

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus**

**ADAM9 und CXCR4 –
neue Angriffspunkte in der Pathogenese des Vestibularisschwannoms**

Inauguraldissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der**

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Anja Maria Nattmann
aus Würzburg**

Würzburg, September 2021



Referent: Prof. Dr. med. Mario Löhr
Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vestibularisschwannome	1
1.1.1	Überblick und Epidemiologie	1
1.1.2	Geschichtlicher Hintergrund	3
1.1.3	Symptomatik	5
1.1.4	Diagnostik	7
1.1.5	Differentialdiagnosen	11
1.1.6	Therapie	12
1.1.7	Überblick: NF 2	17
1.1.8	Ätiologie und genetische Grundlagen	18
1.2	Molekulare Grundlagen dieser Studie	20
1.2.1	Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4)	20
1.2.2	ERK- und AKT-Signalwege	21
1.2.3	Desintegrin und Metalloproteinase-Domäne enthaltendes Protein 9 (ADAM9)	22
1.3	Zielsetzungen, Fragestellungen und Hypothesen der Studie	23
2	Materialien und Methoden	26
2.1	Ethik- und Tierversuchsvotum	26
2.2	Materialien	26
2.3	Computerprogramme	34
2.4	Medien und Lösungen	35
2.4.1	Patientenmaterial	39
2.4.2	Zellkultur	39
2.4.3	Western-Blot	43
2.4.4	Lentivirale Transfektion	45

2.4.5	Auswertungen mittels Image J	51
2.4.6	Statistische Auswertung mittels Excel und GraphPad Prism 6.....	53
2.4.7	Untersuchung der ERK- und AKT-Signalwege nach Stimulation und Inhibition von CXCR4 durch SDF1 bzw. AMD3100	54
2.4.8	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung auf ADAM9 und Integrin $\alpha 6$ bzw. Integrin $\alpha 2\beta 1$	55
2.4.9	Cytokin-Screen.....	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Proteinexpression von CXCR4 und ADAM9 in Vestibularisschwannomen.....	59
3.2	Reduzierte Zahl von Vestibularisschwannomzellen nach lentiviral vermitteltem ADAM9-knock-down	61
3.3	Merlin-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Expression von CXCR4 und ADAM9 in Vestibularisschwannomzellen	62
3.4	CXCR4 regulierte weder den ERK- noch den AKT-Signalweg in Vestibularisschwannomprimärzellkulturen	65
3.5	Kolokalisation von ADAM9 und Integrin $\alpha 6$ in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.....	66
3.6	Cytokin-Screen ausgewählter Vestibularisschwannome im Vergleich zum gesunden Nerven.....	69
4	Diskussion	71
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis.....	81
7	Internetquellen	89
8	Bildquellen	89
	Appendix	

1 Einleitung

1.1 Vestibularisschwannome

1.1.1 Überblick und Epidemiologie

Vestibularisschwannome sind gutartige Tumoren (WHO-Grad I), die aus Schwannzellen des Nervus vestibulocochlearis, des 8. Hirnnervs, hervorgehen. Hierbei handelt es sich um längliche, spindelartige Zellen mit bipolaren Fortsätzen und zentralem, ovalem Zellkern, die im peripheren Nervensystem die Myelinscheide bilden (Brodhun et al. 2017). Diese Umhüllung ermöglicht eine schnellere Reizweiterleitung durch die saltatorische Erregung im Vergleich zur unmyelinisierten Nervenfasern. Darüber hinaus spielen Schwannzellen eine wichtige Rolle für die Nährstoffversorgung des Axons.

Im allgemeinen Sprachgebrauch ist auch oft von „Akustikusneurinomen“ die Rede, was genau genommen jedoch unzutreffend ist, da der Tumor überwiegend aus der Pars vestibularis des N. vestibulocochlearis hervorgeht (Rosahl et al. 2017). In ca. 50 % der Fälle ist der superiore Anteil des N. vestibulocochlearis ursächlich, in 40 % der Fälle der inferiore Teil und bei lediglich 10 % geht der Tumor aus dem N. cochlearis hervor (Kaye und Briggs 2001).

Schwannome sind langsam wachsende, bekapselte Tumoren, die sowohl intrakraniell als auch extrakraniell entstehen und einen Durchmesser von bis zu 10 cm erreichen können (Tatagiba und Ebner 2015; Scheithauer et al. 2007). Im Durchschnitt wachsen sie 1 – 2 mm/Jahr, aber auch Wachstumsraten von 2 – 4 mm/Jahr sind beschrieben (Lin und Crane 2017). Sie umfassen 8 % aller intrakraniellen Tumoren und sind mit 85 % die häufigste Tumorart im Kleinhirnbrückenwinkel (Scheithauer et al. 2007). Extrakraniell sind sie u.a. an Spinalwurzeln anzutreffen (Scheithauer et al. 2007; Tatagiba und Ebner 2015).

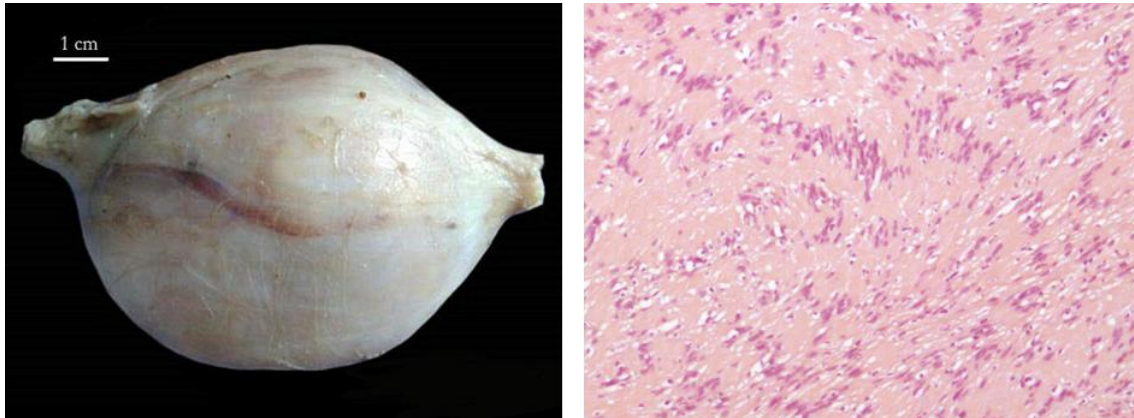


Abbildung 1: Schwannom. *Links:* Makroskopisches Erscheinungsbild eines Schwannoms. Bildquelle: „Schwannoma“ von Dr. Roshan Nasimudeen, zugeschnitten von Anja Nattmann, verfügbar unter der Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported Lizenz. [1] *Rechts:* Histologie eines Schwannoms. Der Ausschnitt zeigt eine Antoni-A-Region eines Schwannoms; die palisadenartige Anordnung der Zellen ist erkennbar. Eigene unveröffentlichte Abbildung.

Histopathologisch können Schwannome in zwei verschiedene Entitäten unterteilt werden: In der zellreicheren Antoni-A-Formation lässt sich eine palisadenartige Anordnung der spindelförmigen Zellen erkennen, die sich als sogenannte „Verocay bodies“ anordnen (Abbildung 1) (Tatagiba und Ebner 2015). Im Gegensatz dazu präsentiert sich Antoni-B-Gewebe deutlich zellärmer mit myxoidem und aufgelockertem Stroma (Tatagiba und Ebner 2015). Darüber hinaus sind gelegentlich hämorrhagische oder auch zystische Areale anzutreffen (Tatagiba und Ebner 2015). Die Tumorzellen exprimieren kräftig das S100-Protein, ein Zytoplasmprotein, das in Nervenscheidentumoren, Melanomen und Myoepithelzellen zu finden ist (Kaye und Briggs 2001). Dies ist ein wichtiger differentialdiagnostischer Unterschied zu Meningeomen, die dieses Protein in der Regel nur in geringem Maße exprimieren (Kaye und Briggs 2001).

Vestibularisschwannome sind im Kleinhirnbrückenwinkel lokalisiert. Als Prädilektionsstelle gilt die sogenannte Obersteiner-Redlich-Zone; hier findet der Übergang von zentraler Glia des ZNS, den Oligodendrozyten, zu peripherer Glia, den Schwannzellen, statt (Lin und Crane 2017; Kaye und Briggs 2001).

Die Tumoren treten in 96 % der Fälle sporadisch und unilateral auf, 4 % sind Ausdruck der genetischen Erkrankung Neurofibromatose 2 (NF 2), für die bilaterale Vestibularisschwannome pathognomonisch sind (Kaye und Briggs

2001). Die Inzidenz des Vestibularisschwannoms beträgt jährlich 1:100.000 (Rosahl et al. 2017); weltweit konnten jedoch steigende Inzidenzen des Vestibularisschwannoms beobachtet werden, was sich u.a. auf die häufigere Durchführung von kranialer Bildgebung mittels Computertomographie (CT) sowie Magnetresonanztomographie (MRT) und damit verbundenen Zufallsbefunden zurückführen lässt (Propp et al. 2006) und somit eher der Ausdruck einer verbesserten Diagnostik ist. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen, ein Altersgipfel lässt sich für Patienten im Alter von 45 – 64 Jahren erkennen (Propp et al. 2006); andere Autoren beschreiben gelegentlich eine leichte Häufung bei Frauen (Kaye und Briggs 2001). Jedoch können auch deutlich jüngere Patienten betroffen sein, insbesondere bei Vorliegen der NF 2, bei der die Tumoren vor allem in der dritten Lebensdekade auftreten (Kaye und Briggs 2001). Gerade jüngere Patienten weisen größere Tumoren auf als ältere Betroffene (Kaye und Briggs 2001).

Prinzipiell handelt es sich bei Vestibularisschwannomen um benigne Tumoren, die ein begrenztes, verdrängendes und nicht metastasierendes Wachstum zeigen. In seltenen Fällen kann es jedoch zur Entartung in einen malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST) kommen (Belyaev et al. 2018). Bei peripheren Schwannomen ist eine Entartung zum MPNST im Vergleich zum Vestibularisschwannom häufiger (Kaye und Briggs 2001).

