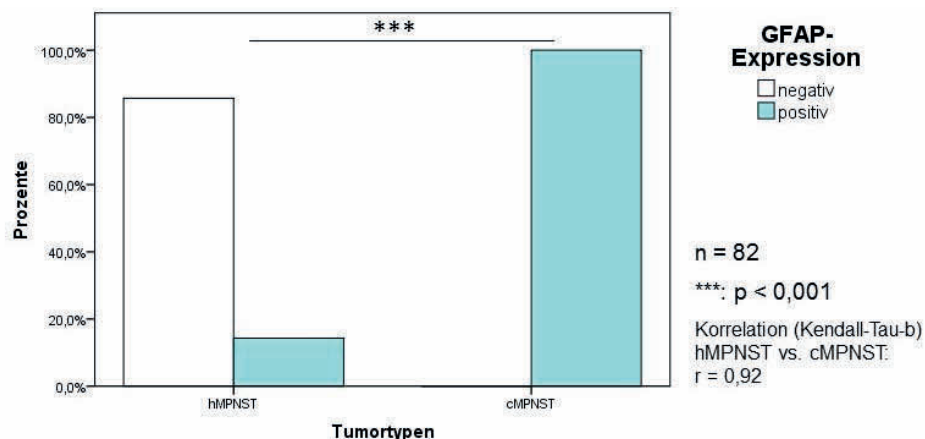


Abb. 53: Säulendiagramm; Vergleich GFAP-Expression in hMPNST und cMPNST
Prozent = prozentualer Anteil der GFAP-Expression innerhalb einzelner MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen hMPNST und cMPNST im Hinblick auf die Expression von GFAP ($p < 0,001$). Das heißt die cMPNST waren signifikant häufiger GFAP-positiv als die hMPNST.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und GFAP lag bei $r = -0,92$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die GFAP-Expression deutlich mit dem Vorkommen von cMPNST.

4.3.5.7 Nervenwachstumsfaktorrezeptor

Vergleicht man die Expression des Nervenwachstumsfaktorrezeptors (NGFR) in hMPNST ($n = 5$) und cMPNST ($n = 75$) waren 100% der **hMPNST** stark positiv und die **cMPNST** zu 25,3% (19/75) negativ und zu 74,7% (56/75) positiv. Das heißt zu 9,3% (7/75) schwach, zu 38,7% (29/75) mittel und zu 26,7% (20/75) stark positiv. Diese Werte sind in Abb. 54 als Säulendiagramm dargestellt.

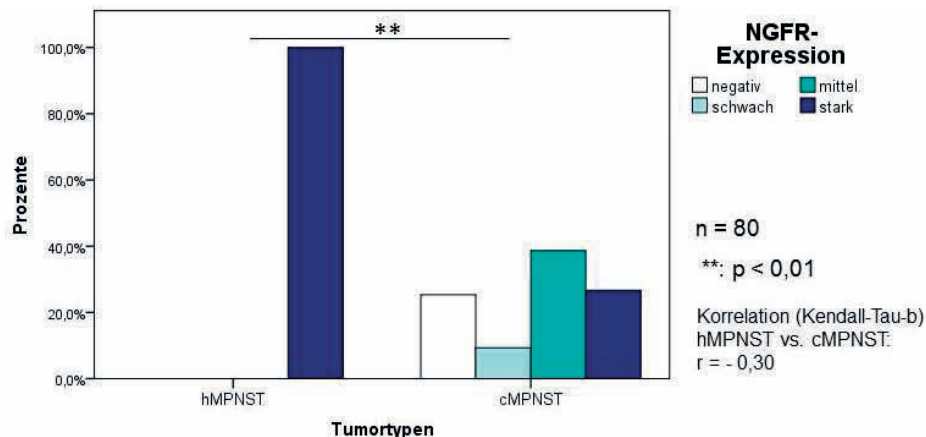


Abb. 54: Säulendiagramm; Vergleich NGFR-Expression in hMPNST und cMPNST
Prozent = prozentualer Anteil der NGFR-Expression innerhalb einzelner MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen hMPNST und cMPNST im Hinblick auf die Expression von NGFR ($p = 0,008$). Das heißt, die hMPNST waren signifikant häufiger NGFR-positiv als die cMPNST.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und dem NGFR lag bei $r = -0,30$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die NGFR-Expression relativ gering mit dem Vorkommen von hMPNST.

4.3.6 Mensch: Faktoren des Tumorwachstums

4.3.6.1 Ki-67-Index

Das Ki-67-Protein wurde in Kernen von proliferierenden Zellen detektiert (Abb. 55). Es wurden alle positiven Kerne auf einer Fläche von 0,12 mm² bestimmt. Aus diesen Zahlen wurde der Ki-67-Index berechnet (siehe 3.2.6.3).

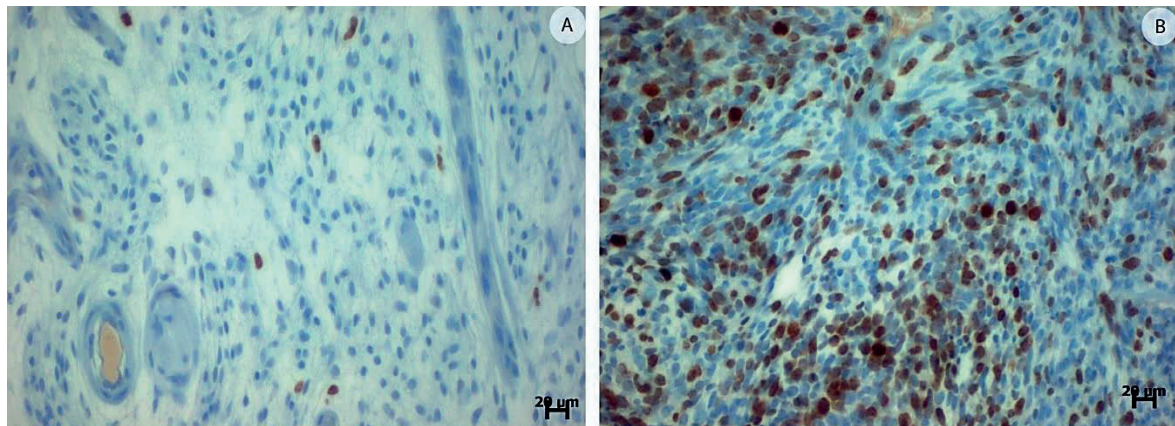


Abb. 55: Proliferationsmarker Ki-67 in humanen peripheren Nervenscheidentumoren
A: diffuses NF, geringe Proliferation, Patient 58; B: MPNST, starke Proliferation, Patient 1005

Zu 94 Fällen (18,1%), der in dieser Studie untersuchten humanen PNST (n = 520), lagen aus technischen Gründen keine Ergebnisse vor. Daraus gibt sich eine Grundgesamtheit von n = 426. Der Median der Ki-67-Indices der humanen Neurofibrome und lag bei 1,3% (0,7%/2,5%).

Betrachtet man die Tumorsubgruppen separat, lag der Median für **KNF** (n = 100) bei 1,2% (0,7%/2%), für **DNF** (n = 109) bei 1,1% (0,7%/2,3%), für **DPNF** (n = 106) bei 1,5% (0,8%/2,5%), für **PNF** (n = 95) bei 1,2% (0,5%/2,6%) und für die **MPNST** (n = 16) bei 16,9% (13,2%/29,7%). In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 56) sind diese Werte als Boxplot dargestellt.

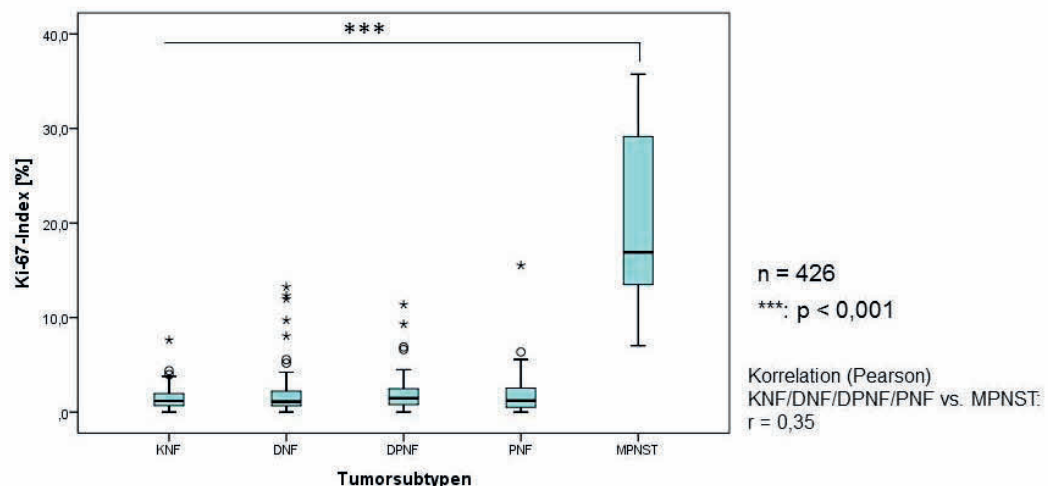


Abb. 56: Boxplot; Ki-67-Index in humanen PNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den benignen Neurofibromen (KNF/DNF/DPNF/PNF) und den MPNST ($p < 0,001$). Das heißt MPNST wiesen einen signifikant höheren Proliferationsindex auf als die gutartigen Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF/PNF vs. MPNST) und Ki-67-Index lag bei $r = 0,35$ (Pearson). Somit war die Korrelation zwischen einem hohen Ki-67-Index und dem Vorkommen von MPNST relativ gering.

4.3.6.2 Zellularität

Die Zellularität wurde in Neurofibromen und MPNST ($n = 431$) auf einer Fläche von $0,12 \text{ mm}^2$ bestimmt.

Betrachtet man die Tumorsubtypen separat, lag der Median für **KNF** ($n = 101$) bei 238 (182,8/290,5) für **DNF** ($n = 109$) bei 171 (142/217,5), für **DPNF** ($n = 107$) bei 156 (131/190), für **PNF** ($n = 98$) bei 101,3 (61,3/141,3) und für **MPNST** ($n = 16$) bei 510 (237,8/692). Die Werte sind in Abb. 57 dargestellt.

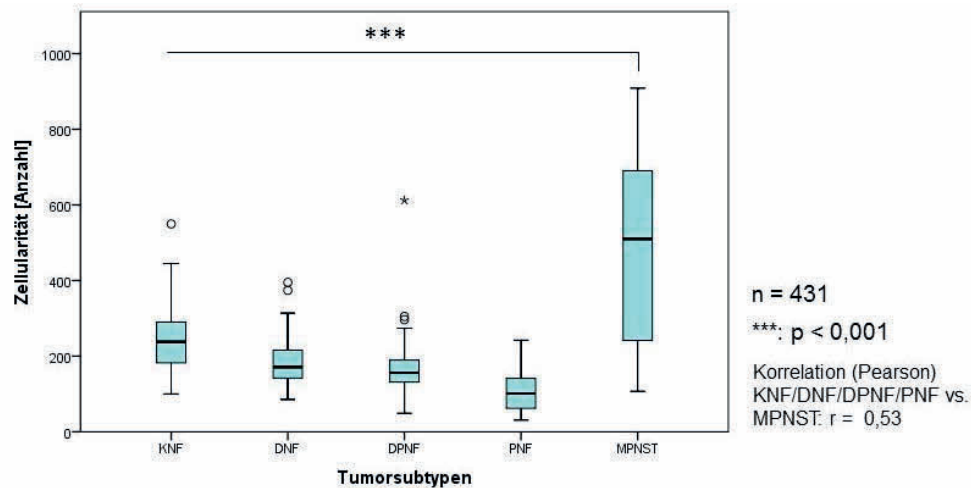


Abb. 57: Boxplot; Zellularität in humanen PNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den benignen Neurofibromen (KNF/DNF/DPNF/PNF) und den MPNST. Das heißt, die hMPNST waren signifikant zellreicher als die gutartigen Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF/PNF vs. MPNST) und Zellularität lag bei $r = 0,53$ (Pearsons Korrelationskoeffizient). Somit korrelierte die Zellularität relativ gut mit dem Vorkommen von MPNST.

4.3.6.3 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor-2 (ErbB2) wurde in den untersuchten humanen PNST perivaskulär um Gefäße, in perineurialen Strukturen und in einzelne Zellen retikulär im Tumorgewebe nachgewiesen (Abb. 58).

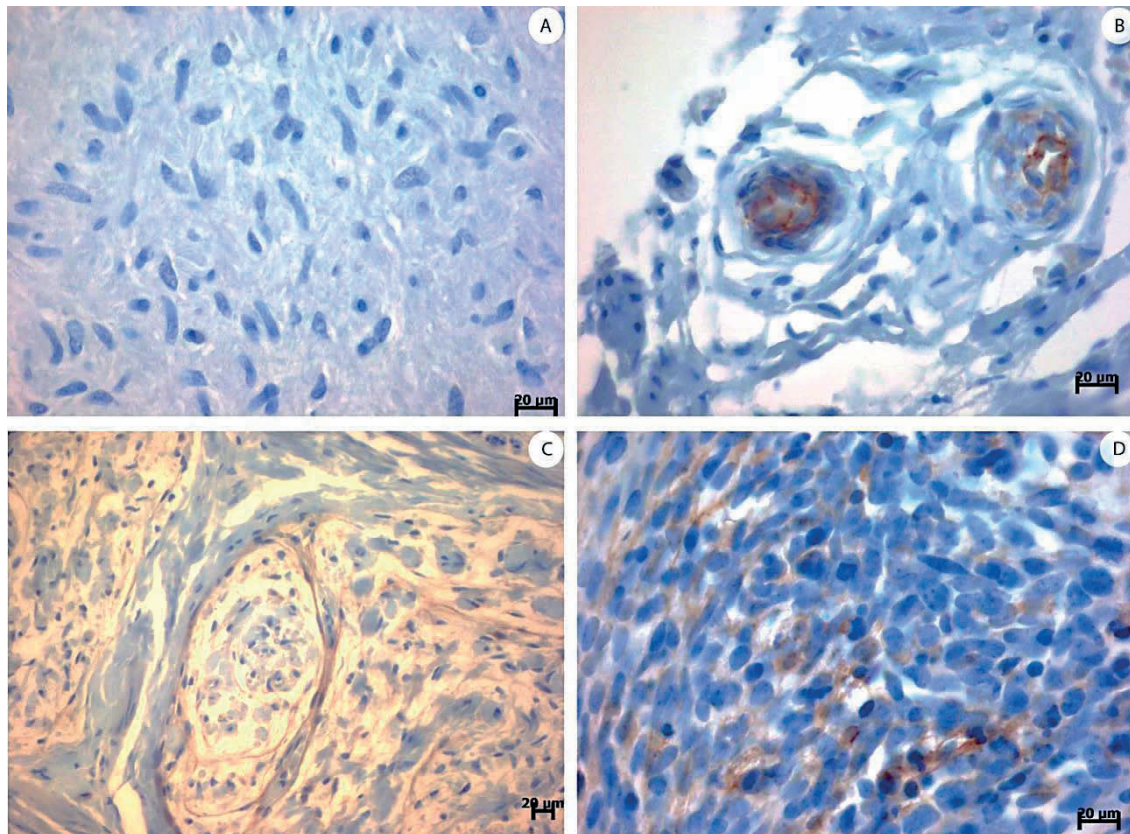


Abb. 58: ErbB2-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: plexiform-diffuses NF, negativ, Patient 610/3; **B:** diffuses NF, perivaskuläre Expression, Patient 123/1; **C:** plexiformes NF, perineuriale Expression, Patient 576; **D:** MPNST, einzelne positive Zellen, Patient 1005

Zu 82 Fällen (15,8%), der in dieser Studie untersuchten humanen PNST ($n = 520$), lagen aus technischen Gründen keine Ergebnisse vor. Von der sich daraus ergebenden Grundgesamtheit ($n = 438$), waren 89% (390/438) der untersuchten Neurofibrome und MPNST ($n = 438$) negativ, 11% (48/438) positiv für den ErbB2. Davon wiesen 5,7% (25/438) positive perineuriale und perivaskuläre Strukturen auf und bei 5,3% (23/438) waren einzelne Zellen im Tumorgewebe positiv.

Im Vergleich der Tumorsubtypen untereinander zeigte sich, dass **KNF** ($n = 82$) zu 89% (73/82) negativ waren, zu 8,5% (7/82) eine perineuriale und perivaskuläre Expression und zu 2,4% (2/82) positive Tumorzellen aufwiesen. **DNF** ($n = 102$) waren zu 95,1% (97/102) negativ, 3,4% (4/102) wiesen eine perineurial/perivaskuläre und 1% (1/102) eine retikuläre Reaktion auf. **DPNF** ($n = 108$) waren zu 89,8% (97/108) negativ, 9,2% (10/108) zeigten eine perineurial/perivaskuläre und 0,9% (1/108) eine retikuläre ErbB2-Expression. **PNF** ($n = 124$) waren zu 83,9% (104/124) negativ, 3,2% (4/124) wiesen eine perineurial/perivaskuläre und 12,9% (16/124) eine retikuläre ErbB2-Reaktion auf. **MPNST** ($n = 22$) waren zu 86,4% (19/22) negativ, und zeigten zu 0% eine perineurial/perivaskulär und zu 13,6% (3/22) eine retikuläre ErbB2-Expression. Diese Werte sind in Abb. 59 als Säulendiagramm dargestellt.

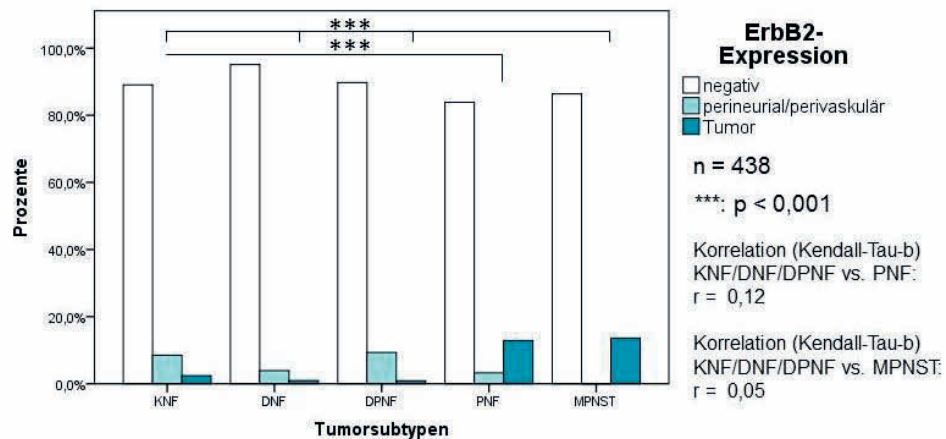


Abb. 59: Säulendiagramm; ErbB2-Expression in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der ErbB2-Expression innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte sowohl einen hoch signifikanten Unterschied zwischen KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) als auch zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p < 0,001$). Das heißt PNF und MPNST waren signifikant häufiger ErbB2-positiv als KNF, DNF und DPNF.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und ErbB2 lag bei $r = 0,12$ (Kendall-Tau-b Korrelationskoeffizient) und die zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und ErbB2 bei $r = 0,05$ (Kendall-Tau-b). Das heißt die ErbB2-Expression korrelierte schlecht mit dem Vorkommen von PNF und MPNST.

In den untersuchten peripheren Nervenscheidentumoren zeigten zusätzlich Endothelzellen und Drüsen eine ErbB2-Expression.

4.3.6.4 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3

In den humanen peripheren Nervenscheidentumoren zeigte die Zellmembran der Tumorzellen eine schwache bis starke ErbB3-Expression (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3); (Abb. 60).

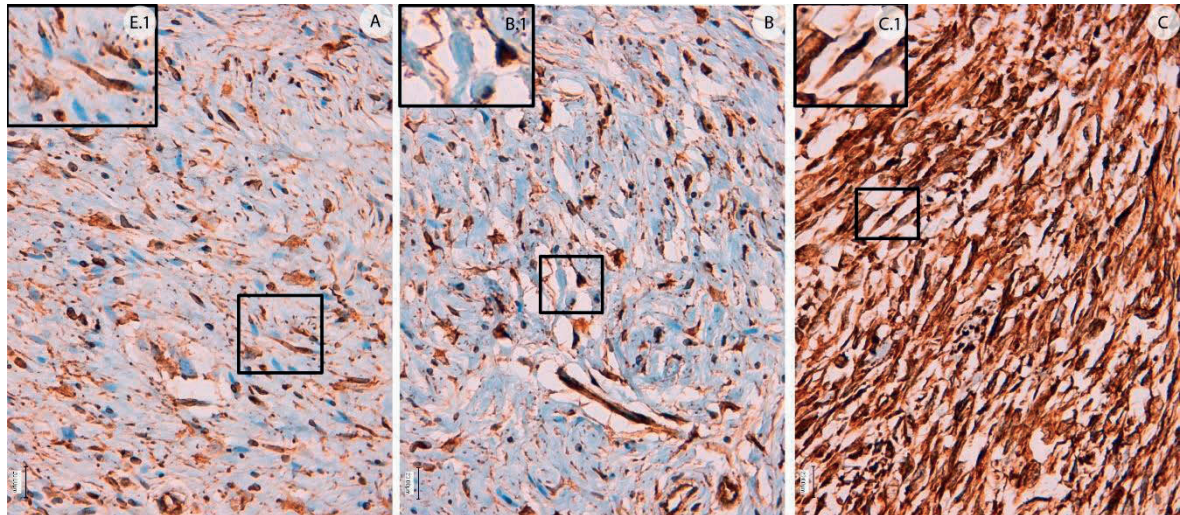


Abb. 60: ErbB3-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: kutanes NF, schwach positiv, Patient 313/1; **A.1:** Insert von A, positives Zytoplasma, urspr. Vergr. 40x; **B:** plexiformes NF, mittel stark, Patient 121; **B.1:** Insert von B, positive Zellen, urspr. Vergr. 40x; **C:** MPNST, stark positiv, Patient 1003; **C.1:** Insert von C, positive Zellen, urspr. Vergr. 40x

Mit dem gegen ErbB3 gerichteten Antikörper wurde eine Stichprobe, die etwa die Hälfte ($n = 222$) der humanen Neurofibrome und MPNST umfasste, untersucht, hier aber alle Fälle bewertet. Die untersuchten Neurofibrome ($n = 222$) zeigten zu 100% eine positiv ErbB3-Expression.

Betrachtet man die Tumorsubtypen einzeln, wiesen die **KNF** ($n = 48$) zu 12,5% (6/48) eine schwache, zu 75% (36/48) eine mittlere und zu 12,5% (6/48) eine starke ErbB3-Expression auf. Bei den **DNF** ($n = 63$) zeigten zu 33,3% (21/63) eine schwache, zu 60,3% (38/63) eine mittlere und zu 6,3% (4/63) eine starke ErbB3-Reaktion. Unter den **DPNF** ($n = 40$) wiesen 20% (8/40) eine schwache, 67,5% (27/40) eine mittlere und 12,5% (5/40) eine starke Expression auf. 0% der **PNF** ($n = 49$) zeigten eine schwache, 26,5% (13/49) eine mittlere und 73,5% (36/49) eine starke ErbB3-Reaktion. 100% der **MPNST** ($n = 22$) wiesen eine starke Reaktion auf. In Abb. 61 sind diese Werte als Säulendiagramm dargestellt.

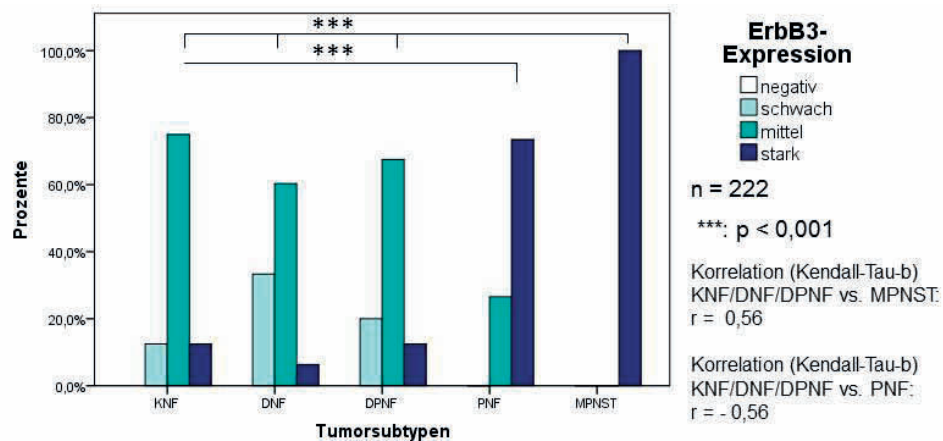


Abb. 61: Säulendiagramm; ErbB3-Expression in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der ErbB3-Expression innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte sowohl hoch signifikante Unterschiede zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) als auch zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p < 0,001$). Das heißt plexiforme Neurofibrome und MPNST zeigten eine stärkere ErbB3-Expression als kutane, diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und ErbB3 lag bei $r = 0,56$ (Kendall-Tau-b) und die zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und ErbB3 ebenfalls bei $r = 0,56$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die ErbB3-Expression relativ gut mit dem Vorkommen von PNF und MPNST.

Endothel- und Epithelzellen zeigten ebenfalls eine unspezifische ErbB3-Anfärbung.

4.3.6.5 Neuregulin-1

In humanen peripheren Nervenscheidentumoren zeigte die Zellmembran in Tumorzellen eine negative bis starke Neuregulin-1-Expression (NRG1); (Abb. 62).

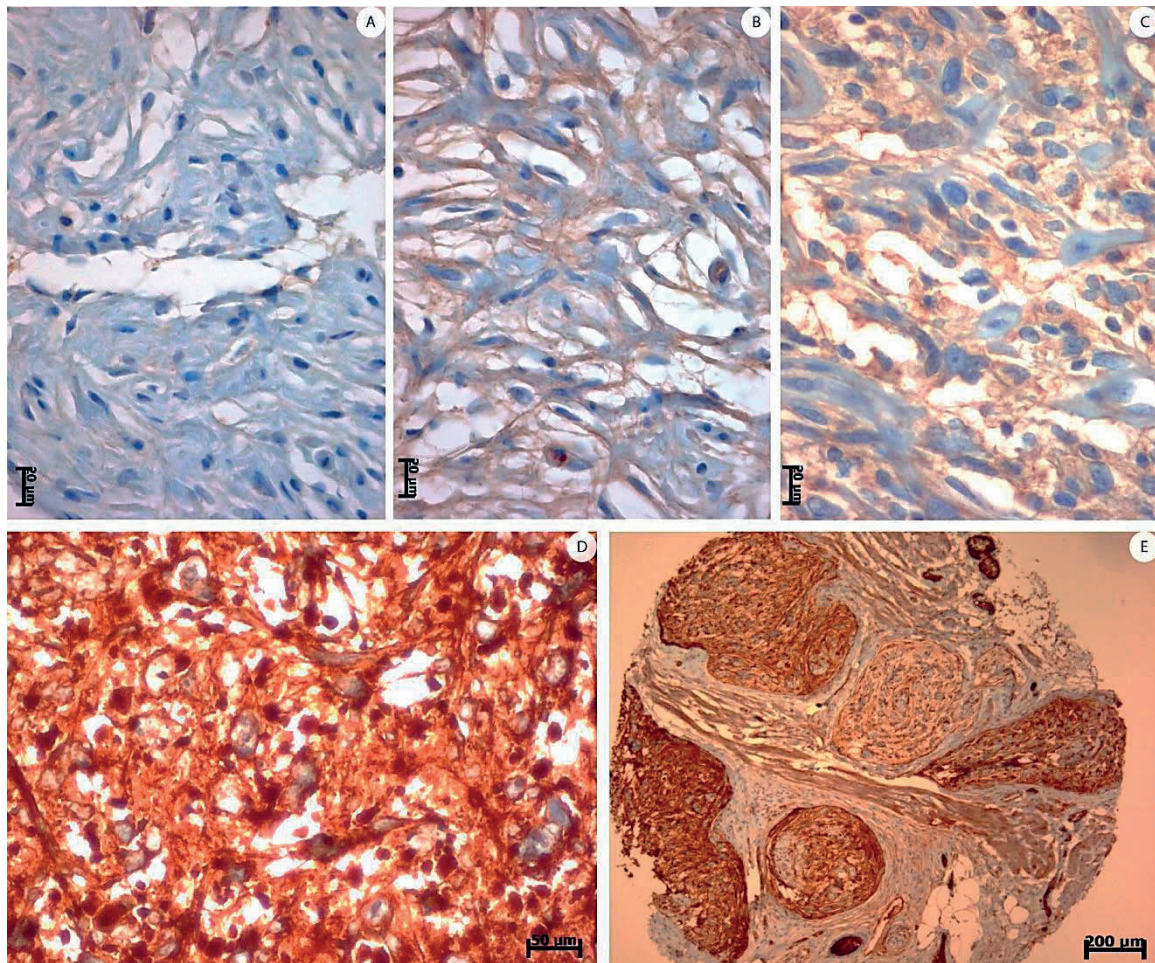


Abb. 62: Neuregulin-1-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: kutanes NF, negativ, Patient 45/2; **B:** kutanes NF, schwach positiv, Patient 544; **C:** MPNST, mittel positiv, Patient 1012; **D:** plexiformes NF, stark positiv, Patient 525; **E:** plexiformes NF, starke Expression in plexiformen Anteilen, Patient 576

Von den in dieser Studie untersuchten humanen benignen Neurofibromen und MPNST (n = 520) lagen aus technischen Gründen zu 109 Fällen (21%) keine Ergebnisse vor. Daraus ergibt sich eine Grundgesamtheit von n = 411, von denen 87,1% (358/411) eine positive und 12,9% (53/411) eine negative NRG1-Expression zeigten. 50,5% (208/411) der Tumore wiesen eine schwache, 14,1% (58/411) eine mittlere und 22,4% (92/411) eine starke NRG1-Reaktion auf.

Im Vergleich der Tumorsubtypen untereinander zeigten **PNF** (n = 117) als einziger Subtyp eine starke Expression (78,6%); (92/117), sonst wiesen sie zu 0% eine negative, 7,7% (9/117) eine schwache und 13,7% (16/117) eine mittlere Expression auf. Bei allen anderen Subtypen überwog die schwache Expression mit 60,9 - 76,1%. Im Detail bedeutet das für die einzelnen Subtypen: **KNF** (n = 89) hatten den höchsten Anteil negativer Tumore (31,5%); (28/89) und zeigten zu 66,3% (59/89) eine schwache, 2,2% (2/89) eine mittlere und 0% eine starke Expression. **DNF** (n = 92) waren zu 10,9% (10/92) negativ und zeigten zu 60,9% (56/92) eine schwache, zu 28,3% (26/92) eine mittlere und 0% eine

starke NRG1-Reaktion. **DPNF** (n = 92) waren zu 14,1% (13/92) negativ, 76,1% (70/92) wiesen eine schwache, 9,8% (9/92) eine mittlere und 0% eine starke Reaktion auf. **MPNST** (n = 21) waren zu 9,5% (2/21) negativ und zeigten zu 66,7% (14/21) eine schwache, zu 23,8% (5/21) eine mittlere und zu 0% eine starke Expression. In Abb. 63 sind diese Werte als Säulendiagramm dargestellt.

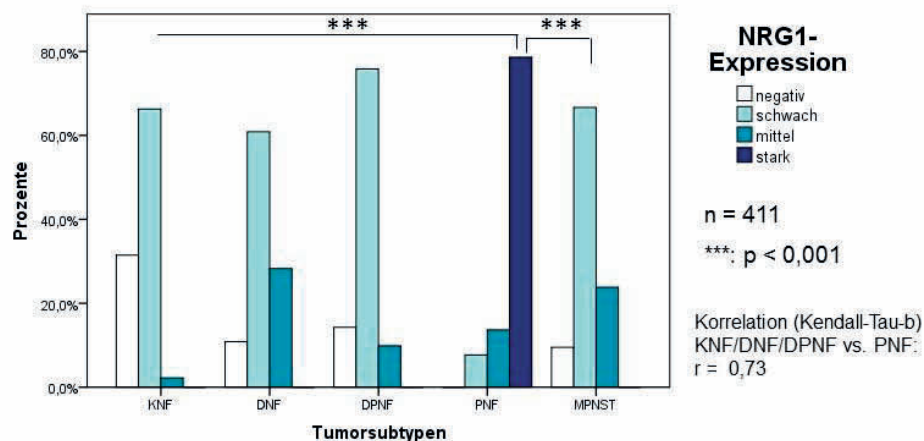


Abb. 63: Säulendiagramm; Neuregulin-1-Expression in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der NRG1-Expression innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte hoch signifikante Unterschiede zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) und zwischen den PNF und den MPNST ($p < 0,001$). Das heißt plexiforme Neurofibrome exprimierten signifikant mehr NRG1 als MPNST, kutane, diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und Neuregulin-1 lag bei $r = 0,73$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die NRG1-Expression stark mit dem Vorkommen von PNF.

Neuregulin-1 und Anzahl von Axonen

Neuregulin-1 wird physiologischer Weise von Axonen gebildet. Um die Frage zu beantworten, ob Axone in humanen Neurofibrome ebenfalls für die starke Expression von NRG1 verantwortlich sind, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Axonanzahl und der Expression von NRG1 statistisch untersucht.

Dafür wurden die Neurofibrome ausgewählt, in denen freie Axone, mit Hilfe des gegen Neurofilament wirkenden Antikörpers nachgewiesen werden konnte (n = 182). Der Median für Neurofilament-positive Axone bei gleichzeitigem Vorkommen von NRG1-Expression lag bei 13. Der Axon-Median bei einer negativen NRG1-Expression (n = 21) lag bei 6 (2/24), für eine schwache NRG1-Expression (n = 79) bei 9 (4/16), für eine mittlere NRG1-Expression (n = 16) bei 13,5 (6,5/44) und für eine starke NRG1-Expression (n = 66) bei 35,5 (12/98,5). Diese Werte sind in Abb. 64 dargestellt.

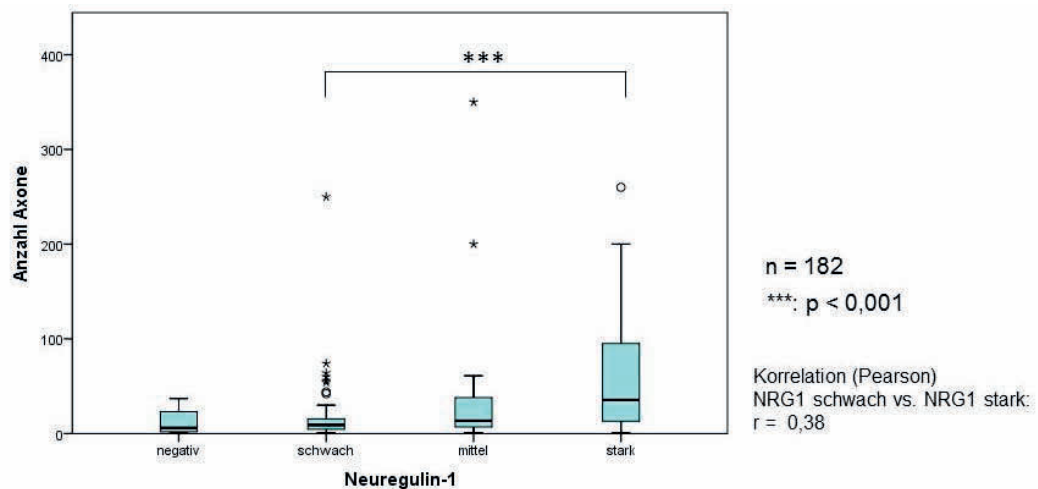


Abb. 64: Boxplot; Anzahl Axone und Neuregulin-1-Expression

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der schwachen und starken Expression von NRG1 in Bezug auf die Anzahl von Axonen ($p < 0,001$). Das heißt Neurofibrome mit einer starken NRG1-Expression wiesen viele Axone und Neurofibrome mit einer schwachen NRG1-Expression wenig Axone auf.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (NRG1 schwach vs. NRG1 stark) und Anzahl Axone lag bei $r = 0,38$ (Pearson Korrelationskoeffizient). Das heißt die Anzahl der Axone korrelierte relativ schwach mit einer starken NRG1-Expression.

4.3.6.6 CD44

In humanen peripheren Nervenscheidentumoren zeigte die Zellmembran von Tumorzellen eine negative bis starke CD44-Expression (Abb. 65).

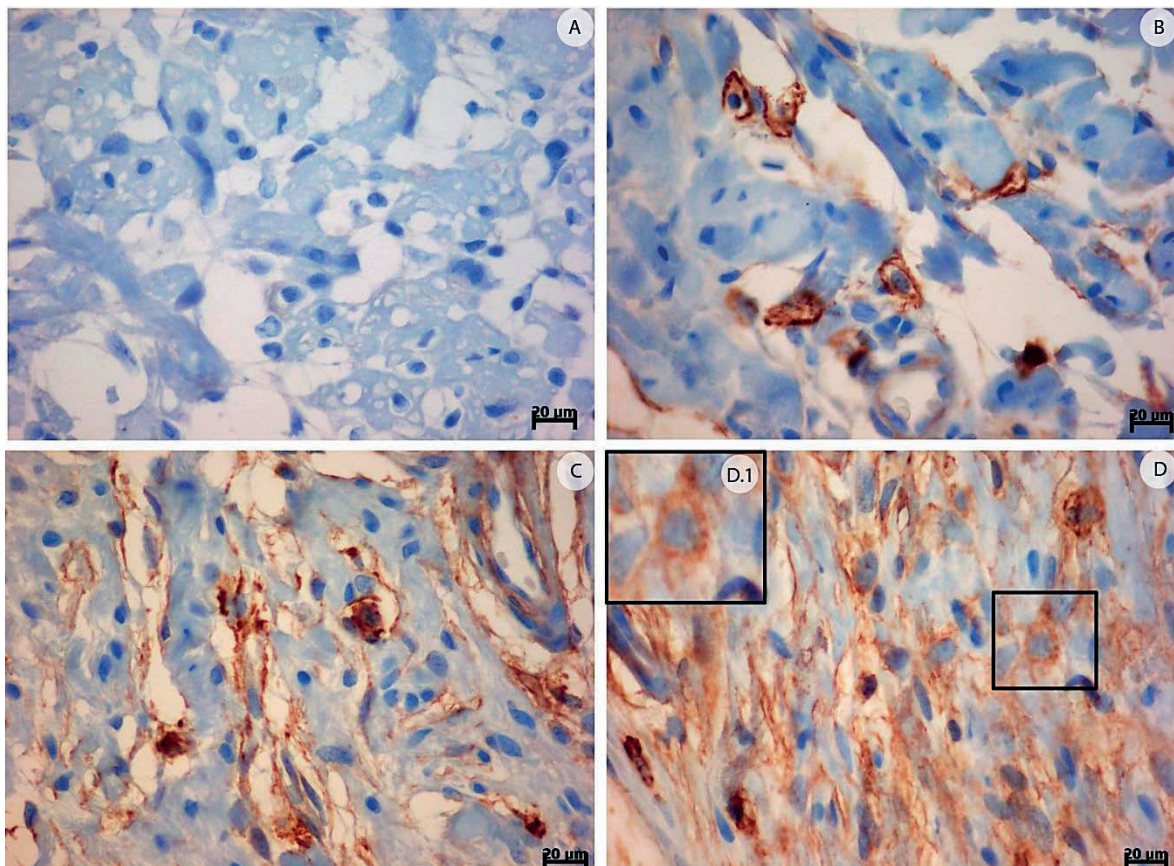


Abb. 65: CD44-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: plexiformes NF, negativ, Patient 390; **B:** plexiform-diffuses NF, schwach positiv, Patient 160/2; **C:** diffuses NF, mittel positiv, Patient 573/2; **D:** plexiform-diffuses NF, stark positiv, Patient 500/2; **D.1:** Insert von D, positives Zytoplasma, ursprüngliche Vergrößerung 40x

Von den in dieser Studie untersuchten humanen PNST (n = 520) lagen aus technischen Gründen zu 33 Fällen (6,3%) keine Ergebnisse vor. Daraus ergibt sich eine Grundgesamtheit von n = 487. Davon waren 24,4% (119/487) negativ und 75,6% (368/487) zeigten eine positive CD44-Expression. Von den positiven Tumoren wiesen 45,8% (223/487) eine schwache, 27,9% (136/487) eine mittlere und 1,8% (9/487) eine starke CD44-Reaktion auf.

Betrachtet man die einzelnen Subtypen separat, zeigten 7,8% (10) der **KNF** (n = 128) eine negative und 92,2% (118/128) eine positive (43% (55/128) schwach, 46,1% (59/128) mittel und 3,1% (4/128) stark) CD44-Reaktion auf. Unter den **DNF** (n = 115) wiesen 18,3% (21/115) eine negative und 81,7% (94) eine positive (59,1% (68/115) schwach, 21,7% (25/115) mittel und 0,9% (1/115) stark) CD44-Expression auf. Die **DPNF** (n = 102) zeigten zu 15,7% (16/102) eine negative, zu 44,1% (45/102) eine schwache, zu 38,2% (39/102) eine mittlere und zu 2% (2/102) eine starke Reaktion (insgesamt positiv: 84,3% (86/102)). Über die Hälfte (54,2%); (65/120) der **PNF** (n = 120) zeigte keine CD44-Expression, 40% (48/120) wiesen eine schwache, 5% (6/120) eine mittlere und 0,8% (1/120) eine starke Reaktion auf. Die **MPNST** (n = 22) waren zu 31,8% (7/22) negativ,

31,8% (7/115) zeigten eine schwache, 31,8% (7/22) eine mittlere und 4,5% (1/22) eine starke Reaktion (gesamt positiv: 68,2% (15/22)). Diese Werte sind in Abb. 66 als Säulendiagramm dargestellt.

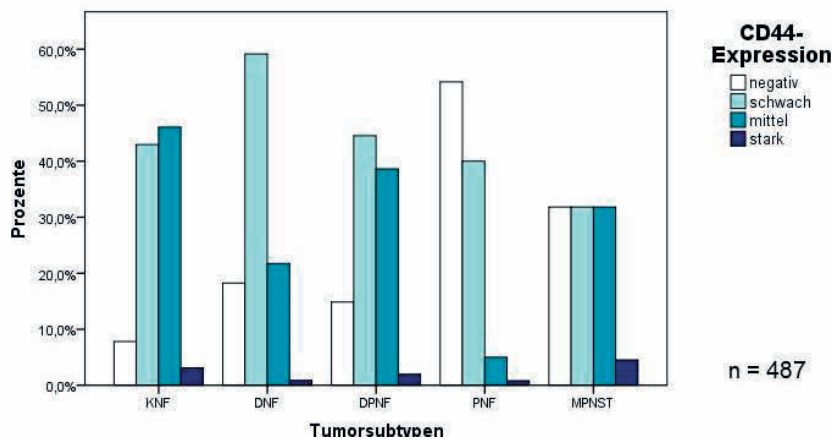


Abb. 66: Säulendiagramm; CD44-Expression in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der CD44-Expression innerhalb der einzelnen PNST-Subtypen

Die statistischen Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede der CD44-Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen Tumorsubtypen.

Bezogen auf das Wachstumsmuster waren die diffus wachsenden Tumore (KNF, DNF, DPNF, MPNST); (n = 367) zu 14,7% (54/367) negativ, 47,7% (175/367) schwach positiv, 35,4% multifokal-diffus (130/367) und zu 2,2% (8/367) diffus positiv (insgesamt positiv: 85,3% (313/367)). PNF (n = 120) waren dahingegen zu 54,2% (65/120) negativ, 40% (48/120) schwach, 5% (6/120) multifokal-diffus und 0,8% (1/120) diffus positiv (gesamt positiv: 44,2% (55/120)); (Abb. 67).

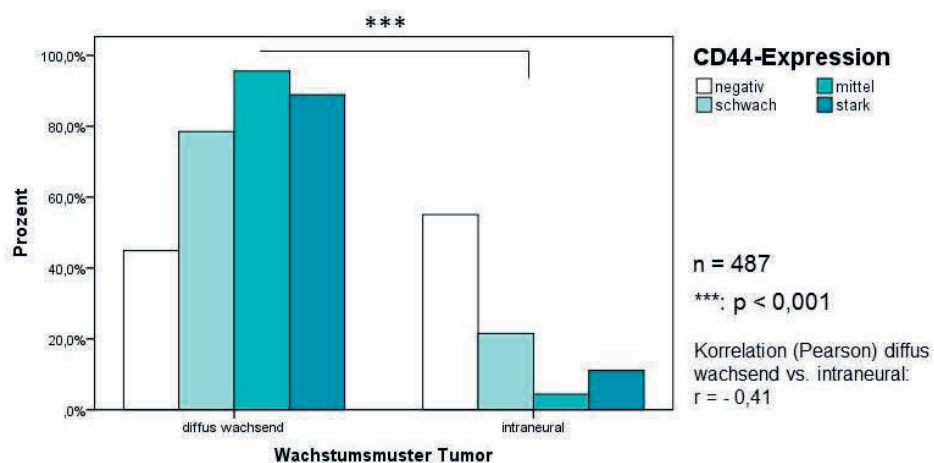


Abb. 67: Säulendiagramm; CD44-Expression in intraneural und diffus wachsenden humanen Nervenscheidentumoren

Prozent = prozentualer Anteil der CD44-Expression innerhalb intraneural und diffus wachsender humaner PNST

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den diffus und intraneural wachsenden Tumoren ($p < 0,001$). Das heißt die diffus wachsenden Tumoren (KNF, DNF, DPNF, MPNST) zeigten eine signifikant stärkere CD44-Expression als die plexiformen Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (diffus vs. intraneural) und CD44 lag bei $r = -0,41$ (Pearsons Korrelationskoeffizient). Somit korrelierte die CD44-Expression relativ schwach mit einem diffusen Wachstumsmuster.

In den untersuchten Tumoren zeigten Entzündungszellen (Mastzellen, Monozyten und Makrophagen) und Drüsen eine CD44-Reaktion.

4.3.6.7 mTor

In den humanen peripheren Nervenscheidentumoren zeigten die Tumorzellkerne eine mTor-Expression (Abb. 68).

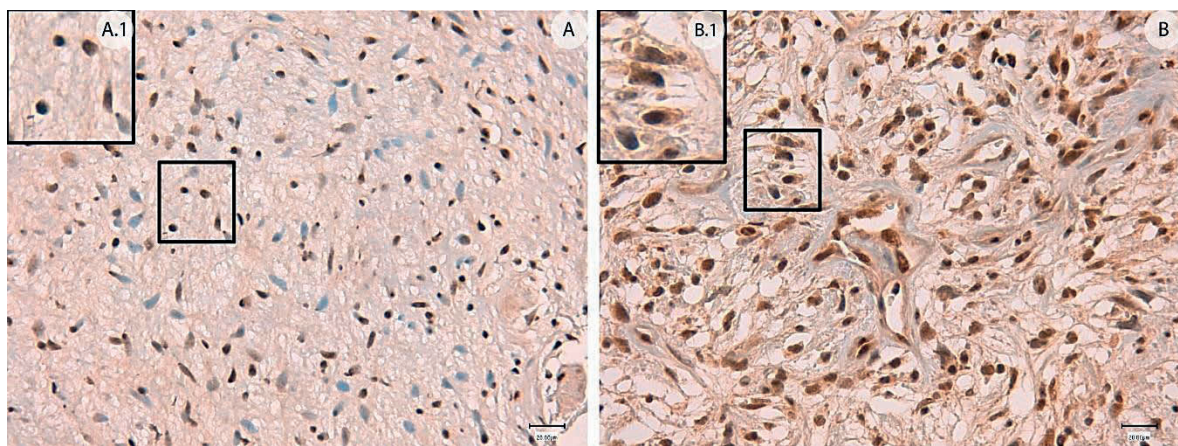


Abb. 68: mTor-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: diffuses NF, Patient 652; **A.1:** Insert von A, positive Zellkerne, ursprüngliche Vergrößerung 40x;
B: MPNST, Patient 1012; **B.1:** Insert von B, positive Zellkerne, ursprüngliche Vergrößerung 40x

Von 26 Fällen (5%), der in dieser Studie untersuchten humanen Neurofibrome und MPNST ($n = 520$), lagen aus technischen Gründen keine Ergebnisse vor. Daraus gibt sich eine Grundgesamtheit von $n = 494$. Der Median der mTor-Indices lag bei 82,6% (72,5%/91,4%).

Betrachtet man die Tumorsubgruppen separat, lag der Median der mTor-Indices für die **KNF** ($n = 136$) bei 85% (79,4%/90,5%), für die **DNF** ($n = 110$) bei 72,7% (66,8%/80,3%), für die **DPNF** ($n = 105$) bei 72,8% (64,7%/80,4%), für die **PNF** ($n = 121$) bei 91,6% (84,6%/95,8%) und für die **MPNST** ($n = 22$) bei 100% (100%/100%). Diese Werte sind in Abb. 69 A als Boxplot dargestellt.

Da die verschiedenen Tumortypen einen unterschiedlich hohen Tumorzellgehalt aufwiesen, wurden mTor-Indices berechnet, die sich auf den Anteil der S100-positiven Zellen beziehen (mTor_vs_%S100_Index). Die MPNST waren davon ausgeschlossen, da sie häufig S100-negativ waren. Für die verschiedenen Subtypen lag der Median dieser Indices für die **KNF** (n = 134) bei 82,8% (54,9%/69,7%), für die **DNF** (n = 103) bei 53,5% (47,4%/60,2%), für die **DPNF** (n = 100) bei 54,4% (45,9%/60,7%) und für die **PNF** (n = 119) bei 65,3% (56,9%/71%). Diese Werte sind in Abb. 69 B als Boxplot dargestellt.

