

Aus dem

Department für Neurochirurgie und Neurotechnologie

Universitätsklinik Tübingen

**Die Rolle von inflammatorischen Zellen und
Immuncheckpoints in Vestibularisschwannomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Suhm, Elisa-Maria**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Behling
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Singer

Tag der Disputation: 10.12.2025

Widmung

Meinen Eltern und meinen Geschwistern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Vestibularisschwannom.....	1
1.1.1	Allgemeines.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	2
1.1.3	Makroskopische und mikroskopische Pathologie.....	3
1.1.4	Neurofibromatose Typ 2.....	4
1.1.5	Sonderform: zystische Vestibularisschwannome.....	6
1.1.6	Klinische Präsentation.....	7
1.1.7	Diagnostik.....	8
1.1.8	Klassifikation.....	9
1.1.9	Therapie.....	11
1.2	Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren.....	16
1.2.1	Physiologische Grundlagen der Immunantwort.....	16
1.2.2	Das inflammatorische Tumor-Microenvironment.....	17
1.2.3	Immuncheckpoint-Signalweg.....	22
1.2.4	Entzündungsinfiltrate in Vestibularisschwannomen.....	25
1.3	Problem / Fragestellung.....	26
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Zusammenstellung der Studienkohorte.....	29
2.2	Datenerhebung.....	31
2.3	Mikroskopische Beurteilung der Gewebeproben.....	31
2.4	Tissue Microarrays (TMA).....	32
2.4.1	Allgemeines zur Methode.....	32
2.4.2	Erstellung der TMAs.....	33
2.4.3	Mikrotomie.....	34
2.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	35
2.6	Erstellung der histologischen Präparate.....	36
2.7	Immunhistochemie.....	37
2.7.1	Auswahl der Kontrollen.....	37
2.7.2	Immunhistochemische Färbungen.....	38
2.7.3	Antikörper Reagenzien für die Immunhistochemische Färbung.....	40
2.8	Lichtmikroskopische Begutachtung.....	42

2.9	Statistische Analyse und Darstellung	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Verteilung der Gesamtkohorte	47
3.2	MIB1.....	49
3.3	CD163	53
3.3.1	CD 163 Verteilung	53
3.4	CD68	69
3.4.1	CD68 Verteilung	69
3.5	CD3.....	84
3.5.1	CD3 Bewertung	84
3.6	CD8.....	95
3.6.1	CD8 Verteilung	95
3.7	Marker des Immuncheckpoint-Pathways	106
3.7.1	PD-L1	106
3.7.2	CTLA 4	109
3.7.3	SIRP alpha	111
3.7.4	CD47	113
4	Diskussion	114
4.1	Vor und Nachteile der TMA-Methode.....	114
4.2	Die PatientInnen-Kohorte.....	116
4.3	Diskussion der Antikörper	117
4.3.1	MIB1	117
4.3.2	Expression der Immunhistochemischen Marker in Vestibularisschwannome	118
4.3.3	Expression der Immunhistochemischen Marker in Zusammenhang der TumorgroÙe.....	119
4.3.4	Expression der Immunhistochemischen Marker bei NF2 Tumoren	121
4.3.5	Expression der Immunhistochemischen Marker nach Radiotherapie ...	122
4.3.6	Interpretation der Untersuchten Marker PD-L1, CTLA4, Sirp alpha und CD48	123
4.4	Zusammenschau der Marker	124
4.5	Limitationen der Studie	125
4.6	Schlussfolgerung	126
5	Zusammenfassung	128
6	Literaturverzeichnis.....	130
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	142

8	Veröffentlichungen.....	143
9	Danksagung	144

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologische Charakteristika der Vestibularisschwannome..	4
Abbildung 2: Hannover Klassifikation MRT Aufnahmen Transversalebene,)	10
Abbildung 3: Flussdiagramm zur Zusammenstellung der Patientenkohorte	30
Abbildung 4: Beispiel der Anfärbung der Kontrollen für CD68.	38
Abbildung 5: Beschreibung des Kollektivs anhand der klinischen Daten	48
Abbildung 6: Quantitative digitale Auswertung der MIB1-Immunhistochemie	49
Abbildung 7: Darstellung von Unterschieden der MIB1 Immunopositivität anhand der klinischen Daten	51
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung von CD 163.	54
Abbildung 9: Balkendiagramm CD163	55
Abbildung 10: Expression von CD163 bei unterschiedlichen Cut offs	58
Abbildung 11: Expression von CD163 in Bezug auf das Verhältnis der NF2 Tumor zu den sporadischen Tumoren	59
Abbildung 12: Expression von CD163 in Bezug auf die Hannover Klassifikation.....	60
Abbildung 13: Expression von CD163 in Bezug auf die dichotomisierte Hannover Klassifikation.....	61
Abbildung 14: Expression von CD163 in Bezug auf das Verhältnis der Rezidivtumore im Vergleich zu den Primärtumoren	62
Abbildung 15: Expression von CD163 in Bezug auf eine präoperative Radiotherapie	63
Abbildung 16: Altersverteilung im Bezug auf den CD163 Score	65
Abbildung 17: MIB1 im Verhältnis zu dem CD163 Score	67
Abbildung 18: MIB1 im Vergleich zu den CD163 Cut offs	68
Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung von CD 68.....	69
Abbildung 20: Balkendiagramm CD68	70
Abbildung 21: Expression von CD68 in Bezug auf das Geschlecht.....	73
Abbildung 22: Expression von CD68 in Bezug auf das Verhältnis der NF2 Tumor zu den sporadischen Tumoren.	74
Abbildung 23: Expression von CD68 in Bezug auf die Hannover Klassifikation.....	75
Abbildung 24: Expression von CD68 in Bezug auf die dichotomisierte Hannover Klassifikation.....	76
Abbildung 25: Expression von CD68 in Bezug auf das Verhältnis der Rezidivtumore im Vergleich zu den Primärtumoren.....	77
Abbildung 26: Expression von CD68 in Bezug auf eine präoperative Radiotherapie...	78
Abbildung 27: Altersverteilung im Bezug auf den CD68 Score	80

Abbildung 28: Verteilung des MIB1 Score im Verhältnis zu dem CD68 Score.....	82
Abbildung 29: MIB1 im Vergleich zu CD68 Cut offs	83
Abbildung 40: Expression von CD3.....	84
Abbildung 41: Verteilung der Häufigkeit von CD 3	85
Abbildung 42: CD3 Immunopositivität in Bezug auf die klinischen Daten.	88
Abbildung 43: Darstellung der MIB1 Expression in Abhängigkeit der CD3 Cut offs.....	94
Abbildung 44: Expression von CD8.....	95
Abbildung 45: Verteilung der CD8 Immunopositivität	96
Abbildung 46: CD8 Immunopositivität in Bezug auf die klinischen Daten	99
Abbildung 47: Darstellung der MIB1-Expression in Abhängigkeit der CD8 Cut offs..	105
Abbildung 48: Immunhistochemischen Färbung von PD-L1.....	107
Abbildung 49: Immunhistochemischen Färbung von CTLA4.....	110
Abbildung 50: Immunhistochemischen Färbung von SIRP alpha.....	112
Abbildung 51: Immunhistochemischen Färbung von CD47.....	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der klinischen Präsentation bei Diagnose eines Vestibularisschwannoms (in Anlehnung an Park et al. 2012).....	8
Tabelle 2: Hannover Klassifikation nach Samii et al. 1997	10
Tabelle 3: Klassifikation der Funktion des N. facialis nach House-Brackmann (House 1985)	14
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	36
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	41
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien und Färbesubstanzen	42
Tabelle 7: Die jeweilig gewählten Scores zu den einzelnen Markern	45
Tabelle 8: MIB1 Score in Abhängigkeit unterschiedlicher Alters- Cut offs	52
Tabelle 9: Verteilung der CD163-Expression auf den gewählten Score 0 – 4 in Bezug auf die klinischen Daten.....	56
Tabelle 10: Expression von CD163 bei den gewählten Cut offs (≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3) im Bezug auf die klinischen Daten.....	64
Tabelle 11: CD163 Score in Abhängigkeit von den Alters Cut offs	66
Tabelle 12: Verteilung der CD68-Expression auf den gewählten Score 0 - 4 in Bezug auf die klinischen Daten.....	72
Tabelle 13: Expression von CD68 bei den gewählten Cut offs (≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3) im Bezug auf die klinischen Daten.....	79
Tabelle 14: CD68 Score im Verhältnis zu den Alters Cut offs.....	81
Tabelle 17: Verteilung von CD3 in Bezug auf die klinischen Daten	87
Tabelle 18: Dichotomisierung der Kohorte in unterschiedliche Cut offs für die CD3-Immunopositivität in Bezug auf die klinischen Daten (Kontingenzanalyse).....	90
Tabelle 19: Unterschiede in der CD3 Immunopositivität im Verhältnis zu unterschiedlichen Cut offs des Patientenalters bei Diagnose (ANOVA Varianzanalyse).	92
Tabelle 20: Unterschiede in der CD8 Immunopositivität im Verhältnis zu unterschiedlichen Cut offs des Patientenalters bei Diagnose.	98
Tabelle 21: Dichotomisierung der Kohorte in unterschiedliche Cut offs für die CD8-Immunopositivität in Bezug auf die klinischen Daten (Kontingenzanalyse).....	101
Tabelle 22: Unterschiede in der CD8 Immunopositivität im Verhältnis zu unterschiedlichen Cut offs des Patientenalters bei Diagnose (ANOVA Varianzanalyse).	103

Tabelle 23: Immunhistochemische Expression von PD-L1 in Vestibularisschwannomen mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern.	108
Tabelle 24: Immunhistochemische Expression von PD-L1 in Vestibularisschwannomen mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern bei einem Cut off von > 2.....	109
Tabelle 25: Darstellung der immunohistochemischen Färbung von CTLA 4 in Tumorproben mit Abhängigkeit mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern.....	111
Tabelle 26: Darstellung der immunohistochemischen Färbung von SIRP alpha in Tumorproben mit Abhängigkeit mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern.....	113

Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacillus Calmette Guerine
BERA	Brain Stem Evoked Response Audiometry
CC1/2	Cell Conditioning Solution
CD	Cluster of Differentiation
CP	Connecting Peptide
CPS	Combined Positive Score
CT	Computertomographie
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
CVS	Zystisches Vestibularisschwannom
DC	Dendritic Cells
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EANO	European Association of Neuro-Oncology
EMG	Elektromyogramm
FFPE	Formalin-fixated and Paraffin-embedded
GM-CSF	Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor
Hb	Hämoglobin
HbSR	Hemoglobin Scavenger Receptor
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hp	Haptoglobin
ICS	Immune Cell Score
IHC	Immunhistochemie
IFN	Interferon
Ig-SF	Immunglobulin- Superfamilie
IL	Interleukin
ISH	Industry Solution Healthcare
kD	Kilo Dalton
KIR	Killer Inhibitory Receptor
LAMP	Lysosomal Associated Membrane Protein

LCS	Liquid Coverslip Solution
LINAC	Linear Accelerator
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MHC	Major histocompatibility complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MSR 1	Macrophage Scavenger Receptor 1
NF 2	Neurofibromatose Typ 2
NIH	The National Institutes of Health
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PD	Programmed Death
PD-L1	Programmed death- Ligand 1
pH	lat. pondus hydrogenii
PNS	Peripheres Nervensystem
PRR	Pattern Recognition Receptor
RS	Radiosurgery
SIRP alpha	Signal Regulatory Protein alpha
SR	Scavenger Receptor
SRCR	Scavenger Receptor Cystein-rich
SRT	Stereotaktische Radiotherapie
SSEP	Somatosensorische Evozierte Potenziale
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TIL	Tumor Infiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue Microarray
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPS	Tumor Proportion Score
TSP	Thrombospondin
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VS	Vestibularisschwannom
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Vestibularisschwannom

1.1.1 Allgemeines

Vestibularisschwannome (Galon et al.) stellen 8% der intrakraniellen Tumore dar und sind mit 80% die am häufigsten vorkommenden Tumore im Kleinhirnbrückenwinkel. Die genaue Lokalisation des intrameatalen Tumors ist meist der Canalis acusticus internus inmitten des Felsenbeins. Die Kleinhirnhemisphäre begrenzt den Tumor von hinten. Somit besteht ein enger Lagebezug zu den angrenzenden Hirnnerven (Schick and Unterberg 2011; Park et al. 2012). Nicht selten werden sie auch Akustikusneurinome genannt, wobei der Tumor sich genaugenommen aus den Schwann-Zellen der Nervenscheide des Nervus vestibularis des VIII. Hirnnervs entwickelt, sodass die Bezeichnung Vestibularisschwannom passender ist. Beide Nomenklaturen werden jedoch akzeptiert und finden regelmäßige Verwendung. Ein weiteres Synonym ist zudem auch Neurilemmom (Nager 1969; Park et al. 2012). Die klinische Manifestation zeigt sich in den meisten der Fälle durch einen einseitigen Hörverlust, Tinnitus und Gangunsicherheiten (Park et al. 2012). Grundsätzlich lässt sich das VS in zwei Kategorien einteilen. Hierbei kann zwischen dem unilateral sporadischen VS, und dem bilateral Neurofibromatose Typ2-assoziierten VS (Neff et al. 2006). Eine morphologische Sonderform des sporadischen VS stellt das zystischen VS dar (Neff et al. 2006). Das Erkrankungsalter des sporadischen VS liegt um die 5. Lebensdekade (Neff et al. 2006). Histologisch ist es als benigne zu werten und weist in aller Regel ein langsames Wachstum auf (Swartz 2004). So liegt die jährliche Größenzunahme bei ungefähr <1 bis 3mm (El Bakkouri et al. 2009). Trotz dieser bekannten histologischen Gegebenheiten, kann ein Vestibularisschwannom ab einer gewissen Größe, neben den klassischen Symptomen, Ursache für eine Nervenwasserzirkulationsstörung (Hydrocephalus) darstellen, eine Kompression des Hirnstamms bewirken und

somit mit einer erheblichen Morbidität einhergehen (Neff et al. 2006; Park et al. 2012).

1.1.2 Epidemiologie

Das aus dem Neuroektoderm entstehende Vestibularisschwannom zählt zu den gutartigen Tumoren und wird entsprechend der WHO-Klassifikation Grad 1 zugeordnet (Ian A. Cree 2021). Insgesamt liegt die Inzidenzrate pro Jahr bei 1/100.000 (Ostrom et al. 2021). Sehr wahrscheinlich ist die Dunkelziffer allerdings höher. So konnte Anderson et al. sieben nicht diagnostizierte VS in 10.000 Magnetresonanztomographien feststellen (Anderson et al. 2000). Eine Zunahme der Inzidenz zwischen 1976 und 2001 ist am ehesten der verbesserten Diagnostik geschuldet, wobei hier das MRT (Magnetresonanztomographie) mit Gadolinium-haltigem Kontrastmittel hervorzuheben ist (Gal, Shinn, and Huang 2010). Das Geschlechterverhältnis zeigt sich als weitestgehend ausgeglichen und auch die Verteilung der rechten und linken Seite ist ausgeglichen (Park et al. 2012). Fünf Prozent der VS kommen bilateral vor und sind klassischerweise mit der Neurofibromatose Typ 2 (NF2) assoziiert (Welling 1998). Hierbei kommt es typischerweise im jungen Erwachsenenalter zur klinischen Manifestation des Krankheitsbildes (Evans et al. 1992a). Die Inzidenz von NF 2 PatientInnen liegt bei 1:25,000 (Evans et al. 2005). Das Vestibularisschwannom lässt sich in ein unilateral sporadisch wachsendes, und in ein bilateral oder auch NF2 assoziiertes Vestibularisschwannom einteilen. Mit 95% macht das sporadische VS den größten Anteil aus (Howitz et al. 2000). Der langsam progredient wachsende Tumor wird meist zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr diagnostiziert (Park et al. 2012). Bei dem bilateralen VS liegt das Erkrankungsalter in den meisten Fällen vor dem 30. Lebensjahr. Bilaterale VS sind ein charakteristisches und pathognomonisches Krankheitsmerkmal für die NF2. Sie machen ungefähr 5% aller Vestibularisschwannome aus (Hannan et al. 2020).

1.1.3 Makroskopische und mikroskopische Pathologie

Der aus dem VIII. Hirnnerv entstehende Tumor kann sowohl vom N. vestibularis superior wie auch vom N. vestibularis inferior ausgehen (Neff et al. 2006). Der genaue Ursprung des Tumors ist noch nicht ganz geklärt. Die Vermutung war lange Zeit eine Transitionszone, welche in der Literatur auch Redlich-Obersteiner Zone bezeichnet wird (Roosli et al. 2012; Obersteiner 1895). Hierbei handelt es sich um den Übergang des oligodendroglialen Myelins in die periphere schwannomatöse Ummantelung (Tallan et al. 1993). Somit stellt sich hier eine Grenze zwischen dem ZNS (Zentrales Nervensystem) und dem PNS (Peripheres Nervensystem) dar (Tallan et al. 1993; Xenellis and Linthicum 2003). Die Mehrheit der VS scheinen allerdings lateral dieser Übergangszone zu entstehen (Xenellis and Linthicum 2003; Roosli et al. 2012). Makroskopisch imponiert eine derbe, glatt berandete Oberfläche von gelblich-weißer Farbe, die aus Epineurium besteht. In der Regel hat der Tumor eine mittelweiche bis leicht feste Konsistenz, die jedoch auch variieren kann. Hämorrhagische und zystische Anteile findet man eher in großen VS (Ian A. Cree 2021). Eine zarte arachnoidale Grenzschicht umscheidet das VS und trennt es somit von den angrenzenden neurovaskulären Strukturen (Ebner and Tatagiba 2019b).

Mikroskopisch lassen sich im klassischen Schwannom zwei Tumorkomponenten abgrenzen. Zum einen finden sich nach dem schwedischen Arzt Nils Ragnar Eugene Antoni benannte Antoni A-Areale, die sich durch ihr monomorphes und spindelartiges Aussehen charakterisieren (Brodhun, Stahn, and Harder 2017). Sie liegen in einem kollagenen Stroma eingebettet. Das eosinophile Zytoplasma lässt sich teils schlecht von den basophilen, welligen Zellkernen abgrenzen. Es zeigt sich für gewöhnlich eine palisadenartige Ausrichtung der Zellkerne (Ian A. Cree 2021). Befinden sich die Zellkerne dicht beisammen gedrängt, werden sie als Verocay-Körper bezeichnet. Sie sind pathognomonisch für das VS. Die Antoni B-Areale, welche ebenfalls aus Schwann-Zellen bestehen, liegen in deutlich unruhigeren Zellverbänden vor (siehe Abb. 1). Sie sind von einem „myxoiden, oft mikrozystischen Stroma“ umgeben (Beham and Schneider-Stock 2009). Auffällig

sind in diesen Arealen auch die Blutgefäße, welche häufig verdickte hyaline Wände aufweisen. Mehrschichtige Endothelproliferationen werden hingegen kaum beobachtet. Sowohl ältere als auch jüngere Blutungen mit perivaskulären Hämosiderophagen sind keine Seltenheit (Brodhun, Stahn, and Harder 2017). Immunhistochemisch findet sich eine nahezu durchgehende positive Expression von S-100 Protein (Beham and Schneider-Stock 2009).

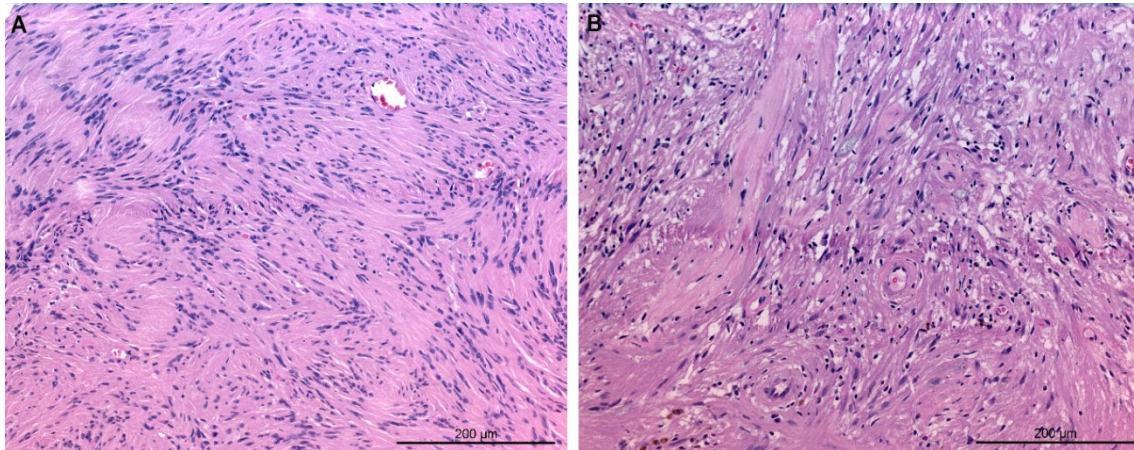


Abbildung 1: Histologische Charakteristika der Vestibularissschwannome. Pallisadenartige Ausrichtung der Zellkerne in Zelldichten Antoni-A-Arealen (**A**), locker sitzende Zellverbände in Antoni-B-Arealen (**B**).

1.1.4 Neurofibromatose Typ 2

Die Neurofibromatose Typ 2 (NF2) ist ein autosomal-dominantes Tumorsyndrom (Evans et al. 1992a). Die Betroffenen leiden an multiplen Tumoren des Nervensystems. Am häufigsten kommt es zu bilateralen Vestibularissschwannomen, intrakraniellen und spinalen Meningeomen sowie anderen spinale Raumforderungen (Asthagiri et al. 2009). Man spricht somit auch von der „zentralen Neurofibromatose“. Hierbei unterscheidet sie sich vom Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ1, die sich überwiegend durch periphere Neurofibrome charakterisiert (Hannan et al. 2020).

In 50% der Fälle ist eine Keimbahnmutation im *NF2*-Gen für die initiale genetische Veränderung (sog. 1st Hit) verantwortlich. In den anderen 50% liegt ein somatisches Mosaik für eine *NF2*-Mutation vor. Für die Tumorentstehung ist nun noch eine weitere Mutation im *NF2*-Gen, eine Methylierung des *NF2*-Gen-Promotors oder auch eine Deletion notwendig (sog. 2nd Hit) (Brodhun, Stahn, and Harder 2017). Bei dem verantwortlichen Gen handelt es sich um das Tumorsuppressorgen *NF2*, welches auf dem Chromosom 22q12-2 lokalisiert ist und das Protein Merlin codiert. Das Protein Merlin wird auch Neurofibromin 2 oder Schwannomin genannt. Es supprimiert unter anderem die Schwann-Zell Produktion. Durch die Mutation kommt es zu einem Verlust dieses Proteins was in einer ungedrosselten Proliferation von Schwann-Zellen resultieren kann (Evans 2009b; Hassepass et al. 2012).

Durchschnittlich wird die Erkrankung um das 20. Lebensjahr diagnostiziert, da sie meist unerkannt in der Kindheit bleibt. Jedoch können Hautveränderungen wie kutane und subkutane Tumore oder auch Auffälligkeiten am Auge (Katarakt, retinale Hamartome, postkapsuläre Linsentrübungen) schon früher wegweisend sein (Evans et al. 1992a). Nahezu alle Betroffenen (90-95%) entwickeln bis zur 3. Lebensdekade bilaterale Vestibularisschwannom (Asthagiri et al. 2009).

Die Diagnose erfolgt anhand klinischer Kriterien die erstmals gemeinschaftlich in einer Konferenz der NIH (The National Institutes of Health) festgelegt wurden (Stumpf 1988). Nachträglich wurden diese in den Manchester Kriterien zusammengefasst (Evans et al. 1992a).

Die klinische Diagnose basiert auf einer der folgenden Kriterien nach Evans et al.:

1. Bilaterale Vestibular Schwannome
2. *NF2* erkrankter Verwandter ersten Grades und unilaterales Vestibularisschwannom oder zwei der Folgenden Erkrankungen: Meningeom, Schwannom, Gliom, Neurofibrom, posterior subkapsuläre Linsentrübung

Unilaterales Vestibularisschwannom und zwei der folgenden Erkrankungen: Meningeom, Schwannom, Gliom, Neurofibrom, posterior subkapsuläre Linsentrübung

3. Multiple Meningeome und ein unilaterales Vestibularisschwannom oder zwei der Folgenden Erkrankungen: Schwannom, Gliom, Katarakt, Neurofibrom

Die klinischen Kriterien werden für gewöhnlich durch die Bestimmung pathogener Mutationen von *NF2* aus dem Blut gesichert. Ebenso ist eine Sicherung der Diagnose durch die Bestimmung einer identischen Mutation in zwei unterschiedlichen Tumoren eines Patienten möglich (Evans 2009a).

Jedoch gibt es einige PatientInnen, die die Diagnosekriterien noch nicht erfüllen, aber der Verdacht auf eine NF2 vorliegt. Dies betrifft vor allem PatientInnen mit einer somatischen Mosaikform (Evans 2009a). Diese PatientInnen sollten zeitnah ein NF2 Screening erhalten. Hierunter fallen PatientInnen mit einem erstgradigen Verwandten der an NF2 erkrankt ist, PatientInnen mit multiplen spinalen Tumoren, oder kutanen Schwannomen, sowie PatientInnen, die im jungen Alter (unter 30 Jahre) ein Vestibularisschwannom, oder (unter 20 Jahren) ein Meningeom entwickeln (Evans 2009b; Baser et al. 2002).

1.1.5 Sonderform: zystische Vestibularisschwannome

Das zystische Vestibularisschwannom (CVS) stellt eine morphologische Sonderform der unilaterale soliden Vestibularisschwannomen dar (Wandong et al. 2005). Es zeigen sich starke Unterschiede in der Klinik, der Bildgebung und der Morphologie. Auch im chirurgischen Outcome sind Differenzen festzustellen (Kameyama et al. 1994). So präsentiert das zystische Vestibularisschwannom bei einer peripheren Lokalisation ein eher dünnwandiges Erscheinungsbild, wohingegen zentral gelegene sich im MRT oder CT (Computertomographie) als dickwandig zeigen. In einer T2-Gewichtung erscheint es in der Kernspintomographie als hyperintens. Dabei kommt es zu keiner

Kontrastmittelanreicherung in den zystischen Teilen des Tumors in der T1-Sequenz (Charabi 2000; Wandong et al. 2005) . Die intra- oder extratumoral gelegenen Zysten entwickeln sich aus dem locker angeordneten Antoni-B-Anteil des Schwannoms. Die schneller fortschreitende Wachstumsprozesse sind auf eine Volumenzunahme der Zysten zurückzuführen und nicht durch ein rasanteres Wachstum der Tumorzellen (Charabi 2000; Neff et al. 2006). Durch das schnelle Wachstum zeigen sich klinisch häufiger Kompressionssyndrome und Ausfallerscheinungen des N. facialis (Hao et al. 2016; Wandong et al. 2005).

1.1.6 Klinische Präsentation

Die klinische Symptomatik ist typischerweise von einer Affektion umliegender Hirnnerven gekennzeichnet. In den meisten Fällen zeigt sich bei einer beginnenden Symptomatik in 95% eine funktionelle Einschränkung des Nervus vestibulocochlearis. Dabei erleiden die PatientInnen in den häufigsten Fällen einen unilateralen Verlust oder eine Reduktion des Hörvermögens (95%) (Park et al. 2012). Zwei-Drittel dieser PatientInnen ist der Hörverlust allerdings nicht bewusst. Auf Grund dieser Tatsache beträgt die Zeit bis zur Diagnosestellung nach auftreten der ersten Symptome im Mittel 3,7 Jahre (Matthies and Samii 1997). In 63% der Betroffenen ist der Hörverlust noch mit einem begleitenden oder vorausgehenden Tinnitus kombiniert. Im weiteren Krankheitsverlauf kommen bei einigen PatientInnen noch weitere Symptome wie Übelkeit und Erbrechen, als auch Schwindel hinzu (Matthies and Samii 1997; EVANS et al. 1992b). Parästhesien und Hypästhesie können sich im Rahmen einer Trigeminaffektion in 17% der Fälle bemerkbar machen. Weitere Beeinflussungen des Nervus facialis oder anderen kaudal gelegenen Nerven kommen nur selten vor (siehe Tabelle 1). Bei stark raumfordernden Tumoren nach einem längeren Tumorprogress können die Folgen die Kompression des Zerebellums oder des Hirnstamms sein. Charakteristisch hierfür können ein Intentionstremor, eine Dysdiadochokinese oder eine Ataxie sein. Bei nicht

behandelten Fällen kann eine Herniation der zerebellären Tonsillen oder ein Hydrocephalus das Leben bedrohen (Matthies and Samii 1997; Park et al. 2012).

Tabelle 1: Verteilung der klinischen Präsentation bei Diagnose eines Vestibularisschwannoms (in Anlehnung an Park et al. 2012).

95%	Unilateraler Hörverlust
63%	Tinnitus
61%	Gangunsicherheiten
17%	Trigeminusneuralgien (Parästhesie, Hypästhesie)
6%	Fazialisparesen

Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht für PatientInnen, die an einer NF2 erkrankt sind, oder in der Kindheit eine radioonkologische Bestrahlung in der Kopf-/Halsregion erhalten haben. Häufiges Nutzen von Mobiltelefonen, oder eine erhöhte Geräuschexposition wurden als begünstigenden Ursachen diskutiert, jedoch nie sicher belegt (Park et al. 2012).

1.1.7 Diagnostik

1.1.7.1 Hörfunktion

Da ein einseitiger Hörverlust beziehungsweise eine Reduktion des Hörvermögens meist die erste auffällige Symptomatik darstellt, wird dies auch in 95% der Fälle durch eine Ton- und Sprachaudiometrie bestätigt. In dem Reintonaudiogramm werden sensorische Asymmetrien deutlich, die vor allem die höheren Frequenzen (ab 1000Hz) betreffen. Die Sprachdiskrimination wird eher als Verlaufsparemeter innerhalb der Behandlung genutzt. Die Ton- und Sprachaudiometrie wird anhand der Klassifikation von Gardner und Robertson ermittelt (Behrbohm, Kaschke, and Nawka 2012; Gardner and Robertson 1988). Bei einer körperlichen Untersuchung kann vorab eine deutliche Lateralisierung

zur gesunden Seite nach Weber ermittelt werden. Der Rinne Test ist positiv, da eine intakte Schalleitung vorliegt (Minovi et al. 2005).

1.1.7.2 Bildgebung

Mit einer fast 100% Spezifität und Sensitivität stellt das Magnetresonanztomograph (MRT) in der Diagnostik des Vestibularisschwannom den Goldstandard dar. Dadurch können schon Tumore gefunden werden die nur einen Durchmesser von 1 bis 2 mm aufweisen (Hofmann and Choné 2011). Diese stellen sich in der T1-Gewichtung als iso- bis hypointens dar und in der T2-Gewichtung deutlich hyperintens. Durch eine hohe Kontrastmittelaaffinität des Tumorgewebes und den engen topographischen Lagebezug im Kleinhirnbrückenwinkel, findet man in der axialen Darstellung das Bild, was in der englischsprachigen Literatur gerne als „ice cream on a cone“ beschrieben wird (Ebner and Tatagiba 2019b). Eine Darstellung mit einem gadoliniumhaltigen Kontrastmittel wird empfohlen. In der nativen Computertomographie zeigt sich das VS klassischerweise als iso- bis leicht hyperdens im Vergleich zum Kleinhirn. Der betroffene innere Gehörgang ist häufig im Seitenvergleich erweitert. Die Tumormasse zeigt sich als homogen (Hofmann and Choné 2011; Ebner and Tatagiba 2019a).

1.1.8 Klassifikation

Bei der Klassifikation des Tumors gibt es unterschiedliche Herangehensweisen. Klassifikationen von Sterkers und House basieren auf der berechneten TumorgroÙe. Allgemein wird die TumorgroÙe anhand der MRT-Aufnahmen ermittelt. Hierbei wird der Durchmesser entlang der Längsachse im Kleinhirnbrückenwinkel gemessen. Teile des Tumor entlang des Canalis acusticus internus werden nochmal separat berechnet (Hao et al. 2016). Die Hannover-Klassifikation oder auch die Klassifikation nach Samii orientiert sich an der topographischen Lage des Tumors. Diese Einteilung erweist sich als sehr

hilfreich bezüglich der operativen Planung (siehe Tabelle 2) (Matthies and Samii 1997). Hierbei ergeben sich folgende Definitionen: Ein T1 Tumor liegt ausschließlich im Meatus acusticus internus, bei einer Größenzunahme kommt es zu Verlagerung von Tumoranteilen die nun auch extrameatal liegen (T2). Ein T3a Tumor nimmt mit seinem Volumen den kompletten Kleinhirnbrückenwinkel ein. Reicht dieser im Verlauf bis zum Hirnstamm, wird er als T3b klassifiziert. Kommt es zu einer Hirnstammverdrängung mit Kompression ist der Tumor als T4a einzuordnen. Bei einer zusätzlichen Kompression des IV. Ventrikels mit begleitetem Hydrozephalus liegt ein VS der Klasse T4b vor (siehe Abb. 2) (Matthies and Samii 1997).

Hannover Klassifikation

Tabelle 2: Hannover Klassifikation nach Samii et al. 1997

T1	rein intrameatales Vestibularisschwannom
T2	intra- und extrameatale Tumoranteile
T3a	der Tumor füllt die Kleinhirnbrückenwinkelzisterne aus
T3b	das VS erreicht den Hirnstamm
T4a	das VS komprimiert den Hirnstamm
T4b	Komprimierung des IV. Ventrikel mit konsekutiven Verschlusshydrozephalus

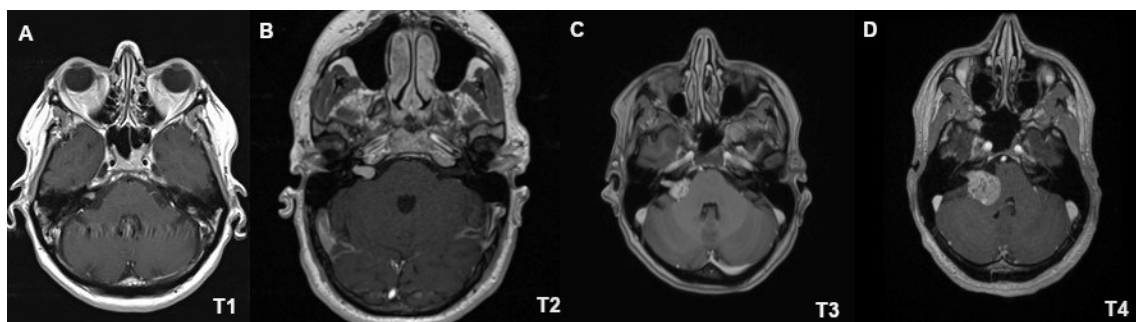


Abbildung 2: Hannover Klassifikation MRT Aufnahmen Transversalebene, T2- Gewichtung mit Kontrastmittel, in aufsteigender Hannover Klassifikation T1-T4 (A-D)

1.1.9 Therapie

Im Vordergrund der Therapie steht die Sicherung und ggfs. Wiederherstellung der Lebensqualität unter Erhalt neuronalen Funktionen. Zu den entscheidenden Faktoren der Therapieentscheidung und -planung zählen das Patientenalter, die Symptomatik, die Tumorgöße, die Patientenkonstitution, wie auch der persönliche Wunsch der Patienten. Durch eine komplette Resektion können Patienten geheilt werden. Alternativ kann durch eine Strahlentherapie ein weiteres Tumorwachstum verhindert werden, was sich insbesondere bei kleineren Tumoren anbietet. Beide Behandlungsmethoden haben Vor- und Nachteile, welche im Folgenden erläutert werden (Savardekar et al. 2021).

1.1.9.1 Wait and scan

Zunächst gilt es die Indikation zur gezielten Behandlung zu stellen. Viele Tumore zeigen eine Stagnation im Wachstum, in Einzelfällen ist sogar ein spontaner Rückgang beschrieben worden (Tan et al. 2010; Fucci et al. 1999). Bei kleiner Tumorgöße, wo sich bislang noch keine Symptome bemerkbar gemacht haben, stellt somit die neuroradiologische Kontrolle („wait and scan“) ein empfehlenswertes Vorgehen dar. Ebenfalls ist dies auch die bevorzugte Methode bei PatientInnen mit deutlich fortgeschrittenem Alter oder relevanten Komorbiditäten. Da in aller Regel das Tumorwachstum (1-2 mm/Jahr) eher langsam fortschreitend ist, können Verlaufskontrollen in einem festgelegten Turnus erfolgen. Dabei sollte in der ersten Zeit nach Diagnosestellung erstmal in einem Zeitraum zwischen 6 und 12 Monaten mittels Kernspintomographie kontrolliert werden (Park et al. 2012). Essentiell ist für diesen Weg eine initial korrekt ermittelte Größe bei der Diagnosestellung, um das Wachstumsverhalten optimal einschätzen zu können (Whitehouse et al. 2010). Unter Berücksichtigung neuer im Verlauf manifester Symptome, kann über eine Anpassung der Therapiestrategie mit dem Patienten gesprochen werden (Probst 1999). Auch bei einer signifikanten Größenzunahme von über 1cm sollte der Therapiebedarf neu evaluiert werden (Schick and Unterberg 2011).

1.1.9.2 Mikrochirurgische Resektion

Die mikrochirurgische Operation stellt die Therapie der ersten Wahl für eine Reduktion des Tumorumfanges dar. Das Ziel einer Operation ist die komplette Tumorsektion unter Funktionserhalt der neuronalen Strukturen. Im Fokus steht hierbei vor allem der N. cochlearis und der N. facialis. Für den mikrochirurgischen Eingriff stehen dem Operateur drei Zugangswege zur Verfügung. Bei der Wahl des passenden Zugangswegs ist die Tumorgöße, die Lokalisation, das Patientenalter wie auch die Hörfunktion entscheidend (Kaschke 2017). Die Wahl des chirurgischen Zugangs ist auch abhängig von der persönlichen Erfahrung und Präferenz des Operateurs (Park et al. 2012).

In erfahrenen Zentren für Schädelbasischirurgie kann in den meisten Fällen eine vollständige Resektion erreicht werden. Je nach Größe des Tumors und Vorschädigung des N. cochlearis und des N. facialis, kann es durch die OP zu einer funktionellen Störung beider Nerven kommen. Wobei eine anhaltende Störung des N. cochlearis häufiger vorkommt, kann sich der N. facialis in der Regel sehr gut funktionell erholen. Weiterführend kann es zu Dysfunktionen des N. trigeminus kommen (Betchen, Walsh, and Post 2005; Schick and Unterberg 2011). So konnten Samii et al. 1997 in einer 1000 Tumore umfassenden retrospektiven Kohorte in 98% eine komplette Resektion erzielen. Die Funktion des N. facialis konnte in 93% erhalten werden, die des N. cochlearis in 68% (Samii and Matthies 1997; Park et al. 2012). Mit 8,5% zeigen sich postoperativ Liquorfisteln die sich durch eine auftretende Rhinorrhoe äußern (Falcioni et al. 1999). In 3% ist ein infektiöses Geschehen möglich, dieses manifestiert sich in den meisten aller Fällen als Meningitis. Nur bei 2,2% kam es zu Ischämien oder Blutungen (Park et al. 2012). Vaskuläre Komplikationen machen jedoch die Hauptursache für eine permanente Morbidität aus. Selten kommt es zu Hemiparesen oder einer Vigilanzminderung bei einer Hirnstammdysfunktion. Ein erhöhter intrakranieller Druck kann durch einen Liquoraufstau verursacht werden.

Die Gesamtmortalität beläuft sich auf 0,2% (Sughrue et al. 2011; Park et al. 2012).

Die Rezidivrate bei einer subtotalen chirurgischen Entfernung liegt bei ca. 20%, nach einer vollständigen Tumorresektion unter 10% (Schick and Unterberg 2011), was den hohen Stellenwert einer möglichst kompletten Resektion in einem erfahrenem Zentrum betont.

Bei jedem der oben genannten Eingriffe ist ein intraoperatives Monitoring unumgänglich. Dies ist eine Methode zur Überwachung der Nerven, die einen engen Lagebezug zu den Operationsgebieten haben. Komplikationen kann vorgebeugt werden und auch das postoperative Outcome lässt sich besser abschätzen. Dabei steht der Funktionserhalt des N. facialis im Vordergrund. Intraoperativ erfolgt ein fortlaufendes spontanes Elektromyogramm (EMG) unter kontinuierlicher Stimulation des Nerven (Amano et al. 2011). Dafür werden subkutane Nadelelektoden in den M. frontalis und den M. orbicularis oculi und oris eingebracht. Für die Überwachung der mimischen Muskulatur helfen Oberflächenelektroden, die im Gesicht des Patienten angebracht werden. Das Risiko für eine anhaltende Funktionseinschränkung des N. facialis ist grundsätzlich bei großen Tumoren gegeben, wie auch bei zystischen Vestibularisschwannomen und NF2-assoziierten Tumoren (Neff et al. 2005). Genauso wichtig ist die Kontrolle des Hörvermögens. Dies erfolgt über die Hirnstammableitung BERA (Brain stem evoked response audiometry). Sie stellt aktuell die gängigste Methode dar. Um pathologische Veränderungen feststellen zu können werden Potenziale auf unterschiedlichen Verschaltungsebenen der Hörbahn darstellen (Jackson and Roberson Jr 2000). Schädigungen des VIII. Hirnnerven können somit über die gesamte synaptische Verschaltung der Hörbahn dargestellt werden. Kommt es während der Operation zu einer mechanischen oder auch thermischen Reizung des Nervs kann man dies anhand von Unregelmäßigkeiten in der Welle V sehen (Harper et al. 1992; Youssef and Downes 2009). Bei großen Tumoren die den Hirnstamm komprimieren sind SSEPs (Somatosensorische Evozierte Potenziale) zur weiterführenden

Überwachung der sensomotorischen Bahnen zu empfehlen (Schick and Unterberg 2011).

Das chirurgische Outcome ist am besten dokumentiert in Bezug auf den Erhalt des Hörvermögens und der Funktion des N. facialis. Sughrue et al. haben 2010 in einer Metanalyse, welche 11.873 PatientInnen umfasst, eine Erhaltungsrate des N. facialis von 78%, 81% und 85% je nach operativem Zugangsweg (retrosigmoidal, translabyrinthär, transtemporal) erfasst. Dabei besitzen die PatientInnen eine uneingeschränkte oder nur ein minimales Defizit in der Fazialisfunktion. Eine Klassifikation der Funktionalität des Nervs erfolgt nach House-Brackmann (siehe Tab. 3)(Sughrue et al. 2011; Rosahl and Eßer 2017).

Tabelle 3: Klassifikation der Funktion des N. facialis nach House-Brackmann (House 1985)

Grad	Parese	Charakteristika
1	Keine	Normal
2	Leicht	Geringe Schwäche, Ruhesymmetrie, geringe Mundasymmetrie
3	Mäßig	Leichte Asymmetrie, Lidschluss bei Anstrengung
4	Ausgeprägt	Stinast plegisch, Lidschluss inkomplett
5	Schwer	Ruheasymmetrie, Lidschluss inkomplett, geringe Bewegung der Mundwinkel
6	Plegie	Keine Bewegung

Samii und Matthies 2006 konnten in ihrer 200 Personen starken Kohorte ein ähnliches Ergebnis nachweisen. Sie konnten bei 52 bis 93% der PatientInnen eine gute Funktionalität des N. facialis nachweisen (House- Brackmann Grad I-II) (Samii, Gerganov, and Samii 2006). In der gleichen Kohorte wurde zudem der funktionelle Hörerhalt untersucht. Hierbei konnten bei 98% der PatientInnen eine vollständige Resektion erzielt werden, wovon sich bei 51% ein funktioneller Hörerhalt zeigte (Samii, Gerganov, and Samii 2006). Grundsätzlich ist festzuhalten, je größer der Tumor ist umso schwieriger ist der Erhalt der Nervenfunktion (Samii, Gerganov, and Samii 2006).

1.1.9.3 Radiotherapie

Neben der operativen Behandlung hat sich die Radiochirurgie (Radiosurgery: RS) und auch die stereotaktische Radiotherapie (Stereotactic radiosurgery: SRS) zunehmend etabliert. Sie wird mittlerweile nicht mehr nur additiv für Rezidive und progrediente Resttumore verwendet, sondern stellt bei kleineren VS (unter 4cm³ Volumen/ kleiner 3cm) eine alternative Behandlungsmethode dar (Hamm et al. 2017). Diese Größenlimitation wurde festgelegt, da es nach einer radiochirurgischer Behandlung größerer VS zu einer problematischen lokalen Ödembildung kommen kann. Postradiogene Ödeme können noch bis zu 12 Monate nach der Behandlung anhalten und bergen die Gefahr einer Hirnstammkompression (Unger, Dominikus, and Haselsberger 2011). Die RS verfügt über drei Systeme, das Gamma Knife, die sogenannte LINAC-Technologie (Linear Accelerator: LINAC) und das CyberKnife. Für die Behandlung der VS findet die Gamma Knife RS die größte Anwendung, da sie sich durch eine hohe Genauigkeit auszeichnet (Unger, Dominikus, and Haselsberger 2011). Dabei werden in ein bis fünf Sitzungen („multisession radiosurgery“) gezielt hohe Einzeldosen auf das gewünschte Areal gestrahlt. Die Randdosis konnte im Verlauf der Jahre auf 12-13 Gy reduziert werden, so dass die angrenzenden Strukturen (Hirnstamm, Hirnnerven, Cochlea) während der Behandlung weitestgehend geschont werden (Barnett et al. 2007). Gleichzeitig sind auch die Chancen der Hörerhaltung gestiegen. Eine Langzeit-Tumorkontrollrate kann mit der Gamma Knife RS in 80-96% erreicht werden (Unger, Dominikus, and Haselsberger 2011). Bei der konventionellen stereotaktischen Radiotherapie belaufen sich die Behandlungen über einen Zeitraum von sechs Monaten. Hierbei werden in 5-10 Sitzungen 3-5Gy auf das Tumorgebiet verabreicht. Die Tumorkontrollrate beläuft sich auch in diesem Verfahren auf über 80% bei einer Nebenwirkungsrate von 1-7% (Unger, Dominikus, and Haselsberger 2011).