1.1.2 Geschichtlicher Hintergrund

Von der ersten Entdeckung des Vestibularisschwannoms bis zur heutigen mikrochirurgischen Therapie war es ein weiter Weg. Das erste unilaterale Vestibularisschwannom wurde im Jahre 1777 von Eduard Sandifort, einem niederländischen Anatom, bei einer Autopsie beschrieben; die erste Schilderung eines bilateralen Exemplars geht auf das Jahr 1822 zurück (Koerbel et al. 2005). Zu dieser Zeit war keine Therapie für das Vestibularisschwannom etabliert, sodass die Patienten unter einer immer größer werdenden Symptomlast wie

Gehörverlust, voranschreitendem Visusverlust, Gleichgewichtsstörungen, peripherer Facialisparese und Kopfschmerzen litten (Koerbel et al. 2005) und schließlich an einer Hirnstammkompression starben. Der hohe Leidensdruck der Betroffenen begründete die Entwicklung chirurgischer Interventionen: Die erste erfolgreiche Operation wurde durch den britischen Chirurgen Sir Charles Ballance im Jahre 1894 durchgeführt – die Patientin überlebte, wenn auch mit erheblichen Funktionseinbußen der Hirnnerven (Koerbel et al. 2005). Weitere Versuche von diversen Chirurgen folgten in den nächsten Jahren, oft mit fatalen Folgen für die Patienten mit Mortalitätsraten von 67 – 84 % (Koerbel et al. 2005). Verschiedene Operationstechniken und -zugänge wurden erprobt, beispielsweise etablierte der amerikanische Neurochirurg Harvey Cushing um 1904 das intraoperative Monitoring der Patienten mit Messung der Vitalparameter und die Verwendung silberner Klammern wie auch der Elektrokauterisation zur verbesserten Blutstillung (Koerbel et al. 2005). Ferner gelang es Walter E. Dandy, einem Schüler Cushings, das Rezidivrisiko des Vestibularisschwannoms deutlich zu senken, indem er neben dem Tumor auch dessen Kapsel vollständig entfernte (Koerbel et al. 2005). Trotzdem blieb die Verletzung der benachbarten Strukturen des Tumors, insbesondere des N. facialis, ein relevantes und häufiges Problem, wohingegen die Mortalität abnahm. So verzeichnete der norwegische Neurochirurg Vilhelm Magnus 1926 bei der chirurgischen Behandlung von 14 Patienten nur einen einzigen letalen Ausgang (Koerbel et al. 2005). Ein Meilenstein für die Neurochirurgie, von dem auch die Therapie des Vestibularisschwannoms enorm profitierte, war die Einführung des Operationsmikroskops durch William House im Jahre 1961 und die dadurch ermöglichte mikrochirurgische Vorgehensweise, die bessere Erhaltungsraten des N. facialis bedingte (Lin und Crane 2017). Später wurde in Schweden das Gamma-Knife entwickelt und konnte ab 1967 als alternative Therapie des Vestibularisschwannoms angeboten werden (Lin und Crane 2017; Koerbel et al. 2005). Dank der neuen Möglichkeiten der Bildgebung durch CT und MRT und der damit verbundenen Planbarkeit des Eingriffes sank die Mortalität der chirurgischen Therapie weiter, sodass sie heute bei unter 1 % liegt und der N. facialis in deutlich über 90 % der Fälle anatomisch erhalten werden kann (Koerbel et al. 2005). Dies ist nicht zuletzt darauf zurückzuführen, dass ein

intraoperatives Neuromonitoring der gefährdeten Hirnnerven, welches u.a. durch Madjid Samii in der Vestibularisschwannomchirurgie etabliert werden konnte, zum Nervenerhalt beiträgt (Koerbel et al. 2005).

1.1.3 Symptomatik

In frühen Stadien bleiben Vestibularisschwannome oft asymptomatisch; in 0,2 % der insgesamt durchgeführten Schädel-MRTs treten sie als Zufallsbefund auf (Vernooij et al. 2007). Als Frühsymptome sind Hörstürze und Schwindel zu nennen (Tatagiba und Ebner 2015), bei zunehmender Tumorlast und dadurch bedingter Kompression des N. vestibulocochlearis klagen Patienten über fokale-neurologische Defizite wie Übelkeit, Tinnitus und eine unilaterale Schwerhörigkeit (Tatagiba und Ebner 2015). Eine Übersicht der häufigsten Symptome gibt Tabelle 1. Jedoch ist anzumerken, dass Tumorgöße und -ausdehnung nicht zwingend mit der Schwere der Symptome korrelieren (Rutkowski et al. 2015). Dennoch zeigte sich eine zweimal häufigere Hörminderung bei Patienten, deren Vestibularisschwannom unabhängig von der Ausgangsgröße mehr als 2,5 mm im Jahr wuchs (Rutkowski et al. 2015).

Während paroxysmaler Schwindel selten ist (6,3 % der Patienten), hat die Mehrzahl der Patienten zumindest leichte Einschränkungen des Gleichgewichtsorgans; im klinischen Alltag bleiben diese meist unentdeckt, da durch die langsame Größenzunahme des Tumors oft eine Kompensation durch das kontralaterale Vestibularorgan stattfindet (Kaye und Briggs 2001). Unterschwellige Funktionseinschränkungen können durch spezifische neurologische Untersuchungen wie dem Unterberger Tretversuch aufgedeckt werden (Kaye und Briggs 2001). Schwere Ataxien treten jedoch erst bei Kleinhirnkompensation durch große Tumoren auf (Kaye und Briggs 2001).

Bei großen Tumoren werden umliegende Nervenstrukturen in Mitleidenschaft gezogen: So sind Sensibilitätsstörungen des äußeren Gehörgangs durch Beeinflussung des N. auricularis posterior (sogenanntes Hitselberger-Zeichen)

möglich, bei zusätzlicher extrameataler Ausbreitung kann es des Weiteren zur Beeinträchtigung der Funktionen des N. trigeminus und des N. abducens kommen (Lenarz und Boenninghaus 2012). Gelegentlich besteht auch eine periphere Facialispause bei gleichzeitiger Kompression des 7. Hirnnervs, bedingt durch die enge Lagebeziehung im Kleinhirnbrückenwinkel (Bräuer 2015). Diese gilt als prognostisch schlechtes Zeichen für das Outcome der chirurgischen Therapie, da die Kompression vor allem im späteren Verlauf der Erkrankung auftritt (Tatagiba und Ebner 2015).

Bei besonders großen Tumoren kann es zu Komplikationen wie der Kompression des Hirnstammes mit Entwicklung eines Hydrocephalus und Hirndruck kommen, außerdem sind Kleinhirnausfälle beschrieben (Tatagiba und Ebner 2015).

Tabelle 1: Symptomatik. Die Tabelle zeigt die typischen Symptome des Vestibularisschwannoms und ihre Prävalenz nach Kaye und Briggs, 2001.

Symptom	Prävalenz
Hörverlust	96 %
Gleichgewichtsstörungen jeglicher Art	77 %
Tinnitus	71 %
Kopfschmerzen	29 %
Otalgie/Schmerzen im Mastoid	28 %
Taubheitsgefühl im Gesicht	7 %
Diplopie	7 %

1.1.4 Diagnostik

Bildgebung

Treten bei einem Patienten Symptome auf, die auf ein Vestibularisschwannom hindeuten (Kapitel 1.1.3), sollte dies Anlass für die Durchführung einer bildgebenden Diagnostik sein. Mit einer hohen Sensitivität und Spezifität von weit über 90 % stellt heutzutage die MRT mit gadoliniumhaltigem Kontrastmittel den diagnostischen Goldstandard dar (Fortnum et al. 2009; Strasilla und Sychra 2017). Im Vergleich zum restlichen Hirnparenchym imponieren Vestibularisschwannome in der T1-Wichtung hypo- bis isointens, in der T2-Wichtung erscheinen sie als hyperintense Raumforderung im Kleinhirnbrückenwinkel (Abbildung 2) (Strasilla und Sychra 2017). Die Einteilung in Tumorstadien erfolgt anhand der intra- und extrameatalen Ausdehnung der Tumoren (Tabelle 2) (Samii und Matthies 1997).

Ein inhomogenes Erscheinungsbild kann vor allem bei größeren Tumoren auftreten; dieses ist auf Nekrosen und Zysten im Tumorparenchym zurückzuführen (Strasilla und Sychra 2017). Gegebenenfalls kann eine CT mit Kontrastmittel erfolgen; entweder für die präoperative Planung des Eingriffs oder bei Patienten, bei denen eine MRT-Untersuchung z. B. aufgrund eines Herzschrittmachers nicht möglich ist (Strasilla und Sychra 2017). Im CT erscheint das Vestibularisschwannom hypo- bis isodens mit starker Kontrastmittelaufnahme, jedoch hat es bei der Detektion von Tumoren, die kleiner als 6 mm sind, eine schlechte Sensitivität (Strasilla und Sychra 2017).

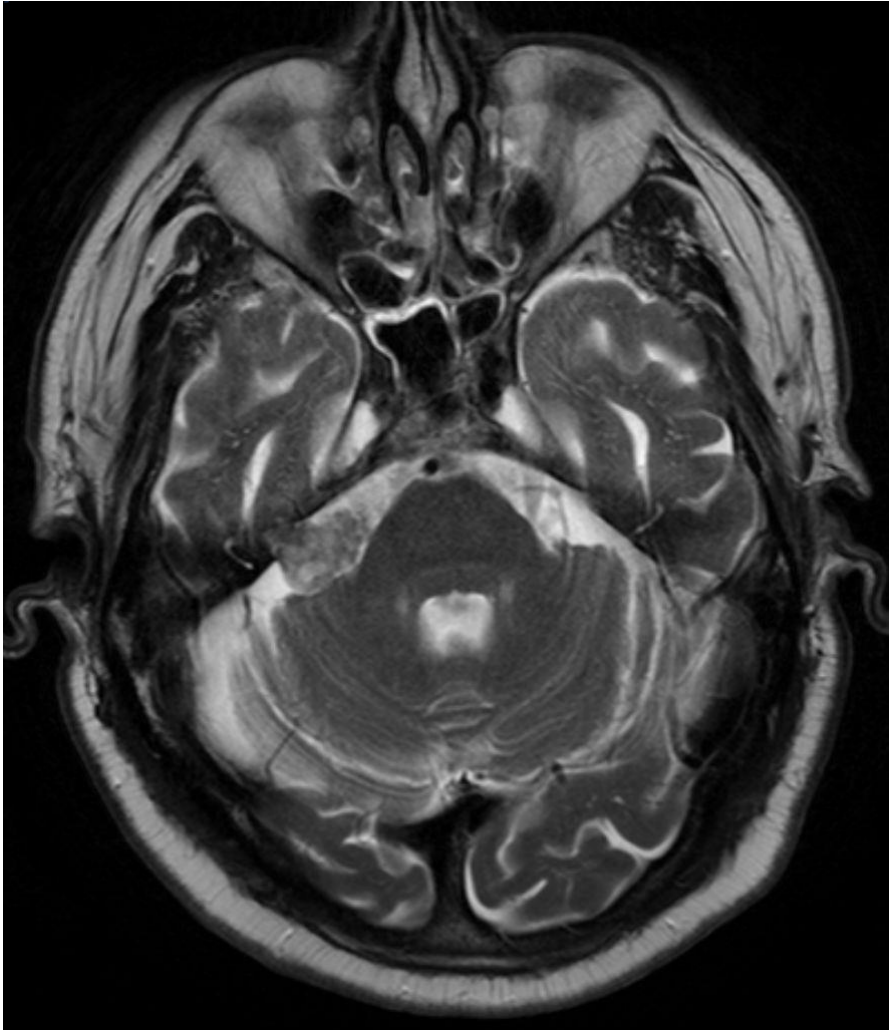


Abbildung 2: Magnetresonanztomografie eines Vestibularisschwannoms. In der T2-Wichtung lässt sich ein rechtsseitiges Vestibularisschwannom erkennen. Bildquelle: „Schwannom am Kleinhirnbrückenwinkel rechts (links im Bild) in der MRT T2 axial“ von Hellerhoff, verfügbar unter der Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported Lizenz. [2]

Tabelle 2: Klassifikation der Vestibularisschwannome. Die Einteilung in Tumorstadien erfolgt entsprechend der intra- und extrameatalen Ausdehnung (Samii und Matthies 1997).