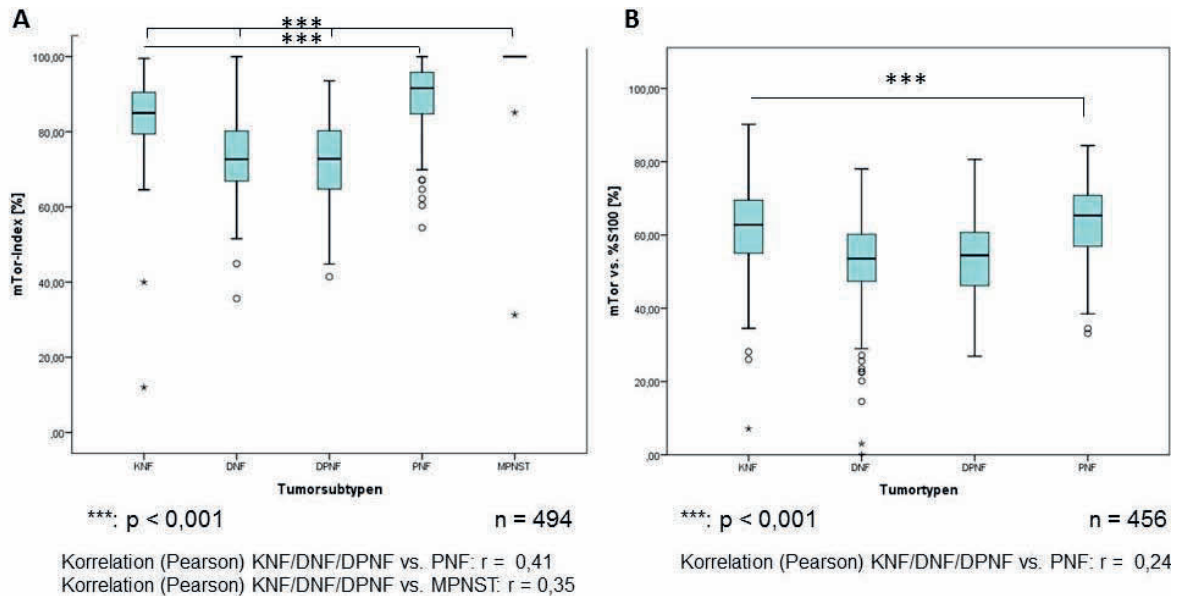


Abb. 69: Boxplot; A: mTor-Index in humanen PNST; **B:** mTor_vs_%S100-Index in humanen Neurofibromen

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte hoch signifikante Unterschiede zwischen KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) im Hinblick auf den mTor-Index und den mTor_vs_%S100-Index und zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p < 0,001$) im Hinblick auf den mTor-Index. Das heißt in den plexiformen Neurofibromen und den MPNST exprimierten signifikant mehr Tumorzellkerne mTor als in den Zellkernen der kutanen, diffusen und plexiform-diffusen Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und mTor-Index lag bei $r = 0,41$ (Pearsons), zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) mTor_vs_%S100-Index bei $r = 0,24$ (Pearsons) und zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und mTor-Index bei $r = 0,35$ (Pearsons). Somit korrelierte ein hoher mTor-Index mit dem Vorkommen von PNF und MPNST und ein hoher mTor_vs_%S100-Index mit dem Vorkommen von PNF.

Um einen Vergleich zu der mTor-Expression im normalen Gewebe zu haben, wurde der mTor detektierende Antikörper an 6 humane Nerven getestet. In diesen Nerven exprimierten das Perineurium, die Gefäßwand und die Mastzellen mTor.

In humanen Neurofibromen zeigten zudem Drüsen, Mast- und Endothelzellen eine mTor-Expression.

4.3.6.8 Rho

In humanen peripheren Nervenscheidentumoren zeigte das Zytoplasma der Tumorzellen eine negative bis starke Rho-Expression (Abb. 70).

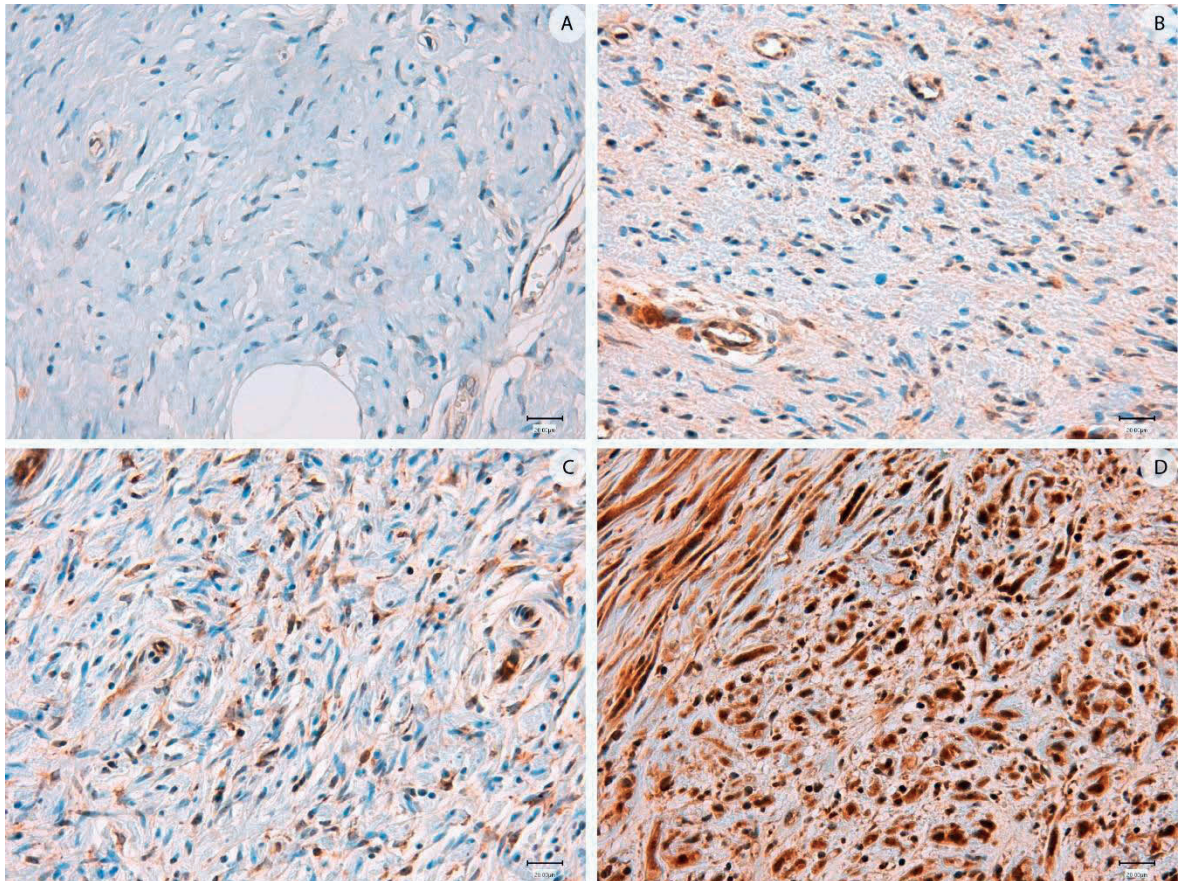


Abb. 70: Rho-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: kutanes NF, negativ, Patient 505; **B:** diffuses NF, schwach positiv, Patient 281; **C:** plexiform-diffuses NF, mittel positiv, Patient 354/1; **D:** MPNST, stark positiv, Patient 1017

Mit dem gegen Rho gerichteten Antikörper wurde eine Stichprobe, die etwa die Hälfte ($n = 215$) der humanen Neurofibrome und MPNST umfasste, untersucht, hier aber alle Fälle bewertet. 14% (30/215) zeigten keine, 86% (185/215) eine positive Immunreaktion für Rho. Mehr als die Hälfte (53,5%); (115/215) waren schwach, 27% (58/215) mittel und 5,6% (12/215) stark positiv.

KNF ($n = 48$) zeigten zu 18,8% (9/48) eine negative, zu 68,8% (33/48) eine schwache, zu 12,5% (6/48) eine mittlere und zu 0% eine starke Rho-Expression (gesamt positiv: 81,2% (39/48)). **DNF** ($n = 49$) waren zu 8,2% (4/49) negativ und zeigten zu 44,9% (22/48) eine schwache, zu 46,9% (23/48) eine mittlere und zu 0% eine starke Rho-Expression (gesamt positiv: 91,8% (45/49)). Von den **DPNF** ($n = 47$) waren 14,9% (7/47) negativ und 85,1%

(40/47) positiv. Davon zeigten 57,4% (27/47) eine schwache, 25,5% (12/48) eine mittlere und 2,1% (1/47) eine starke Rho-Expression. **PNF** (n = 49) waren zu 18,4% (9/49) negativ und wiesen zu 59,2% (29/49) eine schwache, zu 20,4% (10/49) eine mittlere und zu 2% (1/49) eine starke Rho-Reaktion auf (gesamt positiv: 81,6% (40/49)). Die **MPNST** (n = 22) waren der Subtyp mit dem größten Anteil einer starken Expression (45,5%); (10/22). 31,8% (7/22) wiesen eine mittlere, 18,2% (4/22) eine schwache und 4,5% (1/22) eine negative Reaktion auf. Abb. 71 zeigt eine graphische Darstellung dieser Werte.

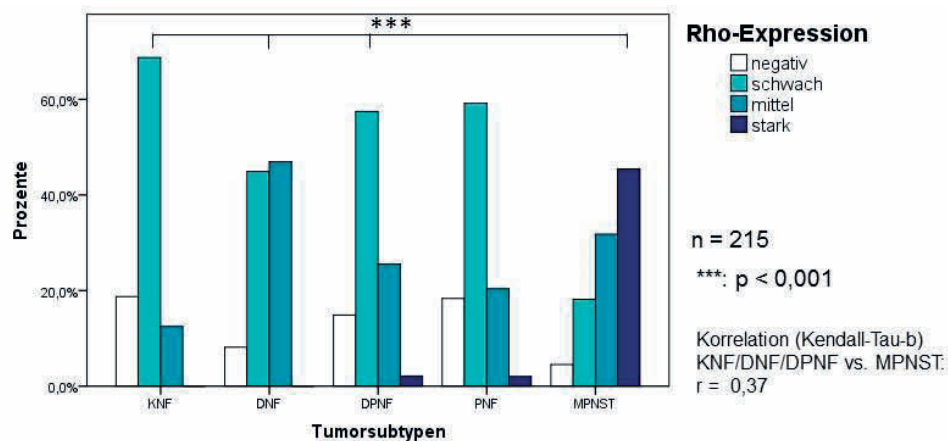


Abb. 71: Säulendiagramm: Rho-Expression in humanen PNST
Prozent = prozentualer Anteil der Rho-Expression innerhalb der PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p > 0,001$). Das heißt, MPNST exprimierten signifikant mehr Rho als kutane, diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und Rho lag bei $r = 0,37$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die Rho-Expression relativ schwach mit dem Vorkommen von MPNST.

Um einen Vergleich zu der Rho-Expression im normalen Gewebe zu haben, wurden 6 humane Nerven mit dem an Rho bindenden Antikörper getestet. In einzelnen Fällen wurden fokal Schwann-Zellen angefärbt. Gefäßwände waren regelmäßig positiv.

In den humanen Neurofibromen zeigten zusätzlich Drüsen, Endothel- und Mastzellen eine unspezifische Rho-Expression.

4.3.6.9 MEK

In humanen PNST zeigte das Zytoplasma der Tumorzellen eine positive oder negative MEK-Expression (Abb. 72).

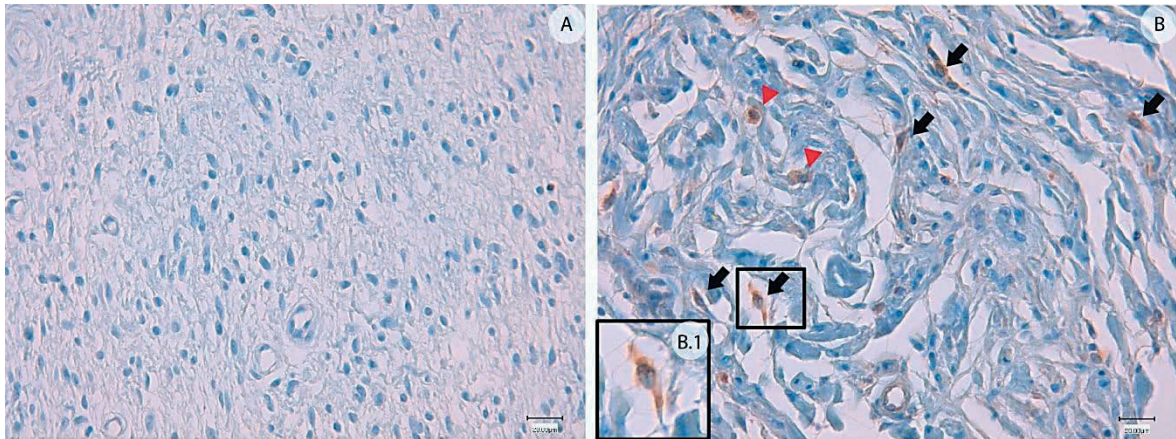


Abb. 72: MEK-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: plexiform-diffuses NF, negativ, Patient 521/1; **B:** diffuses NF, positive Tumorzellen (schwarze Pfeile) und Mastzellen (rote Pfeile), Patient 686; **B.1:** Insert von B, positive Tumorzelle, ursprüngliche Vergrößerung 40x

Mit dem gegen MEK gerichteten Antikörper wurde eine Stichprobe, die etwa die Hälfte ($n = 222$) der humanen Neurofibrome und MPNST umfasste, untersucht, hier aber alle Fälle bewertet. 41,9% (93/222) waren negativ, 58,1% (129/222) positiv für MEK.

Betrachtet man die Tumorsubtypen einzeln, zeigten 98% (48/49) der **KNF** ($n = 49$), 46,7% (28/60) der **DNF** ($n = 60$), 14,6% (6/41) der **DPNF** ($n = 41$), 78% (39/50) der **PNF** ($n = 50$) und 36,4% (8/22) der **MPNST** ($n = 22$) eine positive MEK-Expression. Abb. 73 zeigt eine graphische Darstellung dieser Werte.

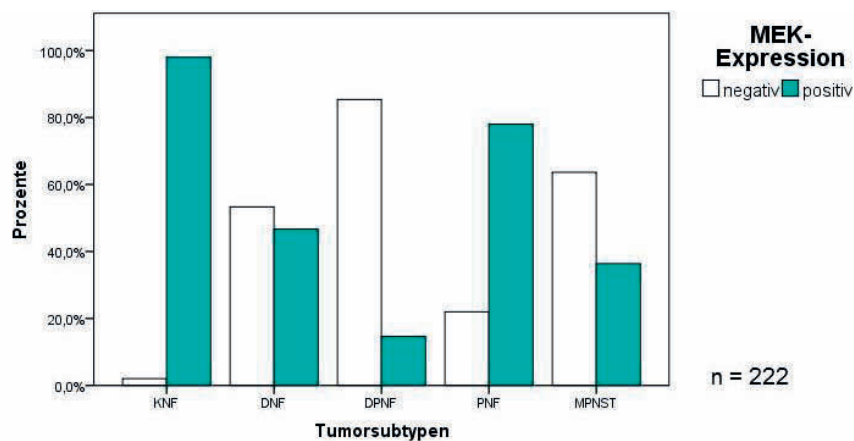


Abb. 73: Säulendiagramm; MEK-Expression in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der MEK-Expression innerhalb der PNST-Subtypen

Die statistischen Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede der MEK-Expression innerhalb der humanen peripheren Nervenscheidentumorsubtypen.

Um einen Vergleich zu der MEK-Expression im normalen Gewebe zu haben, wurden 6 humane Nerven mit dem gegen MEK gerichteten Antikörper getestet. In einzelnen Fällen exprimierten fokal Schwann-Zellen MEK, Gefäßwände waren regelmäßig positiv. Zudem zeigten Mastzellen eine positive MEK-Reaktion.

4.3.6.10 pMEK

Da die Auswertung von MEK keine Aussage über die Funktionalität der MEK-Kinase erlaubte, wurde in einer zweiten Untersuchung die Expression von phosphoryliertem (aktivem) pMEK in den humanen peripheren Nervenscheidentumoren untersucht. Dort zeigte das Zytoplasma der Tumorzellen eine negative bis starke pMEK-Expression (Abb. 74).

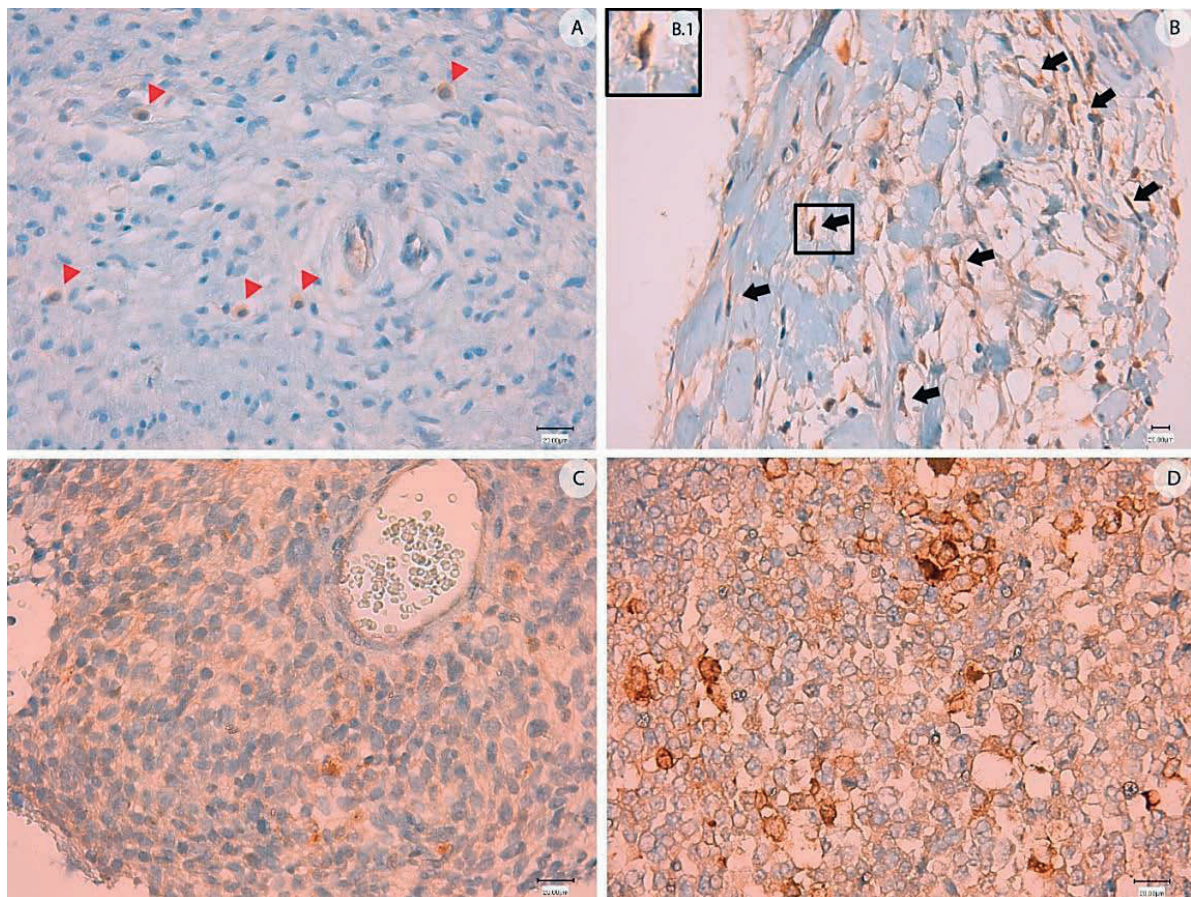


Abb. 74: pMEK in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: diffuses NF, negativ, Mastzellen positiv (rote Pfeile), Patient 52; **B:** plexiformes NF, schwach positiv (schwarze Pfeile), Patient 66/2; **B.1:** Insert von B, positive Tumorzelle, urspr. Vergr. 40x; **C:** MPNST, mittel positiv, Patient 1015; **D:** MPNST, stark positiv, Patient 1016

Mit dem gegen pMEK gerichteten Antikörper wurde eine Stichprobe, die etwa die Hälfte ($n = 237$) der humanen peripheren Nervenscheidentumore umfasste, untersucht, hier aber alle Fälle bewertet. 16,8% (40/237) der Tumore waren pMEK-positiv, 83,1% (197/237) negativ.

Alle **KNF** ($n = 48$) waren negativ für pMEK. Die **DNF** ($n = 70$) waren zu 90% (63/70) negativ und zeigten zu 10% (7/70) eine schwach positive Reaktion, die **DPNF** ($n = 51$) waren zu 98% (50/51) negativ und zeigten zu 2% (1/51) eine schwach positive pMEK-Expression. Die **PNF** ($n = 49$) waren zu 57,1% (28/49) negativ und wiesen zu 42,9% (21/49) eine schwach positiv Reaktion auf. Die **MPNST** ($n = 19$) waren die einzige

Subgruppe, in der auch eine mittlere (26,3% (5/19)) und starke (5,3% (1/19)) Expression nachgewiesen werden konnte (42,1% (8/19) negativ, 26,3% (5/19) schwach). In Abb. 75 sind diese Werte als Säulendiagramm dargestellt.

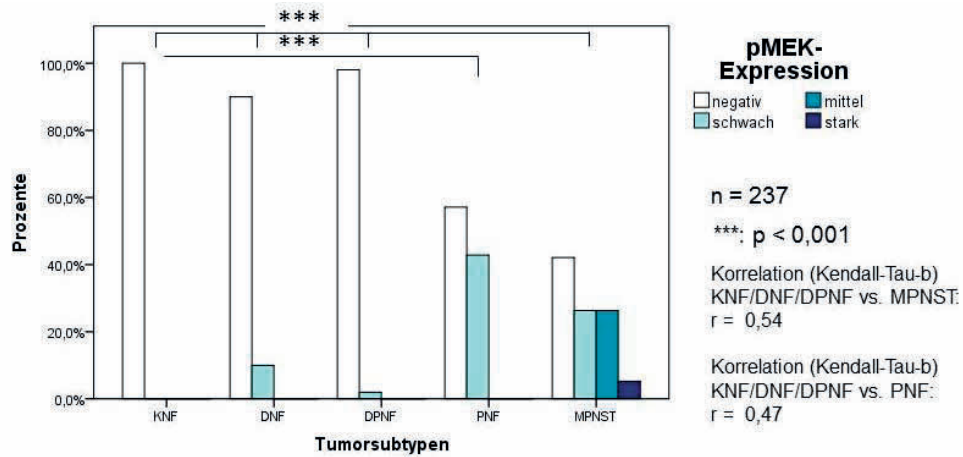


Abb. 75: Säulendiagramm; pMEK-Expression in humanen PNST

Prozent = prozentualer Anteil der pMEK-Expression innerhalb der PNST-Subtypen

Der Chi²-Test zeigte hoch signifikante Unterschiede sowohl zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p < 0,001$) als auch zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$). Das heißt die plexiformen Neurofibrome und die MPNST waren signifikant häufiger pMEK-positiv als die kutanen, diffusen und plexiform-diffusen Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und pMEK lag bei $r = 0,54$ (Kendall-Tau-b) und zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und pMEK bei $r = 0,47$ (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die pMEK-Expression relativ gut mit dem Vorkommen von MPNST und etwas schlechter mit dem Vorkommen von PNF.

Um einen Vergleich zu der pMEK-Expression im normalen Gewebe zu haben, wurden 6 humane Nerven mit dem an pMEK bindenden Antikörper gefärbt. In einzelnen Fällen zeigte das Perineurium eine pMEK-Expression.

In den untersuchten Tumoren zeigten außerdem Mastzellen und Drüsen eine unspezifische pMEK-Expression.

4.3.6.11 Sox9

In den humanen Neurofibromen und MPNST zeigten die Tumorzellkerne eine Sox9-Expression (Abb. 76).

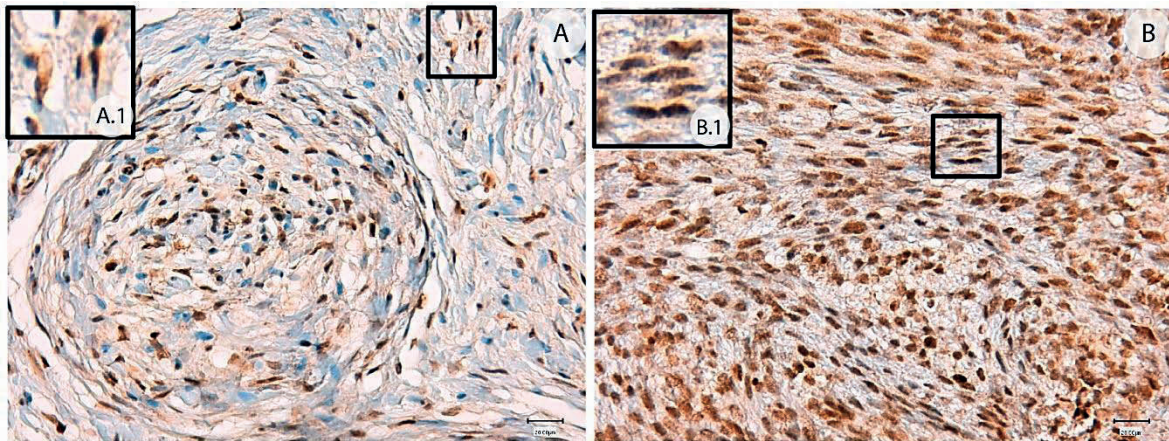


Abb. 76: Sox9-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: plexiform-diffuses NF, Patient 486; **A.1:** Insert von A, positive Zellkerne, urspr. Vergr. 40x; **B:** MPNST, Patient 1015; **B.1:** Insert von B, positive Zellkerne, urspr. Vergr. 40x

Zu 15 Fällen (2,9%), der in dieser Studie untersuchten humanen PNST (n = 520), lagen aus technischen Gründen keine Ergebnisse vor. Daraus gibt sich eine Grundgesamtheit von n = 505. Der Median der Sox9-Indices aller benignen Neurofibrome und MPNST lag bei 87,2% (79,1%/93,3%).

Betrachtet man die Tumorsubgruppen separat, lag der Median für **KNF** (n = 135) bei 79,8% (74,3%/85,4%), für **DNF** (n = 116) bei 89,2% (82,5%/92,3%), für **DPNF** (n = 111) bei 83% (77,8%/88,4%), für **PNF** (n = 121) bei 94,1% (90,2%/97,4%) und für **MPNST** (n = 22) bei 100% (100%/100%). Diese Werte sind in Abb. 77 A als Boxplot dargestellt

Da die verschiedenen Tumortypen einen unterschiedlich hohen Tumorzellgehalt aufweisen, wurden Sox9-Indices berechnet, die sich auf den Anteil der S100-positiven Zellen beziehen (Sox9_vs_%S100-Index). Die MPNST wurden davon ausgeschlossen, da sie häufig S100-negativ waren. Für die verschiedenen Subtypen lag der Median für **KNF** (n = 133) bei 58% (50,8%/65,4%), für **DNF** (n = 107) bei 65,2% (56,8%/71,2%), für **DPNF** (n = 107) bei 61,9% (55,2%/67,1%) und für **PNF** (n = 118) bei 67,7% (60,5%/74,1%). Diese Werte sind in Abb. 77 B als Boxplot dargestellt

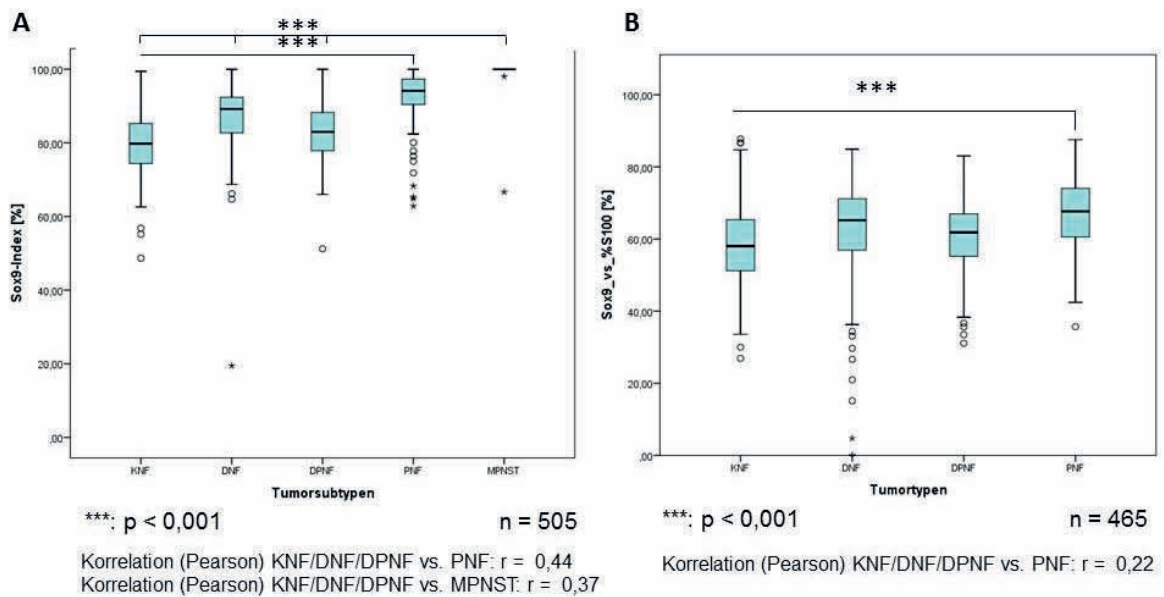


Abb. 77: Boxplot; A: Sox9-Index in humanen PNST; B: Sox9_vs_%S100-Index in humanen Neurofibromen

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte je einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) bezogen auf den Sox9-Index und den Sox9_vs_%S100-Index und zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p < 0,001$) in Bezug auf den Sox9-Index. Das heißt in den plexiformen Neurofibromen und den MPNST exprimierten signifikant mehr Tumorzellkerne Sox9 als in den Zellkernen der kutanen, diffusen und plexiform-diffusen Neurofibrome.

Die Korrelation (nach Pearson) zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und Sox9-Index lag bei $r = 0,44$, zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und Sox9-Index bei $r = 0,22$ und die zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und Sox9-Index bei $r = 0,37$. Somit korrelierte der Sox9-Index relativ schlecht mit dem Vorkommen von PNF und MPNST.

In den humanen Neurofibromen exprimierten zusätzlich Mastzellen unspezifisch Sox9.

4.3.6.12 Pax7

In den benignen Neurofibromen und den MPNST zeigten die Tumorzellkerne eine Pax7-Expression (Abb. 78).

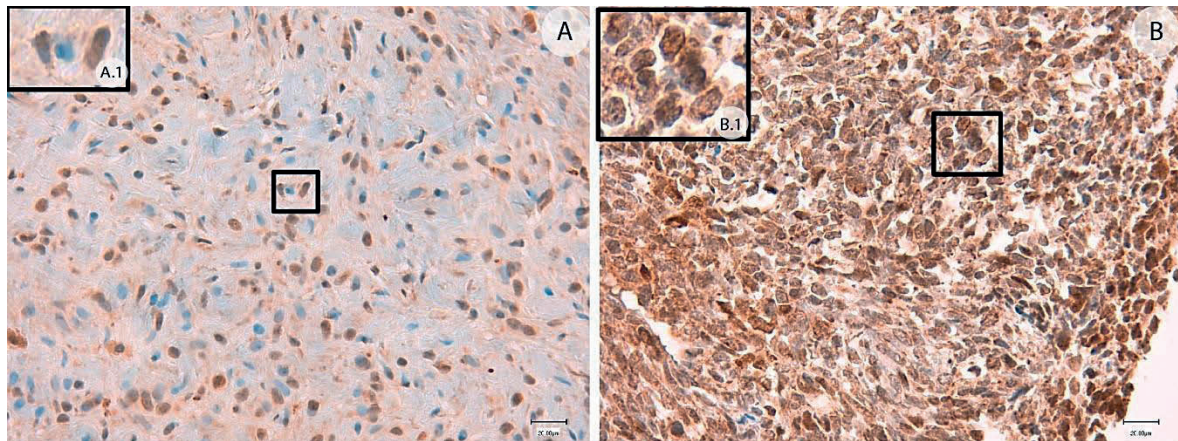


Abb. 78: Pax7-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren

A: diffuses NF, Patient 470; **A.1:** Insert von A, positive Zellkerne, urspr. Vergr. 40x ; **B:** MPNST, Patient 1013; **B.1:** Insert von B, positive Zellkerne, urspr. Vergr. 40x

Mit dem gegen Pax7 gerichteten Antikörper wurde aus Zeitgründen nur knapp die Hälfte ($n = 218$) der humanen peripheren Nervenscheidentumore untersucht, hier aber alle Fälle bewertet. Der Median der Pax7-Indices bei allen hPNST lag bei 69,4% (53,9%/84,2%).

Betrachtet man die einzelnen Tumorguppen separat, lag der Median für **KNF** ($n = 48$) bei 77,1% (71,2%/83,6%), für **DNF** ($n = 54$) bei 56,7% (47,9%/64,5%), für **DPNF** ($n = 50$) bei 49,2% (41,9%/59,5%), für **PNF** ($n = 47$) bei 85,5% (73,1%/90,9%) und für **MPNST** ($n = 19$) bei 98,6% (92,6%/100%). Diese Werte sind in Abb. 79 A dargestellt.

Da die verschiedenen Tumortypen einen unterschiedlich hohen Tumorzellgehalt aufwiesen, wurden Pax7-Indices berechnet, die sich auf den Anteil der S100-positiven Zellen beziehen (Pax7_vs_%S100-Index). Die MPNST sind davon ausgeschlossen, da sie häufig S100-negativ waren. Für die verschiedenen Subtypen lag der Median für **KNF** ($n = 48$) bei 56,1% (49,8%/65,4%), für **DNF** ($n = 51$) bei 40,7% (27,8%/49%), für **DPNF** ($n = 50$) bei 37,8% (32,3%/45%) und für **PNF** ($n = 47$) bei 64,2% (55,6%/70,8%). Diese Werte sind in Abb. 79 B dargestellt.

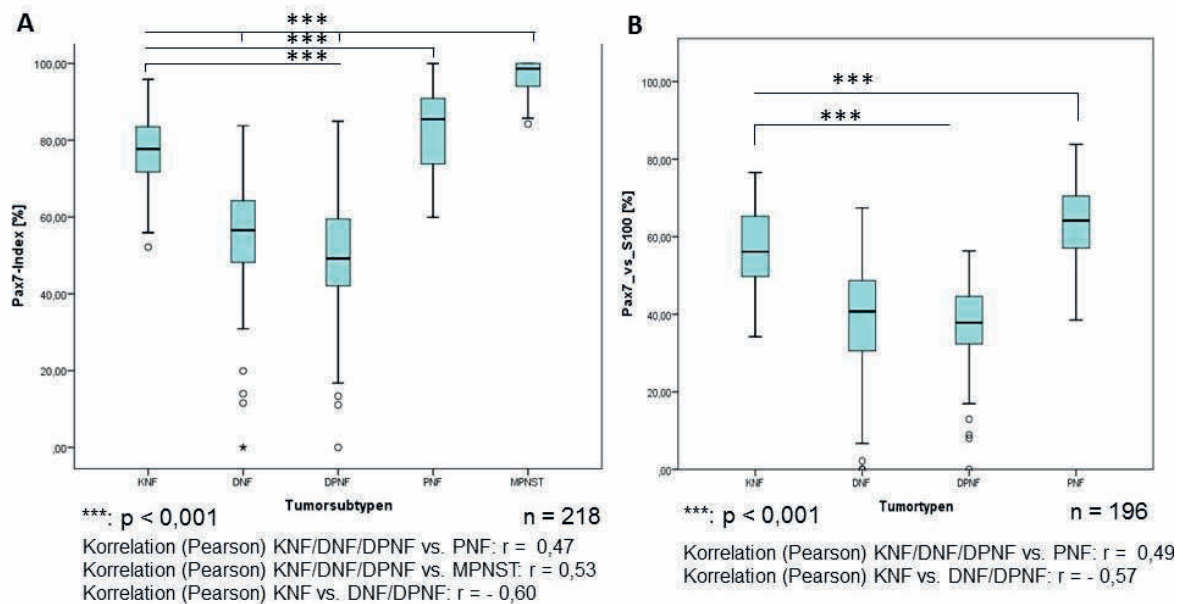


Abb. 79: Boxplot; A: Pax7-Index in humanen PNST; B: Pax7_vs_%S100-Index in humanen Neurofibromen

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte für den Pax7-Index je einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) als auch zwischen den KNF/DNF/DPNF und den MPNST ($p < 0,001$) und zwischen den Tumorguppen DNF/DPNF und den KNF ($p < 0,001$).

Für den Pax7_vs_%S100-Index zeigt der Mann-Whitney-U-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den KNF/DNF/DPNF und den PNF ($p < 0,001$) als auch zwischen den Tumorguppen DNF/DPNF und den KNF ($p < 0,001$).

Das heißt plexiforme Neurofibrome und MPNST wiesen meist höhere Pax7-Indices auf als kutane, diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome. Außerdem hatten kutane Neurofibrome meist höhere Pax7-Indices als diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und Pax7-Index lag bei $r = 0,47$ (Pearson), die zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. MPNST) und Pax7-Index bei $r = 0,53$ und die zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF vs. DNF/DPNF) und Pax7-Index bei $r = -0,60$. Die Korrelation (Pearson) zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF/DNF/DPNF vs. PNF) und Pax7_vs_%S100-Index lag bei $r = 0,49$ (Pearson) und zwischen Gruppenzugehörigkeit (KNF vs. DNF/DPNF) und Pax7_vs_%S100-Index bei $r = -0,57$.

Das heißt die Korrelation zwischen dem Pax7-Index und dem Vorkommen von PNF war relativ gering. Etwas höher korrelierte der Pax7-Index mit dem Vorkommen von MPNST. Noch besser korrelierte der Pax7-Index mit dem Vorkommen von KNF im Bezug zu DNF

und DPNF. Der Pax7_vs_%S100-Index korrelierte mittelmäßig mit dem Vorkommen von PNF und etwas höher mit dem Vorkommen von KNF.

4.3.7 Hund: Faktoren des Tumorwachstums

4.3.7.1 Ki-67-Index

Das Ki-67-Protein wurde in Kernen proliferierender Zellen detektiert. Es wurden alle positiven Kerne auf einer Fläche von 0,12 mm² bestimmt. Aus diesen Zahlen wurde der Ki-67-Index berechnet (siehe 3.2.6.3).

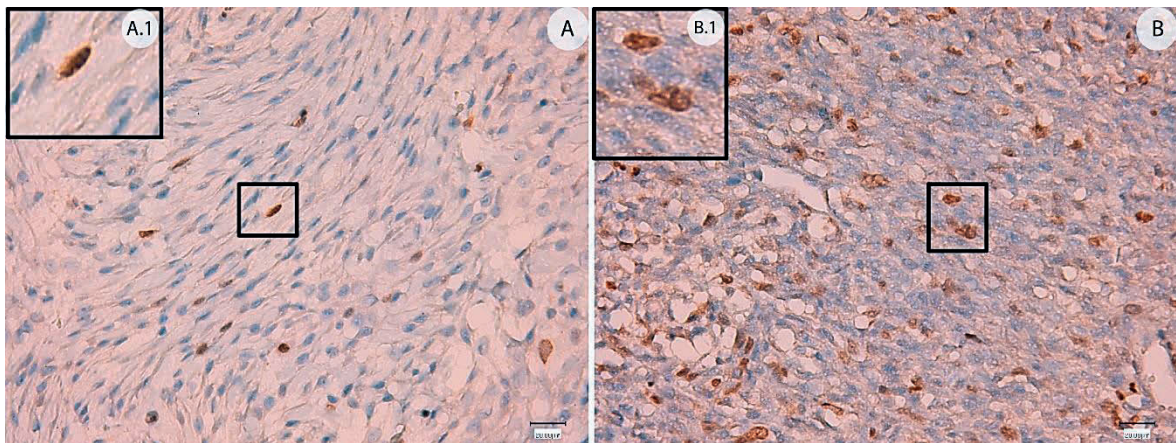


Abb. 80: Ki-67-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: wenige proliferierende Zellen, Patient 83; **A.1:** Insert von A, positive Zelle, urspr. Vergr. 40x; **B:** vermehrt proliferierende Zellen, Patient 66; **B.1:** Insert von B, positive Zellen, urspr. Vergr. 40x

Der Median der Ki-67-Indices für alle cMPNST ($n = 75$) lag bei 10,9% (7,2%/21,8%).

Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Tumore in fünf Ki-67-Index Gruppen eingeteilt. 10,7% (8/75) der Tumore hatten einen Ki-67-Index von 0-5%, 34,7% (26/75) von > 5-10%, 17,3% (13/75) von > 10-15%, 10,7% (8/75) von > 15-20% und 26,7% (20/75) von > 20%. Diese Werte sind in Abb. 81 als Säulendiagramm dargestellt.

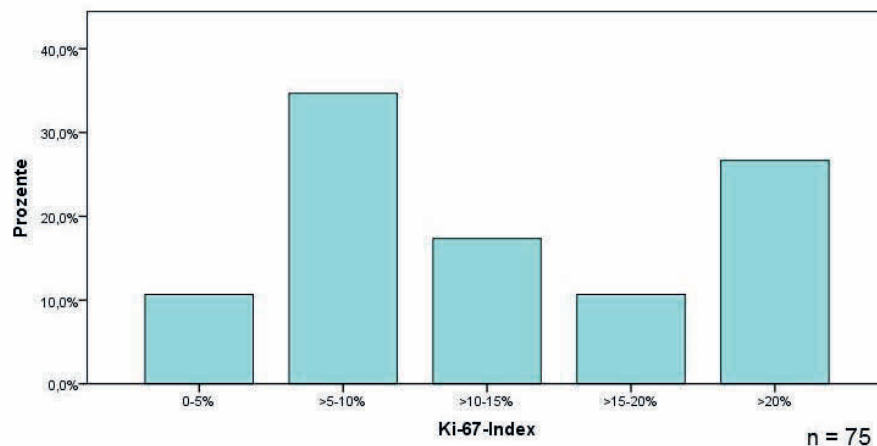


Abb. 81: Säulendiagramm; Ki-67-Index in cMPNST

4.3.7.2 Zellularität

Die Zellularität wurde in allen cMPNST (n = 75) auf einer Fläche von 0,12 mm² bestimmt. Der Median lag bei 205 Zellen (170/284).

Die Korrelation (nach Pearson) zwischen dem Ki-67-Index und der Zellularität lag bei $r = -0,05$. Demnach besteht nahezu keine Korrelation zwischen dem Ki-67-Index und der Zellularität bei cMPNST.

4.3.7.3 Neuregulin-1

In den cMPNST zeigte die Zellmembran von Tumorzellen eine negative bis starke Neuregulin-1-Expression (Abb. 82). Insgesamt war die Expressionsintensität bei den cMPNST schwächer ausgeprägt als bei den humanen Neurofibromen.

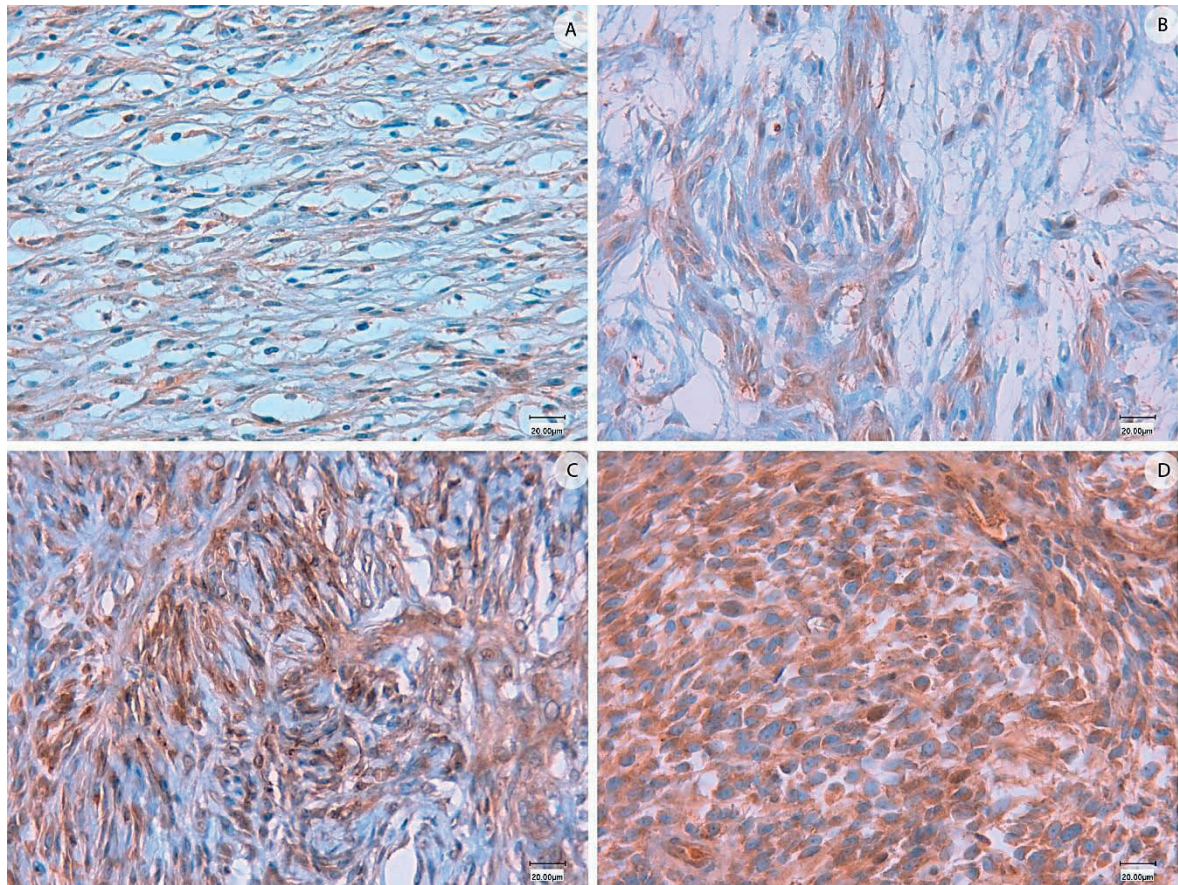


Abb. 82: Neuregulin-1-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren

A: schwach positiv, Patient 06; **B:** multifokal mittel positiv gefärbt, Patient 19; **C:** multifokal stark positiv, Patient 55; **D:** diffus stark positiv, Patient 27

0% der cMPNST (n = 75) waren negativ für NRG1, 12% (9/75) zeigten eine schwache, 29,3% (22/75) eine schwach-mittlere, 50,7% (38/75) eine mittel-stark und 8% (6/75) eine starke Expression.

Weitere Zellen, die eine unspezifische Reaktion für NRG1 zeigten, waren Mast- und Entzündungszellen.

4.3.8 Vergleich Mensch – Hund: Faktoren des Tumorwachstums

4.3.8.1 Ki-67-Index

Die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen wurde sowohl bei den humanen MPNST (hMPNST) als auch bei den caninen MPNST (cMPNST) auf einer Fläche von 0,12 mm² bestimmt. Aus dieser Zahl wurde der Ki-67-Index berechnet (siehe 3.2.6.3).

Vergleicht man die Mediane der Ki-67-Indices lag der Median der **hMPNST** (n = 16) bei 16,9% (13,2%/29,7%) und der Median der **cMPNST** (n = 75) bei 10,9% (7,2%/21,8%). In Abb. 83 sind diese Werte dargestellt.

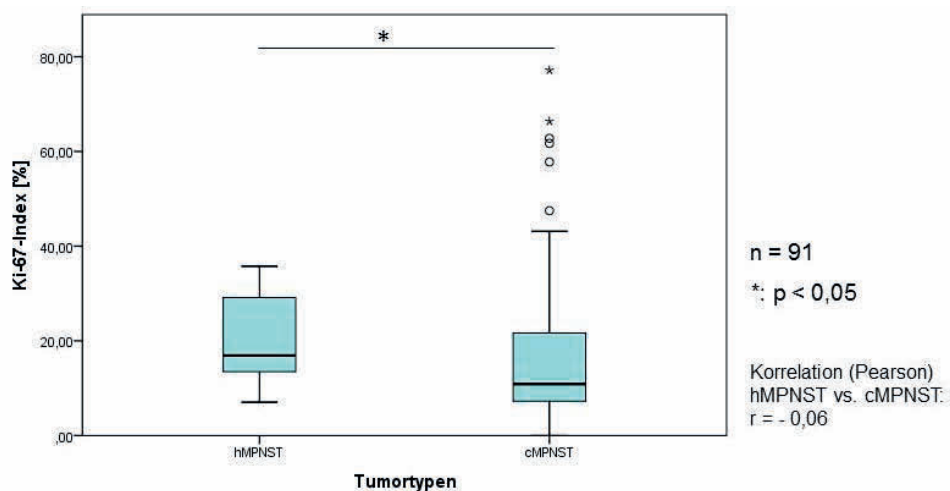


Abb. 83: Boxplot; Vergleich Ki-67-Indices in hMPNST und cMPNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Ki-67-Indices der hMPNST und der cMPNST (p = 0,04). Das heißt, dass die hMPNST meist einen höheren Ki-67-Index aufwiesen als die cMPNST.

Die Korrelation (nach Pearson) zwischen Gruppenzugehörigkeit und Ki-67-Index lag bei r = - 0,06. Somit korrelierte der Ki-67-Index fast gar nicht mit dem Vorkommen von hMPNST.

4.3.8.2 Zellularität

Die Zellularität wurde für humane und canine MPNST auf einer Fläche von 0,12 mm² bestimmt. Die mediane Zellularität lag für **hMPNST** (n = 16) bei 510 Zellen (237/692). Der Median für **cMPNST** (n = 75) lag bei 205 Zellen (170/284). Die Werte sind in Abb. 84 dargestellt.

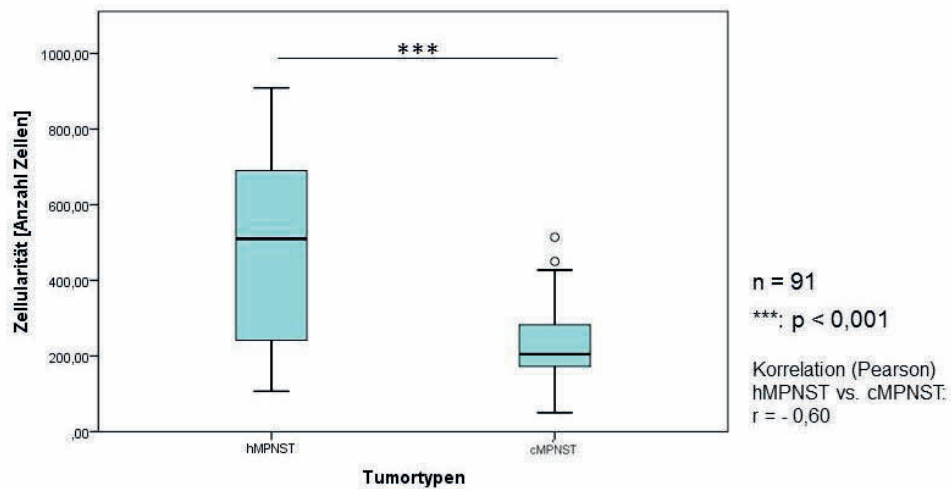


Abb. 84: Boxplot; Vergleich Zellularität in hMPNST und cMPNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Zellularität der hMPNST und der cMPNST ($p < 0,001$). Das heißt, dass die hMPNST signifikant zellreicher waren als die cMPNST.