Eine Kombination aus einer chirurgischen Teilresektion und einer nachfolgenden SRS wird von der EANO-Guideline (European Association of Neuro-Oncology) vor allem bei Tumoren größer als 3cm, empfohlen. Hierdurch soll intraoperativen

und postoperativen Komplikationen vorgebeugt werden (Goldbrunner et al. 2020). Allerdings muss erwähnt werden, dass die wissenschaftliche Grundlage für diese allgemeine Empfehlung fraglich ist und auf wenigen retrospektiven Ergebnissen beruht.

1.2 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren

1.2.1 Physiologische Grundlagen der Immunantwort

In der Immunantwort des Körpers unterscheidet man physiologisch zwei Systeme. Zum einen das angeborene Immunsystem und zum anderen das erworbene Immunsystem. Die sofortige Antwort des angeborenen Immunsystems auf eine Infektion wird von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten vermittelt. Sie können die Erreger direkt über Phagozytose eliminieren. Über den Pattern Recognition Receptor (PRR) erkennen sie spezifische Strukturen (PAMPs = Pathogen Associated Molecular Patterns) auf der Oberfläche der Pathogene. Dadurch ist die Unterscheidung von fremden und körpereigenen Strukturen gewährleistet (Mogensen 2009). Nach Erkennung eines PAMP-tragenden Pathogens kommt es nachfolgend zu zahlreichen Aktivierungen von Immunmodulatoren und Zytokinen. Dadurch werden unter anderem Neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Lymphozyten rekrutiert. Durch die Aktivierung kommt es zur Veränderung der Zelladhäsion von Immunzellen, wodurch eine Migration durch das Endothel in das Gewebe möglich ist (Hörner et al. 2004; Schütt and Bröker 2011). Das erworbene Immunsystem charakterisiert sich hingegen durch eine hochspezifische Erkennung von Antigenen und wird überwiegend von B- und T-Zellen gebildet. Die sogenannte humorale Immunantwort wird durch reife Antikörper-präsentierende B-Zellen initiiert. Trifft sie auf ein passendes Antigen kommt es zur Zellteilung (klonaler Selektion) und Ausdifferenzierung zu

Plasmazellen, wobei eine große Menge spezifischer löslicher Antikörper produziert wird. T-Zellen haben auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TZR) exponiert. Diese dienen der Antigenerkennung. Der TZR wird begleitet von einem Co- Rezeptor, dem CD-8 und den CD-4-Rezeptor (Cluster of Differentiation:CD). CD-8 präsentierende Zellen sind cytotoxische T-Zellen, welche die Antigene auf MHC-I-präsentierenden somatischen Zellen erkennen. CD-4 tragende T-Helferzellen binden überwiegend an MHC-II Proteine, welche auf der Oberfläche von Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen zu finden sind. Je nach Erreger werden sie von unterschiedlichen MHC-Molekülen präsentiert. So zeigen sich intrazelluläre Erreger (Viren) auf einem MHC-I Molekül, wohingegen extrazelluläre Erreger wie Bakterien auf MHC-II Molekülen zur Darstellung kommen (Schütt and Bröker 2011). Bindet ein MHC-II-Protein an ein TZR, werden von der antigenpräsentierenden Zelle Zytokine (IL-1) übermittelt. Das IL-1 (Interleukin-1) bindet an den spezifischen IL-1-Rezeptor auf der T-Helferzelle und aktiviert diese. Die T-Helferzelle beginnt mit der Synthese des IL-2 Oberflächenrezeptors und sezerniert gleichzeitig das Zytokin IL-2 (Interleukin-2). Es kommt zur Autostimulation und dadurch zur Bildung von einer Vielzahl von Zellklonen. Zusätzlich stimulieren die aktivierten T-Helferzellen die antigenpräsentierende B-Zelle mit IL-4 und IL-5, die zum Wachstum und zur Differenzierung anregen. Durch die Koppelung des CD40-Liganden auf der Oberfläche der T-Helferzelle und des CD40-Rezeptors auf der B-Zelle, kann sich die B-Zelle zur Plasmazelle differenzieren. Nach einer Ruhephase im Knochenmark kommt es zur Produktion von spezifischen Antikörpermolekülen (Müller-Esterl 2018; Bellanti 2013).

1.2.2 Das inflammatorische Tumor-Microenvironment

Es ist bekannt, dass die Entwicklung eines soliden Tumors stark von lokalen entzündlichen Prozessen abhängt (Galon et al. 2010). Sowohl ein Tumorprogress als auch eine Suppression können initiiert werden. So hat sich beispielsweise innerhalb der Behandlung von oberflächlich wachsenden

Harnblasentumoren die lokale Anwendung von BCG (Bacillus Calmette-Guerin) etabliert. Hierbei wird eine entzündliche Reaktion genutzt um eine Tumorrückbildung herbeizuführen (Herr and Morales 2008; Galon et al. 2010). In einer Vielzahl an Tumorentitäten (Magenkarzinom, kolorektales Karzinom, etc.) konnte allerdings in Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen ein schlechtes Outcome und auch ein Tumorprogress nachgewiesen werden (Galon et al. 2010; Coussens and Werb 2002).

Das Tumor-Microenvironment besteht aus verschiedenen Komponenten. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei endotheliale Zellen, welche angiogenetische Prozesse einleiten, um die Versorgung des Tumors zu optimieren. Dadurch wird die Tumorentwicklung und das Wachstum unterstützt (Hanahan and Weinberg 2011; Arneth 2020). Eine weitere wichtige Komponente ist die Immunezellinfiltrationen durch Granulozyten, Lymphozyten und auch Makrophagen. Sie agieren auf vielfältige Weise, wobei die detaillierten Mechanismen noch nicht verstanden sind. Die wichtigsten Akteure sind hierbei die Tumor-assoziierten Makrophagen, sowie die Tumor infiltrierenden Lymphozyten (Arneth 2020).

1.2.2.1 Tumor-assoziierte Makrophagen

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) sind aktivierte Makrophagen, welche für einen Progress in verschiedenen Tumorarten sorgen können. TAMs werden in zwei Typen unterschieden, M1 und M2. Der M1-Typ besitzt proinflammatorische Funktionen und ist im klassischen Sinne für die Eliminierung von Pathogenen zuständig. M1-Makrophagen stellen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr dar. Ebenfalls dienen sie durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interferon- γ , TNF- α (Tumornekrose Faktor: TNF) oder IL-18 (Interleukin: IL), der Bekämpfung von Tumorzellen (Tardito et al. 2019; Kovaleva et al. 2016). Wohingegen die TAMs vom M2-Typ eine spätere Modulation der Immunantwort steuern. Hierbei kommt es zur Unterdrückung einer Überreaktion des Immunsystems. Gleichzeitig wird eine Wundheilung sowie Fibrosierung

unterstützt. Diese Qualitäten wirken innerhalb eines Tumor-Mikromilieus als Promotor für das Tumorstadium und induzieren unter anderem die Angiogenese. In vielen unterschiedlichen Tumorarten konnte eine schlechtere Prognose bei einer hohen Dichte an M2-Makrophagen beschrieben werden (Zhang et al. 2021). Mit ihren suppressiven Eigenschaften ist es den TAMs möglich auch die zytotoxischen Aktivität von CD8-positiven T-Zellen in Tumoren zu inhibieren (Chistiakov et al. 2017). Dabei hat sich vor allem CD163 als Marker für TAMs des Typs 2 herausgestellt (Tardito et al. 2019; Wanderley et al. 2018). CD163 gehört zur SRCR-Familie (Scavenger receptor cysteine-rich) der Gruppe B und ist ein transmembranäres Glykoprotein. Die SRCR-Domäne ist charakteristisch und liegt extrazellulär. Innerhalb der Gruppe B der Scavenger Rezeptor Familie wird CD163 ausschließlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert. CD163 (ebenfalls als RM3/1, hemoglobin scavenger receptor (HbSR), M130 oder p155 bekannt) hat ein molekulares Gewicht von 130-kD. Die genetische Information der transmembranären SRCR-Domäne ist auf dem Chromosom 12p13 zu finden und beinhaltet 17 Exons. Reife CD163 positive Makrophagen wurden zahlreich bei akut entzündlichen Prozessen, wie auch chronischen Wundheilungsphasen beobachtet (Fabrick, Dijkstra, and van den Berg 2005). Dabei ist die Expression von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Wenzel et al., haben 1996 einen Anstieg der Expression von 10-30% auf 90% festgestellt, nachdem sie Monozyten mit Glukokortikoiden beimpft hatten (Wenzel, Roth, and Sorg 1996). Antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 und IL-6 haben eine ähnliche Wirkung auf die CD163 Expression. Gleichzeitig ist es ein Rezeptor um Haptoglobin-Hemoglobin (Hp-Hb) Komplexe zu binden. Reife Makrophagen können durch eine hochaffine Bindung eine CD163-vermittelte Endozytose von Hp-Hb-Komplexen initiieren und somit oxidativen Stress für das umliegende Gewebe verhindern (Kristiansen et al. 2001; Fabrick, Dijkstra, and van den Berg 2005). Das lösliche CD163 Molekül stellt zudem einen wichtigen Biomarker für verschiedenste inflammatorische Ereignisse wie einer Sepsis oder auch Lebererkrankungen dar. Zusätzlich sind höhere sCD163 Spiegel bei einigen Tumorerkrankungen mit einem schnelleren Krankheitsprogress oder mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert (Krijgsman et al. 2020). Ein ebenfalls

gängig genutzter TAM Marker stellt CD68 dar (Ferenbach and Hughes 2008; Chistiakov et al. 2017). CD68 ist auch ein transmembranäres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 110kD. Strukturell weist CD68 eine hohe Ähnlichkeit zu den Lysosomal-assoziierten Membranproteinen (LAMPs) auf, weshalb es zu der LAMP-Familie gezählt wird und auch LAMP-4 genannt wird. Das humane CD68 Gen ist auf dem Chromosomen 17p13 lokalisiert und beinhaltet sechs Exons (Holness and Simmons 1993). Es wird überwiegend von mononukleären Phagozyten exprimiert, insbesondere von Makrophagen. In einer geringeren Expression ist CD68 jedoch auch auf Mikroglia, Osteoklasten und myeloisch dendritische Zellen (DCs) exprimiert (Chistiakov et al. 2017; Greaves and Gordon 2002). Eine erhöhte CD68 Expression in Kombination von weiteren Makrophagen-Markern in Tumorgewebe korreliert, laut Chistiakov et al., mit einer höheren Tumor-Klassifikation, einer vermehrten lymphogenen Metastasierung und Aggressivität. Dies konnte sowohl an Non-Hodgkin Lymphomen, wie auch an Gliomen beobachtet werden (Mazur et al. 2004; Strojnik et al. 2009). Somit stellt die CD68 Expression ein potentielles Instrument für die Prognose bestimmter TumorpatientInnen dar (Tzankov, Matter, and Dirnhofer 2010; Chistiakov et al. 2017).

1.2.2.2 Tumor Infiltrierende Lymphozyten

Ähnlich wie die TAMs sind auch in den letzten Jahrzehnten die Tumor Infiltrierenden Lymphozyten (TILs) in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. So konnte in früheren Arbeiten ein prognostischer Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei malignen Melanomen (Clark 1991) sowie auch bei Ovarialkarzinomen (Sato et al. 2005), Nierenzellkarzinomen (Nakano et al. 2001) und Blasenkarzinomen (Sato et al. 2005) festgestellt werden. In einer Studie hingegen, die 400 Tumorproben von kolorektalen Karzinomen untersuchte, zeigte sich bei einer Infiltration durch CD8 und CD45RO positive T-Lymphozyten im Zentrum des Primärtumors hingegen eine schlechte Prognose. Auch nur bei einer geringen Expression von TILs in einem lokal begrenzten Tumor ist die Prognose der Patienten vergleichbar, mit denen, welche schon mit

disseminierten Metastasen befallen sind (Galon et al. 2006; Hadrup and Donia 2013). Diese unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der prognostischen Rolle von TILs verdeutlichen die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen. Über die genauen Mechanismen ist noch wenig bekannt.

Als klassische Marker für TILs gelten CD3 und CD8. Der CD3-T-Zell Rezeptor Komplex nimmt eine wichtige Rolle innerhalb der immunologischen Abwehr von pathogenen Antigenen ein (Call et al. 2002). Es ist ein Co-Rezeptor, welcher auf der Oberfläche der T-Lymphozyten exprimiert wird und zur Immunglobulin-Superfamilie gezählt wird. Das transmembranäre Protein setzt sich aus mehreren (insgesamt sieben Untereinheiten) verschiedener Polypeptidketten zusammen und schließt durch eine enge nachbarschaftliche Beziehung den T-Zell Rezeptor (TCR) mit ein. Man unterscheidet eine 44 kD (α -Kette) und eine 37kD (β -Kette) Kette. Der davon extrazellulär gelegene Teil bildet den TC-Rezeptor. Die α - und die β -Untereinheit formieren sich zu einer Bindestelle für Antigene und den MH-Komplex (MHC). Hinzu kommen noch das 25-28kD (CD3- γ -Kette) und 20kD (CD3- δ -Kettes) schwere Glykoprotein. Sowie die ebenfalls 20kD schwere CD3- ϵ -Kette (Clevers et al. 1988). Sie kommen als akzessorische Ketten hinzu. Die zwei ζ -Ketten bildet den intrazellulären Teil des CD3-Komplexes (Renz and Gierten 2019). Die Aktivierung der Protein Kinase C bewirkt eine Runterregulation durch die Phosphorylierung des CD3/T-Zell-antigen Rezeptor Komplexes (Chetty and Gatter 1994).

CD8 gehört ebenfalls zu der Immunglobulin-Superfamilie und wird als glykosylierter Co-Rezeptor an der Oberfläche der T-Lymphozyten exprimiert. Das 34kD schwere humane CD8-Molekül weist durch Disulfidbrücken verknüpfte Homodimere und Homomultimere auf der Oberfläche im peripheren Thymus auf (Littman 1987). Man unterscheidet zwei CD8-Rezeptoren, zum einen das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer, zum anderen das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer. Beide bestehen aus vier Domänen. Extrazellulär befindet sich N-Terminal die Immunglobulin Domäne gefolgt von einer verbindenden Domäne (connecting peptide = CP) (Andersen et al. 2009). Eine Transmembran-Domäne koppelt die extrazelluläre mit der zytosolischen Domäne. Letztere stellt für die Signaltransduktion die aktive Domäne dar. Durch die anhängende T-Zell spezifische Tyrosinkinase p56^{lck}

können Signalkaskaden ausgelöst werden die zu der Erkennung von Antigenen führen (Janeway Jr 1992). Der MHC-Komplex bindet sich an den Kontaktbereich der Ig-Domäne.

1.2.3 Immuncheckpoint-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Tumorentstehung und das Wachstum ist mit einer Immunologischen Suppression assoziiert. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Immun-Checkpoints. Unter physiologischen Bedingungen sind diese sowohl negativ- als auch positiv-regulierende Kontrollpunkte im Zellzyklus welche sowohl überschießende (Autoimmunreaktionen) als auch zu geringe Reaktionen des Immunsystems kontrollieren (Pardoll 2012). Die zwei bekanntesten Checkpoints sind der CTLA4-Rezeptor (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) und der PD-1/PD-L1 (Programmed death 1 / (Programmed death - Ligand 1) Signalweg. Die entsprechenden Rezeptoren sind auf der Oberfläche von T-Lymphozyten zu finden (Chen and Mellman 2017). Unter gewissen Umständen kommt es zu einer Hochregulation dieser Rezeptorexpression und somit zu einer Suppression der physiologischen immunologischen Reaktion, welche das immunologische Gleichgewicht stören kann (Chen and Mellman 2017). Bei einigen Tumoren kann eine solche Ursache zum Beispiel eine onkogenetische Mutation darstellen (Parsa et al. 2007) oder auch durch eine Hypoxie bedingt werden (Ohta et al. 2006; Mellman, Coukos, and Dranoff 2011) . Allerdings hat die Erkenntnis über diese Signalwege auch neue Optionen für die Therapie gegen verschieden Tumorarten ergeben. So findet die Inhibition der Immuncheckpoints schon seit geraumer Zeit Anwendung bei der Therapie von metastasierten Melanomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen, sowie bei der Behandlung von PatientInnen mit Harnblasenkarzinomen, welche nicht für eine Platin-basierte Chemotherapie in Frage kommen (Onyshchenko 2018).

Die wichtigsten Rezeptoren der Immuncheckpoint-Inhibition werden im Folgenden genauer beschrieben:

CTLA-4 ist ein Glykoprotein was zu den inhibierenden Rezeptoren auf der T-Lymphozyten-Oberfläche zählt. Zu der gleichen Gruppe gehören noch PD-1 und KIRs (killer inhibitory receptors). CTLA-4 wird zu 30% auf aktiven T-Lymphozyten exprimiert. In gleicher Menge wird CD28 exprimiert, welches den Antagonisten zu CTLA-4 darstellt und einer der wichtigsten Stimulatoren für eine T-Zell-spezifische Immunantwort für die Proliferation und Differenzierung der Zelle ist. CTLA-4 und CD28 binden an die identischen Liganden (CD80/86), jedoch besitzt CTLA-4 eine deutlich höhere Bindungsaffinität. Erfolgt eine Bindung von CTLA-4 mit CD80/86, kommt es zu einem Erliegen der Immunantwort. Es kommt zu einer Reduktion der IL-2 Produktion und Verringerung der Expression von IL-2 Rezeptoren. Im gleichen Zug wird der Zellzyklus in der G1- Phase gestoppt (Walunas et al. 1994; Alegre, Frauwirth, and Thompson 2001).

Programmed death Ligand 1 (PD-L1) ist ein 33-kDa schweres transmembranäres Glykoprotein Typ1 mit einer extrazellulären Ig- und IgC Domäne. Für gewöhnlich wird es überwiegend von Makrophagen, aktivierten T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und wenigen epithelialen Zellen präsentiert (Han, Liu, and Li 2020). Zusätzlich wird es von Tumorzellen als adaptiver Immunmechanismus verwendet, nachdem es zu einer Aktivierung mit Zytokinen kam, wie zum Beispiel IFN- γ (Interferon- γ) (Chen and Mellman 2017). Es bindet mit einer hohen Affinität an den PD-1 Rezeptor. Kommt es nun zu einer solchen Bindung, wird ein inhibierendes Signal generiert, welches die Aktivierung von T-Zellen abschwächt oder gar aufhebt (Chen and Mellman 2017). Eine immunologische Anti-Tumor-Reaktion kann somit umgangen werden (Han, Liu, and Li 2020). Unter physiologischen Bedingungen ist diese Bindung essenziell, um der Entwicklung von Immuntoleranzen und überschießenden Autoimmunreaktionen entgegenzuwirken (Kythreotou et al. 2018).

In der Praxis haben sich für die immunonkologischen Therapien folgende PD-L1-Scores etabliert. Der Tumor Proportion Score (TPS) gibt den prozentualen Anteil der PD-L1 immunohistochemisch positiven Tumorzellen im Gewebe an. Der Combined Positive Score (CPS) bestimmt den Anteil aller PD-L1

immunhistochemisch positiven Zellen. Dieser Wert beinhaltet sowohl positive Tumorzellen als auch positive Immunzellen wie Makrophagen oder Lymphozyten. Außerdem kann man noch den Immune Cell Score (ICS) ermitteln, der ausschließlich den positiven PD-L1 Score der immunologischen Zellinfiltrate im Tumorgewebe widerspiegelt. Je nach Tumorentität und immunonkologischen Therapeutika, sind unterschiedliche Cut-offs in den jeweiligen Tumorspezifischen Leitlinien beschrieben (Schildhaus 2018). Dies konnte beispielsweise für metastasierte Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region innerhalb der KEYNOTE-040-Studie nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Überlebensvorteil von PatientInnen unter der Behandlung von Pembrolizumab die eine PD-L1 Expression von $\geq 50\%$ aufweisen konnten (Cohen et al. 2019). Bei einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom hingegen stellt bereits schon eine PD-L1 Expression von $\geq 1\%$ einen Überlebensvorteil dar (Passiglia et al. 2016).

Ebenfalls von Interesse ist die Interaktion und Koexistenz zwischen SIRP alpha und CD47. Signal-regulatory protein alpha (SIRP alpha), welches auch unter MyD-1 bekannt ist, wird überwiegend von myeloischen Zellen und Neuronen exprimiert (Barclay 2009). Reichlich wird SIRP alpha allerdings von mehrkernigen Leukozyten und Monozyten exprimiert, wo es als inhibierender Rezeptor fungiert (Oldenborg et al. 2000). Es gehört zu den Typ 1 Glykoproteinen, die zu der Familie der Immunglobuline gezählt werden. Sie setzen sich aus drei extrazellulären Ig-Superfamilie Domänen (Ig-SF) zusammen mit diversen glykosylierten Resten, einer transmembranären Einheit sowie phosphorylierten Tyrosin-Resten mit einem zytoplasmatischen Schwanz (Smith et al. 2003). Eine der extrazellulären Ig-SF Domäne am N-Terminalen Ende (IgV) ist in der Lage eine Bindung mit CD47 einzugehen (Zhang et al. 2015). CD 47 ist ein transmembranäres Glykoprotein und ist ebenfalls ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie. Das 45-55 kDa schwere Protein weist neben seinem N-Terminalen Ende, welches eine IgV-Domäne besitzt, fünf transmembranäre Einheiten auf mit einem zytoplasmatischem Schwanz. Die Ig-Domäne interagiert mit Integrinen, Ligand für Thrombospondin (TSP), und dem signal-regulatory protein alpha (SIRP α) (Brown and Frazier 2001). CD47 wird

praktisch von allen Zellen exprimiert und kommt auch in Erythrozyten und Thrombozyten vor (Barclay and Van den Berg 2014). Dies scheint eine entscheidende Verbindung für Zell-Zell Interaktionen, Phagozytose und gezielte Tumortherapien zu spielen (Deshpande et al. 2017). Diese Interaktion verhindert unter anderem die Phagozytose normaler Hämatopoetischer Zellen. Gleichzeitig wird die Sensitivität zwischen Antikörpern und komplementärer intragrierender Zellen verringert (Gautam and Acharya 2014; Jaiswal et al. 2010). Die Expression von SIRP α innerhalb von phagozytotischen Prozessen scheint allerdings stabil und nicht beeinflusst von entzündlichen Vorgängen zu sein (Barclay and Van den Berg 2014; Adams et al. 1998). Die Expression von CD47 hingegen ist von inflammatorischen Geschehen abhängig. So konnte eine hohe Anzahl auf der Oberfläche von CD47-tragenden T-Lymphozyten festgestellt werden. Diese Eigenschaft verleiht den T-Zellen eine schützende Funktion vor der vorzeitigen Elimination durch Makrophagen (Barclay and Van den Berg 2014; Van et al. 2012) So werden diese bei einer mangelhaften Präsentation von CD47 von den Makrophagen der roten Pulpa der Milz direkt eliminiert. Bei einer gleichzeitigen Interaktion mit SIRP α hat dies eine inhibierende Wirkung und verhindert die Phagozytose (Oldenborg et al. 2000). Es konnte schon in mehreren Arbeitsgruppen aufgezeigt werden, dass eine Expression von CD47 bei leukämischen Stammzellen eine inhibierende Wirkung auf aktivierte Makrophagen hat und somit die Überlebensrate dieser erhöht wird (Gautam and Acharya 2014; Jäättelä 1999).

1.2.4 Entzündungsinfiltrate in Vestibularisschwannomen

In vielen malignen Tumoren besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Infiltration von Immunzellen und einem invasiven Wachstumsverhalten des Tumors. Die Rolle von Entzündungsinfiltrationen in benignen Tumoren, wie auch dem VS, ist weitaus weniger bekannt (Lewis et al. 2019) . Allerdings konnten die Infiltration von Immunzellen in VS mehrfach beschrieben werden. Hier sind an erster Stelle vor allem Makrophagen sowie B- und T- Lymphozyten zu nennen.

Überwiegend sind diese Infiltrationen in den locker strukturierten Antoni B Arealen zu finden (Hannan et al. 2020; Wippold et al. 2007; Archibald et al. 2010). Ebenfalls konnten neben den Immunzellinfiltrationen auch kollagenreiche Vernarbungen und Zeichen von chronisch entzündlichen Prozessen gefunden werden. Auch Malformationen und fibrotisch umgebaute Gefäße, sowie thrombotische Veränderungen wurden beschrieben (Sobel and Wang 1993). Bi et al. konnten ebenfalls in Vestibularisschwannomen CD4-, CD8- und CD45-positive Lymphozyten, sowie CD68- und CD163-positive TAMs nachweisen. Gleichzeitig konnte das Vorkommen von PD-L1 und PD-L2 in VS belegt werden. In dieser Studie konnte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Tumorgröße und dem Wachstum festgestellt werden, vor allem in Kombination mit den TAMs (Bi, Gupta, Mei, Abdulmohsen, et al. 2020). In einer weiteren Studie mit 69 sporadischen VS konnte eine Korrelation zwischen der Expression von CD45 und der Ausprägung von klinischen Symptomen festgestellt werden (Labit-Bouvier et al. 2000). Der genaue Einfluss dieser Immunzellinfiltration und die damit verbundene Auswirkung auf die Pathogenese, das Wachstum oder einen Tumorprogress, ist allerdings noch weitestgehend unbekannt. Wie auch in anderen Tumorarten, ist auch bei den VS ein wachsender Fokus auf die TAMs gerichtet (Hannan et al. 2020). Diese konnten mit Hilfe von CD63 und CD163 positiven Makrophagen in VS nachgewiesen werden (de Vries et al. 2013).

1.3 Problem / Fragestellung

Das Vestibularisschwannom, welches von der Tumormorphologie als auch von der Histologie und der Genetik zu den WHO Grad 1 Tumoren gezählt wird, ist ein langsam wachsender Tumor (Ian A. Cree 2021). Aufgrund der Lokalisation im Kleinhirnbrückenwinkel mit engem Lagebezug zu neurovaskulären Strukturen ist eine Resektion in Abhängigkeit des Tumolvolumen und der begleitenden Symptomatik in vielen Fällen unumgänglich (Schick and Unterberg 2011; Tan and Woo 2010). Aktuell sind die therapeutischen Lösungsansätze auf das „wait

and scan“ Prinzip, eine mikrochirurgische Resektion oder auf eine Radiotherapie beschränkt (Schick and Unterberg 2011). Im Falle eines Rezidivs oder auch bei Patienten, welche an NF2 erkrankt sind und schon in frühen Jahren an einem fortgeschrittenem Tumorstadium leiden, kommen die Therapieoptionen an ihre Grenzen. Die Versuche einen VEGF Antikörper wie Bevacizumab bei NF2 Patienten zu etablieren, erbrachten keine zufriedenstellenden Resultate (Lu et al. 2019). Auch andere therapeutische Ansätze waren bisher ohne Erfolg. In den letzten Jahren ist allerdings vor allem das Interesse an Immunzellinfiltraten und die sich damit ergebenden möglichen Therapieansätze in VS gestiegen. Hierbei wurde eine Korrelation zwischen der Invasion von Immunzellinfiltraten und der Tumorgröße festgestellt. Ganz speziell sind hier die Tumor-assoziierten Makrophagen zu nennen (de Vries et al. 2013). In diesem Zusammenhang konnte auch eine Differenzierung zwischen infiltrativen Makrophagen des Typ-M1 und Typ-M2 beschrieben werden (Hannan et al. 2020). Hierbei ist die Annahme, dass diese maßgeblich an einem Tumorprogress beteiligt sind. Vor allem die M2 TAMs werden verdächtigt, eine unterstützende Rolle beim Tumorwachstum einzunehmen und werden möglicherweise von Tumorzellen hierfür rekrutiert (Yang et al. 2020). Basierend auf den durchschlagenden Erfolgen in anderen Tumorarten (Onyshchenko 2018), rücken auch die Immuncheckpoint-Inhibitoren zunehmend in den Fokus laufender wissenschaftlicher Untersuchungen an Vestibularisschwannomen (Hannan et al. 2020). Die ersten Erkenntnisse über den möglichen Einfluss von Immunprozessen in Vestibularisschwannomen machen Hoffnung, dass sich therapeutische Ansatzpunkte finden lassen. Erste Beschreibungen beschränken sich jedoch auf kleine selektive VS-Kohorten. Es ist daher erforderlich Immunprozesse in größeren kontinuierlichen Kohorten zu beschreiben (Bi, Gupta, Mei, Abdulmohsen, et al. 2020; de Vries et al. 2012).

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wird die Immunzellinfiltration von Lymphozyten und Makrophagen in einer großen VS-Kohorte immunhistochemisch untersucht. Das Ziel dieser Arbeit ist eine genaue Darstellung des jeweiligen Expressionsmusters inflammatorischer Marker in Vestibularisschwannomen zu erlangen. Es werden zudem Zusammenhänge der

jeweiligen Antikörperexpressionen mit klinischen Daten untersucht (Geschlecht, Alter, Rezidiv/Primär-Tumor, päoperative Radiotherapie, NF, Hannover-Klassifikation) und mit der Proliferationstendenz der unterschiedlichen Tumore verglichen (quantifizierte MIB1-Expression).

Weiterführend soll in dieser Arbeit die Expression von Markern von Tumor-assoziierten Makrophagen und der Immuncheckpoint-Inhibition immunhistochemisch untersucht werden. Hier ist ebenfalls die Beschreibung der Expression in einer großen Kohorte sowie die Untersuchung der Korrelation mit den genannten klinischen Daten vorgesehen.

Auf Grund der großen Kohorte von über 1200 VS, sollte eine umfassende Beschreibung von inflammatorischen Infiltraten möglich sein, sowie erste orientierende Erkenntnisse über die Verteilung von Immuncheckpoint Markern in VS. Zusätzlich soll die Arbeit als Basis für Folgeprojekte dienen, um weitere Fragestellungen bezüglich der Inflammation in Vestibularisschwannomen zu beantworten und möglicherweise neue therapeutischen Ansätze für VS aufzuzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Zusammenstellung der Studienkohorte

Die Tumorgewebeproben, die für diese Arbeit verwendet wurden, stammen von PatientInnen mit einem diagnostizierten Vestibularisschwannom. Diese wurden zwischen November 2003 bis April 2019 im Department für Neurochirurgie und Neurotechnologie der Universitätsklinik Tübingen operativ behandelt. Die genaue histologische Diagnostik, nach aktuellen WHO-Kriterien und die Archivierung der Gewebeproben erfolgte in der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsklinik Tübingen. Es konnten zu Tissue Microarrays zusammengefasste Gewebeproben von den Jahren Okt. 2003 bis Mär. 2017 von einem vorherig durchgeführten Projekt genutzt werden (Behling et al. 2019a). Die Kohorte wurde im Rahmen dieser Arbeit mit neu gewonnen Gewebeproben von den Jahren Apr. 2017 bis Apr. 2019 erweitert.

Die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Tübingen hat den Antrag für dieses Projekt, unter Berücksichtigung einer schriftlich vorliegenden Einwilligung der Patienten zur wissenschaftlichen Nutzung von restlichem Tumorgewebe, am 10.07.2019 stattgegeben (Projekt-Nummer 336/2017BO2).

Insgesamt konnten in dem Zeitraum (Nov. 2003 – Apr. 2019) 1381 Tumore aus der Datenbank des Department für Neurochirurgie und Neurotechnologie der Universitätsklinik Tübingen mit der Diagnose eines Vestibularisschwannoms ermittelt werden. Für die Datenerhebung und die Überprüfung der vorliegenden Einwilligungserklärungen ist das ISH-Programm (Industry Solution Healthcare-Programm) der Universität Tübingen genutzt worden. Bei einer fehlenden Einwilligung, oder einem explizitem Widersprechen wurden die entsprechenden Fälle von der Studie ausgeschlossen. Bei länger zurückliegenden Fällen, bei denen zum Zeitpunkt der Operation eine spezifische Einwilligung zur wissenschaftlichen Nutzung des restlichen Tumorgewebes nicht standardmäßig durchgeführt wurde, wurde auf eine nachträgliche Einholung einer Einwilligung verzichtet. Nach dem Beschluss der Ethik-Kommission gilt dies für Fälle, die länger als 5 Jahre zurückliegen, wobei die Kriterien der Zentralen Ethik-

Kommission bei der Bundesärztekammer (Ethikkommission 2003) und der Regelungen der Deklaration von Helsinki (von Helsinki-Ethische 2013) berücksichtigt wurden.

Ebenfalls mussten Fälle auf Grund von fehlenden klinischen Daten oder bei zu gering archiviertem Gewebe exkludiert werden. Nach dem Ausschluss von 110 Fällen aus oben genannten Gründen, sind 1272 Fälle verblieben. Bei den folgenden Analysen mussten noch weitere Proben aus der jeweiligen Kohorte ausscheiden. Hier sind als Ursachen der Verlust von Gewebe bei der Anfertigung der Schnitte zu nennen. In wenigen Fällen war eine fehlerhafte Integration eines Gewebezylinder in den Paraffinblock die Ursache, oder auch eine mangelhafte immunhistochemische Anfärbung. Im folgenden Schaubild (Abb. 3) ist die finale Zusammenstellung des Patientenkollektivs dargestellt.

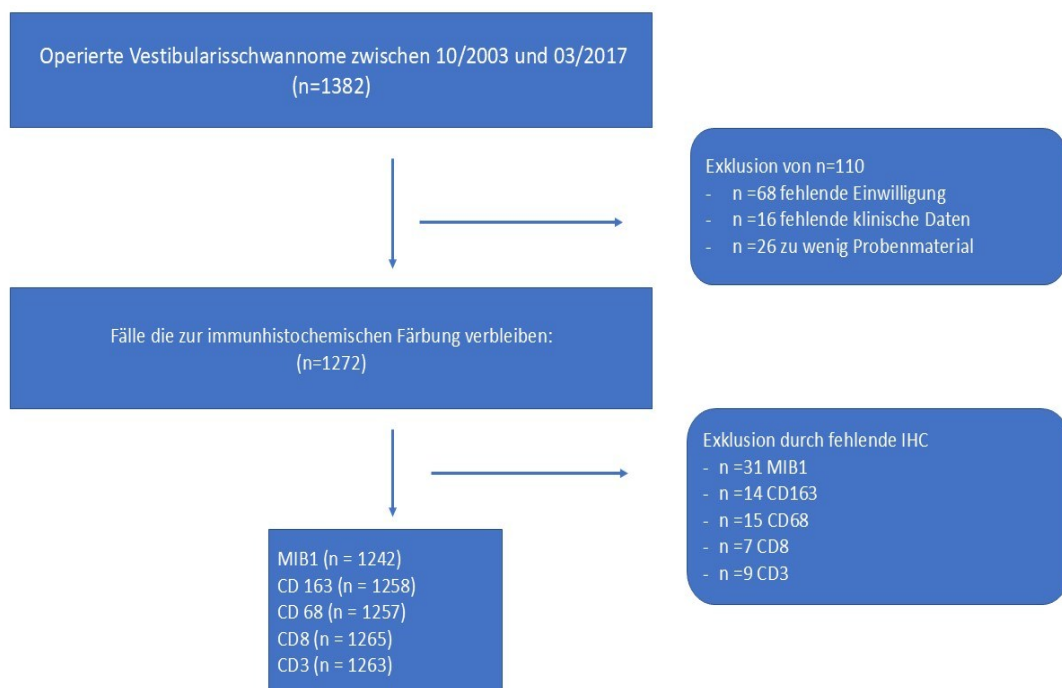


Abbildung 3: Zusammenstellung der Patientenkohorte, dargestellt anhand eines Flussdiagramms

2.2 Datenerhebung

Aus dem ISH-Programm konnten die für diese Studie genutzten klinischen Daten ermittelt werden. Diese beinhalteten das Geschlecht, das Patientenalter zum Zeitpunkt der Tumorresektion, sowie die Tumor Diagnose mit Einteilung in die entsprechende Hannover-Klassifikation. Ebenfalls wurde erfasst, ob es sich hierbei um einen Primär-Tumor oder um ein Rezidiv handelt, und ob eine Neurofibromatose Typ 2 gesichert ist. Außerdem hat eine Einteilung stattgefunden, ob im Voraus eine Radiotherapie durchgeführt wurde. Zusätzlich ist noch die intraoperative Lagerung erfasst worden, sowie die Tumorlokalisierung bezogen auf den rechten oder linken N. vestibularis.

2.3 Mikroskopische Beurteilung der Gewebeprobe

Nach der Erstellung der Tabelle mit den pseudonymisierten Fallnummern und den dazugehörigen Blocknummern, wurden die entsprechenden Paraffinblöcke mit in Formalin fixiertem Tumorgewebe aus dem Archiv der Neuropathologie gesammelt. Gleichzeitig sind die passenden HE-Flächenschnitte (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) zusammengestellt worden. Mit einer Platzhalterkarte für die kurzfristig entnommenen Schnitte und Paraffinblöcke, wurden im Archiv die entsprechenden Stellen markiert, um das Rücksortieren zu erleichtern. Im Weiteren erfolgte die Zuordnung der HE-Flächenschnitte zu den jeweilig passenden Paraffinblöcken. In einer mikroskopischen Begutachtung der HE-Färbungen (Olympus VANOX AHBT3, Tokio, Japan), sind Bereiche auf dem Objektträger markiert worden. Hierbei handelte es sich um Areale, welche aus histopathologischer Sicht eine besonders hohe Tumordichte aufwiesen und nur geringe oder keine Störfaktoren, wie Einblutungen oder unzusammenhängendes Tumorgewebe, zu finden waren. Diese markierten Bereiche sollten zusätzlich, um eine suffiziente 1mm Stanzbiopsie entnehmen zu können, mindestens eine Größe von 2mm aufweisen. Um eine höhere Aussagekraft zu gewinnen, wurden zwei Stanzproben pro Tumor entnommen, weswegen größere Tumorareale

bevorzugt wurden (Camp, Charette, and Rimm 2000). Nach einem genauen Abgleich des Paraffinblocks mit dem HE-Schnitt wurde die optimale Stelle farblich umkreist, so dass man beim Anfertigen der Tissue Microarrays gezielt die Stanzproben entnehmen konnte. In vereinzelt Fällen musste eine erneute Anfertigung eines HE-Schnittes geschehen, da es bei einigen Tumorblöcken, durch mehrfache Abtragung, die Übereinstimmung der ehemals angefertigten HE-Flächenschnitte mit den Paraffinblöcken nicht mehr gegeben war.

2.4 Tissue Microarrays (TMA)

2.4.1 Allgemeines zur Methode

Die Tissue Microarray Methode ermöglicht eine große Anzahl an Gewebeproben auf einen Objektträger strukturiert und einheitlich immunhistochemisch auszuwerten. Hierbei werden zahlreiche runde Stanzzyylinder von einem Gewebeblock in einen vorbereiteten Paraffin-Empfängerblock eingebettet. Die Anzahl der Probezyylinder variiert je nach gewähltem Zylinderdurchmesser. Nach der Aufbereitung dieser neu angefertigten TMA-Blöcke, ist es möglich durch feingewebliche Schnitte und immunhistochemischer Färbungen eine große Kohorte, unter identischen Bedingungen strukturiert und schnell zu analysieren. Nicht nur die Einheitlichkeit der Färbungen sind von Vorteil, gleichzeitig ist auch der Kostenaufwand durch die gering benötigte Menge an Reagenzien wie den entsprechenden Antikörpern und der Gewebeverbrauch sehr gering. Zudem können die angefertigten TMA-Blöcke für weitere wissenschaftliche Fragestellungen und Studien genutzt werden (Behling and Schittenhelm 2018)Horn et al. 2005). Am meisten Anwendung findet die Methode in der Analyse von Tumorgewebe. Besonders Tumore mit einem histologisch homogenen Bild, wie zum Beispiel das Vestibularisschwannom, bieten sich hierfür an. Handelt es sich um ein inhomogenes Gewebe sind die zylindrischen Proben womöglich nicht repräsentativ für die jeweilige Tumore, sodass in solchen

Fragestellungen genau geprüft werden sollte, ob sich die TMA-Methode eignet (Bubendorf et al. 2001).

2.4.2 Erstellung der TMAs

Es wurden insgesamt neun TMAs aus Tumorproben angefertigt, welche in dem Zeitraum Apr. 2017 bis Apr. 2019 im Rahmen der Behandlung reseziert wurden. Hierzu wurden die entsprechenden archivierten FFPE-Gewebeproben (Formalin-fixed and Paraffin-embeded) verwendet. 38 weitere TMAs stehen aus einem vorherigen Projekt (Behling et al. 2019b) zur Verfügung. Diese umfassten Behandlungsfälle aus dem Zeitraum Okt. 2003 bis Mär. 2017, und konnten somit direkt für die geplanten Färbungen genutzt werden.

Vor jeder Probeentnahme aus einem FFPE-Tumorblock erfolgte vorab die genaue Kontrolle der Fallnummer und ein Abgleich mit dem markierten Bereich auf dem HE-Schnitt. Die Tissue Microarrays wurden mit Hilfe des Manual Tissue Microarrayer (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA; Model MTA – 1, Serial No: MTA1777) hergestellt. Durch Feststellschrauben ist der neue Paraffin-Empfängerblock (Spezialparaffin für Histologie, SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Germany; Einbettkassetten, KABE Labortechnik GmbH, Wiehl-Bomig, Germany) im Tissue Microarrayer fixiert worden. Es erfolgte eine Feinjustierung eines Sicherheitsabstandes (2 mm) zum Rand des Paraffinblocks, um Brüche und Risse des Paraffins zu vermeiden. In einem gleichmäßigen Abstand sind nun Löcher von 1mm Durchmesser, in den leeren Paraffinblock gestanzt worden. Der daraus gewonnene Paraffinzylinder wurde verworfen. Das nun entstandene Loch ist unmittelbar danach mit Tumorgewebe aus den ursprünglichen Donor-Blöcken befüllt worden. Die dabei entnommene Donor-Stanze misst ebenfalls 1mm und stammt aus dem zuvor markierten Tumorareal. Durch ein Umschwenken des Manual Tissue Microarrayer kann die Tumorprobe passgenau in die vorgefertigte Lücke eingelassen werden. Die einzelnen Stanzzyylinder werden etwas unter das Niveau des Paraffinblocks in das vorgefertigte Loch abgesenkt. Nach dem erneuten Justieren wird wiederholt eine

Stanzprobe aus dem Paraffinblock entnommen. Dabei ist zwischen den einzelnen Stanzproben auf einen Mindestabstand von 1mm zu achten, um auch hier Risse im Paraffin zu vermeiden. Zur Sicherung der Orientierung sind die letzten zwei Stellen in der untersten Reihe nicht mit Tumorgewebe versehen worden. So kann bei der Beurteilung der Stanzzyylinder die korrekte Fallnummer den einzelnen Proben zugeordnet werden. Etwas versetzt zu den anderen Proben positioniert man in einer letzten gesetzten Spalte jeweils die drei Kontrollproben. Diese dienen noch zusätzlich zur Orientierung. Mit dieser Methode konnten somit bis zu 40 Stanzzyylinder pro Paraffinblock zusammengestellt werden. Da bei den ausgewählten Donor-Blöcken in den meisten Fällen genug Material archiviert war, konnten für jeden Fall exemplarisch zwei Stanzproben entnommen werden. Jeder Empfängerblock wurde mit einer laufenden Nummer versehen. Parallel ist eine passende Excel-Liste (Microsoft Office 365 Plus) für jeden erstellten TMA-Block angefertigt worden. An jeder Position, an der die Tumorprobe in den Paraffinblock eingelassen wurde, ist äquivalent in der Excel-Liste die pseudonymisierte Fallnummer aufgeführt. Dieses Grid-Layout dient der Sicherstellung der Orientierung der Probenanordnung und wurde für die mikroskopische Auswertung verwendet. Nach Fertigstellung der TMAs wurden diese über 10 Minuten in einem Wärmeschrank mit 38°C leicht aufgeweicht. Anschließend werden die Flächen der TMA-Blöcke mit einem Objektträger (TOMO, Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) leicht angedrückt. Dieses "Planieren" sichert den Halt des durch die vielen Stenzen eventuell von der Kassette gelockertem Paraffinblock.

2.4.3 Mikrotomie

Für die mikroskopische Beurteilung wurden von jedem TMA-Block mehrere feingeweblichen Schnitte von 4µm Dicke mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt (Rotationsmikrotom Microm HM 355S, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland; Mikrotomklingen A35 Feather, Osaka, Japan). Die Oberfläche der TMA-Blöcke wurde vor dem Schneiden gekühlt, damit das Paraffin fester ist und sich somit besser schneiden lässt. Die Schnitte

wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen. Für die HE-Färbungen wurden dabei die Superfrost Objektträger (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) genutzt. Für die immunhistochemischen Aufbereitungen ist der TOM-1190 Objektträger (TOMO, Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) verwendet worden. Nach einer Trocknungsphase in einem Wärmeschrank bei 65°C, stehen die Leerschnitte für weitere Behandlungen zur Verfügung. Von jedem TMA-Block wurden zunächst 10 Leerschnitte angefertigt.