T	Tumorausdehnung
1	rein intrameatal
2	intra- und extrameatal
3A	den Kleinhirnbrückenwinkel ausfüllend
3B	den Hirnstamm erreichend
4A	den Hirnstamm komprimierend
4B	den Hirnstamm verlagernd, den IV. Ventrikel komprimierend

Audiometrie

Die Beurteilung des Hörvermögens bei Vorliegen eines Vestibularisschwannoms sollte prä- und postoperativ nach der Klassifikation des Komitees für Hören und Gleichgewicht der American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery erfolgen (Tabelle 3). Zur Einteilung in eine der vier Kategorien müssen sowohl die Kriterien für Reintonschwelle als auch für Sprachdiskrimination erfüllt sein.

Tabelle 3: Klassifikation des Hörvermögens. Einteilung bei Vorliegen eines Vestibularisschwannoms (Monsell et al. 1995; Kaye und Briggs 2001).

Kategorie	Reintonschwelle	Sprachdiskrimination	Bewertung
A	≤ 30 dB	≥ 70 %	gut
B	> 30 dB, ≤ 50 dB	≥ 50 %	nützlich
C	> 50 dB	≥ 50 %	messbar
D	jegliche Schwelle	< 50 %	nicht vorhanden

Für die Tonschwellenbestimmung im Reintonaudiogramm werden dem Patienten Sinustöne mit Frequenzen von 0,5, 1, 2 und 3 kHz präsentiert; in den Kategorien A und B ist funktionelles Hören noch möglich (Rosahl et al. 2017). Die Sprachaudiometrie sollte im Hauptsprachbereich, also bei einer Intensität von 40 dB, durchgeführt werden (Monsell et al. 1995). Die Prozentzahl gibt an, wie viele Wörter der Patient im Vergleich zu den insgesamt genannten Wörtern erkennen kann (Rosahl et al. 2017). Bei Untersuchung des Patienten lässt sich meist eine einseitige Hochtonschwerhörigkeit feststellen, die Verlängerung der Leitzeit in der Hirnstammaudiometrie (auch brainstem-evoked response audiometry, kurz BERA) gilt hier als wichtigster Befund (Lenarz und Boenninghaus 2012). Ferner zeigt sich ein abgeschwächter oder fehlender Stapediusreflex (Lenarz und Boenninghaus 2012).

Nur 5 % der Patienten mit Vestibularisschwannom weisen ein normales Hörvermögen auf der betroffenen Seite auf; sofern eine Hörminderung vorliegt, ist der Hochtonbereich häufig am stärksten eingeschränkt (Kaye und Briggs

2001). In der Regel ist die Leistung in der Sprachaudiometrie stärker herabgesetzt als jene im Reintonaudiogramm, was für die Betroffenen mit Kommunikationseinschränkungen im Alltag einhergeht, beispielsweise ist das Telefonieren auf dem betroffenen Ohr nur noch bedingt möglich (Kaye und Briggs 2001).

In der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg wird zur Kategorisierung der Patienten die Hannover-Klassifikation des Hörvermögens (Matthies und Samii 1997) verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Hannover-Klassifikation. Einteilung der Hörfunktion bei Patienten mit Vestibularisschwannom (Matthies und Samii 1997).

Klasse	SDS*	Reintonschwelle	Beurteilung
H1	100 % bis 95 %	0 bis 20 dB	normal
H2	95 % bis 70 %	21 bis 40 dB	nützlich
H3	65 % bis 40 %	41 bis 60 dB	mäßig
H4	35 % bis 10 %	61 bis 80 dB	schlecht
H5	5 % bis 0 %	80 bis 100 dB	funktionell taub
H6	-	> 100 dB	taub

* Speech Discrimination Score (SDS)

Das sensitivste diagnostische Verfahren für retrocochleäre Schädigungen stellt die Hirnstammaudiometrie dar (Kaye und Briggs 2001). Durch Manipulation und Irritation des N. cochlearis, z. B. durch ein Vestibularisschwannom, wird eine Verzögerung der Laufzeit detektiert (Kaye und Briggs 2001), auch eine Amplitudenminderung oder das Fehlen einzelner Wellen dieser frühen akustisch evozierten Potentiale (v.a. III und V) sind möglich. Diese Methode liefert bei 95 % der Vestibularisschwannom-Patienten pathologische Ergebnisse, wobei in 10 % der Fälle falsch positive Ergebnisse vorliegen (Kaye und Briggs 2001). Die Ableitung der Hirnstammaudiometrie ist eine beliebte Screeninguntersuchung für das Vestibularisschwannom, jedoch schließt ein negativer Befund ein Vestibularisschwannom nicht aus (Kaye und Briggs 2001).

Vestibularisprüfung

Obwohl es nur bei einem Bruchteil der Patienten mit Vestibularisschwannom zu Schwindel kommt, hat die Funktion des Vestibularorgans ebenso wie die Prüfung des Hörvermögens einen zentralen Stellenwert in der präoperativen Diagnostik (Rosahl et al. 2017). Hierfür erfolgt u.a. eine Nystagmusprüfung mittels Frenzelbrille und eine kalorische Prüfung (Rosahl et al. 2017). Die Beeinträchtigung des Vestibularorgans äußert sich bei der kalorischen Prüfung durch einen Spontannystagmus zur gesunden Seite (Lenarz und Boenninghaus 2012). Des Weiteren werden die Bogengangsfunktion eruiert und vestibulär evozierte myogene Potentiale abgeleitet; hierbei kann bereits der Verdacht auf ein geschädigtes Vestibularorgan gefestigt werden (Rosahl et al. 2017).

1.1.5 Differentialdiagnosen

Auch wenn es sich bei Vestibularisschwannomen um die häufigste Raumforderung im Kleinhirnbrückenwinkel handelt (70 – 80 %), müssen einige Differentialdiagnosen bedacht werden (Lin und Crane 2017): Meningeome gelten als die zweithäufigsten Tumoren im KHBW (10 – 15 %), gefolgt von Epidermoidzysten in 5 % der Fälle; des Weiteren sind Metastasen, Lymphome, Melanome, Facialisschwannome oder Aneurysmen möglich (Lin und Crane 2017). Schwannome anderer Hirnnerven wie z. B. des N. trigeminus, N. facialis, N. glossopharyngeus oder N. vagus können ebenfalls im KHBW angetroffen werden (Kaye und Briggs 2001). Klarheit schafft meist der pathologische Befund des Operationspräparats.

Mögliche klinische Differentialdiagnosen sind u.a. der Morbus Menière, der ebenfalls mit Schwindel, Tinnitus und Schwerhörigkeit einhergeht, oder ein neurovaskuläres Kompressionssyndrom, bedingt durch eine im inneren Gehörgang gelegene Gefäßschlinge (Lenarz und Boenninghaus 2012). Hier gibt eine kranielle Bildgebung mittels MRT Aufschluss.

1.1.6 Therapie

Beobachtung „wait and scan“

Bleibt das Vestibularisschwannom des Patienten symptomfrei oder handelt es sich um einen kleinen Tumor, fällt die Nutzen-Risiko-Abwägung oft zugunsten des „watchful waitings“ aus, um dem Patienten die Risiken und Nebenwirkungen einer Operation zu ersparen bzw. diese hinauszuzögern; dies gilt auch für ältere Patienten über 60 Jahre mit relevanten Komorbiditäten (Lin und Crane 2017). Allerdings sollte darauf hingewiesen werden, dass ein hohes Alter allein keine Kontraindikation für eine operative Therapie darstellt (Kaye und Briggs 2001).

Durch den flächendeckenden Zugang zu Magnetresonanztomographen lassen sich die langsam wachsenden Tumoren in regelmäßigen Intervallen kontrollieren (Rutkowski et al. 2015). Sechs Monate nach Diagnosestellung erfolgt die erste Verlaufskontrolle, anschließend wird das Wachstum jährlich kontrolliert. Zeichnet sich ein fehlender Progress des Tumors ab, ist es vertretbar, den Tumor alle fünf Jahre zu kontrollieren (Strasilla und Sychra 2017). In untersuchten Patientenkollektiven zeigten sich folgende Trends in Follow-ups: Bei 51,1 % der Patienten fand sich ein Tumorwachstum, bei 36,4 % gab es einen Wachstumsstillstand und bei 12,5 % der Patienten ließ sich sogar ein Rückgang der Tumorlast erkennen (Whitehouse et al. 2010). Zeigt sich ein Tumorwachstum von mehr als 2,5 mm/Jahr, steigt das Risiko des Hörverlustes (Lin und Crane 2017).

Auch nach erfolgter Resektion des Schwannoms hat die MRT einen hohen Stellenwert in der postoperativen Verlaufskontrolle: 6 – 12 Monate nach dem operativen Eingriff wird empfohlen, eine neue Bildgebung anzufertigen, der jährliche Kontrollen folgen sollten (Strasilla und Sychra 2017).

Radiotherapie

Bei Tumoren mit einer Größe von weniger als 30 mm kann eine nicht-invasive Therapie mittels stereotaktischem Gamma-Knife erfolgen (Rutkowski et al. 2015). Positive Effekte dieser Therapie sind das kurzfristig bessere Hörvermögen nach der Intervention, vor allem, wenn eine Strahlendosis von weniger als 13 Gray verwendet wird (Rutkowski et al. 2015; Lin und Crane 2017). In der längerfristigen Nachbeobachtung gleichen sich die audiometrischen Befunde jedoch denen der operativen Therapie an. Bei der Radiotherapie gilt es, das Nutzen-Risiko-Verhältnis sorgsam abzuwägen, da diese Therapie zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Gewebstoxizität, Hydrocephalus und intrakraniellm Ödem führen kann; außerdem sind Funktionseinbußen des N. vestibulocochlearis und Trigemini-neuropathien beschrieben, wenn eine höhere Strahlendosis von 16 – 20 Gray verwendet wird (Rutkowski et al. 2015; Lin und Crane 2017). Nachteil dieser Therapie ist das Fehlen von Tumormaterial und der somit nicht mögliche pathologische Befund zum Ausschluss von Malignität (Rutkowski et al. 2015). Die Methode mittels Gamma-Knife ist bei älteren Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand der chirurgischen Therapie vorzuziehen, außerdem kann sie bei Rezidivtumoren nach erfolgter primärer chirurgischer Resektion oder bei Teilresektion erfolgen (Strasilla und Sychra 2017).