Die Korrelation (nach Pearson) zwischen Gruppenzugehörigkeit und Zellularität lag bei $r = - 0,60$. Das heißt die Zellularität korrelierte relativ gut mit dem Vorkommen von hMPNST.

4.3.8.3 Neuregulin-1

Vergleicht man die Expression von Neuregulin-1 (NRG1) zwischen hMPNST ($n = 21$) und cMPNST ($n = 75$), waren 9,5% (2/21) der **hMPNST** negativ, 66,7% (14/21) zeigten eine schwache, 23,8% (5/21) eine mittlere und 0% eine starke NRG1-Expression (gesamt positiv: 90,5% (19/21)). Bei den **cMPNST** waren 0% negativ und 12% (9/75) zeigten eine schwache, 29,3% (22/75) eine mittlere und 58,7% (44/75) eine starke NRG1-Expression. Bezieht man in den Vergleich auch noch die benignen humanen Neurofibrome mit ein, zeigt sich das in Abb. 85 dargestellte Bild. Die detaillierten Werte zu den jeweiligen Tumorsubtypen sind unter 4.3.6.5 zu finden.

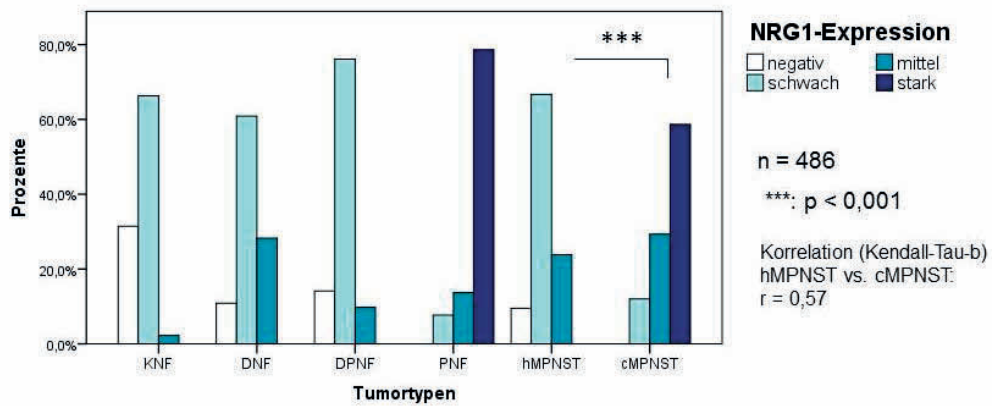


Abb. 85: Säulendiagramm; Vergleich NRG1-Expression in humanen PNST und cMPNST
 Prozent = prozentualer Anteil der NRG1-Expression innerhalb der PNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen hMPNST und cMPNST in Bezug auf die Expression von NRG1 (p < 0,001). Das heißt, die hMPNST zeigten meist eine schwache bis mittlere und die cMPNST eine stärkere Expression von NRG1, ähnlich wie die plexiformen Neurofibrome.

Die Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) und Neuregulin-1 lag bei r = 0,57 (Kendall-Tau-b). Somit korrelierte die NRG1-Expression relativ gut mit dem Vorkommen von cMPNST.

4.4 Mensch: weitere Auswertung

4.4.1 FNCLCC-Grading

Die humanen MPNST (n = 21) wurden nach den Kriterien des FNCLCC-Gradings (siehe 3.2.6.4) eingeteilt.

14,3% (3/21) der Tumore wurden als Sarkome Grad I, 52,4% (11/21) als Sarkome Grad II und 33,3% (7/22) als Sarkome Grad III eingestuft.

Bezogen auf das Auftreten von Nekrosen zeigten 55% (11/20) der MPNST (n = 20) keine und 45,5% (9/20) mindestens eine deutlich zu erkennende Nekrose (mindestens ½ Gesichtsfeld in der 20-fachen Vergrößerung (0,46 mm²) groß). Bei der Bewertung, ob eine Nekrose vorhanden war, wurde der gesamte Histologieschnitt bewertet.

Bei den humanen MPNST wurde die Mitoseanzahl auf einer Fläche von 10 Gesichtsfeldern in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²) bestimmt (n = 20). Der Median lag bei 7 (5/11,5).

4.4.2 Korrelationsberechnungen Variablen untereinander

Um zu untersuchen inwieweit Beziehungen zwischen denen in dieser Arbeit erfassten Variablen bestehen, wurden für jeden Subtyp der humanen peripheren

Nervenscheidentumore bivariate Korrelationsanalysen durchgeführt. Dabei wurden die KNF, PNF und MPNST separat betrachtet und die DNF und DPNF als eine Gruppe (im Folgenden D/PNF genannt) zusammengefasst, da sie sich in den vorausgegangenen Auswertungen der Variablen nahezu gleich verhielten.

Im Folgenden sind nur Ergebnisse dargestellt, bei denen das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ lag. Die Variable CD90 wurde so umkodiert, dass nur zwischen negativ (keine CD90-positiven Zellen vorhanden) und positiv (CD90-positive Zellen vorhanden) unterschieden wurde. Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen sind erst schriftlich und danach als Tabelle dargestellt.

Dermale/Kutane Neurofibrome

Jüngere KNF-Patienten hatten höhere Ki-67-Indices ($r = -0,21$; $p < 0,05$) und mehr Axone innerhalb des Tumors ($r = -0,35$; $p < 0,01$) als ältere KNF-Patienten.

In niedrig zellulären KNF waren Ki-67- ($r = -0,28$; $p < 0,01$), mTor- ($r = -0,24$; $p < 0,05$), Sox9- ($r = -0,36$; $p < 0,001$) und Pax7-Indices ($r = -0,35$; $p < 0,05$) erhöht.

In KNF in denen vermehrt Mastzellen ($r = 0,23$; $p < 0,01$) und CD90-positive Zellen (Fibroblasten); ($r = 0,23$; $p < 0,05$) vorkamen, war jeweils auch der Sox9-Index erhöht.

In KNF mit hohen Ki-67-Indices waren die mTor- ($r = 0,33$; $p < 0,01$) und Sox9-Indices ($r = 0,32$; $p < 0,05$) ebenfalls erhöht. In KNF mit hohen mTor-Indices wurde ErbB3 ($r = 0,37$; $p < 0,05$) stärker exprimiert und die Sox9- ($r = 0,42$; $p < 0,001$) und Pax7-Indices ($r = 0,59$; $p < 0,001$) waren erhöht. In KNF, in denen NRG1 stark exprimiert wurde, waren die Pax7-Indices ebenfalls erhöht ($r = 0,35$; $p < 0,05$). In KNF, in denen der ErbB3 stark exprimiert wurde, wurde auch ErbB2 stark exprimiert ($r = 0,28$; $p < 0,05$).

Ergebnisse

Tabelle 7: Korrelationstabelle dermale Neurofibrome

		Alter	Ki-67-Index	Zellularität	Mastzellen	ErbB3	Fibroblasten	NRG1	mTor-Idx.
		1	2	3	4	5	6	7	8
Ki-67-Index	Korrelation (P)	-0,206*							
1	Sig. (2-seitig)	0,040							
	N	100							
Zellularität	Korrelation (P)		-0,278**						
2	Sig. (2-seitig)		0,005						
	N		100						
Axonanzahl	Korrelation (P)	-0,351**							
3	Sig. (2-seitig)	0,003							
	N	69							
mTor-Index	Korrelation (P)		0,328**	-0,237*		0,370**			
4	Sig. (2-seitig)		0,001	0,017		0,010			
	N		100	101		48			
Sox9-Index	Korrelation (P)		0,315**	-0,362**	0,228**		0,231*		0,418***
5	Sig. (2-seitig)		0,001	0,000	0,009		0,015		< 0,001
	N		100	101	130		111		135
Pax7-Index	Korrelation (P)			-0,346*				0,353**	0,586**
6	Sig. (2-seitig)			0,017				0,014	< 0,001
	N			47				48	48
ErbB2	Korrelation (KTb)					0,283*			
7	Sig. (2-seitig)					0,046			
	N					48			

Es sind ausschließlich Ergebnisse dargestellt, bei denen das Signifikanzniveau $p < 0,01$ war. Bei leeren Feldern war das Signifikanzniveau $p > 0,01$. Die Korrelation wurde nach Pearson (P) oder nach Kendall-Tau-b (KTb) berechnet: *. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant; **. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant; ***: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,001 (2-seitig) signifikant; Variablennamen: Alter = Alter bei Probenentnahme; Fibroblasten = CD90-positive Zellen; Axonanzahl = Anzahl Neurofilament-positive Axone; Idx. = Index

Plexiforme Neurofibrome

In PNF mit vielen Mastzellen wurden wenig ErbB3 ($r = -0,50$; $p < 0,001$), NRG1 ($r = -0,50$; $p < 0,001$) und pMEK ($r = -0,33$; $p < 0,01$) exprimiert. Die mTor-Indices ($r = -0,32$; $p < 0,001$) waren niedrig, jedoch wurde viel CD44 ($r = 0,30$; $p < 0,01$) exprimiert.

PNF mit vielen freien Axonen befanden sich häufiger an Kopf/Hals als an den Extremitäten ($r = -0,32$; $p < 0,01$), exprimierten wenig ErbB3 ($r = -0,51$; $p < 0,01$), hatten geringe mTor-Indices ($r = -0,23$; $p < 0,05$) und häufig CD90-positive Zellen ($r = 0,33$; $p < 0,01$).

Plexiforme Neurofibrome, die viel CD44 exprimierten, enthielten häufig CD90-positive Zellen ($r = 0,20$; $p < 0,05$) und exprimierten wenig NRG1 ($r = -0,21$; $p < 0,05$).

Zelluläre PNF exprimierten viel Rho ($r = 0,58$; $p < 0,01$) und CD44 ($r = 0,42$; $p < 0,001$) und hatten erhöhte Ki-67-Indices ($r = 0,26$; $p < 0,05$).

In PNF mit hohen mTor-Indices wurde viel ErbB3 ($r = 0,58$; $p < 0,001$), NRG1 ($r = 0,21$; $p < 0,05$), pMEK ($r = 0,29$; $p < 0,05$) und Rho ($r = 0,30$; $p < 0,05$) exprimiert und die Sox9- ($r = 0,59$; $p < 0,001$) und Pax7-Indices ($r = 0,48$; $p < 0,01$) waren erhöht. In PNF mit erhöhten Sox9-Indices wurde ebenfalls viel ErbB3 ($r = 0,47$; $p < 0,01$) exprimiert. In PNF mit erhöhten Pax7-Indices wurde auch viel ErbB3 ($r = 0,54$; $p < 0,001$), Rho ($r = 0,30$; $p < 0,05$) und pMEK ($r = 0,48$; $p < 0,001$) exprimiert und die Sox9-Indices ($r = 0,48$; $p < 0,001$) waren erhöht.

Ergebnisse

Tabelle 8: Korrelationstabelle plexiforme Neurofibrome

		Lokal.	Ki-67	Zell.	MZ	ErbB3	Fibrobl.	Axone	NRG1	mTor	Rho	pMEK	Sox9
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zell.	Kor. (P)		,256*								0,580**		
	Sig. (2-seitig)		0,012								0,001		
1	N		95								31		
ErbB3	Kor. (P)				-,498**								
	Sig. (2-seitig)				0,000								
2	N				46								
Axon	Kor. (P)	-,321**				-,508**							
	Sig. (2-seitig)	0,006				0,007							
3	N	71				27							
Fibrobl.	Kor. (P)						,332**						
	Sig. (2-seitig)						0,003						
4	N						79						
NRG1	Kor. (P)				-,502**								
	Sig. (2-seitig)				0,000								
5	N				113								
CD44	Kor. (P/KTb)		,422**	,304**		0,198*		-,211*					
	Sig. (2-seitig)		0,000	0,001		0,029		0,019					
	N		97	115		117		114					
mTor Index	Kor. (P)			-,324**	,582**		-,232*	,206*					
	Sig. (2-seitig)			0,000	0,000		0,041	0,03					
7	N			113	49		78	112					
pMEK	Kor. (P/KTb)			-,325*					,294*	,303*(KT)			
	Sig. (2-seitig)			0,027					0,04	0,027			
8	N			46					49	49			
Sox9-Index	Kor. (P)					,474**				,588*			
	Sig. (2-seitig)					0,001				0,000			
9	N					49				120			
Pax7-Index	Kor. (P)					,540**				,477*	0,301*	,457**	,476**
	Sig. (2-seitig)					0,000				0,001	0,04	0,001	0,001
10	N					47				47	47	47	47

Es sind ausschließlich Ergebnisse dargestellt, bei denen das Signifikanzniveau $p < 0,01$ war. Bei leeren Feldern war das Signifikanzniveau $p > 0,01$. Die Korrelation wurde nach Pearson (P) oder nach Kendall-Tau-b (KTb) berechnet*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant; **: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant; Variablenamen: Lokal = Lokalisation; Zell. = Zellularität; MZ = Anzahl Mastzellen; Fibrobl. = CD90-positive Zellen; Axone = Anzahl Neurofilament-positive Axone

Diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome

Ältere D/PNF-Patienten hatten mehr Mastzellen ($r = 0,16$; $p < 0,05$), höhere Pax7-Indices ($r = 0,20$; $p < 0,05$), seltener CD90-positive Zellen ($r = -0,17$; $p < 0,05$) und exprimierten vermehrt ErbB3 ($r = -0,25$; $p < 0,01$).

D/PNFs an Hals/Kopf hatten höhere Ki-67-Indices ($r = 0,20$; $p < 0,05$) und exprimierten mehr Neuregulin-1 ($r = -0,21$; $p < 0,01$) als D/PNF an den Extremitäten.

D/PNF mit vielen Mastzellen hatten auch häufiger CD90-positive Zellen ($r = 0,15$; $p < 0,05$) und exprimierten viel CD44 ($r = 0,28$; $p < 0,001$), jedoch hatten sie geringere mTor-Indices ($r = -0,15$; $p < 0,05$). D/PNF mit vielen freien Axonen hatten hohe Sox9-Indices ($r = 0,27$; $p < 0,05$) und exprimierten wenig CD44 ($r = -0,28$; $p < 0,05$).

D/PNF mit einer hohen Proliferation (Ki-67-Indices) hatten häufiger CD90-positive Zellen ($r = 0,24$; $p < 0,01$), exprimierten viel ErbB3 ($r = 0,34$; $p < 0,01$), CD44 ($r = 0,14$; $p < 0,05$) und hatten hohe mTor- ($r = 0,22$; $p < 0,01$), Sox9- ($r = 0,20$; $p < 0,01$) und Pax7-Indices ($r = 0,31$; $p < 0,05$).

D/PNF mit einer starken ErbB3-Expression hatten eine geringe Zellularität ($r = -0,22$; $p < 0,05$), exprimierten viel CD44 ($r = 0,28$; $p < 0,01$) und hatten hohe mTor-Indices ($r = 0,28$; $p < 0,01$). D/PNF mit hohen mTor-Indices exprimierten auch viel pMEK

Ergebnisse

($r = 0,22$; $p < 0,05$), hatten hohe Sox9- ($r = 0,35$; $p < 0,001$) und Pax7-Indices ($r = 0,24$; $p < 0,05$). D/PNF, die viel pMEK exprimierten, exprimierten auch viel NRG1 ($r = 0,23$; $p < 0,05$) und hatten hohe Sox9-Indices ($r = -0,24$; $p < 0,05$). D/PNF, die viel Rho exprimierten, exprimierten auch viel CD44 ($r = 0,31$; $p < 0,01$) und hatten hohe Pax7-Indices ($r = 0,48$; $p < 0,001$). In D/PNF mit hohen Sox9-Indices waren auch die Pax7-Indices ($r = 0,27$; $p < 0,01$) erhöht.

Tabelle 9: Korrelationstabelle diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome

		Alter	Lokal.	Ki-67	Zell.	MZ	ErbB3	Axone	mTor	Rho	pMEK	Sox9
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ki-67-Index	Kor. (P)		-0,195**									
	Sig. (2-seitig)		0,006									
1	N		196									
Mastzellen	Kor. (P)	0,156*										
	Sig. (2-seitig)	0,022										
2	N	215										
ErbB3	Kor. (P)	-		,342*	-,220*							
	Sig. (2-seitig)	0,009		0,001	0,034							
3	N	103		93	93							
Fibroblasten	Kor. (P)	-,174**		,236*		0,154*						
	Sig. (2-seitig)	0,010		0,001		0,029						
4	N	220		205		203						
CD44	Kor. (P/KTb)			,143*		,281**	0,279**KT	-0,278*		0,311**KT		
	Sig. (2-seitig)			0,039		0,000	0,003	0,026		0,001		
5	N			209		206	96	64		91		
mTor-Index	Kor. (P)			,222*		-,152*	0,279**					
	Sig. (2-seitig)			0,002		0,033	0,006					
6	N			198		197	97					
pMEK	Kor. (P)								,216*			
	Sig. (2-seitig)								0,024			
7	N								109			
Sox9-Index	Kor. (P)			,202*				0,269*	,351*		-,235*	
	Sig. (2-seitig)			0,003				0,028	0,000		0,011	
8	N			207				67	213		116	
Pax7-Index	Kor. (P)	,195*		,309*					,242*	,481**		0,274**
	Sig. (2-seitig)	0,047		0,002					0,014	0,000		0,005
9	N	104		98					103	96		102
NRG1	Kor. (KTb)		-,208**								,232*	
	Sig. (2-seitig)		0,003								0,015	
10	N		169								104	

Es sind ausschließlich Ergebnisse dargestellt, bei denen das Signifikanzniveau $p < 0,01$ war. Bei leeren Feldern war das Signifikanzniveau $p > 0,01$. Die Korrelation wurde nach Pearson (P) oder nach Kendall-Tau-b (KTb) berechnet: *. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant; **. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant; Variablenamen: Alter = Alter bei Probenentnahme; Ki-67 = Ki-67-Index; Lokal. = Lokalisation; Zell. = Zellularität; MZ = Anzahl Mastzellen; Fibroblasten = CD90-positive Zellen; Axone = Anzahl Neurofilament-positive Axone

Maligne periphere Nervenscheidentumore

In jüngeren MPNST-Patienten war die Zellularität der Tumore erhöht ($r = -0,81$; $p < 0,01$), und es wurde wenig Rho ($r = 0,63$; $p < 0,01$) exprimiert.

In hoch zellulären MPNST wurde wenig CD44 ($r = -0,67$; $p < 0,01$) exprimiert, aber viel Pax7 ($r = 0,57$; $p < 0,05$).

In MPNST mit CD90-positiven Zellen waren die mTor-Indices erhöht ($r = 0,66$; $p < 0,01$). In MPNST mit vielen Mastzellen kamen wenige Mitosen vor ($r = -0,72$; $p < 0,05$). In MPNST, in denen die Pax7-Indices erhöht waren, kamen auch viele Mitosen ($r = 0,84$; $p < 0,01$) vor.

In MPNST, die viel ErbB2 exprimierten, waren die Ki-67-Indices ($r = 0,59$; $p < 0,05$) erhöht. In MPNST, in denen viel CD44 exprimiert wurde, wurde auch viel Rho

Ergebnisse

($r = 0,38$; $p < 0,05$) und pMEK ($r = 0,56$; $p < 0,01$) exprimiert. In MPNST, in denen Rho erhöht war, war auch pMEK ($r = 0,54$; $p < 0,01$) erhöht.

Tabelle 10: Korrelationstabelle MPNST

		Ki-67-Index	Zellularität	Fibroblasten	CD44	Rho	Mitosen
		1	2	3	4	5	6
Alter	Korrelation (P)		-,810**			,626**	
	Sig. (2-seitig)		0,004			0,009	
	N		10			16	
ErbB2	Korrelation (P)	,594*					
	Signifikanz (2-seitig)	0,015					
	N	16					
CD44	Korrelation (P/KTb)		-,667**			,379*(KTb)	
	Signifikanz (2-seitig)		0,005			0,047	
	N		16			22	
mTor-Index	Korrelation (P)			,660**			
	Signifikanz (2-seitig)			0,001			
	N			22			
Pax7-Index	Korrelation (P)		,574*				,835**
	Signifikanz (2-seitig)		0,040				0,003
	N		13				10
Mastzellen	Korrelation (P)						-,720*
	Signifikanz (2-seitig)						0,019
	N						10
pMEK	Korrelation (KTb)				,560**	,537**	
	Signifikanz (2-seitig)				0,007	0,009	
	N				19	19	

Es sind ausschließlich Ergebnisse dargestellt, bei denen das Signifikanzniveau $p < 0,01$ war. Bei leeren Feldern war das Signifikanzniveau $p > 0,01$. Die Korrelation wurde nach Pearson (P) oder nach Kendall-Tau-b (KTb) berechnet*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant; **: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant; Variablenamen: Fibroblasten = CD90-positive Zellen

4.5 Hund: weitere Auswertung

4.5.1 FNCLCC-Grading

Die in dieser Studie untersuchten cMPNST wurden alle nach ihrer Histomorphologie als Sarkome diagnostiziert. Sie wurden daraufhin nach den Kriterien des FNCLCC-Grading eingestuft.

Von den untersuchten cMPNST ($n = 75$) wurden 49,3% (37/75) als Sarkome Grad I, 44% (33/75) als Grad II und 6,7% (5/75) als Grad III eingeteilt.

Bezogen auf das Auftreten von Nekrosen zeigten 77,3% (58/75) der Tumore ($n = 75$) keine und 22,7% (17/75) mindestens eine deutlich zu erkennende Nekrose (mindestens $\frac{1}{2}$ Gesichtsfeld in der 20-fachen Vergrößerung ($0,46 \text{ mm}^2$) groß). Bei der Bewertung, ob eine Nekrose vorhanden war, wurde der gesamte Histologieschnitt bewertet.

Es wurde die Mitoseanzahl auf einer Fläche von 10 Gesichtsfeldern in der 40er Vergrößerung ($0,12 \text{ mm}^2$) bestimmt. Der Median lag bei 5 (2/10).

4.5.2 Gradingversuch

Um cMPNST bezüglich ihrer Malignität besser einteilen zu können, wurden zwei *Gradings* entwickelt. Dabei wurden die Mitoseanzahl, das Vorkommen einer Nekrose und die Ki-67-Indices der in dieser Arbeit untersuchten cMPNST als Gradierungskriterien herangezogen. Die entwickelten *Gradings* sollten die Aussage erbringen, ob ein cMPNST

als niedrig oder hoch maligne einzustufen ist. Um die *Gradings* abschließend zu bewerten, sind Folgedaten der untersuchten Fälle notwendig. Dies ist aber ein möglicher Ansatz für weitere Studien

Die Variablen Mitoseanzahl, Nekrose und Ki-67-Index sind klassische histologische Merkmale der Proliferation und Malignität. Sowohl die Anzahl von Mitosen als auch der Ki-67-Index geben Aufschluss über die Proliferation der Tumore. Nekrosen sind ein Zeichen schnellen Wachstums, in dessen Folge es zur Hypoxie auf Grund einer nicht folgen könnenden Vaskularisierung kommt und können daher als Malignitätskriterium herangezogen werden. Die besagten Variablen sind darüber hinaus objektiv bestimmbar und wurden in anderen Gradierungsschemata für Tumore bereits angewandt. Es wurden zwei Strategien geprüft:

Strategie 1: Gradierung nach klassierten Variablen

Bei der Strategie 1 wurden zuerst nach Klassengrenzen für jede Variable gesucht, die die Verteilung der Daten möglichst gut abbildeten. Das heißt, es wurden Graphen erstellt, in denen nach Peaks gesucht wurde, die möglicherweise Grenzen zwischen Tumorgruppen abbilden (Abb. 86 und Abb. 87). Daraufhin wurden Werte für jede Klasse (x-Achse) vergeben.

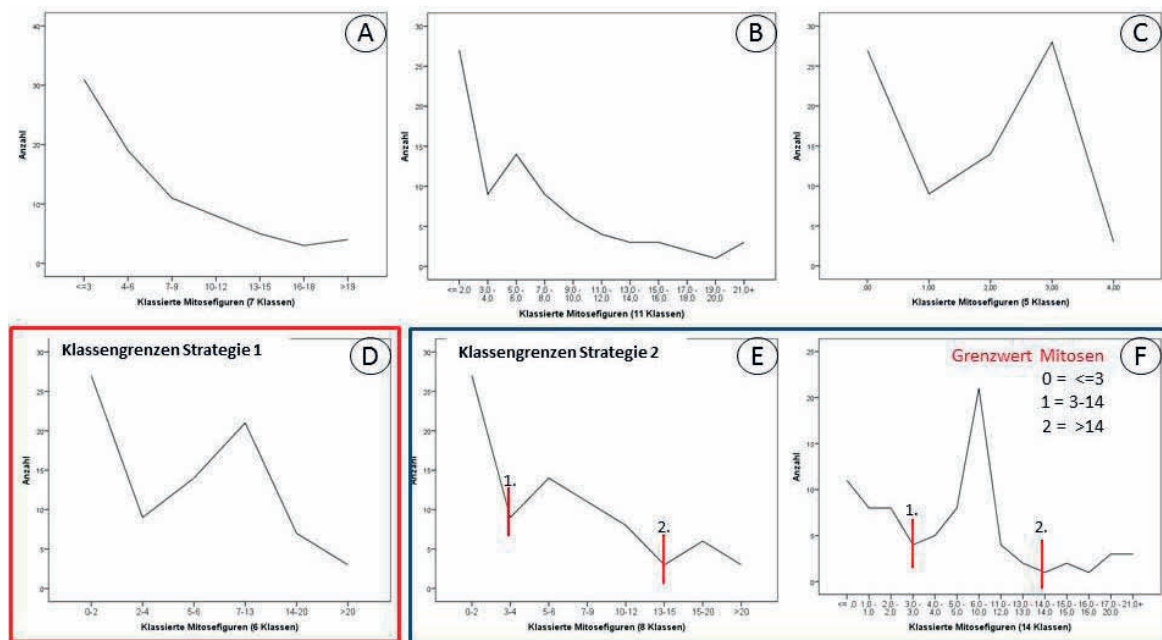


Abb. 86: Darstellung der Suche nach Klassengrenzen für Mitosen bei cMPNST

A-F: verschiedene Klassengrenzen (x-Achse) für Mitosewerte (y-Achse); D: gewählte Klassengrenzen (6 Klassen) Bei Strategie 1, da ein deutlicher Tief- und Hochpunkt; E + F: Klassengrenzen bei Strategie 2 und Festlegung von 2 Grenzwerten

In Abb. 86 wird die Suche nach den Klassengrenzen für Mitosen deutlich. Es wurden verschiedene Klassengrenzen getestet und die folgenden Grenzen für am besten

befunden: 0 (0-2 Mitosen), 1 (3-4 Mitosen), 2 (5-6 Mitosen), 3 (7-13 Mitosen), 4 (14-20 Mitosen), 5 (>20 Mitosen). Somit wurden 5 Klassengrenzen festgelegt.

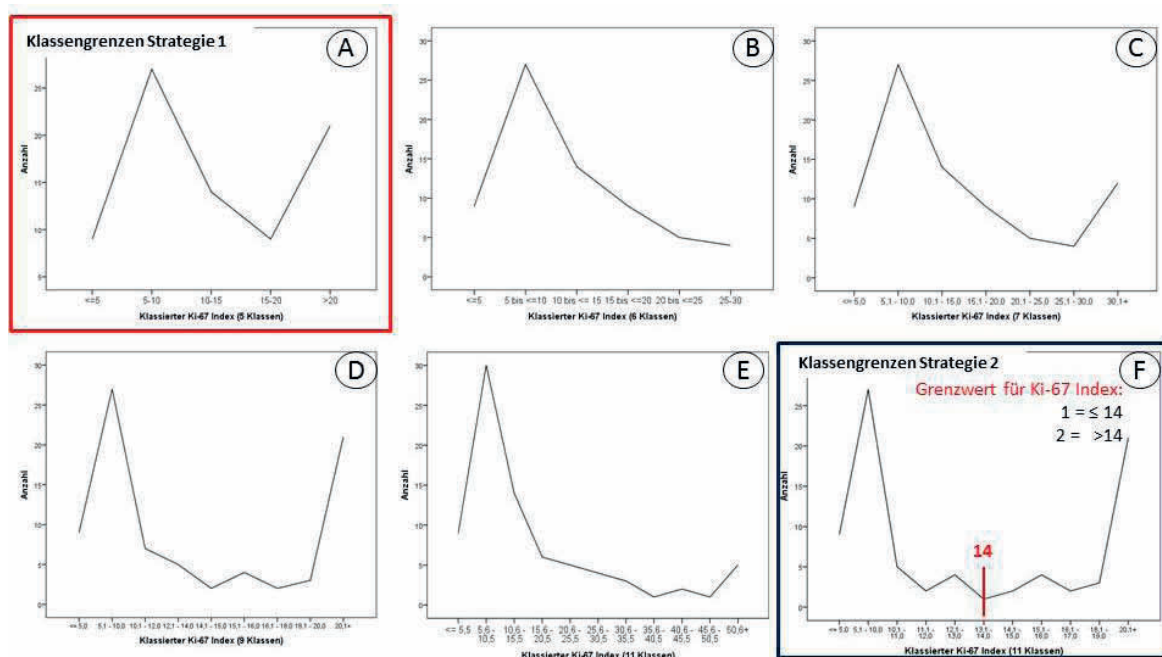


Abb. 87: Suche nach Klassengrenzen für Ki-67-Indices bei cMPNST

A-F: verschiedene Klassengrenzen für Ki-67-Indices; **A:** gewählte Klassengrenzen (5 Klassen) bei Strategie 1, da ein deutlicher Tief- und Hochpunkt; **F:** Klassengrenzen bei Strategie 2 und Festlegung des Grenzwertes 14

In Abb. 87 wird die Suche nach Klassengrenzen für Ki-67-Indices deutlich. Es wurden verschiedene Klassengrenzen ausprobiert und die folgenden Grenzen für am besten befunden: 0 (Ki-67-Index 0-5%), 1 (Ki-67-Index 5-10%), 2 (Ki-67-Index 10-15%), 3 (Ki-67-Index 15-20%), 4 (Ki-67-Index > 20%). Somit wurden 6 Klassengrenzen festgelegt

Das Vorkommen einer Nekrose wurde mit 1, das Fehlen mit 0 bewertet.

Als nächsten Schritt wurden für jeden cMPNST die Werte der Klassengrenzen addiert:

$$\text{Summenscore-1} = \text{Ki-67-Index} + \text{Mitose} + \text{Nekrose}.$$

Im Folgenden wurde aus den so entstandenen Summenscores ein Graph erstellt (Abb. 88).

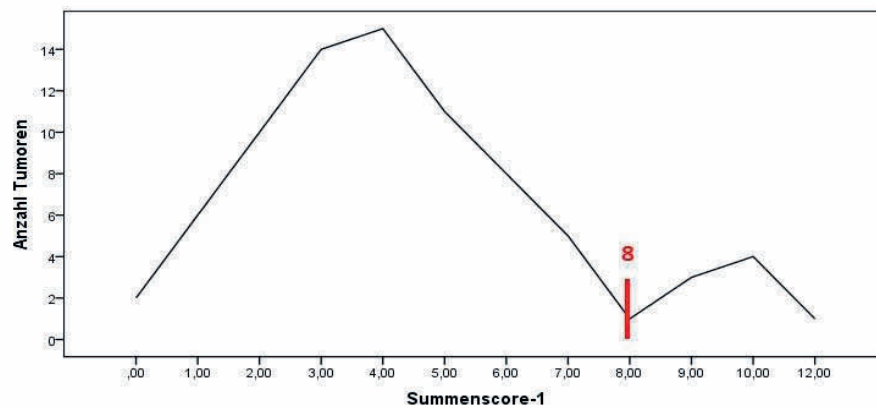


Abb. 88: Kurvendiagramm; Summenscore-1 in cMPNST

Darstellung der Summenscores (Summenscore-1 = Ki-67-Index + Mitose + Nekrose) der cMPNST; 8 = Grenzwert, der zwischen hoher und niedriger Malignität unterscheidet

Aus diesem Graphen wurde der Summenscore 8 als Grenzwert für niedrige und hohe Malignität abgelesen, da an diesem Wert ein deutlicher Tiefpunkt zwischen zwei Gruppen bestand. Dieser Tiefpunkt wurde so interpretiert, dass er einen Grenzwert zwischen zwei sich unterschiedlich verhaltenden Tumorguppen darstellt.

Strategie 2: Gradierung nach Grenzwerten

In den selben Graphen, die für die Strategie 1 verwendet wurden (Abb. 86 und Abb. 87), wurde auch für die Strategie 2 nach Grenzwerten gesucht, denen dann eine Punktzahl zugeteilt wurde.

Für die Mitosenanzahl wurde die Klassenanzahl 8 ausgewählt, da somit zwei relativ deutliche Grenzwerte abgelesen werden konnten: 1 (0-3 Mitosen), 2 (3-14 Mitosen), 3 (> 14 Mitosen); (Abb. 86). In Abb. 86 E zeigten sich zwei deutliche Tiefpunkte, die in Abb. 86 F noch mal genauer dargestellt wurden und somit die Klassengrenzen 3 bzw. 14 festgelegt werden konnte.

Für den Ki-67-Index wurden 11 Klassengrenzen festgelegt (Abb. 87), um den Grenzwert 14 möglichst genau darstellen zu können: 1 (Ki-67-Index 0-14%), 2 (Ki-67-Index > 14%).

Das Vorkommen einer Nekrose wurde bei diesem *Grading* mit 2 und das Fehlen mit 0 bewertet. Das Vorkommen einer Nekrose wurde somit als stärkeres Malignitätskriterium bewertet als in der Strategie 1. Im Vergleich der beiden Strategien kann somit darauf geachtet werden, ob das Vorkommen einer Nekrose ein starkes Zeichen für die Malignität ist oder nicht.

Als nächster Schritt wurden für jeden Tumor die Punktzahlen addiert:
Summenscore-2 = Ki-67-Index + Mitose + Nekrose.

Aus den entstandenen Summenscores wurde daraufhin ein Graph erstellt (Abb. 89).

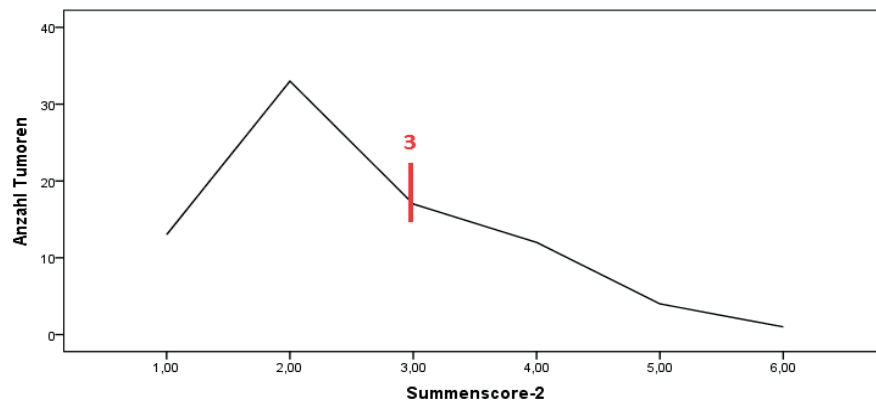


Abb. 89: Liniendiagramm; Summenscore-2 in cMPNST

Darstellung der Summenscores (Summenscore-2 = Ki-67-Index + Mitose + Nekrose) der cMPNST; 3 = Grenzwert, der zwischen hoher und niedriger Malignität unterscheidet

Aus diesem Graphen wurde der Grenzwert 3 für niedrige und hohe Malignität abgelesen, da bei diesem Wert ein leichter Knick im Graph auszumachen war. Dieser Knick wurde so interpretiert, dass er einen Grenzwert zwischen zwei sich unterschiedlich verhaltenden Tumorguppen darstellt.

Vergleich Gradingstrategien untereinander

Vergleicht man die beiden Gradingstrategien miteinander, wurden bei **Strategie 1** 89,3% (67/75) der cMPNST (n = 75) als niedrig und 10,7% (8/75) als hoch maligne eingestuft. Bei **Strategie 2** wurden 77,3% (58/75) als niedrig maligne und 22,7% (17/75) als hoch maligne eingestuft (Tabelle 11 und Abb. 90).

Tabelle 11: Übersicht Malignitätseinteilung nach Gradingstrategie 1 und 2

	Strategie 1		Strategie 2	
	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]
Niedrig maligne	67	89,3	58	77,3
Hoch maligne	8	10,7	17	22,7

Ergebnisse

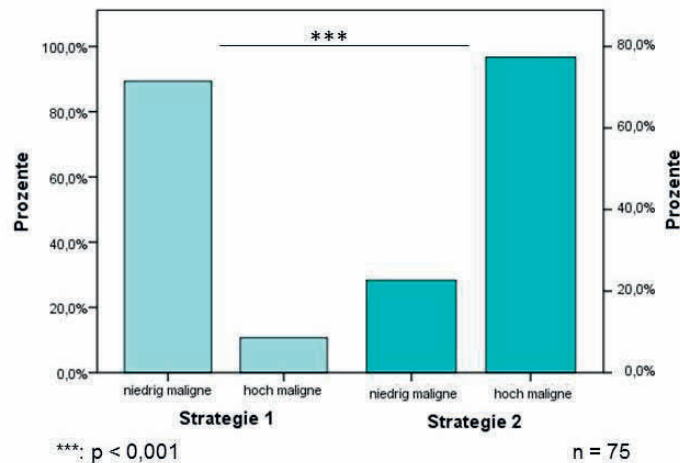


Abb. 90: Balkendiagramm; Vergleich der Gradingstrategien in cMPNST

Prozent = prozentualer Anteil der niedrig und hoch malignen cMPNST in den Gradingstrategien

Der Chi²-Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen hoch und niedrig malignen Tumoren beider Strategien ($p < 0,001$). Das heißt, bei Strategie 2 wurden signifikant mehr cMPNST als hoch maligne eingestuft, als bei der Strategie 1.

In der Tabelle 12 wird deutlich, bei wie vielen Fällen die Gradingstrategien übereinstimmen bzw. differieren. 76% (57/75) der Tumore werden von beiden Strategien als niedrig maligne eingestuft, 1,3% (1/75) wird von der Strategie 1 als niedrig und von der Strategie 2 als hoch maligne eingestuft; 9,3 (7/75) der Tumore werden von beiden Strategien als hoch maligne eingestuft, 13,3% (10/75) wird von der Strategie 2 als niedrig und von der Strategie 1 als hoch maligne eingestuft.

Tabelle 12: Vergleich der Gradingstrategien 1 und 2

	Strategie 1			
Strategie 2	Niedrig maligne		Hoch maligne	
	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]
Niedrig maligne	57	76	10	13,3
Hoch maligne	1	1,3	7	9,3

Zusammengefasst bedeutet das, dass in 85,3% (6/75) der Fälle die beiden Strategien übereinstimmten und in 14,7% (11/75) der Fälle nicht (Tabelle 12 und Abb. 90).

Vergleich Gradingstrategien und FNCLCC

Im Folgenden wurden die Gradierungsstrategien jeweils mit dem FNCLCC-Grading verglichen.

Strategie 1: 49,3% (37/75) der cMPNST ($n = 75$) wurden als niedrig maligne und Grad I eingestuft und 0% als hoch maligne und Grad I. 37,3% (28/75) wurden als niedrig maligne

und Grad II, 6,7% (5/75) als hoch maligne und Grad II eingestuft. 2,7% (2/75) wurden als niedrig maligne und Grad III, 4% (3/75) als hoch maligne und Grad III eingestuft.

Strategie 2: 46,7% (35/75) der cMPNST (n = 75) wurden als niedrig maligne und Grad I eingestuft und 2,7% (2/75) als hoch maligne und Grad I. 29,3% (22/75) wurden als niedrig maligne und Grad II, 14,7% (11/75) als hoch maligne und Grad II eingestuft. 1,3% (1/75) wurden als niedrig maligne und Grad III, 5,3% (4/75) als hoch maligne und Grad III eingestuft. Tabelle 13 gibt eine Übersicht dieser Werte.

Tabelle 13: Vergleich Gradingstrategie 1 und 2 mit FNCLCC

	Strategie 1				Strategie 2			
FNCLCC	Niedrig maligne		Hoch maligne		Niedrig maligne		Hoch maligne	
	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]
Grad I	37	49,3	0	0	35	46,7	2	2,7
Grad II	28	37,3	5	6,7	22	29,3	11	14,7
Grad III	2	2,7	3	4,0	1	1,3	4	5,3
Gesamt	67	89,3	8	10,7	58	77,3	17	22,7

Die Korrelationen (nach Kendall-Tau-b) zwischen Gruppenzugehörigkeit (niedrig maligne vs. hoch maligne) und Strategie 1 lag bei $r = 0,40$ und Strategie 2 bei $r = 0,45$. Das heißt, die Strategie 2 korreliert etwas besser mit der Malignität nach dem FNCLCC-Grading als Strategie 1.

Vergleich Gradierungsstrategien und Tumordifferenzierung

Im Folgenden wurden die Gradierungsstrategien jeweils mit der Variable Wachstumsmuster verglichen.

Strategie 1: 6,7% (5/75) der cMPNST (n = 75) wurden als niedrig maligne und zu Muster-1 eingestuft und 0% als hoch maligne und Muster-1. 64% (48/75) wurden als niedrig maligne und Muster-2, 6,7% (5/75) als hoch maligne und Muster-2 eingestuft. 18,7% (14/75) wurden als niedrig maligne und Muster-3, 4% (3/75) als hoch maligne und Muster-3 eingestuft.

Strategie 2: 4% (3/75) der cMPNST (n = 75) wurden als niedrig maligne und Muster-1 eingestuft und 2,7% (2/75) als hoch maligne und Muster-1. 57,3% (43/75) wurden als niedrig maligne und Muster-2, 13,3% (10/75) als hoch maligne und Muster-2 eingestuft. 16% (12/75) wurden als niedrig maligne und Muster-3, 6,7% (5/75) als hoch maligne und Muster-3. Tabelle 14 zeigt eine Übersicht dieser Werte.

Tabelle 14: Vergleich Gradingstrategie 1 und 2 mit Wachstumsmuster

	Strategie 1				Strategie 2			
Wachstumsmuster	Niedrig maligne		Hoch maligne		Niedrig maligne		Hoch maligne	
	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]
Muster-1	5	6,7	0	0	3	4,0	2	2,7
Muster-2	48	64,0	5	6,7	43	57,3	10	13,3
Muster-3	14	18,7	3	4,0	12	16,0	5	6,7
Gesamt	67	89,3	8	10,7	58	77,3	17	22,7

Die Korrelationen (nach Kendall-Tau-b) zwischen Gruppenzugehörigkeit (niedrig maligne vs. hoch maligne) und Strategie 1 lag bei $r = 0,14$ und Strategie 2 bei $r = 0,03$. Das heißt, der Strategie 1 korreliert besser mit dem Wachstumsmuster als der Strategie 2, aber bei beiden ist die Korrelation gering.

4.6 Vergleich Mensch – Hund: weitere Auswertung

4.6.1 FNCLCC-Grading

Vergleicht man die FNCLCC-Gradierung der hMPNST ($n = 21$) mit der der cMPNST ($n = 75$) zeigt sich, dass 14,3% (3/75) der hMPNST Sarkome Grad I, 52,4% (11/21) Sarkome Grad II und 33,3% (7/21) Sarkome Grad III waren. Bei den cMPNST waren 49,3% (37/75) Grad I, 44% (33/75) Grad II und 6,7% (5/75) Grad II Sarkome. Diese Werte sind in Abb. 91 als Säulendiagramm dargestellt.

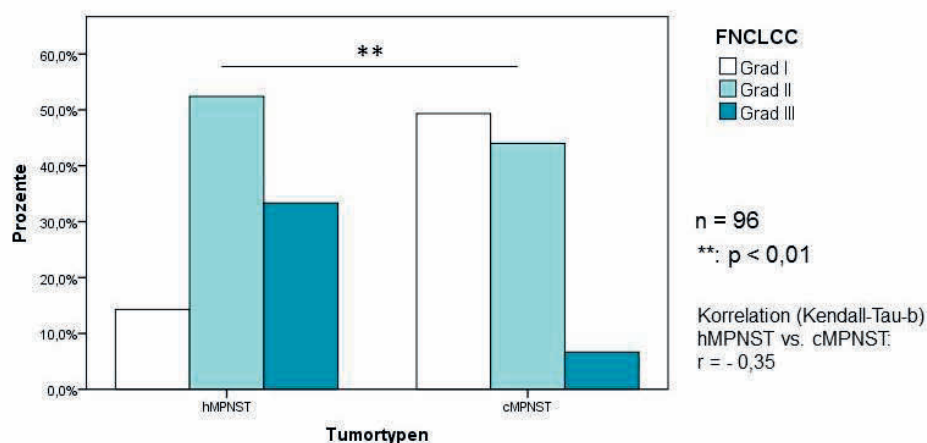


Abb. 91: Säulendiagramm; Vergleich FNCLCC-Gradierung in hMPNST und cMPNST
Prozent = prozentualer Anteil der FNCLCC-Grade innerhalb der MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den hMPNST und den cMPNST in Bezug auf die FNCLCC-Gradierung ($p = 0,001$). Das heißt hMPNST wurden v. a. als Grad II und Grad III Sarkome, cMPNST v. a. als Grad I und Grad II Sarkome eingestuft.

Die Korrelation (Kendall-Tau-b) zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) lag bei $r = -0,35$. Das heißt je höher der FNCLCC-Grad, desto wahrscheinlicher ist der Tumor ein hMPNST, dieser Zusammenhang weist allerdings eine relativ geringe Korrelation auf.

Auftreten von Nekrosen in hMPNST und cMPNST

Bezogen auf das Auftreten von Nekrosen zeigten 55% (11/20) der hMPNST ($n = 20$) keine und 45,5% (9/20) eine Nekrose. Bei den cMPNST ($n = 75$) zeigten 77,3% (58/75) der Tumore keine und 22,7% (17/75) eine Nekrose. Diese Werte sind in Abb. 92 dargestellt.

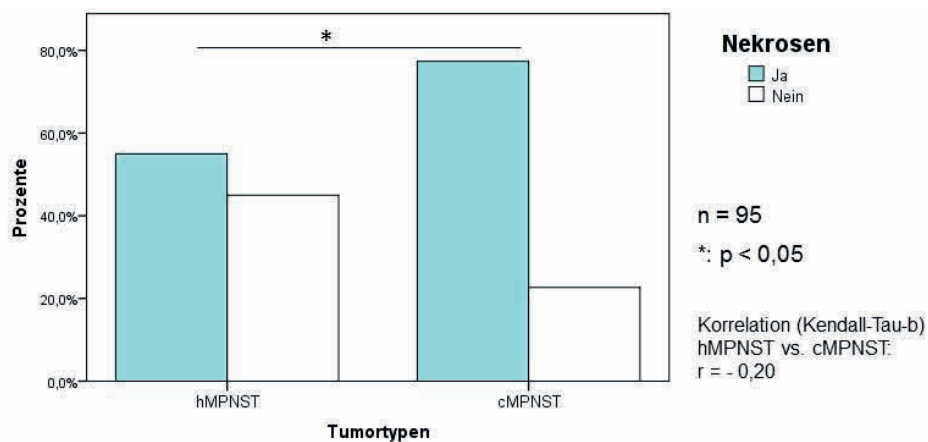


Abb. 92: Säulendiagramm; Vergleich Nekrosen in hMPNST und cMPNST

Prozent = prozentualer Anteil des Vorkommens einer Nekrose innerhalb der MPNST-Typen

Der Chi²-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den hMPNST und den cMPNST in Bezug auf das Auftreten von Nekrosen ($p = 0,05$). Das heißt, hMPNST wiesen signifikant häufiger Nekrosen auf als cMPNST.

Die Korrelation (Kendall-Tau-b) zwischen Gruppenzugehörigkeit (hMPNST vs. cMPNST) lag bei $r = -0,20$. Somit korreliert das Vorkommen von Nekrosen relativ schwach mit dem Vorkommen von hMPNST.

Mitoseanzahl in hMPNST und cMPNST

Der Median der Mitoseanzahl auf einer Fläche von 10 Gesichtsfeldern in der 40er Vergrößerung ($0,12 \text{ mm}^2$) lag bei den hMPNST ($n = 20$) bei 7 (5/11,5) und bei den cMPNST ($n = 75$) bei 5 (2/10). Diese Werte sind in Abb. 93 dargestellt.

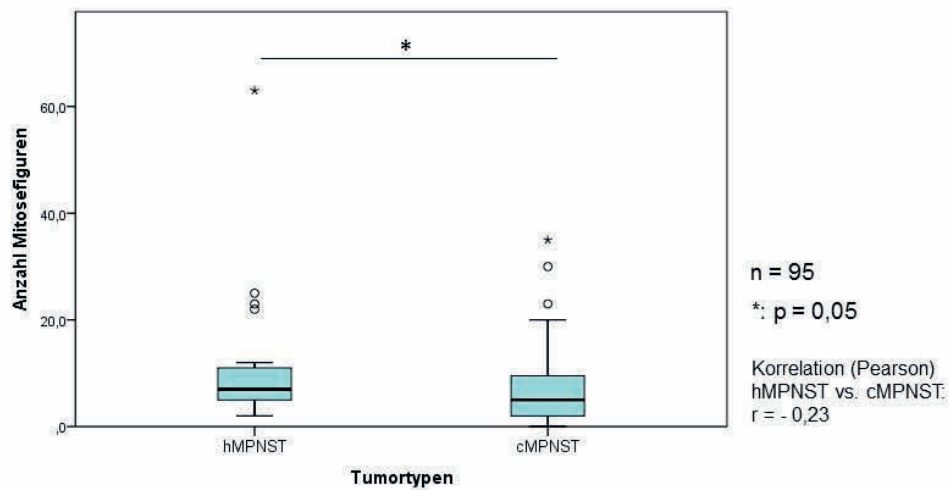


Abb. 93: Boxplot; Vergleich Mitoseanzahl in hMPNST und cMPNST

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Mitoseanzahl der hMPNST und der cMPNST ($p = 0,05$). Das heißt, dass hMPNST mehr Mitosen aufwies als cMPNST.

Die Korrelation (nach Pearson) zwischen Gruppenzugehörigkeit und Mitoseanzahl lag bei $r = - 0,23$. Somit korreliert eine hohe Mitoseanzahl relativ schwach mit dem Auftreten von hMPNST.