2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde als Übersichtsfärbung der zusammengestellten TMAs verwendet, um eine Kontrollübersicht der Tumormasse der TMA-Proben zu haben. Für die Anfertigung der Schnitte ist die Entparaffinierung, mittels einer dreimal zehnmütigen Inkubation mit Xylol, manuell erfolgt. Im Folgenden wurden diese in einer Absteigenden Alkoholreihe (zweimal Ethanol 100%, einmal Ethanol 96% und einmal Ethanol 70%) für weitere fünf Minuten überführt. Für eine anschließende Spülung wurde Aqua dest. genutzt. Eine weitere Inkubation mit Mayers Hämalaun für weitere eineinhalb Minuten folgte. Durch weiteren Spülvorgang mit Aqua dest. und danach für 10 Minuten unter Leitungswasser, wurde die Färbung initiiert. Nach einem weiteren Spülvorgang und einer kurzen Inkubation mit 0,1-prozentigem Erythrosin für eineinhalb Minuten, erfolgte die Gegenfärbung. Die Schnitte werden dabei kurzzeitig zur Differenzierung und zur nachfolgenden Entwässerung in 70%, 96% und zweimal kurz in 100% vergälltes Ethanol eingelegt. Ein Klärvorgang erfolgt darauf mit einem organischen Lösungsmittel, hierfür wird Xylol dreimal angewendet. Um eine abschließende Fixierung zu gewährleisten, wird jeder Schnitt mit einem Einschlussmittel (HICO-MIC) versehen und schlussendlich ein Deckglas aufgelegt. Die hierfür verwendete Reagenzien sind in der folgende Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Reagenzien:	Hersteller:
Xylol	Diagonal, Münster, Germany
Ethanol 100%, 96%, 70%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
vergällter Ethanol 100%, 96%, 70%	Alkoholvertrieb Süd GmbH, Horb am Neckar, Germany
Gebrauchslösung Mayers Hämaalaun	
Hämaalaun nach Mayer 500ml	Darmstadt, Germany
Aqua dest. 500ml	
Stammlösung Erythrosin	
Erythrosin 0,1%	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Aqua dest. 1000ml	
Gebrauchslösung Erythrosin	
Stammlösung Erythrosin 200ml	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Eisessig 0,2ml	

2.6 Erstellung der histologischen Präparate

Unmittelbar nach operativer Entnahme des Tumors wurde das Gewebe in 4%-igem Formalin in Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer fixiert. Anschließend erfolgte eine Überführung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 96%, 100%, 100%). Gefolgt von einer Entwässerung in einem Gemisch aus 100%-igem Alkohol und Chloroform (1:1). Eine Zweite Entwässerung wurde mit unverdünntem Chloroform vorgenommen. Das Gewebe wurde dann in Paraffin (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Germany) eingebettet. Mithilfe eines Mikrotoms (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) wurden nun von den vorbereiteten Paraffinblöcken 3-4µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Labor – u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) gezogen.

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Auswahl der Kontrollen

Zur Sicherstellung der korrekten Färbemethodik ist die Verwendung von diversen Kontrollen erforderlich. Da die Färbung von unterschiedlichen Antikörpern vorgesehen ist, können keine allumfassenden positiven und negativen Kontrollen gewählt werden. Daher wurde zum einen Gewebe einer zerebralen Melanom-Metastase sowie Proben von normalem Cortex und Marklager des Großhirns und Kleinhirns aus Autopsie-Proben verwendet und auf jeden TMA-Block eingelassen. Zudem wird bei jedem Färbevorgang im Stainer eine Flächenschnittprobe von Tonsillengewebe mitgefärbt, da es sich bei diesem Projekt um immunologische Marker handelt. In der folgenden Abbildung zeigt sich eine exemplarische Anfärbung mit dem immunhistochemischen Marker CD68 der Kontrollen (Abb. 5).

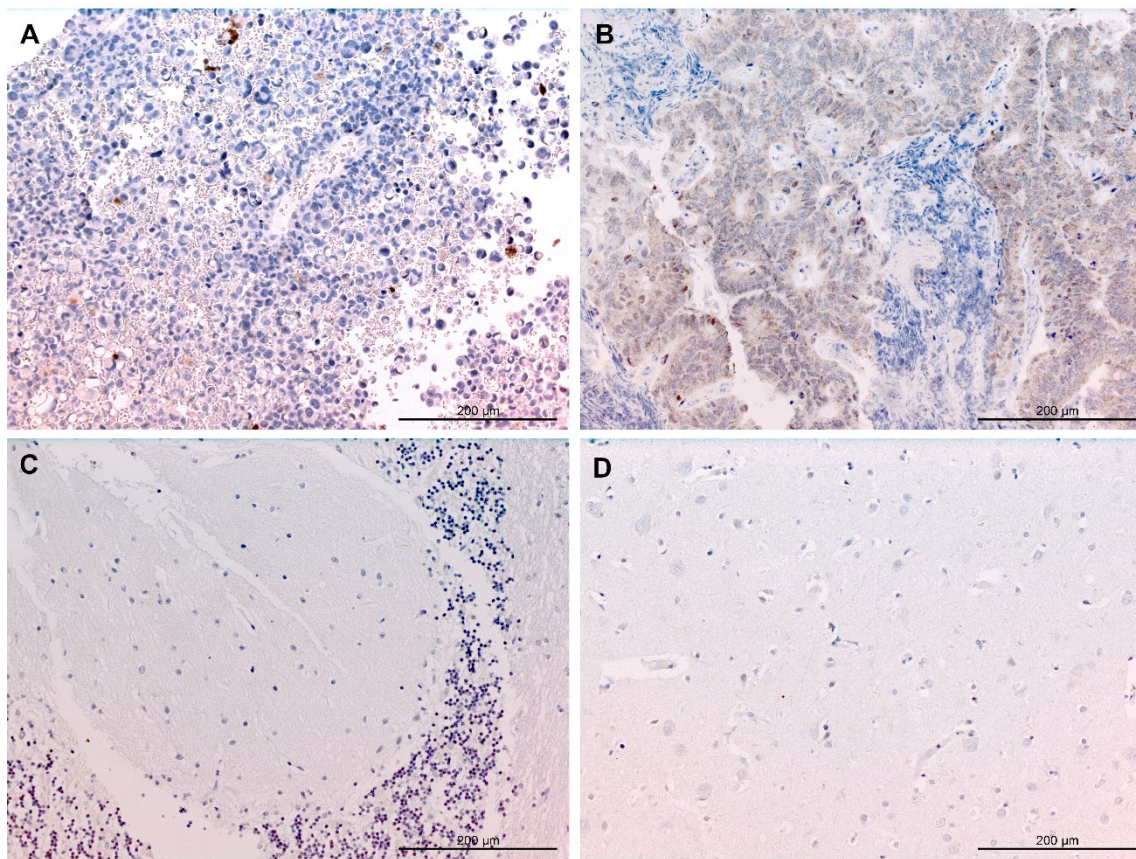


Abbildung 4: Beispiel der Anfärbung der Kontrollen für CD68. Es zeigt sich eine Immunopositivität im Melanom(A) und Tonsillen-Gewebe(B), wobei normale Kleinhirnrinde(C) und Großhirnmarklager immunonegativ bleibt(D).

2.7.2 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbungen der einzelnen TMAs sind jeweils mit Hilfe des Immunostainers Ventana BenchMark GX (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) sowie dem OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) erfolgt. Pro Durchlauf können hiermit bis zu 20 Objektträger gefärbt werden. Es handelt sich um ein indirektes Biotin-freies Verfahren, zur Erfassung der Primärantikörper.

Zum Anfang wird der Objektträger aufgeheizt, um das Paraffin zum Schmelzen zu bringen. Mit der Detergenzlösung (EZ-Prep) werden diese im Anschluss abwechselnd gewaschen. Durch die Wärme löst sich das Paraffin sowohl aus

dem Gewebe als auch vom Objektträger. Zusätzlich wird mit dem Air-Vortex-Mixer ein erneutes Ablagern verhindert. Mit diesem Verfahren wird der Gewebsschnitt entparaffiniert. Bei einem weiteren Spülvorgang wird das Restliche Paraffin entfernt. Durch den Coverslip (LCS), eine flüssige Deckglaslösung, kann eine Verdunstung der wässrigen Reagenzien vom Objektträger reduziert werden. Das organische Öl (LCS) verteilt sich über der Oberfläche. Es entsteht unterhalb der Schicht eine Art Kammer, was eine wirksame Barriere zwischen den jeweiligen Puffern und der Luft darstellt. Durch die Zugabe des OptiView Peroxidase Inhibitors, kann eine endogene Peroxidase Aktivität verhindert werden. Dies führt zu einer geringeren Hintergrundfärbung und optimiert somit die Beurteilbarkeit. Die ursprüngliche Fixierung des Gewebes in Formalin hat zu einem Verlust der Antigenität geführt. Um diese Antigenität zu reaktivieren, benötigt es eine Vorbehandlung. Dabei kommen die Puffer CC1 und CC2 zum Einsatz. In Kombination mit einer hohen Temperatur (95-100°C) können diese Pufferlösungen durch Hydrolyse die gebildeten kovalenten Bindungen, welche maßgeblich zu der Antigenität beitragen, lösen. Durch die Entfernung dieser Bindungen kommt es zu einer Renaturierung der Proteinmoleküle. Die Aufnahmefähigkeit für Antikörper ist somit wieder erhöht. Im Anschluss werden die Objektträger abgekühlt und gewaschen. Je nach Antikörper-Protokoll, werden die jeweiligen Primärantikörper auf die Objektträger aufgetragen. Jeweils 50 µl Optiview Universal Linker, Optiview Multimer, H₂O₂, Optiview DAB, Optiview Copper werden der Reihe nach, von Waschphasen unterbrochen, aufgetragen. Die dazwischen geschobenen Spülvorgänge dienen sowohl zur Reinigung der Objektträger als auch um die ausgelöste Reaktion des vorherigen Arbeitsschrittes zu unterbrechen. Am Ende erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Sie dient zur Stärkung der Kontraste der positiv gefärbten Bereiche. Nach der Entnahme der Objektträger aus dem Stainer werden diese mit einer handelsüblichen und im Alltag gebräuchlichen Geschirrspüllösung von dem Coverslip gereinigt. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Xylol und das anschließende Eindecken mit HICO-MIC erfolgt die restliche Konservierung.

2.7.3 Antikörper Reagenzien für die Immunhistochemische Färbung

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) finden sich alle verwendeten Antikörper. Alle Informationen sind den jeweiligen verwendeten Protokollen entnommen. Die Anwendung jedes einzelnen aufgeführten Antikörpers erfolgt ausschließlich über das Ventana Benchmark Immunohistochemistry OptiView System. Hierbei erfolgte im Vorfeld eine exakte Abstimmung auf die verwendeten Primärantikörper.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Anwendung (Ventana Benchmark Immunohistochemistry OptiView System)	Inkubation	Verdünnung	Hersteller	Interne Negativkontrolle
Ki-67 , Clone MIB 1, Maus	CC1 (40 Minuten)	42°C (20 Minuten)	1:200	DAKO	
CD 163 , Klon EDHu-1, Maus	CC1 (40 Minuten)	37°C (20 Minuten)	1:1000	ABD serotec	Monozyten/Makrophagen
Mouse anti human CD 68 (PG-M1)	CC1 (16 Minuten)	42°C (14 Minuten)	1:200	DAKO	Epithel, Endothel
CD3 , Klon: SP7, Hase	CC1 (40 Minuten)	42°C (20 Minuten)	1:500	Thermo	Epithel, Endothel
Mouse anti human CD8 , Klon: SP57	CC1 (64 Minuten)	37°C (16 Minuten)	Ready to use	ROCHE	
Anti - CD 47 antibody	CC1 (32 Minuten)	Raumtemperatur (32 Minuten)	1:500	Abcam	
Anti - SIRP alpha antibody ab 260039	CC1 (32 Minuten)	Raumtemperatur (32 Minuten)	1:4000	Abcam	
Rabbit PD-L1 monoclonal ab205921 (28-8)	CC1 (64 Minuten)	37°C (32 Minuten)	1:100	Abcam	
Maus anti human CTLA (F8)	CC1 (32 Minuten)	37°C (32 Minuten)	1:100	Santa Cruz	Epithel und Zellen außerhalb der Keimzentren

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien und Färbesubstanzen

Reagenzien	Anwendung	Hersteller
CC1: Cell Conditioning Solution	Tri – basierten Puffer (3:1)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
CC2: Cell Conditioning Solution	Citratpuffer (3:1)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Hämatoxylin	Thermo Scientific	ThermoShandon, Pittsburgh, USA
LCS	Liquid Coverslip Solution	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
EZ PREP	Detergenzlösung	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
OptiView Universal Linker	Spülung und Reinigung	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
OptiView Multimer	Spülung und Reinigung	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
OptiView DAB	Spülung und Reinigung	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
OptiView Copper	Spülung und Reinigung	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Antibody Diluent	Verdünnung der Antikörper	Zytomed Systems GmbH

2.8 Lichtmikroskopische Begutachtung

Die Beurteilung und Auswertung der TMAs erfolgte lichtmikroskopisch (Olympus VANOX AHBT3, Tokio, Japan). Das Lichtmikroskop verfügt über mehrere Objektive mit unterschiedlichen Vergrößerungsstufen (40x, 100x, 200x, 400x, 1.000x). Je nach Auswertungsmethode wurde in 100-facher oder 200-facher Vergrößerung gearbeitet. Bei der Auswertung sind sowohl qualitative und quantitative Aspekte begutachtet worden. Positiv gefärbte Endothelien sowie nicht -tumoröse Gewebeanteile wie, Erythrozyten oder umliegende Bindegewebsstrukturen sind bei der Auswertung nicht berücksichtigt worden. Ausschließlich tumorspezifische Anfärbungen (zytoplasmatisch, perinukleär oder nukleär) wurden ausgewertet (siehe Tab.7).

Die Auswertung von MIB1 erfolgte zum einen mikroskopisch, um eine Vorstellung der MIB1 Ausprägung innerhalb der Stanzprobe zu erhalten. Zum anderen wurde mit Hilfe des Mirax Scanners (Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland) ein Bild eines repräsentativen Areals aufgenommen und mittels dem Mirax Viewer Programm (Imagic Ims Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz) für eine digitale Auswertung aufbereitet. In den weiteren Schritten erfolgte eine quantitative Auswertung durch die Software Image J (Version 1.51j8, NIH, Bethesda, MD, USA) und den Plugins Bio-Formats (Release 5.4.1; Open Microscopy Environment, Madison, NJ, USA), und ImmunoRatio (Version 1.0c, Institute of Biomedical Technology, University of Tampere, Finnland). Hierdurch erfolgte die automatisierte Bestimmung der prozentualen Erfassung von angefärbten Zellkernen, die sich in einer Proliferationsphase befinden, berechnet auf die Gesamtfläche der vorliegenden Zellkerne. Für die jeweiligen Bildausschnitte wurden Areale gewählt, die auch repräsentativ in ihrer MIB1-Ausprägung für die gesamte Stanzprobe zu werten waren.

Bei CD68 und CD163 ist eine semiquantitative Beurteilung der zytoplasmatisch und perinukleären Anfärbung erfolgt, unter Verwendung des folgenden biologischen Scores: Der Score von 0 bedeutet, dass im kompletten Gewebszylinder keine oder nur eine geringe Anfärbung (bis 5%) mikroskopisch zu erkennen war. Score 1 steht für eine schwache Färbung (6-10% der Tumorzellen). Wenn circa 11-25% der Tumorzellen positiv gefärbt sind, wurden sie mit dem Score 2 bewertet. Score 3 steht für eine 26-50%ige Färbung der Zellen. Eine sehr stark positive Anfärbung ist mit dem Score 4 bewertet worden (> 50%). Die Grenzen sind nach einer ersten Abschätzung der Verteilung der Immunopositivität gewählt worden. Da für den Großteil der Tumore 2 Gewebezylinder auf TMAs zusammengetragen und ausgewertet wurden, ist der Mittelwert der Auswertung der einzelnen Stanzzyylinder errechnet worden, was vereinzelt zu Gesamt-Scores eines Tumors von 0,5 oder 1,5 geführt hat. Es wurde beschlossen jeweils auf den nächstgelegenen Score ab- oder aufzurunden (z.B. Abrunden von 1,33 auf einen Score von 1 oder Aufrunden 2,5 auf einen Score von 3).

Die Auswertung der CD3 und CD8 Antikörper erfolgte anhand einer genauen Zählung der immunopositiven Zellen innerhalb des jeweiligen Stanzzyinders. Bei Proben, wo es zu einem partiellen Verlust des Stanzzyinders kam, ist eine prozentuale Schätzung des noch vorhandenen Gewebes erfolgt. Demnach wurde die Anzahl immunopositiver Zellen auf einen vollständigen Gewebezyylinder hochgerechnet. Wäre beispielsweise nur ca. 80% eines Gewebezyinders vorhanden mit 20 immunopositiven Zellen, würde dies auf 25 immunopositive Zellen im Falle eines kompletten Gewebezyinders (100%) geschätzt.

Da es sich bei den Antikörpern für CD47, SIRP alpha, CTLA4 und PD-L1 um Antikörper handelte, welche im neuropathologischen Labor nicht etabliert waren, mussten diese zunächst bezüglich ihres Färbeverhaltens und ihrer Handhabbarkeit evaluiert werden, um ein geeignetes Protokoll für den Stainer zu etablieren. Hierzu erfolgten erste Probefärbungen zur Ermittlung der passenden Vorbehandlungen, Verdünnungen und Inkubationen, unter Berücksichtigung der Herstellerempfehlungen. Anschließend wurden erste Färbungen an Flächenschnitten und Tissue Microarrays von Vestibularisschwannomen angefertigt. Hierbei ergab sich, dass aufgrund einer heterogenen Immunopositivität in Vestibularisschwannomen, die Anfärbung in Tissue Microarrays nicht geeignet war, sodass beschlossen wurde, CD47, SIRP alpha, CTLA4 und PD-L1 an ausgewählten Flächenschnitten zu untersuchen. Die Auswahl der Proben erfolgte in Abhängigkeit der Expressionsergebnisse von CD3/8 und CD68/163 (Tumore mit niedriger und hoher inflammatorischer Infiltration).

Dabei erfolgte eine Einschätzung von den PD-L1 positiven gefärbten Zellen anhand von einem einfachen Score: 0 bedeutet, dass keine Zelle im Flächenschnitt eine Färbung mit eindeutigen Zellbezug aufweisen. Der Score 1, dass 1-5% der Zellen im Flächenschnitt PD-L1 positiv gefärbt sind, der Score von 2, dass 6-25% der Zellen positiv gefärbt sind, und 3 das 26-50% der Zellen eine bräunliche Färbung aufweisen. Ein Score von 4 repräsentiert alle Flächenschnitte bei denen über 50% PD-L1 positiv gefärbte Zellen aufzufinden waren.

Bei der Beurteilung der CTLA4 Flächenschnitte zeigen sich allerdings nur wenig gefärbte Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche und Zellzahl. Somit ist hier kein Score zur Anwendung gekommen, es ist ausschließlich die Beurteilung über positiv und negativ gefärbte Flächenschnitte erfolgt.

SIRP alpha wurde ebenfalls in drei Kategorien eingeteilt. Flächenschnitte, welche keine Färbung aufweisen erhielten den Score 0. Bei einer Färbeintensität von unter 50% erfolgte die Einteilung mit dem Score von 1, bei einer Positivität über 50% wurden sie zu dem Score 2 gezählt.

Bei dem membranären Glykoprotein CD47 ist es zu keiner auswertbaren Färbung gekommen. Das Färbemuster war in den ausgewählten Flächenschnitten immer nur randständig aufgefallen. Da es sich hierbei also um eine axonale Färbung von Nervenfaszikeln handelt und keine Färbung der Tumorzellen vorliegt, konnte eine Beurteilung hier nicht stattfinden. Generell war nur eine sehr geringe prozentuale Färbung zu sehen mit keinem klaren Bezug zu den jeweiligen hoch und niedrig Inflammatorischen Fällen.

Tabelle 7: Die jeweilig gewählten Scores zu den einzelnen Markern

Marker	Score				
	0	1	2	3	4
CD68	0-5%	6-10%	11-25%	26-50%	>50%
CD163	0-5%	6-10%	11-25%	26-50%	>50%
PD-L1	0%	1-5%	6-25%	26-50%	>50%
CTLA4	negativ	positiv	-	-	-
SIRP alpha	0%	< 50%	>50%	-	-
CD47	-	-	-	-	-
CD3	Auszählung immunopositiver Zellen pro Fläche				
CD8	Auszählung immunopositiver Zellen pro Fläche				
MIB1	Digitale Quantifizierung				

Aus den zwei vorliegenden Stanzproben pro Fallnummer wurde jeweils der Mittelwert errechnet, so dass sich pro Fall und Antikörper ein Wert ergab. Für die Auswertung von CD68, und CD163 wurde dies in Grenzfällen auf eine ganze Zahl gerundet, um dem ursprünglichen Score zu entsprechen, wie bereits, beschrieben wurde. Ist nur eine beurteilbare Stanzprobe vorgelegen, wurde auch

nur dieser Wert verwendet. Waren weniger als 10% von einem Stanzzyylinder erhalten wurde dieser nicht bewertet.

2.9 Statistische Analyse und Darstellung

Für die Statistische Auswertung wurde JMP 16, Version 16.2.0, Statistical Discovery Software (SAS Institute inc.; 1989) verwendet. Der Datensatz, welcher in JMP importiert wurde, wurde zuvor vollständig mit Microsoft Excel Office 365 Plus (© Microsoft 11) erfasst. Mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse wurden alle klinischen Daten mit den Expressionsergebnisse der einzelnen Antikörper (CD163, CD68, CD3 und CD8) verglichen (ANOVA „oneway analysis of variance“). Außerdem erfolgte ein zusätzlicher Vergleich mit der Proliferationsrate anhand der MIB-1 Expression. Das Signifikanzniveau wurde mit einem p – Wert $<0,05$ definiert. Das festgelegte Konfidenzintervall liegt bei 95%. Der Pearson – Korrelationskoeffizient wurde der Likelihood Ratio in den Konfidenztafeln vorgezogen. Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen wurden mit Hilfe der Software Imagic Ims (Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz) angefertigt. Das Arrangement von Abbildungen erfolgte mit dem Graphikprogramm GIMP 2.10.20 (Open Source Software, GIMP Development Team, Spencer Kimball and Peter Mattis).

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der Gesamtkohorte

Das Kollektiv umfasst 1272 diagnostizierte Vestibularisschwannome. Das durchschnittliche Diagnosealter liegt bei 46,5 Jahren. Die Altersspanne reicht von 7 bis 80 Jahren. Das Geschlechterverhältnis ist relativ ausgeglichen mit 618 männlichen Patienten (48,6%) und 654 weiblichen Patientinnen (51,4%). Männer sind bei Diagnosestellung minimal jünger (45,9 Jahre) als Frauen (47,1 Jahre) (p -Wert = 0,1408). Bei 1206 Fällen (94,8%) handelt es sich um primäre Fälle, bei 66 Fällen (5,2%) um Rezidive. Innerhalb der Gesamtkohorte befinden sich 137 Tumore (10,8%) bei denen eine NF2 vorliegt. Diese weisen ein Durchschnittsalter von 27,4 Jahren auf und zeigen somit einen signifikanten Unterschied (p -Wert $<0,0001$) zur restlichen Kohorte auf (46,5 Jahre). Ähnlich wie in dem Gesamtkollektiv ist auch hier das Geschlechterverhältnis mit 71 männlichen und 66 weiblichen Patienten ausgeglichen. 41 (3,2%) der gelisteten Tumore erhielten vor OP eine Radiotherapie. Gemäß der Hannover Klassifikation weisen 53 Fälle (4,2%) einen T1 Status auf und 263 (20,7%) Tumore wurden als T2 klassifiziert. Der Großteil der Fälle hatte eine weitere Ausdehnung im Kleinhirnbrückenwinkel, mit 484 Fällen (38,1%) als T3 und 472 Fälle (37,1%) als T4 klassifiziert. Bei einer weiteren Dichotomisierung der Hannover Klassifikation (T1 und T2 vs. T3 und T4) zeigt sich eine klare Überrepräsentation der größeren Tumore (T3/4; $n = 954$). Die Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der beschriebenen Ergebnisse.

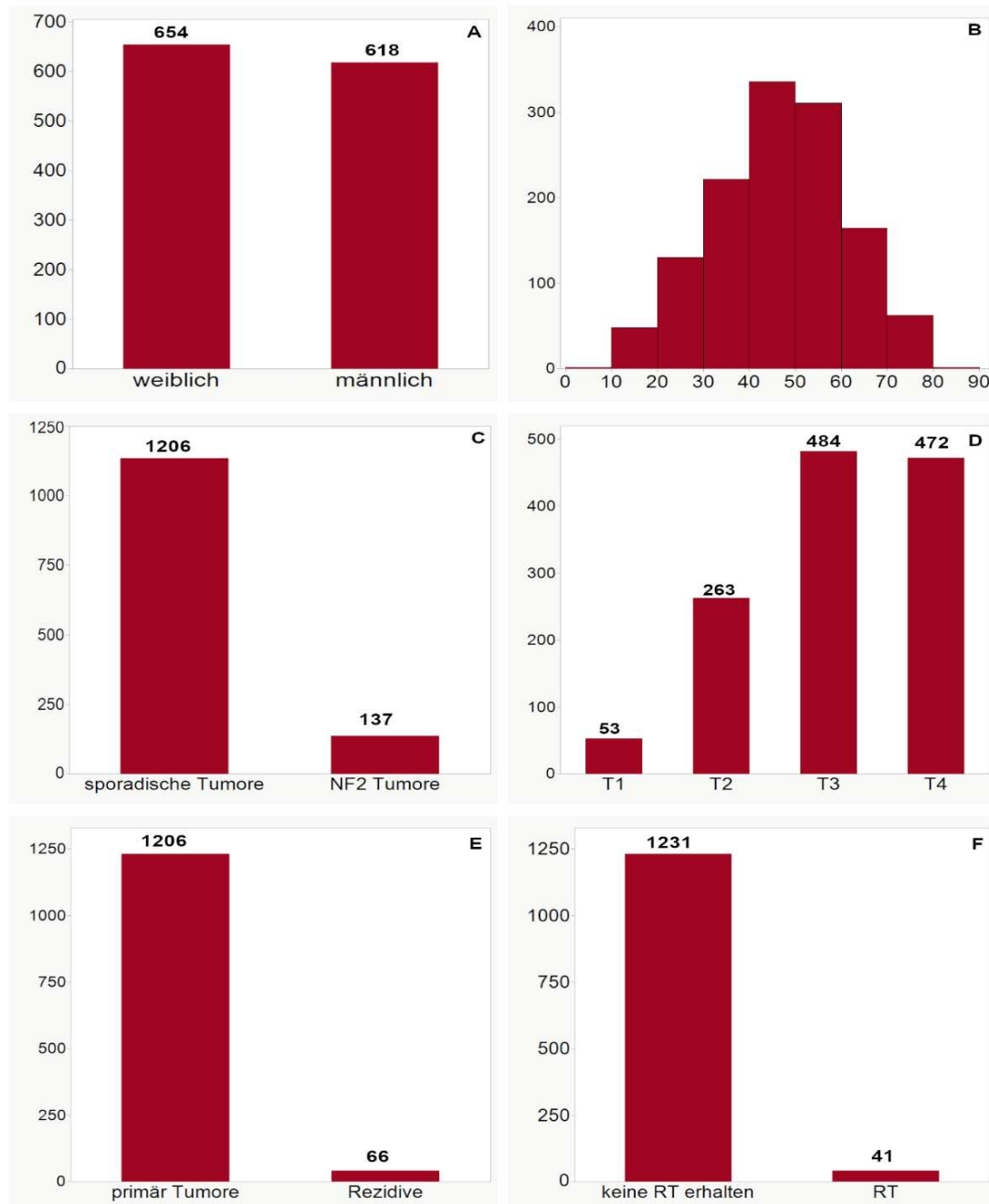


Abbildung 5: Beschreibung des Kollektivs anhand der klinischen Daten (A) Verteilung nach Geschlecht, (B) Alter in Jahren, (C) Anteil der NF2 assoziierten Tumore zu den sporadischen Tumoren, (D) Verteilung nach Hannover Klassifikation, (E) Anteil der Rezidive zu den primär Tumoren, (F) präoperativ Radiotherapie.

3.2 MIB1

Von der Gesamtkohorte (n=1272) liegen MIB1-Flächenschnittfärbungen von 1242 Fällen zur Auswertung vor.

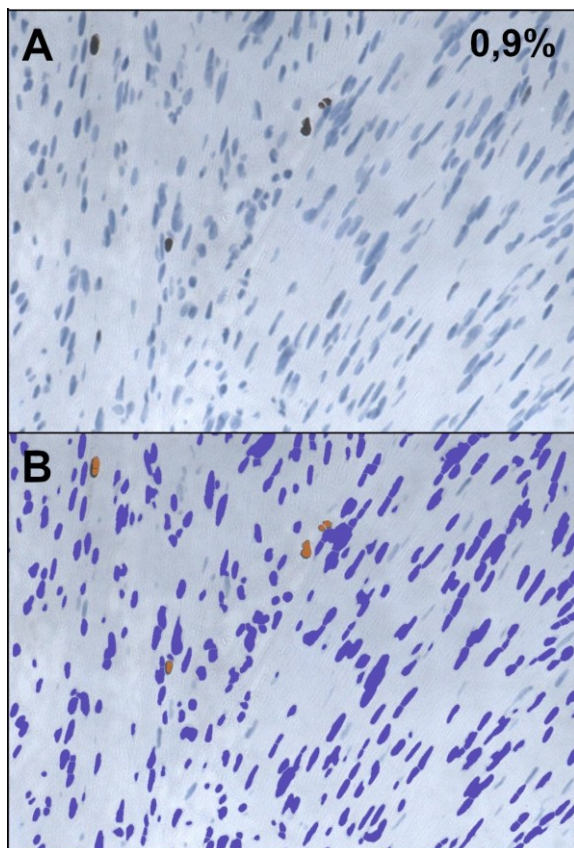


Abbildung 6: Quantitative digitale Auswertung der MIB1-Immunhistochemie. Digitale Bilder von repräsentativen Arealen (A) zeigen in dunkelbraun in Proliferation begriffene Zellen. In Bezug auf die Gesamtfläche der Zellkerne wird so die prozentuale Immunpositivität abgeschätzt (B).

Korrelation von MIB1 zu den klinischen Daten

In der Gesamtkohorte hat sich eine Variation der MIB1-Werten zwischen dem Minimum von 0% und einem Maximum von 4,75% gezeigt. Daraus hat sich der Mittelwert von 1,3% ergeben. In der Auswertung der klinischen Daten im Verhältnis zu MIB1 findet man bei der Verteilung der Geschlechter ein signifikantes Ergebnis (p-Wert = 0,0128). In der männlichen Kohorte präsentiert

sich ein MIB1 Mittelwert von 1,34% wohingegen die weibliche Kohorte einen Mittelwert von 1,23% aufweist. Alle weiteren Ergebnisse weisen keine Signifikanz auf (siehe Abbildung 7). Bei den erhobenen MIB1 Werten handelt es sich jeweils immer um Mittelwerte der einzelnen Gruppen. So zeigt sich bei einer präoperativen Radiotherapie (n=40) ein MIB1-Mittelwert von 1,39%. Bei Tumoren die keine präoperative RT erhalten haben (n=1202), beträgt der Wert 1,30% (p-Wert = 0,2502). Rezidive (n=62; MIB1=1,27%) weisen eine ähnliche MIB1-Expression auf als Tumore einer Erstdiagnose (n=1180; MIB1=1,30%). Somit kann auch hier keine Signifikanz aufgezeigt werden (p-Wert = 0,6412). Die Gruppe der NF2 Fälle (n=131) hat einen Mittelwert von 1,24% im Vergleich zu der Gruppe ohne genetische Erkrankung (n=1111) mit einem MIB1 von 1,31% (p-Wert = 0,1260). Es zeigten sich kein Unterschied hinsichtlich der Tumorausdehnung gemäß der Hannoverklassifikation. Tumore, die mit T1 eingestuft wurden, weisen einen MIB1 Mittelwert von 1,19% auf, T2 Tumore einen Mittelwert von 1,28%, T3 einen Mittelwert von 1,33% und T4 Tumore einen MIB1 Mittelwert von 1,30% (p-Wert = 0,2224). Auch bei Dichotomisierung der Kohorte in T1/2 (n=310) und T3/4 (n=930), ergibt sich mit 1,26%, respektive 1,31%, kein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,1330).

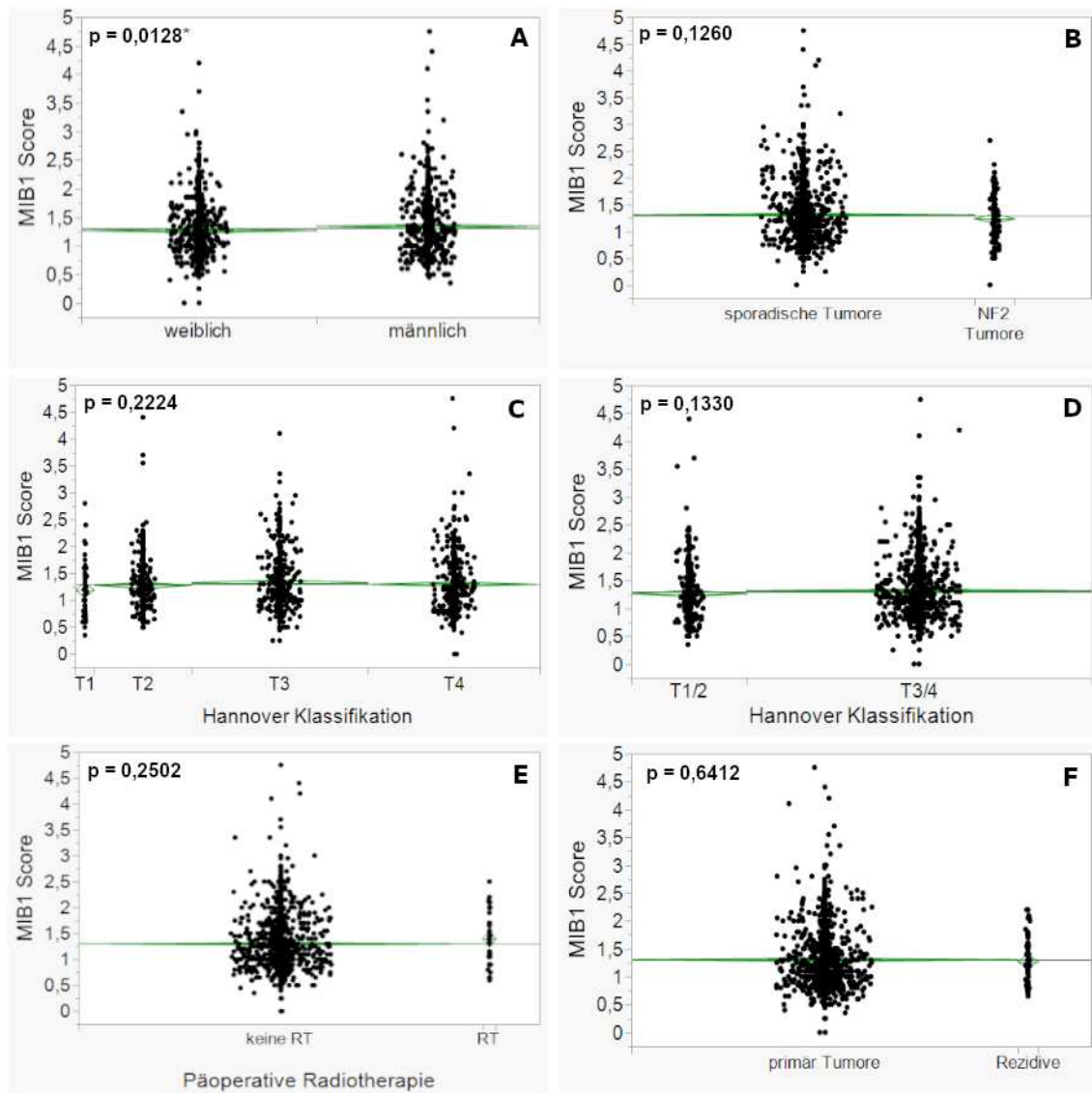


Abbildung 7: Scatter-Plot zur Darstellung von Unterschieden der MIB1 Immunopositivität hinsichtlich Geschlecht (**A**), NF2 (**B**), Tumorextension gemäß der Hannover Klassifikation (normal und dichotomisiert) (**C**) und (**D**), präoperativer RT (**E**), Rezidivtumorstatus (**F**).

Um eine genauere Vorstellung von der Korrelation der MIB1 Expression und dem Alter zu erhalten wurden unterschiedliche Cut offs in der Altersverteilung vorgenommen (Cut off \geq 10; 20; 30; 40; 50; 60 Jahre). Zusätzlich wurde noch ein Cut off bei dem Median von 47 Jahren gesetzt. Bei allen angewandten Cut offs konnte kein altersspezifischer signifikanter Unterschied in der MIB1 Expression ermittelt werden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: MIB1 Score in Abhängigkeit unterschiedlicher Alters- Cut offs

Verteilung des MIB Scores anhand des Alters

Alters-Cut off in Jahren	N (%)	MIB1 (%)	p-Wert
< 47 (<i>median</i>)	606 (48,8)	1,30	0,8710
>= 47	636 (51,2)	1,30	
< 20	45 (3,6)	1,40	0,1931
>= 20	1197 (96,4)	1,30	
< 30	172 (13,8)	1,31	0,8967
>= 30	1070 (86,2)	1,30	
< 40	385 (31,0)	1,32	0,4257
>= 40	857 (69,0)	1,29	
< 50	715 (57,6)	1,30	0,9102
>= 50	527 (42,4)	1,30	
< 60	1019 (82,0)	1,29	0,1825
>= 60	223 (18,0)	1,34	

3.3 CD163

Immunhistochemisch zeigt sich bei CD 163 ein perinukleäres Färbemuster (siehe Abbildung 8). 1258 Fälle der Gesamtkohorte konnten mit dem Antikörper erfolgreich gefärbt und ausgewertet werden.

3.3.1 CD 163 Verteilung

Mit 513 Fällen (41,0%) weist der Großteil der Kohorte keine oder nur eine vereinzelte Expression von CD163 auf (Score 0). Weitere 428 Proben (34,0%) zeigen eine schwache Expression (Score 1) und 207 (16,5%) eine mittlere (Score 2). In 86 Fällen (6,8%) wurde ein Score von 3 gegeben und in 24 (1,9%) ein Score von 4. Bei einem Cut off von ≥ 1 mit Unterscheidung von nicht oder gering gefärbten Tumoren und eindeutig immunpositiven Tumoren, erhält man eine Verteilung von 745 (59%) negativ bis vereinzelt positiven und 513 (41%) positiv gefärbten Fällen (siehe Abbildung 8).

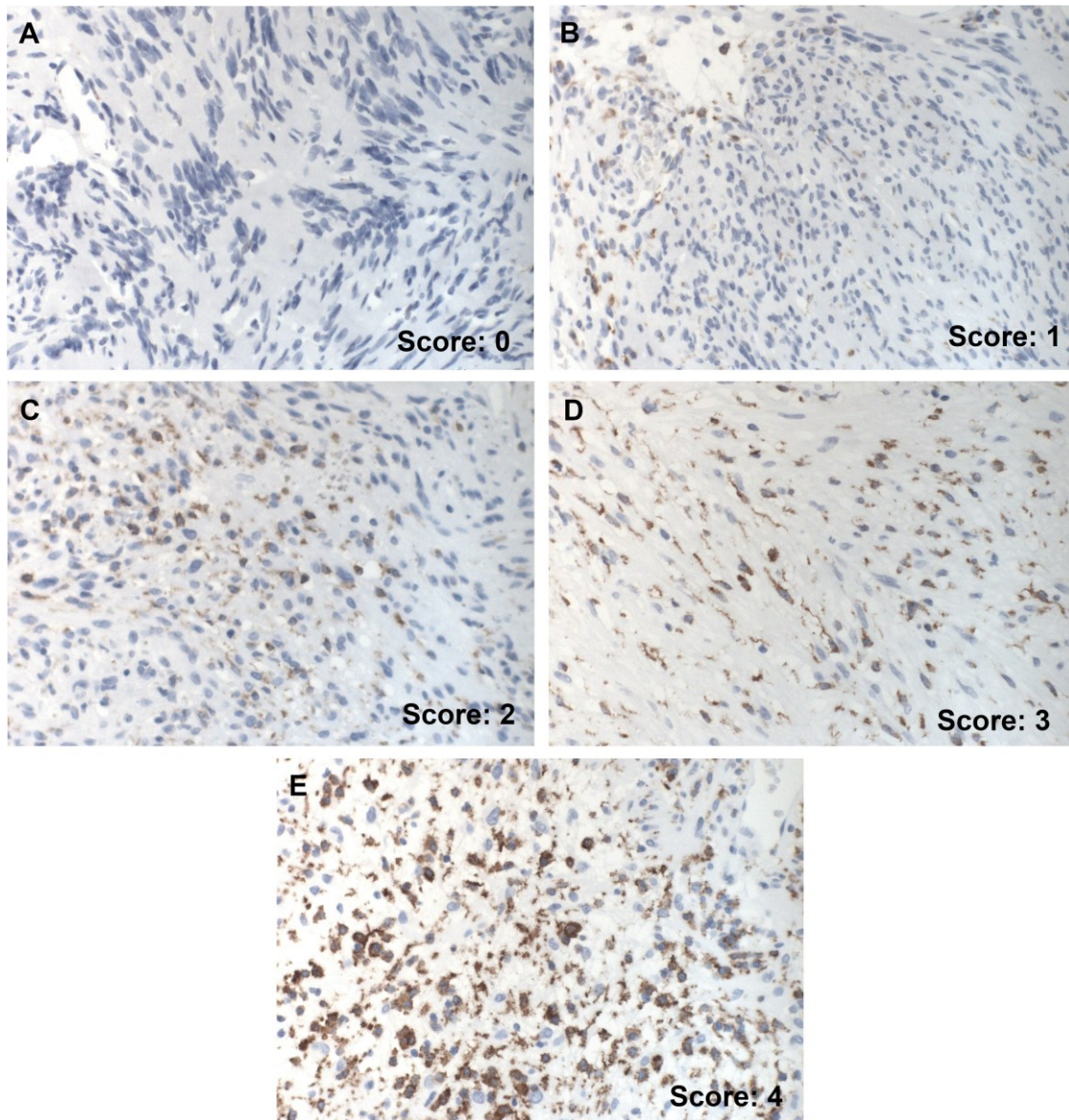


Abbildung 8: Immunhistochemische perinukleäre braune Färbung von CD 163. In Aufsteigender Reihenfolge (A-E) präsentieren die Bilder den gewählten Score 0-4.