Chirurgie

Sind Beobachtung und Radiotherapie keine möglichen Therapieoptionen für den Patienten, sollte eine chirurgische Intervention erfolgen. Dies ist der Fall, wenn das Vestibularisschwannom zu groß für die Gamma-Knife-Therapie ist, ein großes Rezidiv vorliegt, oder die Symptomlast des Patienten keine weitere Verzögerung zulässt (Rutkowski et al. 2015). Außerdem werden junge Patienten unter 60 Jahren, Patienten mit NF 2 oder Patienten mit zystischen Vestibularisschwannomen bevorzugt der operativen Therapie zugeführt (Tatagiba und Ebner 2015).

Heutiger Standard ist das Ableiten einer permanenten Elektromyographie des N. facialis an den Mm. orbicularis oculi und orbicularis oris während des operativen Eingriffs, was mit einer besseren postoperativen Funktionalität des Nerven einhergeht (Kaye und Briggs 2001). Des Weiteren wird bei vorhandenem Resthören das Hörvermögen perioperativ überwacht: Ein Elektrocochleogramm oder eine Hirnstammaudiometrie können abgeleitet werden (Kaye und Briggs 2001). Der Literatur zufolge kann das Hörvermögen in 30 – 50 % der Fälle erhalten werden; hierbei wird von funktionellem Hören gesprochen: Die Sprachaudiometrie sollte eine Diskriminationsleistung von mindestens 50 % haben und die Reintonaudiometrie kein Defizit über 50 dB aufweisen (Kaye und Briggs 2001). Ursächlich für einen Hörverlust können die Verletzung des N. cochlearis oder des Innenohrs während der OP, eine Tumordinvasion in den N. cochlearis oder eine mangelnde perioperative Blutzufuhr des Innenohres sein; ferner kann entstehendes Narbengewebe noch Monate nach dem Eingriff zu einer abnehmenden Hörfunktion führen (Kaye und Briggs 2001). Generell gilt, dass die Chance auf postoperativen Hörerhalt von der Tumorgröße abhängig ist (Kaye und Briggs 2001).

Zur mikrochirurgischen operativen Resektion kommen drei verschiedene Zugangswege in Betracht: translabyrinthär, transtemporal und retrosigmoidal. Welche dieser Techniken in Frage kommt, hängt vor allem von der Tumorgröße, der Lokalisation und der Wahrscheinlichkeit für postoperativen Hörerhalt ab (Chamoun et al. 2012). Im Folgenden werden diese Techniken kurz beschrieben.

Translabyrinthärer Zugang

Liegt ein großer Tumor vor und kam es im Verlauf der Erkrankung zu einem Verlust des Hörvermögens, kann dieser Zugang während der operativen Therapie gewählt werden (Rosahl et al. 2017). Hierfür erfolgt ein retroauriculärer Schnitt, Mastoid und Labyrinth werden entfernt, die Darstellung des N. facialis erfolgt und die Nn. vestibulares werden gekappt; anschließend wird der Tumor mittels Ultraschall in kleinere Fragmente zerteilt und aspiriert (Chamoun et al.

2012). Vorteile dieses Ansatzes sind die gute Darstellbarkeit und die damit verbundene mögliche Schonung des N. facialis sowie die mangelnde Notwendigkeit einer Manipulation am Kleinhirn; während des Eingriffs erfolgt ein intraoperatives Neuromonitoring des N. facialis (Chamoun et al. 2012). Schließlich erfolgt eine Defektdeckung mit Temporalfaszie und viszeralem Fett (Lin und Crane 2017).

Sub- bzw. transtemporaler Zugang („Middle fossa“)

Liegt ein kleiner Tumor mit einer maximalen Größe von 2 cm vor, der vor allem intrameatal gelegen ist und eine realistische Chance auf postoperativen Hörerhalt besteht, kann dieser Zugangsweg gewählt werden (Rosahl et al. 2017). Ventral des Tragus erfolgt die Inzision, der M. temporalis und dessen Faszie werden retrahiert (Chamoun et al. 2012). Es schließt sich die Kraniotomie an; der Temporallappen wird angehoben und der innere Gehörgang im Os temporale dargestellt (Rosahl et al. 2017). Nach Freilegen des Tumors wird dieser vom N. facialis und N. cochlearis getrennt; während des Eingriffs werden ein Neuromonitoring des Gesichtsnervs sowie eine Hirnstammaudiometrie durchgeführt (Chamoun et al. 2012).

Retrosigmoidaler Zugang

Dieser mögliche Operationsweg kann bei allen Tumorstadien angewandt werden und ermöglicht einen postoperativen Hörerhalt (Chamoun et al. 2012). Hierfür wird zwei Fingerbreit hinter der Ohrmuschel ein Schnitt gesetzt und eine Kraniotomie durchgeführt; anschließend erfolgt die Eröffnung der Dura mater (Tatagiba und Ebner 2015). Das Kleinhirn wird verlagert, daraufhin erfolgt die Eröffnung der Cisterna cerebellomedullaris und die Darstellung des Tumors (Tatagiba und Ebner 2015). Eventuelle Tumorzapfen im inneren Gehörgang werden entfernt; weiterhin wird der restliche Tumor im Kleinhirnbrückenwinkel mittels Ultraschallaspirator entfernt, wobei auf den Erhalt des N. facialis und des

N. cochlearis zu achten ist (Tatagiba und Ebner 2015). Vorteil dieses Zugangsweges ist der gute Überblick für den behandelnden Chirurgen in Bezug auf die Tumorausbreitung; andererseits besteht die Notwendigkeit der Retraktion des Kleinhirns (Chamoun et al. 2012). Um die Komplikation eines verbleibenden Resttumors zu verhindern, erfolgt eine endoskopische Kontrolle im inneren Gehörgang.

Wie auch beim translabyrinthären Zugang erfolgt ein Neuromonitoring des N. facialis; außerdem wird eine intraoperative Hirnstammaudiometrie abgeleitet, wenn der Erhalt des Hörvermögens Ziel der Intervention ist (Chamoun et al. 2012).

Allgemeine Risiken der chirurgischen Therapie sind u.a. ein Liquorleck (8,5 %), Infektionen (3,8 %), Meningitis (3 – 6 %) sowie Ischämie (1 %); in 0,2 % der Fälle hat der Eingriff sogar letalen Ausgang (Rutkowski et al. 2015; Kaye und Briggs 2001). Generell gilt, dass größere Tumoren ein schlechteres Outcome bzgl. Mortalität, Funktion des N. facialis und postoperativer Genesung zeigen (Kaye und Briggs 2001).

Außerdem sollte nicht zwingend in jedem Fall eine komplette Resektion des Tumors angestrebt werden: Subtotale Resektionen können den Vorteil haben, dass die Funktion der Nervi vestibulocochlearis und facialis weniger stark beeinträchtigt wird; gerade bei großen Tumoren erhöht dies die Chance auf den Hirnnervenerhalt (Rutkowski et al. 2015; Lin und Crane 2017). Auch eine an den Hirnstamm anhaftende Tumorkapsel rechtfertigt eine subtotale Resektion (Kaye und Briggs 2001). Im Allgemeinen geht man von einer Rezidivwahrscheinlichkeit von 10 % in den nächsten 5 Jahren nach Resektion aus (Lin und Crane 2017).

1.1.7 Überblick: NF 2

Eine mit Vestibularisschwannomen assoziierte Krankheit ist die NF 2. Dabei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die mit einer Inzidenz von 1:40.000 Neugeborenen auftritt; wobei die Hälfte der Fälle spontane Neumutationen ohne familiäre Häufung sind (Stemmer-Rachamimov et al. 2007). Hierbei handelt es sich meist um genetische Mosaik, d.h. nicht alle Körperzellen sind Träger der zugrundeliegenden Mutation (Sughrue et al. 2011). Die Manifestation der Erkrankung beginnt meist um das 22. Lebensjahr, daher sollte bei Patienten mit Vestibularisschwannom vor dem 30. Lebensjahr stets auch eine NF 2 abgeklärt werden (Kaye und Briggs 2001).

Als pathognomonisch gelten bilaterale Vestibularisschwannome, aber auch Schwannome anderer peripherer Nerven, Meningeome, Gliome und (kutane) Neurofibrome können auftreten (Stemmer-Rachamimov et al. 2007). Im Vergleich zu spontanen Vestibularisschwannomen treten NF 2-assoziierte Vestibularisschwannome bereits früher (meist in der 3. Lebensdekade) auf und zeigen ein schnelleres Wachstum (Stemmer-Rachamimov et al. 2007). Außerdem liegen öfter eine Invasion des N. cochlearis und eine Beeinträchtigung des N. facialis vor (Kaye und Briggs 2001).

In der Pathogenese des Vestibularisschwannoms spielt ein Protein namens Merlin eine elementare Rolle. Inaktivierung oder Funktionsverlust von Merlin, dem Genprodukt des NF 2-Gens, bilden die Grundlage für alle Tumoren, die mit NF 2 assoziiert sind, sowie für 60 – 80 % der sporadischen Schwannome und Meningeome (Nadi und Rutka 2015). Die klinische Erscheinung der NF 2 geht auf eine Keimbahnmutation im NF 2-Gen zurück (Stemmer-Rachamimov et al. 2007), im Gegensatz dazu zeigen sporadische Schwannome eine somatische Mutation im NF 2-Gen (Wang et al. 2015). Die genauen Mechanismen werden in Kapitel 1.1.8 erläutert.

Die Therapie der nicht-sporadischen, NF 2-assoziierten Vestibularisschwannome kann genauso erfolgen wie jene der sporadischen

Vestibularisschwannome; allerdings ist hier mit einem schlechteren Outcome und einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit zu rechnen (Rutkowski et al. 2015). Großer Wert sollte auf den funktionellen Hörerhalt gelegt werden, da häufig beide Seiten betroffen sind und dadurch ein beidseitiger Hörverlust droht (Kaye und Briggs 2001). Aus diesem Grund sollte bei bilateralen Vestibularisschwannomen zuerst die Seite des geringeren Resthörens chirurgisch therapiert werden, um den Hörsinn des Patienten möglichst lang zu erhalten (Kaye und Briggs 2001). Eine besonders komplizierte Situation liegt vor, wenn der Patient bereits auf einem Ohr ertaubt ist, auf der kontralateralen Seite aber ebenfalls ein Vestibularisschwannom vorliegt; in diesem Fall sollte zurückhaltend operiert und eher eine subtotale Resektion angestrebt werden, um eine Dekompression des inneren Gehörgang zu erzielen und das Hörvermögen dadurch im besten Fall zu verbessern oder dessen Verschlechterung zumindest hinauszuzögern (Kaye und Briggs 2001). Hierbei sollte ein intraoperatives Monitoring der Hörfunktion erfolgen.