5 Diskussion

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) des Menschen ist eine Krankheit, die mit einer Vielzahl von Symptomen einhergeht, u. a. den peripheren Nervenscheidentumoren. Diese sind vorwiegend gutartige Tumore, die jedoch entstellend und schmerzhaft sein können. Eine lebensbedrohliche Gefahr bei der NF1 ist die Entstehung maligner peripherer Nervenscheidentumore, die eine Haupttodesursache dieser Krankheit darstellt (Ferrari et al. 2007). Demnach kommt der Erforschung der Tumorentstehung und Progression eine große Bedeutung für die Bekämpfung dieser Krankheit zu.

Canine maligne periphere Nervenscheidentumore (cMPNST) gehören zur Gruppe der mesenchymalen Tumore, die die dritthäufigste Tumorentität beim Hund darstellen (Baba und Câtoi 2007). Aufgrund ihrer Histomorphologie, den vielen differentialdiagnostischen Spindelzelltumoren und der Schwierigkeit Immunmarker zu finden, die diese Tumoren verlässlich nachweisen, ist die Diagnose dieser Entität eine Herausforderung in der tiermedizinischen Tumordiagnostik. Mesenchymale Weichteiltumore des Hundes haben ein relativ geringes Metastasierungspotential (Avallone et al. 2013). Ein Problem ist allerdings die relativ häufige Rezidivbildung, da eine vollständige Resektion des Tumors durch schwer zugängliche Lokalisationen häufig schwierig ist (Baba und Câtoi 2007; Dennis et al. 2011). Um geeignete prognostische Informationen zu erlangen ist die exakte Klassifikation der Tumore daher unerlässlich.

In der Humanmedizin ist die Forschung an peripheren Nervenscheidentumoren weiter fortgeschritten als in der Veterinärmedizin. Vor allem wurden bereits mehr Immunmarker zur Diagnose- und Prognosestellung getestet. Daher wird zum einen immer wieder versucht Parallelen zu ziehen und Diagnosekriterien zu übertragen. Zum anderen treten cMPNST beim Hund häufiger als beim Menschen auf, so dass die Möglichkeit besteht, dass sich der Hund als Forschungsmodell für die Humanmedizin nutzen lässt.

In dieser Arbeit wurden MPNST von Menschen und Hunden anhand verschiedener Kriterien miteinander verglichen. Durch diese Vergleiche können zum einen Rückschlüsse gezogen werden, ob cMPNST ein geeignetes Forschungsmodell für die Humanmedizin darstellen und zum anderen, ob sich Diagnose- und Prognosekriterien und die Histogenese von der Human- auf die Tiermedizin übertragen lassen. Des Weiteren wurden Tumorentstehungs- und Progressionsmechanismen der humanen MPNST untersucht um einen grundlegenden Beitrag zur Bekämpfung der mit NF1-assoziierten Tumore zu leisten.

5.1 Vergleich humaner und caniner MPNST

Ein Ziel dieser Studie war es zu prüfen, ob MPNST beim Hund ein Modell für MPNST beim Menschen darstellen können. Darüber hinaus sind periphere Nervenscheidentumore beim Hund hinsichtlich ihrer Proteinexpression und ihrem Tumorverhalten bisher weniger untersucht als beim Menschen. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich Erkenntnisse der humanen peripheren Nervenscheidentumore auf die caninen Tumore übertragen lassen.

Beim Menschen kommen maligne periphere Nervenscheidentumore relativ selten vor, beim Hund sind sie häufiger als die gutartigen cPNST. Die Tumorentitäten beider Spezies werden im Folgenden anhand von klinischen Daten, verschiedenen Expressionsmuster von Immunmarkern und dem FNCLCC-*Grading* verglichen. In jedem Abschnitt wird zuerst auf die Ergebnisse der humanen peripheren Nervenscheidentumore, dann auf die der caninen MPNST eingegangen und am Ende ein vergleichendes Fazit gezogen.

5.1.1 Klinische Daten

Im Folgenden werden die klinischen Daten von Mensch und Hund und im Anschluss im Vergleich zueinander diskutiert.

Alter

Bei den humanen Neurofibromen spiegelte die Verteilung des Alters bei Tumorresektion in der vorliegenden Studie die bisherigen Erkenntnisse in der Literatur wieder (Love et al. 2008). Patienten mit plexiformen Neurofibromen waren am jüngsten (Mittelwert (MW): 24,6 Jahre). Dieser Subtyp entsteht kongenital oder in der Kindheit (Carroll 2012). Patienten mit plexiform-diffusen (MW: 25,6 Jahre) und diffusen (MW: 32 Jahre) NF waren etwas älter. Das ansteigende Alter von den plexiformen (PNF) über die plexiform-diffusen (DPNF) zu den diffusen (DNF) Neurofibromen könnte darauf hinweisen, dass die DPNF und DNF sich aus PNF entwickeln. Dermale NF werden erst bei älteren Patienten (MW: 39,4 Jahre) reseziert, da sie erst relativ spät entstehen und dann mit steigendem Alter und zunehmender Anzahl störend und entstellend werden können. Patienten mit MPNST waren ebenfalls älter (MW: 38 Jahre) als Patienten mit PNF/DPNF/DNF. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die MPNST durch zunehmende Differenzierung aus ihren gutartigen Vorläufern entwickelt haben.

cMPNST treten bevorzugt bei Hunden mittleren Alters (7 – 8 Jahren) auf (Jubb et al. 2008a; Kessler 2012). In der hier vorliegenden Dissertation lag der Median der Altersverteilung bei 10,8 Jahren und somit 2,5 Jahre über den Angaben in dieser Literaturstelle.

Der Vergleich des Altersmedian bei Tumorresektion zwischen Menschen und Hunden ist schwierig, da beide Spezies unterschiedliche Lebenserwartungen haben. Geht man im Mittel davon aus, dass eher mittelgroße bis große Rassen (siehe Tabelle 1, Seite 6) von peripheren Nervenscheidentumoren betroffen sind und rechnet² den Median von 10,8 Jahren in Menschenjahre um, ergaben sich Ergebnisse von 69 – 80 Menschenjahren. Somit traten cMPNST bei älteren Patienten auf als NF1-assoziierte hMPNST. Eine Erklärung könnte sein, dass NF1-assoziierte MPNST beim Menschen im Vergleich zum Hund auf Grund einer genetischen Ursache entstehen, die so beim Hund noch nicht nachgewiesen werden konnte. Sporadische hMPNST treten ebenfalls in einem höheren Alter als NF1-assoziierte hMPNST auf (Zou et al. 2009). Die von uns untersuchten Tumore waren NF1-assoziiert, 50% der MPNST beim Menschen sind jedoch sporadischer Natur (Zou et al. 2009). Da beim Hund bisher kein genetischer Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, könnte man vermuten, dass sich MPNST beim Hund aufgrund einer zunehmenden Akkumulation von Mutationen mit steigendem Alter entwickeln.

Lokalisation

Die Auswertung der Lokalisation der verschiedenen humanen Neurofibrome stimmte in der vorliegenden Studie mit den Angaben in der Literatur überein. KNF, PNF und DPNF treten überall am Körper auf (Scheithauer et al. 1999a; Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). Auf die Tumore der hier vorliegenden Arbeit traf das ebenfalls zu. Diffuse Neurofibrome kommen bevorzugt in der Haut an Kopf und Nacken vor (Scheithauer et al. 1999a). In der vorliegenden Studie traten die meisten DNF zwar auch an Kopf/Hals (41,3%) auf, jedoch war der Unterschied zu den anderen Lokalisationen nicht signifikant. KNF treten in der Haut überall am Körper auf (Scheithauer et al. 1999a), dies war auch in dieser Studie der Fall. Auch wenn mehr KNF am Rumpf (57%) zu finden waren, war der Unterschied zu den anderen Lokalisationen nicht signifikant. PNF sind v. a. in den großen Nervenästen der Extremitäten und des Kopfes zu finden (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001). In dieser Studie war der Kopf/Hals die bevorzugte Lokalisation, aber auch hier war der Unterschied zu den anderen Lokalisationen nicht signifikant. Humane MPNST treten bevorzugt an den Nerven der Extremitäten und des Rumpfes auf (Scheithauer et al. 1999b; Panigrahi et al. 2013). In der aktuellen Studie war der Rumpf (61,5%) die bevorzugte Lokalisation, am Kopf traten keine Tumore auf.

² <http://www.talkteria.de/forum/topic-21054.html>, <http://rechneronline.de/hunde-katzen-jahre/>, <http://www.hundeseite.de/hundealter-rechner/>, <http://www.kirasoftware.com/Hundealter.php>

Beim Hund sind v. a. die Plexus, also die Extremitäten, betroffen (Koestner et al. 1999; Gross et al. 2005). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie gingen damit konform, 68% der cMPNST waren an den Extremitäten entnommen worden. Die restlichen 32% waren an Kopf/Hals (9,5%) und am Rumpf (21,6%) lokalisiert.

Im Vergleich zeigten die Hunde (68%) signifikant mehr MPNST an den Extremitäten als Menschen (38,5%), und Menschen (61,5%) hatten signifikant mehr MPNST am Rumpf als Hunde (21,3%).

Rasseprädisposition

Für cMPNST ist in der Literatur keine Rasseprädisposition beschrieben (LeCouteur und Withrow 2007; Kessler 2012). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie ließen auf keine Bevorzugung einer bestimmten Hunderasse schließen. Die 75 Proben stammten von 27 verschiedenen Rassen und Mischlingen.

5.1.2 Histomorphologie

Humane Neurofibrome werden auf Grund ihrer unterschiedlichen Histomorphologie in verschiedene Subgruppen eingeteilt. Subtypen, wie das dermale, plexiforme und diffuse Neurofibrom sind weithin anerkannte Subklassifikationen (Scheithauer et al. 1999a).

In dieser Dissertation wurde histomorphologisch der humane periphere Nervenscheidentumor in fünf Subgruppen eingeteilt: das dermale (KNF), plexiforme (PNF), plexiform-diffuse (DPNF) und diffuse Neurofibrom (DNF) sowie in den malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST). In der statistischen Auswertung wurden bei Korrelationsberechnungen und der Angabe von Signifikanzunterschieden meistens die diffusen und plexiform-diffusen Neurofibrome zusammengefasst. Diese zwei Tumorsubgruppen verhielten sich häufig ähnlich.

Die Auswertung der mTor-, Sox9- und Pax7-Expression unterstützte diese These. In allen Subgruppen war die Expression dieser Marker unterschiedlich, bei den DNF und DPNF jedoch sehr ähnlich. Der mTor-Index in DNF (Median (M): 72,7) und DPNF (M: 72,8) war nahezu gleich. Der Sox9-Index zeigte ein ähnliches Bild (M: 89,2 und M: 83). Die Pax7-Expression war zwischen den KNF, DNF/DPNF, PNF und MPNST sogar signifikant. Kommt es zu solchen sichtbaren Unterschieden in der Expression von Signalproteinen, spricht das nicht für eine breite Merkmalsverteilung, sondern für unterschiedliche Gruppen mit unterschiedlichem Verhalten.

Die untersuchten Tumore beim Hund ähnelten histomorphologisch eher niedrig malignen humanen MPNST (siehe 4.2.2). Zum Teil trat auch ein Wachstumsmuster

(Wachstumsmuster-2, Abb. 14, Seite 57) auf, das an plexiform-diffuse Neurofibrome des Menschen erinnerte. Diese sind beim Menschen jedoch gutartig.

5.1.2.1 Histogenese humaner Neurofibrome

Die Histogenese der humanen Neurofibrome ist bisher nur zum Teil entschlüsselt. Plexiforme Neurofibrome entstehen sporadisch und können sich zum MPNST entwickeln (Krone und Kehrer-Sawatzki 2001; Carroll 2012). Diese Entwicklung ist anhand von Übergangsformen belegt worden. Dermale Neurofibrome bleiben gutartig und entwickeln sich nicht weiter (Carroll 2012). Diffuse Neurofibrome sind eine weitere Entität, die ebenfalls spontan in der Haut entsteht. Es wurden bisher noch nie MPNST in der Haut von Menschen oder Übergangsformen aus kutanen bzw. diffusen NF gefunden. Daher geht man davon aus, dass diese Subtypen sich nicht zum MPNST entwickeln.

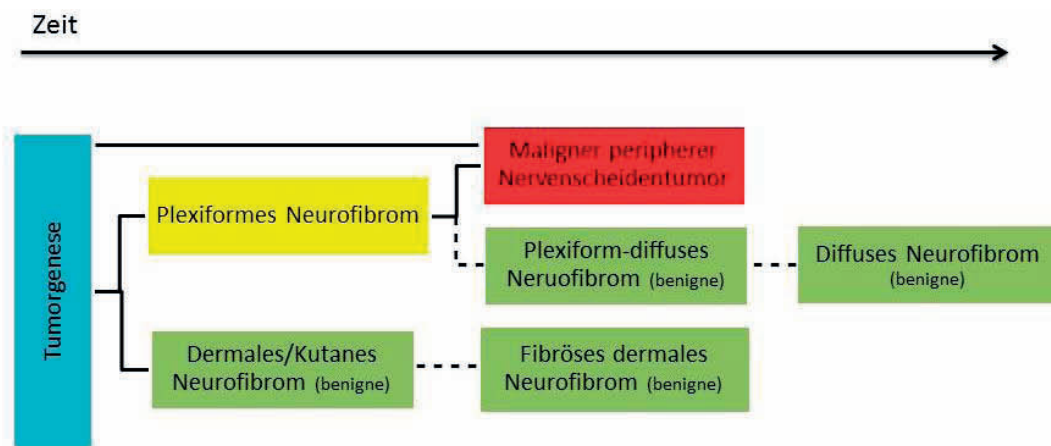


Abb. 94: Mögliche Histogenese humane Neurofibrome

Die farbliche Darstellung repräsentiert die Malignität der Tumorentitäten: Grün steht für benigne, rot für maligne Tumore und gelb für einen Tumor, der sich sowohl zu einem benignen als auch malignen Tumor weiterentwickeln kann. Die blaue Tumorgenese steht als Anfangsprozess. Die schwarzen Verbindungsstriche zeigen an, ob der jeweilige Prozess wissenschaftlich etabliert (durchgezogener Strich) oder als Hypothese (unterbrochener Strich) anzusehen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die eben beschriebenen Annahmen weiterentwickelt und geprüft. Eine These war, dass sich das plexiforme Neurofibrom (PNF) zum plexiform-diffusen Neurofibrom (DPNF) weiterentwickelt (Abb. 94). Es bricht aus der Nervenscheide aus und infiltriert das umliegende Gewebe. Zu dieser Hypothese gab es histologische Funde, die diesen Prozess bestätigten (Abb. 4, Seite 11). Als plexiform-diffuses Neurofibrom wurde jeder Tumor bezeichnet, in dem noch mit Hilfe von EMA perineuriale Reste nachgewiesen werden konnten. Dabei gab es Tumore, bei denen noch viel Perineurium (PN), andere, bei denen nur noch wenige PN-Reste vorhanden waren. Trotz diesem an sich invasiven Verhalten des Ausbrechens und der Gewebeeinfiltration ist dieser Subtyp gutartig und metastasiert nicht. Als Weiterführung dieser These könnte sich das plexiform-diffuse Neurofibrom mit der Zeit weiter zum diffusen Neurofibrom (Abb. 94)

entwickeln. In ihm sind keine Perineurialzellen mehr vorhanden und es bleibt ebenfalls gutartig.

Als weitere Hypothese wurde postuliert, dass sich das dermale Neurofibrome im Laufe der Zeit zu einem fibrösen dermalen NF entwickelt (Abb. 94), bei dem es zu einer Vernarbung des Gewebes und einer Fibroblasteneinlagerung kommt. Dabei handelt es sich immer noch um den gleichen Tumor, der nur seine Komposition ändert

Die eben beschriebenen Annahmen wurden durch die Auswertung der Altersverteilung in den jeweiligen Subtypen zum Teil unterstützt. Der Anstieg der Altersmittelwerte von PNF (24,6 Jahre) über DPNF (25,6 Jahre) zu DNF (32 Jahre) könnte ein Hinweis darauf sein, dass DNF aus DPNF und diese wiederum aus PNF entstehen. Diese These könnte weiterhin durch die kontinuierlich abnehmende mediane Axondichte von PNF (M: 35) über die DPNF (M: 12) zu den DNF (M: 11) unterstützt werden. In PNF existieren noch viele Axone, da sich dieser Tumor in Nervenfaszikeln entwickelt. Bricht der Tumor aus, drängt er die Nervenfaszikel auseinander und die Axondichte sinkt (DPNF). Durch weiteres Auseinanderdrängen der Nervenfaszikel im Entstehungsprozess der DNF sinkt die Axondichte weiter.

5.1.3 Tumorverhalten von MPNST

Das Tumorverhalten wurde an Hand des Ki-67-Index, der Anzahl von Mitosen in 10 Gesichtsfeldern der 40er Vergrößerung, dem Vorkommen von Nekrosen, dem *FNCLCC-Grading* und der Zellularität untersucht.

Der **Ki-67-Index** korrelierte bei humanen peripheren Nervenscheidentumoren mit der Malignität des Tumors (Friedrich et al. 2003), da er die Proliferationsrate des Tumors widerspiegelt. Er ist bei den benignen Subtypen gering und bei den MPNST hoch. Verschiedene Studien geben den mittleren Proliferationsindex für MPNST mit 10-65% und für benigne Neurofibrome mit 1-5% an (Kindblom et al. 1995; Stark et al. 2001; Watanabe et al. 2001; Friedrich et al. 2003). In der hier vorliegenden Arbeit verhielt es sich ähnlich. Für die KNF, DNF, DPNF und PNF lagen die Mediane der Ki-67-Indices bei 1,1-1,5%, für die MPNST signifikant höher bei 16,9%.

Bei humanen MPNST sind i. d. R. wenigstens 4 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder in der 40er Vergrößerung zu finden (Scheithauer et al. 1999b). Die mediane **Mitoseanzahl** lag in dieser Studie bei 7 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder.

Nekrosen treten bei ca. zwei Drittel der humanen MPNST auf (Scheithauer et al. 1999b). In dieser Dissertation wiesen knapp die Hälfte (45%) der untersuchten hMPNST **Nekrosen** im Tumor auf. Da in dieser Arbeit immer die gesamte Fläche jedes

Histologieschnitte beurteilt wurde und diese in ihrer Ausdehnung differierten, ist eine genaue Angabe der prozentualen Verhältnisse nicht möglich.

Humane MPNST werden als hoch maligne Tumore beschrieben und nur 15% werden als geringgradig maligne eingestuft (Scheithauer et al. 1999b). Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit stimmen mit den Literaturangaben überein. Der größte Anteil der untersuchten hMPNST wurde nach dem **FNCLCC-Grading** als Sarkome Grad II (52,4%) oder Grad III (33,3%) eingestuft.

Die **Zellularität** kann ebenfalls Rückschlüsse auf die Malignität eines Tumors zulassen. MPNST werden als hoch zelluläre Tumore beschrieben (Scheithauer et al. 1999b). Bei den hMPNST der hier vorliegenden Studie war die Zellularität signifikant höher (Median (M): 482) als bei allen gutartigen Subtypen. Innerhalb der gutartigen lag sie bei den KNF am höchsten (M: 242,3) und bei den PNF am niedrigsten (M: 104,2). PNF und KNF belegen, dass diese Regel nicht allgemeingültig ist, denn die nicht malignisierenden KNF zeigen eine höhere Zelldichte als PNF, die entarten können.

Der **Ki-67-Index** wird in der Veterinärmedizin ebenfalls als Proliferationsmarker verwendet (Laprie et al. 2001; Sánchez et al. 2007; Ponce et al. 2010). Konkrete Angaben zur Höhe des Proliferationsindex bei cMPNST waren jedoch nicht zu finden. In dieser Studie lag der Median der Ki-67-Indices für cMPNST bei 10,9%. Das spricht für eine deutliche proliferative Aktivität der Tumore, was ein Kriterium für ihre Malignität ist.

Die Mitoseaktivität bei cMPNST wird mit 5 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder in der 40er Vergrößerung angegeben (Gross et al. 2005). Die mediane **Mitoseanzahl** lag in der vorliegenden Dissertation ebenfalls bei 5 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder. Diese Ergebnisse unterstreichen die proliferative Aktivität der Tumore.

Zu der Häufigkeit von Nekrosen konnten keine Literaturangaben gefunden werden, nur dass sie vorkommen können (Gross et al. 2005), 22,7% der in der vorliegenden Studie untersuchten cMPNST wiesen eine **Nekrose** auf. Dies ist ein niedriger Wert, jedoch unterstreicht das tatsächliche Vorkommen der Nekrosen die Malignität der untersuchten caninen Tumore.

Die cMPNST wurden nach dem **FNCLCC-Grading** größtenteils als Sarkome Grad I (49,3%) und Grad II (44%) eingestuft. Somit handelt es sich gemäß dieses Gradierungsverfahrens bei den untersuchten caninen Tumoren vorwiegend um niedrig maligne Sarkome. Die Ergebnisse der in dieser Studie entwickelten Gradierungsschemata (Strategie-1: 89,3% niedrig maligne, Strategie-2: 77,3% niedrig maligne) bestätigen diese Interpretation.

Die mediane **Zellularität** der untersuchten cMPNST lag bei 205 Zellen. Dieses Ergebnis spricht für eine mittelgradige Zellularität.

Im Vergleich der humanen und caninen MPNST war das Tumorverhalten der humanen MPNST maligner als das der caninen MPNST. Sowohl die Ki-67-Indices (16,9 vs. 10,9), die mediane Mitoseanzahl (7 vs. 5), das Vorkommen von Nekrosen (45% vs. 22,7%), die mediane Zellularität (482 vs. 205) als auch die Gradierungen nach dem FNCLCC-Schema wichen signifikant voneinander ab. Möglicherweise weisen diese Unterschiede auf eine Ähnlichkeit der cMPNST mit sporadischen hMPNST hin. Auch sporadische hMPNST zeigen ein weniger malignes Verhalten als NF1-assoziierte hMPNST (Hagel et al. 2007). Somit könnte das abweichende maligne Verhalten auf einem unterschiedlichen Ursprung begründet sein. Auf der anderen Seite ist nicht auszuschließen, dass die Unterschiede auf abweichende Entnahmezeitpunkte zurück zu führen sind. Möglicherweise wurden die cMPNST früher entdeckt und somit auch früher entfernt als die hMPNST und verhalten sich demnach noch nicht so bösartig.

Gradierungsansätze Hund

Canine periphere Nervenscheidentumore gehören zur Gruppe der Weichteilsarkome. Deren Histogenese ist rein morphologisch nicht immer eindeutig zu erkennen. Auch wenn die meisten Weichteilsarkome ein geringe Metastasierungsneigung zeigen, kann das biologische Verhalten der einzelnen Entitäten z. T. stark variieren (Dennis et al. 2011). Es ist daher wichtig, zuverlässige prognostische Kriterien zu entwickeln, um verlässliche prognostische Aussagen zu treffen, die gegebenenfalls eine aggressivere Behandlungsstrategien nach sich ziehen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht ein *Grading* zu entwickeln, das cMPNST nach niedrig- und hochmaligne einteilt. Als Variablen wurden die Anzahl der Mitosen, das Auftreten von Nekrosen und der Ki-67-Index verwendet. Alle drei sind klassische histologische Merkmale der Proliferation. Die beschriebenen Variablen können somit Aufschluss über das Proliferationsverhalten eines Tumors geben. Über den Ki-67-Index und die Anzahl der Mitosen kann man auf die Proliferationsleistung des Tumors schließen. Nekrosen sind ein Zeichen schnellen Wachstums, in dessen Folge es zur Hypoxie auf Grund einer nicht folgen könnenden Vaskularisierung kommt.

Es wurden zwei Gradierungen erstellt und jeweils ein Grenzwert ermittelt, der die Tumore in niedrig- und hochmaligne einteilt. Im Vergleich wählten die beiden Strategien in 64 (85,3%) von 75 Fällen die gleiche Einteilung. In 11 (14,7%) von 75 Fällen wurden eine unterschiedliche Einteilungen gewählt. Diese Tumore wurden nach der Strategie 1 als niedrig- (67 niedrig vs. 8 hoch) und nach der Strategie 2 als hochmaligne (58 niedrig vs. 17 hoch) eingestuft. Daraufhin wurden die zwei Strategien mit dem FNCLCC-*Grading* und

dem histologischen Wachstumsmuster der jeweiligen Tumore verglichen. In dem Vergleich mit dem FNCLCC-Grading erwies sich die Strategie 2 der Strategie 1 überlegen, in dem Vergleich mit dem Wachstumsmuster schnitt die Strategie 1 besser ab. In beiden Fällen kam es allerdings zu keiner völligen Übereinstimmung und die Korrelation war in beiden Fällen gering. Das bedeutet im Einzelnen, dass bei dem Vergleich mit dem FNCLCC-Grading zwei Tumoren, die nach der Strategie 2 als hoch maligne eingestuft wurden einen Grad I und ein niedrig maligner Tumor einen Grad III aufwiesen. Bei der Strategie 1 wies keiner der Tumoren, die als hoch maligne eingestuft waren einen Grad I auf. Zwei als niedrig maligne eingestufte Tumoren wiesen einen Grad II auf. Bei dem Vergleich mit den in dieser Arbeit erstellten Wachstumsmustern wies keiner der Tumoren, die nach der Strategie 1 als hoch maligne eingestuft wurde ein Wachstumsmuster-1 auf. Dahingegen wiesen 14 niedrig maligne Tumoren ein Wachstumsmuster-3 auf. Bei der Strategie 2 zeigten zwei hoch maligne Tumoren Wachstumsmuster-1 und zwölf niedrig maligne das Wachstumsmuster-3. Demnach schnitt die Strategie 1 jeweils um einen Tumor besser ab als die Strategie 2.

Um eine Aussage machen zu können, inwieweit die erstellten Gradingssysteme für die Praxis geeignet sind, müssten die Überlebensdaten und die Zeitdauer bis zur Tumorentfernung der hier untersuchten Hundepatienten in die Evaluation mit einbezogen werden. Dies wurde in dieser Studie nicht durchgeführt, stellt aber einen wichtigen Ansatz für die weitere Forschung dar.

5.1.4 Expressionsmuster peripherer Nervenscheidentumore

In der Literatur werden sowohl humane als auch canine Neurofibrome als zusammengesetzte Tumore beschrieben (Scheithauer et al. 1999a; Koestner und Higgins 2002). Neurofibrome enthalten Schwann-Zellen, Fibroblasten, Perineurialzellen und einige Mastzellen (Scheithauer et al. 1999a; Koestner und Higgins 2002). Der jeweilige Anteil der verschiedenen Zellfraktionen wurde bisher nur in humanen PNST quantifiziert (Hagel et al. 2012). Dies sollte in der vorliegenden Studie an einer großen Fallzahl humaner PNST und cMPNST überprüft werden. Außerdem wurde untersucht, ob die verschiedenen Zellkomponenten einen Einfluss auf das Tumorverhalten in den hPNST haben. Nicht zuletzt lässt sich anhand der Zusammensetzung der MPNST ein Vergleich zwischen Mensch und Hund ziehen, in wieweit die gleichen Zellpopulationen vorkommen.

Einschränkend ist zu sagen, dass bei den humanen Neurofibromen immer nur ein kleines Tumoreareal untersucht wurde, welches vorher am H. E. Schnitt ausgewählt wurde. Dieses sollte repräsentativ für den gesamten Tumor stehen, jedoch kann es diesem Anspruch nicht vollständig entsprechen. Dieser Aspekt sollte bei allen immunhistochemischen Ergebnissen des Menschen in dieser Studie berücksichtigt werden.

S100-Protein

Schwann-Zellen, die Tumorzellen der peripheren Nervenscheidentumore, exprimieren S100-Protein. In der Literatur wird der Anteil an Schwann-Zellen in humanen Neurofibromen mit 60-85% angegeben (Peltonen et al. 1988; Sheela et al. 1990). In dieser Studie lag der Schwann-Zellen-Anteil aller Neurofibrome nach S100-Expression bei 73,8% und damit in dem angegebenen Bereich.

Zusätzlich wurde auch der Anteil der S100-positiven Tumoren erfasst. In der Literatur werden gutartige humane Neurofibrome als 100% positiv beschrieben (Scheithauer et al. 1999a). In dieser Studie waren 99,8% der humanen benignen Neurofibrome S100-positiv. Humane MPNST sind seltener positiv für S100, die Angaben variieren zwischen 50-70% (Louis et al. 2007). In dieser Studie waren 81,8% der MPNST S100-positiv. Eine Erklärung, warum nicht alle hMPNST S100-Protein exprimieren, könnte sein, dass eine Dedifferenzierung der Ursprungszellen, der Schwann-Zellen, dafür verantwortlich ist. Die Tumorzellen könnten ihrer Ursprungszelle so unähnlich werden, dass es zu einem Verlust der S100-Immunreaktivität kommt. Zum anderen ist es möglich, dass hMPNST nicht von Schwann-Zellen abstammen und aus diesem Grund weniger verlässlich S100 exprimieren.

Canine MPNST werden in der Literatur zu 45-83% als S100-positiv beschrieben (Chijiwa et al. 2004; Gaitero et al. 2008; Schöniger und Summers 2009). In dieser Studie waren 56% der cMPNST positiv für S100. Somit stimmt der ermittelte Wert mit den Angaben aus der Literatur überein. Dieses Ergebnis könnte ebenfalls für eine Dedifferenzierung der Zellen sprechen. Auf der anderen Seite, könnte es bedeuten, dass Schwann-Zellen nicht die Ursprungszellen der cMPNST sind.

Im Vergleich von MPNST bei Mensch und Hund waren hMPNST häufiger positiv für S100 als cMPNST. Unter der Annahme, dass MPNST beim Menschen und beim Hund von Schwann-Zellen abstammen, könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Zellen der hMPNST ihre Schwann-Zell-Eigenschaften noch nicht so stark verloren haben wie die cMPNST-Zellen. Die Abweichungen in der Expressionshäufigkeit von S100 könnten aber auch darauf hinweisen, dass cMPNST oder beide MPNST-Typen nicht von Schwann-Zellen abstammen. Eine weitere Erklärung wäre, dass der verwendete, gegen S100 gerichtete Antikörper auf Hunde-Schwann-Zellen weniger sensitiv reagiert. Dafür spricht, dass in allen cMPNST die S100-Immunreaktivität relativ schwach war im Vergleich zu den hMPNST.

Epitheliales Membranantigen

Ein Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) wurde aus mehreren Gründen bei den humanen Neurofibromen angewandt. Zum einen sollten EMA-positive Perineuriome ausgeschlossen werden, die als Differentialdiagnose zu Neurofibromen in Frage kommen. Zum anderen sollten Reste von Perineurium identifiziert werden und somit die Tumorsubtypen (DPNF) eindeutig bestimmt werden.

Die in dieser Studie vorhandenen Färbemuster schlossen ein Perineuriom aus, denn die untersuchten Tumoren exprimierten EMA weder diffus noch stark, was für humanen Perineuriome typisch ist (Macarenco et al. 2007). Außerdem wiesen sie nicht das Wachstumsmuster eines Perineurioms auf. Bei der Auswertung der EMA-Färbung wurden einige Tumore nachträglich den plexiform-diffusen Neurofibromen zugeordnet, da sie sich mit Hilfe von EMA-positiven perineurialen Resten besser identifizieren ließen.

22,8% der humanen Neurofibrome zeigten eine multifokale EMA-Expression im Tumor. Somit enthält nur ein kleiner Teil (22,8%) der Neurofibrome Perineurialzellen innerhalb des Tumorgewebes. Betrachtet man die hMPNST allein, wies nur einer der Tumore (5%) eine EMA-Expression auf.

Bemerkenswert ist, dass in 29,9% der Neurofibrome sowohl Perineurium als auch andere umwickelnde Strukturen innerhalb des Tumors nachgewiesen werden konnten. Vermutlich handelt es sich bei diesen Strukturen um versprengte Perineurialzellen. Im Vergleich der Tumorsubtypen untereinander ergab sich kein eindeutig interpretierbares Muster.

Beim Hund konnte der EMA-Antikörper nicht etabliert werden. Damit bestätigen wir Literaturangaben, die besagen, dass es zurzeit keinen mit Hundegewebe reagierenden EMA-Antikörper gibt (Ramos-Vara et al. 2010). Als Alternative ist Claudin-1 anzusehen, dessen Expression in humanen und caninen Perineurialzellen beschrieben ist (Folpe et al. 2002; Jakab et al. 2012). Die Ergebnisse der Färbung mit diesem Marker werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

Claudin-1

Aufgrund des Artikels von Jakab et al. (2012) wurde Claudin-1 als Ersatz für EMA zur Darstellung des Perineuriums beim Hund ausgewählt. In der zitierten Arbeit wurde gezeigt, dass canine Perineurialzellen eine Immunreaktion für Claudin-1 zeigen (Jakab et al. 2012). In der hier vorliegenden Dissertation konnte zwar bestätigt werden, dass das Perineurium in caninen Nerven Claudin-1 exprimiert, jedoch konnte kein Claudin-1-positives Perineurium in den cMPNST nachgewiesen werden. Demnach könnte dieses Ergebnis so interpretiert werden, dass die cMPNST kein Perineurium enthalten. Auf der

anderen Seite zeigten die gegen CD90- und α -SMA-gerichteten Antikörper eine Reaktion in Strukturen, die stark an Perineurium erinnerten. Auf diese Strukturen wird in den jeweiligen Abschnitten weiter eingegangen. Die Rolle von Claudin-1 als Differenzierungsmarker für cMPNST wird unter 5.2 diskutiert.

CD90

CD90 ist ein Oberflächenprotein, welches in vielen verschiedenen Zelltypen (Fibroblasten Neuronen, Blutstammzellen, Endothelzellen) vorkommt (Leyton und Hagood 2014). In dieser Arbeit wurde CD90 als Fibroblasten-Marker verwendet. In den von uns untersuchten Tumoren, war die Lokalisation der Tumore bekannt. Dementsprechend, konnte man bei den CD90-positiven Zellen davon ausgehen, dass es sich um Fibroblasten und keine anderen CD90-positiven Zellen handelte. Allerdings gibt es bislang keinen ausschließlich spezifischen Fibroblastenantikörper, so dass möglicherweise in dieser Studie nicht alle Fibroblasten erfasst wurden bzw. andere Zellen, die CD90 positiv waren die Ergebnisse beeinflussten. Eine andere Nachweismöglichkeit wäre ein Antikörper gegen das sog. Fibroblasten-Oberflächenprotein gewesen (Hagel et al. 2012).

Die CD90-Färbung wurde aus verschiedenen Gründen qualitativ ausgewertet. Zum einen sollte der Anteil an Zellen bestimmt werden, die nicht als freie Fibroblasten und damit Tumorzellen, anzusehen waren. Dies war nur über eine deskriptive Auswertung möglich, da die CD90-Markierung den Zellen nicht eindeutig zuzuordnen war. Andere Auswertungsverfahren, wie Western Blot oder ELISA, ermitteln die Gesamtmenge der CD90-positiven Strukturen und berücksichtigen dabei nicht, dass CD90 nicht nur von Tumorzellen exprimiert wird, sondern auch andere Strukturen CD90-positiv sein und diese das Ergebnis verfälschen können. Diese anderen positiven Strukturen waren in den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren perivaskulär und perineurial gelegen. Aufgrund ihrer Lokalisation und Morphologie wurden sie als Perizyten und Perineurialzellen identifiziert, die der Herkunft nach auch Fibroblasten sind.

Da CD90-positive Zellen durchweg nur sporadisch multifokal im Tumorgewebe verteilt waren, darf von einem geringen Anteil (< 20%) an freien Fibroblasten ausgegangen werden.

In der Literatur wird der Anteil der Fibroblasten an den humanen Neurofibromen mit 10-20% angegeben (Sheela et al. 1990). In der hier vorliegenden Arbeit wurde nicht der Anteil der Fibroblasten an der Gesamtzellzahl bestimmt, sondern der Anteil der CD90-positiven Neurofibrome (68,8%). In 30,7% Neurofibromen waren Tumorzellen, in 38,1% gefäßassoziierte Strukturen und Perineurium CD90-positiv. Somit ist mehr als die Hälfte der CD90-positiven Färbung auf die Anfärbung von Perizyten und Perineurialzellen

zurückzuführen. Nur ein relativ geringer Prozentsatz der Neurofibrome wies tatsächlich freie Fibroblasten im Tumor auf.

Die CD90-Expression wurde unseres Wissens bislang nicht an cMPNST untersucht. CD90 wird als Marker zur Diagnose von histiozytären Erkrankungen (Moore 2014) und Lymphomen (Reggeti und Bienzle 2011) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass 98,7% der Tumore multifokal bis diffus positiv für CD90 waren. Da nicht davon auszugehen ist, dass alle Tumorzellen Fibroblasten sind, scheint es, dass dieses Protein beim Hund eher als allgemeiner mesenchymaler Marker zu werten ist.

Mastzellen

In der Literatur werden Mastzellen als Promotor der Tumorentstehung und des Tumorwachstums bei Neurofibromen diskutiert (Yang et al. 2008; Carroll 2012; Staser et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Studie sprechen gegen eine solche Rolle der Mastzellen. Die Mediane an Mastzellen waren in KNF im Vergleich der humanen Neurofibromsubtypen untereinander am höchsten (Median (M): 57). Diese Entität bleibt jedoch über Jahre hinweg gutartig und verändert seine Größe nicht (Ruggieri 1999), was auf ein geringes Malignitätspotential und eine geringe Proliferation hinweist. Darüber hinaus war die Mastzellanzahl sowohl in PNF (M: 8) als auch in MPNST (M: 9) signifikant geringer als in den gutartigen Varianten (KNF, DNF, DPNF). Sollten Mastzellen die Tumorprogression vom PNF zum MPNST unterstützen, dann wäre zu vermuten, dass ihre Anzahl in PNF und MPNST erhöht ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung des in der Literatur beobachteten verringerten Tumorwachstums bei Inhibition von Mastzellrezeptoren (Zhu et al. 2002; Yang et al. 2008) wäre, dass durch Mastzellen vermittelte Entzündungsprozesse immer zu einem Ödem und damit zu einer Tumorvergrößerung führen. Diese Vergrößerung wäre demnach auf den Entzündungsprozess und nicht auf das tatsächliche Tumorwachstum zurückzuführen. Auf der anderen Seite sind PNF geschlossene Kompartimente, in denen Mastzellfaktoren länger erhalten bleiben und somit konzentrierter wirken können. Dadurch könnte die Mastzellwirkung verstärkt werden und somit doch einen Beitrag zur Tumorprogression leisten, auch wenn die Anzahl der Mastzellen nicht zunimmt.

Die Literatur gibt an, dass Mastzellen in cMPNF vorkommen (Goldschmidt und Hendrick 2002), sagt jedoch nichts über deren Rolle als Tumorpromoter. Mastzellen konnten in dieser Studie in cMPNF mit Hilfe der Mastzelltryptase nachgewiesen werden - ihre Anzahl war jedoch relativ gering (M: 3,4). Somit scheinen sie auch beim Hund keinen Anteil an der Tumorprogression und dem Tumorwachstum zu haben. Da die meisten der in dieser Studie untersuchten caninen Tumoren aus der Haut isoliert wurden und Mastzellen zur

normalen Zellpopulation der Haut gehören (Maurer et al. 2003), handelt es sich vermutlich um die physiologisch vorkommende Zellpopulation.

Beim Vergleich der hMPNST und cMPNST wurde deutlich, dass in beiden Entitäten wenige Mastzellen vorhanden waren (M: 9 vs. 3,4). Somit zeigt sich hier eine Gemeinsamkeit der beiden Entitäten, die zwar Mastzellen enthalten, jedoch zu einem geringen Anteil.

Neurofilament

In humanen peripheren Nervenscheidentumoren, v. a. im plexiformen Subtyp, kommen Neurofilament-positive Axone vor (Louis et al. 2007).

Die Anwendung des gegen Neurofilament gerichtete Antikörpers sollte klären, inwieweit und wie viele Axone im Tumorgewebe noch vorhanden sind und somit ob die Innervation noch erhalten ist. In allen humanen Tumorsubtypen fanden sich Axone im Tumorgewebe. Wie erwartet enthielten die meisten plexiformen NF (66,4%) Axone im Tumorgewebe. Auch enthielten PNF die höchste Anzahl an Axonen im Tumor (M: 35). Somit könnte eine Interpretation sein, dass das Tumorwachstum in allen Subtypen nicht unmittelbar zur Degeneration der Axone führt.

Bei Hunden wird Neurofilament ebenfalls als Axon-Marker eingesetzt und z. T. für die Diagnose von cMPNST verwendet (Suzuki et al. 2013). 86,7% der cMPNST zeigten Axone im Gewebe. Somit war der Antikörper auch für canines Gewebe geeignet und könnte zur Diagnose von cMPNST verwendet werden.

Im Vergleich wiesen hMPNST (18,2%) signifikant weniger freie Axone im Gewebe auf als cMPNST. Das könnte seinen Grund in der unterschiedlichen Malignität der Tumore haben. Eine andere Erklärung wäre, dass beim Menschen nur kleine Tumorareale untersucht wurden (TMA) und somit nicht die Stelle mit den meisten Axonen im ganzen Tumor ausgewählt wurde. Beim Hund wurde hingegen der ganze Tumor betrachtet.

Fazit

Das Ergebnis der detaillierten Untersuchung der verschiedenen Tumorbestandteile zeigt, dass humane periphere Nervenscheidentumore zwar Tumore sind, die verschiedene Zellfraktionen enthalten, die Schwann-Zelle jedoch den weitaus größten Anteil (73,8%) an den Tumorzellen stellt. Die anderen Zellarten (Fibroblasten, Perineurialzellen) waren zwar bei den meisten Subtypen vertreten, die verwendeten Antikörper färbten jedoch häufig Strukturen an, die gar nicht zum Tumor zu rechnen waren, wie Teile der Gefäßwand und das Perineurium. Nur 30,7% der Tumore zeigte CD90-positive Zellen – vermutlich Fibroblasten – und EMA-positive Perineurialzellen.

In allen humanen Tumorsubtypen waren noch Axone nachweisbar. Die Anzahl der Mastzellen, ein in der Literatur viel diskutierter Promoter der Tumorentstehung und des Tumorwachstums, korrelierte nicht mit dem Proliferationsverhalten der peripheren Nervenscheidentumoren. Die möglichen Auswirkungen von Mastzellen auf PNST lassen sich nicht auf die zunehmende Anzahl der Mastzellen zurückführen.

Die caninen MPNST zeigten, dass sie ebenfalls aus verschiedenen Zellfraktionen bestehen, auch wenn die Ergebnisse weniger eindeutig als beim Menschen waren und der Tumorzellursprung somit nicht endgültig geklärt werden konnte. Die größtenteils für menschliches Gewebe hergestellten Antikörper zeigten eine Immunreaktion im Gewebe der Hundetumore. Jedoch ergab die Auswertung, dass S100 kein besonders spezifischer Marker für cMPNST war. Damit werden die Angaben in der Literatur bestätigt (Chijiwa et al. 2004; Gaitero et al. 2008). EMA als perineurialer Marker funktionierte beim Hund nicht und der Ersatz, Claudin-1, erzielte ebenfalls keine befriedigenden Ergebnisse. CD90 scheint ebenso kein spezifischer Fibroblasten-Marker beim Hund zu sein. Seine Immunreaktivität sollte daher an einzelnen Fibroblasten oder Fibrosarkomen getestet werden. Neurofilament als Axonmarker zeigte eine gute Immunreaktion und verdeutlichte die teils erhaltene Innervation in cMPNST. Die Mastzelltryptase färbte canine Mastzellen, auch wenn die Immunreaktion nicht so stark war, wie bei c-kit. In dieser Studie konnte somit gezeigt werden, dass canine MPNST Axone und Mastzellen enthalten. Die Tumorzellen selber exprimierten häufig CD90 und Claudin-1 und teilweise S100 exprimierten. Entweder handelt es sich bei den Tumorzellen ursprünglich um Schwann-Zellen, die ihre zellspezifischen Eigenschaften zum großen Teil verloren haben, oder die cMPNST stammen von anderen Zellen ab. Weitere Untersuchungen müssen folgen um dem Ursprung der cMPNST weiter nach zu gehen.

Im Vergleich der beiden Spezies zeigte sich, dass hMPNST häufiger positiv für S100 (81,8% vs. 56%) waren, die cMPNST hingegen häufiger CD90-positiv (98,7% vs. 86,4%). Mehr cMPNST enthielten Axone (86,7% vs. 18,2%), die mediane Mastzellanzahl war vergleichbar (M 9 vs. 3,4) und der EMA-Antikörper funktioniert bei den cMPNST nicht. Somit stellen sich bisher mehr Unterschiede als Gemeinsamkeiten hinsichtlich der immunhistologischen Expression zwischen den beiden Entitäten dar.

5.2 Diagnose und Differentialdiagnosen von cMPNST

Die Diagnose des peripheren Nervenscheidentumors ist beim Hund wie beim Menschen schwer zu stellen. Die Histomorphologie zeigt unspezifische Wachstumsmuster, die denen in anderen Spindelzelltumoren (Fibrosarkom, Hämangioperizytom) ähneln (Jubb et al. 2008a; Klopffleisch et al. 2013). Die Immunhistochemie bietet keinen einzelnen spezifischen und sensitiven Marker zur Identifikation (Koestner et al. 1999). Eine

Kombination mehrerer Marker ist daher bisher das Mittel der Wahl. Im Folgenden werden die in dieser Studie verwendeten Differenzierungsmarker diskutiert. Dabei wird zuerst auf die Ergebnisse beim Hund eingegangen, da es in diesem Kapitel hauptsächlich um den Hund geht, und die dargestellten Ergebnisse werden daraufhin im Vergleich zum Menschen diskutiert.

Saures Gliafaserprotein

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein Protein, das ausschließlich in Gliazellen vorkommt (Jessen et al. 1984). Diverse Studien haben belegt, dass GFAP in caninen PNST (Sawamoto et al. 1999; Chijiwa et al. 2004; Sugiyama et al. 2008; Bergmann et al. 2009; Volmer et al. 2010) und nicht in Hämangioperizytomen (Perez et al. 1996; Chijiwa et al. 2004; Avallone et al. 2007) exprimiert wird. Jedoch variierten die prozentualen Angaben der cMPNST-positiven Tumore zwischen 1-67%. In dieser Studie waren 100% der untersuchten Tumore positiv für GFAP und dieser Marker wurde als Diagnosekriterium für cMPNST herangezogen.

In den humanen MPNST zeigte nur ein Fall eine GFAP-Expression. Alle anderen humanen Neurofibrome waren negativ für GFAP. In anderen Studien wurde publiziert, dass vorrangig Schwannome (33-60%) GFAP exprimieren und nur wenige Neurofibrome (11-40%) und MPNST (7%); (Kawahara et al. 1988; Gray et al. 1989; Gaitero et al. 2008). Dieses Ergebnis spricht für eine unterschiedliche Differenzierung der Schwann-Zellen oder einen unterschiedlichen Tumorzelltyp in humanen und caninen MPNST.

Nervenwachstumsfaktorrezeptor

Chijiwa et al. (2004) haben gezeigt, dass der Nervenwachstumsfaktorrezeptor (NGFR) ein hilfreicher Marker für cPNST sein kann, da er in 70% der Tumore exprimiert wird (Chijiwa et al. 2004). In dieser Studie zeigten 74,7% der cMPNST eine Färbung für den NGFR, bei den humanen periphere Nervenscheidentumoren waren es 100%. Die Intensität war bei den humanen MPNST signifikant stärker als bei den cMPNST. Somit ist der NGFR ein hoch sensibler Immunmarker für humane periphere Nervenscheidentumore. Für cMPNST ist er ebenfalls geeignet, jedoch weniger sensitiv.

Claudin-1

Claudin-1 (Cl-1) wurde als möglicher diagnostischer Marker für cMPNST diskutiert. In der Studie von Jakab et al. (2012) waren 100% der untersuchten cMPNST positiv für Claudin-1. Suzuki et al. (2013) fanden dagegen das Antigen nur in 70% der Tumore. In der hier vorliegenden Arbeit zeigten 78,7% der Tumore eine Färbung für Claudin-1. Zu seiner Spezifität können keine Aussagen gemacht werden, da in dieser Studie keine anderen Spindelzelltumore untersucht wurden. Somit ist Claudin-1 ein geeigneter

Immunmarker für die Diagnose von cMPNST, jedoch nur in Kombination mit anderen Markern.

Zum Vergleich der Expression von Claudin-1 in humanen Tumoren können wir ebenfalls keine Aussage tätigen, da Claudin-1 in dieser Studie nicht an humanen Tumoren getestet wurde. Folpe et al. (2002) geben an, dass 66% von humanen MPNST positiv für Claudin-1 sind.

Periaxin

Periaxin ist ein Entwicklungsprotein der Myelinscheide. Es wurde ausgewählt, da es von Tovar et al. (2011) als sensitiver Marker für Schwann-Zell-Neoplasien vorgeschlagen wurde. Seit dieser Arbeit wurde Periaxin in anderen Studien an cMPNST getestet (Suzuki et al. 2013). Bei Suzuki et al. (2013) waren 40% der untersuchten cMPNST positiv für Periaxin. In der vorliegenden Dissertation zeigten 45,3% der cMPNST eine Immunreaktivität für Periaxin.

Bei den humanen Neurofibromen zeigten 65,5% der Tumore eine positive Färbung für Periaxin. Bei den hMPNST waren es sogar 86,4%.

Im Vergleich färbte Periaxin signifikant mehr hMPNST als cMPNST, so dass er als ein Marker insbesondere für Schwann-Zell-Tumore beim Menschen geeignet scheint. Beim Hund sollte er nur in Kombination mit anderen Immunmarkern angewandt werden.

α -SMA

α -SMA wird in der Literatur als möglicher Differenzierungsmarker der cPNST vom caninen Hämangioperizytom diskutiert (Chijiwa et al. 2004). Darüber hinaus wurde die Expression im Perineurium und in Gefäßwänden von Hundegewebe nachgewiesen (Suzuki et al. 2013).