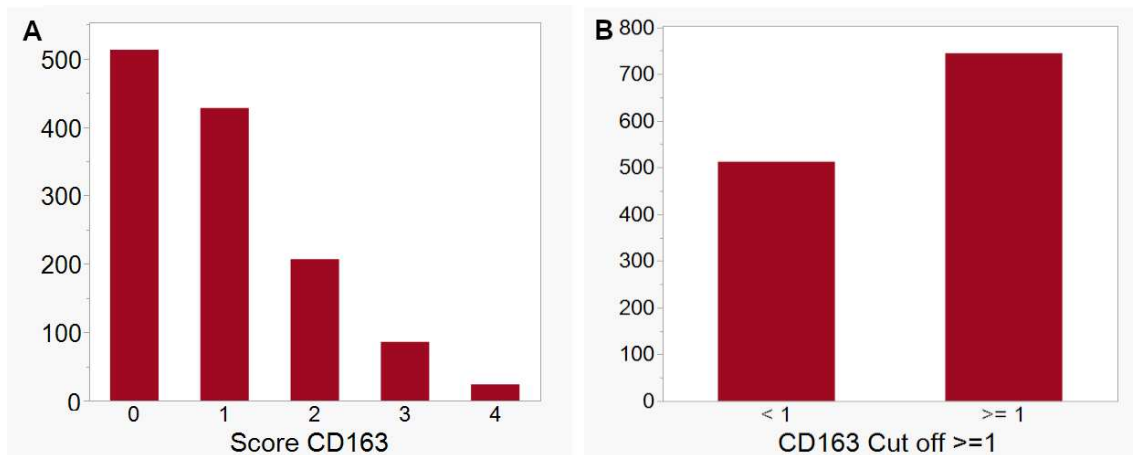


Abbildung 9: Balkendiagramm CD163 (A) Verteilung nach dem gewählten Score CD163, (B) Verteilung von CD 163 bei einem gewählten Cut off von ≥ 1

Verteilung von CD163 zu den klinischen Daten

Zwischen dem Geschlecht und der Expression von CD163 lässt sich im Gesamtkollektiv kein signifikanter Unterschied erkennen (p-Wert = 0,1654). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei Primärtumoren und Rezidiven (p-Wert = 0,1517). Bei Tumoren, die eine Radiotherapie erhalten haben, ist eine signifikant höhere Expression von CD163 zu erkennen (p-Wert = 0,0007). Aus der Gruppe der bestrahlten Tumore weisen somit 34 (82%) von n=41 eine positive Färbung von CD163 auf. Hingegen bei der Gruppe Tumore, bei denen eine Assoziation zu NF2 (n=133) vorliegt, zeigen hingegen eine bedeutend geringere Färbung von CD163 positiven Zellen (p-Wert = 0,0084). So finden sich bei 60 (45,1%) Tumore eine immunhistochemische Reaktion. Bei der Kohorte der nicht NF2 assoziierten Tumore (n=1125) zeigen sich bei 685 (60,8%) Tumorproben ein positiver Nachweis. Ein klares Resultat findet sich in der Auswertung der Hannover Klassifikationen. Zur Dichotomisierung wurden die Klassifikationen T1 und T2, sowie die Klassifikationen T3 und T4 jeweils zusammengefasst. Schon in dieser Einteilung der Klassifikation findet sich ein klarer signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,0001). Exemplarisch wird hier der Score 2 näher beleuchtet. Hier können bei den T1/T2 gelisteten 23 Tumore kategorisiert werden, wo sich hingegen bei den T3/T4 Tumoren bei einem Score von 2 184 Tumore auflisten lassen. Dieses Ergebnis wird in der detaillierten

Hannover Klassifikation erneut bestätigt (p-Wert = 0,0001) Die einzelnen Zahlen sind nochmals detailliert in der folgenden Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Verteilung der CD163-Expression auf den gewählten Score 0 – 4 in Bezug auf die klinischen Daten

Verteilung der Expression von CD163 nach klinischen Daten

N 1258

Score	0 N (%)	1 N (%)	2 N (%)	3 N (%)	4 N (%)	p-Wert
Geschlecht						0,1654
weiblich	255 (39,4)	237 (36,6)	108 (16,7)	36 (5,6)	12 (1,9)	
männlich	258 (42,3)	191 (31,3)	99 (16,2)	50 (8,2)	12 (2,0)	
Präopertiv RT						0,0007*
keine RT	506 (41,6)	412 (33,9)	199 (16,4)	79 (6,5)	21 (1,7)	
RT	7 (17,1)	16 (39,0)	8 (19,5)	7 (17,1)	3 (7,3)	
Rezidiv						0,1517
Primärtumor	477 (40,0)	414 (34,7)	196 (16,4)	82 (6,9)	23 (1,9)	
Rezidiv	36 (54,6)	14 (21,2)	11 (16,7)	4 (6,1)	1 (1,5)	
NF2						0,0084*
kein NF2	440 (39,1)	394 (35,0)	187 (16,6)	81 (7,2)	23 (2,0)	
NF2	73 (54,9)	34 (25,6)	20 (15,0)	5 (3,8)	1 (0,8)	
Hannover Klassifikation (komplett)						<,0001*
T1	44 (84,6)	6 (11,5)	2 (3,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	
T2	145 (56,0)	85 (32,8)	21 (8,1)	6 (2,3)	2 (0,8)	
T3	186 (36,4)	174 (36,4)	84 (17,6)	27 (5,7)	7 (1,5)	
T4	136 (29,1)	163 (34,9)	100 (21,4)	53 (11,4)	15 (3,2)	
Hannover Klassifikation (dichotomisiert)						<,0001*
T1/2	189 (60,8)	91 (29,3)	23 (7,4)	6 (1,9)	2 (0,6)	
T3/4	322 (34,1)	337 (35,7)	184 (19,5)	80 (8,5)	22 (2,3)	

Als nächstes wurde eine Dichotomisierung der Kohorte vorgenommen. Die jeweiligen Cut offs bei einem Score von ≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3 , < 4 wurden erneut mit den klinischen Daten zu einem Vergleich herangezogen. Die Cut offs orientieren sich dabei streng an der Einteilung nach dem Score. Die hellblaue Färbung in den Graphen kennzeichnet Tumore die unterhalb des gewählten Cut offs liegen. Der dunkelblaue Ton zeigt die Anzahl der Tumor die oberhalb des Cut offs liegen. Bei einem gewählten Cut off von < 4 waren nur noch sehr wenige Tumore über dem Cut off gelegen, so dass dieser aus der Wertung rausgenommen wurde.

Bei einem gewählten Cut off von ≥ 1 zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei dem Geschlecht (p -Wert = 0,2884). Gleiches zeigt sich auch bei einem Cut off von ≥ 2 , sowie bei einem Cut off von ≥ 3 . Auch hier kann keine Signifikanz in der Geschlechterverteilung nachgewiesen werden (siehe Abb. 10). Für die tatsächlichen Werte, siehe Tabelle 10.

Geschlecht

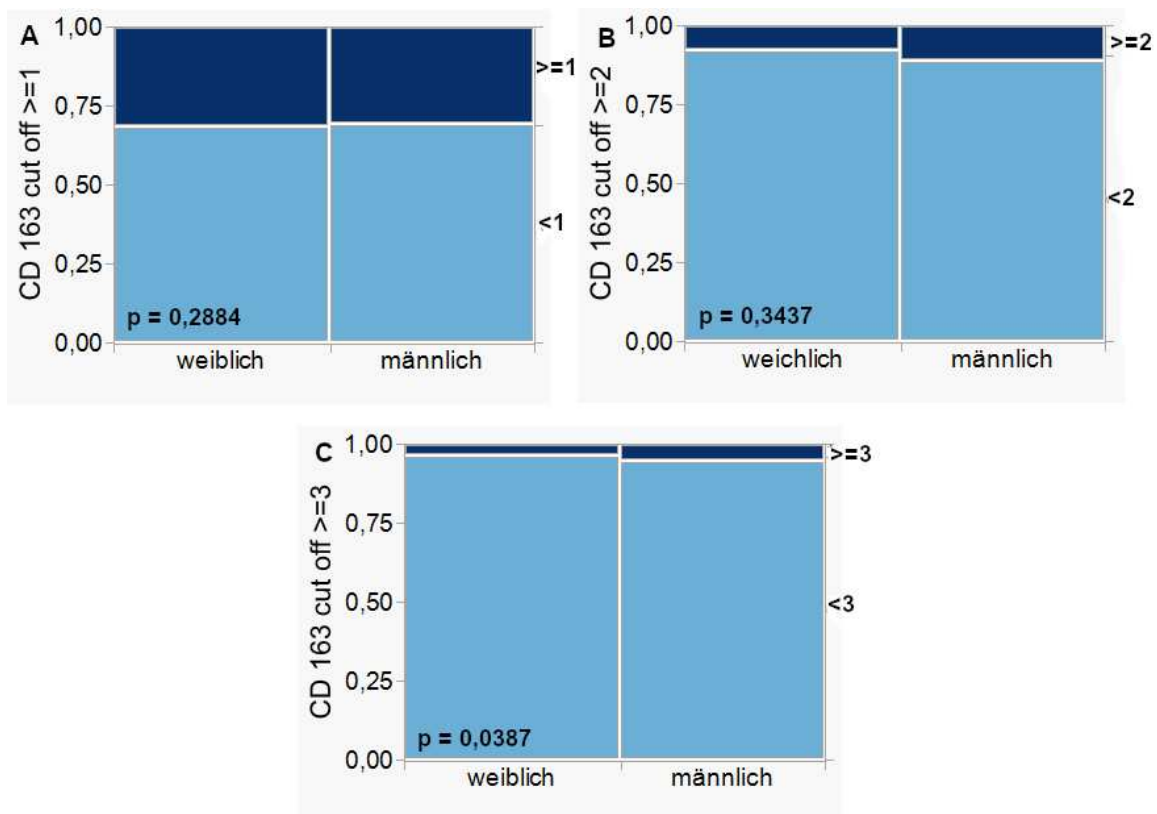


Abbildung 10: Unterschiede in der Expression von CD163 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf das Geschlecht

Hier zeigt sich ein klarer signifikanter Unterschied bei einem gewählten Cut off von ≥ 1 ($p = 0,0005$). Die Expression von CD163 ist in der Gruppe der sporadischen Tumoren oberhalb des gewählten Cut off signifikant höher. Auch in

den weiteren Cut offs (≥ 2 , ≥ 3) besteht hier eine höhere Expression im Vergleich zu den NF2 Tumoren, allerdings mit keinem signifikanten Ergebnis (siehe Abb. 11). Für die tatsächlichen Werte, siehe Tabelle 10.

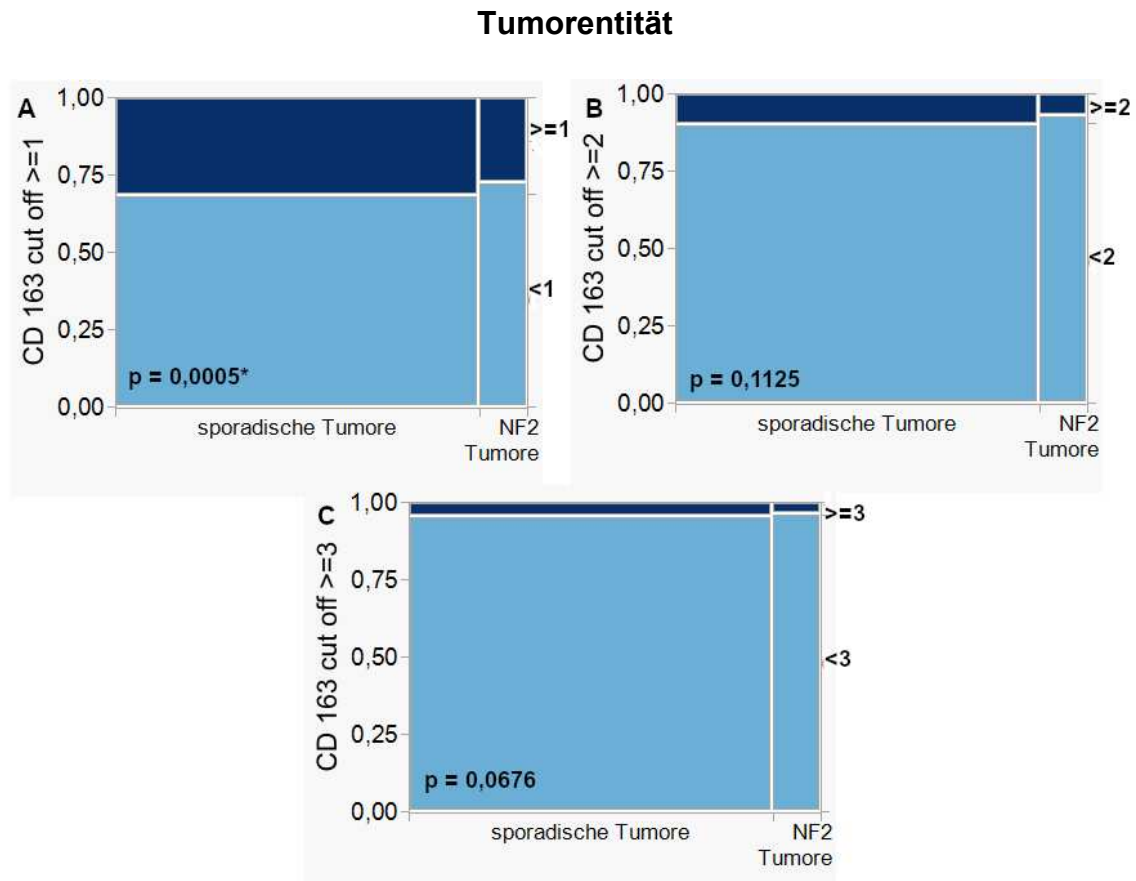


Abbildung 11: Unterschiede in der Expression von CD163 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf das Verhältnis der NF2 Tumor zu den sporadischen Tumoren

Ein sehr klares Resultat zeigt sich im Vergleich der hoch und niedrig gradigen Hannover Klassifikation bei dem Cut off von ≥ 1 . So wird erneut deutlich, wie hoch die Assoziation einer erhöhten CD163 Expression mit einer größeren Tumorenausdehnung ist (p -Wert $< 0,0001$) (siehe Abb. 12). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 10.

Hannover Klassifikation

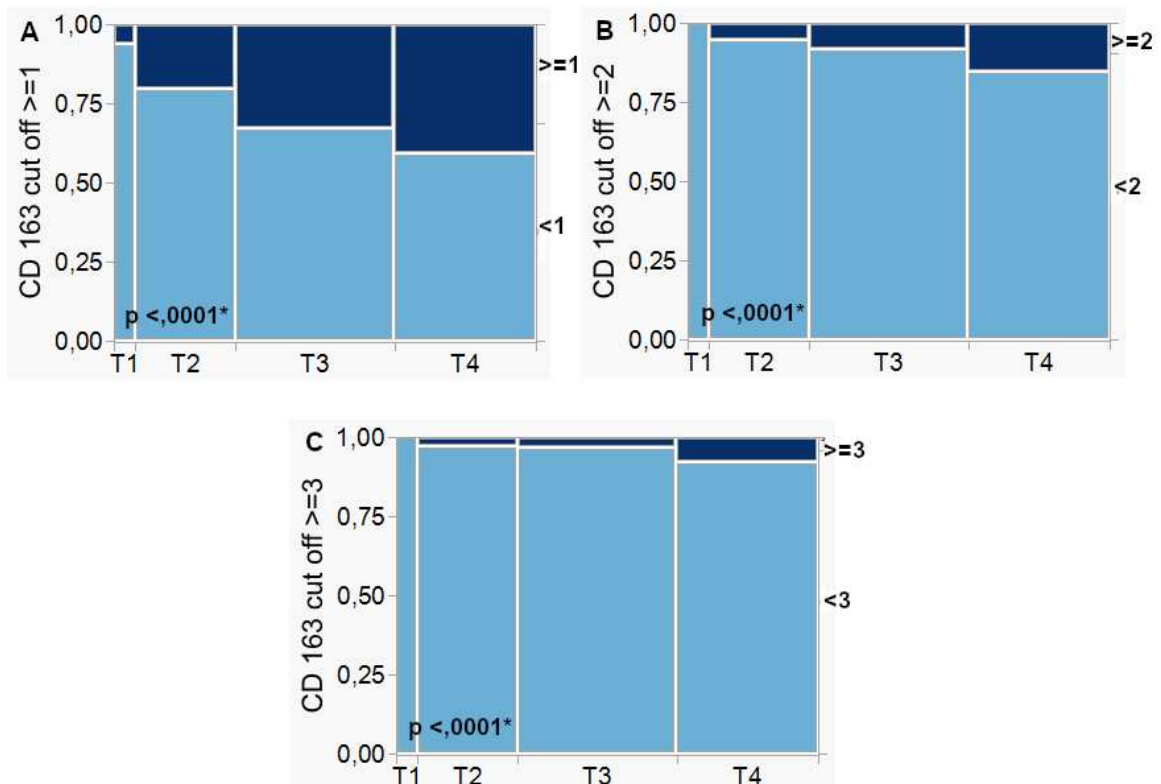


Abbildung 12: Unterschiede in der Expression von CD163 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf die Hannover Klassifikation

Auch in der dichotomisierten Hannover Klassifikation sieht man eine signifikant höheren Wert von CD163 positiven Zellen bei zunehmender Tumorausdehnung ($<0,0001$) (siehe Abb. 13). Dieses Ergebnis ist in allen drei angewandten Cut offs zu erkennen. Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 10.

Dichotomisierte Hannover Klassifikation

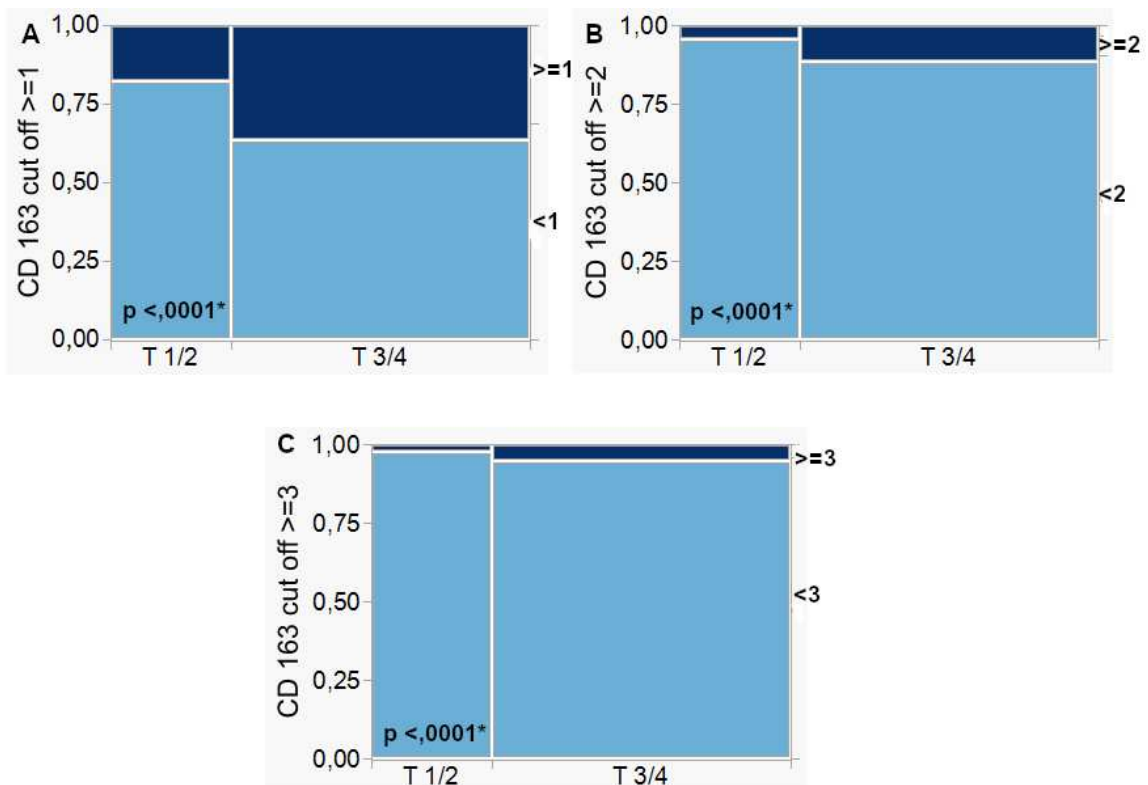


Abbildung 13: Unterschiede in der Expression von CD163 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf die dichotomisierte Hannover Klassifikation

Die Rezidivtumore weisen bei einem Cut off von ≥ 1 eine signifikant geringere CD163 Expression auf, im Vergleich zu primären Tumoren (p-Wert = 0,0194). In den weiteren Cut offs zeigt sich kein signifikanter Unterschied der CD163 Expression (siehe Abb. 14). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 10.

Primärtumore vs Rezidivtumore

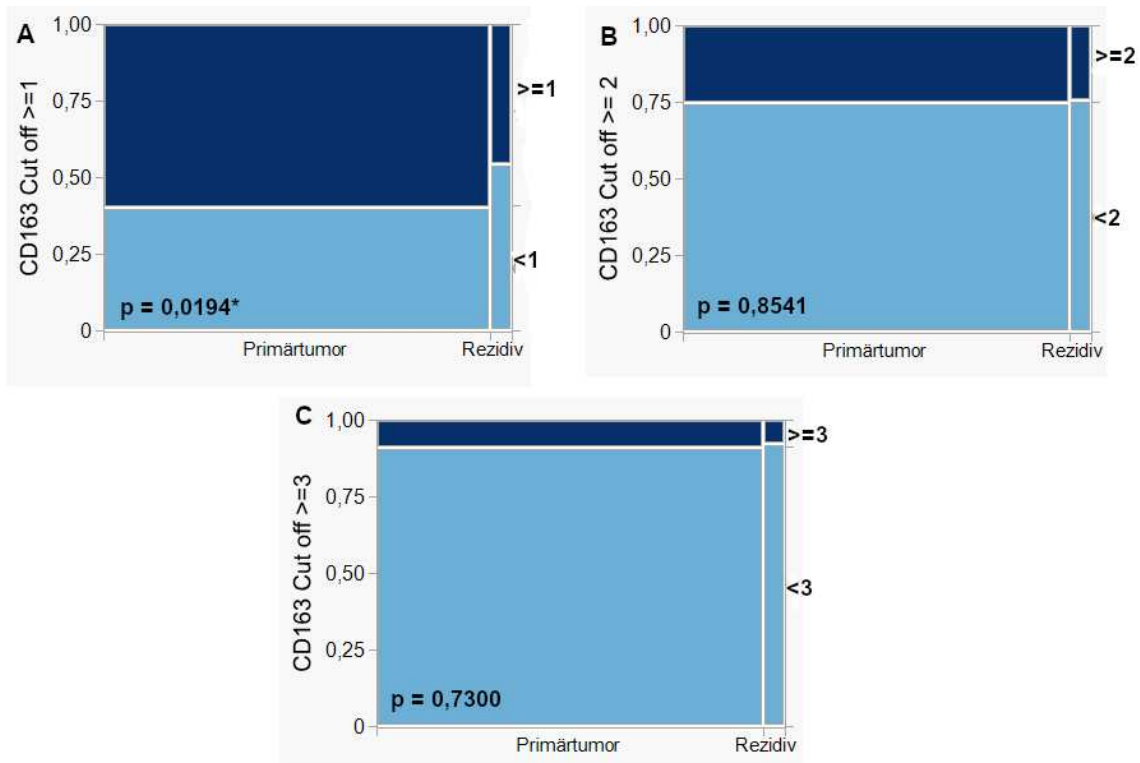


Abbildung 14: Unterschiede in der Expression von CD163 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf das Verhältnis der Rezidivtumore im Vergleich zu den Primärtumoren

Ein signifikantes Ergebnis ist zudem bei der Gruppe mit erhaltener Radiotherapie erkennbar, hier ergibt sich bei dem Cut off von ≥ 1 ein p-Wert von 0,0017. So zeigt sich hier eine deutlich gesteigerte Expression von CD163 positiven Zellen. Ein ähnlich signifikantes Ergebnis zeigt sich ebenfalls bei einem Cut off von ≥ 2 ($p = 0,0050$), sowie einem Cut off von ≥ 3 ($p = 0,0003$) (siehe Abb. 15). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 10.

Präoperative Radiotherapie

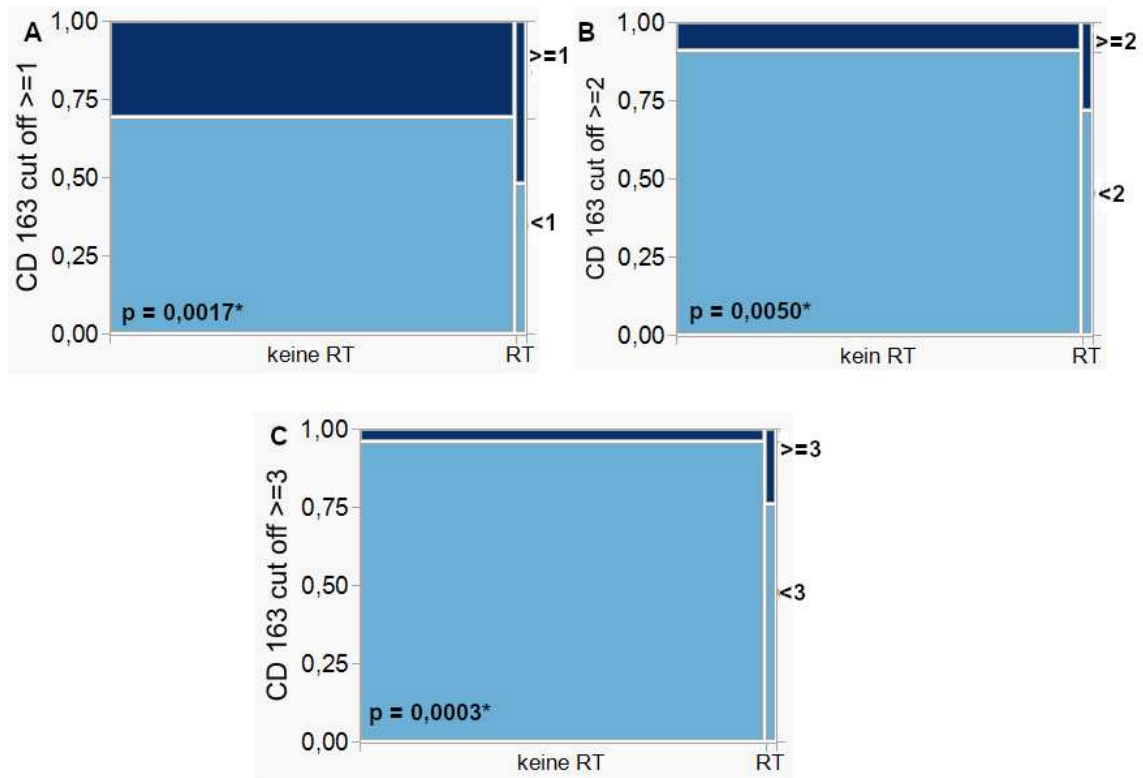


Abbildung 15: Unterschiede in der Expression von CD163 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf eine präoperative Radiotherapie

Tabelle 10: Expression von CD163 bei den gewählten Cut offs (≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3) im Bezug auf die klinischen Daten**Verteilung der gewählten CD163 Cut offs im Vergleich der klinischen Daten**

	Cut off ≥ 1		Cut off ≥ 2		Cut off ≥ 3	
	< 1 N (%)	≥ 1 N (%)	< 2 N (%)	≥ 2 N (%)	< 3 N (%)	≥ 3 N (%)
Geschlecht						
p-Wert	0,2884*		0,3437		0,0837	
Weiblich	255 (20,3)	393 (31,2)	492 (39,1)	156 (12,4)	600 (47,7)	48 (3,8)
Männlich	258 (20,5)	352 (27,9)	449 (35,7)	161 (12,8)	548 (43,5)	62 (4,9)
Tumorentität						
p-Wert	0,0005*		0,1125		0,0477*	
Sporadische Tumore	440 (34,9)	685(54,4)	834(66,3)	291 (23,1)	1021 (81,2)	104 (8,3)
NF2 Tumore	73(5,8)	60 (4,7)	107 (8,5)	26 (2,1)	127(10,1)	6 (0,5)
Rezidive						
p-Wert	0,0194*		0,8541		0,7300	
Primär Tumor	477 (37,9)	715 (56,8)	891 (70,8)	301(23,9)	1087 (86,4)	105 (8,4)
Rezidiv	36 (2,8)	30 (2,4)	50 (3,9)	16 (1,3)	61 (4,9)	5 (0,4)
Präoperative Radiotherapie						
p-Wert	0,0017*		0,0050*		0,0003*	
Keine RT	506 (40,2)	711 (56,5)	918 (73,0)	299 (23,8)	1117 (88,8)	100 (8,0)
RT	7 (0,5)	34 (2,7)	23 (1,8)	18 (1,4)	31 (2,5)	10 (0,8)
Hannover Klassifikation						
p-Wert	<,0001*		<,0001*		<,0001*	
T1	44 (3,5)	8 (0,6)	50 (4,0)	2 (0,2)	52 (4,1)	0 (0,0)
T2	145 (11,5)	114 (9,1)	230 (18,3)	29 (2,3)	251 (20,0)	8 (0,6)
T3	186 (14,8)	292 (23,4)	360 (28,7)	118 (9,4)	444 (35,4)	34 (2,7)
T4	136 (10,8)	331 (26,4)	299(23,8)	168 (13,4)	399 (31,8)	68 (5,4)

Auch in Bezug auf das Alter findet sich eine signifikante Zunahme der Infiltration mit CD163 positiven Zellen mit steigendem Alter (p-Wert <0,0001). So liegt der Mittelwert des Alters (in Jahren) bei einem Score von 0 bei 44,5 Jahren, im Vergleich zu 57,5 Jahren bei einem Score von 4 (siehe Abb. 16).

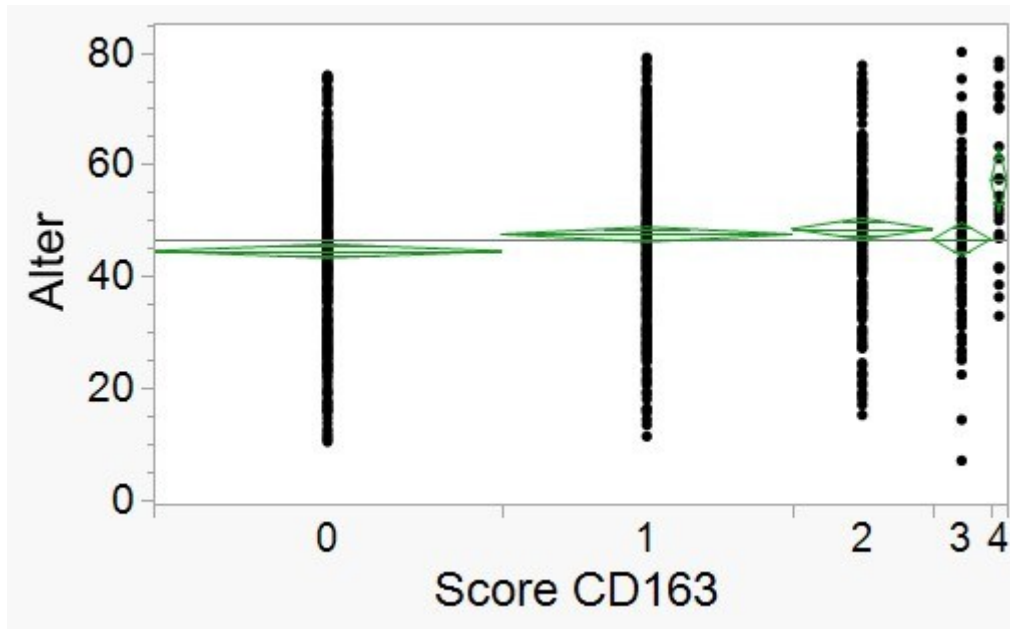


Abbildung 16: Altersverteilung im Bezug auf den CD163 Score

Bei den angewandten Cut offs (Cut off \geq 20; 30; 40; 50; 60; Median) des Alters zeichnet sich eine ähnlich signifikante Ergebnisse ab. So weisen die jeweiligen Kohorten mit dem höheren Altersdurchschnitt jeweils immer eine klare höhere Expression von CD 163 positiven Zellen auf. Ab einem Cut off von 30 Jahren zeigt sich dies auch in einem signifikante Ergebnis.. Beispielhaft zu nennen ist der Cut off \geq Median (47 Jahren) mit einem p-Wert von 0,0037 (siehe Tab. 11)

Tabelle 11: CD163 Score in Abhängigkeit von den Alters Cut offs

Verteilung der CD163 Expression anhand des Alters

Score CD163		0	1	2	3	4	p-Wert
	N (%)	N(%)	N (%)	N(%)	N(%)	N(%)	
Alters Cut off in Jahren							
< 47	617 (49,1)	279 (45,2)	202 (32,7)	88 (14,3)	42 (6,8)	6 (1,0)	0,0037*
>= 47 (Median)	641 (50,9)	234 (36,5)	226 (35,3)	119 (18,6)	44 (6,8)	18 (2,8)	
< 20	46 (3,7)	26 (56,5)	12 (26,1)	6 (13,0)	2 (4,4)	0 (0,0)	0,2427
>= 20	1212 (96,3)	487 (40,2)	416 (34,3)	201 (16,6)	84 (6,9)	24 (2,0)	
< 30	176 (14,0)	88 (50,0)	52 (29,6)	25 (14,2)	11 (6,3)	0 (0,0)	0,0386*
>= 30	1082 (86,0)	425 (39,3)	376 (34,8)	182 (16,8)	75 (6,9)	24 (2,2)	
< 40	393 (31,2)	183 (46,6)	125 (31,8)	52 (13,2)	30 (2,4)	3 (0,8)	0,0088*
>= 40	865 (68,8)	330 (38,2)	303 (35,0)	155 (17,9)	56 (4,5)	21 (2,4)	
< 50	726 (57,7)	323 (44,5)	243 (33,5)	104 (14,3)	48 (6,6)	8 (1,1)	0,0023*
>= 50	532 (42,3)	190 (35,7)	185 (34,8)	103 (19,4)	38 (7,1)	16 (3,0)	
< 60	1033 (82,1)	444 (43,0)	346 (33,5)	160 (15,5)	69 (6,7)	14 (1,4)	0,0005*
>= 60	225 (17,9)	69 (30,7)	82 (36,4)	47 (20,9)	17 (7,6)	10 ()	

Verteilung von CD163 zu MIB1

Ein ebenfalls signifikantes Ergebnis (p-Wert <0,0001) zeigt sich bei der Gegenüberstellung der CD163 Expression zu dem Proliferationsmarker MIB1. Hierbei zeigt sich eine deutliche Zunahme von MIB1 bei steigendem CD163 Score (Abb. 17).

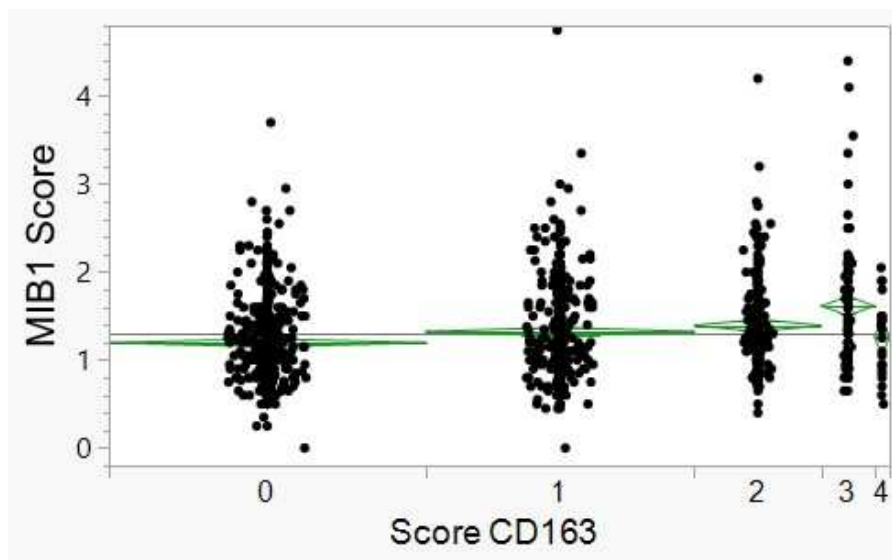


Abbildung 17: MIB1 im Verhältnis zu dem CD163 Score

So findet sich ein Mittelwert von 1,19% bei einem Score von 0, 1,32% mit einem Score von 1, 1,39% bei dem Score von 2. Einen maximalen Mittelwert von MIB1 (1,62%) zeigt sich in der Gruppe die einen Score 3 aufweisen. In der Kohorte mit dem Score von 4 zeichnet sich mit 1,26% ein verhältnismäßig geringer MIB1 Mittelwert ab.

Bei einem Cut off von ≥ 1 erfolgt eine Aufteilung von negativer bis schwacher Expression von CD163 und einer stärkeren Positivität. Im Vergleich ergibt sich hier ein Mittelwert von MIB1 von 1,24% bei denjenigen die unter dem Cut off liegen (< 1). Liegt die CD 163 Expression ≥ 1 zeigt sich ein Mittelwert von 1,41%. Somit liegt auch hier ein signifikanter Unterschied vor (p-Wert <0,0001). Ebenfalls bei einem gewählten Cut off von ≥ 2 , auch hier ist ein signifikantes Ergebnis mit einem p- Wert von <0,0001 nachweisbar. Hier beträgt der Mittelwert von MIB1 unterhalb dem Cut off 1,28%. Oberhalb des Cut off zeigt sich ein Mittelwert von

1,50% (Abb.18). Auf weitere Cut offs wurde bei einer zu geringen Gruppengröße in den höheren CD163 Scores verzichtet.

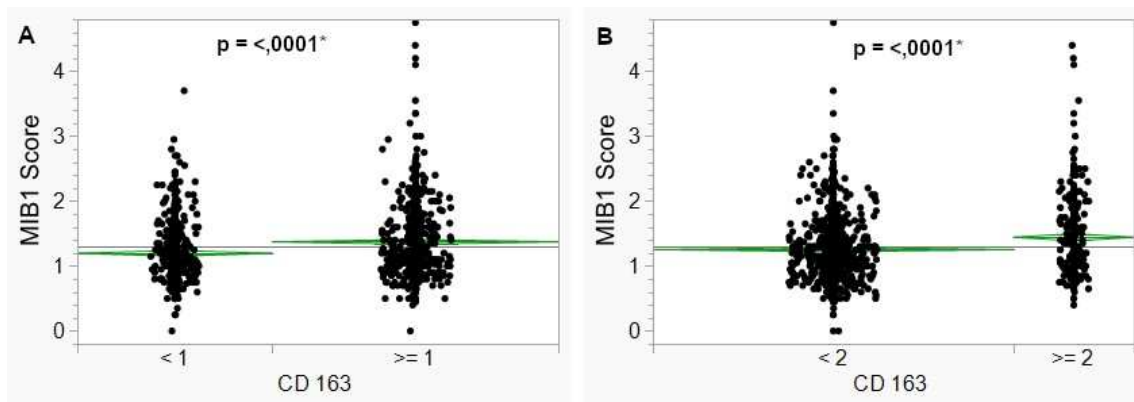


Abbildung 18: MIB1 im Vergleich zu CD163 Cut offs, (A) Cut off bei >= 1, (B) Cut off bei >= 2

3.4 CD68

3.4.1 CD68 Verteilung

Ein auswertbare immunohistochemische Färbung von CD68 ergab sich in 1257 von 1272 Fällen (98,8%). Das spezifische perinukleäre Färbemuster ist nochmal in der Abbildung 19 dargestellt.

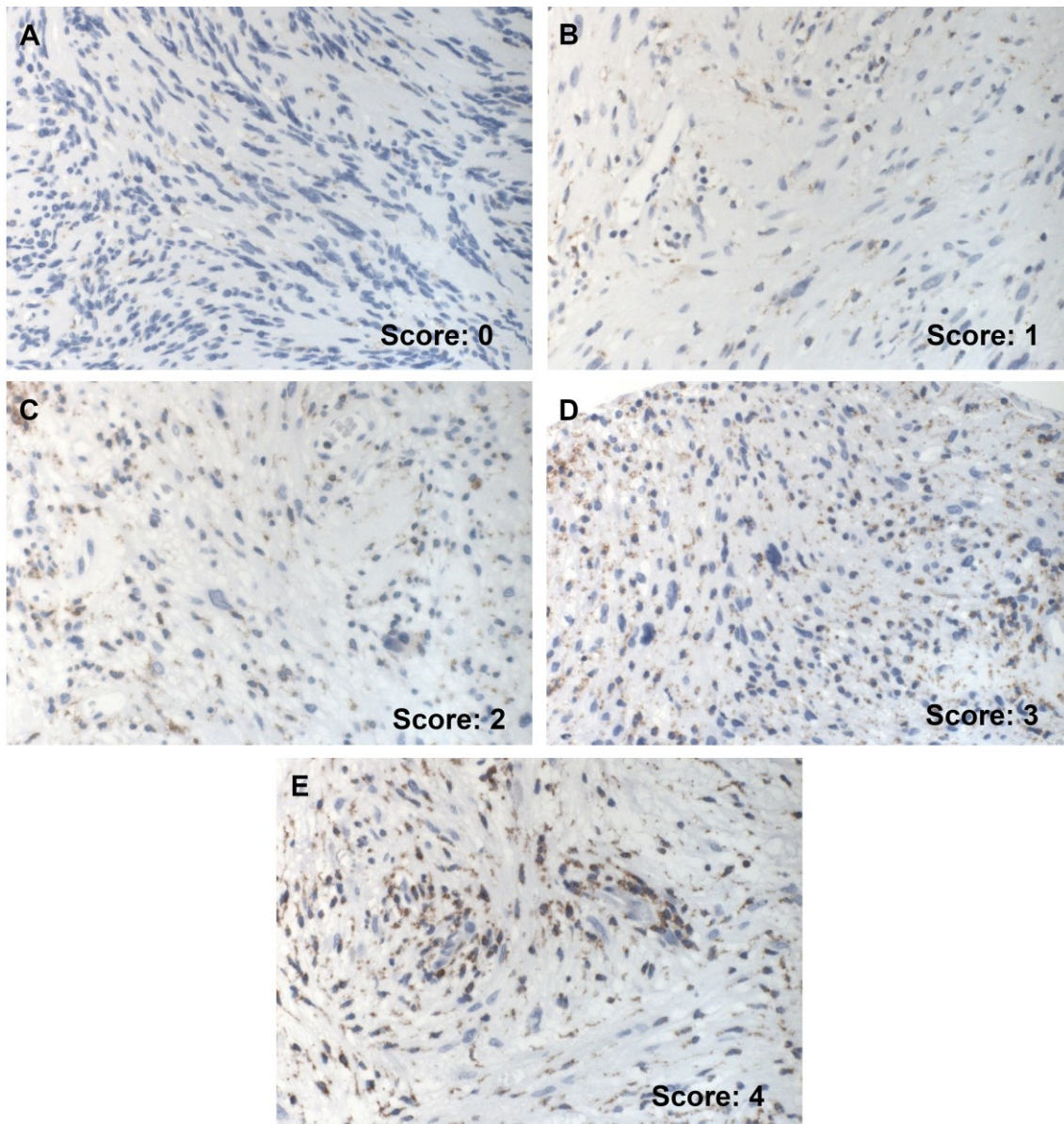


Abbildung 19: Immunhistochemische perinukleäre braune Färbung von CD 68. In Aufsteigender Reihenfolge (A-E) präsentieren den immunhistochemischen Score von 0 bis 4.

Wie schon bei CD163 zeigt sich in der Gesamtkohorte eine abfallende Zahl der Expression von CD68 bei zunehmendem Score. 247 (20 %) Fälle weisen somit keine oder nur vereinzelt positiv gefärbte Zellen auf (Score 0). Eine maximale Expression findet sich allerdings in dem Score von 1 mit 396 (32%) Fällen. 303 (24%) Tumore lassen sich dem Score 2 zuordnen und 195 (16%) dem Score 3. Eine sehr starke Positivität (Score 4) findet sich noch bei 116 (9%) Fällen (Abb. 20). Bei einer Dichotomisierung der Kohorte bei einem Cut off von ≥ 1 , zeigt sich, dass ein Großteil der Kohorte als immunopositiv für CD68 zu werten ist (1010/1257; 80,4%).

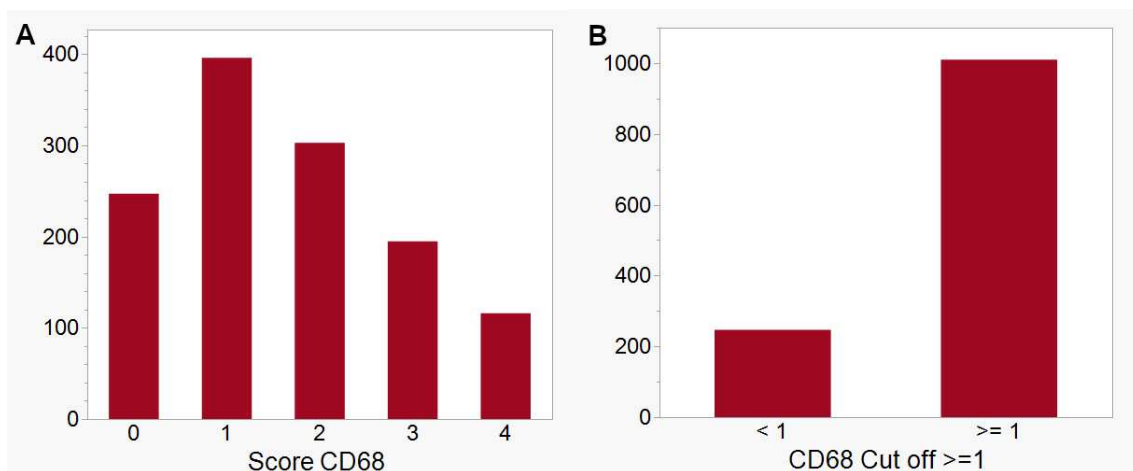


Abbildung 20: Balkendiagramm CD68 (A) Verteilung nach dem gewählten Score CD68, (B) Verteilung von CD68 bei einem gewählten Cut off von ≥ 1

Verteilung von CD68 zu den klinischen Daten

In der Geschlechterverteilung zeigt sich kein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,8419) bezüglich der Expression von CD68. Ebenfalls sieht man auch keine Unterschiede bei der Gruppe die eine Radiotherapie erhalten hat im Vergleich zu denen ohne Radiotherapie (p-Wert = 0,2436). Rezidivtumore hingegen scheinen eher eine leicht geringere Expression aufzuweisen, als Primärtumore, jedoch auch mit keiner Signifikanz (p-Wert = 0,2776). Tumore hingegen, bei denen eine Assoziation mit NF2 vorliegt, präsentieren signifikant weniger CD68 positive Zellen (p-Wert = 0,0003). Bei der Auswertung der Hannover Klassifikation

konnte, wie auch schon bei CD163, eine stufenweise ansteigende Expression bei zunehmender Tumorausdehnung aufgezeigt werden (p -Wert $< 0,0001$). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch bei der weiteren Dichotomisierung in kleine (T1 und T2) und größere Tumore (T3 und T4) wider (p -Wert $< 0,0001$) (siehe Tab. 12).

Tabelle 12: Verteilung der CD68-Expression auf den gewählten Score 0 - 4 in Bezug auf die klinischen Daten

Verteilung der Expression von CD68 nach klinischen Daten

N 1257

Score	0 N (%)	1 N (%)	2 N (%)	3 N (%)	4 N (%)	p-Wert
Geschlecht						0,8419
weiblich	120 (18,5)	211 (32,5)	158 (24,4)	101 (15,6)	59 (9,1)	
männlich	127 (20,9)	185 (30,4)	145 (23,9)	94 (15,5)	57 (9,4)	
Präoperativ RT						0,2436
keine RT	243 (20,0)	383 (31,5)	294 (24,2)	187 (15,4)	109 (9,0)	
RT	4 (9,8)	13 (31,7)	9 (21,9)	8 (19,5)	7 (17,1)	
Rezidiv						0,2776
Primärtumor	232 (19,5)	370 (31,0)	294 (24,7)	186 (15,6)	110 (9,2)	
Rezidiv	15 (23,1)	26 (40,0)	9 (13,9)	9 (13,9)	6 (9,2)	
NF2						0,0003*
kein NF2	208 (18,5)	348 (30,9)	273 (24,3)	184 (16,3)	113(10,0)	
NF2	39 (29,8)	48 (36,6)	30 (22,9)	11 (8,4)	3 (2,3)	
Hannover Klassifikation (komplett)						<,0001*
T1	26 (49,1)	20 (37,7)	6 (11,3)	1 (1,9)	0 (0,0)	
T2	69 (26,6)	97 (37,5)	49 (18,9)	34 (13,1)	10 (3,9)	
T3	78 (16,3)	157 (32,9)	134 (28,0)	70 (14,6)	39 (8,2)	
T4	73 (29,7)	122 (30,8)	113 (37,4)	90 (46,2)	67 (57,8)	
Hannover Klassifikation (dichotomisiert)						<,0001*
T1/2	95 (30,5)	117 (37,5)	55 (17,6)	35 (11,2)	10 (3,2)	
T3/4	151 (16,0)	279 (29,6)	247 (26,2)	160 (17,0)	106(11,2)	

Um eine genauere Darstellung der Verteilung von CD68 zu den klinischen Daten zu erhalten ist nach jedem Score ein Cut off gesetzt worden. Somit erhält man in den folgenden Abbildungen eine genaue Verteilung bei den jeweilig gewählten Cut offs (≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3). Die dunkelblau gefärbten Flächen präsentieren jeweils die Schnittmenge oberhalb des gewählten Cut offs, die hellblaue Fläche jeweils den der Tumore unterhalb des Cut offs. Bei einem gewählten Cut off von < 4 waren nur noch sehr wenige Tumore über dem Cut off gelegen, so dass dieser aus der Wertung rausgenommen wurde.