1.1.8 Ätiologie und genetische Grundlagen

Ursächlich für die Entstehung eines Schwannoms ist die Inaktivierung des NF 2-Gens (Brodhun et al. 2017). Dies konnte sowohl bei sporadischen als auch bei NF 2-assoziierten Vestibularisschwannomen beobachtet werden. Das NF 2-Gen befindet sich auf Chromosom 22q12 und wird in den meisten menschlichen Geweben exprimiert (Stemmer-Rachamimov et al. 2007). Es hat eine wichtige Rolle als Tumorsuppressorgen und kodiert für sein Genprodukt, das Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein (kurz: Merlin oder auch Schwannomin), das mit dem Cytoskelett der Zelle assoziiert ist und über tumorsuppressive Eigenschaften verfügt (Stemmer-Rachamimov et al. 2007; Twist et al. 1994); vor allem wird ihm die Funktion der Wachstumsregulation von Schwannzellen zugesprochen (Sughrue et al. 2011), weshalb es als ein potentiell negativer Wachstumsfaktor für Schwannzellen gilt (Gutmann et al. 1997). Aus diesem Grund spielt die Mutation des Gens und der damit verbundene Funktionsverlust

von Merlin eine essentielle Rolle in der Entstehung des Vestibularisschwannoms (Twist et al. 1994).

Merlin interagiert auch mit wachstumsfördernden Signalwegen und führt u.a. zur Inhibition von mTOR-, AKT- und Ras-Signalkaskaden. Fällt der regulatorische Einfluss Merlins durch Mutation weg, kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen tumorsuppressiven und wachstumsfördernden Signalen (Sughrue et al. 2011). Es existieren bereits einige Versuche von Schulze und Kollegen, in denen Merlin über einen Gentransfer in Tumorzellen von Vestibularisschwannomen eingebracht wurde; die Folge waren Apoptose, reduzierte Proliferation und Zellzyklusarrest (Sughrue et al. 2011), da Merlin in seiner physiologischen Form als Tumorsuppressorprotein in Schwannzellen agiert.

Merlin weist eine hohe Ähnlichkeit mit Proteinen der 4.1-ezrin/moesin/talin-Familie auf, die ebenfalls Interaktionen zwischen Zytoskelett und Zellmembranproteinen herstellen (Twist et al. 1994). Jedoch unterscheidet sich Merlin von der ERM-Familie durch eine Domäne am N-terminalen Ende des Proteins, die sieben Aminosäuren umfasst und für die spezifische Funktion Merlins verantwortlich ist (Sughrue et al. 2011). Ferner wurden in NF 2-assoziierten Tumoren physiologische Konzentrationen der ERM-Proteine gemessen, während ein Funktionsverlust von Merlin vorlag (Kaye und Briggs 2001). Im aktiven Zustand bindet Merlin mit seinem C-terminalen Ende an aktinreiche Abschnitte der Zellmembran; im inaktiven Zustand geht es eine Bindung mit sich selbst ein, was durch eine α -Helix-Struktur ermöglicht wird (Sughrue et al. 2011). Außerdem kann Merlin im aktiven Zustand andere Proteine der ERM-Familie binden und damit eine bimolekulare Struktur bilden (Sughrue et al. 2011). In der aktiven Form verhindert Merlin Zellproliferation und -motilität, indem es die Transmission extrazellulärer Wachstumsfaktoren ins Zellinnere hemmt (Stemmer-Rachamimov et al. 2007). Wachstumshemmung durch Merlin geht auf die Interaktion mit dem Transmembranrezeptor CD44 zurück (Nadi und Rutka 2015).

Beobachtungen an NF 2-knockout-Mäusen und Schwanzzellkulturen legen nahe, dass die Merlinmutation eine Schlüsselrolle im Verlust des Zell-Zell-Kontaktes spielt und damit die Tumorentstehung ermöglicht (Sughrue et al. 2011).

1.2 Molekulare Grundlagen dieser Studie

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob die Merlinmutation und der damit verbundene Funktionsverlust des Proteins eine erhöhte Expression von CXCR4 und ADAM9 nach sich zieht, die die Entstehung und Progression des Vestibularisschwannoms vorantreiben.

1.2.1 Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4)

CXCR4 spielt eine Rolle bei verschiedensten physiologischen und pathologischen Vorgängen im menschlichen Körper. Durch Stimulation dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch SDF1 (Synonym: CXCL12) werden die Proteinkinase B (AKT) und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) aktiviert und führen u.a. zu Zellmigration, veränderter Genexpression und Zellproliferation (Domanska et al. 2013). Diese Signalwege finden allerdings nicht nur physiologisch in der Embryogenese, der Hämatogenese oder der Hirnentwicklung statt, sondern leisten auch einen wesentlichen Beitrag zu Autoimmunerkrankungen und Tumorentstehung; letztere wird durch den CXCR4/CXCL12-Signalweg durch Förderung von Metastasierung, Angiogenese und invasivem Wachstum aufrechterhalten und vorangetrieben (Domanska et al. 2013). Eine erhöhte CXCR4-Expression konnte in diversen Krebsarten beobachtet werden, dazu zählen u.a. Prostata-, Lungen-, Blut-, Brust- und Darmkrebs (Domanska et al. 2013).

Neuen Erkenntnissen zufolge spielt CXCR4 jedoch nicht nur eine Rolle in der Pathogenese maligner Tumoren, sondern auch im benignen Vestibularisschwannom konnte eine erhöhte CXCR4-Konzentration nachgewiesen und sogar mit dem Grad der Hörminderung in Verbindung gebracht werden (Breun et al. 2018). Dies führt zu der Überlegung, das Wachstum des Vestibularisschwannoms mit der Gabe eines CXCR4-Antagonisten, dem AMD3100, beeinflussen zu können, da diese Inhibition in anderen Tumorentitäten bereits Gegenstand aktueller Forschung ist und eine Progressionsreduktion diverser maligner Tumoren durch AMD3100 erzielt werden konnte (Chatterjee et al. 2014). Tatsächlich konnte ein Effekt auf Vestibularisschwannomzellen auch experimentell in vitro gezeigt werden (Breun et al. Manuskript in Vorbereitung) und führt nun zu der Überlegung, ob AMD3100 die Aktivierung der Proteine ERK und AKT, regulatorische Mitglieder der oben erwähnten mitogenen Signalwege, die durch CXCR4 initiiert werden, reduzieren kann.

1.2.2 ERK- und AKT-Signalwege

Die bereits erwähnten mitogenen Signalwege, die eine zentrale Rolle für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen und die Entstehung von Tumoren spielen, setzen sich aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedenster Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Proteinkinasen zusammen. Nachfolgend werden zwei dieser Signalkaskaden kurz beschrieben:

Bindet ein Wachstumsfaktor an seine Rezeptor-Tyrosinkinase, beginnt eine komplexe, auf Phosphorylierungen beruhende Signalkaskade (Voet et al. 2019). Wird die Kinase Raf über das G-Protein Ras aktiviert, phosphoryliert und aktiviert es eine Serin/Threonin-Kinase, auch MEK genannt (Voet et al. 2019). MEK wiederum phosphoryliert die MAPK, die im Zellkern mitogene Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und dadurch aktiviert (Voet et al. 2019). Ein Synonym für die MAPK ist ERK. Bei phosphoryliertem ERK (pERK) handelt es

sich also um die aktive Form der Kinase. Eine Überexpression von pERK ist für Vestibularisschwannome beschrieben (Neff et al. 2012).

Die AKT-Signalkaskade beginnt nach Aktivierung des PDGF-Rezeptors: Durch Bindung an diesen Rezeptor wird die Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert und führt über Zwischenschritte zur Bindung der Proteinkinase B, auch AKT genannt (Heinrich et al. 2014). Durch diese Bindung wird AKT über Phosphorylierungen aktiviert und wirkt antiapoptotisch (Heinrich et al. 2014). Außerdem agiert AKT im Zellkern über die Regulierung von Transkriptionsfaktoren proliferativ (Heinrich et al. 2014). Auch hier handelt es sich beim phosphorylierten AKT (pAKT) um die aktive Form des Enzyms. Eine Aktivierung der PI3K/AKT-Kaskade ist bereits für das Vestibularisschwannom beschrieben (Jacob et al. 2008).

Da die beiden erläuterten Signalkaskaden durch CXCR4 aktiviert werden (Domanska et al. 2013) und CXCR4 im Vestibularisschwannom erhöht exprimiert wird (Breun et al. 2018), wäre es von Interesse, einen möglichen Zusammenhang auch für das Vestibularisschwannom zu prüfen.

1.2.3 Desintegrin und Metalloproteinase-Domäne enthaltendes Protein 9 (ADAM9)

ADAM9 spielt eine zentrale Rolle in der Metastasierung maligner Tumoren (Kossmann et al. 2017). Es gehört zur ADAM-Familie, die verschiedene Metalloproteasen beinhaltet und zur Modifizierung der Extrazellulärmatrix beiträgt; bisher sind 29 verschiedene ADAM-Proteine bei Säugetieren beschrieben (Huovila et al. 2005). Es handelt sich um Transmembranproteine mit einer N-terminalen Metalloprotease-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, die Integrin bindet, einer cysteinreichen Region und einer Region, die dem Epithelial Growth Factor ähnelt (Nath et al. 2000). Durch sogenanntes „ectodomain shedding“, was das Freisetzen des extrazellulären Anteils von Transmembranproteinen durch proteolytische Aktivität der ADAM-Familie

beschreibt, können Wachstumsfaktoren und Cytokine freigesetzt und Signalwege über Rezeptoren aktiviert werden (Huovila et al. 2005). Ein bekanntes Substrat stellt die Familie der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Liganden dar (Mygind et al. 2018). Diese aktivierten Signalwege sind potentiell relevant für die Krebsentstehung (Huovila et al. 2005). So konnte eine erhöhte Expression von ADAM9 in vielen verschiedenen Krebsarten detektiert werden, wie z. B. beim Mamma- oder Prostatakarzinom; im Pankreaskarzinom war eine ADAM9-Expression sogar mit einer höheren Mortalität für den Patienten assoziiert (Grützmann et al. 2004). Da in der Pathogenese des Vestibularisschwannoms auch die autokrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren diskutiert wird (Kaye und Briggs 2001), liegt es nahe, ADAM9 als Metalloprotease, die ebenfalls an der Modulation von Wachstumsfaktoren beteiligt ist, näher zu untersuchen.