Diese Ergebnisse konnten z. T. in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. 29,3% der in dieser Studie untersuchten cMPNST zeigten eine deutliche Anfärbung des Perineuriums für α -SMA (Abb. 41 E, Seite 81). Zusätzlich zeigten 20% der Tumore eine Immunreaktion im Tumorgewebe (Abb. 41 B). Durch eine Doppelfärbung mit GFAP zeigte sich, dass in einigen Tumoren (10,7%) umschriebene α -SMA-positive Zellfraktionen inmitten von GFAP-positiven Zellen lagen (Abb. 44 A, Seite 83). In anderen Tumoren (9,3%) waren GFAP- und α -SMA-positive Zellen diffus durchmischt, und viele Zellen zeigten sowohl eine GFAP- als auch eine α -SMA-positive Färbung (Abb. 45, Seite 84). Eine Doppelexpression ist bisher noch nicht beschrieben worden. Ebenso ging man bisher davon aus, dass α -SMA nicht in cMPNST exprimiert wird. Verschiedene Studien haben Aktin in Schwann-Zellen des Menschen und der Maus nachgewiesen und seine Rolle bei

der Schwann-Zell-Entwicklung beschrieben (Fernandez-Valle et al. 1997; Bouquet et al. 2007; Perego et al. 2012). In einer Studie von Stonecypher et al. (2005) wurde in drei MPNST-Zelllinien eine Population von α -SMA-Doppelexpression nachgewiesen. Auch dieser Befund unterstützt die Annahme, dass es in den hier vorliegenden Fällen zu einer divergenten Differenzierung eines Teils der cMPNST-Zellen gekommen ist. Dies ist in der Tiermedizin nach unserem Wissen noch nicht beschrieben worden.

In humanen Neurofibromen zeigte das Perineurium ebenfalls eine α -SMA-Expression, jedoch nicht das Tumorgewebe. Eine Sonderform des humanen MPNST ist der Triton-Tumor, der eine rhabdomyoblastische Differenzierung aufweist (Stasik und Tawfik 2006). Neben typischen PNST-Zellen, treten auch Rhabdomyoblasten in diesen Tumoren auf (Kamperis et al. 2013). Immunhistochemisch sind Triton-Tumoren positiv für die typischen neuronalen Markern sowie auch für muskuläre Marker (Myoglobin, Desmin, muskelspezifisches Actin und α -SMA); (Takeuchi und Ushigome 2001; Stasik und Tawfik 2006; Kamperis et al. 2013). Eine Erklärung für die Anfärbung der cMPNST mit α -SMA könnte somit eine rhabdomyoblastische Differenzierung der besagten Tumore sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der verwendete Antikörper mit den Aktinfilamenten der Tumorzellen kreuzreagiert hat. Jede Zelle besitzt Aktinfilamente, die für die Bewegung der Zellausläufer zuständig sind. Da der Antikörper gegen α -SMA an *smooth muscle actin* bindet, könnte es möglicherweise zu einer Kreuzreaktion mit anderem Zellaktin gekommen sein.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie können wir die Annahme von Chijiwa et al. (2004), dass α -SMA ein guter Differenzierungsmarker zum caninen Hämangioperizytom ist, nicht bestätigen.

Fazit

Jakab et al. (2012) schlugen in ihrer Studie die folgenden Immunmarker zur Abgrenzung der cPNST von Perineuriomen und Hämangioperizytomen (cHP) vor: Claudin-1, S100 und α -SMA. Demnach sollen cPNST und cHP positiv für Claudin-1 sein, Perineuriome jedoch nicht. S100-Positivität soll kennzeichnend für cPNST sein und α -SMA-Positivität für cHP. Andere Autoren geben jedoch an, dass nicht alle cPNST S100-positiv sind (Chijiwa et al. 2004) und cHP ebenfalls S100 exprimieren können (Perez et al. 1996; Chijiwa et al. 2004). In dieser Studie zeigten ebenfalls nur 56% der cMPNST eine Immunreaktivität für S100. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Studie α -SMA in cMPNST nachgewiesen. Somit bewerten wir diesen Marker als wenig geeignetes Ausschlusskriterium für cMPNST. Zur vollständigen Beantwortung der Frage, welche Marker am besten zur Diagnose von cMPNST geeignet sind, erscheinen weitere Studien

an Fibrosarkomen und Hämangioperizytomen erforderlich, um die Expression der besagten Marker in diesen Entitäten zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie zeigten sich GFAP, NGFR und Claudin-1 als relativ sensitive Marker für cMPNST.

Für den Vergleich von hMPNST und cMPNST zeigten die beschriebenen Immunfärbungen weitere Unterschiede zwischen diesen beiden Tumorentitäten auf. Periaxin und der NGFR werden signifikant mehr bzw. stärker in hMPNST als in cMPNST exprimiert, GFAP hingegen signifikant mehr in cMPNST, und α -SMA färbt in beiden Entitäten das Perineurium.

5.2.1 Abschließende Bewertung: Vergleich Mensch - Hund

Im Vergleich der Klinik, der Histomorphologie, des Tumorverhaltens und der Immunreaktivität für ausgewählte Marker deckte der Vergleich von hMPNST und cMPNST durchweg mehr Unterschiede als Gemeinsamkeiten auf.

Das könnte darauf hin deuten, dass beide Entitäten möglicherweise auf einen unterschiedlichen zellulären Ursprung zurück zu führen sind. Demnach wäre die Übertragung von Forschungserkenntnissen von der einen auf die andere Entität nicht sinnvoll. Sicher lässt sich sagen, dass cMPNST nicht als Forschungsmodell für hMPNST in Frage kommen, da zu große Unterschiede bestehen und eine sichere Diagnose der cMPNST schwer zu stellen ist. In wie weit in Zukunft Erkenntnisse und Einteilungsschemata der Humanmedizin auf die Forschung der cMPNST übertragen werden sollten, ist fraglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass mehr Gründe dagegen als dafür sprechen.

Ein möglicher Ansatz wäre weiterhin, dass caninen MPNST eine größere Ähnlichkeit zu sporadischen hMPNST als zu NF1-assoziierten hMPNST besteht. 50% der humanen MPNST sind sporadischen Ursprungs (Zou et al. 2009). Sie treten bei älteren Patienten auf und verhalten sich weniger maligne als NF1- assoziierte MPNST (Hagel et al. 2007). Allerdings stehen der Forschung wenige Proben zur Verfügung, da dieser Tumor selten vorkommt.

5.3 Tumorwachstum in humanen PNST

Ein weiterer Ansatzpunkt dieser Studie war es, Mechanismen des Tumorwachstums in peripheren Nervenscheidentumoren zu untersuchen. Im Folgenden wird zunächst die Rolle von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren in der Entstehung von hPNST diskutiert, anschließend wird auf intrazelluläre, die Proliferation unterstützende, Signalwege eingegangen und schließlich die mögliche Funktion von Entwicklungsmarkern

im Tumorentstehungsprozess beleuchtet. In Abschnitt 5.3 wird v. a. auf die humanen Neurofibrome und nur am Rande auf die cMPNST eingegangen, da nur die Expression von NRG1 an Hundegewebe untersucht wurde.

5.3.1 Wachstumsfaktoren und Rezeptoren

Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Liganden haben viele physiologische Funktionen. Durch ihre Aktivierung und der ihnen folgenden Signalkaskaden sichern sie in physiologisch arbeitenden Zellen das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und Migration (Chen et al. 2006; Heermann et al. 2011; Kumar et al. 2015a). Geraten diese Mechanismen außer Kontrolle, können sie zur Tumorentstehung beitragen. Dies geschieht, wenn Onkogene modifizierte Wachstumsrezeptoren produzieren, die stetig proliferationsinduzierende Signale in das Zellinnere leiten (Kumar et al. 2015a). Zum anderen ist es möglich dass Tumorzellen auto- oder parakrin ungehindert Wachstumsfaktoren ausschütten, die wiederum durchgängig Wachstumsrezeptoren aktivieren (Kumar et al. 2015a). Aus diesen Gründen werden Wachstumsfaktorrezeptoren in vielen Tumorarten vermehrt exprimiert (Earp et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit ErbB2, ErbB3 und ihr Ligand Neuregulin-1 an der Tumorbiologie von Neurofibromen und MPNST beteiligt sind, die eine wichtige Rolle bei der Axon-Schwannzell-Kommunikation spielen.

Epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren-2 und -3, Neuregulin-1

NRG1 bindet an den Wachstumsrezeptor ErbB3, der daraufhin einen Heterodimer mit ErbB2 oder ErbB4 bildet (Stonecypher et al. 2005). Stonecypher et al. (2005) haben ErbB2, ErbB3 und NRG1 in humanen Neurofibromen und hMPNST nachgewiesen. Durch eine Inhibition der Wachstumsfaktorrezeptoren in Zellkultur konnte eine Reduktion der ErbB-Phosphorylierung und der DNA-Synthese in den hMPNST-Zellen erreicht werden (Stonecypher et al. 2005). Weitere Studien zeigen die wichtige Rolle dieses Signalweges für das Tumorwachstum und die Migration von Neurofibrom- und hMPNST-Zellen *in vitro* und *in vivo* auf (Carroll und Stonecypher 2005; Eckert et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ErbB2, ErbB3 und NRG1 an einer großen Anzahl humaner, operativ-gewonnener Tumorproben getestet.

Der größte Teil (89%) der in dieser Studie untersuchten Tumore war negativ für ErbB2. In den positiven Tumoren exprimierte das Zytoplasma von einer kleinen Fraktion der Tumorzellen ErbB2. ErbB2 schien somit in nur wenigen Neurofibromen und dort lediglich in einzelnen Tumorzellen exprimiert zu werden. Es kam zu einer Immunfärbung des Zytoplasmas und nicht der Zellmembran, da der verwendete Antikörper (c-erbB2 Oncoprotein, A 0485, Dako) an einen intrazytoplasmatischen Abschnitt des

transmembranen ErbB2-Rezeptors bindet. Trotz der geringen Expression des ErbB2 in humanen Neurofibromen ergab die statistische Auswertung, dass PNF und MPNST diesen Rezeptor signifikant stärker exprimieren als ihre Verwandten KNF, DNF, DPNF. Dieses Ergebnis muss allerdings aufgrund der geringen Zahl der positiven Tumore vorsichtig bewertet werden.

Im Gegensatz dazu zeigten alle humanen peripheren Nervenscheidentumore eine schwache bis starke zytoplasmatische und membranöse Anfärbung für ErbB3. Da der ErbB3 als transmembranöser Wachstumsfaktorrezeptor durch die Zellmembran reicht, war von einer ausschließlich membranösen Färbung auszugehen. Die zytoplasmatische Reaktivität wurde jedoch schon in anderen Tumortypen beobachtet und spiegelt die Endozytose des Rezeptors wieder (Cheng et al. 2007). Die Intensität der ErbB3-Färbung nahm mit steigender Malignität der Neurofibrome zu. Der Unterschied zwischen den PNF und MPNST im Vergleich zu den KNF, DNF und DPNF war auch hier signifikant. Demnach lässt sich eine verstärkte Aktivität des ErbB3 in PNF und MPNST vermuten, die zu einer zunehmenden Proliferation der Tumorzellen führen könnte.

Neuregulin-1 (NRG1), Ligand der Wachstumsfaktorrezeptoren, wurde in 87,1% der untersuchten humanen Neurofibrome im Zytoplasma und der Zellmembran exprimiert. Diese zytoplasmatische Färbung ist ebenfalls schon in anderen Studien beschrieben worden (Eckert et al. 2009). Der in der vorliegenden Studie verwendete Neuregulin-1 Antikörper (NRG1, AP 06168PU-N, Acris) bindet an das N-Ende, das bei transmembranösen NRG1-Isoformen im Zytoplasma liegt (Bao et al. 2003). Die Intensität und Verteilung der NRG1-Färbung war in PNF signifikant am stärksten. Demnach befand sich mehr NRG1 in PNF als in den anderen PNST. Das könnte auf einen *autocrine loop* hindeuten, der die Proliferation der Tumorzellen verstärkt. Einen zusätzlichen Einfluss könnten in diesem Zusammenhang residuale Axone haben, die in PNF am häufigsten vorkommen.

In den meisten Studien wird die Expression von NRG1 in humanen MPNST untersucht um nachzuweisen, dass NRG1 die Proliferation der hMPNST-Zellen unterstützt und somit zu einer Tumorprogression und Metastasierung beiträgt. In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass NRG1 signifikant stärker in den gutartigen Tumoren (PNF) exprimiert wird und somit möglicherweise eine Rolle bei der Progression der plexiformen Neurofibrome zu MPNST spielen könnte.

Unter physiologischen Bedingungen wird NRG1 von Axonen gebildet (Sherman et al. 2000). In Neurofibromen ist die Herkunft von NRG1 noch nicht vollständig geklärt. Einige Studien gehen von einer autokrinen oder parakrinen Sekretion der Tumor-Schwann-

Zellen aus (Stonecypher et al. 2005; Eckert et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden freie Axone mit einem Antikörper gegen Neurofilamente dargestellt und ihre Anzahl pro Fläche bestimmt. Daraufhin wurde die Axondichte mit der NRG1-Expression in Beziehung gesetzt. In Tumoren mit vielen Axonen war die NRG1-Immunreaktion signifikant stärker als in Tumoren mit geringer Axondichte. Das könnte darauf hindeuten, dass Axone in Neurofibromen mindestens teilweise für die Bildung von Neuregulin-1 verantwortlich sind. Auf der anderen Seite zeigte die Evaluation der Immunhistologie deutlich, dass die Tumorzellen selber, insbesondere in PNF, NRG1 exprimierten.

Neuregulin-1 geht eine direkte Bindung mit dem ErbB3 oder ErbB4 ein (Yarden und Sliwkowski 2001). Diese dimerisieren, um ein Signal in das Zellinnere zu vermitteln. Bevorzugter Heterodimerpartner von beiden ist ErbB2. In dieser Studie konnten sowohl der ErbB3 als auch NRG1 in fast allen humanen peripheren Nervenscheidentumoren nachgewiesen werden, der ErbB2 jedoch nur in wenigen Neurofibromen und dort lediglich in einzelnen Tumorzellen. Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangte die Studie von Stonecypher et al. (2005).

Neuregulin-1 wurde unseres Wissens noch nie in cMPNST untersucht. Alle 75 untersuchten Tumore zeigten eine Reaktion mit dem NRG1-Antikörpern. Möglicherweise könnte Neuregulin-1 bei cMPNST als Differenzierungsmarker verwendet werden. Dafür müsste seine Expression zusätzlich in den Differentialdiagnosen der cPNST wie z. B. dem caninen Fibrosarkomen und caninen Hämangioperizytomen getestet werden. Die starke Expression dieses Moleküls könnte auf die Proliferation unterstützende Signalwege wie den Ras-Signalweg hinweisen, die aktiviert sind und damit einen möglichen Ansatz für die Therapie darstellen könnte. In beiden Fällen erscheinen weitere Untersuchungen sinnvoll.

In der statistischen Auswertung exprimierten cMPNST signifikant mehr NRG1 als hMPNST. Die caninen Tumore verhielten sich hinsichtlich der NRG1-Expression eher wie humanen PNF. Darüber hinaus ist dieses Resultat ein weiterer Hinweis auf die Verschiedenheit der beiden Entitäten.

CD44

CD44 ist ein Zelloberflächenprotein, das die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren verstärken kann (Riddle et al. 2010). Riddle et al. (2010) zeigten, dass CD44 auf eine invasive und infiltrative Aktivität der Neurofibrome hinweist und damit mit der Migration assoziiert ist. Um die Ergebnisse von Riddle et al. (2010) zu überprüfen wurden die peripheren Nervenscheidentumore nach ihrer Invasivität in Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung weicht von der normalerweise in dieser Arbeit verwendeten Einteilung ab. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigten die Resultate von Riddle et al.

(2010). Die plexiformen, umschriebenen Neurofibrome, die keine infiltrative oder invasive Aktivität aufwiesen, exprimierten signifikant weniger CD44 als die diffus wachsenden Tumorsubtypen (KNF, DNF, DPNF, MPNST).

5.3.2 Intrazelluläre Signalwege

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine Krankheit, bei der es zu einem Defekt im Neurofibromin-Gen kommt (Gottfried et al. 2010). Neurofibromin fungiert u. a. als Tumorsuppressor (Boyd et al. 2009) im Ras-Signalweg. Dieser fördert bei Aktivierung über verschiedene Signalwege die Zellproliferation, -differenzierung und Proteinbiogenese (Boyd et al. 2009). In der vorliegenden Studie sollte die Aktivität der verschiedenen Ras-*Downstream*-Signalwege in den Neurofibromsubtypen untereinander und mit normalem Gewebe verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden drei Proteine, die repräsentativ für die drei Ras-nachgeschalteten Signalwege stehen, an humanen Neurofibromen getestet.

mTor

mTor hat Einfluss auf die Proliferation und Invasion von Zellen sowie auf die Proteinbiogenese im Zellkern (Hsieh et al. 2012). Verschiedene Studien haben die Inhibition von mTor in MPNST-Zellen *in vitro* und *in vivo* getestet (Johannessen et al. 2005; Johannessen et al. 2008; Endo et al. 2013). Ihnen zufolge kam es zu einer verminderten Proliferation sowie zu einem verminderten Tumorwachstum.

In der hier vorliegenden Studie markierten mTor-Antikörper die Zellkerne in allen humanen Neurofibromen. PNF (Median (M): 91,6%) und MPNST (M: 100%) wiesen signifikant mehr mTor-positive Zellen auf als KNF, DNF und DPNF. DNF und DPNF hatten nahezu die gleichen medianen mTor-Indices (M: 72,7% und M: 72,8%), die KNF zeigten einen etwas höheren medianen Index (M: 85%). In physiologischem humanem Nervengewebe exprimierten nur Perineurium, Gefäßwände und Mastzellen mTor. Somit scheint dieser Signalweg in allen Neurofibromsubtypen aktiv zu sein, in physiologischem Nervengewebe jedoch nicht. Der mTor-Signalweg könnte darüber hinaus auch eine Rolle bei der malignen Transformation der Neurofibrome spielen. Dafür spricht die signifikant verstärkte Aktivierung dieses Signalweges in PNF- und MPNST-Tumorzellen.

Um einer Verfälschung der Färbung aufgrund eines unterschiedlichen Tumorzellgehalts der Subtypen vorzubeugen, wurden Indices bezogen auf die Anzahl der S100-positiven Zellen errechnet (mTor_vs_%S100-Index). Die Mediane der neuen Indices lagen zwar etwas niedriger als die der ursprünglichen Indices, jedoch zeigten sich im Verhältnis der Tumorsubtypen und der berechneten signifikanten Unterschiede zueinander keine deutlichen Abweichungen.

Rho

Rho ist Bestandteil eines Signalweges, der durch Ras aktiviert wird. Dieser Signalweg ist v. a. am Umbau und an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt (Vallée et al. 2012). Diese Mechanismen sind für Zellbewegung, Zelladhäsion und Zellteilung nötig (Ozawa et al. 2005). Neurofibromin-defiziente Zellen zeigen vermehrte Motilität und Invasion und bilden Zellaggregate (Ozawa et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit zeigten nahezu alle Neurofibrome (86%) eine unterschiedlich starke Immunreaktion auf Rho. In physiologischem Nervengewebe zeigten nur einzelne Schwann-Zellen eine positive Rho-Expression. Dieser Signalweg scheint daher in allen Neurofibrom-Subtypen einen Beitrag zum Tumorwachstum zu leisten. MPNST exprimierten signifikant mehr Rho als KNF, DNF und DPNF. Demnach scheint dieser Signalweg in MPNST im Vergleich zu KNF, DNF und DPNF stärker aktiv zu sein und zum Tumorwachstum bei zu tragen.

MEK1/2

MEK1 und MEK2 sind Teil des Mitogen-aktivierenden-Proteinkinase-Signalweges, der die Transkription, Proliferation und Motilität der Zellen reguliert (Berridge 2012). Dieser Signalweg soll in MPNST vermehrt aktiv sein und seine Inhibition zu einem reduzierten Zellwachstum führen (Ambrosini et al. 2008). Dies wurde von Ambrosini et al. (2008) in Zellkultur nachgewiesen.

In der vorliegenden Studie wurde die phosphorylierte (aktive) MEK-Form (pMEK) und die unphosphorylierte (inaktive) MEK-Form (MEK) an den humanen Neurofibromen getestet. Die Auswertung der MEK-Färbung in den verschiedenen Subtypen ergab ein uneinheitliches Bild. Gut die Hälfte (58,1%) der untersuchten Tumore exprimierte unphosphoryliertes MEK, jedoch waren jeweils nur vereinzelt Zellen positiv. KNF waren signifikant häufiger positiv als PNF (98% vs. 78%).

Für pMEK zeigten 16,8% der Neurofibrome eine positive Immunreaktion. In diesem Fall zeigten ebenfalls nur einzelne Zellen eine positive Färbung bis auf einige MPNST, bei denen vermehrt Zellen pMEK-positiv waren.

Vergleicht man die MEK- und pMEK-Expression, so zeigt sich, dass in KNF kein pMEK vorhanden war. Demnach ist MEK in KNF inaktiv. Die Auswertung von pMEK zeigte darüber hinaus, dass in den KNF, DNF, DPNF fast gar kein pMEK vorhanden war (KNF: 0%, DNF: 10%, DPNF: 2%). PNF (42,9%) und MPNST (57,9%) exprimierten signifikant mehr pMEK als die anderen Tumortypen. Dies könnte auf eine mögliche Beteiligung von pMEK an der Proliferation von PNF und MPNST hinweisen.

Im Vergleich, war in normalem Nervengewebe in einigen Schwann-Zellen eine Immunreaktion für MEK, jedoch nicht für pMEK, festzustellen. Demnach ist pMEK in Schwann-Zellen nicht aktiv. Das unterstreicht die mögliche Bedeutung von pMEK am Tumorprozess, da es im physiologischen Zustand inaktiv und im pathologischen Zustand aktiv ist.

Fazit

Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle drei untersuchten Signalwege in humanen Neurofibromen aktiv erscheinen, jedoch unterschiedlich stark. Der Vergleich zeigt, dass mTor in allen Neurofibromsubtypen, und insbesondere in den PNF und MPNST, in 72-100% der Tumorzellen aktiv war. Rho wurde in allen Subtypen nachgewiesen und zeigte eine signifikant stärkere Expression in MPNST im Vergleich zu den gutartigen Neurofibromen. pMEK als Marker für den MAPK-Signalweg konnte nur in 16,8% der Neurofibrome in wenigen Tumorzellen nachgewiesen werden. In PNF und MPNST wurde signifikant mehr pMEK als in den anderen Subtypen exprimiert. Demnach könnten diese Ergebnisse auf eine Beteiligung von pMEK an Tumorprozessen in PNF und MPNST hinweisen. Allerdings scheint diese Beteiligung nicht groß zu sein, da nur wenige Zellen pMEK exprimierten.

5.3.3 Transkriptionsfaktoren

Die Entwicklung und Differenzierung von Zellen hängt essentiell von der Expression von bestimmten Faktoren ab (Jessen und Mirsky 2005; Pytel et al. 2010). Im adulten Stadium eines Organismus spielen diese häufig eine Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumoren. In dieser Studie wurden zwei Transkriptionsfaktoren ausgewählt, denen eine Rolle bei der Tumorbilogie von humanen Nervenscheidentumoren zugeschrieben wird (Gershon et al. 2005; Pytel et al. 2010; Carbonnelle-Puscian et al. 2011).

Pax7

Pax7 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach bisherigem Stand der Forschung ausschließlich in MPNST und nicht in den gutartigen peripheren Nervenscheidentumoren exprimiert werden soll (Gershon et al. 2005; Pytel et al. 2010).

In der vorliegenden Dissertation wurde in allen untersuchten humanen peripheren Nervenscheidentumoren eine Immunreaktivität für Pax7 in einer variablen Anzahl von Zellkernen nachgewiesen. Damit widersprechen die Ergebnisse dieser Untersuchung Gershon et al. (2005) und Pytel et al. (2010). In deren Erhebungen wurden, wie in dieser Dissertation, immunhistochemische Färbungen an 6 bzw. 105 Neurofibromen und 4 bzw. 34 MPNST durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden 199 Neurofibrome und 19

MPNST untersucht. Beide Studien verwendeten denselben Pax7-Antikörper (monoklonaler Mausantikörper, P3U1, Iowa Hybridoma bank, Iowa City, IA) ein anderer, als in der vorliegenden Arbeit (polyklonaler Antikörper, ABIN739905, Antikörper-online) verwendet wurde. Polyklonale Antikörper erkennen mehr Strukturen als monoklonale Antikörper, daher ist möglicherweise in dieser Abweichung der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zu finden.

Die statistische Auswertung in dieser Studie ergab, dass in PNF und MPNST signifikant mehr Zellkerne Pax7 exprimierten als KNF, DNF und DPNF. Darüber hinaus zeigten auch in dermalen Neurofibromen signifikant mehr Zellkerne eine Immunreaktion für Pax7 als in DNF und DPNF.

Um einer Verfälschung der Färbung aufgrund eines unterschiedlichen Tumorzellgehalts der Subtypen vorzubeugen, wurden Indices bezogen auf die Anzahl der S100-positiven Zellen errechnet (Pax7_vs_%S100-Index). Die Mediane der neuen Indices lagen zwar etwas niedriger als die der ursprünglichen, jedoch zeigten sich im Verhältnis der Tumorsubtypen und der berechneten signifikanten Unterschiede zueinander keine deutlichen Abweichungen.

Pax-Transkriptionsfaktoren sind an der Proteinbiosynthese im Zellkern beteiligt. Sie können z. B. die Transkription initiieren, indem sie an Promoterregionen von Genen binden. Darüber hinaus übernehmen sie wichtige Aufgaben während der Embryonalentwicklung. Pax7 reguliert zusammen mit seinem Homolog Pax3 die Myogenese und wird im dorsalen Neuralrohr exprimiert (Buckingham und Relaix 2007). Dort unterstützen beide Transkriptionsfaktoren die Differenzierung der Neuralleistenzellen zu ihren Bestimmungszellen wie den Melanozyten, Schwann-Zellen, Muskelzellen u. a. (Jessen und Mirsky 2005; Pytel et al. 2010). Muratovska et al. (2003) haben nachgewiesen, dass Pax-Faktoren durch ihre proliferativen und zellerhaltenden Eigenschaften das Tumorzellüberleben in verschiedenen Tumorzelllinien (Melanom, Ovarial-, Blasen-, Lungentumor) unterstützen (Muratovska et al. 2003).

Die vorliegende Studie zeigte, dass Pax7 grundsätzlich in den untersuchten peripheren Nervenscheidentumoren exprimiert wurde. Weiterhin ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Subtypen feststellen. Diese Erkenntnis untermauert die in dieser Studie gewählte Subklassifikation der humanen Neurofibrome. KNF verhielten sich anders als DNF und DPNF und diese wiederum anders als PNF und MPNST. Die Expression von Pax7 korrelierte außerdem mit der Malignität in den humanen peripheren Nervenscheidentumoren, jedoch war er in der vorliegenden Studie kein ausschließender

Marker für eine maligne Progression, so wie es in den Studien von Gershon et al. (2005) und Pytel et al. (2010) nahegelegt wurde, da er in allen Tumortypen nachweisbar war.

Sox9

Sox9 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der während der Entwicklung der Neuralleiste und der von ihr abstammenden Zellen eine zentrale Rolle spielt (Cheung und Briscoe 2003). Mehrere Studien haben sich mit der Expression von Sox9 in Schwann-Zelltumoren beschäftigt (Miller et al. 2006; Pytel et al. 2010; Carbonnelle-Puscian et al. 2011). Zwei Studien wiesen nach, dass Sox9 auf dem RNA- und Proteinlevel signifikant stärker in MPNST exprimiert wird als in Neurofibromen (Miller et al. 2009; Carbonnelle-Puscian et al. 2011). In einer anderen Studie wurden jedoch keine Unterschiede zwischen Neurofibromen und MPNST nachgewiesen (Pytel et al. 2010).

In der vorliegenden Studie zeigte in allen Tumoren eine variable Anzahl von Zellkernen eine Immunreaktion für Sox9. Demzufolge wurde Sox9 in allen Neurofibromsubtypen exprimiert. Allerdings zeigte sich in der statistischen Auswertung, dass signifikant mehr Zellen in PNF und MPNST Sox9 exprimierten als in KNF, DNF und DPNF. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Resultate von Miller et al. (2009) und Carbonnelle-Puscian et al. (2011).

Um einer Verfälschung der Färbung aufgrund eines unterschiedlichen Tumorzellgehalts der Subtypen vorzubeugen, wurden Indices bezogen auf die Anzahl der S100-positiven Zellen errechnet (Sox9_vs_%S100-Index). Die Mediane der neuen Indices lagen zwar etwas niedriger als die der ursprünglichen, jedoch zeigten sich im Verhältnis der Tumorsubtypen und der berechneten signifikanten Unterschiede zueinander keine deutlichen Abweichungen.

Während der Entwicklung von Schwann-Zellen aus Neuralleistenzellen nimmt der Gehalt von Sox9 stetig ab (Miller et al. 2009). Neuralleistenzellen enthalten folglich viel Sox9, wie auch MPNST-Zellen. Ferner sind in MPNST-Zellen Gene der Schwann-Zelldifferenzierung wenig aktiv (Miller et al. 2006). Miller et al. (2009) stellten daher die Hypothese auf, dass MPNST-Zellen Eigenschaften von primitiven, unreifen Schwann-Zellen aufweisen. MPNST-Zellen könnten sich demnach direkt aus Neuralleistenzellen entstanden sein.

Sicher ist, dass Sox9 als Transkriptionsfaktor im Zellkern die Transkription von Genen reguliert. In den hier untersuchten humanen Neurofibromen nahm die Anzahl an Zellen, in denen Sox9 aktiv ist, mit steigender Malignität zu. Darüber hinaus wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass Sox9 durch die Bindung an eine mTor-Promotorregion die Bildung von mTor unterstützt (Kim et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit korrelieren die Expression von Sox9 und mTor signifikant ($p < 0,001$, $r = 0,42$), was auf eine assoziierte

Expression der beiden Proteine hinweisen könnte und in Übereinstimmung mit den Literaturangaben steht.

5.4 Hypothetische Signalwege in humanen PNST

Im bisherigen Verlauf der Diskussion wurden die in dieser Studie untersuchten Proteine und Enzyme in Bezug auf ihre Expression in den jeweiligen humanen Neurofibromsubtypen betrachtet. Dabei wurden die Expressionsunterschiede der Proteine in den Subtypen dargestellt und bezüglich ihres Beitrages zur Tumorbilogie interpretiert.

In dem folgenden Abschnitt werden für jeden Neurofibromsubtyp (KNF, DNF/DPNF, PNF, MPNST) separat die Beziehungen der Proteine und Enzyme zueinander untersucht. Als statistisches Mittel wurde eine bivariate Korrelationsanalyse angewandt, mit deren Hilfe signifikante ($p < 0,05$) Korrelationen errechnet wurden. Letztere wurde als mögliche Beziehungen und Signalwege innerhalb der Tumorzellen interpretiert. Diese werden im Folgenden für jeden Subtypen separat in einer Abbildung dargestellt, deren Grundlage die Abb. 8, Seite 28 ist. Auch wenn viele der hier beobachteten Zusammenhänge bereits in der Literatur beschrieben wurden, ist die Interpretation der Korrelationen hoch spekulativ und dient der Hypothesenbildung. Hinweise auf biologische Zusammenhänge müssen erst durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

Von den in 4.4.2 dargestellten Korrelationen werden hier nur die für die Fragestellung der Arbeit besonders interessanten bzw. relevanten diskutiert.

Die Korrelationen zu den CD90-positiven Zellen, in dieser Studie als Fibroblasten definiert, sind zurückhaltend zu interpretieren. CD90 ist ein relativ unspezifischer Marker für Fibroblasten. Vor allem in den MPNST ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei allen CD90-positiven Zellen um Fibroblasten handelt.

Dermale/kutane Neurofibrome

Die für die KNF berechneten Korrelationen zwischen der Anzahl an Mastzellen, dem Vorkommen von Fibroblasten, dem ErbB2, ErbB3, NRG1, den mTor-, Sox9-, Pax7- und Ki-67-Indices sind in Abb. 95 graphisch dargestellt.

KNF von jüngeren Patienten zeigten höhere Ki-67-Indices als KNF von älteren, was möglicherweise zurückzuführen ist auf eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und Hormonen im jüngeren Lebensalter. Darüber hinaus zeigten jüngere KNF-Patienten mehr freie Axone im Tumor als ältere - ein möglicher Hinweis darauf, dass mit längerem Krankheitsverlauf zunehmend Axone degenerieren.

In KNF in denen CD90-positive Zellen (Fibroblasten) vorkamen und die ihrerseits viele Mastzellen enthielten, waren auch die Sox9-Indices erhöht. Möglicherweise wirken Mastzellen über andere Signalwege (Zytokine) aktivierend auf Sox9. Diese Korrelation könnte man so interpretieren, dass Mastzellen in KNF ein Tumorwachstum forcieren, was schon an anderer Stelle diskutiert worden ist (Staser et al. 2012). Die von Mastzellen getriggerte Immunreaktion könnte weiterhin zu einer Fibrosierung, also einem Anstieg an Fibroblasten, führen. Da sowohl die Anzahl an Mastzellen als auch der Nachweis von Fibroblasten im Tumor mit Sox9 positiv korrelieren, könnte die Beziehung zwischen den Fibroblasten und Sox9 auf die Mastzellen zurückzuführen sein. Eine direkte Wirkung der Fibroblasten auf Sox9 in Schwann-Zellen scheint eher unwahrscheinlich.

Weiterhin korrelierten ErbB2 und 3, da sie heterodimerisieren um Signale in das Zellinnere vermitteln zu können (Burden und Yarden 1997). Sie aktivieren als Wachstumsfaktoren mTor (Zhou et al. 2004; Rosner et al. 2008; Johannessen et al. 2005), welches sich wiederum über die Transkriptionsfaktoren Sox9 (Kim et al. 2012) und Pax7 auf die Proliferation auswirkt.

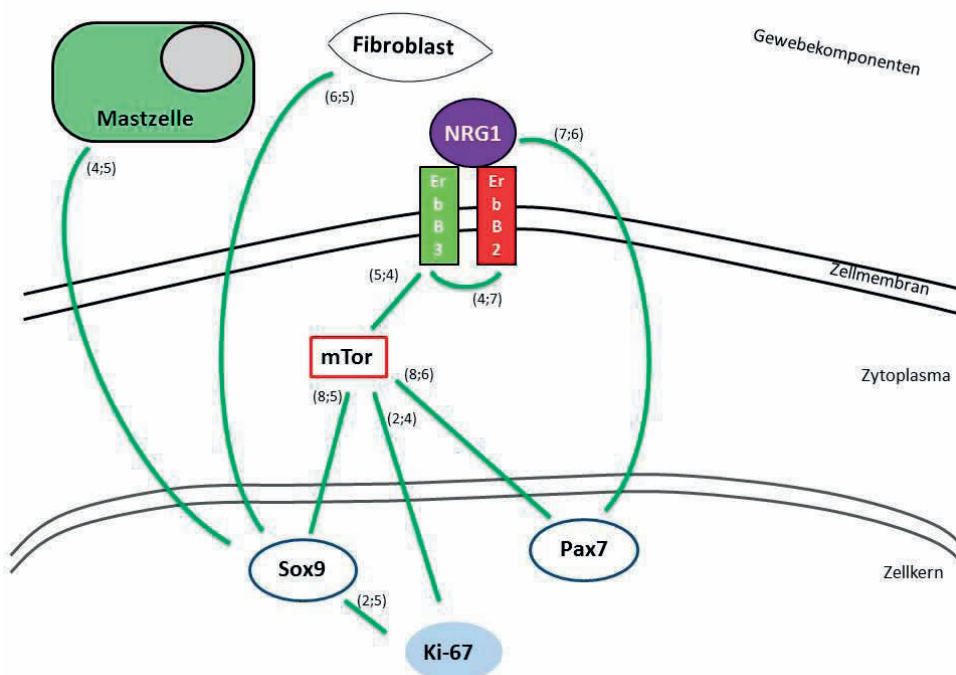


Abb. 95: Korrelationsbeziehungen in dermalen Neurofibromen

Bedingung $p < 0,05$; grüne Linien geben eine positive Korrelation an; die Zahlen neben den grünen Linien verweisen auf die Position der Korrelations- und Signifikanzangaben (Spalte/Zeile) in der Tabelle 7, Seite 120

Diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome

Die für diffuse und plexiform-diffuse NF berechneten Korrelationsbeziehungen zwischen der Anzahl an Mastzellen und der an Axonen, dem Vorkommen von Fibroblasten, ErbB3,

CD44, pMEK, Rho, den mTor-, Sox9-, Pax7- und Ki-67-Indices sind in Abb. 96 graphisch dargestellt.

In D/PNF, die viele Mastzellen enthielten, kamen auch häufiger CD90-positive Zellen (Fibroblasten) vor. Das könnte auf den gleichen Mechanismus, wie bei den KNF beschrieben, hinweisen. Mastzellen verursachen Entzündungsreaktionen, in deren Folge es zu einer Fibrosierung und einem Anstieg an Fibroblasten kommt.

D/PNF mit einer hohen Proliferation (Ki-67-Indices) enthielten häufiger CD90-positive Zellen (Fibroblasten). Da auch der Mastzellgehalt und das Vorkommen von Fibroblasten korrelierte und der Mastzellgehalt über mTor mit Ki-67 korrelierte, könnte die Korrelation des Vorkommen von Fibroblasten mit Ki-67 möglicherweise rechnerisch ohne inhaltliche Bedeutung entstehen.

Die weiteren Korrelationen weisen auf Signalwege hin, die z. T. schon bei den KNF beschrieben wurden. ErbB3 aktiviert pMEK und mTor (Zhou et al. 2004; Johannessen et al. 2005; Rosner et al. 2008), die die Zellproliferation (Berridge 2012; Hsieh et al. 2012) und damit den Anstieg des Ki-67-Proteins verursachen. Darüber hinaus interagieren mTor und pMEK (Yamnik und Holz 2010; Endo et al. 2013) und beeinflussen den Entwicklungsfaktor Sox9 (Kim et al. 2012) und mTor zusätzlich Pax7. Sox9 und Pax7 unterstützen als Transkriptionsfaktoren die Proliferation (Ki-67). CD44 wirkt zusammen mit ErbB3 (Riddle et al. 2010) und interagiert mit Rho, welches die Umgestaltung des Zytoskeletts reguliert (Vallée et al. 2012). Dieser Prozess ist bei der Zellbewegung und Infiltration, die u. a. durch CD44 vermittelt wird (Su et al. 2003), unerlässlich.

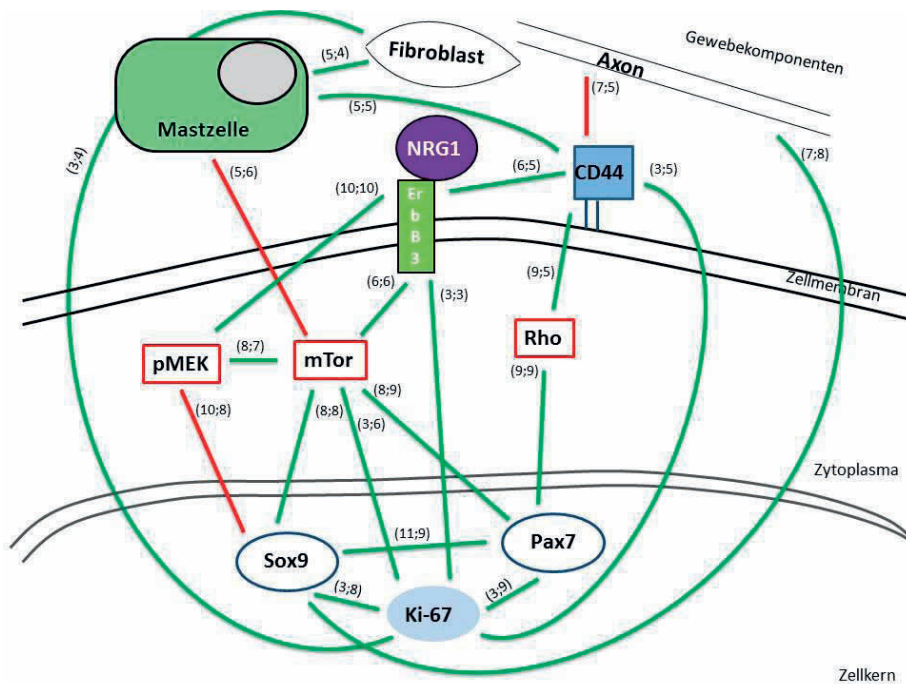


Abb. 96: Korrelationsbeziehungen in diffusen und plexiform-diffusen Neurofibromen

Bedingung $p < 0,05$; grüne Linien geben eine positive Korrelation an, rote Linien eine negative; die Zahlen neben den grünen und roten Linien verweisen auf die Position der Korrelations- und Signifikanzangaben (Spalte/Zeile) in der Tabelle 9, Seite 122

Plexiforme Neurofibrome

In plexiformen Neurofibromen, die vermehrt Mastzellen enthielten, kamen weniger proliferationsaktivierende Moleküle (NRG1, ErbB3, pMEK, mTor) vor. CD44 als infiltrativ wirkendes Oberflächenprotein korrelierte negativ mit der Mastzellendichte. Die Mastzellen scheinen also hier der Tumorphorprogression entgegenzuwirken. Bei den vermutlich von den PNFs abgeleiteten D/PNF zeigten sich ähnliche Verhältnisse. Dort korrelierte zwar die Anzahl von Mastzellen positiv mit der Expression von CD44, jedoch negativ mit den mTor-Indices. Somit scheinen Mastzellen in beiden Subtypen ähnliche Aufgaben zu übernehmen, auch wenn sie in den PNF stärker wirken.

Darüber hinaus stellen sich in den PNF dieselben proliferationsinduzierenden Korrelationsbeziehungen wie in den vorangegangenen Subtypen dar. ErbB3 aktiviert mTor (Zhou et al. 2004; Johannessen et al. 2005; Rosner et al. 2008), welches wiederum die Transkriptionsfaktoren Sox9 (Kim et al. 2012) und Pax7 aktiviert. mTor (Yamnik und Holz 2010; Endo et al. 2013) und Rho interagieren mit pMEK und wirken alle zusammen auf Pax7.

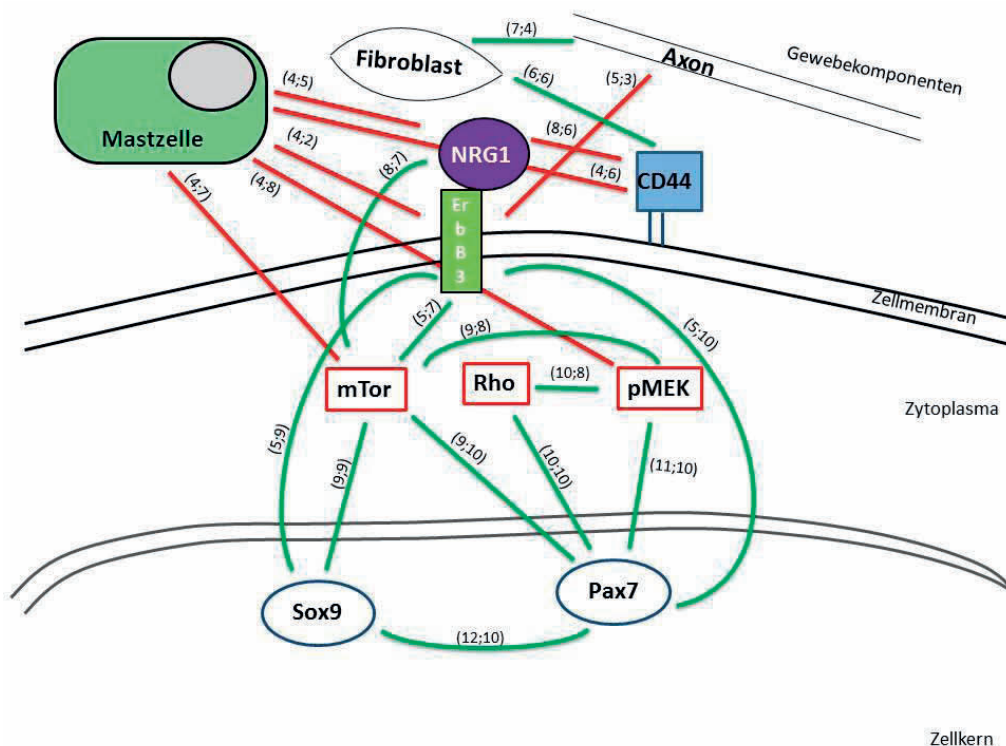


Abb. 97: Korrelationsbeziehungen in plexiformen Neurofibromen

Bedingung $p < 0,05$; grüne Linien geben eine positive Korrelation an, rote Linien eine negative; die Zahlen neben den grünen und roten Linien verweisen auf die Position der Korrelations- und Signifikanzangaben (Spalte/Zeile) in der Tabelle 8, Seite 121

Maligne periphere Nervenscheidentumore

In MPNST mit CD90-positiven Zellen waren die mTor-Indices erhöht. Da CD90 vielfach auch in Zellen mesenchymaler Gewebe exprimiert wird, wäre zu erwägen, ob in MPNST die Tumorzellen CD90 exprimierten und es sich nicht um Fibroblasten handelt.

In MPNST mit vielen Mastzellen waren weniger Mitosen vorhanden. Demnach zeigten Mastzellen auch in diesem Tumorsubtyp eine antiproliferative Wirkung, auch wenn die genauen Mechanismen in dieser Studie nicht geklärt werden können.

Pax7 und ErbB2 korrelierten, wie bei anderen Tumorsubtypen, mit der Proliferation (Mitosen und Ki-67-Indices), und CD44 wirkte mit Rho und pMEK zusammen. Die Graphik zeigt, dass zwischen intra- und extrazellulären Variablen keine Korrelationen auftreten, also die Tumorzellen weitgehend abgekoppelt vom umliegenden Milieu erscheinen. Die proliferationsaktivierenden Signalwege, die in den anderen Subtypen noch aktiv waren, scheinen bei den MPNST keine große Rolle zu spielen.

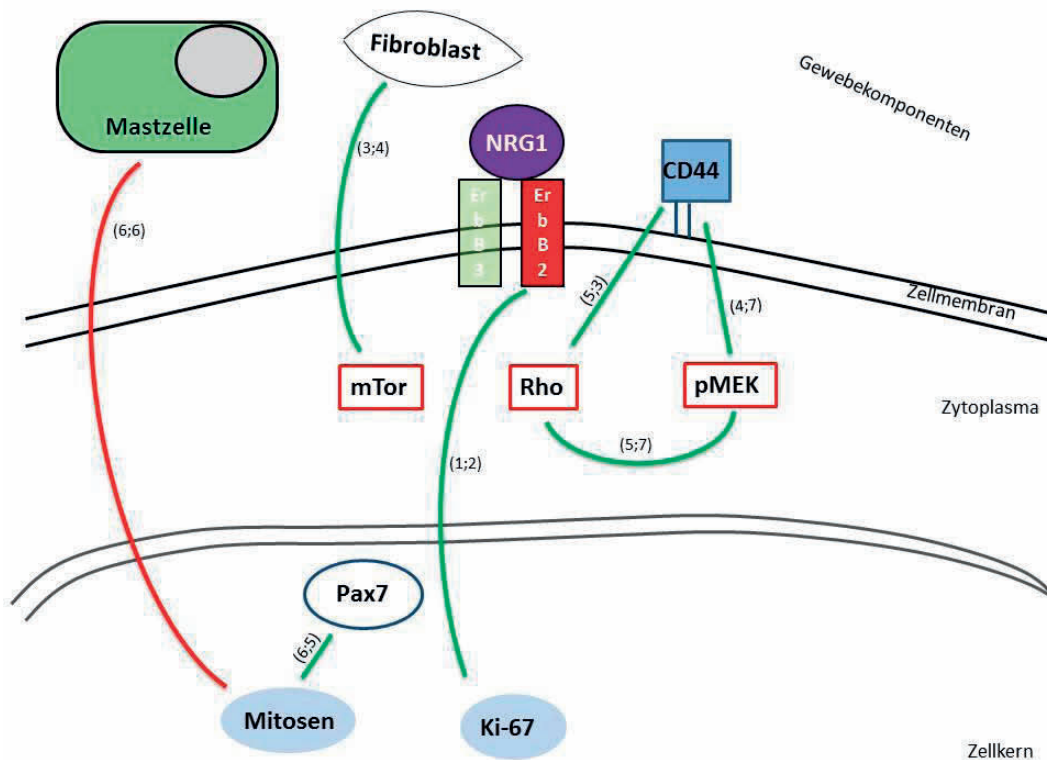


Abb. 98: Korrelationsbeziehungen in malignen peripheren Nervenscheidentumoren

Bedingung $p < 0,05$; grüne Linien geben eine positive Korrelation an, rote Linien eine negative; die Zahlen neben den grünen und roten Linien verweisen auf die Position der Korrelations- und Signifikanzangaben (Spalte/Zeile) in der Tabelle 10, Seite 123

Fazit

Für die Diskussion ob Mastzellen die Tumورprogression in Neurofibromen unterstützen, ergab die vorliegende Arbeit teils widersprüchliche Ergebnisse. Die im Ergebnisteil beschriebenen Resultate, dass Mastzellen nicht zur Tumورprogression beitragen, wurden in der Darstellung der Korrelationsberechnungen bestätigt (Abb. 96 - Abb. 98). Man kann sogar davon ausgehen, dass sie einen Beitrag zur Tumorbekämpfung leisten. In D/PNF, PNF und MPNST korrelierten sie jeweils negativ mit Proliferationsmarkern. Nur in den KNF könnte man möglicherweise von einer Proliferation unterstützenden Wirkung der Mastzellen ausgehen, sofern sie nicht nur eine Fibroblastenproliferation initiieren.

In Bezug auf Signalwege zeigte sich in den gutartigen Neurofibromen (KNF, D/PNF, PNF) wiederholt die Verbindung von ErbB3 – mTor – Sox9/Pax7 (– Ki-67). Eine weitere Verknüpfung wurde sichtbar in den D/PNF und MPNST mit CD44 – Rho/MEK.

In dieser Auswertung wurde auch deutlich, dass zwischen den KNF, PNF und MPNST gewisse Unterschiede im Verhalten bestehen, die sich hier in der Darstellung von Korrelationsbeziehungen äußerten. PNF waren den D/PNF recht ähnlich, auch wenn die Auswertung sichtbar machte, dass in den PNF noch andere Signalwege als in den D/PNF aktiv waren. Die Annahme, dass D/PNF aus PNF entstehen, erscheint erneut sinnvoll, da

sich durch das Ausbrechen aus der Nervenscheide das Milieu im Tumor vollständig ändert und viele neue Signale auf die Tumorzellen einwirken.

Abschließend ist zu vermerken, dass das statistische Hilfsmittel der Korrelationsanalyse viele mögliche Beziehungen und Signalwege zwischen den untersuchten Molekülen aufgedeckt hat. Diese müssen jedoch in weiteren Untersuchungen auf ihre biologische Sinnhaftigkeit überprüft werden.