In allen gewählten Cut offs konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung des Geschlechts nachgewiesen werden (siehe Abb. 21). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 13.

Geschlecht

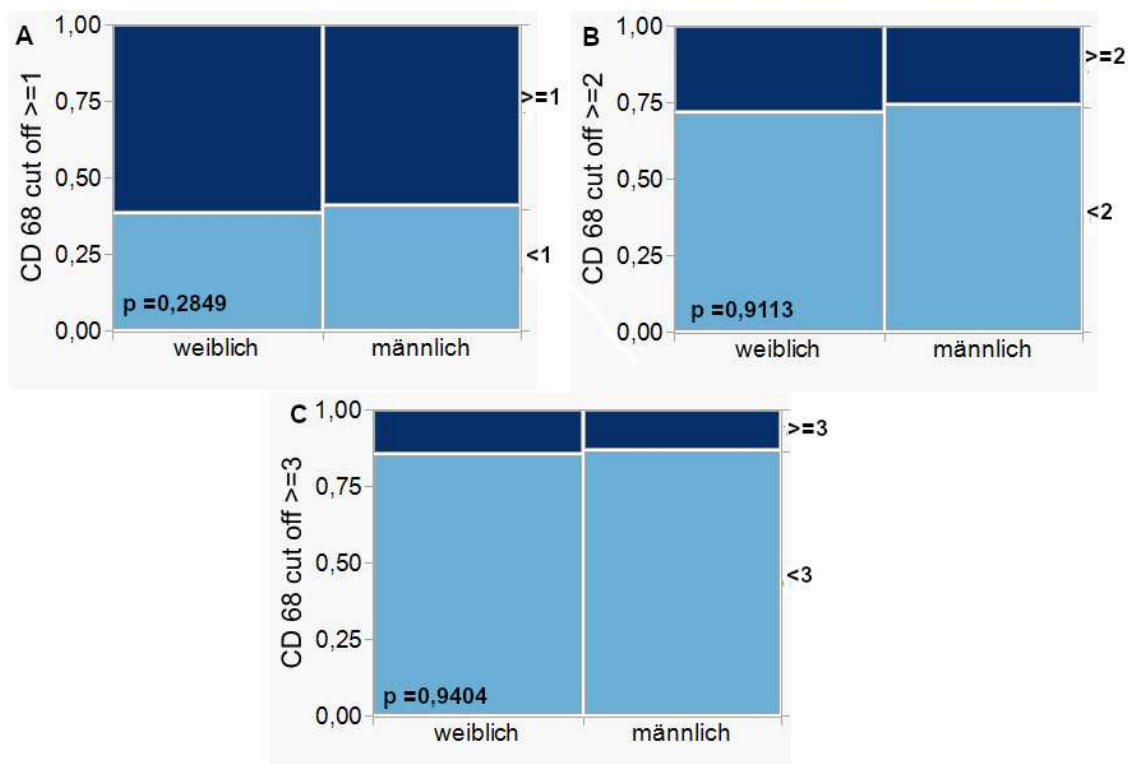


Abbildung 21: Unterschiede in der Expression von CD68 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf das Geschlecht

Ein statistisch signifikantes Ergebnis (p -Wert $< 0,0021$) zeigt sich bei den NF2 assoziierten Tumore bei einem Cut off von ≥ 1 . Diese weisen eine geringere CD68 Positivität auf als die Gruppe der sporadischen Schwannome. Dieser Trend setzt sich auch in den weiteren gewählten Cut offs mit signifikanten Ergebnissen fort (siehe Abb. 22). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 13.

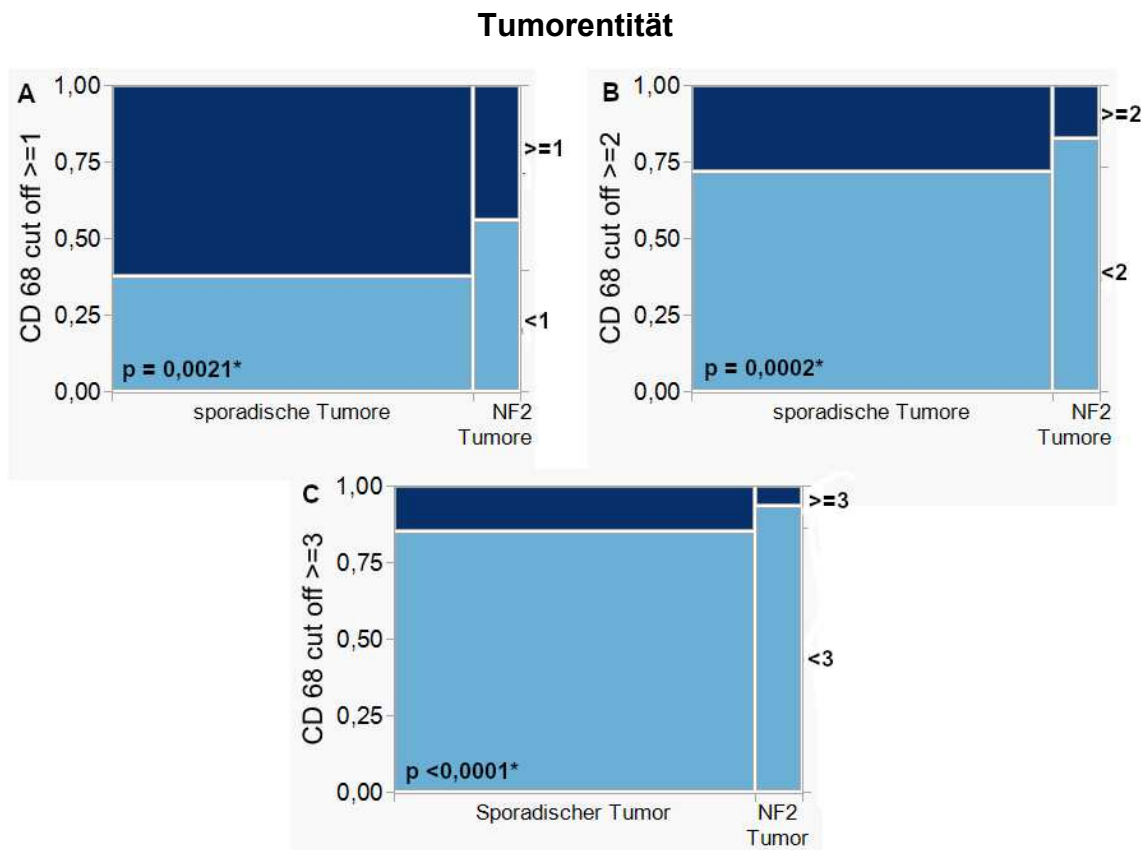


Abbildung 22: Unterschiede in der Expression von CD68 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf das Verhältnis der NF2 Tumor zu den sporadischen Tumoren.

Klare signifikante Ergebnisse ergeben sich bei der Hannover Klassifikation. Hier kann bei allen angewandten Cut offs mit einem signifikanten Resultat ($p < 0,0001$) aufgezeigt werden, dass die Expression von CD68 zunehmend ist bei einer höheren Hannover Klassifikation (Abb.23). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 13.

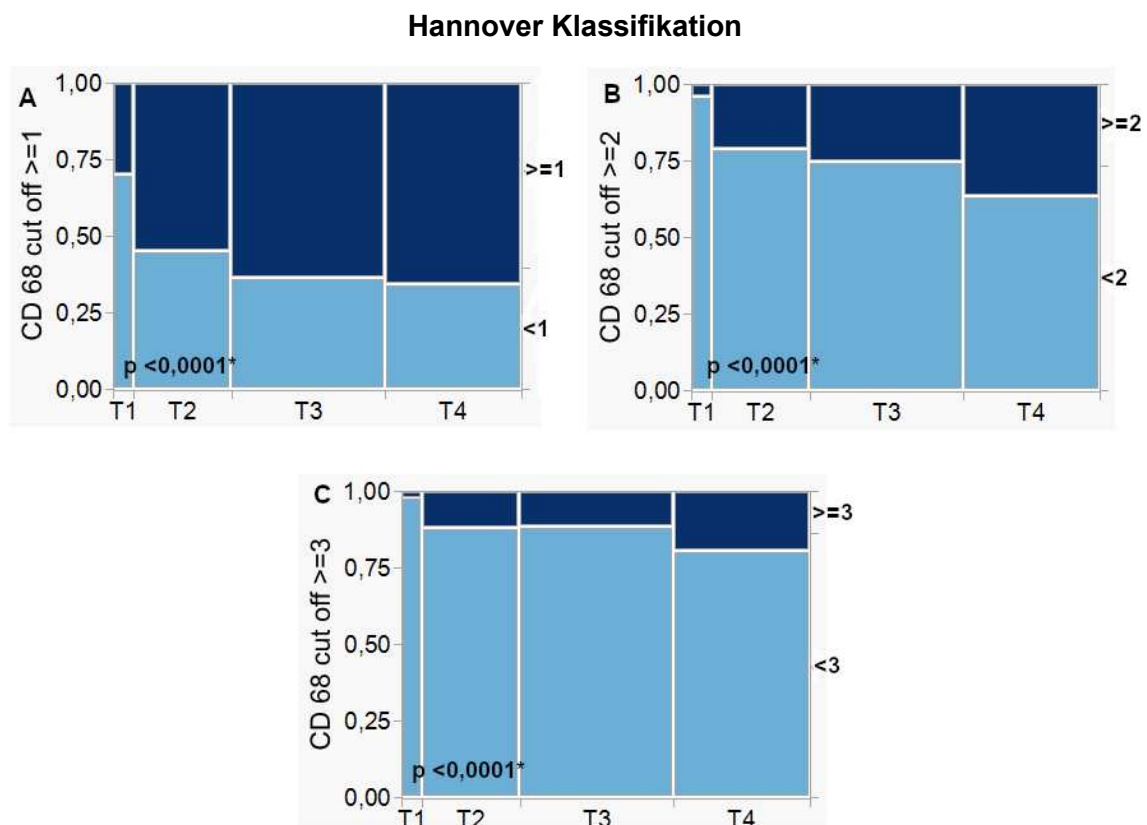


Abbildung 23: Unterschiede in der Expression von CD68 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf die Hannover Klassifikation

Das gleiche signifikante Resultat ist auch bei der Dichotomisierung der Hannover Klassifikation zu erkennen. Bei allen gewählten Cut offs ist eine deutlich stärkere Expression von CD68 in größeren Tumoren im Vergleich zu Tumoren mit geringerer räumlicher Ausdehnung (jeweils $p < 0,0001$, siehe Abb. 24). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 13.

Dichotomisierte Hannover Klassifikation

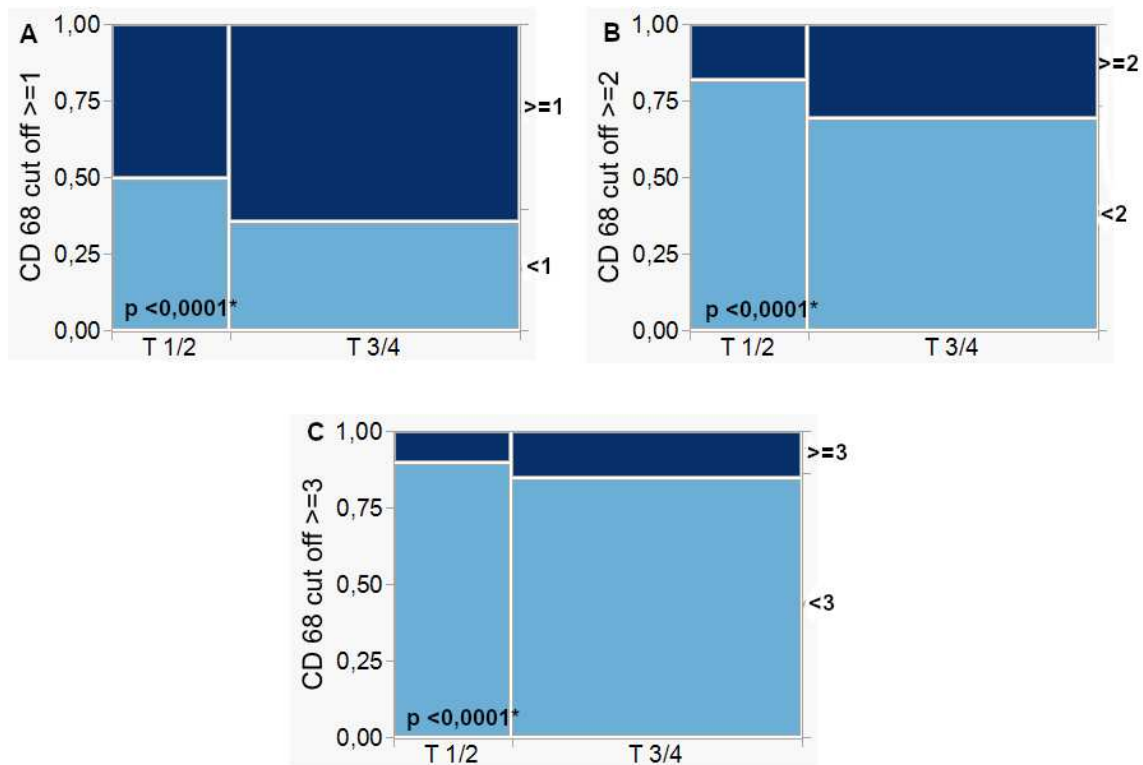


Abbildung 24: Unterschiede in der Expression von CD68 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf die dichotomisierte Hannover Klassifikation

In dem Vergleich der Rezidivtumore zu den primär erfassten Tumoren kann bei einem Cut off von ≥ 1 und ≥ 3 kein signifikanter Unterschied bezüglich der CD68-Expression aufgezeigt werden. Bei einem Cut off von ≥ 2 zeigt sich ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,0483$). Hier findet man bei den Rezidivtumoren eine geringere Expression von CD68 im Vergleich zu der Kohorte der Primärtumoren (siehe Abb. 25). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 13.

Primärtumore vs Rezidivtumore

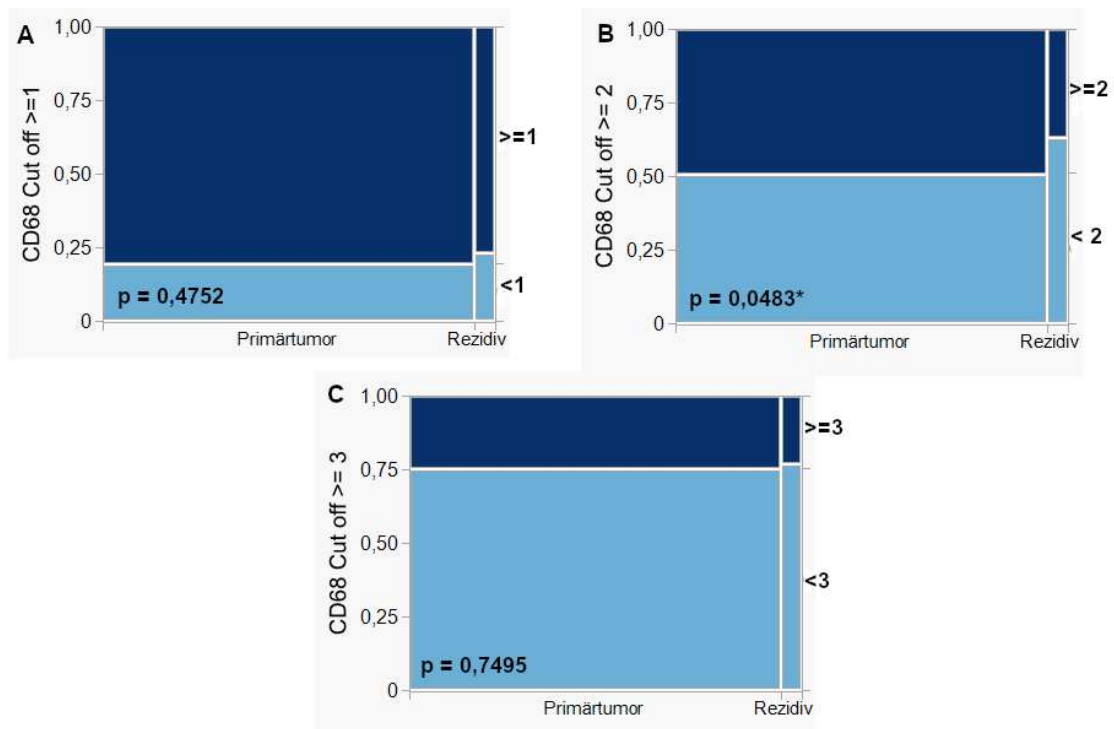


Abbildung 25: Unterschiede in der Expression von CD68 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf das Verhältnis der Rezidivtumore im Vergleich zu den Primärtumoren

Bei allen gewählten Cut offs kann kein signifikanter Unterschied der Expression von CD68 zwischen den Kohorten, die eine präoperative Radiotherapie erhalten haben, zu der die keine präoperative Radiotherapie erhalten haben aufgezeigt werden (siehe Abb 26). Für die tatsächlichen Zahlen, siehe Tabelle 13.

Präoperative Radiotherapie

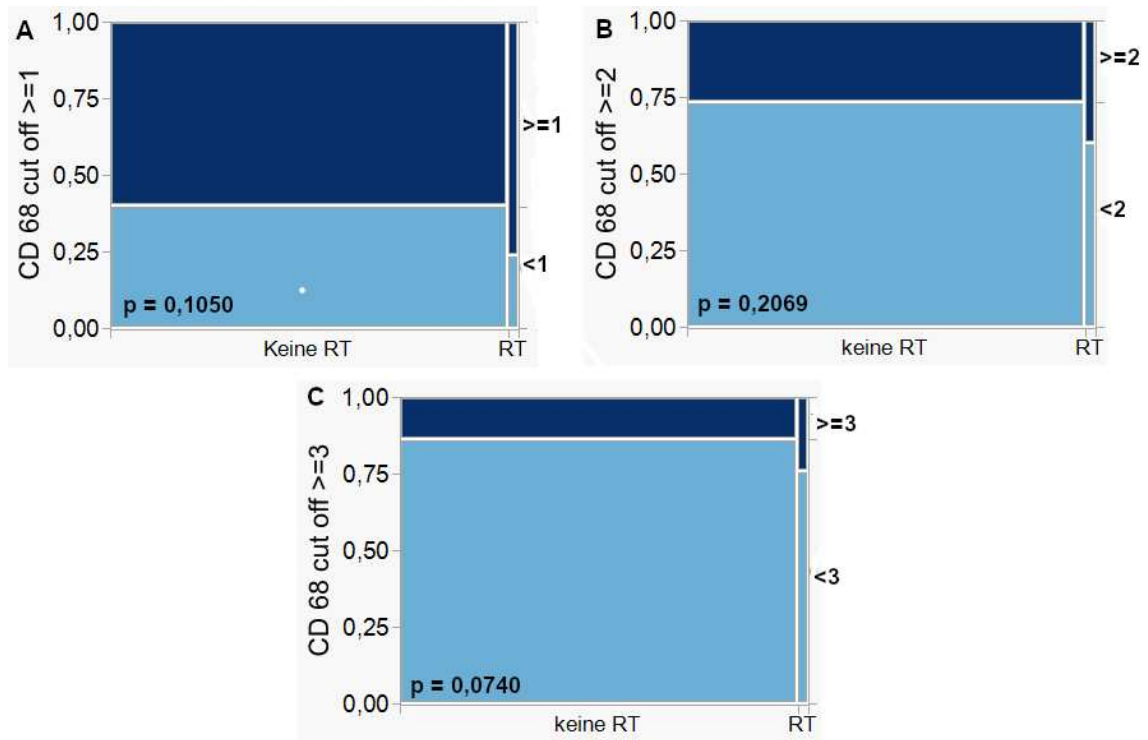


Abbildung 26: Unterschiede in der Expression von CD68 bei einem Cut off von ≥ 1 (A), ≥ 2 (B) und ≥ 3 (C) in Bezug auf eine präoperative Radiotherapie

Tabelle 13: Expression von CD68 bei den gewählten Cut offs (≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3) im Bezug auf die klinischen Daten**Verteilung der gewählten CD68 Cut offs im Vergleich der klinischen Daten**

	Cut off ≥ 1		Cut off ≥ 2		Cut off ≥ 3	
	< 1 N (%)	≥ 1 N (%)	< 2 N (%)	≥ 2 N (%)	< 3 N (%)	≥ 3 N (%)
Geschlecht						
p-Wert	0,2849		0,9113		0,9404	
Weiblich	120 (9,6)	529 (42,1)	331 (26,3)	318 (25,3)	489 (38,9)	160 (12,7)
Männlich	127 (10,1)	481 (28,3)	312 (24,8)	296 (23,5)	457 (36,4)	151 (12,0)
Tumorentität						
p-Wert	0,0021*		0,0002*		<,0001*	
Sporadische Tumore	208 (16,6)	918 (73,0)	556 (44,2)	570 (45,4)	829 (66,0)	297 (23,6)
NF2 Tumore	39 (3,1)	92 (7,3)	87 (6,9)	44 (3,5)	117 (9,3)	14 (1,1)
Rezidive						
p-Wert	0,4752		0,0483*		0,7495	
Primär Tumor	232 (18,5)	960 (76,4)	602 (47,9)	590 (46,9)	896 (71,3)	296 (23,6)
Rezidiv	15 (1,2)	50 (4,0)	41 (3,3)	24 (1,9)	50 (4,0)	15 (1,2)
Präoperative Radiotherapie						
p-Wert	0,1050		0,2069		0,0740	
Keine RT	243 (19,3)	973 (77,4)	626 (49,8)	590 (46,9)	920 (73,2)	296 (23,6)
RT	4 (0,3)	37 (2,9)	17 (1,4)	24 (1,9)	26 (2,1)	15 (1,2)
Hannover Klassifikation						
p-Wert	<,0001*		<,0001*		<,0001*	
T1	26 (2,1)	27 (2,2)	46 (3,7)	7 (0,6)	52 (4,1)	1 (0,1)
T2	69 (5,5)	190 (15,1)	166 (13,2)	93 (7,4)	215 (17,1)	44 (3,5)
T3	78 (6,2)	400 (31,9)	235 (18,7)	243 (19,4)	369 (29,4)	109 (8,7)
T4	73 (5,8)	392 (31,2)	195 (15,5)	270 (21,5)	308 (24,5)	157 (12,5)

Wie auch schon bei CD163 zeigen sich auch bei CD68 signifikante Resultate im Bezug auch die Altersverteilung (p -Wert = 0,0004). Auch hier ist bei zunehmendem Alter eine erhöhte Ausprägung von CD68 positiven Zellen zu verzeichnen. Liegt der Mittelwert des Alters bei einem Score von 1 noch bei 43,9 Jahren, ist er bei einem Score von 4 bei 50,1 Jahren (siehe Abbildung 27)

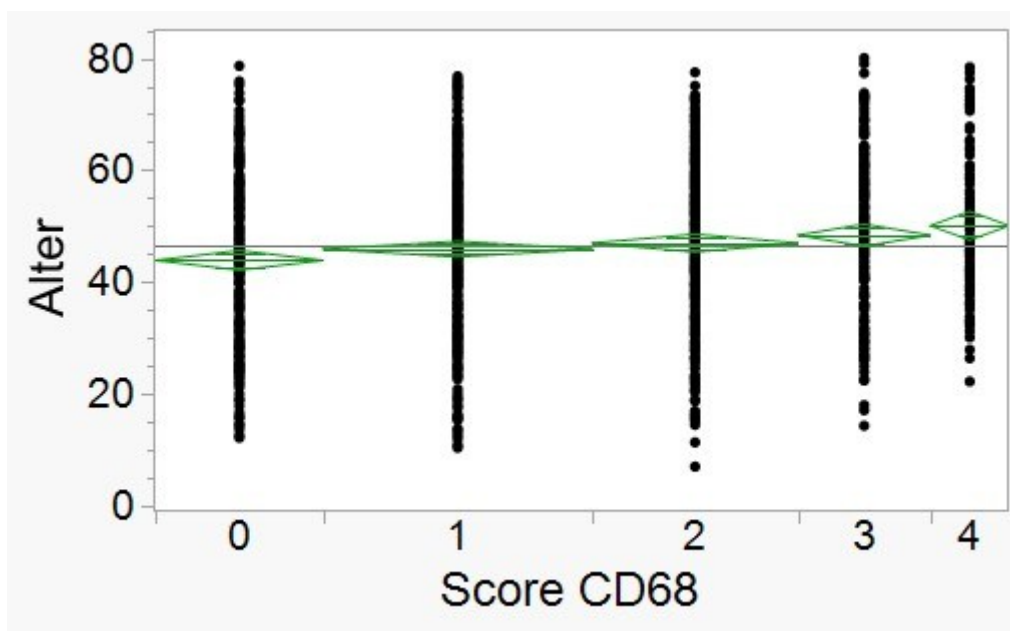


Abbildung 27: Altersverteilung im Bezug auf den CD68 Score

Bei allen angewendeten Cut offs (Cut off \geq 20, 30, 40, 50, 60 Jahren und dem Median (47 J.)) zeigen sich klare Tendenzen. Bei den Cut offs von \geq 20; 30; 40 kann sogar ein signifikantes Ergebnis aufgezeigt werden (siehe Tab 12). Hier zeigt sich jeweils immer eine signifikant erhöhte Expression des Antikörpers in den Gruppen die oberhalb des Cut offs liegen. So haben wir in der Altersgruppe \geq 20 ein signifikantes Ergebnis von p -Wert = 0,0500. Deutlicher werden die Resultate bei einem Cut off von \geq 30 ($<0,0001$) und dem einem gewählten Cut off \geq 40 (p -Wert = 0,032) (siehe Tab. 14).

Tabelle 14: CD68 Score im Verhältnis zu den Alters Cut offs

Verteilung der CD68 Expression anhand des Alters

Score CD68	N (%)	0 N(%)	1 N(%)	2 N(%)	3 N(%)	4 N(%)	p-Wert
Alters Cut off in Jahren							
< 47	616 (49,0)	137 (22,2)	197 (32,0)	140 (22,7)	89 (14,4)	53 (8,6)	0,1612
>= 47 (Median)	641 (51,0)	110(17,2)	199 (31,1)	163 (25,4)	106 (16,5)	63 ()	
< 20	46 (3,7)	13 (29,0)	17 (37,0)	13 (28,3)	3 (6,5)	0 (0,0)	0,0500*
>= 20	1211 (96,3)	234 (19,3)	379 (31,3)	290 (24,0)	192 (16,0)	116 (9,6)	
< 30	176 (14,0)	54 (30,7)	59 (22,2)	39 (22,2)	21 (11,9)	3 (1,7)	<,0001*
>= 30	1081 (86,0)	193 (17,9)	337 (24,4)	264 (24,4)	174 (16,1)	113 (10,4)	
< 40	392 (31,2)	98 (25,0)	132 (33,7)	82 (20,9)	50 (12,8)	30 (7,7)	0,0032*
>= 40	865 (68,8)	149 (17,2)	264 (30,5)	221 (25,6)	145 (16,8)	86 (9,9)	
< 50	726 (57,8)	159 (21,9)	232 (32,0)	171 (23,6)	101 (13,9)	63 (8,7)	0,0857
>= 50	531 (42,2)	88 (16,6)	164 (30,9)	132 (24,9)	94 (17,7)	53 (10,0)	
< 60	1032 (82,1)	210 (20,4)	330 (32,0)	249 (24,1)	157 (15,2)	86 (8,3)	0,1265
>= 60	225 (17,9)	37 (16,4)	66 (29,3)	54 (24,0)	38 (17,0)	30 (13,3)	

Verteilung von CD 68 zu MIB1

Ähnlich der Expression von CD163, ist auch bei einer zunehmend höheren CD68 Expression eine Zunahme der MIB1 Expression zu erkennen (p-Wert = 0,0188). Bei einem Score von 0 (n=240) lässt sich ein MIB1-Mittelwert von 1,23% ermitteln. Im Vergleich ist der Mittelwert von 1,36% bei dem Score von 3 (n=190) zu nennen. Erneut kommt es bei dem Score von 4 (n=114) wieder zu einer geringeren Expression von MIB1 (1,31%), wie auch schon bei CD163 (Abb. 28).

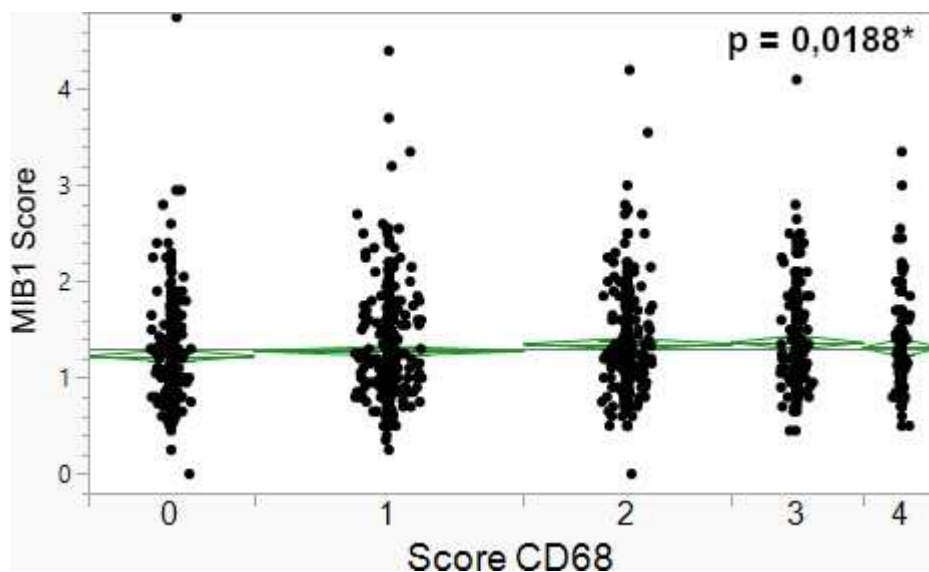


Abbildung 28: Verteilung des MIB1 Score im Verhältnis zu dem CD68 Score

Verdeutlicht wird dieses Resultat unter der Anwendung des Cut off ≥ 1 (p-Wert = 0,0117). Bei einem CD68 Score von <1 (n = 240) zeigt sich ein MIB1 Mittelwert von 1,23%. Bei einer stärkeren Expression (≥ 1 /n=994) hingegen konnte ein Mittelwert von 1,32% kalkuliert werden. Ähnliches findet man bei einem Cut off von ≥ 2 . Hierbei sind die zwei zu vergleichenden Gruppen ungefähr ähnlich groß (<2 /n=630; ≥ 2 /n=604). Die Kohorte, welche unterhalb des Cut offs liegt, weist einen MIB1 Mittelwert von 1,26% auf, in der Kohorte welche oberhalb des Cut off liegt lässt sich ein Mittelwert von 1,35% ermitteln (p- Wert = 0,0019) (Abb. 29).

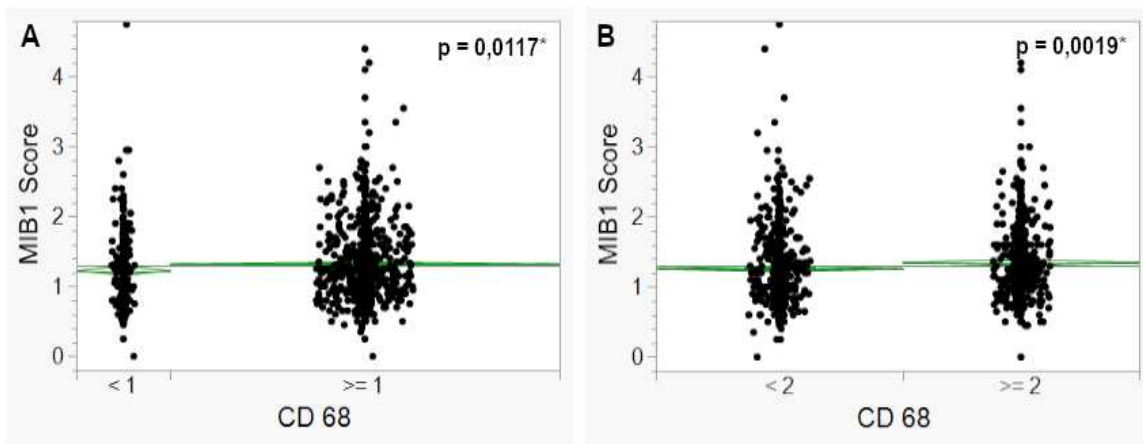


Abbildung 29: MIB1 im Vergleich zu CD68 Cut offs, (A) Cut off bei ≥ 1 , (B) Cut off bei ≥ 2

3.5 CD3

Von der Gesamtkohorte (n = 1272) konnten 1263 Fälle erfolgreich mit dem Antikörper gefärbt werden und ausgewertet werden (Abb. 40).

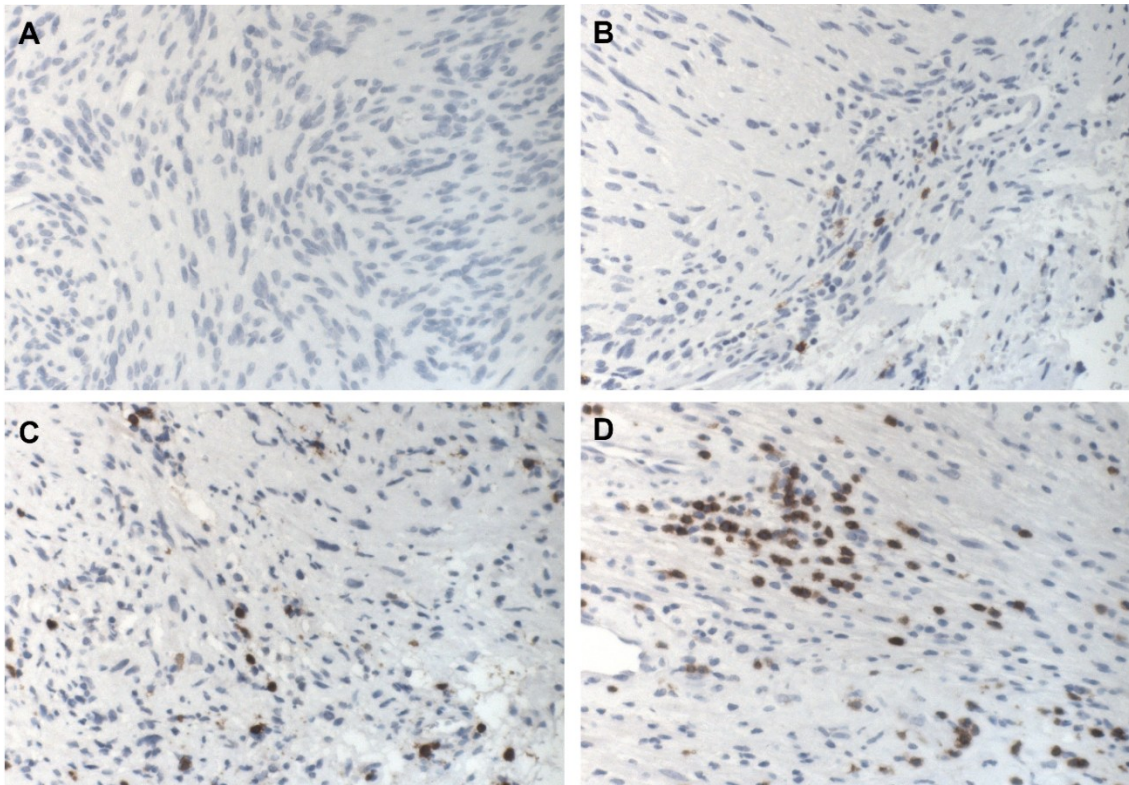


Abbildung 30: Expression von CD3; die Bilder A-D zeigen beispielhaft die unterschiedliche Expression von CD3 in den einzelnen Stanzproben. Die manuelle Auszählung immunopositiver Zellen ergab in diesen Beispielen keine (A), 8(B), 42(C) und 127(D) pro mm Stanzzyylinder.

3.5.1 CD3 Bewertung

Bei den ausgewerteten Proben von 1263 Fällen ist eine ermittelte Spanne von 0 (Minimum) und 604 (Maximum) gezählten CD3 positiven Lymphozyten pro 1 mm Gewebezyylinder in der Kohorte zu verzeichnen. Daraus ergibt sich ein Median von 22, und ein Mittelwert von 37,7 immunopositiver Zellen pro 1mm Gewebezyylinder innerhalb der Gesamtkohorte (Abb. 41).

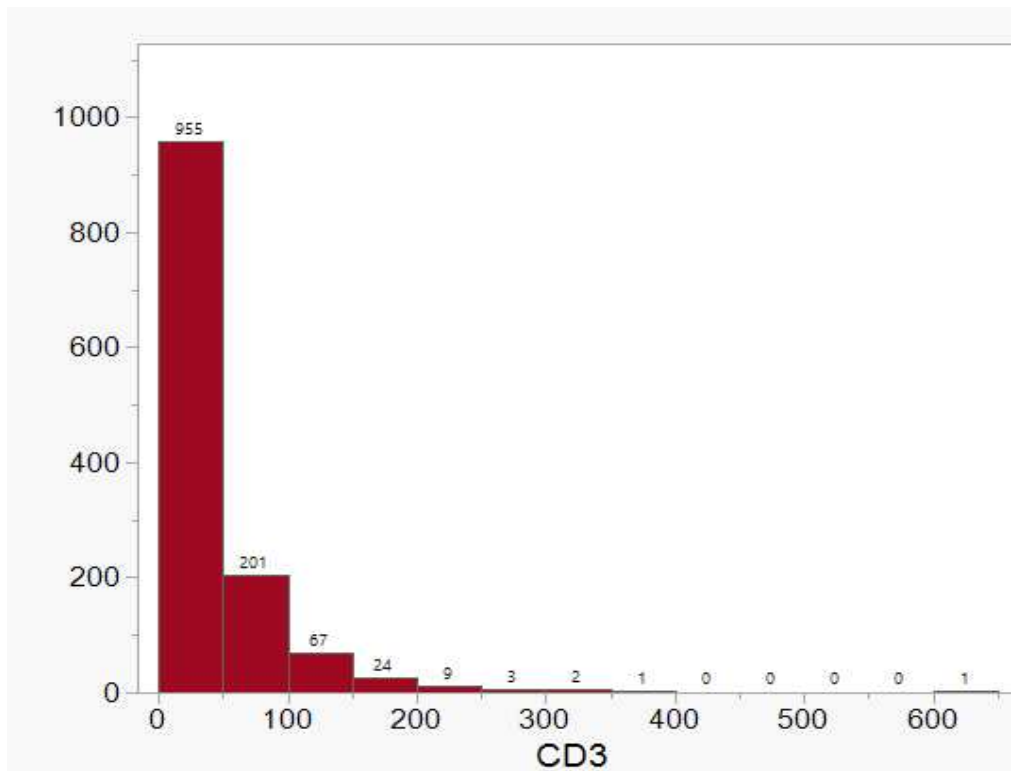


Abbildung 31: Verteilung der Häufigkeit von CD 3 Expressierenden Zellen pro 1 mm Gewebezylinder.

Korrelation von CD3 zu den klinischen Daten

Aus den erhobenen Zahlen konnte keine signifikanten Unterschiede (p -Wert = 0,6793) bei der Auswertung in der Geschlechterverteilung gefunden werden. Tumore von weiblichen Patientinnen ($n=650$) weisen im Durchschnitt 37,0 immunopositive Lymphozyten pro 1mm Tumorgewebe auf. Wohingegen Tumore von männlichen Patienten ($n=613$) einen Mittelwert von 38,0 aufweisen. Signifikante Resultate finden sich jedoch bei dem Vergleich von NF2 assoziierten Tumoren die eine deutlich geringere Expression von CD3 positiven Zellen aufweisen (Mittelwert = 26,2) als Tumore mit einer spontanen Genese (Mittelwert = 38,8; p -Wert = 0,0035). Bei Betrachtung der Hannover Klassifikation ist eine deutliche Zunahme der CD3 positiven Lymphozyten bei steigender Tumorausdehnung zu verzeichnen (p -Wert < 0,0001). Im direkten Vergleich sind die T1-klassifizierten Tumore (N 53) mit einem Mittelwert von 15,8 zu nennen. Dem gegenüber zu stellen mit einem Mittelwert von 48,7 bei T4-klassifizierten

Tumoren (N 469). Dies zeigt sich auch bei der dichotomisierten Hannover Klassifikation. Tumore mit einer Klassifikation von T1 oder T2 weisen eine geringere Infiltration von CD3 präsentierenden T-Lymphozyten auf als T3 oder T4 klassifizierte Tumore (Mittelwert von 22,6 vs. 42,4; p-Wert < 0,0001). Gleiche Mittelwerte für CD3 positive Zellen ergaben sich hingegen bei zuvor bestrahlten Tumoren im Vergleich zur restlichen Kohorte (37,0 Zellen/mm; p-Wert = 0,9561). Auch bei den Rezidiven ist kein statistischer Unterschied zu messen (p-Wert = 0,3923) (siehe folgende Tab. 17 und Abb. 42).

Tabelle 15: Verteilung von CD3 in Bezug auf die klinischen Daten

Verteilung von CD3

(N1263)

	N (%)	Mittelwert (immunopositive Zellen pro 1mm Tumorgewebe)	p-Wert
Geschlecht			0,6793
weiblich	650 (51,5)	36,9	
männlich	613 (48,5)	38,0	
Präoperative RT			0,9561
Keine RT	1222 (96,8)	37,5	
RT	41 (3,2)	37,1	
Rezidiv			0,3923
Primärtumor	1197 (94,8)	37,7	
Rezidiv	66 (5,2)	32,6	
NF2			0,0035*
Keine NF2	1130 (89,5)	38,8	
NF2	133 (10,5)	26,2	
Hannover Klassifikation (komplett)			<,0001*
T1	53 (4,2)	15,9	
T2	260 (20,6)	24,0	
T3	479 (37,9)	36,3	
T4	469 (37,1)	48,7	
Hannover Klassifikation (dichotimisiert)			<,0001*
T1/2	313 (24,8)	22,6	
T3/4	948 (75,1)	42,4	

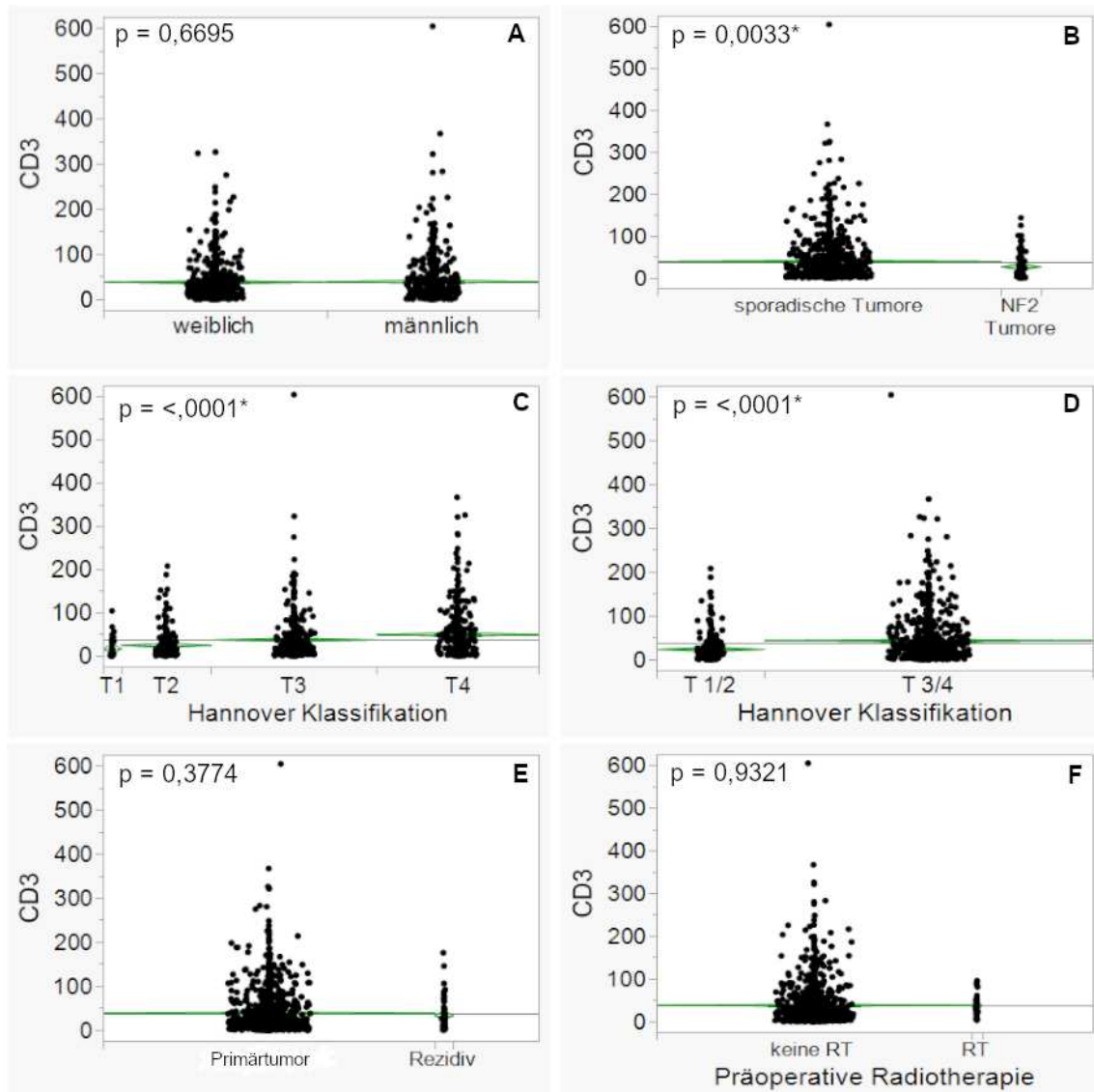


Abbildung 32: CD3 Immunopositivität in Bezug auf die klinischen Daten, in Abhängigkeit von Geschlecht (A), NF2 (B), der Hannover Klassifikation (C und D), Tumorstatus (Primär vs. Rezidiv) (E) und der präoperativen Radiotherapie (F).