Die Proteingröße von ADAM9 beträgt ca. 84 kDa, wobei durch alternatives Splicing auch andere Größen im Western-Blot detektiert werden können, wie z. B. 47 kDa. ADAM9 bindet an Integrin $\alpha V\beta 5$ und Integrin $\alpha 6\beta 1$ (Huovila et al. 2005) und hat außerdem eine Funktion als Zelladhäsionsmolekül, indem es durch die Bindung an $\alpha 6\beta 1$ die Zellmotilität reguliert (Nath et al. 2000). Integrin $\alpha 6\beta 1$ wird u.a. in Schwannzellen exprimiert (Nath et al. 2000) und könnte daher auch im Vestibularisschwannom mit ADAM9 assoziiert sein.

Bisher gibt es keine relevanten Erkenntnisse zur Bedeutung von ADAM9 in der Pathogenese des Vestibularisschwannoms; diese soll in dieser Arbeit näher erörtert werden.

1.3 Zielsetzungen, Fragestellungen und Hypothesen der Studie

Obwohl es sich bei Vestibularisschwannomen um gutartige Tumoren handelt, die durch eine Operation meist zuverlässig entfernt werden können, geht dies oft mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität des Patienten einher. Die Risiken der OP müssen getragen werden, ein Hörverlust des betroffenen Ohres

droht und in einigen Fällen kommt es zu einer Facialisparese. Daher scheint es naheliegend, nach konservativen Therapiealternativen für die betroffenen Patienten zu suchen, die einen invasiven Eingriff und dessen Nebenwirkungen hinauszögern oder gar verhindern können, indem das Wachstum des Tumors verzögert oder gestoppt wird und im besten Fall sogar eine Remission erreicht werden kann. Hiervon würden insbesondere Patienten profitieren, die an einer NF 2 leiden. Wie bereits beschrieben, liegen in diesem Fall meist bilaterale Vestibularisschwannome vor, die eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit aufweisen als sporadische Vestibularisschwannome. Durch diese Faktoren ist das Hörvermögen der NF 2-Patienten besonders gefährdet und die Therapie sollte umso schonender – und wenn möglich medikamentös – sein.

Leider ist das Verständnis der molekularen Pathomechanismen des Vestibularisschwannoms noch zu rudimentär und lückenhaft, um diese als möglichen Therapieansatz zu nutzen. Um diesem Ziel einen Schritt näher zu kommen, widmet sich diese Arbeit ausgewählten molekularen Grundlagen, die als möglicher Angriffspunkt für eine solche Therapie dienen könnten.

Durch CXCR4 werden auf molekularer Ebene wichtige Signalwege der Zellproliferation aktiviert; hier soll analysiert werden, ob die CXCR4-Inhibition durch AMD3100 und Stimulation durch SDF1 Einfluss auf die Proteinmengen von pERK und pAKT nehmen kann und einen möglichen Angriffspunkt für spätere Therapiemöglichkeiten darstellen könnte.

Neben dem CXC-Rezeptor 4 stehen auch die Metalloprotease ADAM9 und das NF 2-Genprodukt Merlin im Zentrum der Untersuchungen. Es soll untersucht werden, ob die bereits zuvor beobachtete erhöhte Expression von CXCR4 und ADAM9 in Vestibularisschwannomzellen auf der Mutation von Merlin beruht. Hierfür soll durch eine Überexpression von Merlin erforscht werden, ob diese die Menge an CXCR4 und ADAM9 im Vestibularisschwannom reduzieren kann oder – falls dies nicht der Fall ist – ob diese beiden Mechanismen unabhängig voneinander zur Tumorentstehung beitragen.

Außerdem soll beobachtet werden, ob eine ADAM9-Reduktion zu einer Änderung des Wachstumsverhaltens oder der Zellzahl der Vestibularisschwannomzellen führt. Hierfür wird mittels viraler Transfektion ein ADAM9-knock-down durchgeführt.

Ferner ist es von Interesse, die Bedeutung der beobachteten erhöhten ADAM9-Expression zu erörtern und deren Interaktion mit dem Zytoskelett der Tumorzellen näher zu verstehen. Hierbei steht vor allem das Integrinmolekül als Bestandteil des Zytoskeletts der Vestibularisschwannomzelle im Mittelpunkt. Es wird die Kolo-kalisation von ADAM9 mit zwei verschiedenen Integrinen (Integrin $\alpha 2\beta 1$ und Integrin $\alpha 6$) näher betrachtet, die Hinweise auf eine mögliche Interaktion geben könnte.

Da die Tumorentstehung meist multifaktoriell bedingt ist, könnte es sich als nützlich erweisen, eine breite Basis an verschiedenen Cytokinen zu untersuchen, die potenziell Ausblick auf weitere, bisher unbekannte Mechanismen geben könnten. Aus diesem Grund soll ein Screening auf diverse Cytokine durchgeführt werden, um neue und für die Pathogenese des Vestibularisschwannoms relevante Signalwege aufzudecken.

2 Materialien und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Die Unbedenklichkeit des Projekts wurde von der Ethik-Kommission der Universität Würzburg bestätigt und kann unter dem Aktenzeichen 145/16 eingesehen werden.

2.2 Materialien

Es folgt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Utensilien, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Zellen, Bakterien, RNA, Kits, Antikörper und Computerprogramme.

Tabelle 5: Geräte und Utensilien.

Bezeichnung	Hersteller
Abzug DIN 12924 Typ 2-426	Köttermann
Automated Cell Counter Countess II	ThermoFisher Scientific
Dampfgarer Multigourmet	Braun
Eismaschine	Ziegra
Entwicklungsmaschine Curix 60	AGFA
Eppendorf Research Plus Pipetten	Eppendorf
Färbeeinsatz aus Edelstahl	A. Hartenstein
Färbekasten nach Schiefferdecker	A. Hartenstein
Färberahmen aus Glas für 10 Objektträger 76 x 26 mm	A. Hartenstein
Glaspipetten	A. Hartenstein
Heracell™ 240i CO ₂ Inkubator	ThermoFisher Scientific
Hypercassette™ 18 x 24 cm	Amersham Biosciences

iBlot® 7-Minute Blotting System	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Macs Mix	Miltenyi Biotec
Mikroskop	HUND Wetzlar
Mikroskop DMI 3000B, mit DFC 450C (Kamera)	Leica Microsystems
pH-Meter Lab 855	SI Analytics
Pipettierhilfe Accurpette	VWR
Qubit® 2.0 Fluorometer	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Reaktionsgefäßständer	A. Hartenstein
Rotamax 120	Heidolph
Rührer MR 3001	Heidolph
Sterilbank Class II Type A/B3, Modellnummer NU-425-400	NUAIRE
Stickstoffbehälter Chronos 10000397	Messer Griesheim
Thermometer Enviro-Safe Total Immersion	VWR
Thermomixer C	Eppendorf
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage, ABT 120-5 DNM	Kern & Sohn
Waage, Entris 4202-1S	Sartorius
Wasserbad WTE var 3185	A. Hartenstein
Wecker Modell Nr. SKT338N	TFA Dostmann und A. Hartenstein
Zentrifuge Mega Star 3,0/3.0R	VWR
Zentrifuge Micro Star 17/17R	VWR

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial.

Bezeichnung	Hersteller
15 ml Polypropylen Reaktionsgefäße	CELLSTAR®
50 ml Polypropylen Reaktionsgefäße	CELLSTAR®
6-Well-Platten	costar®
Countess cell counting chamber slide	Invitrogen ThermoFisher Scientific
Cutfix Surgical Disposable Scalpels	B. Braun Melsungen
Deckgläser 24 x 50 mm	A. Hartenstein
Einmalspritze, 50 ml, Luer-Lock, steril, 1 Stk./Blister	Sarstedt
Fujifilm medical X-Ray Film 100 NIF 13 x 18 cm	A. Hartenstein
Filter 100 µl CellTrics® steril	Sysmex
Filter 50 µl CellTrics® steril	Sysmex
Filter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt
Filter Filtropur S 0,45 µm	Sarstedt
Handschuhe Dermagrip ultralong Nitrile Examination Gloves	VWRP
iBlot® Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Mini	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Labor- und Hygienetücher	zetBox
Liquid Blocker (PAP-Pen Mini)	Science Services
Nalgene™ Kryoröhrchen für die Langzeit- lagerung	ThermoFisher Scientific Invitrogen
NuPage™ 4 – 12 % Bis-Tris-Gel	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Objektträger	A. Hartenstein
Parafilm 4 inch x 125 feet	Pechiney Plastic Packaging
Petrischalen 10 cm	Nunc™
Petrischalen 6 cm	Nunc™
Pipettenspitzen 1.000 µl	Sarstedt

Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt
Qubit® assay tubes	lifeTechnologies
Safe-Lock Eppendorfgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Safe-Lock Eppendorfgefäße 2 ml	Eppendorf
Spritzen 20 ml Injekt Luer Solo	B. Braun
Wägebapier 531 100 x 100 mm	VWR
xCellsure Lock Gefäße	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Zellkulturflaschen T25	Corning®
Zellkulturflaschen T75	Corning®
Zellschaber Cell Scraper 25 cm	Sarstedt

Tabelle 7: Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
10 % normal Goat Serum	life Technologies
2 % Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich
Albumin bovine Fraction	Serva Electrophoresis
Albumin bovine Fraction V, pH 7,0	Serva
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS
Aprotinin from bovine lung	Sigma
Aqua bidest	Wasser für Injektionszwecke aus Millipore-Anlage, doppelt autoklaviert
Bacto™ Agar	A. Hartenstein
Bacto™ Trypton	A. Hartenstein
Bacto™ Yeast Extract (Hefeextrakt)	A. Hartenstein
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck
Chloramphenicol	Sigma

Citronensäure-Monohydrat 99,5-102 %	Sigma-Aldrich
Collagenase (lyophilisiert) from Clostridium histolyticum CO 130-100 mg	Sigma-Aldrich
Destilliertes Wasser (Ultra Pure Water)	Biochrom
Developer For CP 1000/CURIX 60 G 153	AGFA
Dimethyl Sulfoxide anhydrous (DMSO) > 99,9 %	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	ThermoFisher Scientific Invitrogen
ECL™ Western Blotting Analysis Systems	GE Healthcare Amersham
Ethanol ≥ 99,8 % (vereinfacht als Ethanol 100 % bezeichnet)	Carl Roth
Ethanol 70 %	Carl Roth
Ethanol 96 %	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Fetal bovine serum (FBS)	gibco® by lifeTechnologies™
Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (ab104139)	Abcam
Glucoselösung (5 %)	B. Braun
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS+/+)	Biochrom
Human Recombinant Heregulin-beta 1	Stemcell Technologies
IGEPAL	Sigma-Aldrich
Insulin Solution Human SLBW 1982	Sigma-Aldrich
Lentikonzentrat sterile	OriGene Technologies
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Mäuse-Laminin Purified Protein 1,3 mg/ml	Merck Millipore
MCF7 Whole Cell Lysate (sc-2206)	Santa Cruz Biotechnology
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich

Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH-Plätzchen)	Merck
Natronlauge 1 mol/l	Merck
NuPage™ Antioxidant	ThermoFisher Scientific Invitrogen
NuPage™ LDS Sample Buffer (4x)	ThermoFisher Scientific Invitrogen
NuPage™ MES SDS Running Buffer 20x	ThermoFisher Scientific Invitrogen
NuPage™ Sample Reducing Agent 10x	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Opti-MEM® 1x Reduced Serum Medium	gibco® by lifeTechnologies™
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline Dulbecco (PBS)	Biochrom
Plerixafor 8HCl (AMD3100 8HCl)	Selleck Chemicals
PluriSTEM® Dispase-II Solution SCM133 (Dispase)	Millipore Sigma&trade
Protamine sulfate salt from salmon P4020-1G	Sigma-Aldrich
Puromycin 10 mg/ml	gibco® by lifeTechnologies™
Qubit® buffer	Invitrogen
Qubit® reagent	Invitrogen
Rapid Fixer G 354	AGFA
Salzsäure 30 % (HCl)	Merck
SDF-1 ALPHA human	Sigma-Aldrich
SeeBlue Plus2 Prestained Standard 1	ThermoFisher Scientific Invitrogen
Tris base	Applichem
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich

Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau, 0,4 %	Sigma-Aldrich
Trypsin 0,05 %/0,02 % (w/v) in PBS without Ca ²⁺ without Mg ²⁺	Biochrom
Trypsin 0,25 %/0,05 % (w/v) in PBS without Ca ²⁺ without Mg ²⁺	Biochrom
Tween® 20	Carl Roth
Wasser für Injektionszwecke	Ampuwa
Xylol (Isomerengemisch)	VWR
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Tabelle 8: Zellen.

Bezeichnung	Hersteller
HEK 293T Cells	ATCC

Tabelle 9: Bakterien.

Bezeichnung	Hersteller
DH5α Competent Cells (E. coli)	ThermoFisher Scientific

Tabelle 10: RNA.

Bezeichnung	Hersteller
ADAM9 Human shRNA Lentiviral Particle (Locus ID 8754) TL314947VB	OriGene Technologies
Lenti-shRNA Control Particles CAT#: TR30021V	OriGene Technologies
NF 2 (NM_000268) Human Tagged ORF Clone (Lenti ORF clone of Human neurofibromin 2 (merlin) (NF 2) transcript variant 1, mGFP tagged shRNA-Plasmid) RC205883L2	OriGene Technologies

Tabelle 11: Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Cytokine Array: Human Cytokine Antibody Array (Membrane, 80 Targets), (ab133998)	Abcam
Endotoxin Free plasmid DNA purification Maxi-Kit	Macherey-Nagel
Lenti-Vpak packaging KIT TR 30037	OriGene Technologies
NucleoBond® PC 500 EF Kit	Macherey-Nagel
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	lifeTechnologies
Qubit® Protein Assay Kit	lifeTechnologies

Tabelle 12: Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Verwendung*	Verdünnung
Anti-ADAM9 (ab186833) (1,09 mg/ml)	Abcam	IF	1:100
Anti-Integrin α 6 antibody [MP 4F10] (ab20142)	Abcam	IF	1:50
Anti-Integrin α 2 β 1 antibody [16B4] (ab30483)	Abcam	IF	1:50
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 555 (A32732)	ThermoFisher	IF	1:400
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (A32732)	ThermoFisher	IF	1:400
Anti-ERK1 + ERK2 [EPR17526] (ab184699)	Abcam	WB	1:10.000

Anti-Akt (pan) C67E7 #4691	Cell Signaling Technology	WB	1:1.000
Anti-CXCR4 GTX 22074	Genetex	WB	1:500
Anti-Integrin α 6 (sc-374057)	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:200
Anti-Phospho-Akt (Ser473) 587F11 #4051	Cell Signaling Technology	WB	1:500 bzw. 1:400
Anti-ERK1 (phospho T202) + ERK2 (phospho T185) antibody [EPR19401] (ab201015)	Abcam	WB	1:1.000
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721)	Abcam	WB	1:1.000
m-IgGk BP-HRP (sc-516102)	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:1.000
NF 2 Antikörper (B-12) (sc-55575)	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:200
Anti-mouse IgG HRP NA931	GE Healthcare	WB	1:1.000
Anti- γ -Tubulin T6557	Sigma-Aldrich	WB	1:5.000
Anti-ADAM9 (ab186833) (3,05 mg/ml)	Abcam	WB	1:1.500

* Immunofluoreszenz (IF), Western-Blot (WB)

2.3 Computerprogramme

Tabelle 13: Verwendete Computerprogramme.

Bezeichnung	Hersteller/Entwickler
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
Image J	National Institutes of Health (NIH)
LAS V4.5 software	Leica Microsystems
Microsoft Excel	Microsoft Corporation

2.4 Medien und Lösungen

Tabelle 14: Zusammensetzung verwendeter Medien und Lösungen.

Bezeichnung	Chemikalien	Menge
0,1 % TBS-T	10x TBS Destilliertes Wasser Tween® 20 NaOH	200 ml 1.800 ml 2 ml bis pH = 8
10x TBS	H ₂ O Tris-Base NaCl HCl (25 %)	1.000 ml 60,5 g 87,7 g bis pH = 8 (WB) oder bis pH = 7,6 (IF)
1x MES-SDS Running Buffer	NuPage™ MES SDS Running Buffer 20x Destilliertes Wasser	250 ml 4.750 ml
1x Wash Buffer 1 (Cytokine Screen Kit)	20x Wash Buffer 1 H ₂ O	0,9 ml 17,1 ml
1x Wash Buffer 2 (Cytokine Screen Kit)	20x Wash Buffer 2 H ₂ O	0,6 ml 10,9 ml
293T-Medium	DMEM FBS Penicillin/Streptomycin	500 ml 50 ml 2 ml
AMD3100-Lösung (1 mM)	Schwannzellmedium AMD3100-Verbrauchslösung	9,4 ml 1,1 ml
AMD3100- Verbrauchslösung	Plerixafor 8HCl (AMD3100 8HCl) Destilliertes Wasser	10 mg 1,25 ml

Antikörperverdünnung	TBS BSA Antikörper • ADAM9 • Integrin $\alpha 6/\alpha 2\beta 1$	10 ml 0,1 g 1:100 1:50
Aufkonzentrations- medium	DMEM FBS	500 ml 50 ml
Blockinglösung	Milchpulver Blotting Grade 0,1 % TBS-T	5 g 100 ml
Cell-Lysis-Buffer (Cytokine Screen Kit)	CellLysis buffer 2x H ₂ O Aprotinin PMSF Leupeptin	490 μ l 490 μ l 10 μ l 10 μ l 1 μ l
Chloramphenicol- Stocklösung	Chloramphenicol Ethanol 100 %	34 mg 1 ml
Citratpuffer (20 mM)	Citronensäure-Monohydrat NaOH Aqua bidest NaOH (5 M) Tween [®] 20	8,4 g 4,2 g 2.000 ml bis pH = 6 1 ml
Collagenase- Verbrauchslösung	Collagenase (lyophilisiert) PBS Filter mit 0,2 μ m Porengröße zum Filtrieren	100 mg 10 ml
Einfriermedium	DMEM FBS DMSO	500 ml 100 ml 50 ml
Ethanol 50 %	Ethanol 100 % Destilliertes Wasser	50 % 50 %

Gebrauchs-Lyse-Puffer	Lyse-Puffer PMSF Aprotinin Leupeptin	5 ml 50 µl 50 µl 5 µl
H ₂ O-Lösung	Schwannzellmedium H ₂ O	9,4 ml 1,1 ml
IF-Blockinglösung	10 % normal Goat Serum BSA	100 µl 1 mg
IF-TBS-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)- Aminomethan NaCl 25 % HCl Aqua bidest	121,1 g 169,4 g 100 ml 2.000 ml
Lyse-Puffer	Triton X-100 NaCl Tris Base EDTA EGTA IGEPAL	5 ml 4,38 g 5 ml 1 ml 0,2 g 2,5 ml
Lysogeny-Broth (LB)- Medium mit Agar	Trypton Hefeextrakt NaCl Bacto-Agar H ₂ O	5 g 2,5 g 5 g 7,5 g 500 ml
Lysogeny-Broth (LB)- Medium ohne Agar	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O	5 g 2,5 g 5 g 500 ml
Puromycinmedium (1 µg/ml)	Schwannzellmedium Puromycin (10 mg/ml)	20 ml 2 µl

Schwanzzellmedium	DMEM	500 ml
	Glucoselösung (5 %)	35 ml
	IBMX	500 µl
	Human Recombinant Heregulin-beta 1	20 µl
	Insulin Solution Human	250 µl
	FBS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
SDF1-Lösung (100 ng/ml)	Schwanzzellmedium	10,395 ml
	SDF1-Verbrauchslösung	105 µl
SDF1-Verbrauchslösung	SDF-1 ALPHA human	10 µg
	Destilliertes Wasser	1 ml
shRNA-Plasmid-Stock (100 ng/µl)	shRNA-Plasmid	10 µg
	Aqua bidest	100 µl
Stripping Buffer	Tris-HCl pH 6,8	10 ml
	SDS 20 %	10 ml
	β-Mercaptoethanol	1,5 ml
	H ₂ O	78,5 ml
TBS-Triton-X-Puffer	IF-TBS-Puffer	200 ml
	Aqua bidest	1.800 ml
	25 % HCl	bis pH = 7,6
	Triton-X	0,5 ml
Verbrauchsfertiges Packaging-Plasmid (0,5 µg/µl)	Packaging Plasmid (lyophilisiert) aus Lenti-Vpak packaging KIT TR 30037	60 µg
	Destilliertes Wasser	120 µl
Verdauungslösung	Dispase	850 µl
	Collagenase-Verbrauchslösung	750 µl

Methoden

2.4.1 Patientenmaterial

Untersucht wurden 37 Vestibularisschwannome ab Tumorstadium T3, welche im Zeitraum vom 16.01.2018 bis 22.07.2019 in der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg operativ entfernt wurden. Das Patientenkollektiv bestand aus 21 männlichen und 16 weiblichen Patienten; die Altersspanne reichte von 25 bis 76 Jahren zum Zeitpunkt der Operation. Im Vorfeld wurde eine Einverständniserklärung der Patienten darüber eingeholt, einen Teil des entfernten Tumormaterials zu Forschungszwecken zu verwenden. Die Vestibularisschwannomzellkulturen, die aus den nativen OP-Präparaten der Tumoren angelegt wurden, wurden nach dem Schema „T + chronologische Nummer“ benannt, z. B. T60, T61, T62 etc.