5.5 Ausblick

Im Vergleich caniner und NF1-assoziiierter humaner MPNST hat sich deutlich gezeigt, dass es sich um unterschiedliche Entitäten handelt, die nicht als Modell füreinander genutzt werden können. cMPNST verhielten sich weniger maligne als NF1-assoziierte hMPNST und zeigten auch ein anderes Expressionsmuster. Da sich sporadische hMPNST ebenfalls weniger bösartig als NF1-assoziierte hMPNST verhalten (Zou et al. 2009; Barnard et al. 2011), könnte man diese in einer weiteren Studie mit den cMPNST vergleichen. Möglicherweise stammen beide Tumoren jedoch auch von unterschiedlichen Ursprungszellen ab. Dann müsste dieser Ursprung weiter untersucht werden.

Die in dieser Studie erstellten Gradierungsansätze für cMPNST müssen auf ihre klinische Praktikabilität hin untersucht werden. Dafür müssen die Überlebensdaten der untersuchten Hunde und die Zeitdauer bis zur Tumorentfernung mit den Ergebnissen aus den Gradierungsansätzen verglichen werden.

Das saure Gliafaserprotein, der Nervenwachstumsfaktorrezeptor und Claudin-1 haben sich in dieser Studie als sensitiv für die Diagnose von cMPNST erwiesen. Wie spezifisch sie sind, muss jedoch noch in weiteren Untersuchungen differenzialdiagnostisch an Spindelzelltumoren, v. a. dem caninen Hämangioperizytom und Fibrosarkom, abgeklärt werden.

In dieser Studie wurden CD90 und EMA bzw. Claudin-1 als Fibroblasten- und perineuriale Marker verwendet. Alle drei zeigten keine hohe Spezifität bei den caninen Tumoren. Um daher aussagekräftige Äußerungen zu dem Anteil der verschiedenen Zellfraktionen machen zu können, müssten noch spezifische Immunmarker gefunden werden.

Auch beim Menschen war die Spezifität des Fibroblastenmarkers CD90 eingeschränkt. Daher könnten mit einem weiteren Marker, z. B. dem Fibroblasten-Oberflächeprotein (Hagel et al. 2012), die Untersuchungen wiederholt und die Ergebnisse mit denen der CD90-Färbung verglichen werden. Somit würde eine bessere Einschätzung der Größe der Fibroblastenfraktion gewonnen werden. Darüber hinaus könnte es von Nutzen sein,

molekularbiologische Methoden anzuwenden, um den exakten Gehalt von Fibroblasten und Perineurialzellen in humanen Neurofibromen zu quantifizieren.

Zu der Frage ob Mastzellen in humanen Neurofibromen als Promotor der Tumorentstehung und -progression agieren, wurden in dieser Arbeit weitere Hinweise gegen diese Rolle der Mastzellen gefunden. Die mittlere Anzahl von Mastzellen korrelierte nicht mit dem Malignitätsgrad der Neurofibrome und auch bei den weiterführenden Korrelationsberechnungen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Mastzellanzahl und den Faktoren des Tumorwachstums oder der Progression. Dennoch sollten weitere Studien folgen um diese Ergebnisse zu validieren.

Der ErbB2/3-Neuregulin-1-Signalweg scheint in plexiformen Neurofibromen eine wichtige Rolle zu spielen. Seine Funktion als möglicher Faktor in der Progression zum MPNST sollte in weiteren Studien untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Faktoren der Tumorbilogie in peripheren Nervenscheidentumoren: Eine vergleichende immunhistochemische Studie bei Mensch und Hund

Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, sporadische canine maligne periphere Nervenscheidentumore (cMPNST) mit NF1-assoziierten humanen malignen peripheren Nervenscheidentumoren anhand verschiedener Kriterien (Klinik, Histomorphologie, Verhalten, Immunreaktivität) zu vergleichen. Darüber hinaus sollte die zelluläre Zusammensetzung (Schwann-Zellen, Fibroblasten, Perineurialzellen, Mastzellen) der humanen peripheren Nervenscheidentumore (PNST) und cMPNST quantifiziert und ihre mögliche Rolle für die Tumorprogression untersucht werden. Ferner war ein Ziel, diagnostische Immunmarker (GFAP, NGFR, Claudin-1, Periaxin, α -SMA) auf ihre Spezifität für cMPNST hin zu untersuchen. Des Weiteren wurden humane PNST in verschiedene Subgruppen eingeteilt. Deren Existenz sollte nachgewiesen und Hinweise auf ihre Histogenese sollten gesammelt werden. Letztendlich war es ein Ziel, zelluläre Signalwege in humanen NF1-assoziierten Tumoren zu untersuchen und ihren Beitrag zur Tumorbilogie aufzuzeigen.

Es wurden 75 canine MPNST aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen und 520 humane PNST aus dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf immunhistochemisch untersucht. Aus den humanen Proben wurden 11 *Tissue-Microarrays* (TMA) hergestellt, die caninen Proben wurden einzeln gefärbt.

Im Vergleich der humanen und caninen MPNST wurden durchgängig Unterschiede aufgedeckt. Die humanen MPNST verhielten sich maligner als die cMPNST und auch in Bezug auf klinische, histologische und immunhistochemische Parameter wichen beide Entitäten deutlich voneinander ab. Die abschließende Bewertung kommt zu dem Ergebnis, dass cMPNST kein Forschungsmodell für NF1-assoziierte hMPNST sein können.

Humane periphere Nervenscheidentumore sind Schwann-Zell-Tumore und keine zusammengesetzten, so genannte *compound*-Tumore, wie vielfach in der Literatur angegeben. Die anderen Zellfraktionen (Fibroblasten, Perineurialzellen und Mastzellen) machen nur einen kleinen Anteil an der Gesamtzellzahl aus. Ferner tragen Mastzellen nicht zur malignen Progression der plexiformen Neurofibrome zum malignen peripheren Nervenscheidentumor bei.

Für die Diagnose von caninen MPNST wurde von den Immunmarkern GFAP, NGFR und Claudin-1 eine sehr gute bis gute Sensitivität nachgewiesen. Ferner wurde in dieser Studie gezeigt, dass cMPNST auch eine Immunreaktivität für α -SMA, ebenso wie hMPNST mit divergenter Differenzierung, zeigen können. Die Spezifität der besagten Marker muss noch an anderer Stelle an caninen Hämangioperizytomen und Fibrosarkomen, den Differenzialdiagnosen von cMPNST, untersucht werden.

Humane NF1-assoziierte PNST können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, das dermale Neurofibrom, das lebenslang gutartig bleibt und das plexiforme Neurofibrom (PNF). Das PNF könnte sich entweder zum bösartigen MPNST weiter entwickeln oder gutartig bleiben und sich bei Auflösung des Perineuriums über die Zwischenform des plexiform-diffusen zum diffusen Neurofibrom weiter entwickeln.

In Bezug auf die zellulären Signalwege in humanen PNST leisten sowohl Wachstumsfaktorrezeptoren, Transkriptionsfaktoren als auch der Neurofibromin-Signalweg einen Beitrag zur Tumorbilogie. Für die maligne Progression der plexiformen Neurofibrome zum MPNST scheint der NRG1–ErbB2/3-Signalweg eine besonders wichtige Rolle zu spielen. Weitere Untersuchungen müssen folgen um diese Ergebnisse zu verifizieren.

7 Summary

Factors of tumour biology in peripheral nerve sheath tumours: a comparative immunohistochemical study in human and dog

The aim of this dissertation was to compare sporadic canine malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNST) and NF1-associated human MPNST along different criteria (clinic, histomorphology, behaviour, immunoreactivity). Furthermore, we wanted to quantify the cellular components (schwann cells, fibroblast, perineurial and mast cells) of human peripheral nerve sheath tumours (PNST) and canine MPNST and analyse their potential role in tumour progression. Moreover one objective was to investigate diagnostic immunomarkers (GFAP, NGFR, claudin-1, Periaxin, α -SMA) with regards to their specificity for cMPNST. In addition, human PNST were sorted into subgroups. We aimed at proving their existence and collect hints for their histogenesis. Finally, cellular signalling pathways in human NF1-associated tumours were investigated in order to show their contribution to tumour biology.

75 canine MPNST samples of the Institute of Veterinary Pathology of the Justus-Liebig-University in Gießen and 520 human PNST samples of the Institute of Neuropathology of the Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf were examined immunohistochemically. 11 Tissue Microarrays (TMA) were produced from the human specimens, the canine samples were stained individually.

The comparison of the human and canine MPNST revealed a number of differences. The human MPNST behaved more malignant than the cMPNST and also in terms of clinical, histological and immunohistochemical parameters both entities differed clearly. The final assessment hence concludes that cMPNST are not suitable as a research model for NF1-associated MPNST.

Human peripheral nerve sheath tumours are schwann cell tumours and no so-called compound-tumours. Other cell fractions (fibroblasts, perineurial and mast cells) constitute just a small portion of the overall cell count. Furthermore, mast cells do not contribute towards the malignant progression of plexiform neurofibromas into malignant peripheral nerve sheath tumours.

For the diagnosis of canine malignant peripheral nerve sheath tumours (cMPNST) the immunomarkers GFAP, NGFR and Claudin-1 showed a very good or good sensitivity. Moreover, in this study it was shown that cMPNST can be immunoreactive for α -SMA. The specificity of this marker will have to be investigated in further studies with hemangioperizytoma and fibrosarcoma, the differential diagnosis of cMPNST.

Human NF1-associated PNST can be classified into two main subgroups: The dermal neurofibroma which remains benign lifelong, and the plexiform neurofibroma. The plexiform neurofibroma could progress into a malignant peripheral nerve sheath tumour or stay benign and could evolve into a diffuse neurofibroma via the intermediate form of the plexiform-diffuse neurofibroma.

Growth factor receptors, transcriptional factors as well as the neurofibromin-signalling pathways contribute to the tumour biology of PNST. The signalling path of NRG1-ErbB2/3 seems to play a central role for the malignant progression of plexiform neurofibromas into MPNST. Further studies still have to confirm these results.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kutanen Neurofibrom, H. E.	8
Abb. 2: Plexiformes Neurofibrom, H. E.	9
Abb. 3: Diffuses Neurofibrom, H. E.	10
Abb. 4: Plexiform-diffuses Neurofibrom, H. E.	11
Abb. 5: Maligner peripherer Nervenscheidentumor, H. E.	12
Abb. 6: Die 8 Kennzeichen der Tumorentstehung, modifiziert nach Kumar et al. (2015a)	20
Abb. 7: Signalwege von Wachstumsfaktorrezeptoren, modifiziert nach Doherty et al. (2008)	24
Abb. 8: Neurofibromin-Signalweg, modifiziert nach Dobashi et al. (2009), Gottfried et al. (2010), Barkan et al. (2011), Berridge (2012)	28
Abb. 9: Beispielbild Boxplot	48
Abb. 10: Säulendiagramm; mittleres Alter in humanen PNST	50
Abb. 11: Säulendiagramm; Tumorlokalisation in humanen PNST	51
Abb. 12: Säulendiagramm; Vergleich der Tumorlokalisation in hMPNST und cMPNST	54
Abb. 13: Canine maligne periphere Nervenscheidentumore, Wachstumsmuster-1, H.E.	56
Abb. 14: Canine maligne periphere Nervenscheidentumore, Wachstumsmuster-2, H.E.	57
Abb. 15: Canine maligne periphere Nervenscheidentumore, Wachstumsmuster-3, H.E.	58
Abb. 16: S100-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren	59
Abb. 17: Boxplot; S100-Index in humanen PNST	60
Abb. 18: EMA-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	61
Abb. 19: Säulendiagramm; EMA-Expression in humanen PNST	62
Abb. 20: CD90-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	63
Abb. 21: Säulendiagramm; CD90-Expression in humanen PNST	64
Abb. 22: Mastzellen in humanen peripheren Nervenscheidentumoren	64
Abb. 23: Boxplot; Anzahl Mastzellen in humanen PNST.....	65
Abb. 24: Neurofilament-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren	66
Abb. 25: Säulendiagramm; Neurofilament-Expression in humanen PNST	67
Abb. 26: Boxplot; Anzahl Neurofilament-positive Axone in humanen PNST.....	67
Abb. 27: Periaxin-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren	69
Abb. 28: Säulendiagramm; Periaxin-Expression in humanen PNST.....	70
Abb. 29: α -SMA-Expression in plexiformen Neurofibromen	71
Abb. 30: GFAP-Expression in peripheren Nervenscheidentumoren.....	71
Abb. 31: NGFR-Expression in peripheren Nervenscheidentumoren	72
Abb. 32: Säulendiagramm; NGFR-Expression in humanen PNST.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abb. 33: S100-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren	74
Abb. 34: Claudin-1-Expression in caninen Nerven	75
Abb. 35: Claudin-1-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren.....	76
Abb. 36: CD90-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren	77
Abb. 37: Mastzelltryptase-Expression in malignen peripheren Nervenscheidentumoren.....	78
Abb. 38: Säulendiagramm; Mastzellen in cMPNST	78
Abb. 39: Neurofilament-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren ...	79
Abb. 40: Periaxin-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren	80
Abb. 41: α -SMA-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren	81
Abb. 42: Säulendiagramm; α -SMA-Expression und Tumorvariable in cMPNST	82
Abb. 43: GFAP in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren	83
Abb. 44: Doppelfärbung zur Darstellung von GFAP (rot) und α -SMA (braun) in cMPNST.....	83
Abb. 45: Doppelfärbung zur Darstellung von GFAP (rot) und α -SMA (braun) in cMPNST.....	84
Abb. 46: NGFR-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren.....	85
Abb. 47: Säulendiagramm; Vergleich S100-Expression in hMPNST und cMPNST	86
Abb. 48: Säulendiagramm; Vergleich CD90-Expression in hMPNST und cMPNST.....	87
Abb. 49: Boxplot; Vergleich Mastzellanzahl in hMPNST und cMPNST.....	88
Abb. 50: Säulendiagramm; Vergleich Neurofilament-Expression in hMPNST und cMPNST	88
Abb. 51: Boxplot; Vergleich Neurofilament-positive Axone in hMPNST und cMPNST	89
Abb. 52: Säulendiagramm; Vergleich Periaxin-Expression in hMPNST und cMPNST	90
Abb. 53: Säulendiagramm; Vergleich GFAP-Expression in hMPNST und cMPNST	90
Abb. 54: Säulendiagramm; Vergleich NGFR-Expression in hMPNST und cMPNST	91
Abb. 55: Proliferationsmarker Ki-67 in humanen peripheren Nervenscheidentumoren	92
Abb. 56: Boxplot; Ki-67-Index in humanen PNST	92
Abb. 57: Boxplot; Zellularität in humanen PNST	93
Abb. 58: ErbB2-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	94
Abb. 59: Säulendiagramm; ErbB2-Expression in humanen PNST	95
Abb. 60: ErbB3-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	96
Abb. 61: Säulendiagramm; ErbB3-Expression in humanen PNST	97
Abb. 62: Neuregulin-1-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren	98
Abb. 63: Säulendiagramm; Neuregulin-1-Expression in humanen PNST	99
Abb. 64: Boxplot; Anzahl Axone und Neuregulin-1-Expression	100
Abb. 65: CD44-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	101
Abb. 66: Säulendiagramm; CD44-Expression in humanen PNST	102

Abb. 67: Säulendiagramm; CD44-Expression in intraneural und diffus wachsenden humanen Nervenscheidentumoren	102
Abb. 68: mTor-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	103
Abb. 69: Boxplot; A: mTor-Index in humanen PNST; B: mTor_vs_%S100-Index in humanen Neurofibromen	104
Abb. 70: Rho-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	105
Abb. 71: Säulendiagramm: Rho-Expression in humanen PNST.....	106
Abb. 72: MEK-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	107
Abb. 73: Säulendiagramm; MEK-Expression in humanen PNST	107
Abb. 74: pMEK in humanen peripheren Nervenscheidentumoren	108
Abb. 75: Säulendiagramm; pMEK-Expression in humanen PNST	109
Abb. 76: Sox9-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	110
Abb. 77: Boxplot; A: Sox9-Index in humanen PNST; B: Sox9_vs_%S100-Index in humanen Neurofibromen	111
Abb. 78: Pax7-Expression in humanen peripheren Nervenscheidentumoren.....	112
Abb. 79: Boxplot; A: Pax7-Index in humanen PNST; B: Pax7_vs_%S100-Index in humanen Neurofibromen	113
Abb. 80: Ki-67-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren.....	114
Abb. 81: Säulendiagramm; Ki-67-Index in cMPNST	114
Abb. 82: Neuregulin-1-Expression in caninen malignen peripheren Nervenscheidentumoren....	115
Abb. 83: Boxplot; Vergleich Ki-67-Indices in hMPNST und cMPNST.....	116
Abb. 84: Boxplot; Vergleich Zellularität in hMPNST und cMPNST	117
Abb. 85: Säulendiagramm; Vergleich NRG1-Expression in humanen PNST und cMPNST	118
Abb. 86: Darstellung der Suche nach Klassengrenzen für Mitosen bei cMPNST	124
Abb. 87: Suche nach Klassengrenzen für Ki-67-Indices bei cMPNST	125
Abb. 88: Kurvendiagramm; Summenscore-1 in cMPNST.....	126
Abb. 89: Liniendiagramm; Summenscore-2 in cMPNST.....	127
Abb. 90: Balkendiagramm; Vergleich der Gradingstrategien in cMPNST	128
Abb. 91: Säulendiagramm; Vergleich FNCLCC-Gradierung in hMPNST und cMPNST.....	130
Abb. 92: Säulendiagramm; Vergleich Nekrosen in hMPNST und cMPNST	131
Abb. 93: Boxplot; Vergleich Mitoseanzahl in hMPNST und cMPNST.....	132
Abb. 94: Mögliche Histogenese humane Neurofibrome	137
Abb. 95: Korrelationsbeziehungen in dermalen Neurofibromen	161
Abb. 96: Korrelationsbeziehungen in diffusen und plexiform-diffusen Neurofibromen.....	163
Abb. 97: Korrelationsbeziehungen in plexiformen Neurofibromen	164

Abb. 98: Korrelationsbeziehungen in malignen peripheren Nervenscheidentumoren.....	165
--	-----

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien der Neurofibromatose Typ 1	6
Tabelle 2: Verwendete Antikörper	35
Tabelle 3: Auswertungsmethoden immunhistochemischer Färbungen	41
Tabelle 4 : FNCLCC-Grading, nach Fletcher et al. (2002)	46
Tabelle 5: Übersicht Rassen cMPNST	53
Tabelle 6: Übersicht der gefärbten Strukturen der Tumorzellen je Antikörper	59
Tabelle 7: Korrelationstabelle dermale Neurofibrome	120
Tabelle 8: Korrelationstabelle plexiforme Neurofibrome	121
Tabelle 9: Korrelationstabelle diffuse und plexiform-diffuse Neurofibrome	122
Tabelle 10: Korrelationstabelle MPNST	123
Tabelle 11: Übersicht Malignitätseinteilung nach Gradingstrategie 1 und 2.....	127
Tabelle 12: Vergleich der Gradingstrategien 1 und 2	128
Tabelle 13: Vergleich Gradingstrategie 1 und 2 mit FNCLCC	129
Tabelle 14: Vergleich Gradingstrategie 1 und 2 mit Wachstumsmuster	130
Tabelle 15: Evaluierungsschemata der verwendeten Antikörper.....	200
Tabelle 16: Codeplan zu Rohdaten canine periphere Nervenscheidentumore	202
Tabelle 17: Rohdaten caniner peripherer Nervenscheidentumore	203
Tabelle 18: Codeplan zu Rohdaten humane periphere Nervenscheidentumore	204
Tabelle 19: Rhodaten humane periphere Nervenscheidentumore	206

10 Literaturverzeichnis

- Ambrosini, G.; Cheema, H. S.; Seelman, S.; Teed, A.; Sambol, E. B.; Singer, S.; Schwartz, G. K. (2008): Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells. In: *Mol Cancer Ther* 7 (4), S. 890–896.
- Auer-Grumbach, M. (2008): Hereditary sensory neuropathy type I. In: *Orphanet J Rare Dis* 3, S. 7.
- Avallone, G.; Boracchi, P.; Stefanello, D.; Ferrari, R.; Rebughini, A.; Roccabianca, P. (2013): Canine perivascular wall tumors: high prognostic impact of site, depth, and completeness of margins. In: *Vet Pathol* 51 (4), S. 713–721.
- Avallone, G.; Helmbold, P.; Caniatti, M.; Stefanello, D.; Nayak, R. C.; Roccabianca, P. (2007): The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. In: *Vet Pathol* 44 (5), S. 607–620.
- Baba, A. I.; Cătoi, C. (2007): Mesenchymal tissue tumors. In: Alecsandru I. Baba und Cornel Cătoi (Hg.): *Comparative oncology*, Chapter 5, S. 1–84. Buckarest: The Publishing House of the Romanian Academy.
- Bao, J.; Wolpowitz, D.; Role, L. W.; Talmage, D. A. (2003): Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. In: *J Cell Biol* 161 (6), S. 1133–1141.
- Barboni, E.; Gormley, A. M.; Pliego Rivero, F B; Vidal, M.; Morris, R. J. (1991): Activation of T lymphocytes by cross-linking of glycopospholipid-anchored Thy-1 mobilizes separate pools of intracellular second messengers to those induced by the antigen-receptor/CD3 complex. In: *Immunology* 72 (4), S. 457–463.
- Barkan, B.; Kloog, Y.; Ehrlich, M. (2011): Phenotypic reversion of invasive neurofibromin-deficient schwannoma by FTS: Ras inhibition reduces BMP4/Erk/Smad signaling. In: *Mol Cancer Ther* 10 (8), S. 1317–1326.
- Barnard, Z. R.; Agarwalla, P. K.; Jeyaretna, D. S.; Farrell, C. J.; Gerstner, E. R.; Di Tian; Curry, W. T. (2011): Sporadic primary malignant intracerebral nerve sheath tumors: case report and literature review. In: *J Neurooncol* 104 (2), S. 605–610.
- Basu, T. N.; Gutmann, D. H.; Fletcher, J. A.; Glover, T. W.; Collins, F. S.; Downward, J. (1992): Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. In: *Nature* 356 (6371), S. 713–715.

- Berger, P.; Tunon-De-Lara, J. M.; Savineau, J. P.; Marthan, R. (2001): Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. In: *J Appl Physiol* 91 (2), S. 995–1003.
- Bergmann, W.; Burgener, I. A.; Roccabianca, P.; Rytz, U.; Welle, M. (2009): Primary splenic peripheral nerve sheath tumour in a dog. In: *J Comp Pathol* 141 (2-3), S. 195–198.
- Berridge, M. J. (2012): Cell signalling biology: module 2 - cell signalling pathways. In: *Biochem J*.
- Birchmeier, C. (2009): ErbB receptors and the development of the nervous system. In: *Exp Cell Res* 315 (4), S. 611–618.
- Bonnin, J. M.; Rubinstein, L. J. (1984): Immunohistochemistry of central nervous system tumors. Its contributions to neurosurgical diagnosis. In: *J Neurosurg* 60 (6), S. 1121–1133.
- Bouquet, C.; Ravaille-Veron, M.; Probst, F.; Nothias, F. (2007): MAP1B coordinates microtubule and actin filament remodeling in adult mouse schwann cell tips and DRG neuron growth cones. In: *Mol Cell Neurosci* 36 (2), S. 235–247.
- Bowles, J.; Schepers, G.; Koopman, P. (2000): Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. In: *Dev Biol* 227 (2), S. 239–255.
- Boyd, K. P.; Korf, B. R.; Theos, A. (2009): Neurofibromatosis type 1. In: *J Am Acad Dermatol* 61 (1), S. 1–14.
- Brower, A.; Salamat, S.; Crawford, J.; Manley, P. (2005): Unilateral limb enlargement in a dog with a malignant peripheral nerve sheath tumor. In: *Vet Pathol* 42 (3), S. 353–356.
- Buckingham, M.; Relaix, F. (2007): The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, S. 645–673.
- Buonanno, A.; Fischbach, G. D. (2001): Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. In: *Curr Opin Neurobiol* 11 (3), S. 287–296.
- Burden, S.; Yarden, Y. (1997): Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. In: *Neuron* 18 (6), S. 847–855.
- Burger, P. C.; Scheithauer, B. W. (2012): Neoplastic: familial tumor syndroms. In: Peter C. Burger und Bernd W. Scheithauer (Hg.): Diagnostic pathology. Neuropathology, Chapter 5, S. 1–7. 1st Edition. Salt Lake City, Utah: Amirsys.

- Cairns, J. A.; Walls, A. F. (1996): Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. In: *J Immunol* 156 (1), S. 275–283.
- Cairns, J. A.; Walls, A. F. (1997): Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. In: *J Clin Invest* 99 (6), S. 1313–1321. DOI: 10.1172/JCI119290.
- Carbonnelle-Puscian, A.; Vidal, V.; Laurendeau, I.; Valeyrie-Allanore, L.; Vidaud, D.; Bièche, I. et al. (2011): SOX9 expression increases with malignant potential in tumors from patients with neurofibromatosis 1 and is not correlated to desert hedgehog. In: *Hum Pathol* 42 (3), S. 434–443.
- Carroll, S. L. (2012): Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of schwann cell neoplasms. In: Werner Paulus (Hg.): *Acta Neuropathologica*, Bd. 123: Springer, S. 321–348.
- Carroll, S. L.; Stonecypher, M. S. (2005): Tumor suppressor mutations and growth factor signaling in the pathogenesis of NF1-associated peripheral nerve sheath tumors: II. The role of dysregulated growth factor signaling. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (1), S. 1–9.
- Chen, S.; Velardez, M. O.; Warot, X.; Yu, Z.-X.; Miller, S. J.; Cros, D.; Corfas, G. (2006): Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. In: *J Neurosci* 26 (12), S. 3079–3086.
- Chen, Y.; Zeng, J.; Cen, L.; Wang, X.; Yao, G.; Wang, W. et al. (2009): Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. In: *J Int Med Res* 37 (2), S. 281–288.
- Cheng, C.-J.; Ye, X.-c.; Vakar-Lopez, F.; Kim, J.; Tu, S.-M.; Chen, D.-T. et al. (2007): Bone microenvironment and androgen status modulate subcellular localization of ErbB3 in prostate cancer cells. In: *Mol Cancer Res* 5 (7), S. 675–684.
- Cheung, M.; Briscoe, J. (2003): Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. In: *Development* 130 (23), S. 5681–5693.
- Chijiwa, K.; Uchida, K.; Tateyama, S. (2004): Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. In: *Vet Pathol* 41 (4), S. 307–318.
- Corfas, G.; Velardez, M. O.; Ko, C.-P.; Ratner, N.; Peles, E. (2004): Mechanisms and roles of axon-schwann cell interactions. In: *J Neurosci* 24 (42), S. 9250–9260.
- Cornelis, I.; Chiers, K.; Kramer, M.; Ducatelle, R.; D'Herde, K.; van Ham, L. (2009): Expression of claudin-1 in a canine perineurioma. In: *J Comp Pathol* 141 (4), S. 274.

- Corson, L. B.; Yamanaka, Y.; Lai, K.-M. V.; Rossant, J. (2003): Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. In: *Development* 130 (19), S. 4527–4537.
- Dang, I.; DeVries, G. H. (2011): Aberrant cAMP metabolism in NF1 malignant peripheral nerve sheath tumor cells. In: *Neurochem Res* 36 (9), S. 1697–1705.
- Dasgupta, B.; Dugan, L. L.; Gutmann, D. H. (2003): The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. In: *J Neurosci* 23 (26), S. 8949–8954.
- Dasgupta, B.; Yi, Y.; Chen, D. Y.; Weber, J. D.; Gutmann, D. H. (2005): Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. In: *Cancer Res* 65 (7), S. 2755–2760.
- DeClue, J. E.; Papageorge, A. G.; Fletcher, J. A.; Diehl, S. R.; Ratner, N.; Vass, W. C.; Lowy, D. R. (1992): Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. In: *Cell* 69 (2), S. 265–273.
- Dennis, M. M.; McSporran, K. D.; Bacon, N. J.; Schulman, F. Y.; Foster, R. A.; Powers, B. E. (2011): Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. In: *Vet Pathol* 48 (1), S. 73–84.
- Dobashi, Y.; Suzuki, S.; Sato, E.; Hamada, Y.; Yanagawa, T.; Ooi, A. (2009): EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. In: *Mod Pathol* 22 (10), S. 1328–1340.
- Dobashi, Y.; Suzuki, S.; Sugawara, H.; Ooi, A. (2007): Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors. In: *Hum Pathol* 38 (6), S. 914–925.
- Doggen, K.; Ray, L.; Mathieu, M.; McEntee, K.; Lemmens, K.; De Keulenaer, G. W. (2009): Ventricular ErbB2/ErbB4 activation and downstream signaling in pacing-induced heart failure. In: *J Mol Cell Cardiol* 46 (1), S. 33–38.
- Doherty, J. K.; Ongkeko, W.; Crawley, B.; Andalibi, A.; Ryan, A. F. (2008): ErbB and Nrg: potential molecular targets for vestibular schwannoma pharmacotherapy. In: *Otol Neurotol* 29 (1), S. 50–57.
- Donato, R. (2001): S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. In: *Int J Biochem Cell Biol* 33 (7), S. 637–668.

- Donato, R.; Cannon, B. R.; Sorci, G.; Riuzzi, F.; Hsu, K.; Weber, D. J.; Geczy, C. L. (2013): Functions of S100 proteins. In: *Curr Mol Med* 13 (1), S. 24–57.
- Earp, H. S.; Calvo, B. F.; Sartor, C. I. (2003): The EGF receptor family - multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. In: *Trans Am Clin Climatol Assoc* 114, S. 315-33; discussion 333-4.
- Eckert, J. M.; Byer, S. J.; Clodfelder-Miller, B. J.; Carroll, S. L. (2009): Neuregulin-1 β and neuregulin-1 α differentially affect the migration and invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor cells. In: *Glia* 57 (14), S. 1501–1520.
- Endo, M.; Yamamoto, H.; Setsu, N.; Kohashi, K.; Takahashi, Y.; Ishii, T. et al. (2013): Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. In: *Clin Cancer Res* 19 (2), S. 450–461.
- Fernandez-Valle, C.; Gorman, D.; Gomez, A. M.; Bunge, M. B. (1997): Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with schwann cell myelination. In: *J Neurosci* 17 (1), S. 241–250.
- Ferner, R. E.; Gutmann, D. H. (2002): International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. In: *Cancer Res* 62 (5), S. 1573–1577.
- Ferner, R. E.; O'Doherty, M. J. (2002): Neurofibroma and schwannoma. In: *Curr Opin Neurol* 15 (6), S. 679–684.
- Ferrari, A.; Bisogno, G.; Macaluso, A.; Casanova, M.; D'Angelo, P.; Pierani, P. et al. (2007): Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. In: *Cancer* 109 (7), S. 1406–1412.
- Fletcher, C. D.; Rydholm, A.; Singer, S.; Sundaram, M.; Coindre, J. M. (2002): Soft tissue tumors. Epidemiology, clinical features, histopathological typing and grading. In: C. Fletcher, K. K. Unni und F. Mertens (Hg.): *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press, S. 12–18.
- Folpe, A. L.; Billings, S. D.; McKenney, J. K.; Walsh, S. V.; Nusrat, A.; Weiss, S. W. (2002): Expression of claudin-1, a recently described tight junction-associated protein, distinguishes soft tissue perineurioma from potential mimics. In: *Am J Surg Pathol* 26 (12), S. 1620–1626.
- Friedrich, R. E.; Hagel, C.; Brehme, Z.; Kluwe, L.; Mautner, V. F. (2003): Ki-67 proliferation-index (MIB-1) of neurofibromas in neurofibromatosis type 1 patients. In: *Anticancer Res* 23 (2A), S. 953–955.

- Furthauer, M.; Lin, W.; Ang, S.-L.; Thisse, B.; Thisse, C.e (2002): Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. In: *Nat Cell Biol* 4 (2), S. 170–174.
- Gaitero, L.; Añor, S.; Fondevila, D.; Pumarola, M. (2008): Canine cutaneous spindle cell tumours with features of peripheral nerve sheath tumours: a histopathological and immunohistochemical study. In: *J Comp Pathol* 139 (1), S. 16–23.
- Gershon, T. R.; Oppenheimer, O.; Chin, S. S.; Gerald, W. L. (2005): Temporally regulated neural crest transcription factors distinguish neuroectodermal tumors of varying malignancy and differentiation. In: *Neoplasia* 7 (6), S. 575–584.
- Gillespie, C. S.; Sherman, D. L.; Blair, G. E.; Brophy, P. J. (1994): Periaxin, a novel protein of myelinating schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. In: *Neuron* 12 (3), S. 497–508.
- Goding, C. R. (2000): Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. In: *Genes Dev* 14 (14), S. 1712–1728.
- Goldschmidt, M. H.; Hendrick, M. J. (2002): Tumors of the skin and soft tissues. In: Donald J. Meuten (Hg.): Tumors in domestic animals, Chapter 2, S. 94–96. 4th Edition. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Gottfried, O. N.; Viskochil, D. H.; Couldwell, W. T. (2010): Neurofibromatosis type 1 and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic implications. In: *Neurosurg Focus* 28 (1), S. E8.
- Gray, M. H.; Rosenberg, A. E.; Dickersin, G. R.; Bhan, A. K. (1989): Glial fibrillary acidic protein and keratin expression by benign and malignant nerve sheath tumors. In: *Hum Pathol* 20 (11), S. 1089–1096.
- Gross, T. L.; Ihrke, P. J.; Walder, E. J.; Affolter, V. K. (2005): Neural and perineurial tumors. In: Thelma L. Gross, Peter J. Ihrke, Emily J. Walder und Verena K. Affolter (Hg.): Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis, S. 789–795. 2nd Edition. Ames, Iowa: Blackwell Science.
- Gutmann, D. H. (1998): Recent insights into neurofibromatosis type 1. In: *Arch Neurology* (Vol. 55, No 6), S. 778–780.
- Hagel, C.; Behrens, T.; Prehm, P.; Schnabel, C.; Glatzel, M.; Friedrich, R. E. (2012): Hyaluronan in intra-operative edema of NF1-associated neurofibromas. In: *Neuropathol* 32 (4), S. 406–414.

- Hagel, C.; Zils, U.; Peiper, M.; Kluwe, L.; Gotthard, S.; Friedrich, R. E. et al. (2007): Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. In: *J Neurooncol* 82 (2), S. 187–192.
- Han, H.; Kursula, P. (2013): Preliminary crystallographic analysis of the N-terminal PDZ-like domain of periaxin, an abundant peripheral nerve protein linked to human neuropathies. In: *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* 69 (7), S. 804–808.
- Hauck, M. L. (2013): Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Stephen J. Withrow, David M. Vail und Rodney L. Page (Hg.): Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology, Chapter 18, S. 305–320. 5th Edition. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Heermann, S.; Schmücker, J.; Hinz, U.; Rickmann, M.; Unterbarnscheidt, T.; Schwab, M. H.; Krieglstein, K. (2011): Neuregulin 1 type III/ErbB signaling is crucial for schwann cell colonization of sympathetic axons. In: *PLoS ONE* 6 (12), S. e28692.
- Hendrick, M. J. (1998): Unclassified tumors. In: Mattie J. Hendrick (Hg.): Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals, Chapter 12, S. 32–33. 2nd Edition. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Colaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology.
- Hoshi, N.; Hiraki, H.; Yamaki, T.; Natsume, T.; Watanabe, K.; Suzuki, T. (1994): Frequent expression of 75 kDa nerve growth factor receptor and phosphotyrosine in human peripheral nerve tumours: an immunohistochemical study on paraffin-embedded tissues. In: *Virchows Arch* 424 (5), S. 563–568.
- Hsieh, A. C.; Liu, Y.; Edlind, M. P.; Ingolia, N. T.; Janes, M. R.; Sher, A. et al. (2012): The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. In: *Nature* 485 (7396), S. 55–61.
- Jakab, Cs.; Gálfi, P.; Jerzsele, Á.; Szabó, Z.; Németh, T.; Sterczer, Á. et al. (2012): Expression of claudin-1 in canine peripheral nerve sheath tumours and perivascular wall tumours. Immunohistochemical study. In: *Histol Histopathol* 27 (7), S. 905–917.
- Jessen, K. R.; Mirsky, R. (2005): The origin and development of glial cells in peripheral nerves. In: *Nat Rev Neurosci* 6 (9), S. 671–682.
- Jessen, K. R.; Thorpe, R.; Mirsky, R. (1984): Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. In: *J Neurocytol* 13 (2), S. 187–200.

- Jessen, W. J.; Miller, S. J.; Jousma, E.; Wu, J.; Rizvi, T. A.; Brundage, M. E. et al. (2013): MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors. In: *J Clin Invest* 123 (1), S. 340–347.
- Johannessen, C. M.; Johnson, B. W.; Genter Williams, S. M.; Chan, A. W.; Reczek, E. E.; Lynch, R. C. et al. (2008): TORC1 is essential for NF1-associated malignancies. In: *Curr Biol* 18 (1), S. 56–62.
- Johannessen, C. M.; Reczek, E. E.; James, M. F.; Brems, H.; Legius, E.; Cichowski, K. (2005): The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (24), S. 8573–8578.
- Jubb; Kennedy, P. C.; Palmer, N. (2008a): Neoplastic and reactive diseases of the skin and mammary glands. In: M. Grant Maxie (Hg.): Pathology of domestic animals, S. 761–766. 5th Edition. Edinburgh: Elsevier Saunders.
- Jubb; Kennedy, P. C.; Palmer, N. (2008b): Neoplastic diseases of the nervous system. In: M. Grant Maxie (Hg.): Pathology of domestic animals, S. 455–457. 5th Edition. Edinburgh: Elsevier Saunders.
- Kamperis, E.; Barbetakis, N.; Asteriou, C.; Kleontas, A.; Christoforidou, V. (2013): Malignant triton tumor of the chest wall invading the lung. A case report and literature review. In: *Hippokratia* 17 (3), S. 277–280.
- Kawahara, E.; Oda, Y.; Ooi, A.; Katsuda, S.; Nakanishi, I.; Umeda, S. (1988): Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in peripheral nerve sheath tumors. A comparative study of immunoreactivity of GFAP, vimentin, S-100 protein, and neurofilament in 38 schwannomas and 18 neurofibromas. In: *Am J Surg Pathol* 12 (2), S. 115–120.
- Kawarai, S.; Masuda, K.; Ohmori, K.; Matsuura, S.; Yasuda, N.; Nagata, M. et al. (2010): Cultivation and characterization of canine skin-derived mast cells. In: *J Vet Med Sci* 72 (2), S. 131–140.
- Kessler, M. (2012): Tumoren der Kopf- und peripheren Nerven. In: Martin Kessler (Hg.): Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze, Kapitel 29.3, S. 474–477. 3. Auflage. Stuttgart: Enke.
- Kim, A. L.; Back, J.; Zhu, Y.; Tang, X.; Athar, M.; DR Bickers (2012): Carcinogenesis and cancer genetics. Intrinsic Akt1 activation through SOX9-mediated mTOR regulation is obligatory for BCC pathogenesis in a murine model of nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS). In: *J Invest Dermatol* 132, S. S36-S43.

- Kim, H. A.; Ratner, N.; Roberts, T. M.; Stiles, C. D. (2001): Schwann cell proliferative responses to cAMP and Nf1 are mediated by cyclin D1. In: *J Neurosci* 21 (4), S. 1110–1116.
- Kindblom, L. G.; Ahlden, M.; Meis-Kindblom, J. M.; Stenman, G. (1995): Immunohistochemical and molecular analysis of p53, MDM2, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in benign and malignant peripheral nerve sheath tumours. In: *Virchows Arch* 427 (1), S. 19–26.
- Kissil, J. L.; Blakeley, J. O.; Ferner, R. E.; Huson, S. M.; Kalamarides, M.; Mautner, V.-F. et al. (2010): What's new in neurofibromatosis? Proceedings from the 2009 NF Conference: new frontiers. In: *Am J Med Genet A* 152A (2), S. 269–283.
- Klopfleisch, R.; Meyer, A.; Lenze, D.; Hummel, M.; Gruber, A. D. (2013): Canine cutaneous peripheral nerve sheath tumours versus fibrosarcomas can be differentiated by neuroectodermal marker genes in their transcriptome. In: *J Comp Pathol* 148 (2-3), S. 197–205.
- Kobayashi, A.; Chang, H.; Chaboissier, M.-C.; Schedl, A.; Behringer, R. R. (2005): Sox9 in testis determination. In: *Ann NY Acad Sci* 1061, S. 9–17.
- Koestner, A.; Bilzer, T.; Fatzer, R. (1999): Tumors of the peripheral nervous system. In: Adalbert Koestner, T. Bilzer, R. Fatzer und Koest (Hg.): Histological classification of tumors of the nervous system of domestic animals, Chapter 8, S. 36–38. Washington, DC: Armed Forces Inst. of Pathology (5).
- Koestner, A.; Higgins, R. J. (2002): Tumors of the nervous system. In: Donald J. Meuten (Hg.): Tumors in domestic animals, Chapter 14, S. 731–735. 4th Edition. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Korkiamäki, T.; Ylä-Outinen, H.; Koivunen, J.; Karvonen, S.-L.; Peltonen, J. (2002): Altered calcium-mediated cell signaling in keratinocytes cultured from patients with Neurofibromatosis type 1. In: *Am J Pathol* 160 (6), S. 1981–1990.
- Krol, M.; Pawlowski, K. M.; Skierski, J.; Rao, N A S; Hellmen, E.; Mol, J. A.; Motyl, T. (2009): Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential. In: *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 1, S. 95–106.
- Krone, W.; Kehrer-Sawatzki, H. (2001): Neurofibromatosen. In: Detlev Ganten und Walter Back (Hg.): Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen. Mit 90 Tabellen, Kapitel 5, S. 88–233. Berlin: Springer.
- Kumar, V.; Abbas, A. K.; Aster, J. C.; Cotran, R. S.; Robbins, S. L. (2015a): Neoplasia. In: Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster, Ramzi S. Cotran und Stanley L. Robbins

- (Hg.): Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Chapter 7, S. 282–340. 9th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders (Robbins Pathology).
- Kumar, V.; Abbas, A. K.; Aster, J. C.; Cotran, R. S.; Robbins, S. L. (2015b): Peripheral Nerves and skeletal muscle. In: Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster, Ramzi S. Cotran und Stanley L. Robbins (Hg.): Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Chapter 27, S. 1227–1250. 9th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders (Robbins Pathology).
- Laprie, C.; Abadie, J.; Amardeilh, M. F.; Net, J. L.; Lagadic, M.; Delverdier, M. (2001): MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. In: *Vet Dermatol* 12 (3), S. 139–147.
- LeCouteur, R. A.; Withrow, S. J. (2007): Tumors of the nervous system. In: Stephen P. Withrow, David M. Vail und Page Rodney (Hg.): Small animal clinical oncology, Chapter 29, S. 676–685. 4th Edition. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier.
- Leyton, L.; Hagood, J. S. (2014): Thy-1 modulates neurological cell-cell and cell-matrix interactions through multiple molecular interactions. In: *Adv Neurobiol* 8, S. 3–20.
- Lin, W.; Sanchez, H. B.; Deerinck, T.; Morris, J. K.; Ellisman, M.; Lee, K. F. (2000): Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (3), S. 1299–1304.
- Louis, David N.; Ohgaki, Hiroko; Wiestler, Otmar D.; Cavenee, Webster K. (Hg.) (2007): WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th Edition. Lyon: IARC Press; Distributed by WHO Press, World Health Organization.
- Loukopoulos, P.; Heng, H. G.; Arshad, H. (2004): Canine biphasic synovial sarcoma: case report and immunohistochemical characterization. In: *J Vet Sci* 5 (2), S. 173–180.
- Love, S.; Louis, D. N.; Ellison, D. W. (2008): Tumors of the peripheral nerves. In: CRC Press (Hg.): Greenfield's neuropathology, S. 2053–2260. 8th Edition. London: Arnold.
- Macarenco, R. S.; Ellinger, F.; Oliveira, A. M. (2007): Perineurioma: a distinctive and underrecognized peripheral nerve sheath neoplasm. In: *Arch Pathol Lab Med* 131 (4), S. 625–636.
- Marino, S. (2005): Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. In: *Trends Mol Med* 11 (1), S. 17–22.
- Massa, R.; Palumbo, C.; Cavallaro, T.; Panico, M. B.; Bei, Roberto; Terracciano, C. et al. (2006): Overexpression of ErbB2 and ErbB3 receptors in schwann cells of patients with Charcot-Marie-tooth disease type 1A. In: *Muscle Nerve* 33 (3), S. 342–349.

- Maurer, M.; Theoharides, T.; Granstein, R. D.; Bischoff, S. C.; Bienenstock, J.; Henz, B. et al. (2003): What is the physiological function of mast cells? In: *Exp Dermatol* 12 (6), S. 886–910.
- Mazzei, M.; Millanta, F.; Citi, S.; Lorenzi, D.; Poli, A. (2002): Haemangiopericytoma: histological spectrum, immunohistochemical characterization and prognosis. In: *Vet Dermatol* 13 (1), S. 15–21.
- McClatchey, A. I. (2007): Neurofibromatosis. In: *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2 (1), S. 191–216.
- McGavin, M. D.; Zachary, J. F. (2007): Nervous system. In: M. Donald McGavin und James F. Zachary (Hg.): *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*, Chapter 14, S. 962–964. 4th Edition: Mosby.
- McKenzie, J. L.; Fabre, J. W. (1981): Studies with a monoclonal antibody on the distribution of Thy-1 in the lymphoid and extracellular connective tissues of the dog. In: *Transplantation* 31 (4), S. 275–282.
- Meyer, D.; Birchmeier, C. (1995): Multiple essential functions of neuregulin in development. In: *Nature* 378 (6555), S. 386–390.
- Miettinen, M. (2014): Immunohistochemistry of soft tissue tumours - review with emphasis on 10 markers. In: *Histopathology* 64 (1), S. 101–118.
- Miller, S. J.; Jessen, W. J.; Mehta, T.; Hardiman, A.; Sites, E.; Kaiser, S. et al. (2009): Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. In: *EMBO Mol Med* 1 (4), S. 236–248.
- Miller, S. J.; Rangwala, F.; Williams, J.; Ackermann, P.; Kong, S.; Jegga, A. G. et al. (2006): Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. In: *Cancer Res* 66 (5), S. 2584–2591.
- Moore, P. F. (2014): A review of histiocytic diseases of dogs and cats. In: *Vet Pathol* 51 (1), S. 167–184.
- Morotti, R. A.; Nicol, K. K.; Parham, D. M.; Teot, L. A.; Moore, J.; Hayes, J. et al. (2006): An immunohistochemical algorithm to facilitate diagnosis and subtyping of rhabdomyosarcoma: the children's oncology group experience. In: *Am J Surg Pathol* 30 (8), S. 962–968.
- Muratovska, A.; Zhou, C.; He, S.; Goodyer, P.; Eccles, M. R. (2003): Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. In: *Oncogene* 22 (39), S. 7989–7997.

- Ozaki, K.; Yamagami, T.; Nomura, K.; Narama, I. (2002): Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. In: *Vet Pathol* 39 (5), S. 557–564.
- Ozawa, T.; Araki, N.; Yunoue, S.; Tokuo, H.; Feng, L.; Patrakitkomjorn, S. et al. (2005): The neurofibromatosis type 1 gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-cofilin pathway. In: *J Biol Chem* 280 (47), S. 39524–39533.
- Panigrahi, S.; Mishra, S. S.; Das, S.; Dhir, M. K. (2013): Primary malignant peripheral nerve sheath tumor at unusual location. In: *J Neurosci Rural Pract* 4 (Suppl 1), S. S83-6.
- Panteliadis, C. P.; Hagel, C.; Mautner, V.-F.; Friedrich, R. E.; Rosenbaum, T. (2009): Neurokutane Erkrankungen. In: Rudolf Korinthenberg, Christos P. Panteliadis und Christian Hagel (Hg.): *Neuropädiatrie. Evidenzbasierte Therapie*, Kapitel 5, S. 67–84. 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Park, J.-W.; Woo, G.-H.; Jee, H.; Jung, D.-W.; Youn, H.-Y.; Choi, M.-C. et al. (2011): Malignant peripheral nerve sheath tumour in the liver of a dog. In: *J Comp Pathol* 144 (2-3), S. 223–226.
- Peltonen, J.; Jaakkola, S.; Lebowitz, M.; Renvall, S.; Risteli, L.; Virtanen, I.; Uitto, J. (1988): Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis. In: *Lab Invest* 59 (6), S. 760–771.
- Perego, C.; Di Cairano, E. S.; Ballabio, M.; Magnaghi, V. (2012): Neurosteroid allopregnanolone regulates EAAC1-mediated glutamate uptake and triggers actin changes in schwann cells. In: *J Cell Physiol* 227 (4), S. 1740–1751.
- Perez, J.; Bautista, M. J.; Rollon, E.; Chacón de Lara, F.; Carrasco, L.; Martín de las Mulas, J. (1996): Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. In: *Vet Pathol* 33 (4), S. 391–397.
- Perez-Montiel, M. D.; Plaza, J. A.; Dominguez-Malagon, H.; Suster, S. (2006): Differential expression of smooth muscle myosin, smooth muscle actin, h-caldesmon, and calponin in the diagnosis of myofibroblastic and smooth muscle lesions of skin and soft tissue. In: *Am J Dermatopathol* 28 (2), S. 105–111.
- Perosio, P. M.; Brooks, J. J. (1988): Expression of nerve growth factor receptor in paraffin-embedded soft tissue tumors. In: *Am J Pathol* 132 (1), S. 152–160.
- Perrot, R.; Berges, R.; Bocquet, A.; Eyer, J. (2008): Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. In: *Mol Neurobiol* 38 (1), S. 27–65.