Betrachtet man den gewählten Cut off ≥ 37 welcher dem Mittelwert von CD3 positiven Zellen der Gesamtkohorte entspricht, findet sich kein Expressionsunterschied bezüglich des Geschlechts (p-Wert = 0,6198), einer präoperativen Radiotherapie (p-Wert = 0,4253) und bei der Betrachtung von Tumorgewebe von Rezidiven im Vergleich zu Primärtumoren (p-Wert = 0,6012). Bei der Kohorte von NF2 Tumoren findet man eine geringere Expression von CD3 tragenden Lymphozyten als bei sporadischen Tumoren, allerdings mit

keiner statistischen Signifikanz (p-Wert = 0,0173). Ein signifikanter stufenweiser Anstieg der Expression ist bei einer zunehmenden Tumorausdehnung nach Hannover Klassifikation zu verzeichnen (p-Wert <0,0001). Auch die dichotomisierte Aufteilung von hoch und niedrig gradig klassifizierten Tumoren zeigt dieses Ergebnis (p-Wert <0,0001). Für alle weiteren Cut offs (Median, ≥ 10 , ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 60) sind die Ergebnisse jeweils in folgender Tabelle zu finden (Tabelle 18). Auf den ersten Blick ist hierbei auffällig das sich bei den Auswertungen des Geschlechts sowie des Rezidivs keine signifikanten Ergebnisse zeigen. Bei der Hannover Klassifikation hingegen konnte in jedem gewählten Cut off ein signifikantes Ergebnis aufgezeigt werden. So zeigt sich in den Kohorten die oberhalb des Cut offs liegen auch eine deutlich ausgeprägtere Expression von CD3 positiven Zellen. Vereinzelt finden sich auch signifikante Ergebnisse bei der präoperativen Radiotherapie (Median/ p-Wert = 0,0010; ≥ 10 / p-Wert = 0,0019; ≥ 20 / p-Wert = 0,0004). Hier zeigt sich jeweils in den Kohorte die präoperativ eine Radiotherapie erhalten haben auf eine deutlich gesteigerte Expression von CD3. Auch bei den NF2 Tumoren konnte ab einem Cut off von ≥ 30 (p-Wert = 0,0397) bis einschließlich einem Cut off von ≥ 60 (p-Wert = 0,0231) ein signifikantes Resultat aufgezeigt werden. Hierbei zeigt sich allerdings bei der Kohorte der NF2 Tumore eine geringe Expression von CD3 (siehe Tab. 18).

Tabelle 16: Dichotomisierung der Kohorte in unterschiedliche Cut offs für die CD3-Immunopositivität in Bezug auf die klinischen Daten (Kontingenzanalyse).

CD3 Cut offs	Geschlecht N (%)		Radiotherapie N (%)		N (%)		N (%)		Hannover Klassifikation N (%)	
	weiblich	männlich	Keine RT	RT	Primär Tumor	Rezidiv	Sporadische Tumore	NF2 Tumore	T1 / T2	T3 / T4
< Mittelwert >= Mittelwert (Mittelwert = 37)	438 (67,7)	405 (65,7)	818 (66,9)	404 (33,1)	797 (66,6)	46 (69,7)	742 (65,7)	101 (76,0)	258 (82,4)	583 (61,5)
	212 (32,3)	208 (34,3)	25 (61,0)	16 (39,0)	400 (33,4)	20 (30,3)	388 (34,3)	32 (24,1)	55 (17,6)	365 (38,5)
	p = 0,6198		p = 0,4253		P = 0,6012		P = 0,0173*		P = <,0001*	
< Median >= Median (Median = 22)	311 (47,8)	317 (51,7)	618 (50,6)	10 (24,4)	596 (49,8)	32 (48,5)	553 (48,9)	75 (56,4)	208 (66,5)	418 (44,1)
	339 (52,2)	296 (48,3)	604 (49,4)	31 (75,6)	601 (50,2)	34 (51,5)	577 (51,1)	58 (43,6)	105 (33,6)	530 (55,9)
	p = 0,1696		p = 0,0010*		P = 0,8363		P = 0,1039		P = <,0001*	
<10 >= 10	181 (27,6)	185 (30,2)	363 (29,7)	3 (7,3)	346 (28,9)	20 (30,3)	325 (28,8)	41 (30,8)	136 (43,5)	229 (24,2)
	469 (72,2)	428 (69,8)	859 (70,3)	38 (92,7)	851 (71,1)	46 (69,7)	805 (71,2)	92 (69,2)	177 (56,6)	719 (75,8)
	P = 0,3610		P = 0,0019*		P = 0,8075		P = 0,6193		P = <, 0001*	
< 20 >= 20	293 (45,1)	297 (48,5)	582 (47,6)	8 (19,5)	560 (46,8)	30 (45,5)	520 (46,0)	70 (52,6)	201 (64,2)	387 (40,8)
	357 (54,9)	316 (51,6)	640 (52,4)	33 (80,5)	637 (53,2)	36 (54,6)	610 (54,0)	63 (47,4)	112 (35,8)	561 (59,2)
	P = 0,2298		P = 0,0004*		P = 0,8331		P = 0,1482		P = <,0001*	
< 30 >= 30	384 (59,1)	366 (59,7)	731 (59,8)	19 (46,3)	709 (59,2)	41 (62,1)	660 (58,4)	90 (67,7)	237 (75,7)	511 (53,9)
	266 (40,9)	247 (40,3)	491 (40,2)	22 (53,7)	488 (40,8)	25 (37,9)	470 (41,6)	43 (32,3)	76 (24,3)	437 (46,1)
	P = 0,8199		P = 0,0839		P = 0,6417		P = 0,0397*		P = <,0001*	

CD3 Cut offs	Geschlecht N (%)		Radiotherapie N (%)		N (%)		N (%)		Hannover Klassifikation N (%)	
	weiblich	männlich	Keine RT	RT	Primär Tumor	Rezidiv	Sporadische Tumore	NF2 Tumore	T1 / T2	T3 / T4
< 40 ≥ 40	457 (70,3) 193 (29,7)	415 (67,7) 198 (32,3)	844 (69,1) 378 (30,9)	28 (68,3) 13 (31,7)	823 (68,8) 374 (31,2)	49 (74,2) 17 (25,8)	766 (67,8) 364 (32,2)	106 (79,7) 27 (20,3)	261 (83,4) 52 (16,6)	609 (64,2) 339 (35,8)
	P = 0,3164		P = 0,9160		P = 0,3479		P = 0,0049*		P = <,0001*	
< 50 ≥ 50	495 (76,2) 155 (23,9)	460 (75,0) 153 (25,0)	923 (75,5) 299 (24,5)	32 (78,1) 9 (22,0)	904 (75,5) 293 (24,5)	51 (77,3) 15 (22,7)	840 (74,3) 290 (25,7)	115 (86,5) 18 (13,5)	277 (88,5) 36 (11,5)	676 (71,3) 272 (28,)
	P = 0,6452		P = 0,7120		P = 0,7471		P = 0,0021*		P = <,0001*	
< 60 ≥ 60	530 (81,5) 120 (18,5)	488 (79,6) 125 (20,4)	983 (80,4) 239 (19,6)	35 (85,4) 6 (14,6)	965 (80,6) 232 (19,4)	53 (80,3) 13 (19,7)	901 (79,7) 229 (20,3)	117 (88,0) 16 (12,0)	288 (92,0) 25 (8,0)	728 (76,8) 220 (23,2)
	P = 0,3860		P = 0,4329		P = 0,9497		P = 0,0231*		P = <,0001*	

Nutzt man bei der Altersanalyse den Cut off ≥ 47 (Median), ist keine signifikanter Unterschied in der Expression von CD3 festzustellen (p-Wert = 0,2654). Bei einer weiteren Analyse und Anwendung weiterer Cut offs des Alters (Cut off $\geq 20, 30, 40, 50, 60$) findet man sowohl bei einem Cut off von ≥ 30 (p-Wert = 0,0096) wie auch bei einem Cut off ≥ 60 (p-Wert = 0,0361) ein signifikantes Resultat. Nicht nur bei den signifikanten Ergebnissen sondern auch bei den restlichen Cut offs kann bei einem steigenden Alter auch eine Zunahme von CD3 positiven T-Lymphozyten im Tumorgewebe aufgezeigt werden.

Tabelle 17: Unterschiede in der CD3 Immunopositivität im Verhältnis zu unterschiedlichen Cut offs des Patientenalters bei Diagnose (ANOVA Varianzanalyse).

CD3	N (%)	Mittelwert der CD3 Expression	p-Wert
Alter Cut off in Jahren			
< 47	619 (49,0)	35,9	0,2654
≥ 47 (Median)	644 (51,0)	38,9	
< 20	46 (3,6)	24,9	0,0666
≥ 20	1217 (96,4)	37,9	
< 30	176 (13,9)	28,9	0,0096*
≥ 30	1087 (86,0)	38,9	
< 40	395 (31,3)	33,9	0,0759
≥ 40	868 (68,7)	39,1	
< 50	729 (57,7)	35,5	0,0789
≥ 50	534 (42,3)	40,2	
< 60	1037 (82,1)	36,2	0,0361*
≥ 60	226 (17,9)	43,4	

Verteilung von CD3 zu MIB1

Zur differenzierten Analyse der CD3 und MIB1 Immunopositivität wurden folgende Cut offs für CD3 angewandt: Cut off ≥ 22 (Median), ≥ 37 (Mittelwert); ≥ 10 , ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 ; ≥ 50 , ≥ 60 . Bei einem gewählten Cut off des Medians von ≥ 22 findet sich ein signifikantes Ergebnis (p-Wert = 0,0046). Fälle die unterhalb des Cut offs liegen (n=615) weisen eine geringere MIB1 Expression auf (1,26%) als Fälle die oberhalb liegen (N624/1,34%). Eine ähnliche Aufteilung ist auch bei dem Mittelwert von CD3 von 37 zu finden (1,28% vs. 1,35%/ p-Wert = 0,0236). Auch bei allen weiteren Cut offs ≥ 10 bis ≥ 60 , zeigen sich diese Tendenzen. Bei den Cut offs ≥ 20 (1,25% vs 1,34%; p-Wert = 0,0025), ≥ 30 (1,27% vs 1,33%; p-Wert = 0,0328), ≥ 50 (1,28% vs 1,36%; p-Wert = 0,0251) und dem Cut off ≥ 60 (1,28% vs 1,39%; p-Wert = 0,0030) lassen sich jeweils signifikant höhere MIB1-Werte ermitteln für die Gruppe mit der höheren CD3 Expression (siehe Abb. 43). Auch in den Cut offs ≥ 10 und ≥ 40 zeichnet sich dieser Trend ab, allerdings mit keiner statistischen Signifikanz.

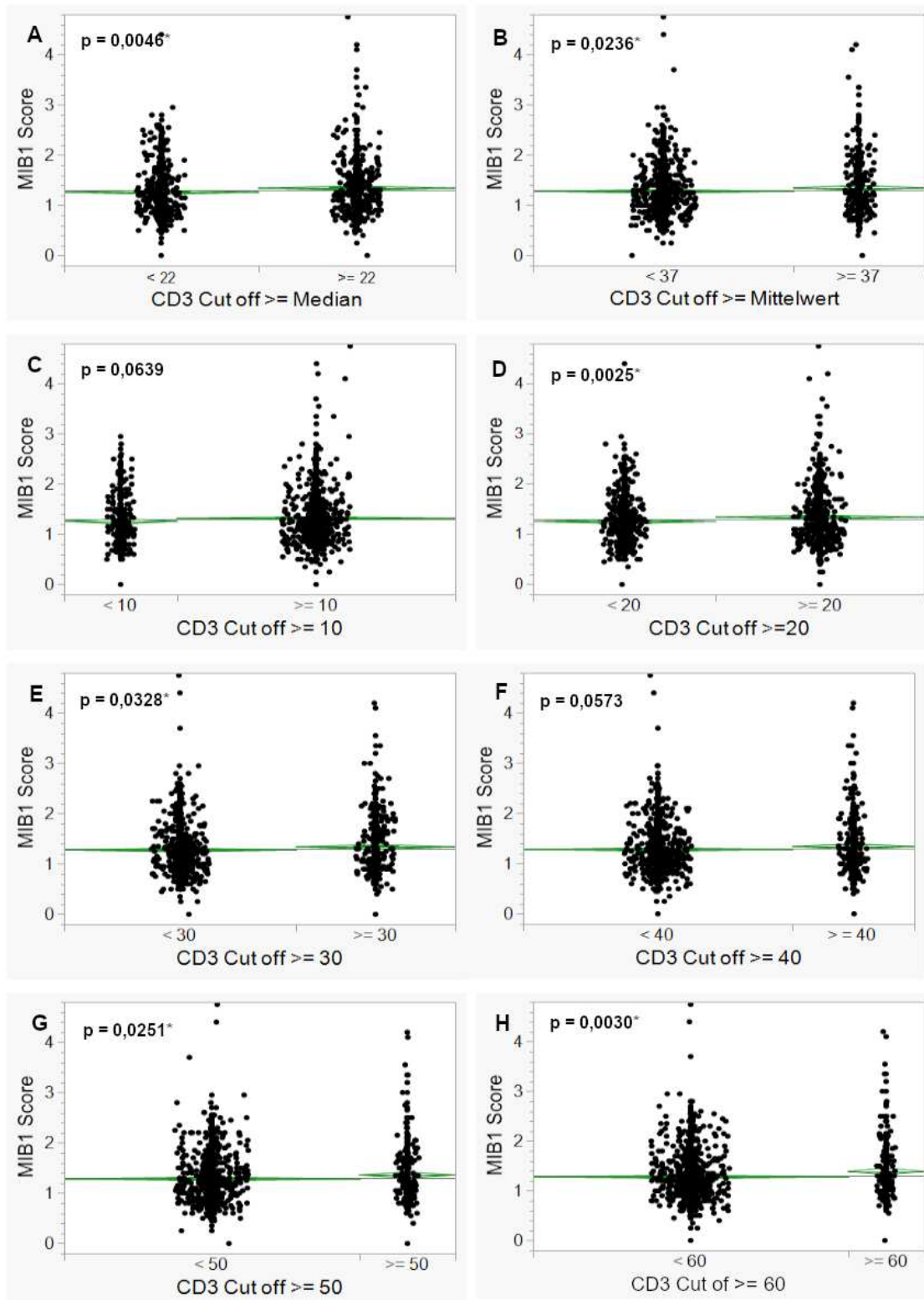


Abbildung 33: Darstellung der MIB1 Expression in Abhängigkeit unterschiedlicher CD3 Cut offs; CD3 Cut offs von ≥ 22 (Median) (A), Mittelwert von ≥ 37 (B), ≥ 10 (C), ≥ 20 (D), ≥ 30 (E), ≥ 40 (F), ≥ 50 (G), ≥ 60 (H)

3.6 CD8

Immunhistochemisch zeigt sich ein perinukleärer rot-brauner Saum um die T-Lymphozyten. Unterschiedliche Infiltrationsraten mit CD8 positiven Zellen sind in Abbildung 44 dargestellt.

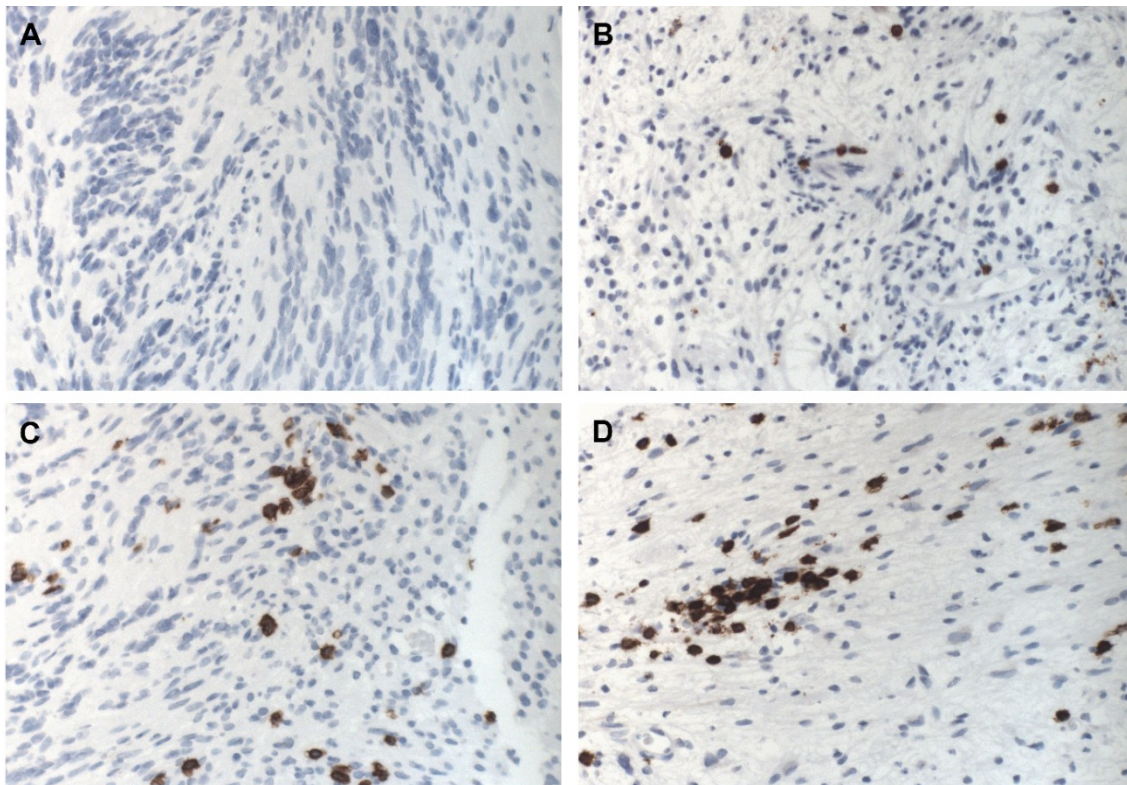


Abbildung 34: Expression von CD8. Die Bilder **A-D** zeigen die unterschiedliche Expressionraten von CD8 positiven Zellen innerhalb der einzelnen Stanzproben; negativ (**A**), 10 (**B**), 32 (**C**) und 205 immunopositive Zellen pro 1mm Gewebezyylinder (**D**).

3.6.1 CD8 Verteilung

Von der Gesamtkohorte (n=1272) konnten 1265 Fälle erfolgreich mit dem Antikörper angefärbt und somit ausgezählt werden. Insgesamt liegt die Spanne der Gesamtkohorte zwischen 0 (Minimum) und 533 (Maximum) positiven CD8 Zellen pro 1mm Tumorgewebe. Daraus ergibt sich ein Median von 26 und ein Mittelwert von 39,6. 99,21% aller Tumorproben haben eine Infiltration mit CD 8 tragenden Lymphozyten aufweisen können. Nur in 10 Tumoren konnte keine positive Zelle gefunden werden (Abb.45).

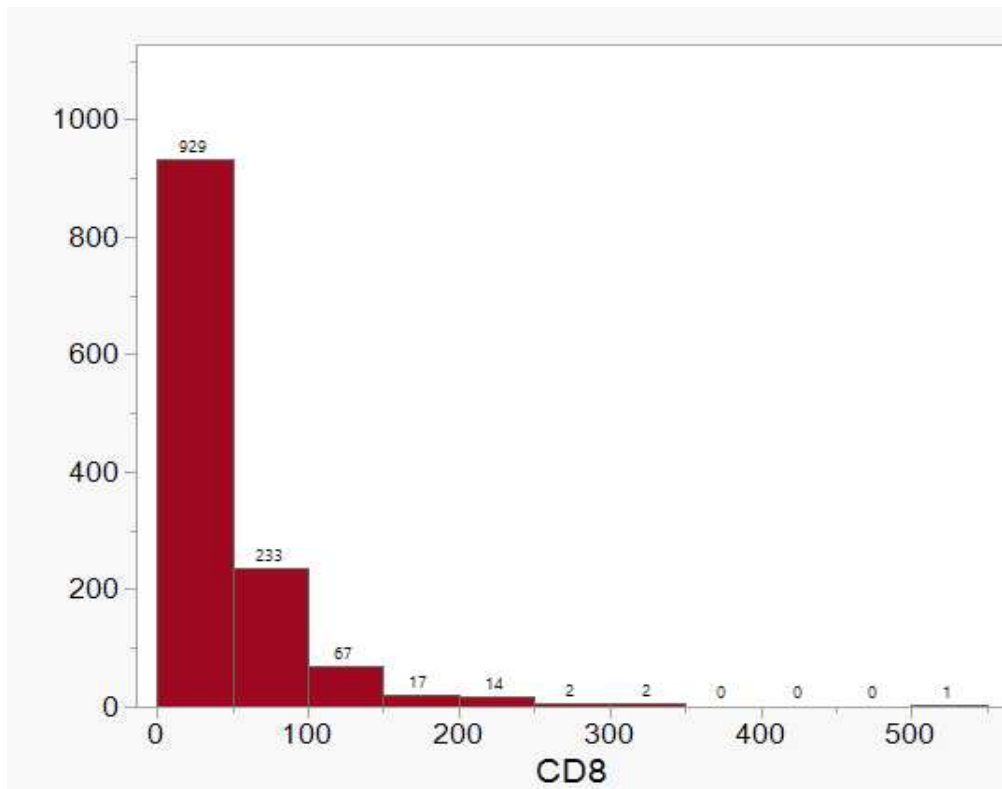


Abbildung 35: Verteilung der CD8 Immunopositivität (Anzahl positiver Zellen pro 1mm Tumorgewebe) unter den untersuchten Tumoren.

Verteilung von CD8 zu den klinischen Daten

In der Auswertung der klinischen Daten im Bezug auf die Immunopositivität von CD8 konnte kein signifikantes Ergebnis bei der Analyse des Geschlechts festgestellt werden (p-Wert = 0,1493). Bei weiblichen Patienten (n=650) zeigt sich ein Mittelwert von 37,9 ausgezählten T-Lymphozyten in der Stanzprobe. Männliche Patienten haben durchschnittlich 41,4 positive gefärbte T-Lymphozyten. Ähnliche Ergebnisse sind auch in der Betrachtung der Radiotherapie (p-Wert = 0,8182) und bei den Rezidiven (p-Wert = 0,2236) zu finden. Wobei Rezidive eine minimal geringere Expression (Mittelwert = 33,1) als Tumore einer Erstdiagnose (Mittelwert = 40,0) aufweisen. Ein klareres Resultat ergibt sich bei den NF2 Tumore (n=134) die mit einem Mittelwert von 29,0 eine deutlich geringere Expression des CD8 Antikörper aufweist als Proben sporadischer Tumore (n=1131/Mittelwert = 40,8/ p-Wert = 0,0034). Ein ebenfalls klar signifikantes Ergebnis ist bei der Hannover Klassifikation zu sehen (p-Wert

<0,0001), hier findet sich bei stetig zunehmender Tumorausdehnung eine höhere Zahl an nachweisbaren CD8 positiven Zellen. Ähnliche Ausmaße sind innerhalb der dichotomisierten Hannover Klassifikation zu finden. Hierbei haben Tumore die als T1 oder T2 Tumor einkategorisiert wurde einen Mittelwert von 28,4. Im Vergleich zu den Tumoren mit einer größeren Volumenausdehnung (T3/4) die mit einem Mittelwert von 43,4 gezählten CD8 positiven Zellen eine signifikant höhere Expression aufweisen (p-Wert <0,0001) (siehe Tabelle 20 und Abbildung 46).

Tabelle 18: Unterschiede in der CD8 Immunopositivität im Verhältnis zu unterschiedlichen Cut offs des Patientenalters bei Diagnose.

(N 1265)

	N (%)	Mittelwert (immunopositive Zellen pro 1mm Tumorgewebe)	p-Wert
Geschlecht			0,1493
weiblich	650 (51,4)	37,89	
männlich	615 (48,6)	41,40	
Präoperativ RT			0,8182
Keine RT	1224 (96,8)	39,69	
RT	41 (3,2)	38,08	
Rezidiv			0,2236
Primärtumore	1199 (94,8)	39,99	
Rezidiv	66 (5,2)	33,20	
NF2			0,0034*
Keine NF2	1131 (89,4)	40,89	
NF2	134 (10,6)	29,07	
Hannover Klassifikation (komplett)			<,0001*
T1	53 (6,8)	18,6	
T2	261 (25,3)	30,6	
T3	479 (34,9)	38,8	
T4	470 (43,9)	47,8	
Hannover Klassifikation (dichotomisiert)			<,0001*
T1/2	314 (24,8)	28,6	
T3/4	949 (75,2)	43,3	

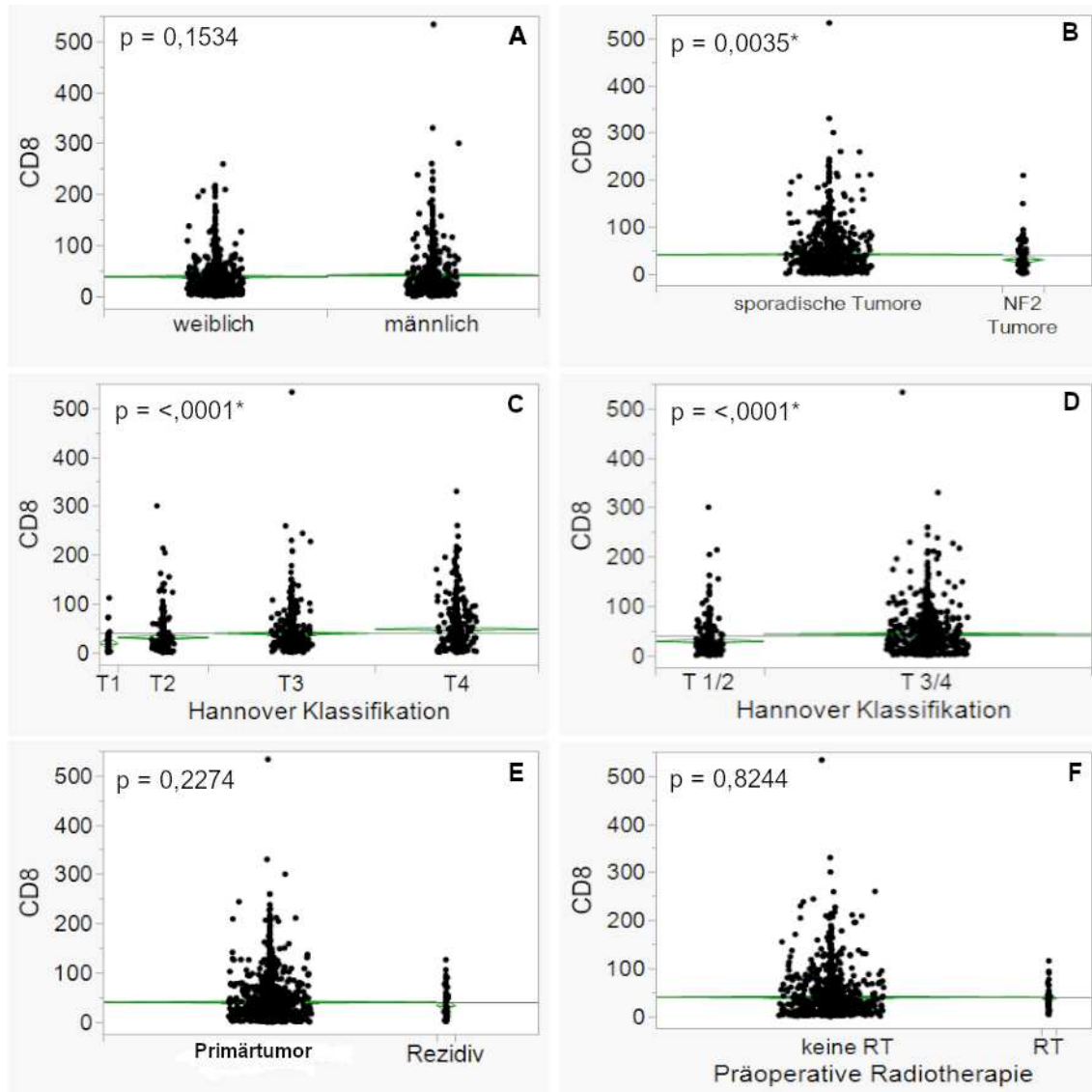


Abbildung 36: CD8 Immunopositivität in Abhängigkeit vom Geschlecht (A), NF2 (B), der Hannover Klassifikation (C und D), Tumorstatus (Primär vs. Rezidiv) (E) und der präoperativen Radiotherapie (F).

Wie auch schon bei CD3 wurde zu einer weiteren Beurteilung der Cut off bei dem Mittelwert von 39,6 gesetzt. Hier sind in der Verteilung der Geschlechter keine Unterschiede zu finden (p -Wert = 0,7410), ebenso zwischen den Vergleichsgruppen in Bezug auf die präoperative Radiotherapie (p -Wert = 0,9504) und den Rezidiven (p -Wert = 0,9671). Bei den NF2 assoziierten Fällen ist eine geringere Expression des Antikörpers zu finden als in der Vergleichsgruppe (p -Wert = 0,0477). Und ebenso ist eine schrittweise Zunahme

der CD8 positiven Zellen bei einer steigenden Hannover Klassifikation zu sehen (komplett und dichotomisiert bei T1/2 und T3/4, jeweils p-Wert < 0,0001). Ebenfalls sind noch weitere Cut offs wie auch schon bei CD3 bei dem Median von 26 und aufsteigend von ≥ 10 bis ≥ 60 erfolgt. Eindeutig signifikante Ergebnisse konnten hier bei der Hannover Klassifikation nachgewiesen werden (p-Wert < 0,0001), in allen gewählten Cut offs. Die Expression von CD8 positiven Zellen ist hier in den höher klassifizierten Tumoren deutlich ausgeprägter als in kleiner klassifizierten Tumoren. Vereinzelt können auch signifikante Ergebnisse bei den NF2 Tumoren im Vergleich zu den sporadisch entstandenen Tumoren aufgezeigt werden. Hier fallen vor allem signifikante Ergebnisse bei höher gewählten Cut offs auf (≥ 40 , (p-Wert = 0,0156); ≥ 50 , (p-Wert = 0,0006); ≥ 60 , (p-Wert = 0,0129)). Hierbei ist eine signifikant geringere Expression des Immunhistochemischen Markers in der Kohorte der NF2 Tumor aufzufinden. Auch können signifikante Ergebnisse im Vergleich der Kohorte der prätherapeutisch angewandten Radiotherapie zu den nicht bestrahlten Tumoren aufgezeigt werden. Hier finden sich vor allem signifikante Ergebnisse bei niedrigeren Cut offs (\geq Median (p-Wert = 0,0190); ≥ 20 (p-Wert = 0,0169); ≥ 20 (p-Wert = 0,0008)), wo in den präoperativ bestrahlten Tumoren eine bedeutend erhöhte Expression von CD8 positiven Zellen zu finden ist. In dem Vergleich der Geschlechter sowie der Vergleich zwischen Primär und Rezidiv Tumoren konnte in allen gewählten Cut offs kein signifikantes Ergebnis aufgewiesen werden. Die untenstehende Tabelle (Tab. 21) verschafft hier eine Übersicht.

Tabelle 19: Dichotomisierung der Kohorte in unterschiedliche Cut offs für die CD8-Immunopositivität in Bezug auf die klinischen Daten (Kontingenzanalyse).

CD8 Cut offs	Geschlecht N (%)		Radiotherapie N (%)		N (%)		N (%)		Hannover Klassifikation N (%)	
	weiblich	männlich	Keine RT	RT	Primär Tumor	Rezidiv	Sporadische Tumore	NF2 Tumore	T1 / T2	T3 / T4
< Mittelwert	418 (64,3)	390 (63,4)	782 (63,9)	26 (63,4)	766 (63,9)	42 (63,6)	712 (63,0)	96 (71,6)	247 (78,7)	559 (58,9)
>= Mittelwert (Mittelwert = 39,6)	232 (35,7)	225 (36,6)	442 (36,1)	15 (36,6)	433 (36,1)	24 (36,4)	419 (37,1)	38 (28,4)	67 (21,3)	390 (41,1)
	p = 0,7410		p = 0,9504		p = 0,9671		p = 0,0477*		p = <,0001*	
< Median	322 (49,5)	307 (49,9)	616 (50,3)	13 (31,7)	595 (49,6)	34 (51,5)	556 (49,2)	73 (54,5)	207 (65,9)	420 (67,0)
>= Median (Median = 26)	328 (50,5)	308 (50,1)	608 (49,7)	28 (68,3)	604 (50,4)	32 (48,4)	575 (50,8)	61 (45,5)	107 (34,1)	529 (55,7)
	p = 0,8925		p = 0,0190*		p = 0,7649		p = 0,2444		p = <,0001*	
<10	146 (22,5)	141 (22,9)	284 (23,2)	3 (7,3)	269 (22,4)	18 (27,3)	248 (21,9)	39 (29,1)	100 (31,9)	186 (19,6)
>= 10	504 (77,5)	474 (77,1)	940 (76,8)	38 (92,7)	930 (77,6)	48 (72,7)	885 (78,1)	95 (70,9)	214 (68,2)	763 (80,4)
	p = 0,8434		p = 0,0169*		p = 0,3610		p = 0,0607		p = <,0001*	
< 20	262 (40,3)	244 (39,7)	500 (40,9)	6 (14,6)	480 (40,0)	26 (39,4)	448 (39,6)	58 (43,3)	168 (53,5)	337 (35,5)
>= 20	388 (59,7)	371 (60,3)	724 (59,2)	35 (85,4)	719 (60,0)	40 (60,6)	683 (60,4)	76 (56,7)	146 (46,5)	612 (64,5)
	p = 0,8184		p = 0,0008*		p = 0,9178		p = 0,4119		p = <,0001*	
< 30	360 (55,4)	346 (56,3)	686 (56,1)	20 (48,8)	669 (55,8)	37 (56,1)	621 (54,9)	85 (63,4)	222 (70,7)	482 (50,8)
>= 30	290 (44,6)	269 (43,7)	538 (44,0)	21 (51,2)	530 (44,2)	29 (43,9)	510 (45,1)	49 (36,6)	92 (29,3)	467 (49,2)
	p = 0,7540		p = 0,3568		p = 0,9664		p = 0,0602		p <,0001*	

CD8 Cut offs	Geschlecht N (%)		Radiotherapie N (%)		N (%)		N (%)		Hannover Klassifikation N (%)	
	weiblich	männlich	Keine RT	RT	Primär Tumor	Rezidiv	Sporadische Tumore	NF2 Tumore	T1 / T2	T3 / T4
< 40 ≥ 40	432 (66,5) 218 (33,5)	393 (63,9) 222 (36,1)	798 (65,2) 426 (34,8)	27 (65,9) 14 (34,2)	782 (65,2) 417 (34,8)	43 (65,2) 23 (34,9)	725 (64,1) 406 (35,9)	100 (74,6) 34 (25,4)	249 (79,3) 65 (20,7)	574 (60,5) 375 (39,5)
	p = 0,3395		p = 0,9307		p = 0,9908		p = 0,0156*		p = <,0001*	
< 50 ≥ 50	490 (75,4) 160 (24,6)	439 (71,4) 176 (28,6)	897 (73,3) 327 (26,7)	32 (78,1) 9 (22,0)	881 (73,5) 318 (26,5)	48 (72,7) 18 (27,3)	814 (72,0) 317 (28,0)	115 (85,8) 19 (14,2)	265 (84,4) 49 (15,6)	662 (69,8) 287 (30,2)
	p = 0,1072		p = 0,4968		p = 0,8931		p = 0,0006*		p = <,0001*	
< 60 ≥ 60	520 (80,0) 130 (20,0)	480 (78,1) 135 (22,0)	966 (78,9) 258 (21,1)	34 (82,9) 7 (17,1)	945 (78,8) 254 (21,2)	55 (83,3) 11 (16,7)	883 (78,1) 248 (21,9)	117 (87,3) 17 (12,7)	276 (87,9) 38 (12,1)	722 (76,1) 227 (23,9)
	p = 0,3940		p = 0,5353		p = 0,3799		p = 0,0129*		p = <,0001*	

Um eine Vorstellung von der Ausprägung im Zusammenhang mit dem Alter zu bekommen, wurde auch hier der Median als Cut off gewählt (≥ 47 Jahre). Dabei lässt sich kein signifikanter Unterschied in der CD8-Expression erkennen (38,6 vs. 40,7, p-Wert = 0,3912). Setzt man den Cut off etwas niedriger bei ≥ 20 , oder bei ≥ 30 wird offensichtlich, dass bei einem geringeren Alter auch eine verminderte Anzahl an CD8 T-Lymphozyten zu finden ist (24,9 vs. 40,2, p-Wert = 0,0218 und 30,4 vs. 41,1 p-Wert = 0,0028, respektive) (Tab. 22).

Tabelle 20: Unterschiede in der CD8 Immunopositivität im Verhältnis zu unterschiedlichen Cut offs des Patientenalters bei Diagnose (ANOVA Varianzanalyse).

CD 8	N (%)	Mittelwert der CD8 Expression	p-Wert
Cut offs in Jahren			
< Median	621(49,1)	38,6	0,3912
\geq Median	644 (50,9)	40,7	
<i>(Median = 47 Jahre)</i>			
< 20	46 (3,6)	24,9	0,0218*
\geq 20	1219 (96,4)	40,2	
< 30	176 (13,9)	30,4	0,0028*
\geq 30	1089 (86,1)	41,1	
< 40	396 (31,3)	36,9	0,1455
\geq 40	869 (68,7)	40,9	
< 50	731 (57,8)	38,0	0,1259
\geq 50	534 (42,2)	41,9	
< 60	1039 (82,1)	38,7	0,1062
\geq 60	226 (17,9)	43,9	

Vergleich von CD8 zu MIB1

Für die Beurteilung der Verteilung von CD8 zu MIB1 stehen 1240 Fälle zu Verfügung, die in gleichem Maße eine auswertbare MIB1 wie auch eine CD8 Färbung erhalten haben. Mehrere Cut offs für CD8 sind dabei untersucht worden: Cut off ≥ 26 (Median); 39,6 (Mittelwert); 10; 20; 30; 40; 50; 60. Dabei zeigen sich signifikante Ergebnisse bei einem Cut off ≥ 26 (Median). So ist in der Gruppe oberhalb des Cut offs ≥ 26 auch eine erhöhte Expression von MIB1 zu finden (MIB1: 1,35 vs 1,25; p-Wert = 0,0022). Ein ähnliches signifikantes Ergebnis ist auch bei dem Cut off von ≥ 20 (MIB1: 1,34 vs 1,25; p-Wert = 0,0055) und einem Cut off von ≥ 30 (MIB1: 1,35 vs 1,27; p-Wert = 0,0050) zu sehen. Bei allen weiteren Cut offs ist jeweils eine Tendenz zu einem höheren MIB1 Wert bei vermehrter CD8 Expression zu erkennen, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb.47).

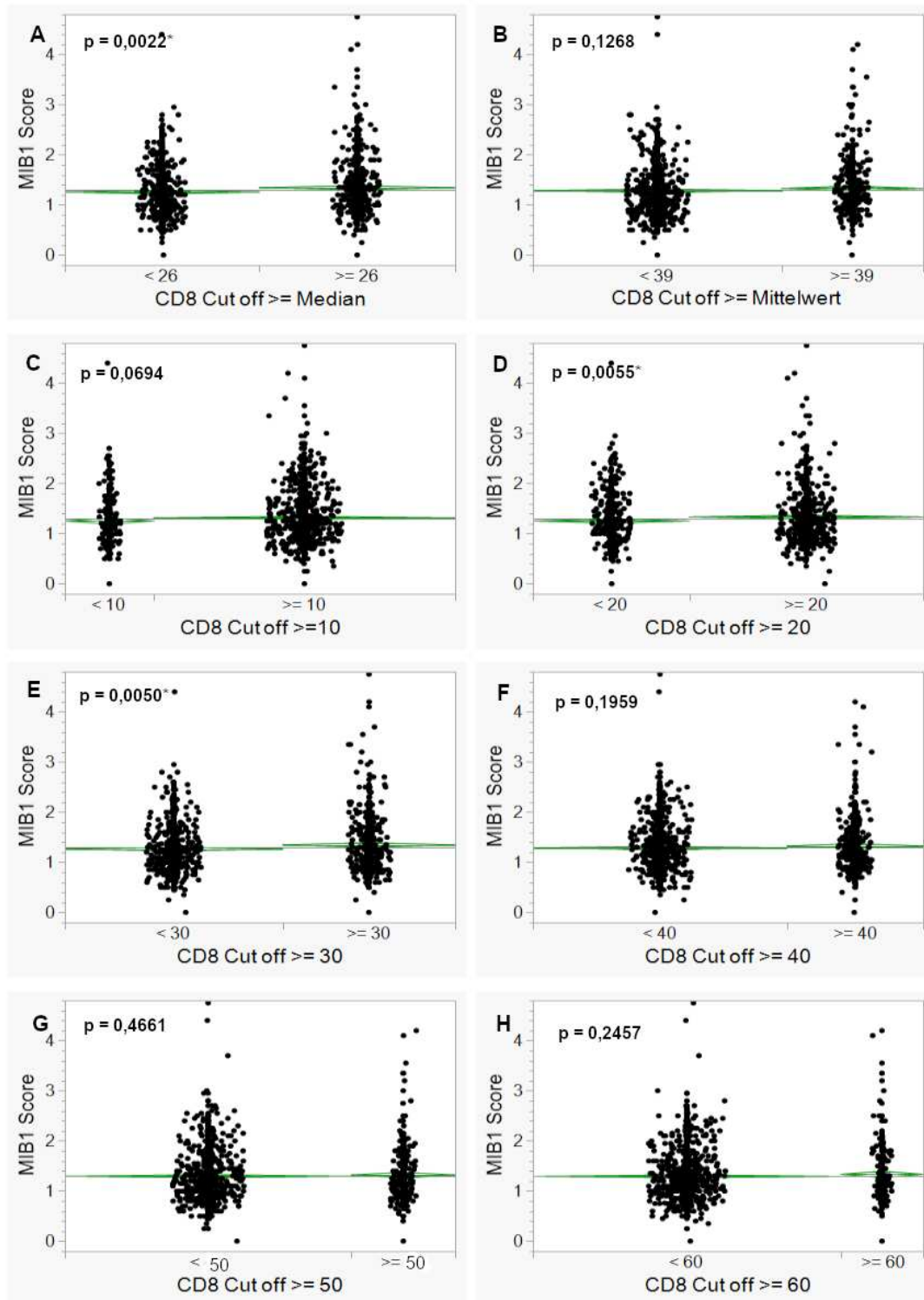


Abbildung 37: Darstellung der MIB1-Expression im Vergleich zur dichotomisierten CD8 Expression: ≥ 22 (Median) (A) und dem Mittelwert von ≥ 37 (B), sowie den Cut offs von ≥ 10 (C), ≥ 20 (D), ≥ 30 (E), ≥ 40 (F), ≥ 50 (G), ≥ 60 (H)

3.7 Marker des Immuncheckpoint-Pathways

Für die ursprünglich geplanten Immuncheckpoint Marker CTLA 4 und PD-L1 wurden zunächst TMA- Schnitte vergleichend mit Flächenschnitten durchgeführt. Zusätzlich wurden die Marker SIRP alpha und CD46 noch hinzugenommen. Hier zeigte sich ein nicht homogenes zytoplasmatisches Färbemuster in den Flächenschnitte, so dass sich eine Färbung der gesamten TMA-Schnitte nicht als praktikabel erwies. Um dennoch eine Vorstellung zu erhalten, wie die Ausprägung bei Vestibularisschwannomen ist, erfolgte die Bewertung anhand ausgewählter Flächenschnitte. Es wurden zunächst jeweils 10 Flächenschnitte ausgesucht, die bei sämtlichen obigen Markern (CD3, CD8, CD163, CD68) eine hohe Expression aufgewiesen haben und jeweils 10 die nur einen geringen Nachweis der Marker zeigten (Tab. 5).

3.7.1 PD-L1

Der Programmed death Ligand 1 (PD-L1), welcher ein transmembranäres Glykoprotein ist, zeigt sich in den angefertigten Flächenschnitten mit einem bräunlichen zytoplasmatischen Färbemuster. Die unterschiede der immunhistochemischen Färbung zeigt sich in der folgen Abbildung 48.

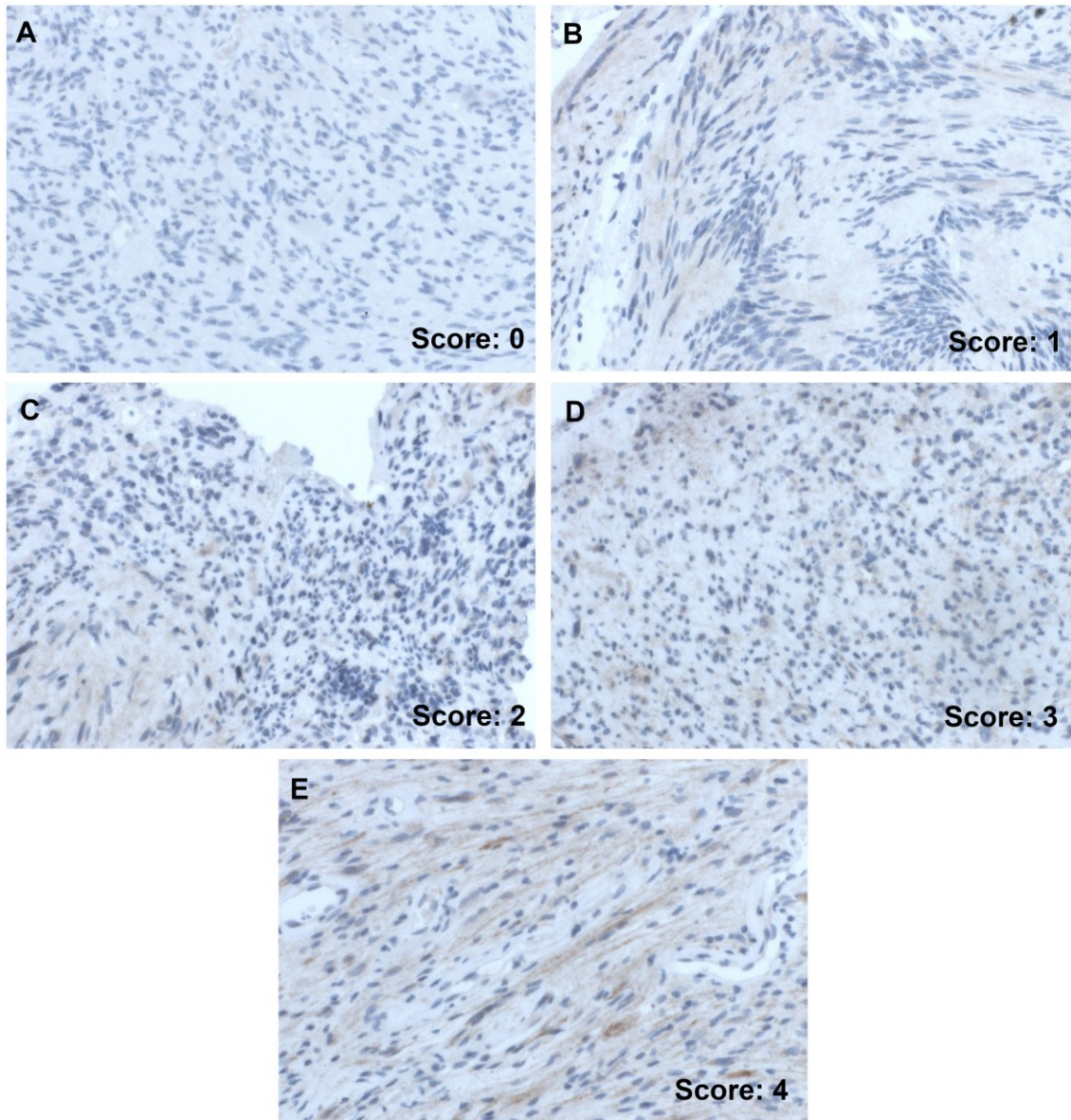


Abbildung 38: Ausprägung und Klassifizierung der immunhistochemischen Färbung von PD-L1. Das Bildmaterial zeigt in aufsteigender Reihenfolge A-E die jeweilige Bewertung und Zuordnung in dem Score 0-4. 0 (keine positiven Zellen) **A**, 1 (1-5%) **B**, 2 (6-25%) **C**, 3 (26-50%) **D**, und **E** repräsentiert den Score 4 mit > 50% positiven Zellen.

Tabelle 21: Immunhistochemische Expression von PD-L1 in Vestibularisschwannomen mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern.

PDL-1 Score	0 (0%)	1 (1-5%)	2 (6-25%)	3 (26-50%)	4 (>51%)
Hoch exprimierende inflammatorische Marker n = 10	1	0	2	5	2
Niedrig exprimierende inflammatorische Marker n = 10	0	2	4	1	3

Die aufgeführte Ergebnisse der Tabelle 23 können kein eindeutiges Expressionsmuster von PDL-1 aufweisen im Bezug auf die inflammatorischen Marker. Wenn man einen Cut off bei einem Score von > 2 setzt kann man einen Trend erkennen. Hier zeichnet sich ab, dass eine höhere Ausprägung der inflammatorischen Marker mit einer höhere Expression von PDL-1 assoziiert ist. Umgekehrt weisen Tumore mit einer geringeren Positivität von inflammatorischen Markern auch eine geringere Expression von PDL-1 auf (siehe Tab. 24).

Tabelle 22: Immunhistochemische Expression von PD-L1 in Vestibularisschwannomen mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern bei einem Cut off von > 2 .

PD-L1 bei einem gesetzten Cut off von > 2

PD-L1 Score	≤ 2 (0%-25%)	> 2 (≥ 26)
Hoch exprimierende inflammatorische Marker N = 10	3	7
Niedrig exprimierende inflammatorische Marker N = 10	6	4

3.7.2 CTLA 4

Das CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) Glykoprotein, welches auf den T-Lymphozyten zu finden ist, lässt sich ebenfalls im Flächenschnitt mit einem klaren Zellbezug darstellen. Die positiv gefärbten Zellen sind in einem dunklen braun gefärbt. Nach sorgfältiger Sichtung aller Flächenschnitte zeigen sich allerdings nur wenig gefärbte Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche und Zellzahl. Somit ist hier kein Score zur Anwendung gekommen, es ist ausschließlich die Beurteilung über positive und negative Flächenschnitte erfolgt (Abb. 49).

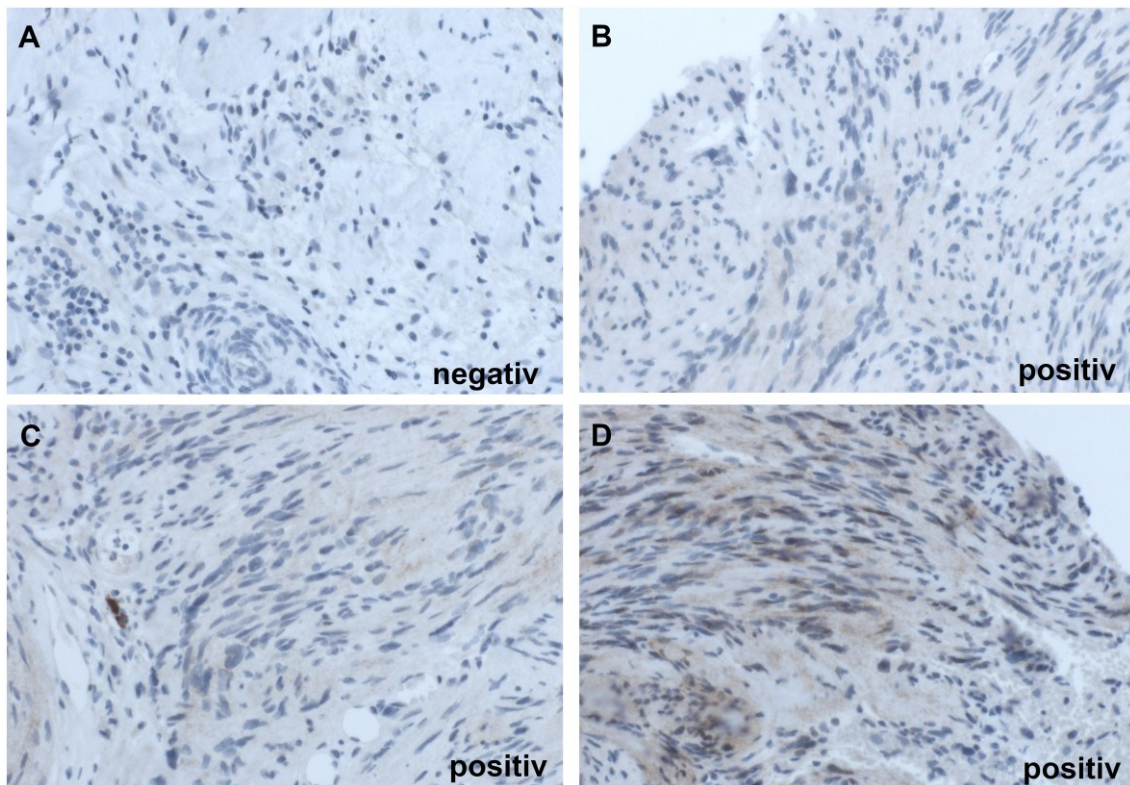


Abbildung 39: Färbemuster von CTLA4. Das Bildmaterial zeigt die diffuse Färbung von CTLA4, hierbei muss auf einen klaren Zellbezug geachtet werden. Die Einschätzung erfolgt nur in negativ (A), und positiv (B, C, D).

Hier konnte kein Zusammenhang zu den hoch und niedrig positiv gefärbten Flächenschnitten, im Vergleich mit einer hohen (7 positive) oder niedrigen (8 positive) Expression der inflammatorische Markern nachgewiesen werden (Tab. 25). Die Ergebnisse der einzelnen Kohorten unterscheiden sich nur um einen Fall. Die hohe Expression von CTLA 4 tragenden Lymphozyten scheint also unabhängig von der Detektion anderer inflammatorischer Marker zu sein.

Tabelle 23: Darstellung der immunohistochemischen Färbung von CTLA 4 in Tumorproben mit Abhängigkeit mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern.

CTLA 4	negativ	positiv
Hoch exprimierende inflammatorische Marker N = 10	3	7
Niedrig exprimierende inflammatorische Marker N = 10	2	8

3.7.3 SIRP alpha

Der membranständige Marker SIRP alpha weist im Flächenschnitt einen guten und klaren Zellbezug auf. Für die genaue Einschätzung im Schnittbild wurde ein Cut off von $\geq 50\%$ gewählt. Gesondert sind noch komplett nicht gefärbte Flächenschnitte als negativ beurteilt worden (Abb. 50).

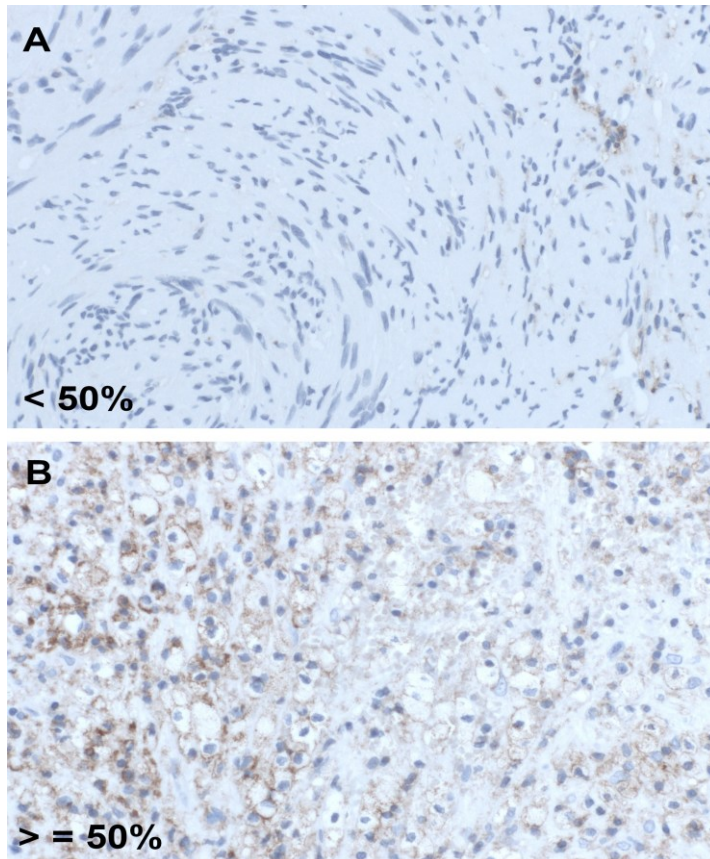


Abbildung 40: Färbemuster von SIRP alpha. Das Bild **A** zeigen einen Ausschnitt von einem Flächenschnitt der weniger als 50% der Zellen SIRP alpha exprimieren. Das Bild **B** wurde mit mehr als 50% bewertet.

Bei der nur geringen Fallzahl der Flächenschnitte in den jeweiligen Kategorien zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen SIRP alpha und den inflammatorischen Markern ab. Bei einer nachgewiesenen erhöhten Expression von inflammatorischen Markern scheint es auch eine erhöhte (> 50%) Expression von SIRP alpha geben. Umgekehrt zeigt sich bei einer weniger ausgeprägten Inflammation auch nur eine geringe (< 50%) SIRP alpha Expression (siehe folgende Tab. 26).

Tabelle 24: Darstellung der immunohistochemischen Färbung von SIRP alpha in Tumorproben mit Abhängigkeit mit hoher und niedriger Expression von inflammatorischen Markern

SIRP alpha Score	0 (keine positiven Zellen)	1 (< 50% positive Zellen)	2 (>= 50 % positive Zellen)
Hoch exprimierende inflammatorische Marker N = 10	0	4	6
Niedrig exprimierende inflammatorische Marker N = 10	0	9	1

3.7.4 CD47

Bei dem membranären Glykoprotein CD47 ist es zu keiner auswertbaren Färbung gekommen. Das Färbemuster war in den ausgewählten Flächenschnitt nur randständig aufgefallen. Da es sich hierbei also um eine axonale Färbung von Nervenfaszikeln handelt und keine Färbung der Tumorzellen vorliegt, konnte eine Beurteilung hier nicht stattfinden. Generell war nur eine sehr geringe prozentuale Färbung zu sehen, ohne klaren Bezug zu den jeweiligen hoch und niedrig Inflammatorischen Fällen (siehe Abb. 49)

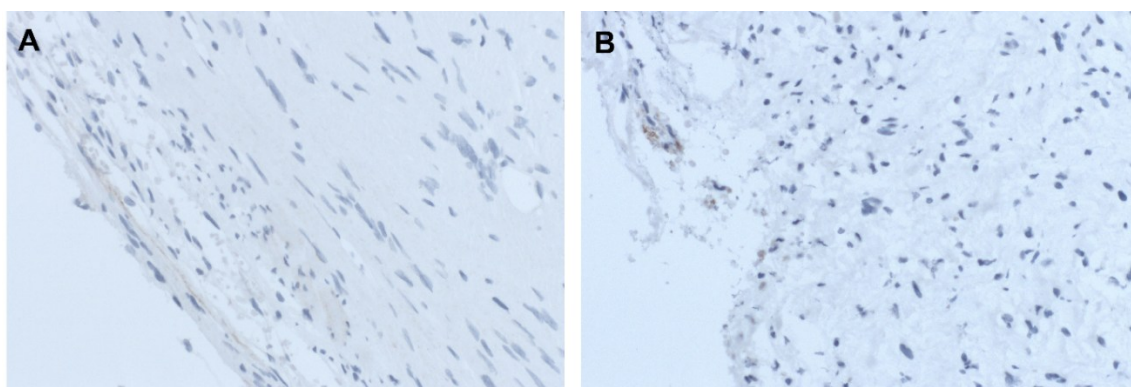


Abbildung 41: Färbemuster von CD47. Sowohl in der Abbildung **A** als auch in **B** sieht man eine randständige Färbung, welche keinen klaren Zellbezug erkennen lässt. Dies passt am ehesten zu einer axonalen Färbung von Nervenfaszikeln.

4 Diskussion

4.1 Vor und Nachteile der TMA-Methode

In der Anwendung der Tissue-Microarray Methode verbergen sich einige Vor- und Nachteile, die im weiteren Verlauf nun beleuchtet werden. Ein klarer Vorteil der Methode ist die große Zahl von Tumor-Gewebestücken, welche in einem Microarray gesammelt werden können. Innerhalb dieser Studie konnten somit bis zu 2544 Gewebeproben von insgesamt 1272 PatientInnen gebündelt werden, mit bis zu 40-70 Stanzproben pro TMA. Diese Methodik ermöglicht innerhalb eines großen Kollektivs ein zeiteffizientes und materialschonendes Arbeiten. Durch die kleinen Stanzproben kann Tumorgewebe gezielt aus dem Paraffinblock separiert werden. Auch bei Präparaten mit nur wenig tumorhaltigen Gewebe kann somit sehr schonend Material genutzt werden. Der Donorblock bleibt für gewöhnlich erhalten und steht für eine erneute histopathologische Evaluierung im Rahmen weiterer Studien und klinische Fragestellungen weiterhin zur Verfügung (Horn et al. 2005; Chen et al. 2003). Zusätzlich können viele einzelne arbeitsintensive Flächenschnitte vermieden werden. Auch der Kostenfaktor ist zu beachten, da der Verbrauch der teuren Antikörpersubstanzen somit reduziert werden kann (Hidalgo et al. 2003). Hierbei können direkt hohe Fallzahlen erfasst werden, welche durch die Kohortengröße, eine bessere Aussage hinsichtlich der Signifikanz der Ergebnisse bietet. Im Vergleich zu den Flächenschnitten kann mittels der TMA-Methode eine Vielzahl mehr Färbungen von einem begrenzt konservierten Gewebe durchgeführt werden. Als zusätzlicher Vorteil ist die Tatsache zu nennen, dass alle Proben auf einem Microarray mittels dem gleichen Antikörperansatz und Färbeprotokoll gefärbt werden. Somit ist hiermit eine Einheitlichkeit gewährleistet und eine Standardisierung möglich (Horn et al. 2005.) Zusätzlich kann dies zu einer Reduzierung der Fehlerbreite führen. Des Weiteren ist ein Austausch von großen Probenkollektiven auf ungefärbten Microarrays zwischen unterschiedlichen Laboratorien mit geringem Aufwand möglich. Dies kann zu einer Verbesserung der Standardisierung bei

immunhistochemischen Färbeprozessen führen (Camp, Charette, and Rimm 2000).

Die Hauptnachteile bezüglich der TMA-Methode beziehen sich auf die Größe der einzelnen Stanzzyylinder. Bei heterogenen Tumoren, wie das Adenokarzinom der Prostata oder auch bei Leberkarzinomen, bietet es keine optimale Aussage. Wenn man allerdings jeweils zwei Stanzungen pro Paraffinblock vornimmt, können Ergebnisse erzielt werden die nahezu vergleichbar mit den Resultaten eines Flächenschnittes sind (Camp, Charette, and Rimm 2000). Dieses Prinzip hat auch in dieser Studie Anwendung gefunden. Somit sind aus den 1272 Fällen jeweils zwei bis drei Stenzen entnommen worden. Aufgrund von einer unterschiedlichen Gewebedichte innerhalb der Stenzen und dem TMA-Block kann es zu einem Dislozieren der einzelnen Stenzen im Block kommen und somit zu einem Verlust von diesem. Durch das Erhitzen der TMA-Blöcke (37 °C für 30 Minuten) kann durch Verschmelzung der einzelnen Proben ein Verlust von Material vermindert werden (Horn et al. 2005). Zudem kann die Bewertung der einzelnen immunhistochemischen Färbungen durch eine hohe Hintergrundfärbung teils erschwert sein. Dies ist vor allem bei zytoplasmatischer Expression zu beobachten (Hedvat et al. 2002).

Diese Erfahrung konnten wir ebenfalls im Rahmen der immunhistochemischen Färbung der Immuncheckpoint-Inhibitoren machen. Hier konnte musste, aufgrund des zytoplasmatischen Färbemusters und dem nicht klaren Zellbezug, Abstand von der TMA- Methode genommen werden.

Grundsätzlich hat sich die TMA-Methode für dieses Projekt mit so einer Größenordnung dennoch als sehr praktisch erwiesen. Für die Mehrheit der immunhistochemischen Marker konnten aussagekräftige Ergebnisse gewonnen werden. Und auch für weitere Forschungsarbeiten steht noch genügend Material zur Verfügung.

4.2 Die PatientInnen-Kohorte

Um eine detaillierte Vorstellung zu erhalten wie hoch die Aussagekraft der Ergebnisse der speziellen Antikörper sind, muss zuerst geklärt werden, inwiefern das untersuchte Gesamtkollektiv mit den Angaben der Literatur übereinstimmt.

Die untersuchte Kohorte weist insgesamt eine sehr hohe Kongruenz mit den Ergebnissen aus der Literatur auf (Park et al. 2012) (Hannan et al. 2020). Wenn man davon ausgeht, dass der operative Eingriff zeitnah an dem Termin der Diagnosestellung gekoppelt ist, stimmt das Diagnosealter der Kohorte mit durchschnittlich 46,5 Jahren mit den Angaben der Fachliteratur (zwischen der vierten und fünften Lebensdekade) überein (Neff et al. 2006). Die in den doch meisten Fällen (75,2%) höhergradig erfasste Hannoverklassifikation (T3 und T4) lässt sich dadurch erklären, dass es sich hierbei um eine chirurgische Kohorte handelt. Auch die Geschlechterverteilung mit 48,6% männlichen Patienten und 51,4% weiblichen Patientinnen ist wie in der Literatur weitestgehend ausgeglichen (Hannan et al. 2020, (Park et al. 2012). Nach Park et al. stellen Neurofibromatose Typ 2 PatientInnen circa 5% dar. In der untersuchten Kohorte wird hier ein höherer prozentualer Anteil von 10,8% ermittelt. Diese Abweichung von der Literatur lässt sich sehr wahrscheinlich mit dem großen Bekanntheitsgrad der Abteilung für Neurochirurgie in Tübingen erklären, die ebenfalls ein Zentrum für Neurofibromatose und Schwannomatosen ist. Das durchschnittliche Alter (27,4 Jahre) der NF2 PatientInnen entspricht wieder dem der Fachliteratur, wo von einem durchschnittlichen Erkrankungsalter vor der dritten Lebensdekade die Rede ist (Evans et al. 1992a). 5,2% dieser Kohorte waren chirurgische Eingriffe bei rezidivierenden Tumoren. Hier sind die Zahlen der Rezidiv-Fälle in der Literatur etwas höher. Vor allem nach einer vorherigen subtotalen Resektion können diese, je nach Literatur, bis zu 15% darstellen (Ohta et al. 1998; Park et al. 2012). Allerdings sind die Zahlen nach einer Komplettresektion bei unter 10% (Schick and Unterberg 2011). In der Annahme, dass auch schon der erste Eingriff in dem Department für Neurochirurgie der Universitätsklinik vonstattengegangen ist, sind die Zahlen der Kohorte wieder denen der Literatur ähnlich. Nur 3,2% der PatientInnen dieser Kohorte sind mit einer Radiotherapie vorbehandelt. Diese

geringe Zahl (n=41) kann möglicherweise an der generell sehr guten Tumorkontrolle der Radiotherapie liegen (Murphy and Suh 2011). Auch die Tatsache, dass es sich hier um eine chirurgische Kohorte handelt, lässt diesen geringen Teil innerhalb des Kollektivs erklären.

4.3 Diskussion der Antikörper

4.3.1 MIB1

Die Erhebung des MIB1 Scores ist eine etablierte Methode, um den Proliferationsindex zu erfassen. Selbstverständlich ist dies auch schon in vielen anderen Studien zur Anwendung gekommen. Allerdings wurden dabei deutlich kleinere Kohorten untersucht. So konnte Niemczyk et al. in seiner Kohorte, die 43 PatientInnen umfasste, einen MIB1 Mittelwert von 1,9% ermitteln. Ebenfalls konnte hier ein deutlicher Unterschied zwischen Tumoren, welche unilateral (n = 38) (MIB1 = 1,74%) aufgetreten sind und Tumoren (n = 5) mit einem bilateralen (MIB1 = 2,79%) Vorkommen erfasst werden (Niemczyk et al. 2000). Ähnliches findet sich auch in der Studie von Lesser et al, hier wurden insgesamt acht Vestibularisschwannome untersucht, die eine MIB1 Variation von 0,36% bis 3,15% aufweisen (Lesser et al. 1991). In der hier untersuchten Kohorte konnte ein Mittelwert von 1,3% erfasst werden. Eine Unterscheidung zwischen unilateral und bilateral ist in der Form nicht geschehen. Allerdings ist der Vergleich zwischen sporadisch aufgetretenen Tumoren und Tumoren von NF2 PatientInnen, bei denen ein bilaterales Auftreten die Regel ist, erfolgt. In dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte das Ergebnis der oben genannten Studie jedoch nicht bestätigt werden. Mit einem p-Wert von 0,1260 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen nachgewiesen werden. Das signifikante Ergebnis im Geschlechtervergleich ist unter Umständen auch der Größe der Kohorte geschuldet und konnte so bisher noch nicht in Studien aufgezeigt werden. So zeigt sich in dieser Kohorte bei den männlichen Patienten eine MIB1 Expression von 1,3%, die weiblichen Patientinnen weisen eine

Expression von 1,2% auf (p-Wert = 0,0128). Cafer et al konnte in seiner Studie hingegen, die 59 PatientInnen einschließt, keine Zusammenhänge zwischen der Ki-67 Expression und dem Geschlecht sowie der Tumorgroße erzielen (Cafer et al. 2008). Auch in dieser Studie konnten keine signifikanten Resultate (p-Wert = 0,2224) bezüglich der Tumorgroße und der MIB1 Expression gewonnen werden. Es lässt sich nur eine minimal zunehmende Tendenz feststellen (T1: MIB1 von 1,19%; T2: MIB1 von 1,28%; T3: MIB1 von 1,33%; T4: MIB1 von 1,30%). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es außer dem signifikanten Ergebnis im Geschlechtervergleich trotz der Kohortengroße keine neuen Erkenntnisse in der Expression von MIB1 in Vestibularisschwannomen ergeben haben.

Betrachtet man die MIB1 Expression in Bezug auf die verwendeten Marker, kann man ebenfalls einen Zusammenhang feststellen. So finden sich bei einer erhöhten Expression der Marker ebenfalls erhöhte MIB1 Werte. Somit ist die Möglichkeit denkbar, dass sowohl der Proliferationsindex als auch die Zunahme der Immunzellinfiltration auf einen Tumorprogress hindeuten kann. Auch zu berücksichtigen ist, dass natürlich auf die Immunzellen eine Proliferation haben die das Ergebnis beeinflussen kann. Grundsätzlich muss jedoch betont werden, dass die MIB1-Expression in VS im Vergleich zu anderen Tumoren generell recht niedrig ist und die Unterschiede, auch wenn signifikant, ebenfalls recht gering sind. Es ist daher fraglich, ob diese geringen Unterschiede eine biologische Signifikanz widerspiegeln.

4.3.2 Expression der Immunhistochemischen Marker in Vestibularisschwannome

Schon in zahlreichen Studien konnte der Nachweis der verwendeten Marker belegt werden. So ist nicht nur die Ausprägung der TAMs in den Fokus vieler Forschungsprojekte geraten, sondern auch die Infiltration von T-Lymphozyten. So haben Wang et al. ebenfalls schon das Mikromilieu von 10 NF2 Schwannomen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur CD68 positive Makrophagen in VS-Proben anzutreffen waren, sondern auch T-

Lymphozyten, welchen CD3 und CD8 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Wang et al. 2018). In einer etwas älteren Studie (n = 37) konnten auch Rossi et al. bei Vestibularisschwannomen eine geringe Zahl an CD8 und CD4 positiven Lymphozyten feststellen. 87% der Fälle haben eine Infiltration von CD8 aufgewiesen (Rossi et al. 1990). Auch in diesem Kollektiv konnten neben den Makrophagenmarkern CD68 (80,8%) und CD163 (61,2%), CD3 (97,2%) und CD8 (99,2%) positive Lymphozyten in Vestibularisschwannomen festgestellt werden.

4.3.3 Expression der Immunhistochemischen Marker in Zusammenhang der Tumorgroße

Ein besonders eindeutiges Ergebnis konnte in der Expression der Marker im Bezug auf die Tumorgroße aufgezeigt werden. So konnten sowohl bei den Tumor-assoziierten Makrophagen Markern, CD163 und CD68, wie auch bei den tumorinfiltrierenden Lymphozyten, CD3 und CD8, eine signifikant gesteigerte Expression bei einer größeren Tumorausdehnung nachgewiesen werden.

Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden diese Marker bereits vereinzelt, meist nicht kombiniert, in kleineren Studien verwendet. So ist in der Literatur CD163 schon mehrfach als Marker für Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) des Typs 2 verwendet worden (Tardito et al. 2019). Da es ein Marker für immunsupprimierende Aktivitäten, als auch ein Promotor für das Tumorwachstum darstellt (Jeong et al. 2019) war er auch im Rahmen dieser Studie von besonderer Bedeutung.

De Vries et al. konnten in einer kleinen Stichprobe von 10 schnell und 10 langsam wachsenden Vestibularisschwannomen nachweisen, dass sich eine signifikant höhere CD163 Expression in den schnellwachsenden Tumoren befindet. Zudem konnte eine vermehrte Mikrovaskularisierung aufgezeigt werden (De Vries et al. 2019; Zhang et al. 2021). Allerdings waren sieben der zehn schnell wachsenden Tumore zystisch veränderte VS. Dabei konnte auch bei den zystischen Tumoren eine erhöhte CD163 Expression nachgewiesen werden (De Vries et al. 2019).

Ähnliches konnte auch mit einer 48 PatientInnen umfassende Studie aus dem Jahr 2020 festgestellt werden. Hier wurde neben CD 163 noch mit den immunhistochemischen Markern CD45, CD4 und CD68 gearbeitet, wovon alle eine direkte Korrelation mit der Größe von VS aufweisen konnten. So konnte bei einem größeren Tumolvolumen auch einer erhöhte Expression von den immunhistochemischen Markern nachgewiesen werden (Bi, Gupta, Mei, Al Abdulmohsen, et al. 2020).

CD 68 weist im Vergleich zu CD 163 keine strenge Spezifität zu Makrophagen auf, sondern ist auch noch zusätzlich auf Mikroglia, Osteoklasten und myeloisch dendritische Zellen (DCs) zu finden (Jeong et al. 2019). De Vries et al. haben ebenfalls bei einer 67 PatientInnen umfassenden Kohorte Untersuchungen mit dem Marker CD68 durchgeführt. Hierbei wurden ausschließlich sporadisch unilateral auftretende Tumore untersucht, deren Volumen vorab mittels MRT Diagnostik kalkuliert wurden. Es konnte eine signifikante Assoziation zwischen der Tumorgöße und der Detektion von CD68 positiven Zellen im Tumorgewebe festgestellt werden. So konnten sie nachweisen, dass sowohl eine erhöhte Expression in Bezug auf die Tumorgöße, der Expression von MIB1 als auch einer erhöhten Mikrovaskularisierung besteht (de Vries et al. 2012).

Die Ergebnisse von De Vries et al. können somit vollständig bestätigt werden, auch wenn die Kategorisierung der Hannover Klassifikation nicht so genau ist wie die einer MRT-Volumetrie. In dieser Studie konnte bei allen verwendeten Markern (CD163, CD68, CD3 und CD8) eine signifikant erhöhte Expression bei einer zunehmenden Tumorausdehnung nachgewiesen werden (p-Wert $<0,0001$). Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass es innerhalb größeren beziehungsweise älteren Tumoren zu einer Umstrukturierung der Antoni A Areale zu Antoni B Areale kommen kann. Der Grundbaustein dieser These ist die Beobachtung einer Überganszone zwischen Antoni A und B. Innerhalb dieser Zone soll es eine erhöhte proliferative Aktivität geben. Aus diesem degenerativen Prozess von Antoni A zu Antoni B Arealen kommt es zusätzlich zu einem erhöhten Vorkommen von Makrophagen und Lymphozyten in den locker strukturierten Typ B Regionen (Abe et al. 2000; Helbing, Schulz, and Morrison

2020). Somit wäre die durchgehende Beobachtung eines engen Zusammenhangs bei einer höheren Hannover Klassifikation mit einer begleitenden hohen Immunzellinfiltration (sowohl TAMs als auch TILs) zu erklären.

4.3.4 Expression der Immunhistochemischen Marker bei NF2 Tumoren

Ein besonderes Interesse des Forschungsprojektes obliegt den NF2 Tumoren. Da dieses junge und schwer-betroffene Patientenkollektiv besonders von neu gewonnen Erkenntnissen profitieren kann. Bisher gibt es nur wenige Studien in dieser Patientengruppe bei kleinen Kohortengrößen.

So konnten Tamura et al. in der Vergleichsstudie von 22 NF2 Tumoren und 21 sporadischen Tumoren eine signifikante höhere Expression von CD3, CD8 und CD163 positiven Zellen in den NF2 Tumoren feststellen (Tamura et al. 2020). Ähnliches konnten Nickl et al. in einer ähnlich großen Kohorte nachweisen, auch hier konnte eine erhöhte Expression von den TAMs (CD68 und CD163) bei den NF2 Tumoren nachgewiesen werden. In den Untersuchungen der TILs (CD4 und CD8) zeigte sich allerdings keine Unterschiede zu den sporadisch entstandenen Tumoren (Nickl et al. 2024). Diese Ergebnisse konnte innerhalb dieser Studie allerdings nicht bestätigt werden. Es konnte zwar ebenfalls ein signifikantes Resultat bei den NF2 Tumore festgestellt werden, allerdings mit einer signifikant geringeren Expression der immunhistochemischen Marker (CD163/p-Wert = 0,0084; CD 68/ p-Wert = 0,0003; CD3/p-Wert = 0,0035; CD8/ p-Wert = 0,0034). Dieses Ergebnis lässt sich vielleicht somit erklären, dass die Genetik innerhalb der Vestibularisschwannome von NF2 PatientInnen hier die entscheidendere Rolle für Wachstumsimpulse und das bilaterale Auftreten darstellt (Jacob et al. 2008) und dies somit nicht zwingend mit einer Inflammation und Migration von Makrophagen einhergeht. In Anbetracht an der bisher größten Untersuchten Kohorte von NF2 Tumoren (n=137) sowie der detaillierten Methodik in der Auswertung hat dieses Ergebnis einen sehr hohen Stellenwert.

Da die Genetik in NF2 eine wesentliche Rolle spielt, würden auch die Ergebnisse in Bezug auf das Patientenalter unterstreichen. Im Rahmen dieser Studie konnte eine signifikant höhere Expression der Marker CD163 und CD68 in höheren Erkrankungsalter nachgewiesen werden (CD163 p-Wert $<0,0001$; CD68 p-Wert = $0,0004$). Somit würde das frühe Erkrankungsalter (27,4 Jahre) erklären, warum in der Kohorte der NF2 Tumore eine signifikant geringere Expression der inflammatorischen Marker nachgewiesen werden konnte. Auch die TumorgroÙe scheint entgegen der restlichen Kohorte, keine Auswirkungen auf die Expression der immunhistochemischen Marker bei NF2 Tumoren zu haben. Da von der Kohorte der NF2 Tumoren ($n=135$) 116 mit einer Hannover Klassifikation T3 oder T4 kategorisiert wurden, bestätigt dieses Ergebnis, dass hier kein Zusammenhang besteht.

4.3.5 Expression der Immunhistochemischen Marker nach Radiotherapie

Auch bei einer vorangegangenen Radiotherapie konnte ein signifikant höheres Vorkommen von CD163 (p-Wert = $0,0007$) nachgewiesen werden. Diese Tatsache ist möglicherweise Folge der Radiotherapie, welche sowohl systemisch zu einer Immunreaktion (CATENA and M. TRINCI 1997), wie auch in bestrahltem Tumorgewebe zu einer Migration von Immunzellen führt (Shiao and Coussens 2010). Da es sich bei den vorbestrahlten Fällen um eine selektive Subgruppe von Schwannomen handelt, welche nach einer Radiotherapie einen deutlichen Progress zeigten, kann jedoch auch spekuliert werden, ob die vermehrte Expression von CD163 eventuell auch Ausdruck des Rezidivwachstums nach stattgehabter Bestrahlung sein könnte. Bei den übrigen Markern konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu primären unbehandelten Schwannomen nachgewiesen werden.

4.3.6 Interpretation der Untersuchten Marker PD-L1, CTLA4, Sirp alpha und CD48

Aufgrund einer heterogenen Immunpositivität in Vestibularisschwannomen, erwies sich die Anfärbung in Tissue Microarrays als nicht geeignet. Eine gesonderte Auswahl von insgesamt 20 Tumoren wurde gezielt untersucht. In Abhängigkeit der Expressionsergebnisse von CD3 und CD8 sowie CD68 und CD163 wurden jeweils 10 Flächenschnitte ausgewählt mit einer geringen inflammatorischen Infiltration sowie 10 mit einer hohen Expression der einzelnen Marker. Die kleine Kohorte konnte für die Immuncheckpoints CTLA4 und PD-L1, sowie für den Marker SIRP alpha ausgewertet werden. In einer kleineren Studie (n=46) konnte schon eine Korrelation zwischen der PD-L1 Expression und einem Tumorprogress nachgewiesen werden. So zeigten sich bei Tumoren in einem stabilen Krankheitsverlauf eine Präsenz von PD-L1 von 1%. Bei Tumoren die sich in einem Progress befanden konnte hingegen eine mediane Expression von 11% nachgewiesen werden. (Perry et al. 2019). Zudem hat sich in der Studie von Bi et al. eine positive Korrelation, der CD163 Expression in der Kombination mit der PD-L1 Positivität, in Bezug auf das Tumorwachstum gezeigt (Zhang et al. 2021; Bi, Gupta, Mei, Abdulmohsen, et al. 2020). Diese Ergebnisse konnten innerhalb der hier untersuchten Kohorte nicht bestätigt werden. Es ließ sich keine genaue Aussage über einen Zusammenhang treffen. Weder bei der Kohorte mit der hohen inflammatorischen Reaktion, noch mit denen der niedrig ausgeprägten Reaktion. Die deutlichen Ergebnisse der Literatur können in dieser Kohorte nicht nachvollzogen werden. Eine Interpretation der Ergebnisse ist grundsätzlich kritisch zu sehen, da man nicht vergessen darf, dass hier die Fallzahl von jeweils 10 hoch und niedrig exprimierenden Flächenschnitte gewählt wurde. Aufgrund dieser geringen Fallzahl ist die Hypothese zu stellen, ob es überhaupt einen Zusammenhang zwischen diesen Markern gibt und ob die Expression von PD-L1 nicht unabhängig von der Inflammation zu werten ist.

Eine ähnlich geringe Aussage lässt sich hier zu der Expression von CTLA4 treffen. In der bestehenden Literatur lassen sich hier allerdings auch keine eindeutigen Ergebnisse finden. Nicht nur die Immuncheckpoint Signalwege

stehen im Fokus, ein weiterer wichtiger Anti-Tumor-Effekt lässt sich in dem CD47-SIRP α Signal System finden (Murata et al. 2018). Aus diesem Grund ist auch die Wahl auf diese Marker gefallen. Eine adäquate Beurteilung von CD47 war aufgrund der axonalen Färbung des Nervenfaszikel ohne genauen Tumorzellbezug leider nicht möglich. Bei SIRP alpha allerdings schon. Da SIRP alpha für gewöhnlich reichlich auf mehrkernigen Leukozyten und Monozyten präsentiert wird (Oldenborg et al. 2000), war die Annahme, dass sich dies auch in dieser Studie bestätigen wird. Tatsächlich konnten bei sechs der ausgewählten Fälle, die der hochinflammatorischen Rubrik zugeordnet werden konnten, eine Expression von SIRP alpha über 50% nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigt sich auch in der Kohorte der niedrig exprimierenden Fällen eine geringere SIRP alpha Ausprägung.

Diese Resultate bieten eine neue Grundlage für weitere Experimente. Neuen Aufschluss könnte die Vergrößerung der stichprobenartigen Kohorte liefern. In diesem Fall könnten zudem Flächenschnitte von NF2 Tumoren berücksichtigt werden um auch hier genauere Aufschlüsse gewinnen zu können.

4.4 Zusammenschau der Marker

Unter der Zusammenschau aller inflammatorischer Marker (CD163, CD86, CD3 und CD8) konnte jeweils ein klarer Zusammenhang zur Tumorgröße gestellt werden. Eine wichtige Überlegung ist sicherlich die oben beschriebenen Umbauprozesse der Antoni A zu den Antoni B Arealen (Abe et al. 2000; Helbing, Schulz, and Morrison 2020). Auch die Assoziation zu einem erhöhten Patientenalter würde dafürsprechen. Da keine gesonderte Untersuchung in Bezug auf zystische VS erfolgt ist, kann die Beobachtung von De Vries et al. im Rahmen dieser Studie nicht sicher bewertet werden. Allerdings wurden zystische Tumor auch nicht aus der Kohorte ausgeschlossen, so dass gut möglich ist das die Expression von CD163 beeinflusst wurde (de Vries et al. 2012). Ein schnellerer Wachstumsprozess, genauer gesagt eine Volumenzunahme ist bei diesem Tumortyp allerdings eher auf die Größenzunahme der Zysten

zurückzuführen und nicht auf die Tumorzellmasse (Charabi 2000; Neff et al. 2006). In einer Erweiterung der Studie, wo MRT Volumina berücksichtigt wurden, konnte keine Korrelation zwischen einer erhöhten Immunzellinfiltration bei einer progredienten Größenzunahme erfasst werden (Gonçalves et al. 2021). So scheint also eine gesteigerte Expression der Marker auch keine Reaktion auf das Größenwachstum zu sein. Dennoch lässt die erhöhte MIB1 Expression in der Kombination mit einer gesteigerten Immunzellinfiltration bei größeren VS auf proliferative Prozesse schließen. Auch das signifikante Ergebnis im Bezug auf die immunhistochemische Expression bei der Kohorte der NF2 PatientInnen lässt zusätzlich vermuten, dass die Immunzellinfiltration nicht zwingen ein Initiator für das Größenwachstum darstellt. Es ist also anzunehmen, dass eine Größenwachstum komplexer erscheint als ursprünglich angenommen.

4.5 Limitationen der Studie

Eine wichtig zu nennende Limitation dieser Studie, stellt der retrospektive Aufbau dar. Eine regelmäßige Verlaufskontrolle im Rahmen der Tumornachsorge ist zwar erfolgt allerdings wurden erhobene Daten nicht für diese Studie berücksichtigt. Wichtige Aspekte wie ein Rezidiv wurden somit nicht miterfasst. Hier besteht für weitere Forschungsprojekte großes Potential, inwieweit die Rezidivrate abhängig ist von der Ausprägung einer inflammatorischen Reaktion. Auch könnte hier Aufschluss gewonnen werden, ob eine gesteigerte Immunzellinfiltration ein Initiator oder eher eine Reaktion auf eine Größenzunahme darstellt. Auch innerhalb der Erhebung der klinischen Daten wurde ausschließlich auf bestehende Dokumentationssysteme zurückgegriffen. Somit wurde der operative Resektionstermin mit dem Diagnosealter gleichgestellt. Bei einigen Patienten war allerdings die Diagnose sicherlich schon mehrere Jahre bekannt und man hatte sich vorerst auf den Therapieansatz des „wait and scan“ geeinigt. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um eine chirurgische Kohorte handelt, sowie eine Vielzahl der hier erfassten Tumore auf Grund des hohen Bekanntheitsgrades, des neurochirurgischen Departments der Universitätsklinik Tübingen, Teil dieser Studie wurden. Daher

sind in dieser Kohorte sicherlich höhere Zahlen an größeren Tumoren zu verzeichnen. Kleinere Tumore werden häufig bestrahlt. Ein weiterer Faktor ist die Menge des beurteilten Gewebes. Unter dem Gesichtspunkt, dass Vestibularisschwannome in aller Regel sehr homogene Tumore sind und die Wahl der Stanzprobeentnahmen durch mehrere Instanzen geprüft wurden, ist die Menge des Gewebes dennoch sehr gering. Bei mehreren Übersichtsarbeiten konnte man allerdings feststellen, dass nahezu alle Tumoreigenschaften (80% - 100%) durch die Entnahmen von zwei bis drei Stanzproben (je 1mm Durchmesser) erfasst werden können (Camp, Charette, and Rimm 2000; Hedvat et al. 2002; Horn et al. 2005). Ebenfalls muss die Wahl der Scores vor allem von den TAMs kritisch hinterfragt werden. Es wurde ein möglichst repräsentativer Score gewählt, welcher der biologischen Beurteilung am ehesten entspricht.

4.6 Schlussfolgerung

In dieser Studie konnten an der bisher größten erfassten Kohorte von Vestibularisschwannomen viele Erkenntnisse, in Bezug auf die Immunzellinfiltration im Tumorgewebe, gewonnen werden. Zusätzlich konnten einige Ergebnisse, welche schon aus kleineren Kohorten bekannt waren, bestätigt werden. Unter der Erfassung von klinischen Daten konnten bei allen untersuchten immunhistochemischen Markern (CD163, CD68, CD3 und CD8) eine deutliche Zunahme bei einer erhöhten Hannover Klassifikation (T3 und T4) nachgewiesen werden. Eine ähnliche Korrelation wurde auch bei PatientInnen mit einem höheren Diagnosealter ermittelt. Auf Grund dieser Erkenntnis ergeben sich hierfür vor allem für Große Tumore bei älteren Patienten gute Optionen für weitere therapeutische Ansätze. Ebenfalls konnte der Zusammenhang zwischen einer höheren Inflammation und einer damit steigenden MIB1 Ausprägung festgehalten werden. Bei den NF2 Tumoren hingegen konnte klar die bisherigen Erkenntnisse der Literatur in Bezug auf eine gesteigerte Immunzellinfiltration widerlegt werden. So scheint hier ein anderer Mechanismus bezüglich des Tumorwachstums und der Rezidivrate im Vordergrund zu stehen.