- Petzold, A. (2005): Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. In: *J Neurol Sci* 233 (1-2), S. 183–198.
- Ponce, F.; Marchal, T.; Magnol, J. P.; Turinelli, V.; Ledieu, D.; Bonnefont, C. et al. (2010): A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. In: *Vet Pathol* 47 (3), S. 414–433.
- Pytel, P.; Karrison, T.; Can G.; Tonsgard, J. H.; Krausz, T.; Montag, A. G. (2010): Neoplasms with schwannian differentiation express transcription factors known to regulate normal schwann cell development. In: *Int J Surg Pathol* 18 (6), S. 449–457.
- Ramos-Vara, J. A.; Miller, M. A.; Gilbreath, E.; Patterson, J. S. (2010): Immunohistochemical detection of CD34, E-cadherin, claudin-1, glucose transporter 1, laminin, and protein gene product 9.5 in 28 canine and 8 feline meningiomas. In: *Vet Pathol* 47 (4), S. 725–737.
- Recklinghausen, Friedrich von (1882): Ueber die Multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen. Berlin: Hirschwald, August.
- Rege, T. A.; Hagood, J. S. (2006): Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. In: *FASEB J* 20 (8), S. 1045–1054.
- Reggeti, F.; Bienzle, D. (2011): Flow cytometry in veterinary oncology. In: *Vet Pathol* 48 (1), S. 223–235.
- Reinhard, S.; Vela, E.; Bombara, N.; DeVries, G. H.; Raabe, T. D. (2009): Developmental regulation of Neuregulin1 isoforms and erbB receptor expression in intact rat dorsal root ganglia. In: *Neurochem Res* 34 (1), S. 17–22.
- Riddle, N. D.; Gorden, L.; Rojiani, M. V.; Hakam, A.; Rojiani, A. M. (2010): CD44 and p53 immunoexpression patterns in NF1 neoplasms - indicators of malignancy and infiltration. In: *Int J Clin Exp Pathol* 3 (5), S. 515–521.
- Riethmacher, D.; Sonnenberg-Riethmacher, E.; Brinkmann, V.; Yamaai, T.; Lewin, G. R.; Birchmeier, C. (1997): Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. In: *Nature* 389 (6652), S. 725–730.
- Rodriguez, F. J.; Folpe, A. L.; Giannini, C. Perry, Arie (2012a): Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. In: Werner Paulus (Hg.): *Acta Neuropathologica*, Bd. 123, S. 295–319: Springer.
- Rodriguez, F. J.; Stratakis, C. A.; Evans, D. G. (2012b): Genetic predisposition to peripheral nerve neoplasia: diagnostic criteria and pathogenesis of neurofibromatoses,

- carney complex, and related syndromes. In: Werner Paulus (Hg.): *Acta Neuropathologica*, Bd. 123, S. 349–367: Springer.
- Rosner, M.; Hanneder, M.; Siegel, N.; Valli, A.; Fuchs, C.; Hengstschläger, M. (2008): The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. In: *Mutat Res Rev Mutat Res* 659 (3), S. 284–292.
- Ruggieri, M. (1999): The different forms of neurofibromatosis. In: *Childs Nerv Syst* 15 (6-7), S. 295–308.
- Sánchez, J.; Ramirez, G. A.; Buendia, A. J.; Vilafranca, M.; Martinez, C. M.; Altimira, J.; Navarro, J. A. (2007): Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation. In: *Vet Pathol* 44 (5), S. 676–682.
- Santen, R. J.; Song, R. X.; McPherson, R.; Kumar, R.; Adam, L.; Jeng, M.-H.; Yue, W. (2002): The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 80 (2), S. 239–256.
- Sawamoto, O.; Yamate, J.; Kuwamura, M.; Hagiwara, R.; Kurisu, K. (1999): A canine peripheral nerve sheath tumor including peripheral nerve fibers. In: *J Vet Med Sci* 61 (12), S. 1335–1338.
- Scheithauer, B. W.; Louis, David N.; Hunter, S.; Woodruff, James M.; Antonescu, C. R. (2007): Tumours of the cranial and paraspinal nerves. In: David N. Louis, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler und Webster K. Cavenee (Hg.): *WHO classification of tumours of the central nervous system*, Chapter 9, S. 152–162. 4th Edition. Lyon: IARC Press; Distributed by WHO Press, World Health Organization.
- Scheithauer, B. W.; Woodruff, James M.; Erlandson, Robert A. (1999a): Neurofibroma. In: Bernd W. Scheithauer, James M. Woodruff und Robert A. Erlandson (Hg.): *Tumors of the peripheral nervous system (AFIP Atlas of Tumor Pathology)*, Chapter 8, S. 177–218. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology (fasc. 24).
- Scheithauer, B. W.; Woodruff, James M.; Erlandson, Robert A. (1999b): Primary malignant tumors of peripheral nerve. In: Bernd W. Scheithauer, James M. Woodruff und Robert A. Erlandson (Hg.): *Tumors of the peripheral nervous system (AFIP Atlas of Tumor Pathology)*, Chapter 11, S. 303–328. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology (fasc. 24).
- Scholzen, T.; Gerdes, J. (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *J Cell Physiol* 182 (3), S. 311–322.

- Schöniger, S.; Summers, B. A. (2009): Localized, plexiform, diffuse, and other variants of neurofibroma in 12 dogs, 2 horses, and a chicken. In: *Vet Pathol* 46 (5), S. 904–915.
- Schulz, A.; Kyselyova, A.; Baader, S. L.; Jung, M. J.; Zoch, A.; Mautner, V.-F. et al. (2014): Neuronal merlin influences ERBB2 receptor expression on Schwann cells through neuregulin 1 type III signalling. In: *Brain* 137 (2), S. 420–432.
- Seymour, P. A.; Freude, K. K.; Tran, M. N.; Mayes, E. E.; Jensen, J.; Kist, R. et al. (2007): SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (6), S. 1865–1870.
- Sheela, S.; Riccardi, V. M.; Ratner, N. (1990): Angiogenic and invasive properties of neurofibroma schwann cells. In: *J Cell Biol* 111 (2), S. 645–653.
- Sherman, L. S.; Rizvi, T. A.; Karyala, S.; Ratner, N. (2000): CD44 enhances neuregulin signaling by schwann cells. In: *J Cell Biol* 150 (5), S. 1071–1084.
- Stark, A. M.; Buhl, R.; Hugo, H. H.; Mehdorn, H. M. (2001): Malignant peripheral nerve sheath tumours - report of 8 cases and review of the literature. In: *Acta Neurochir* 143 (4), S. 357-63; discussion 363-4.
- Staser, K.; Yang, F.-C.; Clapp, D. W. (2012): Pathogenesis of plexiform neurofibroma: tumor-stromal/hematopoietic interactions in tumor progression. In: *Annu Rev Pathol Mech Dis* 7 (1), S. 469–495.
- Stasik, C. J.; Tawfik, O. (2006): Malignant peripheral nerve sheath tumor with rhabdomyosarcomatous differentiation (malignant triton tumor). In: *Arch Pathol Lab Med* 130 (12), S. 1878–1881.
- Stonecypher, M. S.; Byer, S. J.; Grizzle, W. E.; Carroll, S. L. (2005): Activation of the neuregulin-1/ErbB signaling pathway promotes the proliferation of neoplastic schwann cells in human malignant peripheral nerve sheath tumors. In: *Oncogene* 24 (36), S. 5589–5605.
- Su, W.; Sin, M.; Darrow, A.; Sherman, L. S. (2003): Malignant peripheral nerve sheath tumor cell invasion is facilitated by Src and aberrant CD44 expression. In: *Glia* 42 (4), S. 350–358.
- Sugiyama, A.; Morita, T.; Shimada, A.; Tsuka, T.; Okamoto, Y.; Takeuchi, T. (2008): Primary malignant peripheral nerve sheath tumor with eosinophilic cytoplasmic globules arising from the greater omentum in a dog. In: *J Vet Med Sci* 70 (7), S. 739–742.
- Summers, B. A.; Cummings, J. F.; DeLahunta, A. (1995): Diseases of the peripheral nervous system. In: Brian A. Summers, John F. Cummings und Alexander DeLahunta (Hg.): *Veterinary neuropathology*, Chapter 7, S. 472–499. St. Louis, Mo: Mosby.

- Suzuki, S.; Uchida, K.; Nakayama, H. (2013): The effects of tumor location on diagnostic criteria for canine malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) and the markers for distinction between canine MPNSTs and canine perivascular wall tumors. In: *Vet Pathol*.
- Takeuchi, A.; Ushigome, S. (2001): Diverse differentiation in malignant peripheral nerve sheath tumours associated with neurofibromatosis-1: an immunohistochemical and ultrastructural study. In: *Histopathology* 39 (3), S. 298–309.
- Tavasoly, A.; Javanbakht, J.; Khaki, F.; Hosseini, E.; Bahrami, A.; Hassan, M. A.; Mirabad, M. (2013): Ulnar malignant peripheral nerve sheath tumour diagnosis in a mixed-breed dog as a model to study human: histologic, immunohistochemical, and clinicopathologic study. In: *Diagn Pathol* 8 (1), S. 86.
- Thompson, J.; Lovicu, F.; Ziman, M. (2004): The role of Pax7 in determining the cytoarchitecture of the superior colliculus. In: *Dev Growth Differ* 46 (3), S. 213–218.
- Tomellini, E.; Lagadec, C.; Polakowska, R.; Le Bourhis, X. (2014): Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. In: *Cell Mol Life Sci* 71 (13), S. 2467–2481.
- Tomita, Y.; Morooka, T.; Hoshida, Y.; Zhang, B.; Qiu, Y.; Nakamichi, I. et al. (2006): Prognostic significance of activated AKT expression in soft-tissue sarcoma. In: *Clin Cancer Res* 12 (10), S. 3070–3077.
- Tovar, C.; Obendorf, D.; Murchison, E. P.; Papenfuss, A. T.; Kreiss, A.; Woods, G. M. (2011): Tumor-specific diagnostic marker for transmissible facial tumors of tasmanian devils: immunohistochemistry studies. In: *Vet Pathol* 48 (6), S. 1195–1203.
- Valero, M. C.; Martín, Y.; Hernández-Imaz, E.; Marina Hernández, A.; Meleán, G.; Valero, A. M. et al. (2011): A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. In: *J Mol Diagn* 13 (2), S. 113–122.
- Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gombault, A.; Tchalikian, A.; Tauzia, M.-L. et al. (2012): Nf1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways. In: *PLoS ONE* 7 (10), S. e47283.
- Vanderslice, P.; Ballinger, S. M.; Tam, E. K.; Goldstein, S. M.; Craik, C. S.; Caughey, G. H. (1990): Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (10), S. 3811–3815.
- Vandeveld, M.; Higgins, R.; Oevermann, A. (2012): Neoplasia. In: Marc Vandeveld, Robert Higgins und Anna Oevermann (Hg.): *Veterinary Neuropathology. Essentials of Theory and Practice*, Chapter 7, S. 145–147. Chicester: Wiley.

- Volmer, C.; Caplier, L.; Reyes-Gomez, E.; Huet, H.; Owen, R. A.; Fontaine, J.-J. (2010): An atypical peripheral nerve sheath tumour with pseudoglandular architecture in a dog. In: *J Vet Med Sci* 72 (2), S. 249–251.
- Watanabe, T.; Oda, Y.; Tamiya, S.; Kinukawa, N.; Masuda, K.; Tsuneyoshi, M. (2001): Malignant peripheral nerve sheath tumours: high Ki67 labelling index is the significant prognostic indicator. In: *Histopathology* 39 (2), S. 187–197.
- Webster, J. D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Kaneene, J. B.; Miller, R.; Resau, J. H.; Kiupel, M. (2006): The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 8 (2), S. 104–111.
- Weiss, S. W.; Goldblum, J. R. (2001): Malignant soft tissue tumors of uncertain type. In: Sharon W. Weiss, John R. Goldblum und Franz M. Enzinger (Hg.): *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors*, Chapter 37. 4th ed. St. Louis: Mosby, S. 1161–1220.
- Whitfield, M. L.; George, L. K.; Grant, G. D.; Perou, C. M. (2006): Common markers of proliferation. In: *Nat Rev Cancer* 6 (2), S. 99–106.
- Williams, A. F.; Gagnon, J. (1982): Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. In: *Science* 216 (4547), S. 696–703.
- Wiranowska, M.; Ladd, S.; Smith, S. R.; Gottschall, P. E. (2006): CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. In: *Brain Cell Biol* 35 (2-3), S. 159–172.
- Withrow, Stephen P.; Vail, David M.; Rodney, Page (Hg.) (2007): *Small animal clinical oncology*. 4th Edition. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier.
- Yamnik, R. L.; Holz, M. K. (2010): mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. In: *FEBS Lett* 584 (1), S. 124–128.
- Yang, F.-C.; Ingram, D. A.; Chen, S.; Zhu, Y.; Yuan, J.; Li, X. et al. (2008): Nf1-dependent tumors require a microenvironment containing Nf1+/- and c-kit-dependent bone marrow. In: *Cell* 135 (3), S. 437–448.
- Yarden, Y. (2001): The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. In: *Eur J Cancer* 37, S. 3–8.
- Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2), S. 127–137.
- Zhao, Q.; Eberspaecher, H.; Lefebvre, V.; Crombrughe, B. de (1997): Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. In: *Dev Dyn* 209 (4), S. 377–386.

Zhou, X.; Tan, M.; Stone Hawthorne, V.; Klos, K. S.; Lan, K.-H.; Yang, Y. et al. (2004): Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. In: *Clin Cancer Res* 10 (20), S. 6779–6788.

Zhu, Y.; Ghosh, P.; Charnay, P.; Burns, D. K.; Parada, L. F. (2002): Neurofibromas in NF1: schwann cell origin and role of tumor environment. In: *Science* 296 (5569), S. 920–922.

Zou, C.; Smith, K. D.; Liu, J.; Lahat, G.; Myers, S.; Wang, W.-L. et al. (2009): Clinical, pathological, and molecular variables predictive of malignant peripheral nerve sheath tumor outcome. In: *Ann Surg* 249 (6), S. 1014–1022.

11 Danksagung

Die Labortätigkeiten zu der vorliegenden Arbeit fanden am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von August 2013 bis Januar 2015 statt.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. C. Hagel, für seine sehr intensive Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Evaluationen, für seine Geduld und ständige Präsenz während des gesamten Promotionsverfahrens. Frau Prof. Dr. habil. C. Herden möchte ich danken für das entgegengebrachte Vertrauen zur Durchführung dieser externen Doktorarbeit und der Bereitstellung der Hundeproben aus dem Institut der Veterinär-Pathologie der JLU in Gießen.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Diagnostiklabors im Institut für Neuropathologie des UKE, in erster Linie Kendra Richter und Ulrike Rumpf, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn es um die Durchführung jeglicher Aufgaben im Histologie Labor ging.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie am UKE für ihre nette Aufnahme und manchen feucht-fröhlichen Abend.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Gisela Arndt, einer ehemaligen Mitarbeiterin des Instituts für Biometrie und Informationsverarbeitung der Freien Universität Berlin und Johannes Hengelbrock vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE, die mich geduldig und kompetent bei der Wahl und Ausführung der Statistik beraten haben.

Ferner gilt mein Dank einigen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie der JLU in Gießen wie Herrn Dr. K. Köhler, Nadine Czerwonka und Josefine Fuhr die mir bei meinen Besuchen in Gießen tatkräftig zur Seite gestanden sind.

Ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern und meinem Freund, die mich stets tatkräftig unterstützt und immer wieder motiviert haben.

12 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Forchheim, den 21.09.2016

Louisa Püschel

13 Anhang

13.1 Lösungen und immunhistochemische Reagenzien

Für die manuelle **Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)** im Institut für Neuropathologie des UKE wurden folgende Reagenzien und Lösungen verwendet (alphabetisch aufgelistet).

Reagenzien	Firma	Bestellnummer
3-Aminopropylthriethoxysilan	Sigma-Aldrich GmbH, München	#A3648
Alkohol aufsteigende Reihe	Apotheke UKE	
Eosin	Merck KGaA (Darmstadt)	# 1.15935.0100
Essigsäure konzentriert	Sigma-Aldrich GmbH (München)	# 27225
Hämalaun nach Mayer	Merck KGaA (Darmstadt)	# 1.09249
Hämatoxylin nach Harris	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	# X 903.1
Phloxin B	Sigma-Aldrich GmbH (München)	# 28550 Fluka
Sakura GLC	Sakura (Staufen)	# 468253
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA (Darmstadt)	# 1.09057.1000
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co KG (Renningen)	

Lösungen	Rezeptur
Gebrauchslösung	50 ml A + 5 ml B + 390 ml 96% Alkohol + 2 ml konz. Essigsäure
HCl-Wasser	2.5 ml HCl 37%ig in 500 ml Aqua dest
Stammlösungen	3 g Eosin gelblich wasserlöslich in 300 ml Aqua dest (Lösung A) 0,5 g Phloxin B in 50 ml Aqua dest (Lösung B)

Für die **Hämatoxylin-Eosin-Färbung** im Institut für Veterinär Pathologie der JLU in Gießen wurden folgende Reagenzien verwendet (alphabetisch aufgelistet).

Reagenzien	Firma
Alkohol (Isopropanol)	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn
Eosin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Papanicolaoul	Merck KGaA (Darmstadt)
Xylol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn

Lösungen	Rezeptur
Kardasewitsch-Lösung	70%iger Alkohol + 5% Ammoniak
HCl-Alkohol	50%iger Alkohol + 0,1%ige Salzsäure

Für die **immunhistochemischen Färbungen** wurden die verwendeten Antikörper in der angegebenen Verdünnung (Tabelle 2, Seite 35) mit Antibody Diluent verdünnt und angesetzt. Die verwendeten Reagenzien und Lösungen sind im Folgenden alphabetisch sortiert aufgelistet.

Reagenzien	Firma	Bestellnr.
Antibody Diluent Reagent Solution	Invitogen life technologies (Carlsbad)	# 003218
Ziegenserum (Goat Serum)	Dako (Glostrup, DK)	# X 0907

Lösungen	Rezeptur
TRIS-Puffer	1 Paket TRIS-Buffered Saline, pH 7.6, Dako (# S 1968, Glostrup, DK) in 5 l H ₂ O + 5ml Triton x 100 (# 3051.3, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Für die immunhistochemischen Färbungen mit dem Ventana-Färbeautomaten wurden folgende Reagenzien und Lösungen verwendet (alphabetisch aufgelistet).

Reagenzien	Firma	Bestellnr.
Bluing Reagent	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 760-2037
SSC (Konzentrat)	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 950-110
cc1 Cell conditioning Solution(ready-to-use)	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 950-124
cc2 Cell Conditioning solution (ready-to-use)	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 950-123
EZ Prep(tm) Konzentrat	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 950-120
Hematoxylin	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 760-2021
LCS (Predilute) (ready-to-use)	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 650-010
Reaction buffer (Konzentrat)	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 950-300
Ultraview Universal DAB Detection Kit, bestehend aus:	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	# 760 500
25ml ultraview Universal DAB Inhibitor		
25ml ultraview Universal HRP Multimer		
25ml ultraview Universal DAB Chromogen		
25ml ultraview Universal DAB H ₂ O ₂		
25ml ultraview Universal DAB Copper		
Ultraview Universal AP Red Detection Kit, bestehend aus:	Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)	#760-501
25ml ultraview Universal AP Red Enhancer		
25ml ultraview Universal AP Red Multimer		
25ml ultraview Universal AP Red Naphthol		
25ml ultraview Universal AP Red Fast R. A		
25ml ultraview Universal AP Red Fast R. B		
Lösungen	Rezeptur	
2xSSC	10 Liter Aqua dest + 2 Liter 2xSSC Konzentrat	
EZ Prep:	18 Liter aqua dest + 2 Liter EZ Konzentrat	
Reaction buffer	18 Liter Aqua dest + 2 Liter Reaction buffer	

13.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden sind alle verwendeten Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien alphabetisch aufgelistet.

Material	Firma
Deckgläser	Paul Marientfeld GmbH & Co KG (Lauda-Königshofen)
Eppendorf Tubes	Safe Seal Gefäß, Aktiengesellschaft & Co Nümbrecht (Sarstedt)
Küvetten für Färbelösungen	
Mikrotomklingen	Microtom Blade A35, Feather Safety Razor Co, LTD. Mecial Division (Osaka, Japan)
Objektträger	72 SuperFrost/Plus, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim v. d. Rhön)
Pippettenspitzen	epT.I.P.S.®, original Eppendorf, Eppendorf A.G. (Hamburg)
Wiegen zum Aufnehmen der Objektträger	

13.3 Geräte

Im Folgenden sind alle verwendeten Geräte alphabetisch aufgelistet.

Anhang

Geräte	Firma
Eindeckelautomat	Leica CV5030 (Wetzlar)
Färbeautomat (Gießen)	Varistain 24-3, Shandon
Färbeautomat (UKE)	Ventana benchmark xt, Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, USA)
Heizbad	GFL. Gesellschaft für Labortechnik m.b.H. & Co. (Burgwedel)
Mikroskop	Olympus BH2-RFCA 1,25x (Hamburg)
Mikroskopkamera	Leica DMD108 (Wetzlar) und Axiophot Zeiss (Oberkochen)
Mikrotom (Gießen)	Leica RM2255 (Wetzlar)
Mikrotom (UKE)	Leica SM2000 R (Wetzlar)

13.4 Evaluierungsschemata der verwendeten Antikörper

Tabelle 15: Evaluierungsschemata der verwendeten Antikörper

Bei freien Feldern, wurde dieser Marker nicht an dem jeweiligen Gewebe getestet bzw. wurde nicht nach dem jeweiligen Muster ausgewertet

Mensch			Hund	
	Expressionsintensität	Expressionsmuster	Expressionsintensität	Expressionsmuster
CD90		0 = negativ 2 = perivaskulär und/oder perineurial positiv 3 = Tumor positiv	0 = negativ 1 = 100% Tumorzellen schwach positiv 2 = 22-66% Tumorzellen schwach-mittel positiv 3 = > 66% bis < 100% Tumorzellen mittel-stark positiv 4 = 100% Tumorzellen stark positiv	
CD44	0 = negativ 1 = 0-20% Tumorzellen positiv 2 = >20 bis < 100% Tumorzellen positiv 3 = 100% Tumorzellen positiv			
Claudin-1			0 = Tumorzellen negativ positiv 1 = Tumorzellen schwach positiv 2 = Tumorzellen mittel positiv 3 = Tumorzellen stark positiv	1 = multifokal 2 = diffus
EMA		0 = negativ 1 = PN, umwickelnde Strukturen positiv 2 = multifokal Tumor positiv 3 = PN u. Tumor positiv		
ErbB2		0 = negativ 1 = perineurial od. perivaskulär positiv 3 = einzelne Zellen od. retikulär positiv		
ErbB3	0 = negativ 1 = 0-80% Tumorzellen positiv 2 = > 80 bis <100% Tumorzellen positiv 3 = 100% Tumorzellen positiv			
GFAP	0 = negativ 1 = Tumorzellen positiv		0 = negativ 1 = positiv	
MEK	0 = negativ 1 = Tumorzellen positiv			
pMEK	0 = negativ 1 = 0-70% Tumorzellen positiv 2 = > 70% Tumorzellen positiv 3 = > 70% Tumorzellen positiv mit starker Färbintensität			
Neurofilament		0 = negativ 1 = Axone in intakten Nerven positiv 2 = Axone im Tumorgewebe (Axone wurden gezählt) positiv	0 = negativ 1 = Axone in intakten Nerven positiv 2 = Axone im Tumorgewebe (Axone wurden gezählt) positiv	

Mensch			Hund	
	Expressionsintensität	Expressionsmuster	Expressionsintensität	Expressionsmuster
NGFR	0 = negativ 1 = Tumorzellen schwach positiv 2 = Tumorzellen mittel positiv 3 = Tumorzellen stark positiv		0 = negativ 1 = Tumorzellen schwach positiv 2 = Tumorzellen mittel positiv 3 = Tumorzellen stark positiv	0 = negativ 1 = 0-20% (einzelne Zellen) 2 = 20-50% Tumorzellen fokal positiv 3 = 50-100% Tumorzellen multifokal positiv 4 = 100% Tumorzellen diffus positiv
Neuregulin-1	0 = negativ 1 = Tumorzellen schwach positiv 2 = Tumorzellen mittel positiv 3 = Tumorzellen stark positiv		0 = negativ 1 = 100% Tumorzellen schwach positiv 2 = 22-66% Tumorzellen schwach-mittel positiv 3 = > 66% bis < 100% Tumorzellen mittel-stark positiv 4 = 100% Tumorzellen stark positiv	
Periaxin	0 = negativ 1 = Tumorzellen schwach positiv 2 = Tumorzellen mittel positiv 3 = Tumorzellen stark positiv		0 = negativ 1 = Tumorzellen schwach positiv 2 = Tumorzellen deutlich positiv 3 = Tumorzellen diffus stark positiv	
Rho	0 = negativ 1 = schwach (0-33% Tumorzellen positiv) 2 = mittel (>33-70% Tumorzellen positiv) 3 = stark (>70-100% Tumorzellen positiv)			
S100	0 = negativ 1 = Tumorzellen positiv		0 = negativ 1 = Tumorzellen positiv	
α -SMA		0 = negativ 1 = Gefäßwände positiv 2 = zusätzlich PN positiv	0 = negativ 1 = Tumorzellen positiv	0 = keine weiteren Strukturen 1 = Perineurium Tumorzellen 2 = zwiebelschalentartig um Gefäße 3 = Granulationsgewebe 4 = Perineurium und um Nekrose 5 = Perineurium und um Gefäße

13.5 Rohdaten canine periphere Nervenscheidentumore

Tabelle 16: Codeplan zu Rohdaten canine periphere Nervenscheidentumore

Variablenname	Variablenlabel	Wertelabel
OT-Nummer	Objektträgernummer	
T_Nummer	T-Nummer zur Zuordnung des Patienten bei Vetidata	
Rasse_kodiert		1 = American Bulldog, 2 = Appenzeller Sennenhund, 3 = Australian Shepherd, 4 = Beagle, 5 = Berner Sennenhund, 6 = Border Collie, 7 = Briard, 8 = Cocker Spaniel, 9 = Deutscher Schäferhund, 10 = Dobermann, 11 = Fox Terrier, 12 = Galgo Espanol, 13 = großer Münsterländer, 14 = Harzer Fuchs, 15 = Hovawart, 16 = Husky, 17 = Jack Russel Terrier, 18 = King Charles Spaniel, 19 = Kleiner Münsterländer, 20 = Langhaardackel, 21 = Magyar Vizsla, 22 = Mischling, 23 = Rhodesian Ridgeback, 24 = Rottweiler, 25=Siberian Husky, 26 = Tibet Terrier, 27 = Welsh Terrier, 28 = West Highland White Terrier, 29 = Yorkshire Terrier, 30 = k.A.
Sex_kodiert	Geschlecht	weiblich = 1, männlich = 2
Alter_berechnet	Berechnetes Alter	
Lokalisation_kodiert	Lokalisation	1 = Kopf/Hals , 2 = Rumpf, 3 = Extremitäten
Diagnose_Gießen	Diagnose aus Gießen	1 = Sarkom, 2 = peripherer Nervenscheidentumor, 3 = maligner peripherer Nervenscheidentumor
GFAP_GI	saures Gliafaserprotein	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
S100_GI	S100-Protein	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
Vimentin_GI	Vimentin	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
NGFR_GI	Nervenzustimmungsfaktor	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
Desmin_GI	Desmin	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
NF_GI	Neurofilament	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
NSE_GI	Neuronenspezifische Enolase	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
Zytokeratin_GI	Zytokeratin	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
Periaxin_GI	Periaxin	Immunhistologie aus Gießen 0 = negativ, 1 = positiv
FNCLCC	Grading für Weichteilsarkome	0 = nicht auswertbar, 1 = Grad I, 2 = Grad II, 3 = Grad III
Mitosefiguren	Anzahl Mitosefiguren pro 10 Gesichtsfelder in der 40-fachen Vergrößerung (0,19 mm²)	
Nekrose		0 = Nekrose nicht vorhanden, 1 =Nekrose vorhanden
Tumordifferenzierung	Wachstumsmuster	1 = deutl. Neurofibrom, gering-mittelgr. Zellularität, homogenes Bild, spindelförmige Zellen, keine Wirtel o.ä. ODER plexiformes Wachstumsmuster, myxoid; 2 = in Zügen, Wirteln, Radspeichermuster (storiform), Fischgrätenmuster, Pallsadenbildung (der Kerne), plexiforme Anteile können vorkommen, z. T. sehr zell dicht; 3 = dicht gepackt, Zellkerne basophil, homogenes Bild, keine Züge, Wirtel, Radspeichen o.ä. erkennbar aber myxoide Bereich möglich
Ki67_pos	alle Ki-67-positiven Zellen in einem Gesichtsfeld der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Ki67_neg	alle Ki-67-negativen Zellen (restliche Zellen) in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Ki67_Index	= Ki67_pos : (Ki67_pos + Ki67_neg) x 100	
Zellularität	= Ki67_pos + Ki67_neg	Anzahl der Zellen (Ki67-positive und negative addiert) in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)
Neurofilament	Neurofilament	0 = negativ, 1 = pos. Axone in intakten Nerven; 2 = filamentäre Strukturen (Axone) im Tumorgewebe; 3 = filamentäre Strukturen (Axone)im Tumorgewebe
Anzahl_pos_NFStrukturen	Anzahl der Neurofilament-positiven Strukturen	
CD90	Fibroblastenmarker	0 = neg, 1= 0-33% (100%) schwach; 2 = 33-66 % Färbung, schwach-mittel ; 3 = > 66% Färbung mittel-stark; 4 = 100% stark
NRG1	Neuregulin-1	0 = negativ, 1 = 100% schwach, 2 = 33-66% schwach-mittel, 3 = >66% mittel-stark, 4 = 100% stark
MZ_Tryptase	Mastzell-Tryptase	
c-kit	Anzahl von c-kit-positiven Zellen in einem Gesichtsfeld der 20x Vergrößerung	Anzahl von positiven Mastzellen in einem Gesichtsfeld der 20x Vergrößerung
S100	S100-Protein	
Claudin_1	Claudin-1	0 = negativ, 1=positiv
Cl1 Verteilungsmuster	Verteilungsmuster der Claudin-1-Expression	0 = negativ, 1 = schwach, 2 = mittel, 3 = stark
α_SMA_Tumorvariable	Tumor positiv oder negativ für α-SMA	1 = multifokal, 2 = diffus
α_SMA_Färbemuster	welche Gewebeteile sind im Tumor zusätzlich positiv	0 = negativ, 1 = positiv
α_SMA_Färbemuster_zusammengefasst	α-SMA-Färbemuster vereinfacht	0 = nichts, 1 = Perineurium außen, 2 = Perineurium außen und innen, 3 = um Gefäße, 4 = glockenförmig um Nekrose und Fibrose, 5= 1+3 (PN + um Gefäße), 6 = 1+4 oder 2+4 (PN u. Nekrose)
		0 = negative, 1= Perineurium (außen/innen)(1,2); 2 = Gefäße (3); 3 = Granulationsgewebe (4); 4= PN und Nekrose; 5 = PN und Gefäße (5)

Variablenname		Variablenlabel	Wertelabel
Periaxin_ausfuehrlich			0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv (multifokal oder diffus), 3 = deutlich stark positiv
Periaxin_zusammengefasst			0 = oberes 0 und 1 zusammengefasst; 1 = oberes 2 und 3 zusammengefasst
NGFR_Färbeintensität		Intensität der Expression des Nervenwachstumsfaktors	0 = negativ, 1 = schwach, 2 = mittel, 3 = stark
NGFR_Färbemuster		Expressionsverteilung des Nervenwachstumsfaktors	0 = negativ, 1 = einzelne Zellen 0-20% , 2 = multifokal >20% bis < 50% des Tumors , 3 = diffus >50% bis <100%, 4 = 100%
GFAP		Saures Gliafaserprotein	0 = negativ, 1 = positiv
Doppelfärbung_Färbemuster		Doppelfärbung mit α-SMA und GFAP	1 = prinzipiell GFAP-positiv, weniger Stellen SMA-positiv; 2 = GFAP diffus positiv, netzartig dazwischen SMA bzw. beides gemischt positiv

Tabelle 17: Rohdaten caniner peripherer Nervenscheidentumore

OT_Nummer	T_Nummer	Rasse_kodiert	Sex_kodiert	Alter_berechnet	Lokalisation_kodiert	Diagnose_Gliessen	GFAP_GI	S100_GI	Vimentin_GI	NGFR_GI	Desmin_GI	NF_GI	NSE_GI	Zytokeratin_GI	Periaxin_GI	FNCLCC	Mitosefiguren	Nekrosen	Tumordifferenzierung	Ki67_pos	Ki67_neg	Ki67_Index	Zellulartität	Neurofilament	Anzahl_pos_NFStruktur	CD90	NRG1	MZ_Tryptase	c-kit	S100	Claudin_1	Cl1_Verteilungsmuster	α_SMA_Tumorable	α_SMA_Färbemuster	zusammengefasst	Periaxin_ausführlich	Periaxin_zusammengef	NGFR_Färbeintensität	NGFR_Färbemuster	GFAP	Doppelfärbung_Färbemuster					
1	T5492/09-	10	1	13	3	3										1	5	0	2	15	190	7,32	205	3	2	3	1	2	25	0	2	1	0	0	0	0	2	1	0	0	1					
2	T7328/09	30	1	3	3	3										2	0	0	3	98	201	32,7	299	3	32	3	3	3	6		0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	1				
4	T7985/09	26	1	9	2	1										2	8	0	3	15	167	8,24	182	3	165	4	3	60		0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1					
5	T7965/09	30	2	9	3	1										1	7	0	3	7	255	2,67	262	3	33	3	2	6		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1					
6	T338/10-2	7	2	5	3	2										1	3	0	1	36	199	15,3	235	0	0	4	1	2	6		1	1	2	1	0	0	0	3	1	3	4	1	2			
7	T1946/10	22	1	13	3	2										1	7	0	2	27	92	22,6	119	2	10	3	1	3		0	0	0	1	0	0	0	3	1	0	0	1	2				
8	T2977/10-	9	1	14	2	3										1	8	0	2	35	260	11,8	295	2	159	3	3	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	3	1	2	2	1	1			
9	T3599/10	3	1	14	1	1										2	4	0	3	14	132	9,59	146	3	103	4	3	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	3	1	2	1	1				
10	T3647/10-	22	1	10	3	1										2	10	0	3	5	203	2,40	208	2	128	4	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	1	1			
11	T3673/10	30	2	3	1	1										1	5	0	2	179	53	77,1	232	3	3	3	2	0		1	2	1	0	0	1	1	3	1	3	2	1	1				
12	T4889/10	3	1	15	3	1										2	16	0	3	41	147	21,8	188	2	103	4	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	1	1				
15	T7304/10-	22	1	13	3	1	0	1	1	0	0					3	23	0	2	63	451	12,2	514	3	149	4	4	0		0	0	2	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1			
16	T7376/10	22	2	14	3	1										1	3	0	2	7	168	4,00	175	2	3	3	3	4		1	0	9	1	3	2	1	3	2	2	1	2	1	1	1		
18	T8098/10-	22	2	14	3	2	0	1	1	1		0	1			2	4	1	3	14	175	7,41	189	2	53	3	0	16		1	2	1	0	1	1	1	1	0	0	2	1	1	1			
19	T8098/10-	22	2	14	3	2	0	1	1	1		0	1			2	12	0	2	17	174	8,90	191	3	147	3	2	2	7	18	1	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	1				
20	T8630/10-	14	1	15	2	1										2	15	0	2	26	258	9,15	284	2	145	3	3	0		0	0	3	1	0	0	0	0	2	1	0	0	1	2			
21	T8685/10	28	2	8	2	1										1	1	0	2	141	103	57,7	244	2	9	2	2	9		1	2	1	1	5	1	0	0	2	1	0	0	1	2			
22	T125/11	16	1	13	2	1										3	15	0	3	37	390	8,67	427	2	94	4	0	2		1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	1	1	2		
23	T158/11	30	1	9	2	1										2	0	1	2	16	108	12,9	124	2	66	3	2	0		1	0	0	1	5	2	1	5	2	1	2	2	1	1	1		
24	T185/11-1	30	1	15	2	1										2	14	1	2	151	167	47,4	318	3	122	3	3	6		1	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1			
25	T1251/11	30	2	10	3	3										1	2	1	1	50	130	27,7	180	3	43	4	1	7	18		1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1			
26	T1264/11-	1	2	7	2	1				0						3	15	0	2	15	154	8,88	169	3	14	3	2	7		1	1	2	0	0	4	3	1	0	2	3	1	0	1			
27	T1427/11	22	1	8	3	1										3	3	0	3	47	245	16,1	292	3	2	2	4	2		0	1	2	0	1	2	0	1	1	2	1	2	4	1	1		
28	T2205/11	15	2	12	1	1										1	1	0	1	36	125	22,3	161	2	15	2	1	18		1	1	1	1	2	0	0	0	1	0	3	4	1	1			
29	T3290/11-	22	2	16	3	1	0	1	1		0			0		2	6	0	3	19	299	5,97	318	2	46	3	2	0		0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1		
30	T3511/11	22	1	15	3	1										2	30	0	2	40	224	15,1	264	2	3	4	3	0		1	2	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	1	1		
31	T3536/11	7	2	12	2	1										1	0	0	2	23	99	18,8	122	2	24	3	2	2		0	0	0	1	3	2	1	3	2	1	0	3	2	1	1		
32	T3725/11	22	2	16	3	1										1	5	0	2	25	244	9,29	269	2	144	4	3	0		1	2	1	0	0	4	3	1	0	0	3	1	0	0	1	1	
33	T3762/11	3	1	15	3	1										1	9	0	2	18	232	7,20	250	2	148	3	3	8		0	2	1	1	3	2	0	2	1	0	2	1	1	1	1		
34	T3788/11	22	1	13	3	1										1	1	0	2	34	124	21,5	158	2	39	3	2	0		0	2	1	0	2	1	0	2	1	0	0	2	1	1	1	2	
35	T5359/11	24	1	7	3	3										2	6	0	3	136	257	34,6	393	2	7	2	4	6		0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2	1	1	1	2		
36	T5619/11	20	2	9	3	3										1	2	0	2	10	150	6,25	160	2	202	3	1	0		0	2	1	0	1	0	1	1	1	0	3	3	1	1			
37	T5782/11	22	1	13	3	1										1	9	0	2	49	401	10,8	450	2	100	4	3	0		0	2	1	0	1	1	0	1	1	2	1	0	0	1	0	1	

OT_Nummer	T_Nummer	Rasse_kodiert	Sex_kodiert	Alter_berechnet	Lokalisation_kodiert	Diagnose_Gliessen	GFAP_GI	S100_GI	Vimentin_GI	NGFR_GI	Desmin_GI	NF_GI	NSE_GI	Zytokeratin_GI	Periaxin_GI	FNCLCC	Mitosefiguren	Nekrosen	Tumordifferenzierung	Ki67_pos	Ki67_neg	Ki67_index	Zellularität	Neurofilament	Anzahl_pos_NFStruktur	CD90	NRG1	MZ_Tryptase	c-kit	S100	Claudin_1	Cl1_Verteilungsmuster	α_SMA_Tumorvariable	α_SMA_Färbemuster	zusammengefasst	Periaxin_ausführlich	Periaxin_zusammengefa	NGFR_Färbemuster	NGFR_Färbemuster	Doppelfärbung				
61	T5693/12-	22	2	10	3	1										1	0	0	2	32	191	14,3	223	2	61	3	2	5		1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1		
62	T5684/12	22	1	11	3	1										1	1	0	2	11	167	6,18	178	2	13	4	2	1		0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1		
63	T5731/12	22	1	11	3	1										2	12	0	2	11	156	6,59	167	2	52	3	1	0		1	1	1	0	1	0	1	0	2	2	2	1	1		
64	T5824/12	22	1	13	3	3										1	5	0	2	84	120	41,1	204	2	45	3	2	4		1	2	1	0	1	1	1	1	0	2	3	1	1		
65	T5931/12	22	1	6	3	3										2	10	0	3	11	168	6,15	179	2	5	4	2	3		1	1	1	0	6	4	1	0	0	0	1				
66	T6090/12-	30	3		1	3			1	0					1	3	35	1	3	116	72	61,7	188	0	0	2	3	6		1	3	1	0	4	3	2	1	3	4	1				
67	T6259/12-	22	2	12	2	3										2	6	1	2	12	187	6,03	199	2	140	3	3	2		0	2	1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1		
68	T6607/12	22	1	6	2	2			1							1	2	0	2	12	285	4,04	297	0	0	4	4	0		1	1	1	2	0	0	0	0	3	1	3	4	1		
70	T6877/12-	22	2	10	2	1										2	0	1	2	17	117	12,6	134	2	43	2	2	2		1	1	2	0	0	0	0	0	2	1	1	2	1		
71	T6859/12-	8	1	12	3	1										1	5	0	2	11	164	6,29	175	2	93	4	3	0		1	3	2	0	1	1	2	0	1	1	2	1	3	2	1
72	T7257/12	6	2	10	1	1										1	0	0	1	12	100	10,7	112	0	0	1	3	1		1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	2	3	1	1	
73	T7489/12	22	2	5	3	1										2	4	0	3	107	196	35,3	303	3	12	2	3	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	
74	T90/13	27	2	12	3	1										2	13	1	2	38	211	15,2	249	2	126	2	2	3		0	3	1	0	6	4	1	0	3	3	1	1	1		
75	T240/13-1	19	2	11	3	1										2	13	0	2	33	300	9,91	333	2	95	3	3	9		1	3	1	0	2	1	1	0	2	2	2	1	1		
76	T1481/13-	22	1	5	3	1										2	20	0	2	23	171	11,8	194	2	108	4	3	3		1	3	2	0	1	1	2	1	2	3	1	1	1		
77	T1896/13	30	1	0,5	3	1										2	18	0	2	21	217	8,82	238	2	679	4	3	16		1	2	2	0	0	0	0	0	2	1	1	2	1	1	
78	T1938/13	2	2	9	3	1										2	6	1	2	8	162	4,71	170	2	294	4	2	2		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	1
79	T2523/13	30	2	11	3	1										1	6	0	2	55	133	29,2	188	2	26	3	2	30		1	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1		
81	T3469/13	23	2	9	3	1										2	10	0	2	21	197	9,63	218	2	67	4	3	1		0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	
82	T3537/13-	30	1	12	3	1										1	8	0	2	34	149	18,5	183	2	131	4	3	2		1	3	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	
83	T3797/13	5	1		3	1										1	4	0	2	18	218	7,63	236	2	171	3	3	2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
85	T6084/13	19	1	10	3	2			1						0	3	5	1	3	86	51	62,7	137	2	160	2	3	0		1	1	1	0	1	1	2	1	1	2	1	3	4	1	1
86	T6362/201	21	2	8	3	3				1					0	2	2	1	2	63	83	43,1	146	2	352	3	3	20		1	3	1	0	2	1	1	1	3	1	3	4	1	1	
88	T39/14	13	1	9	3	3			1	1					0	2	5	0	3	51	132	27,8	183	0	0	1	3	0		1	1	1	0	1	1	2	1	1	2	1	3	4	1	1

13.6 Rohdaten humanen peripheren Nervenscheidentumore

Tabelle 18: Codeplan zu Rohdaten humane periphere Nervenscheidentumore

Variablenname	Variablenlabel	Wert/Wertelabel
Patienten_Nr	Patientennummer	
E_Nr	E-Nummer zur Zuordnung des Tumors im System	
Alter_kalkuliert	Alter bei Entfernung des Tumors	
Sex	Geschlecht	weiblich = 1, männlich = 2, Leerzeile = keine Angabe
Tumortypen	Subtyp peripherer Nervenscheidentumor	1 = kutanes Neurofibrom, 2 = diffuses Neurofibrom, 3 = diffus-plexiformes Neurofibrom, 4 = plexiformes Neurofibrom, 5 = MPNST
Lokalisation	Lokalisation	1 = Kopf/Hals, 2 = Rumpf, 3 = Extremitäten
Rezidiv	Ist die untersuchte Tumorprobe ein Rezidiv oder nicht	1 = Tumorprobe ist ein Rezidiv, 0 = Tumor ist ein Primärtumor
FNCLCC	Grading für Weichteilsarkome (nur bei MPNST)	Leer = kein Sarkom, 1 = Grad I, 2 = Grad II, 3 = Grad III
Mitosenanzahl	Anzahl Mitosefiguren pro 10 Gesichtsfelder in der 40-fachen Vergrößerung (0,19 mm²)	
TMA_Name	Name des TMA	DNF01 = diffuse Neurofibrome, DNF02 = diffuse Neurofibrome, DPNF01 = diffus-plexiforme Neurofibrome, DPNF02 = diffus-plexiforme Neurofibrome, KNF01 = kutane Neurofibrome, KNF02 = kutane Neurofibrome, KNF03 = kutane Neurofibrome, MPNST = maligne peripherer Nervenscheidentumore, P/DPNF_DIF = diffus-plexiforme Neurofibrome (gemischter TMA), P/DPNF_PX = plexiforme Neurofibrome (gemischter TMA), PNF01 = plexiformes Neurofibrom, PNF02 = plexiformes Neurofibrom
TMA_Zeile	Zeilenposition des Tumors im TMA	
MTA_Spalte	Spaltenposition des Tumors im TMA	
Ki67_pos	alle Ki-67- positiven Zellen in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Ki67_neg	alle Ki-67- negativen Zellen (restliche Zellen) in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Ki67_Index	= Ki67_pos : (Ki67_pos + Ki67_neg) x 100	
Zellularität	= Ki67_pos + Ki67_neg	Anzahl der Zellen (Ki67-positive und negative addiert) in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)
Mastzellen	Anzahl Mastzellen pro TMA-Spot (0,79 mm²)	

EMA	Epitheliales Membranantigen	0 = negativ, 1 = Perineurium und/oder umwickelnde Strukturen positiv, 2 = multifokal Tumorzellen positiv, 3 = Perineurium und Tumorzellen positiv
Her-2/Erbb2	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2	0 = negativ, 1= perineurial/perivaskuläre Expression, 2 = einzelne Zellen positiv (netzartig)
Her-3/Erbb3	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3	0 = negativ, 1 = vermehrt negative Kerne sichtbar (0-80% Kerne positiv), 2 = negative Kerne sichtbar (> 80% bis < 100% Kerne positiv), 3 = alle Kerne (100%) positiv
Neurofilament	Neurofilament	0 = negativ, 1 = positive Axonen in intakten Nerven (wenn Nerv erkennbar und umgrenzt), 2 = einzelne Axone im Tumorgewebe
Anzahl_NFposStrukturen	Anzahl positiv angefärbte Axone, wenn bei Neurofilament mit 2 bewertet	Anzahl freier Neurofilament-positiver Axone
CD90	CD90	0 = negativ, 1 = perivaskuläre und/oder perineuriale Expression, 2 = perivaskuläre/perineuriale Expression u. Tumorzellen positiv, 3 = nur im Tumor
NRG1	Neuregulin-1	0 = negativ, 1 = schwache Expression der Tumorzellen, 2 = mittlere Expression der Tumorzellen, 3 = starke Expression der Tumorzellen
CD44	CD44	0 = negativ bzw. nur Monozyten positiv, 1 = schwach, d.h. 0-20% Tumorzellen positiv, 2 = multifokal-diffuse, d.h. > 20% bis < 100% der Tumorzellen positiv, 3 = stark, d.h. 100% der Tumorzellen positiv
Periaxin	Periaxin	0 = negativ, 1 = schwach, 2 = mittel, 3 = stark (jeweils diffus-multifokal)
mTor_pos	alle mTor-positiven Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
mTor_neg	alle mTor-negativen Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
mTor_pos_Index	= mTor_pos : (mTor_pos + mTor_neg) x 100	
Rho	Rho	0 = negativ, 1= schwach, d.h. 0-33% der Zellen positiv, 2 = mittel, d.h. > 33% bis 70% der Zellen positiv, 3 = stark, d.h. > 70-100% der Tumorzellen positiv
MEK		0 = negativ, 1 = positiv (einzelne Zellen)
p_MEK	phosphoryliertes MEK1 und 2	0 = negativ, 1 = schwach, d.h. > 0% bis 70% der Tumorzellen positiv, 2 = mittel, d.h. > 70% der Tumorzellen schwach bis mittelmäßig intensiv positiv, 3 = stark, d.h. > 70% der Tumorzellen mit einer starken Intensität positiv
Sox9_pos	alle Sox9-positiven Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Sox9_neg	alle Sox9-negativen Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Sox9_pos_Index	= Sox9_pos : (Sox9_pos + Sox9_neg) x 100	
S100_pos	alle S100-positiven Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
S100_neg	alle S100-negativen Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
S100_pos_Index	= S100_pos : (S100_pos + S100_neg) x 100	
A-SMA	α-smooth muscle actin	0 = negativ, 1 = Gefäßwände positiv, 2 = Gefäßwände und Perineurium positiv
GFAP	Saures Gliafaserprotein	0 = negativ, 1 = positiv
NGFR_Intensität	Intensität der Expression des Nervenwachstumsfaktors	0 = negativ, 1 =schwach, 2 = mittel, 3 = stark
NGFR_Verteilung	Expressionsverteilung des Nervenwachstumsfaktors	1 = 0-20% Tumorzellen positiv, 2 =20-50% Tumorzellen positiv, 3 = >50% Tumorzellen positiv, 4 = 100% Tumorzellen positiv
Pax7_pos	alle Pax7-positiven Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Pax7_neg	alle Pax7-negativen Zellkerne in einem Gesichtsfeld in der 40-fachen Vergrößerung (0,12 mm²)	
Pax7_pos_Index	= Pax7_pos + Pax7_neg x 100	

Tabelle 19: Rhodaten humane periphere Nervenscheidentumore
aufsteigend nach Tumortyp sortiert, 1 = dermales, 2 = diffuses, 3 = diffus-plexiformes, 4 = plexiformes Neurofibrom und 5 = MPNST