Die gewonnenen Kenntnisse im Zusammenspiel der Immuncheckpoint-Signalwege (PD-L1 und CTLA4) haben in dieser Studie aufgezeigt, dass es eher keinen Zusammenhang zu der Immunzellinfiltration gibt. Allerdings lohnt es sich diese Wege nochmals unter anderen Aspekten sowie in einer größeren Kohorte zu untersuchen. Unter den gleichen Bedingungen konnte aber eine Assoziation zu SIRP alpha festgestellt werden. Diese Erkenntnis sollte in der Zukunft weiterverfolgt werden, da der CD47-SIRP α Signalweg, neben den Immuncheckpoints, ein weiterer vielversprechender Ansatzpunkt für gezielte Therapiekonzepte darstellt.

5 Zusammenfassung

Vestibularisschwannome stellen 8% der intrakraniell wachsenden Tumore dar und sind im Kleinhirnbrückenwinkel lokalisiert. Es handelt sich um benigne und langsam wachsende Tumore deren Ursprung in den Schwannzellen des N. vestibularis liegt. In den meisten Fällen treten sie sporadisch-unilateral auf. Ein geringer Teil ist allerdings mit dem autosomal-dominanten Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 2 assoziiert. Hier treten im Krankheitsverlauf Vestibularisschwannome typischerweise bilateral auf. Das Manifestationsalter sporadischer Tumore liegt meist zwischen der vierten und fünften Lebensdekade und kann durch die MRT – Bildgebung recht zuverlässig diagnostiziert werden. Aus therapeutischer Sicht kann je nach Tumorgroße, Symptomatik, Patientenalter und -konstitution zwischen den Optionen einer „wait and scan“ Strategie, der Mikrochirurgie sowie der Radiochirurgie gewählt werden. Speziell nicht operable, multimorbide PatientInnen und insbesondere PatientInnen mit NF2 würden von neuen und alternativen Behandlungsoptionen profitieren. Gemäß der vorliegenden Literatur stehen diesbezüglich vor allem immuninfiltrative Prozesse, als auch Veränderungen des Immuncheckpoint-Signalwegs im Fokus.

Daher wurde in dieser Arbeit die Expression von Immunzellinfiltraten und Immuncheckpoint-Markern in einer großen Kohorte von Vestibularisschwannomen untersucht. Insgesamt wurden 1272 Vestibularisschwannome in Tissue Microarrays zusammengefasst. Im weiteren Verlauf wurden diese, mit den Tumor assoziierten Makrophagen Markern (CD163 und CD68) und den Tumor infiltrierenden Lymphozyten Markern (CD3 und CD8), versehen. Die Bewertung erfolgte anhand der Färbeintensität sowie der Quantität der angefärbten Tumorzellen. Teils wurden hierfür semiquantitative Scores genutzt (TAMs), in den anderen Fällen (CD3 und CD8) erfolgte eine genaue Zählung der positiv gefärbten Zellen. Somit konnte für jeden immunhistochemischen Marker eine Ausprägung innerhalb der Vestibularisschwannome erfasst werden. In der Kombination von mehreren klinischen Parametern erfolgte die statistische Auswertung. Alle vier

ausgewählten Marker konnten erfolgreich detektiert und in ihrer unterschiedlichen Expression beurteilt werden. Somit konnte ein klarer Zusammenhang zwischen der Tumorgroße und einer erhöhten Expression von TAMs als auch von TILs aufgezeigt werden. Zusätzlich weisen ältere PatientInnen ebenfalls eine höhere inflammatorische Ausprägung auf. Eine weitere Assoziation konnte zu dem Proliferationsindex MIB1 aufgezeigt werden. Tumore mit einer hohen Inflammatorischen Zellzahl weisen ebenfalls einen erhöhten MIB1 Score auf. Gleichzeitig konnte allerdings bei der Kohorte von Neurofibromatose Typ 2 PatientInnen jeweils eine geringere Expression von Immunzellinfiltrationen zu dem restlichen Kollektiv festgestellt werden.

Ein weiterer Ausblick konnte durch die nochmals separierte Kohorte von hoch und niedrig exprimierenden Inflammatorischen Fällen (n = 20) geliefert werden. Diese wurden im Flächenschnitt mit den Immuncheckpoints CTLA4 und PD-L1, sowie mit CD47 und SIRP alpha versehen. Dabei konnten keine genaueren Erkenntnisse im Bezug auf die Immuncheckpoints gewonnen werden. Einen eindeutigen Zusammenhang zu Tumoren mit einer ausgeprägten Immunzellinfiltration war nicht erkenntlich. Hier könnte in der Zukunft eine etwas größere Kohorte eventuell mehr Aufschluss liefern. Bei der SIRP alpha Expression ist jedoch ein Zusammenhang mit der Gruppe der hoch exprimierenden Fällen angedeutet gewesen.

Ob diese Ergebnisse nun eine Option für neue Behandlungsansätze darstellen ist noch fraglich. Zumal nicht alle Zusammenhänge zwischen den Expressionsunterschieden verstanden sind. Diese Unklarheiten bieten und erfordern weiteren Forschungsbedarf. Letztendlich stellt diese Arbeit aber eine breite Basis für weitere neue Ansätze dar.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, Masato, Tsukasa Kawase, Makoto Urano, Yoshikazu Mizoguchi, Makoto Kuroda, Masao Kasahara, Hiromi Suzuki, and Tetsuo Kanno. 2000. 'Analyses of proliferative potential in schwannomas', *Brain tumor pathology*, 17: 35-40.
- Adams, Susan, Luc JW van der Laan, Elizabeth Vernon-Wilson, Chantal Renardel de Lavalette, Ed A Döpp, Christine D Dijkstra, David L Simmons, and Timo K van den Berg. 1998. 'Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells', *The Journal of Immunology*, 161: 1853-59.
- Alegre, Maria-Luisa, Kenneth A Frauwirth, and Craig B Thompson. 2001. 'T-cell regulation by CD28 and CTLA-4', *Nature Reviews Immunology*, 1: 220-28.
- Amano, Midori, Michihiro Kohno, Osamu Nagata, Makoto Taniguchi, Shigeo Sora, and Hiroaki Sato. 2011. 'Intraoperative continuous monitoring of evoked facial nerve electromyograms in acoustic neuroma surgery', *Acta neurochirurgica*, 153: 1059-67.
- Andersen, Mads Hald, Rikke Bæk Sørensen, Marie K Brimnes, Inge Marie Svane, Jürgen C Becker, and Per thor Straten. 2009. 'Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8+ T cells in cancer patients', *The Journal of clinical investigation*, 119: 2245-56.
- Anderson, Timothy D, Laurie A Loevner, Douglas C Bigelow, and Natasha Mirza. 2000. 'Prevalence of unsuspected acoustic neuroma found by magnetic resonance imaging', *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 122: 643-46.
- Archibald, David J, Brian A Neff, Stephen G Voss, Patrick L Splinter, Colin LW Driscoll, Michael J Link, Haidong Dong, and Eugene D Kwon. 2010. 'B7-H1 expression in vestibular schwannomas', *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 31: 991.
- Arneth, Borros. 2020. 'Tumor Microenvironment', *Medicina*, 56: 15.
- Asthagiri, Ashok R, Dilys M Parry, John A Butman, H Jeffrey Kim, Ekaterini T Tsilou, Zhengping Zhuang, and Russell R Lonser. 2009. 'Neurofibromatosis type 2', *The Lancet*, 373: 1974-86.
- Barclay, A Neil. 2009. 'Signal regulatory protein alpha (SIRPα)/CD47 interaction and function', *Current opinion in immunology*, 21: 47-52.
- Barclay, A Neil, and Timo K Van den Berg. 2014. 'The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPα) and CD47: structure, function, and therapeutic target', *Annual review of immunology*, 32: 25-50.
- Barnett, Gene H, Mark E Linskey, John R Adler, Jeffrey W Cozzens, William A Friedman, M Peter Heilbrun, L Dade Lunsford, Michael Schulder, and Andrew E Sloan. 2007. 'Stereotactic radiosurgery—an organized neurosurgery-sanctioned definition', *Journal of neurosurgery*, 106: 1-5.

- Baser, ME, JM Friedman, AJ Wallace, RT Ramsden, H Joe, and DGR Evans. 2002. 'Evaluation of clinical diagnostic criteria for neurofibromatosis 2', *Neurology*, 59: 1759-65.
- Beham, Alfred, and Regine Schneider-Stock. 2009. 'Neural differenzierte/neuroektodermale Tumoren.' in, *Pathologie* (Springer).
- Behling, F., V. Ries, M. Skardelly, I. Gepfner-Tuma, M. Schuhmann, F. H. Ebner, G. Tabatabai, A. Bornemann, J. Schittenhelm, and M. Tatagiba. 2019a. 'COX2 expression is associated with proliferation and tumor extension in vestibular schwannoma but is not influenced by acetylsalicylic acid intake', *Acta Neuropathol Commun*, 7: 105.
- Behling, Felix, Vanessa Ries, Marco Skardelly, Irina Gepfner-Tuma, Martin Schuhmann, Florian-Heinrich Ebner, Ghazaleh Tabatabai, Antje Bornemann, Jens Schittenhelm, and Marcos Tatagiba. 2019b. 'COX2 expression is associated with proliferation and tumor extension in vestibular schwannoma but is not influenced by acetylsalicylic acid intake', *Acta Neuropathologica Communications*, 7: 1-10.
- Behling, Felix, and Jens Schittenhelm. 2018. 'Tissue microarrays—translational biomarker research in the fast lane', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18: 833-35.
- Behrbohm, Hans, Oliver Kaschke, and Tadeus Nawka. 2012. *Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde* (Georg Thieme Verlag).
- Bellanti, Joseph. 2013. *Immunology* (Springer Science & Business Media).
- Betchen, Simone A, Jane Walsh, and Kalmon D Post. 2005. 'Long-term hearing preservation after surgery for vestibular schwannoma', *Journal of neurosurgery*, 102: 6-9.
- Bi, Wenya Linda, Saksham Gupta, Yu Mei, Sally Al Abdulmohsen, Alexandra Giantini Larsen, Prashin Unadkat, Shakti Ramkissoon, Malak Abedalthagafi, and Ian F. Dunn. 2020. 'Immunophenotype of Vestibular Schwannomas', *Otology & neurotology*, 41: e1290-e96.
- Bi, Wenya Linda, Saksham Gupta, Yu Mei, Sally Al Abdulmohsen, Alexandra Giantini Larsen, Prashin Unadkat, Shakti Ramkissoon, Malak Abedalthagafi, and Ian F Dunn. 2020. 'Immunophenotype of vestibular Schwannomas', *Otology & neurotology*, 41: e1290-e96.
- Brodhun, M, V Stahn, and A Harder. 2017. 'Pathogenese und Molekularpathologie des Vestibularisschwannoms', *Hno*, 65: 362-72.
- Brown, Eric J, and William A Frazier. 2001. 'Integrin-associated protein (CD47) and its ligands', *Trends in cell biology*, 11: 130-35.
- Bubendorf, Lukas, Antonio Nocito, Holger Moch, and Guido Sauter. 2001. 'Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies', *The Journal of pathology*, 195: 72-79.
- Cafer, S, I Bayramoglu, N Uzum, M Yilmaz, L Memis, and KADİR Uygur. 2008. 'Expression and clinical significance of Ki-67, oestrogen and progesterone receptors in acoustic neuroma', *The Journal of Laryngology & Otology*, 122: 125-27.
- Call, Matthew E, Jason Pyrdol, Martin Wiedmann, and Kai W Wucherpfennig. 2002. 'The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex', *Cell*, 111: 967-79.

- Camp, Robert L, Lori A Charette, and David L Rimm. 2000. 'Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma', *Laboratory investigation*, 80: 1943-49.
- CATENA, P. PARASACCHI, D. CONTI, A. SGURA, G. TRENTA, E. RIGHI, MM TRINCI, and C M. TRINCI. 1997. 'Peripheral blood lymphocyte decrease and micronucleus yields during radiotherapy', *International journal of radiation biology*, 72: 575-85.
- Charabi, Mirko Tos, Jens Thomsen, Jørgen Rygaard, Petra Fundova, Birgitte Charabi, Samih. 2000. 'Cystic vestibular schwannoma-clinical and experimental studies', *Acta oto-laryngologica*, 120: 11-13.
- Chen, Daniel S, and Ira Mellman. 2017. 'Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point', *Nature*, 541: 321-30.
- Chen, Yan, Christine Miller, Rebecca Mosher, Xumei Zhao, Jim Deeds, Mike Morrissey, Barb Bryant, David Yang, Ron Meyer, and Frank Cronin. 2003. 'Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays', *Cancer research*, 63: 1927-35.
- Chetty, Runjan, and Kevin Gatter. 1994. 'CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice', *The Journal of pathology*, 173: 303-07.
- Chistiakov, Dimitry A, Murry C Killingsworth, Veronika A Myasoedova, Alexander N Orekhov, and Yuri V Bobryshev. 2017. 'CD68/macrosialin: not just a histochemical marker', *Laboratory investigation*, 97: 4-13.
- Clark, WH. 1991. 'Tumour progression and the nature of cancer', *British journal of cancer*, 64: 631-44.
- Clevers, Hans, Balbino Alarcon, Thomas Wileman, and Cox Terhorst. 1988. 'The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble', *Annual review of immunology*, 6: 629-62.
- Cohen, Ezra EW, Denis Soulières, Christophe Le Tourneau, José Dinis, Lisa Licitra, Myung-Ju Ahn, Ainara Soria, Jean-Pascal Machiels, Nicolas Mach, and Ranee Mehra. 2019. 'Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study', *The Lancet*, 393: 156-67.
- Coussens, Lisa M, and Zena Werb. 2002. 'Inflammation and cancer', *Nature*, 420: 860-67.
- de Vries, Maurits, Inge Briaire-de Bruijn, Martijn JA Malessy, Sica FT de Bruïne, Andel GL van der Mey, and Pancras CW Hogendoorn. 2013. 'Tumor-associated macrophages are related to volumetric growth of vestibular schwannomas', *Otology & neurotology*, 34: 347-52.
- de Vries, Maurits, Pancras CW Hogendoorn, Inge Briaire-de Bruyn, Martijn JA Malessy, and Andel GL van der Mey. 2012. 'Intratympanic hemorrhage, vessel density, and the inflammatory reaction contribute to volume increase of sporadic vestibular schwannomas', *Virchows Archiv*, 460: 629-36.
- De Vries, WM, IH Briaire-de Bruijn, PPG Van Benthem, AGL Van Der Mey, and PCW Hogendoorn. 2019. 'M-CSF and IL-34 expression as indicators for growth in sporadic vestibular schwannoma', *Virchows Archiv*, 474: 375-81.

- Deshpande, Ravindra Pramod, YBVK Chandra Sekhar, Manas Panigrahi, and Phanithi Prakash Babu. 2017. 'SIRP alpha protein downregulates in human astrocytoma: presumptive involvement of Hsa-miR-520d-5p and Hsa-miR-520d-3p', *Molecular Neurobiology*, 54: 8162-69.
- Ebner, FH, and M Tatagiba. 2019a. 'Update on diagnostics and microsurgical treatment of vestibular schwannoma', *Der Nervenarzt*, 90: 578-86.
- . 2019b. 'Vestibularissschwannome—ein Update zu Krankheitsbild und mikrochirurgischer Behandlung', *Der Nervenarzt*, 90: 578-86.
- El Bakkouri, Wissame, Romain E Kania, Jean-Pierre Guichard, Guillaume Lot, Philippe Herman, and Patrice Tran Ba Huy. 2009. 'Conservative management of 386 cases of unilateral vestibular schwannoma: tumor growth and consequences for treatment', *Journal of neurosurgery*, 110: 662-69.
- Ethikkommission, Zentralen. 2003. 'Die (Weiter-)Verwendung von menschlichen Körpermaterialien für Zwecke medizinischer Forschung'. https://www.zentrale-ethikkommission.de/fileadmin/user_upload/_old-files/downloads/pdf-Ordner/Zeko/Koerpermat-1.pdf.
- Evans, D Gareth R. 2009a. 'Neurofibromatosis 2 [Bilateral acoustic neurofibromatosis, central neurofibromatosis, NF2, neurofibromatosis type II]', *Genetics in medicine*, 11: 599-610.
- Evans, D Gareth R, SM Huson, D Donnai, W Neary, Val Blair, V Newton, and R Harris. 1992a. 'A clinical study of type 2 neurofibromatosis', *QJM: An International Journal of Medicine*, 84: 603-18.
- Evans, D Gareth R, Anthony Moran, Andrew King, S Saeed, Nihal Gurusinghe, and Richard Ramsden. 2005. 'Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: higher incidence than previously thought', *Otology & neurotology*, 26: 93-97.
- Evans, DGareth R. 2009b. 'Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review', *Orphanet journal of rare diseases*, 4: 1-11.
- EVANS, DGR, SM HUSON, D DONNAI, W NEARY, V BLAIR, V NEWTON, and R HARRIS. 1992b. 'A Clinical Study of Type 2 Neurofibromatosis', *QJM: An International Journal of Medicine*, 84: 603-18.
- Fabrick, Babs O, Christine D Dijkstra, and Timo K van den Berg. 2005. 'The macrophage scavenger receptor CD163', *Immunobiology*, 210: 153-60.
- Falcioni, Maurizio, JJ Mulder, Abdelkader Taibah, Giuseppe De Donato, and Mario Sanna. 1999. 'No cerebrospinal fluid leaks in translabyrinthine vestibular schwannoma removal: reappraisal of 200 consecutive patients', *The American journal of otology*, 20: 660-66.
- Ferenbach, D, and J Hughes. 2008. 'Macrophages and dendritic cells: what is the difference?', *Kidney international*, 74: 5-7.
- Fucci, Michael J, Craig A Buchman, Derald E Brackmann, and Karen I Berliner. 1999. 'Acoustic tumor growth: implications for treatment choices', *Otology & neurotology*, 20: 495-99.
- Gal, Thomas J, Jennifer Shinn, and Bin Huang. 2010. 'Current epidemiology and management trends in acoustic neuroma', *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 142: 677-81.

- Galon, J, MC Dieu-Nosjean, E Tartour, C Sautes-Fridman, and WH Fridman. 2010. 'Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored', *Oncogene*, 29: 1093-102.
- Galon, Jérôme, Anne Costes, Fatima Sanchez-Cabo, Amos Kirilovsky, Bernhard Mlecnik, Christine Lagorce-Pagès, Marie Tosolini, Matthieu Camus, Anne Berger, and Philippe Wind. 2006. 'Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome', *Science*, 313: 1960-64.
- Gardner, Gale, and Jon H. Robertson. 1988. 'Hearing Preservation in Unilateral Acoustic Neuroma Surgery', *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*, 97: 55-66.
- Gautam, PK, and A Acharya. 2014. 'Suppressed Expression of Homotypic Multinucleation, Extracellular Domains of CD 172 α (SIRP- α) and CD 47 (IAP) Receptors in TAM s UpRegulated by Hsp70–Peptide Complex in Dalton's Lymphoma', *Scandinavian journal of immunology*, 80: 22-35.
- Goldbrunner, Roland, Michael Weller, Jean Regis, Morten Lund-Johansen, Pantelis Stavrinou, David Reuss, D Gareth Evans, Florence Lefranc, Kita Sallabanda, and Andrea Falini. 2020. 'EANO guideline on the diagnosis and treatment of vestibular schwannoma', *Neuro-oncology*, 22: 31-45.
- Gonçalves, Vítor Moura, Elisa-Maria Suhm, Vanessa Ries, Marco Skardelly, Ghazaleh Tabatabai, Marcos Tatagiba, Jens Schittenhelm, and Felix Behling. 2021. 'Macrophage and lymphocyte infiltration is associated with volumetric tumor size but not with volumetric growth in the Tübingen schwannoma cohort', *Cancers*, 13: 466.
- Greaves, David R, and Siamon Gordon. 2002. 'Macrophage-specific gene expression: current paradigms and future challenges', *International journal of hematology*, 76: 6-15.
- Hadrup, Sine, and Marco Donia. 2013. 'Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment', *Cancer Microenvironment*, 6: 123-33.
- Hamm, K, H-U Herold, G Surber, and S Rosahl. 2017. 'Radiochirurgie und fraktionierte stereotaktische Radiotherapie des Vestibularisschwannoms', *Hno*, 65: 434-42.
- Han, Yanyan, Dandan Liu, and Lianhong Li. 2020. 'PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer', *American journal of cancer research*, 10: 727.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hannan, Cathal John, Daniel Lewis, Claire O'leary, Carmine A Donofrio, Dafydd Gareth Evans, Federico Roncaroli, David Brough, Andrew Thomas King, David Coope, and Omar Nathan Pathmanaban. 2020. 'The inflammatory microenvironment in vestibular schwannoma', *Neuro-Oncology Advances*, 2: vdaa023.
- Hao, Wu, Zhang Liwei, Han Dongyi, Mao Ying, Yang Jun, Wang Zhaoyan, Jia Wang, Zhong Ping, and Jia Huan. 2016. 'Summary and consensus in 7th International Conference on acoustic neuroma: An update for the management of sporadic acoustic neuromas', *World journal of otorhinolaryngology-head and neck surgery*.

- Harper, CM, SG Harner, DH Slavitt, WJ Litchy, JR Daube, CW Beatty, and MJ Ebersold. 1992. 'Effect of BAEP monitoring on hearing preservation during acoustic neuroma resection', *Neurology*, 42: 1551-51.
- Hassepass, F, SB Bulla, A Aschendorff, and W Maier. 2012. 'Vestibularisschwannom', *Hno*, 60: 837-46.
- Hedvat, Cyrus V, Abhijith Hegde, Raju SK Chaganti, Beiyun Chen, Jing Qin, Daniel A Filippa, Stephen D Nimer, and Julie Teruya-Feldstein. 2002. 'Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma', *Human pathology*, 33: 968-74.
- Helbing, Dario-Lucas, Alexander Schulz, and Helen Morrison. 2020. 'Pathomechanisms in schwannoma development and progression', *Oncogene*, 39: 5421-29.
- Herr, Harry W, and Alvaro Morales. 2008. 'History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story', *The Journal of urology*, 179: 53-56.
- Hidalgo, A, P Pina, G Guerrero, M Lazos, and M Salcedo. 2003. 'A simple method for the construction of small format tissue arrays', *Journal of clinical pathology*, 56: 144-46.
- Hofmann, E, and L Choné. 2011. 'Imaging of acoustic neuroma (vestibular schwannoma). Breakthrough or dilemma?', *Hno*, 59: 9-15.
- Holness, Claire L, and David L Simmons. 1993. 'Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins'.
- Horn, L-C, S Faber, J Einenkel, CB Gilks, CE Richter, H Stepan, S Purz, C Krumpe, and C Leo. 2005. 'Der Einsatz von Tissue Microarrays (TMA)-eine neue Technik in der gynäkologischen Tumorforschung', *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 65: 23-29.
- Hörner, C, A Bouchon, A Bierhaus, PP Nawroth, E Martin, HJ Bardenheuer, and MA Weigand. 2004. 'Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis', *Der Anaesthetist*, 53: 10-28.
- House, WE. 1985. 'Facial nerve grading system', *Otolaryngol Head Neck Surg*, 93: 184-93.
- Howitz, Michael F, Christoffer Johansen, Mirko Tos, Samih Charabi, and Jørgen H Olsen. 2000. 'Incidence of vestibular schwannoma in Denmark, 1977–1995', *Otology & neurotology*, 21: 690-94.
- Ian A. Cree, Dilani Lokuhetty, Laura A.N. Peferoen, Valerie A. White. 2021. *Central Nervous System Tumours: Who Classification of Tumours (IARC)*.
- Jäättelä, Marja. 1999. 'Heat shock proteins as cellular lifeguards', *Annals of medicine*, 31: 261-71.
- Jackson, Lance E, and Joseph B Roberson Jr. 2000. 'Acoustic neuroma surgery: use of cochlear nerve action potential monitoring for hearing preservation', *Otology & neurotology*, 21: 249-59.
- Jacob, Abraham, Tina X Lee, Brian A Neff, Shyra Miller, Bradley Welling, and Long-Sheng Chang. 2008. 'Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation in human vestibular schwannoma', *Otology & neurotology*, 29: 58-68.

- Jaiswal, Siddhartha, Mark P Chao, Ravindra Majeti, and Irving L Weissman. 2010. 'Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance', *Trends in immunology*, 31: 212-19.
- Janeway Jr, Charles A. 1992. 'The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation', *Annual review of immunology*, 10: 645-74.
- Jeong, Hasong, Ilseon Hwang, Sun Hee Kang, Hyeong Chan Shin, and Sun Young Kwon. 2019. 'Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer', *Journal of breast cancer*, 22: 38-51.
- Kameyama, S, R Tanaka, Y Honda, A Hasegawa, H Yamazaki, and T Kawaguchi. 1994. 'The long-term growth rate of residual acoustic neurinomas', *Acta neurochirurgica*, 129: 127-30.
- Kaschke, Oliver. 2017. 'Diagnostik und Behandlung des Vestibularisschwannoms', *HNO Nachrichten*, 47: 34-42.
- Kovaleva, Olga V, Daria V Samoiloa, Maria S Shitova, and Alexei Gratchev. 2016. 'Tumor associated macrophages in kidney cancer', *Analytical Cellular Pathology*, 2016.
- Krijgsman, Daniëlle, Natasja L De Vries, Morten N Andersen, Anni Skovbo, Rob AEM Tollenaar, Holger J Møller, Marianne Hokland, and Peter JK Kuppen. 2020. 'CD163 as a biomarker in colorectal cancer: The expression on circulating monocytes and tumor-associated macrophages, and the soluble form in the blood', *International journal of molecular sciences*, 21: 5925.
- Kristiansen, Mette, Jonas H Graversen, Christian Jacobsen, Ole Sonne, Hans-Jürgen Hoffman, SK Law, and Søren K Moestrup. 2001. 'Identification of the haemoglobin scavenger receptor', *Nature*, 409: 198-201.
- Kythreotou, A., A. Siddique, F. A. Mauri, M. Bower, and D. J. Pinato. 2018. 'PD-L1', *J Clin Pathol*, 71: 189-94.
- Labit-Bouvier, C, B Crebassa, C Bouvier, L Andrac-Meyer, J Magnan, and C Charpin. 2000. 'Clinicopathologic growth factors in vestibular schwannomas: a morphological and immunohistochemical study of 69 tumours', *Acta oto-laryngologica*, 120: 950-54.
- Lesser, THJ, RC Janzer, P Kleihues, and U Fisch. 1991. 'Clinical growth rate of acoustic schwannomas: correlation with the growth fraction as defined by the monoclonal antibody Ki-67', *Skull base surgery*, 1: 11-15.
- Lewis, Daniel, Federico Roncaroli, Erjon Agushi, Dominic Mosses, Ricky Williams, Ka-loh Li, Xiaoping Zhu, Rainer Hinz, Ross Atkinson, and Andrea Wadeson. 2019. 'Inflammation and vascular permeability correlate with growth in sporadic vestibular schwannoma', *Neuro-oncology*, 21: 314-25.
- Littman, Dan R. 1987. 'The structure of the CD4 and CD8 genes', *Annual review of immunology*, 5: 561-84.
- Lu, Victor M, Krishnan Ravindran, Christopher S Graffeo, Avital Perry, Jamie J Van Gompel, David J Daniels, and Michael J Link. 2019. 'Efficacy and safety of bevacizumab for vestibular schwannoma in neurofibromatosis type 2: a systematic review and meta-analysis of treatment outcomes', *Journal of neuro-oncology*, 144: 239-48.

- Matthies, Cordula, and Madjid Samii. 1997. 'Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): clinical presentation', *Neurosurgery*, 40: 1-10.
- Mazur, G, A Haloń, T Wróbel, and K Kuliczowski. 2004. 'Macrophage/histiocytic antigen CD68 expression in neoplastic and reactive lymph nodes', *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*, 49: 73-75.
- Mellman, Ira, George Coukos, and Glenn Dranoff. 2011. 'Cancer immunotherapy comes of age', *Nature*, 480: 480-89.
- Minovi, A, R Mangold, M Kollert, E Hofmann, W Draf, and U Bockmühl. 2005. 'Functional results, cognitive and effective quality of life disturbances after trans-temporal resection of acoustic neuroma', *Laryngo-Rhino-Otologie*, 84: 915-20.
- Mogensen, Trine H. 2009. 'Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses', *Clinical Microbiology Reviews*, 22: 240-73.
- Müller-Esterl, Werner. 2018. 'Angeborenes und erworbenes Immunsystem.' in, *Biochemie* (Springer).
- Murata, Yoji, Yasuyuki Saito, Takenori Kotani, and Takashi Matozaki. 2018. 'CD 47-signal regulatory protein α signaling system and its application to cancer immunotherapy', *Cancer Science*, 109: 2349-57.
- Murphy, Erin S, and John H Suh. 2011. 'Radiotherapy for vestibular schwannomas: a critical review', *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 79: 985-97.
- Nager, George T. 1969. 'Acoustic neurinomas: Pathology and differential diagnosis', *Archives of Otolaryngology*, 89: 252-79.
- Nakano, Osamu, Makoto Sato, Yoshitaka Naito, Kenichi Suzuki, Seiichi Orikasa, Masataka Aizawa, Yasuyoshi Suzuki, Ichirou Shintaku, Hiroshi Nagura, and Haruo Ohtani. 2001. 'Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity', *Cancer research*, 61: 5132-36.
- Neff, Brian A, Jonathan Ting, Stephanie L Dickinson, and D Bradley Welling. 2005. 'Facial nerve monitoring parameters as a predictor of postoperative facial nerve outcomes after vestibular schwannoma resection', *Otology & neurotology*, 26: 728-32.
- Neff, Brian A, D Bradley Welling, Elena Akhmametyeva, and Long-Sheng Chang. 2006. 'The molecular biology of vestibular schwannomas: dissecting the pathogenic process at the molecular level', *Otology & neurotology*, 27: 197-208.
- Nickl, Vera, David Ziebolz, Charlotte Rumpel, Dennis Klein, Robert Nickl, Eva Rampeltshammer, Camelia M Monoranu, Ralf-Ingo Ernestus, Cordula Matthies, and Mario Löhr. 2024. 'Analysis of tumor microenvironment composition in vestibular schwannomas: insights into NF2-associated and sporadic variations and their clinical correlations', *Frontiers in Oncology*, 14: 1340184.
- Niemczyk, Kazimierz, Francois Michel Vaneecloo, Martine Houcke Lecomte, Jean Paul Lejeune, Laurent Lemaitre, Henryk Skarzynski, Christophe Vincent, and Frederique Dubrulle. 2000. 'Correlation between Ki-67 index

- and some clinical aspects of acoustic neuromas (vestibular schwannomas)', *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 123: 779-83.
- Obersteiner, H. 1895. 'Bemerkungen zur tabischen Hinterwurzelkrankung', *Arb. neur. Inst Wien*, 3: 192-209.
- Ohta, Akio, Elieser Gorelik, Simon J Prasad, Franca Ronchese, Dmitriy Lukashev, Michael KK Wong, Xiaojun Huang, Sheila Caldwell, Kebin Liu, and Patrick Smith. 2006. 'A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 13132-37.
- Ohta, S, T Yokoyama, S Nishizawa, and K Uemura. 1998. 'Regrowth of the residual tumour after acoustic neurinoma surgery', *British journal of neurosurgery*, 12: 419-22.
- Oldenborg, Per-Arne, Alex Zheleznyak, Yi-Fu Fang, Carl F Lagenaur, Hattie D Gresham, and Frederik P Lindberg. 2000. 'Role of CD47 as a marker of self on red blood cells', *Science*, 288: 2051-54.
- Onyshchenko, Mykola. 2018. 'The puzzle of predicting response to immune checkpoint blockade', *EBioMedicine*, 33: 18-19.
- Ostrom, Quinn T, Gino Cioffi, Kristin Waite, Carol Kruchko, and Jill S Barnholtz-Sloan. 2021. 'CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014–2018', *Neuro-oncology*, 23: iii1-iii105.
- Pardoll, Drew M. 2012. 'The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 12: 252-64.
- Park, John K, PM Black, DM Vernick, and N Ramakrishna. 2012. 'Vestibular schwannoma (acoustic neuroma)', *UpTo-Date. Available on: <http://www.uptodate.com/contents/vestibular-schwannoma-acousticneuroma>*: 1-32.
- Parsa, Andrew T, James S Waldron, Amith Panner, Courtney A Crane, Ian F Parney, Jeffrey J Barry, Kristine E Cachola, Joseph C Murray, Tarik Tihan, and Michael C Jensen. 2007. 'Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma', *Nature medicine*, 13: 84-88.
- Passiglia, Francesco, Giuseppe Bronte, Viviana Bazan, Clara Natoli, Sergio Rizzo, Antonio Galvano, Angela Listi, Giuseppe Cicero, Christian Rolfo, and Daniele Santini. 2016. 'PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis', *Oncotarget*, 7: 19738.
- Perry, Avital, Christopher S Graffeo, Lucas P Carlstrom, Aditya Raghunathan, Colin LW Driscoll, Brian A Neff, Matthew L Carlson, Ian F Parney, Michael J Link, and Jamie J Van Gompel. 2019. 'Predominance of M1 subtype among tumor-associated macrophages in phenotypically aggressive sporadic vestibular schwannoma', *Journal of neurosurgery*, 133: 1637-45.
- Probst, R. 1999. 'Vestibularschwannom (Akustikusneurinom) Wandel des Krankheitsbildes und der Therapie?', *Hno*, 47: 223-25.
- Renz, H, and B Gierten. 2019. 'CD8.' in, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Springer).
- Roosli, Christof, Fred H Linthicum Jr, Sebahattin Cureoglu, and Saumil N Merchant. 2012. 'What is the site of origin of cochleovestibular schwannomas?', *Audiology and Neurotology*, 17: 121-25.

- Rosahl, S, and D Eßer. 2017. 'Chirurgische Indikation und Komplikationsmanagement beim Vestibularisschwannom', *Hno*, 65: 388-94.
- Rossi, ML, NR Jones, MM Esiri, L Havas, N Nakamura, and HB Coakham. 1990. 'Mononuclear cell infiltrate, HLA-Dr expression and proliferation in 37 acoustic schwannomas', *Histology and histopathology*, 5: 427-32.
- Samii, Madjid, Venelin Gerganov, and Amir Samii. 2006. 'Improved preservation of hearing and facial nerve function in vestibular schwannoma surgery via the retrosigmoid approach in a series of 200 patients', *Journal of neurosurgery*, 105: 527-35.
- Samii, Madjid, and Cordula Matthies. 1997. 'Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): surgical management and results with an emphasis on complications and how to avoid them', *Neurosurgery*, 40: 11-23.
- Sato, Eiichi, Sara H Olson, Jiyoung Ahn, Brian Bundy, Hiroyoshi Nishikawa, Feng Qian, Achim A Jungbluth, Denise Frosina, Sacha Gnjatic, and Christine Ambrosone. 2005. 'Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 18538-43.
- Savardekar, Amey R, Danielle Terrell, Saudamini J Lele, Ryan Diaz, Praneeth Reddy Keesari, Krystle Trosclair, Jennifer Kosty, Chiachien Jake Wang, Gale Gardner, and Bharat Guthikonda. 2021. 'Primary Treatment of Small to Medium (< 3 cm) Sporadic Vestibular Schwannomas: A Systematic Review and Meta-Analysis on Hearing Preservation and Tumor Control Rates for Microsurgery versus Radiosurgery', *World Neurosurgery*.
- Schick, U, and A Unterberg. 2011. 'Akustikusneurinome (Vestibularisschwannome)', *Hno*, 59: 16-21.
- Schildhaus, HU. 2018. 'Predictive value of PD-L1 diagnostics', *Der Pathologe*, 39: 498-519.
- Schütt, Christine, and Barbara Bröker. 2011. *Grundwissen Immunologie* (Springer-Verlag).
- Shiao, Stephen L, and Lisa M Coussens. 2010. 'The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy', *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15: 411-21.
- Smith, Rosemary E, Vanshree Patel, Sandra D Seatter, Maureen R Deehan, Marion H Brown, Gareth P Brooke, Helen S Goodridge, Christopher J Howard, Kevin P Rigley, and William Harnett. 2003. 'A novel MyD-1 (SIRP-1 α) signaling pathway that inhibits LPS-induced TNF α production by monocytes', *Blood*, 102: 2532-40.
- Sobel, Raymond A, and Youbin Wang. 1993. 'Vestibular (acoustic) schwannomas: histologic features in neurofibromatosis 2 and in unilateral cases', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 52: 106-13.
- Strojnik, Tadej, Rajko Kavalari, Irena Zajc, Eleftherios P Diamandis, Katerina Oikonomopoulou, and Tamara T Lah. 2009. 'Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma', *Anticancer research*, 29: 3269-79.

- Stumpf, DA. 1988. 'Neurofibromatosis. Conference statement, National Institute of Health development conference', *Arch Neurol*, 45: 575-78.
- Sughrue, Michael E, Isaac Yang, Derick Aranda, Martin J Rutkowski, Shanna Fang, Steven W Cheung, and Andrew T Parsa. 2011. 'Beyond audiofacial morbidity after vestibular schwannoma surgery', *Journal of neurosurgery*, 114: 367-74.
- Swartz, Joel D. 2004. "Lesions of the cerebellopontine angle and internal auditory canal: diagnosis and differential diagnosis." In *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 332-52. Elsevier.
- Tallan, Eric M, Stephen G Harner, Charles W Beatty, BW Scheithauer, and JE Parisi. 1993. 'Does the distribution of Schwann cells correlate with the observed occurrence of acoustic neuromas?', *The American journal of otology*, 14: 131-34.
- Tamura, Ryota, Yukina Morimoto, Mizuto Sato, Yuki Kuranari, Yumiko Oishi, Kenzo Kosugi, Kazunari Yoshida, and Masahiro Toda. 2020. 'Difference in the hypoxic immunosuppressive microenvironment of patients with neurofibromatosis type 2 schwannomas and sporadic schwannomas', *Journal of neuro-oncology*, 146: 265-73.
- Tan, Marietta, Oluwaseun A Myrie, Frank R Lin, John K Niparko, Lloyd B Minor, Rafael J Tamargo, and Howard W Francis. 2010. 'Trends in the management of vestibular schwannomas at Johns Hopkins 1997–2007', *The Laryngoscope*, 120: 144-49.
- Tan, Melin, and Peak Woo. 2010. 'Injection laryngoplasty with micronized dermis: a 10-year experience with 381 injections in 344 patients', *The Laryngoscope*, 120: 2460-66.
- Tardito, Samuele, Giulia Martinelli, Stefano Soldano, Sabrina Paolino, Greta Pacini, Massimo Patane, Elisa Alessandri, Vanessa Smith, and Maurizio Cutolo. 2019. 'Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: a systematic review', *Autoimmunity reviews*, 18: 102397.
- Tzankov, Alexandar, Matthias S Matter, and Stephan Dirnhofer. 2010. 'Refined prognostic role of CD68-positive tumor macrophages in the context of the cellular microenvironment of classical Hodgkin lymphoma', *Pathobiology*, 77: 301-08.
- Unger, F, K Dominikus, and K Haselsberger. 2011. 'Stereotactic radiosurgery and fractionated stereotactic radiotherapy of acoustic neuromas', *Hno*, 59: 31-37.
- Van, Vu Quang, Marianne Raymond, Nobuyasu Baba, Manuel Rubio, Keiko Wakahara, Santos A Susin, and Marika Sarfati. 2012. 'CD47high expression on CD4 effectors identifies functional long-lived memory T cell progenitors', *The Journal of Immunology*, 188: 4249-55.
- von Helsinki-Ethische, WMA Deklaration. 2013. 'Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen', *Verabschiedet von der*, 18.
- Walunas, Theresa L, Deborah J Lenschow, Christina Y Bakker, Peter S Linsley, Gordon J Freeman, Jonathan M Green, Craig B Thompson, and Jeffrey A Bluestone. 1994. 'CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation', *Immunity*, 1: 405-13.
- Wanderley, Carlos W, David F Colon, Joao Paulo M Luiz, Francisco F Oliveira, Paula R Viacava, Caio A Leite, Janaina A Pereira, Camila M Silva,

- Cassia R Silva, and Rangel L Silva. 2018. 'Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent MannerPaclitaxel Drives TAMs to an M1 Profile', *Cancer research*, 78: 5891-900.
- Wandong, Su, Liu Meng, Li Xingang, Liu Yuguang, Zhu Shugan, Wang Lei, and Wu Chengyuan. 2005. 'Cystic acoustic neuroma', *Journal of clinical neuroscience*, 12: 253-55.
- Wang, Shiyang, Benjamin Liechty, Seema Patel, Jeffrey S Weber, Travis J Hollmann, Matija Snuderl, and Matthias A Karajannis. 2018. 'Programmed death ligand 1 expression and tumor infiltrating lymphocytes in neurofibromatosis type 1 and 2 associated tumors', *Journal of neuro-oncology*, 138: 183-90.
- Welling, D Bradley. 1998. 'Clinical manifestations of mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in vestibular schwannomas (acoustic neuromas)', *The Laryngoscope*, 108: 178-89.
- Wenzel, Ileana, Johannes Roth, and Clemens Sorg. 1996. 'Identification of a novel surface molecule, RM3/1, that contributes to the adhesion of glucocorticoid-induced human monocytes to endothelial cells', *European journal of immunology*, 26: 2758-63.
- Whitehouse, K, M Foroughi, G Shone, and R Hatfield. 2010. 'Vestibular schwannomas—when should conservative management be reconsidered?', *British journal of neurosurgery*, 24: 185-90.
- Wippold, Franz J, M Lubner, RJ Perrin, M Lämmle, and A Perry. 2007. 'Neuropathology for the neuroradiologist: Antoni A and Antoni B tissue patterns', *American Journal of Neuroradiology*, 28: 1633-38.
- Xenellis, John E, and Fred H Linthicum. 2003. "On the myth of the glial/schwann junction (Obersteiner-Redlich zone): origin of vestibular nerve schwannomas." In, 1. LWW.
- Yang, Qiyao, Ningning Guo, Yi Zhou, Jiejian Chen, Qichun Wei, and Min Han. 2020. 'The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy', *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10: 2156-70.
- Youssef, A Samy, and Angela E Downes. 2009. 'Intraoperative neurophysiological monitoring in vestibular schwannoma surgery: advances and clinical implications', *Neurosurgical focus*, 27: E9.
- Zhang, Haiyue, Fengwu Li, Yuanyuan Yang, Jun Chen, and Xiaoming Hu. 2015. 'SIRP/CD47 signaling in neurological disorders', *Brain research*, 1623: 74-80.
- Zhang, Yu, Jianfei Long, Junwei Ren, Xiang Huang, Ping Zhong, and Bin Wang. 2021. 'Potential molecular biomarkers of vestibular schwannoma growth: Progress and prospects', *Frontiers in Oncology*, 11.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik für Neurochirurgie und Neurotechnologie unter der Betreuung von PD Dr. med. Felix Behling durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Apl.Prof. Dr. Jens Schittenhelm / Oberarzt Institut für Neuropathologie Tübingen und Prof. Dr. Felix Behling / Oberarzt der Abteilung für Neurochirurgie Tübingen .

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder des Instituts der Neuropathologie sowie von Herrn Prof. Dr. med. Felix Behling von mir in Zusammenarbeit mit Mitarbeitenden des Labors der Neuropathologie durchgeführt.

Hier ist nochmal ausdrücklich zu erwähnen, dass ein Großteil der erfassten klinischen Daten (Okt. 2003 bis Mär. 2017) von Vanessa Ries für eine vorherigen Projekt übernommen wurden (Teilveröffentlichung (Behling et al. 2019a)). Der Datensatz wurde von mir erweitert (Apr. 2017 bis Apr. 2019). Die gesamte Auswertung der Kohorte bei neu angewandten immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch mich.

Auch die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Felix Behling durch mich. Sämtliche Graphiken oder Tabellen wurden neu entworfen und nicht aus schon Veröffentlichung von Teilergebnissen übernommen.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Köln, den 28.04.2025

8 Veröffentlichungen

Teildaten der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

1. Behling F, **Suhm E**, Ries V, Gonçalves VM, Tabatabai G, Tatagiba M, Schittenhelm J. COX2 expression is associated with preoperative tumor volume but not with volumetric tumor growth in vestibular schwannoma. *Neurol Res Pract.* 2021 Mar 1;3(1):11. doi: 10.1186/s42466-021-00111-6.
2. Gonçalves VM, **Suhm EM**, Ries V, Skardelly M, Tabatabai G, Tatagiba M, Schittenhelm J, Behling F. Macrophage and Lymphocyte Infiltration Is Associated with Volumetric Tumor Size but Not with Volumetric Growth in the Tübingen Schwannoma Cohort. *Cancers (Basel).* 2021 Jan 26;13(3):466. doi: 10.3390/cancers13030466.

9 Danksagung

an Prof. Dr. med. Felix Behling an die Möglichkeit und das an mich entgegengebrachte Vertrauen für die Durchführung meiner Dissertation.

an alle PatientInnen die sich für die Nutzung Ihrer Daten zur Verfügung gestellt haben. Sie sind elementar dafür Verantwortlich, das Fundament dieser Arbeit und tragen einen erheblichen Anteil an der Dissertation sowie die daraus resultierenden Ergebnisse.

an meine Familie die immer für mich da war und zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hatte. Ganz besonders ist hier meine Schwester Theresa zu nennen.

ein besonderes Dank gilt aber meinen Eltern die mich immer gefördert, geliebt und unterstützt haben.