Patienten_Nr	E_Nr	Alter_kalkuliert	Sex	Tumortypen	Lokalisation	Rezidiv	FNCLCC	Mitosenanzahl	TMA_Name	TMA_Zeile	TMA_Spalte	Ki67_pos	Ki67_neg	Ki67_Index	Zellularität	Mastzellen	MZ_Index	EMA	Her2/ErbB2	Her3/ErbB3	Neurofilament	Nfpos_Strukturen	CD90	NRG1	CD44	Periaxin	Mtor_pos	Mtor_neg	Mtor_pos_Index	Rho	MEK	p_MEK	Sox9_pos	Sox9_neg	Sox9_pos_Index	S100_pos	S100_neg	α-SMA	GFAp	NGFR_Indensität	NGFR_Verteilung	Pax7_pos	Pax7_neg	Pax7_pos_Index	
2	E0069-06	57	1	1	3	0			KNF01	9	E			0,9	323	84	25,9	2	0	2	2	2	5	0	0	2	1	248	10	96,12	1	1	0	267	23	92,23	172	63	73,19			154	9	94,48	
10	E0734-06	54	1	1		0			KNF01	11	C			0,9	217	43	19,8	2	0	2	1	1	9	1	1	2	1	121	53	69,65	1	1	0	95	27	77,78	102	47	68,35		2	90	34	72,76	
15	E0661-05	39	1	1	3	1			KNF01	7	G			1	295	44	14,7	0	0	1	0		0	0	1	1	1	223	40	84,95	0	1	0	146	74	66,29	144	30	83			142	32	81,84	
17	E914-01	47	1	1	2	0			KNF01	2	E			1,3	154	63	40,6	0	2	3	0	0		0	0	1	2	161	31	84,07	1	1	0	105	32	76,92	114	53	68,37			64	23	73,99	
22	E0211-06	35	1	1	1	1			KNF01	9	G			1,9	260	97	37,3	3	0	2	0	28	1	0	2	0	221	34	86,64	2	1	0	208	40	84,04	162	44	78,83			126	32	79,68		
43	E836-01	32	2	1	2	1			KNF01	2	C			1,7	240	47	19,4	0	0	2	0	1	1	1	0	1	249	27	90,38	1	1	0	145	24	86,05	150	48	75,95			90	17	84,04		
45	E0039-05	28	2	1	3	1			KNF01	7	A			0,5	204	66	32,1	0	0	2	0	1	37	0	0	1	1	189	34	84,91	1	1	0	165	32	83,93	102	45	69,52			110	26	80,88	
47	E1071-06	18	1	1	2	0			KNF01	13	A			0,4	246	50	20,1	0	0	2	1	1	18	0	1	0	1	128	48	72,65	1	1	0	143	61	70,2	125	36	77,81		1	3	73	39	65,32
61	E1111-06	40	1	1	2	1			KNF01	13	E			1,2	170	48	28,2	1	0	3	0	0	0	0	0	2	0	178	27	87,04	1	1	0	159	33	83,03	130	42	75,8		2	3	126	46	73,18
93	E0907-04	21	1	1	2	0			KNF01	6	E			2,4	169	53	31,4	2	0	2	1	1	7	1	1	2	1	154	24	86,48	1	1	0	136	45	75,14	112	42	72,64			83	21	79,71	
142	E0927-06	25	1	1	2	0			KNF01	12	E			0,7	300	80	26,7	0	0	2	1	5	0	0	1	2	1	175	47	79,01	1	1	0	126	69	64,78	129	52	71,39		2	3	128	84	60,52
150	E0400-02	26	1	1	2	0			KNF01	3	G			1,5	266	123	46,1	0	0	3	2	10	1	0	2	2	176	30	85,61	0	1	0	125	50	71,35	105	61	63,14			62	45	57,75		
157	E0602-06	51	2	1	1	0			KNF01	10	G			1	291	46	15,8	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	181	41	81,53	1	1	0	166	58	74,22	151	40	79,21			85	50	62,96	
163	1074-05	59		1	2	1			KNF01	8	G			1,2	253	35	13,8	2	0	2	2	1	0	0	1	1	243	13	94,91	1	1	0	190	45	81,02	152	38	80,21			108	16	87,45		
188	E502-01	39	1	1	2	0			KNF01	2	A			1,4	143	89	61,9	3	0	3	0	0	6	1	1	2	165	36	82,29	1	1	0	116	34	77,59	123	42	74,47			116	11	91,7		
209	E134-01	37	2	1	2	0			KNF01	1	G			1,2	252	37	14,7	2	1	2	2	2	0	0	1	2	237	42	85,07	1	1	0	151	57	72,53	104	38	73,24			75	28	72,82		
222	E0168-05	23	2	1	2	0			KNF01	7	C			0,8	252	102	40,6	1	0	2	1	13	0	0	2	1	203	15	93,32	1	1	0	114	18	86,64	115	41	73,72			61	20	75,31		
224	E0463-04	31	2	1	1	0			KNF01	5	E			1,1	185	68	36,8	0	0	2	0		0	0	1	2	1	175	49	78,13	2	1	0	150	58	72,12	90	60	59,87			136	21	86,62	
235	E0296-02	49	1	1	2	0			KNF01	4	E			2,1	141	46	32,3	2	0	3	2	12	1	1	1	1	202	15	93,07	1	1	0	228	22	91,2	272	85	76,19			208	9	95,84		
278	E0839-06	44	1	1	2	1			KNF01	3	E			0,5	384	74	19,1	3	0	1	1	0	0	2	0	1	209	50	80,81	1	1	0	165	42	79,71	123	54	69,6			75	39	65,64		
278	E0432-06	38	2	1	2	1			KNF01	10	C			0,8	263	58	22,1	3	0	2	2	5	1	0	1	1	265	23	92,17	1	1	0	166	39	80,98	185	44	80,74		2	3	132	16	89,19	
313	E0383-05	39	2	1	2	1			KNF01	6	C			1,3	312	76	24,4	2	0	1	1	7	0	1	1	2	173	59	74,68	1	1	0	220	80	73,41	110	45	71,1			127	65	66,23		
334	E0027-02	62	1	1	0	1			KNF01	3	A			0,9	213	71	33,1	0	0	1	2	6	1	1	2	0	156	47	76,85	0	1	0	108	53	67,19	147	22	86,98			92	28	76,67		
434	E0323-02	38	2	1	2	0			KNF01	13	C			0,5	221	49	22,2	1	0	3	2	2	0	0	2	1	203	15	93,32	1	1	0	114	18	86,64	115	41	73,72			61	20	75,31		
443	E0158-04	29	2	1	2	0			KNF01	4	E			2,1	141	46	32,3	2	0	3	2	2	1	1	1	1	175	49	78,13	2	1	0	150	58	72,12	90	60	59,87			136	21	86,62		
445	E0339-06	44	1	1	2	1			KNF01	12	A			0,5	384	74	19,1	3	0	1	1	0	0	2	0	1	209	50	80,81	1	1	0	165	42	79,71	123	54	69,6			75	39	65,64		
457	E1066-05	56	1	1	3	1			KNF01	8	E			2,3	222	42	18,7	3	0	2	2	5	1	0	1	1	265	23	92,17	1	1	0	172	103	62,59	147	36	80,55			123	7	94,59		
462	E716-98	33	2	1	2	0			KNF01	1	A			0,8	130	36	27,7	0	0	2	0	2	1	2	1	0	111	30	78,72	1	1	0	66	32	67,35	77	61	55,64			105	11	90,52		
466	E0917-06	19	2	1	3	0			KNF01	11	E			0,8	252	102	40,6	1	0	2	1	13	0	0	2	1	203	15	93,32	1	1	0	151	57	72,6	109	44	71,15			62	49	55,91		
489	E1030-06	39	1	1	2	0			KNF01	13	C			0,5	221	49	22,2	1	0	2	2	2	0	0	2	1	175	49	78,13	2	1	0	149	47	75,96	118	48	71,08			88	50	63,77		
500	E0042-06	37	1	1	3	1			KNF01	9	A			0,5	384	74	19,1	3	0	1	1	0	0	2	0	1	147	72	67,28	1	1	0	136	68	66,58	117	39	75,16			84	77	52,17		
505	E094-01	46	1	1	2	0			KNF01	1	E			0,6	156	29	18,6	0	0	2	1	15	0	1	1	1	190	37	83,85	0	1	0	120	21	85,05	127	37	77,61			67	13	83,65		
512	E0975-04	40	1	1	2	0			KNF01	6	G			1,5	205	62	30,2	2	0	1	0		0	0	1	2	238	55	81,2	1	1	0	192	64	75,1	177	52	77,29			101	24	80,8		
521	E921-018	40	2	1	2	0			KNF01	2	G			0,4	233	31	13,2	1	0	2	0	0	0	1	1	0	147	65	69,54	0	0	0	144	51	74	128	42	75,22			73	37	66,21		
544	E0779-04	28	2	1	2	0			KNF01	6	A			0,4	233	31	13,2	1	0	0	1	9	1	1	1	1	133	43	75,57	2	1	0	167	25	86,98	119	40	74,84			103	25	80,78		
555	E0352-04	40	2	1	2	0			KNF01	5	C			4,4	160	55	34,1	0	0	1	1	16	1	0	1	2	132	38	77,58	1	1	0	56	33	62,71	80	46	63,75			85	25	77,63		
580	E0087-06	71	1	1	3	0			KNF01	9	C			0,8	252	79	31,2	2	0	2	2	2	2	1	0	1	174	35	83,45	1	1	0	129	45	74,06	167	44	79,15			110	22	83,27		
600	E368-00	61	1	1	2	0			KNF01	1	C			0,5	199	17	8,5	0	0	2	0	0	0	0	1	0	233	50	82,33	0	1	0	146	59	71,32	142	20	87,62			77	23	77,39		
608	E0318-04	39	1	1	1	0			KNF01	5	A			1,2	167	60	35,6	2	0	2	2	6	1	1	1	1	161	67	70,7	1	1	0	158	58	73,15	157	72	68,49					</		

Patienten_Nr	E_Nr	Alter_kalkuliert	Sex	Tumortypen	Lokalisation	Rezidiv	FNCLCC	Mitosenanzahl	TMA_Name	TMA_Zeile	TMA_Spalte	Ki67_pos	Ki67_neg	Ki67_Index	EMA	Her2/ErbB2	Her3/ErbB3	Neurofilament	Nfpos_Strukturen	CD90	NRG1	CD44	Periaxin	Mtor_pos	Mtor_neg	Mtor_pos_Index	Rho	MEK	p_MEK	Sox9_pos	Sox9_neg	Sox9_pos_Index	S100_pos	S100_neg	S100_pos_Index	α-SMA	GFAP	NGFR_Indensität	NGFR_Verteilung	Pax7_pos	Pax7_neg	Pax7_pos_Index		
262	E0168-12	48	1	1	2	0			KNF02	12	E			90	1								2	0	127	21	86,1				155	54	74,28	80	43	65,16								
267	E0167-08	64	1	1	2	1			KNF02	3	C			73	0	0		0				1	2	1	144	19	88,62				136	28	82,87	163	50	76,71								
283	E1174-08	32	2	1	2	0			KNF02	4	G		2,6	196	46	23,5	3	2	13	2		1	2	1	165	10	84,54				148	18	89,39	186	32	85,52								
322	E0087-10	43	2	1	3	1			KNF02	8	G		0	194	21	10,6	3	0				0	1	0	114	20	85,02				154	23	86,97	139	40	77,81								
429	E0755-08	57	1	1	1	1			KNF02	4	A		1,3	318	42	13,2	3	0				1	2	1	175	14	92,59				138	39	77,97	229	20	91,97								
446	E0343-11	31	1	1	2	0			KNF02	10	G			57	3			2	4	2		1	1	0	110	23	82,95				110	22	83,27	183	31	85,51								
447	E1020-10	47	2	1	2	1			KNF02	9	E			41	0			0				1	1	0	66	13	83,54				69	22	75,82	80	45	64,26								
454	E0422-09	30	2	1	2	0			KNF02	6	G		1,5	197	27	13,5	2	0			0	1	2	1	141	40	78,06				115	56	67,45	134	30	81,71								
456	E1157-10	55	1	1	2	1			KNF02	9	G		1,7	297	57	19,2	1	0	11	1	0	1	2	1	140	19	88,05				140	36	79,77	123	44	73,57								
464	E0538-10	38	1	1	1	0			KNF02	9	A			37	0			2				1	0	113	34	77,05				106	58	64,63	104	41	71,63									
467	E1222-08	48	1	1	2	0			KNF02	5	C		1	200	50	25	1	0	1	1	0	1	2	0	169	11	94,15				132	23	85,44	210	28	88,21								
471	E1339-09	20	1	1	3	0			KNF02	8	A			45	3	0		2	11			1	1	119	27	81,79				132	58	69,58	93	38	71,26									
494	E1184-09	24	1	1	2	0			KNF02	7	C		2,2	313	66	21,1	1	0	2			1	2	0	114	23	83,46				117	31	78,98	143	58	71,14								
515	E1404-09	31	1	1	2	1			KNF02	8	C			66	1			2	4			1	1	0	122	7	94,57				155	25	86,11	106	41	72,26								
526	E1048-12	45	1	1	1	0			KNF02	13	A		1,9	286	91	31,8	1	1	1		2	0	3	0	122	14	89,67				127	45	73,98	123	40	75,46								
547	E1200-07	15	1	1	3	1			KNF02	2	A		2,9	190	48	25,1	2	0	7	2	2	1	2	1	139	16	89,97				150	18	89,29	151	39	79,68								
553	E0144-08	37	2	1	2	1			KNF02	3	A			40	0								0	1	102	34	75,19				75	28	73,04	118	35	77,12								
555	E1479-09	46	2	1	3	1			KNF02	8	E			43	0			0				0	3	1	93	22	80,87				102	24	80,95	84	40	67,61								
569	E1189-12	49	1	1	1	0			KNF02	13	C			11	1			2						0	102	50	67,33				114	93	55,21	109	22	83,46								
598	E1343-07	51	2	1	3	1			KNF02	2	E		2,7	146	35	24,1	0	0	6		1	2	1	0	98	10	90,7				104	25	80,62	198	32	86,27								
603	E1017-09	19	2	1	2	1			KNF02	6	A			38	0			0				0	1	2	100	25	80,24				104	25	80,62	198	32	86,27								
604	E0110-09	61	2	1	1	0			KNF02	6	C		0,7	202	51	25,3	2	0			1	1	3	2	122	22	85,02				106	33	76,45	124	58	68,04								
618	E1283-07	36	1	1	1	1			KNF02	2	C		0,5	183	31	16,7	3	1	17	0	1	1	1	154	9	94,48				192	15	92,75	239	48	83,28									
639	E1033-07	40	1	1	2	1			KNF02	1	G			68	1			2	11			1	1	113	8	93,78				128	8	94,46	161	19	89,69									
645	E0099-09	15	2	1	1	1			KNF02	5	G			60	0			0				2	1	2	84	7	92,31				103	3	97,17	132	16	89,19								
659	E1473-11	37	2	1	1	0			KNF02	12	A			60			0					2	1	3	0	119	22	84,4				104	19	84,55	145	74	66,21							
663	E1449-12	49	1	1	2	1			KNF02	13	E			82	1			1				0	1	0	118	8	94,02				123	19	86,57	140	23	86,11								
672	E1324-09	44	2	1	3	1			KNF02	7	G			57	3			0				2	0	94	18	83,86				157	28	85,05	113	45	71,52									
1	E1032-05	46	1	1	2	1			KNF03	7	C			91	1			2	5	1		2	2	114	15	88,72				94	27	78,01	143	51	73,9									
19	E0258-04	52	1	1	3	1			KNF03	5	G		0,3	169	61	36,1	2				1	1	2	1	117	32	78,52				127	42	75,07	53	95	35,81								
39	E0638-06	49	1	1	2	0			KNF03	8	C		1,1	266	55	20,7	3		4	1	1	1	1	202	44	82,08				156	52	75,18	180	97	65,1									
43	E0402-04	34	2	1	3	1			KNF03	6	A		1,1	282	46	16,3	0		2	4	1	1	2	149	29	84,57				129	34	79,08	123	94	56,68									
57	E458-99	41	2	1	3	0			KNF03	1	E		2,6	329	59	17,8	1		2	4	2	2	3	207	33	86,22				173	15	92,02	152	48	76									
59	E683-00	16	1	1	3	0			KNF03	1	G		1,9	284	38	13,2	3		5	1	1	2	2	183	13	93,35				130	16	89	159	42	79,05									
77	E0893-04	29	1	1	2	1			KNF03	6	G		0,8	181	44	24,3	0		2	2	1	1	2	1	104	14	88,09				166	42	69,23	152	94	61,79								
111	E0329-09	48	1	1	3	0			KNF03	10	C			60	3			2	2	1	1	2	2	1	150	10	93,73				93	98	48,69	181	64	73,98								
112	E0154-08	42	2	1	3	1			KNF03	9	E		1,3	264	95	35,9	1		9	1	1	2	0	137	12	91,95				112	17	86,77	185	49	79,23									
113	E0265-03	44	2	1	2	0			KNF03	3	E				0			0				1	1	142	37	79,33				147	13	91,88	109	56	66,06									
131	E1018-07	46	1	1	2	0			KNF03	9	A			368		0		6				1	2	167	28	85,64				152	42	78,35	86	84	50,59									
180	E0729-08	30	1	1	2	1			KNF03	9	G		2	230	94	40,7	1		11	0	1	1	1	118	23	83,99				130	16	89	159	42	79,05									
213	E457-98	59	2	1	3	0			KNF03	1	C		0,9	445	86	19,2	1		2	4	1	1	3	110	46	70,42				95	42	69,23	152	94	61,79									
215	E0348-05	35	1	1	2	1			KNF03	7	A			118				2	6			1	1	170	27	86,29				166	42	79,81	138	77	64,19									
227	E0812-08	19	1	1	3	1			KNF03	10	A		2,9	289	51	17,7	3		1	1	1	2	2	119	25	82,87				100	40	71,58	101	60	62,73									
242	E0794-02	34	1	1	2	0			KNF03	2	E			102				2	1			2	182	15	92,6				140	12	92,11	218	38	85,13										
248	E1000-06	47	2	1	2	1			KNF03	8	G		2,7	245</																														

Patienten_Nr	E_Nr	Alter_kalkuliert	Sex	Tumortypen	Lokalisation	Rezidiv	FNCLCC	Mitosenanzahl	TMA_Name	TMA_Zeile	TMA_Spalte	Ki67_pos	Ki67_neg	MZ_Index	EMA	Her2/ErbB2	Her3/ErbB3	Neurofilament	Nfpos_Strukturen	CD90	NRG1	CD44	Periaxin	Mtor_pos	Mtor_neg	Mtor_pos_Index	Rho	MEK	p_MEK	Sox9_pos	Sox9_neg	Sox9_pos_Index	S100_pos	S100_neg	S100_pos_Index	α-SMA	GFAP	NGFR_Indensität	NGFR_Verteilung	Pax7_pos	Pax7_neg	Pax7_pos_Index				
32	E0201-08	51	1	2	3	1			DNF01	9	A			36,4	1	0			1	23	1	1	1	2	0	174	72	70,67	2			211	19	91,72	159	46	77,51					49	51	49,25		
44	E1086-09	34	1	2		1			DNF01	11	A			27,7	0	0		0		1	1	1	0	0	89	76	54,1	2			96	38	71,91	107	38	73,79					56	46	55,17			
58	E0192-08	38	2	2	3	1			DNF01	8	K			10,3	1	0		0		1	2	2	1	178	108	62,24	2			136	14	92,35	201	34	85,5					50	66	43,04				
60	E1107-10	24	1	2	1	1			DNF01	11	K			32,9		0		0		1	1	1	0	113	79	58,85	1			115	9	92,74	7	130	5,11					41	56	42,27				
73	E0301-02	9	2	2	3	0			DNF01	2	K			58,1	0	0		0		3			1	146	42	77,81	1			92	11	89,76	146	65	69,19					50	53	48,54				
106	E0690-08	28	1	2	2	0			DNF01	9	G			54,5	0	0		0		1			1	154	17	90,32	1			177	1	99,44								55	52	51,17				
111	E0331-09	48	1	2	1	1			DNF01	9	E			103,7	1	0		1	11	2	1	2	0	145	61	70,39	2			145	10	93,55	127	41	75,75					66	38	63,77				
115	E1099-09	39	2	2		0			DNF01	11	C			56,9	0	0		0		1	1	2	1	85	40	68,15	2			102	15	87,18	92	27	77,54					54	31	63,31				
123	E0716-05	10	1	2	3	0			DNF01	5	A			41,8	0	1		1	15	3	1	1	0	126	36	77,78				186	14	93														
163	E0965-04	58	1	2	1	1			DNF01	4	K					0		0		0			0	108	26	80,6				147	11	93,04														
173	E0018-02	23	2	2	3	0			DNF01	1	G			47,7	0	0		0		1			1	199	37	84,29	1			134	9	93,71	107	72	59,83					64	32	66,49				
173	E0367-04	26	2	2	3	1			DNF01	4	E			78		0		0		0			0	164	100	62,17	0			73	18	80,56	104	114	47,7					14	83	13,99				
183	E0131-08	25	1	2	3	0			DNF01	8	G			70,5	0	0		0		0			1	78	51	60,7				116	15	88,55	120	41	74,53					47	53	47				
226	E007-00	38	1	2	3	0			DNF01	1	A			105,9	0	0		0		1	1	1	0	51	62	44,89	1			33	18	64,71	35	73	32,41					0	71	0				
241	E0971-12	35	2	2		0			DNF01	14	A			6,3	2	0	2	2	250	2	1	0	0	210	44	82,84				145	10	97,18	65	46	58,64					77	25	75,49				
281	E1540-11	41	1	2	2	0			DNF01	12	K			9,4	2	0		0		1	0		0	53	49	51,96	1			72	14	83,72	39	51	43,33		0	2	4	137	76	64,24				
301	E1198-09	41	2	2	3	1			DNF01	11	E			104,8	0	0		0		1	0	1	0	169	94	64,19	2			154	30	83,65	163	58	73,86					94	39	70,57				
314	E279-01	38	2	2	3	1			DNF01	1	K			189	198	0		0		0			1	167	28	85,86	1			121	5	96,02	152	65	70,05					46	47	49,46				
459	E0392-02	42	1	2	3	0			DNF01	3	A			192	47	0		0		2	2	1	2	207	44	82,63	0			170	18	90,64	124	50	71,18					56	47	54,15				
325	E0462-02	43	2	2	3	0			DNF01	3	C			24,2	0	0		0		2	2	1	2	71	42	62,83				71	6	92,21	138	61	69,35					58	31	65,17				
332	E698-00	56	2	2	1	0			DNF01	1	C			95,5	0	0		0		1	1	1	2	104	0	100				80	4	95,24														
348	E1310-07	20	1	2	2	1			DNF01	7	G			64,4	0	0		2	5	1	1	0	0	104	0	100				118	9	93,28	153	31	83,33					34	36	48,2				
351	E1254-07	47	2	2	1	1			DNF01	7	E			27,1	0	0		0		0	1	2	1	97	48	66,9	2																			
352	E0323-07	25	2	2	1	0			DNF01	6	E			0	0			0		1	0	0	0	54	8	87,7	2			46	1	97,85	47	23	67,63					38	10	78,95				
386	E0070-10	63	1	2	3	1			DNF01	11	G					1		0		1			1	99	55	64,38	1			112	18	86,43	144	24	85,71					25	56	30,86				
414	E0666-07	14	2	2	1	1			DNF01	6	K			23,9		0		0		1	2	1	0	86	25	77,09	2			97	8	92,82	51	32	61,21					51	16	75,94				
435	E1339-07	18	1	2	2	1			DNF01	8	A			0	0	0	2	0		0			0	157	118	57,09	2			0	143	12	92,26	74	106	41,11		0	3	4	102	66	60,9			
458	E0359-11	28	1	2	1	0			DNF01	12	E			67,9	0	0		0		0	2	1	2	216	66	76,69	1			140	16	89,71	169	54	75,96					22	89	19,91				
459	E0392-02	42	1	2	3	0			DNF01	3	A			158	38	0		0		1	0	1	0	120	51	70,38	2			100	10	90,87	146	18	88,99					35	47	42,94				
463	E0790-03	31	2	2	2	1			DNF01	3	E			23,7	0	0		0		1	2	1	1	120	51	70,38	2			127	13	91,04	150	12	92,57					50	49	50,25				
463	E1382-08	36	2	2	2	1			DNF01	9	C			224	28	0		1	12	0	2	1	0	155	55	73,75	1			0	150	5	96,77	184	30	85,98					0	1	4	156	43	78,39
470	E0166-11	30	1	2	1	0			DNF01	12	C			300	66	0	2	0		1	1	3	0	123	46	72,7	2			0	154	7	95,65	63	29	68,68		0	2	4	80	72	52,65			
492	E0611-12	36	2	2	3	0			DNF01	13	C			169	88	0	2	1	9	1	1	2	0	141	42	77,05	2			145	18	88,92	102	37	73,65					52	37	58,76				
504	E0106-08	27	1	2	1	0			DNF01	8	E			161	57	0	0	0		2	1	1	0	119	50	70,41	1			139	17	89,35	163	55	74,71					54	41	56,61				
523	E0769-07	15	1	2	3	1			DNF01	7	A			162	73	1	1	0		1	1	2	0	129	49	72,6	2			148	5	96,72	48	125	27,54					58	54	51,8				
527	E0122-06	48	1	2	3	0			DNF01	5	G			242	33	0	0	0		2	0	0	0	198	41	83,02	1			195	1	99,49	175	30	85,37					62	28	68,89				
539	E0029-04	28	1	2	3	0			DNF01	4	A			150	62	0	0	0		1	1	0	0	75	38	66,37	1			66	13	84,08	54	78	40,91					42	49	46,15				
578	E0809-12	36	1	2	3	0			DNF01	13	E			142	110	0	2	2		3	0	2	1	188	66	74,11	1			139	17	89,07	196	23	89,7		0	3	4	93	18	83,78				
581	E888-01	35	1	2	3	1			DNF01	2	C			78	83	0		0	52	1	1	1	1						1																	
588	E0296-06	28	2	2	2	0			DNF01	5	K			153	54	0	0	0		0	0	1	0	105	46	69,44	2			71	6	90,11									51	38	57,39			
593	E0124-09	34	1	2	1	1			DNF01	10	A			138	11	0	0	0		1	2	1	0	90	8	91,79	1			149	10	94,01	220	34	86,76					45	13	77,59				
595	E0892-09	16	1	2		0			DNF01	10	G			222	83	0		1	54	2	1	2	0	186	80	70,06	1			136	13	91,55	144	47	75,59					45	50	47,09				
598	E1342-07	51	2	2	1	1			DNF01	8	C			125	53	0	1	0		1	2	2	0	110	51	68,54	2			140	16	89,71	132	23	85,39					32	29	52,89				
610	E0829-07	20	1	2	1	1			DNF01	7	C			219	13	0		0		2	2	1	1	217	63																					

Patienten_Nr	F_Nr	Alter_kalkuliert	Sex	Tumortypen	Lokalisation	Rezidiv	FNCCLC	Mitosenanzahl	TMA_Name	TMA_Zeile	TMA_Spalte	Ki67_pos	Ki67_neg	Ki67_Index	EMA	Her2/ErbB2	Her3/ErbB3	Neurofilament	Nfpos_Strukturen	CD90	NRG1	CD44	Periaxin	Mtor_pos	Mtor_neg	Mtor_pos_Index	Rho	MEK	p_MEK	Sox9_pos	Sox9_neg	Sox9_pos_Index	S100_pos	S100_neg	α-SMA	GFAP	NGFR_Indensität	NGFR_Verteilung	Pax7_pos	Pax7_neg	Pax7_pos_Index						
287	E1014-05	40	2	3	2	0			DPNF01	1	E			37,9	0	0	0	0	0	3	1	1	1	1	126	61	67,56	2			94	20	82,82	180	44	80,25					57	39	59,47				
298	E0117-08	15	2	3	2	0			DPNF01	5	C			1,1	89	43	0	0	0		3	1	1	0	106	38	73,78	1			118	12	91,09	70	31	68,98					26	32	44,74				
313	E0052-09	43	2	3	1	1			DPNF01	7	K			3	101	77	75,7	1	0		1	1	1	0	161	31	84,03	2			108	31	77,98	125	34	78,86					47	33	58,86				
328	E1004-09	55	1	3	2	0			DPNF01	9	C			0,8	124	78	62,5	1	0	2	17	0		1	131	39	76,99	1			132	23	85,44	131	38	77,78					41	42	49,39				
343	E0272-04	6	2	3	2	0			DPNF01	1	A			6,9	145	44	30,3	2	0		0	0	2	1	140	43	76,5	1			150	27	84,7	184	35	83,94					49	64	43,36				
351	E1252-07	47	2	3	2	1			DPNF01	4	F			0,9	215	58	26,8	0	0		0	0	2	1	140	43	76,5	1			150	27	84,7	184	35	83,94					49	64	43,36				
352	E0324-07	25	2	3	2	1			DPNF01	3	A			0,7	144	56	38,9	1	0	2	74	0	1	1	78	45	63,41	1			62	17	78,98	144	43	77,04					37	38	48,99				
354	E1515-09	50	2	3	2	0			DPNF01	1	K			1,5	261	38	14,6	1	0	2	12	0	1	1	223	83	72,95	2			142	57	71,36	46	19	70,5	0	1	2	70	56	55,38					
369	E0813-06	16	2	3	1	0			DPNF01	9	K			0,3	147	23	15,4	0	0		0	0	0	79	51	60,85	2			64	28	69,4	78	31	71,4					34	30	53,13					
370	E0514-10	29	2	3	3	0			DPNF01	11	A			0	109	28	25,7	1	0	5	1	1	2	82	35	70,09	1			0	83	22	79,33	118	33	78,37					3	3	67	40	62,44		
385	E0862-11	17	2	3	0	0			DPNF01	12	B			2,6	189	38	20,1	1	0	3	1	1	2	164	38	81,39	1			0	101	35	74,26	124	34	78,41					2	3	45	64	41,28		
400	E1438-12	20	2	3	2	1			DPNF01	12	D			2,2	181	32	17,4	1	0	4	3	1	1	174	41	80,89	3			0	146	35	80,66	90	42	68,12					3	135	55	71,05			
426	E0697-07	6	2	3	2	0			DPNF01	3	E			2	154	8	4,9	0	0	8	0	2	0	121	9	93,41	0			96	11	90,09	221	35	86,3					38	22	63,03					
445	E0037-07	44	1	3	1	1			DPNF01	2	F			0,8	256	63	24,4	0	0		1	2	0	0	151	53	74,2	1			154	52	74,76	181	52	77,85					79	47	62,95				
463	E1328-08	36	2	3	3	1			DPNF01	9	E			0,6	177	28	15,8	1	0	2	0	0	1	0	234	25	90,5	0			0	131	25	84,19	78	13	85,64					4	38	46	45,18		
474	E0128-06	20	1	3	3	0			DPNF01	1	G			2,5	157	62	39,2	1	0	42	0	1	1	0	200	51	79,68	1			128	34	79,19	215	54	80,06					42	76	35,32				
478	E1476-08	29	2	3	1	0			DPNF01	7	E			2,5	139	62	44,4	0	0	1	1	1	2	0	115	35	76,67	2			147	14	91,3	156	32	83,11					35	42	45,1				
486	E1027-07	26	2	3	3	0			DPNF01	3	G			1,1	176	90	50,9	1	0	5	0	0	1	2	192	85	69,31	1			128	32	80	147	66	69,02					65	58	53,06				
500	E0174-09	40	1	3	3	1			DPNF01	8	F			1,4	143	64	44,4	1	0	7	1	1	3	1	135	51	72,78	1			148	30	83,33	118	31	79,16					66	43	60,83				
504	E1297-08	28	1	3	1	1			DPNF01	7	A			2,7	93	71	76,2	1	0	1	1	1	2	0	93	16	85,65	1			102	7	94,01	110	28	79,53					45	31	58,94				
518	E0142-09	10	1	3	1	1			DPNF01	8	D			2,6	116	73	62,9	1	0	2	5	0	0	1	163	33	83,33	1			171	45	79,12	120	46	72,44					16	129	11,07				
520	E0587-10	6	2	3	2	0			DPNF01	11	C			2,6	116	73	62,9	1	0	2	5	0	0	1	163	33	83,33	1			1	142	45	76,08	83	65	56,2					124	46	72,86			
538	E1158-07	8	1	3	1	1			DPNF01	3	K			1,5	131	34	25,6	1	0	2	119	2	0	0	94	32	74,5	0			96	10	90,95	88	44	66,67					8	52	13,33				
555	E1480-09	46	2	3	2	1			DPNF01	9	G			2,2	91	42	46,2	1	0	0	0	0	2	0	93	28	76,86	0			0	92	24	79,65	85	29	74,95					57	52	52,31			
566	E0480-07	6	1	3	3	0			DPNF01	3	C			1,4	147	42	28,6	1	0		0	0	1	2	194	25	88,56	1			149	10	93,71	164	44	79,04					52	43	54,5				
585	E0767-08	39	1	3	1	1			DPNF01	6	B			0,7	137	68	49,5	0	0		0	0	0	1	0	102	57	64,04	1			123	27	82	115	20	85,13					23	40	36,51			
593	E0049-09	34	1	3	1	0			DPNF01	7	G			0,9	117	63	53,8	0	0		0	0	1	0	101	66	60,66	2			124	44	74,03	108	30	78,51					37	41	47,44				
610	E1222-07	20	1	3	1	1			DPNF01	4	B			0,5	215	8	3,5	0	0		0	0	1	2	0	197	23	89,73	0			115	11	91,63	139	36	79,69					0	99	0			
12	E1087-06	37	2	3	2	0			DPNF02	11	E			1,4	141	37	26,2	1	0		0	0	1	2	82	11	66	60,66	2			0	99	13	88,74	122	30	80,46					16	129	11,07		
13	E516-01	17	2	3	3	0			DPNF02	5	C			11,4	150	63	41,8	1	0	2	1	1	2	2	108	57	65,55	0			0	110	23	83,02	87	35	71,31										
19	E0259-04	52	1	3	1	1			DPNF02	8	H			0	184	25	13,6	1	0		0	0	1	2	1	94	23	80,26	0			91	21	81,25	72	31	69,9										
32	E0106-04	47	1	3	2	1			DPNF02	8	D			3,9	103	139	134,5	0	0		0	0	2	1	87	28	75,98	1			0	103	15	87,61	121	51	70,47										
45	E245-01	24	2	3	3	1			DPNF02	3	K			0,8	189	60	31,6	1	1	2	27	3	1	0	131	42	75,72				0	168	27	86,15	58	46	55,77										
47	E1074-06	18	1	3	2	0			DPNF02	11	C			0,6	158	52	32,6	1	1	1	1	3	1	2	124	43	74,25				0	117	35	77,15	150	42	78,27										
62	E725-98	61	2	3	2	1			DPNF02	1	E			2,2	134	77	57,5	2	0	0	0	0	1	2	106	31	77,57				0	116	17	87,17	120	51	70,18										
82	E0274-05	10	1	3	1	0			DPNF02	9	K			4,4	124	31	25	1	2	24	2	1	1	1	168	18	90,3				0	114	10	92,28	87	38	69,6										
93	E0904-04	21	1	3	2	0			DPNF02	9	E			3,8	212	40	18,9	3	1	5	1	1	2	1	225	38	85,55				139	34	80,35														
97	E0127-02	15	2	3	2	1			DPNF02	7	E			1,9	162	73	45,2	1	1	9	2	1	0	1	126	78	61,67				0	83	38	68,88	101	31	76,52										
105	E0459-07	23	2	3	1	0			DPNF02	12	B			0,7	151	45	29,9	1	0	4	0	1	2	1	101	28	78,6				0	95	23	80,85	149	38	79,84										
107	E721-98	38	2	3	1	0			DPNF02	1	C			0,5	194	84	43	3	0	2	10	0	1	2	123	47	72,35	1			1	0	117	31	79,25	149	39	79,41									
108	E325-00	34	1	3	3	0			DPNF02	2	F			0,6	246	81	33	0	0		0	0	1	0	135	45	74,93				0	146	56	72,21	112	42	72,64										

Patienten_Nr	F_Nr	Alter_kalkuliert	Sex	Tumortypen	Lokalisation	Rezidiv	FNCCLC	Mitosenanzahl	TMA_Name	TMA_Zeile	TMA_Spalte	Ki67_pos	Ki67_neg	Ki67_Index	MZ_Index	EMA	Her2/ErbB2	Her3/ErbB3	Neurofilament	Nfpos_Strukturen	CD90	NRG1	CD44	Periaxin	Mtor_pos	Mtor_neg	Mtor_pos_Index	Rho	MEK	p_MEK	Sox9_pos	Sox9_neg	Sox9_pos_Index	S100_pos	S100_neg	S100_pos_Index	α-SMA	GFAP	NGFR_Indensität	NGFR_Verteilung	Pax7_pos	Pax7_neg	Pax7_pos_Index		
682	E1783-11	40	2	4		0			PNF01	9	K			2,2	178	6	3,4	0	0	3	0	149	3	3	1	1	194	7	96,75	2	1	1	88	4	96,15	143	69	67,54		0	3	3	81	35	69,83
695	E0838-04	16	1	4	1	0			PNF01	2	E			0	117	2	1,7	3	3	0	3	1	0	0	0	117	7	94,74	1	1	0	161	10	94,41	150	48	75,95					85	14	85,86	
24	E3355-01	33	2	4	2	1			PNF02	5	A				10		0	0	5	1	5	0	0	0	2	81	15	84,74				88	6	94,12	75	44	63,14	2							
31	E0561-04	14	1	4		0			PNF02	8	K			3,4	59	14	23,7	1	0	0		1	2	0	3	47	3	94				34	3	91,89	39	32	54,93								
32	E059-01	44	1	4	3	1			PNF02	3	E				32		2	0	0	2	2	1	1	3	135	35	79,41				145	31	82,39	123	88	58,29	1								
38	E345-00	15	2	4	2	0			PNF02	2	K			0,5	106	4	3,8	1	0	7	0	3	0	1	120	4	96,77				101	10	90,99	125	45	73,75	1								
68	E0551-05	46	1	4	1	1			PNF02	10	A			0	47	7	14,9	0	0	0	0	3	0	2	53	3	94,59				54	0	100	34	25	57,76	1								
84	E0297-03	17	1	4	2	1			PNF02	8	A				9		2	0	0	0	1	3	0	0																					
97	E0124-02	15	2	4	2	1			PNF02	7	C			0	33	8	24,2	0	0	2	4	1	3	0	1	38	1	97,44				39	2	95,12	45	25	64,29	1							
104	E209-01	36	1	4	2	1			PNF02	3	K				6		0	0	2	44	0	3	0	1	48	24	67,13				48	26	65,31	91	44	67,29	1								
109	E974-01	59	2	4	3	0			PNF02	15	K			0,5	202	15	7,2	2	0	0	0	3	0	1	116	10	92,06				116	18	84,51	95	39	70,79	1								
119	E097-98	47	2	4	2	1			PNF02	1	K			0	108	8	7,4	0	0	0	0	3	0	2	34	28	54,47				76	11	87,36	202	53	79,17	1								
134	E1006-05	37	2	4	3	0			PNF02	10	E			0	124	9	6,9	0	0	2	1	1	3	0	2	130	10	93,19				108	5	95,56	177	45	79,86	1							
146	E229-91		2	4	1	0			PNF02	1	A			0,7	141	9	6	0	0	2	35	1	3	1	2	107	23	82,24				97	16	86,16	76	45	62,66	1							
148	E0047-02	6	2	4	1	0			PNF02	7	A			1,2	81	7	8	0	0	2	36	0	3	0	0	49	7	87,39				66	0	100	107	45	70,39	1							
152	E0981-06	3	2	4	2	0			PNF02	11	A			1,4	37	6	15,1	1	0	2	29	2	3	1	2	30	2	95,24				24		100	28	26	51,85	2							
153	E1096-09	55	1	4	3	1			PNF02	13	K			0,8	123	4	2,8	0	0	2	4	1	3	0	0	80	4	95,78				103	1	99,04	50	23	68,49	1							
159	E0774-03	14	2	4	3	1			PNF02	8	C			1,4	142	6	4,2	2	0	0	0	2	1	0	96	9	91,43				113	11	91,13	117	43	73,13	1								
160	E0543-07	5	2	4		0			PNF02	11	E			0,7	145	6	3,8	1	0	2	36	1	3	0	2	51	7	88,6				89	5	94,68	96	42	69,57	2							
168	E669-97	32	1	4	3	0			PNF02	1	G			1,5	68	4	5,9	2	2	2	120	0	3	0	3	50	19	72,46				24	13	64,86	88	72	55	1							
185	E0822-12	30	1	4		0			PNF02	16	C				52	6	10,6	0	0	2	79	0	3	0	0	56	2	96,52				61		98,39	72	22	76,47	1							
191	E1297-11	16	1	4	3	0			PNF02	15	A			0,4	120	12	10	2	0	2	46	0	3	0	1	69	7	90,79				42	2	96,55	52	24	68,42	1							
210	E0437-05	12	1	4	1	1			PNF02	9	K			0,9	53	7	13,2	2	2	2	13	0	3	1	1	54	1	98,18				42	3	93,26	72	23	75,79	1							
212	E0140-03	53	1	4	2	1			PNF02	7	K				46	6	12	0	0	2	120	0	3	0	0	36	5	87,65				32	5	87,67	55	18	75,34	0							
223	E0850-09	12	2	4	2	0			PNF02	13	G			1,1	46	2	3,3	3	0	2	19	1	3	0	2	35	1	97,18				53	0	100	49	22	69,29	2							
237	E1416-11	11	1	4		0			PNF02	15	C					2		0	0	2	2	1	3	0	1	70	5	93,92				55	1	98,2	116	19	85,87	1							
247	E0620-06	20	2	4	3	0			PNF02	10	G			0	56	14	25	0	0	0	0	3	0	0	34	2	95,71				38	3	92,59	74	29	72,2	1								
274	E960-01	16	1	4	1	0			PNF02	6	G			2,8	196	7	3,3	0	2	2	200	3	3	1	1	109	10	91,6				111	8	93,25	92	47	66,19	1							
295	E227-01	19	2	4	1	1			PNF02	4	A			0	139	17	11,9	0	0	0		1	3	1	0	141	13	91,53				108	7	93,91	68	49	58,12	1							
322	E0088-10	43	2	4	2	1			PNF02	14	E			5,6	180	4	2,2	0	0	0		0	3	1	2	138	1	99,28				119	0	100	137	35	79,59	1							
327	E924-01	61	2	4	3	0			PNF02	6	C			0	59	17	28,8	2	2	2	7	0	3	1	3	73	5	93,55				75	1	98,68	96	47	67,13	1							
331	E1273-07	9	1	4	1	1			PNF02	12	A			3,4	118	4	3,4	0	0	0		0	3	1	1	50	4	92,59				58	2	96,67	50	23	68,49	1							
344	E163-01	26	1	4		1			PNF02	3	G			0,6	87	16	18,5	3	0	2	7	0	1	1	3	114	9	92,68				118	16	88,06	184	56	76,67	1							
351	E0820-02	42	2	4	1	0			PNF02	7	G					28		0	0	2	200	2	2	1	2	56	10	84,85				78	7	91,76	103	42	71,03								
381	E0807-06	1	2	4	1	0			PNF02	10	K			0,6	78	8	10,3	3	0	2	60	1	3	0	3	39	3	92,86				28	13	68,29				2							
381	E1119-06	1	2	4	3	1			PNF02	11	G			6,4	118	4	3,4	1	1	2	2	1	3	1	2	87	2	97,74				70	3	96,53	159	54	74,76	2							
389	E795-00	26	2	4	3	0			PNF02	3	C			3,2	172	14	7,8	1	2	0		2	1	2	3	173	6	96,64				136	1	99,27	73	31	70,19	2							
393	E0314-05	12	1	4	2	0			PNF02	9	G			0,5	96	7	7,3	0	0	2	78	0	3	0	3	51	4	93,58				43	3	94,44	133	34	79,82	1							
400	E490-93	2	2	4	1	0			PNF02	1	C			2,8	143	3	1,7	0	0	2	75	1	3	1	2	137	3	97,86				109	3	97,32	238	62	79,33	1							
415	E0836-04	38	1	4	1	0			PNF02	9	C			2,6	97	8	8,3	0	0	0		0	3	1	2	66	3	96,32				80	1	99,38	57	44	56,5	2							
422	E1308-09	19	1	4		0			PNF02	14	A			0	36	14	37,5	2	0	2	119	0	3	0	1	28	5	84,85				37	2	94,87	34	24	58,26	1							
438	E799-01	12	2	4	1	0			PNF02	5	K			0,7	70	10	14,4	1	0	2	15	1	3	0	3	62	3	95,35				55	2	96,49	52	31	62,8	2							
450	E900-01	38	1	4	1	1			PNF02	6	A			1	203	16	7,6	0	0	2	200	0	3	2	1	136	26	84,16				215	0	100	75	43	63,56	1							

Patienten_Nr	E_Nr	Alter_kalkuliert	Sex	Tumortypen	Lokalisation	Rezidiv	FNCLCC	Mitosenanzahl	TMA_Name	TMA_Zeile	TMA_Spalte	Ki67_pos	Ki67_neg	Ki67_Index	Zellulartität	Mastzellen	MZ_Index	EMA	Her2/ErbB2	Her3/ErbB3	Neurofilament	NFpos_Strukturen	CD90	NRG1	CD44	Periaxin	mtor_pos	mtor_neg	Tor_pos_Index	Rho	MEK	p_MEK	Sox9_pos	Sox9_neg	Sox9_pos_Index	\$100_pos	\$100_neg	\$100_pos_Index	α-SMA	GFAP	NGFR_Indensität	NGFR_Verteilung	Pax7_pos	Pax7_neg	Pax7_pos_Index					
538	E1159-07	8	1	4	2	1			PNF02	11	K			2,9	103	3	2,9	2	2	2	0	0	0	2	1	2	108	3	97,29						91	7	92,82	96	43	69,06	1									
550	E317-01	25	1	4	2	1			PNF02	4	G			0	72	11	15,3	0	0	0	2	1	0	3	0	2	76	5	93,83						54	6	90	61	32	65,59	1									
576	E0285-12	9	1	4	1	0			PNF02	15	E			0,7	152	6	4	1	1	1	2	65	2	3	1	2	130	2	98,86						79	0	100	119	56	68	2									
581	E884-01	35	1	4	2	1			PNF02	5	G			1,2	82	9	11	1	0	0	2	67	2	3	1	1	50	8	86,21						61	6	91,04	97	17	85,09	1									
589	E0754-12	14	2	4	1	0			PNF02	16	A			4	151	10	6,6	1	0	0	2	200	3	3	0	2	29	2	93,55						29	2	93,55	88	36	71,26	1									
602	E0777-08	30	1	4	1	1			PNF02	12	G			1,7	151	5	3,3	0	0	0	2	9	0	3	0	0	69	12	85,63						82	4	95,91	75	35	68,35	1									
620	E0890-08	12	2	4	1	0			PNF02	13	A			0,9	58	9	15,7	0	2	2	2	42	0	3	0	2	55	10	85,16						64	0	100	75	35	68,35	1									
638	E1007-08	25	2	4	1	1			PNF02	13	C			2,5	81	9	11,1	1	0	0	2	1	0	3	1	2	46	2	95,79						75	1	98,68	32	23	58,33	1									
638	E0363-09	26	2	4	1	0			PNF02	13	E			0	37	10	26	0	0	0	2	5	0	3	0	0	21	2	91,3						33	0	100	28	18	60,87	1									
644	E1053-06	19	1	4	1	1			PNF02	11	C			1,3	159	12	7,2	0	0	0	2	200	0	3	1	1	155	3	98,41						115	3	97,46	207	51	80,23	1									
655	E454-98	6	1	4	1	1			PNF02	2	A			0	75	13	17,3	1	0	0	2	14	2	3	0	3	86	10	90,05						89	0	100	93	35	72,66	1									
700	E1027-12	18	1	4	1	1			PNF02	16	E			0,8	124	7	5,7	2	2	2	2	29	3	1	1	1	68	7	90,6						89	0	100	93	35	72,66	1									
1001	E54-90			5			2	6	MPNST	1	A			15,1	754	2	0,3	0	0	0	3	2	11	1	0	2	107	234	31,28	2	0	0	384	0	100	6	443	1,34	1											
1002	E011-94			5			3	6	MPNST	1	C			16	686	0	0	0	0	0	3	0	2	1	0	2	596	0	100	2	0	0	686	0	100	5	371	1,2	1											
1003	E624-00			5					MPNST	2	A			24,2	360	16	4,4	0	0	0	3	0	2	2	1	1	360	0	100	2	1	1	196	0	100	8	252	2,9	1											
1004	157102-02			5			2	8	MPNST	3	E			8,3	617	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	1	617	0	100	3	0	0	617	0	100	11	493	2,09												
1005	483-07			5			3		MPNST	5	A			33,2	614	0	0	0	2	3	2	22	1	2	1	2	614	0	100	2	0	2	614	0	100	0	410	0	0											
1006	276-2009			5			2		MPNST	6	A			14,1	694	7	0,9	0	0	0	3	0	2	1	0	3	694	0	100	3	0	2	334	167	66,67	213	106	66,77												
1007	E0852-09	17	1	5	2	0	2		MPNST	6	C			12,9	909	9	1	0	0	0	3	2	54	2	1	0	2	909	0	100	0	0	426	0	100	5	426	1,16												
1008	E864-97	35	1	5	2	0	1	6	MPNST	1	G			17,8	107	8	7,5	0	0	0	3	2	44	2	1	1	2	107	0	100	1	1	0	107	0	100	23	123	15,75											
1009	E1184-06	52	2	5	0	0	2		MPNST	4	E			0	29								2	1	1	1	231	0	100	3	1	1	260	0	100	63	172	26,87												
1010	E1108-09	51	1	5	2	1	3	2	MPNST	7	A			28,1	185	19	10,3	0	0	0	3	0	2	1	3	2	185	0	100	3	0	224	0	100	0	104	0	0												
1011	E494-97	32	2	5	2	0	2	6	MPNST	1	E			30,2	179	0	0	0	0	0	3	0		2	1	1	0	217	0	100	1	1	179	0	100	41	137	22,88												
1012	E0534-04	41	1	5	2	0	2		MPNST	3	G			7	256	56	21,9	0	0	0	3	0	2	1	1	2	1	256	0	100	3	1	2	261	0	100	107	189	36,04											
1013	E0077-07	21	2	5	3	0	3		MPNST	4	G			18,1	847	0	0	0	0	0	3	0	2	1	1	1	0	847	0	100	1	0	402	0	100	0	602	0	0											
1014	E0759-05	61	1	5	2	0	1		MPNST	4	C			4										2	0	2	298	0	100	3	0	1	148	0	100	26	206	11,23												
1015	E1331-08	26	2	5	2	1	2		MPNST	5	G			14,9	522	64	12,3	0	0	0	3	0	2	1	2	0	522	0	100	2	0	2	349	0	100	12	281	3,94												
1016	E949-01	19	1	5	3	0	3	10	MPNST	3	A			35,7	498	1	0,2	2	2	2	3	0	2	1	2	1	498	0	100	3	0	3	498	0	100	3	413	0,72												
1017	E0491-08	40	2	5	2	0	1		MPNST	5	C			9,6	249	10	4	0	0	0	3	0	2	2	2	2	249	0	100	3	1	1	167	0	100	116	70	62,43												
1018	E1444-09	40	1	5	2	1	3		MPNST	7	C			33,8	234	17	7,3	0	0	0	3	0	2	1	2	3	234	0	100	3	0	196	0	100	29	123	18,81													
1019	E0025-02	26		5		0	2	3	MPNST	3	C			27									2	0	2	337	0	100	1	0	0	221	0	100	25	182	12,08													
1020	E110-01	56	2	5	3	1	3	2	MPNST	2	G			37									2	1	1	2	192	0	100	3	1	2	126	3	98,05	52	95	35,27												
1020	E109-01	56	2	5	3	1	2	5	MPNST	2	E				38								2	2	2	2	249	0	100	2	1	1	113	0	100	28	185	12,97												
1021	E782-00	35	1	5	3	1	2	8	MPNST	2	C												1	2	0	2	471	83	85,08	2	0	0	335	0	100	0	442	0	0											



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6553-9



9 783835 196553 9