2.4.2 Zellkultur

Laminierung von Zellkulturplatten

Um eine primäre Schwannzellkultur anlegen zu können, wurde eine 6-Well-Platte mit Mäuse-Laminin beschichtet: Pro 6-Well-Platte wurden 18,5 µl Mäuse-Laminin in 6 ml PBS gegeben, gemischt und je 1 ml in ein Well pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden je 2 ml PBS im Well belassen und die Platten bei 4 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen betrug die Haltbarkeit 4 Wochen. Die Laminierung stellte eine künstliche Extrazellulärmatrix dar, die die Adhäsion der Schwannzellen an der Zellkulturplatte ermöglichte.

Anlegen einer Schwanzzellkultur

Es wurde ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 25 ml HBSS+/+ ohne jeglichen Zusatz befüllt und auf Eis in die OP-Schleuse gestellt. Das Gefäß wurde mit einem ca. 1 x 1 cm großen Tumorstück befüllt und anschließend im Zellkulturlabor weiter bearbeitet. Nach dreimaligem Waschen und Schwenken des Tumors in HBSS+/+ wurde das Gewebe in eine 10 cm große Petrischale überführt, blutige Anteile wurden mittels Skalpell entfernt. Das Tumorgewebe wurde in 0,2 x 0,2 cm große Stücke zerteilt und in eine 6 cm große Petrischale mit 6 ml Schwanzzellmedium transferiert, anschließend wurde die Verdauungslösung hinzugegeben. Es folgte eine 17-stündige Inkubation bei 37 °C.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe mit der Verdauungslösung zuerst in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, durch Auf- und Abpipettieren aufsuspendiert und anschließend filtriert. Hierfür wurden erst ein 100 µl- und dann ein 50 µl-Filter verwendet. Nach einer Zentrifugation bei 300g für 5 Min. wurde der Überstand verworfen und die übrigbleibenden Zellen wurden in Schwanzzellmedium resuspendiert; ein Pellet von 0,5 cm wurde beispielsweise in 12 ml Schwanzzellmedium gelöst und auf eine 6-Well-Platte ausgesät (Abbildung 3). Die Lagerung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre.

Mediumwechsel

Jeden 2. bzw. 3. Tag (Wochenende) erfolgte ein Wechsel des Schwanzzellmediums. Dazu wurde das alte Medium verworfen und 2 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. Es wurde darauf geachtet, das Medium nicht direkt auf die Zellen zu pipettieren, da sich diese sonst ablösen konnten. Entsprechend des gängigen Prozederes wurde das Medium langsam über den Rand des Wells zu den Zellen gegeben.

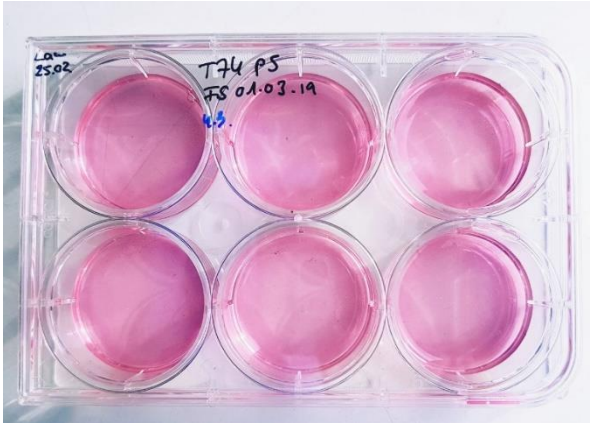


Abbildung 3: Primäre Schwanzzellkultur. Der Tumor T74 wuchs auf einer 6-Well-Platte, welcher man folgende Informationen entnehmen kann: Der Tumor befindet sich in der 5. Passage (P5), hat am 1. März 2019 eine Fibroblastenselektion (FS) erhalten und der letzte Mediumwechsel erfolgte am 4. März 2019. In der linken oberen Ecke erkennt man das Datum, an dem die Platte mit Mäuse-Laminin beschichtet wurde (Lam 25.02.). Eigene unveröffentlichte Abbildung.

Passagieren von Schwanzzellen

Bei einer Konfluenz von ca. 80 % (Beurteilung durch Mikroskopie) wurden die Schwanzzellen passagiert. Dabei wurde das vorherige Schwanzzellmedium entfernt und durch 1 ml PBS pro Well ersetzt; es folgte eine Vorinkubation bei 37 °C im Brutschrank. Nach mikroskopischem Ausschluss einer vorzeitigen Ablösung der Zellen wurde PBS abgesaugt und 500 µl Trypsin 0,05 % pro Well hinzugegeben. Nach einer zwei- bis dreiminütigen Inkubation bei 37 °C und mikroskopischer Kontrolle der erfolgreichen Ablösung der Zellen wurde die Trypsinreaktion durch Hinzugabe von 1 ml Schwanzzellmedium gestoppt und der Inhalt eines jeden Wells in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 300g und 20 °C für 5 Min. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Schwanzzellmedium aufsuspendiert. Anschließend wurden 80.000 – 100.000 Zellen pro Well ausplattiert, indem entsprechend viel Schwanzzellmedium zur Zellsuspension gegeben wurde, sodass sich in jedem Well 2 ml Suspension befanden.

Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Trypanblau und 10 µl der Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren vermischt. 10 µl davon wurden auf ein Countess cell counting chamber slide gegeben und mithilfe des Automated Cell Counter Countess II gezählt.

Fibroblastenselektion

Sofern unter dem Mikroskop erkennbar war, dass sich nicht nur Schwanzzellen, sondern auch Fibroblasten in der Kultur befanden, war es erforderlich, eine Fibroblastenselektion durchzuführen. Dafür wurde bis zum Schritt der Zentrifugation wie beim bereits beschriebenen Passagieren der Zellen vorgegangen. Nach dem Zentrifugieren und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 12 ml Schwanzzellmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche T25 überführt und für 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mikroskopisch die Anhaftung der Fibroblasten am Boden der Flasche kontrolliert, der Überstand, der die Schwanzzellen enthielt, vorsichtig abgenommen und erneut bei 300g für 5 Min. bei 20 °C zentrifugiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem des Passagierens mit Zellzahlbestimmung und Ausplattieren.

Tieftemperaturlagerung von Schwanzzellen

Der Ablauf entsprach dem des Passagierens bis zur Bestimmung der Zellzahl. Nachdem die Zellzahl ermittelt worden war, erfolgte eine neue Zentrifugation bei 300g für 5 Min. und das Entfernen des Überstandes. Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert, sodass 1 ml Medium 1.000.000 Zellen enthielt. Anschließend wurde je 1 ml der Suspension in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -195 °C in flüssigem Stickstoff.

Auftauen von Schwannzellen

Zur Vorbereitung wurde in jedes Well einer 6-Well-Platte 1 ml Schwannzellmedium pipettiert und bei 37 °C inkubiert. Das Kryoröhrchen, welches die eingefrorenen Zellen beinhaltete, wurde so lange in das 37 °C warme Wasserbad gehalten, bis es gerade aufgetaut war und anschließend zusammen mit 5 ml Schwannzellmedium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 300g bei 4 °C für 5 Min. und sorgfältigem Abpipettieren des Überstandes erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in 6 ml Schwannzellmedium mit anschließendem Ausplattieren auf die vorbereitete Platte mit 1 ml/Well.

2.4.3 Western-Blot

Proteinlyse

Zur Vorbereitung des Western-Blots wurden die Zellen lysiert. Dafür wurde ein Well mit einer hohen Schwannzellichte und wenig Fibroblasten gewählt. Nach zweimaligem Waschen des Wells auf Eis mit 1 ml PBS und vollständigem Absaugen wurden 100 µl des Lyse-Puffers auf die Zellen pipettiert, diese gründlich mit einem Zellschaber abgelöst und das daraus entstandene Lysat in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation bei 15.000g bei 4 °C für 30 Min. War diese abgeschlossen, wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Konzentrationsbestimmung mittels Qubit®

Die Konzentrationsbestimmung des Proteinlysats, welches für den Western-Blot verwendet wurde, erfolgte mittels Qubit®. Hierzu wurde gemäß des Herstellerprotokolls mit dem Qubit® Protein Assay Kit, das zuvor auf

Raumtemperatur gebracht worden war, gearbeitet: Drei 500 µl PCR-Gefäße für die Standardmessung und ein 500 µl PCR-Gefäß für jede Probe des Lysats wurden bereitgestellt. Die Qubit® Working Solution wurde vorbereitet, indem Qubit® Protein Reagent und Qubit® Protein Buffer im Verhältnis 1:200 verdünnt wurden. Anschließend wurden 190 µl dieser Qubit® Working Solution und 10 µl der Standardreagenzien 1 – 3 zusammenpipettiert; für die Proben wurden 199 µl Qubit® Working Solution und 1 µl Probe verwendet. Im nächsten Schritt wurden die Reaktionsgefäße 2 – 3 Sek. mittels Vortex-Genie 2 vermischt und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Qubit® 2.0 Fluorometer zuerst mittels der 3 Standards kalibriert, anschließend wurden die Proben gemessen.

Western-Blot

Zur Vorbeitung der Proben wurden 6,25 µl Nu Page LDS Sample Buffer (4x), 2,5 µl Nu Page Reducing Agent (10x) und 16,25 µl der Probe in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß zusammenpipettiert und gemischt. Die Proben wurden bei 70 °C für 10 Min. im Heizblock aufgeköcht und anschließend 1 Min. bei 11.000g zentrifugiert. Währenddessen wurde das Gel mit den Taschen nach innen in die Western-Blot-Kammer gestellt. Danach wurde in die äußere Kammer 600 ml 1x MES-SDS Running Buffer und in die innere Kammer 200 ml 1x MES-SDS Running Buffer + 500 µl NuPage™ Antioxidant gefüllt. Nun wurden die Taschen mit 20 µl Probe bzw. 15 µl Marker befüllt und der Blot wurde für 50 Min. bei 200 V und 120 mA laufen gelassen.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel entnommen und mittels Programm 3 des iBlot 7 Min. geblottet. Danach wurde der Marker mittels Kugelschreiber nachgezeichnet und der Blot für 45 – 60 Min. in frischer Blockinglösung schüttelnd geblockt. Nach dieser Zeit erfolgte eine Inkubation über Nacht mit Primärantikörper, der in 2 ml Blockinglösung verdünnt war, bei 4 °C im Macs Mix.

Am nächsten Tag erfolgten drei je fünfminütige Waschschriffe schüttelnd mit 0,1 % TBS-T. Der Sekundärantikörper wurde in 2 ml 0,1 % TBS-T verdünnt und der Blot bei 4 °C für 60 Min. erneut im Macs Mix inkubiert. Es folgten fünf weitere fünfminütige Waschschriffe in 0,1 % TBS-T.

Zur Entwicklung des Blots wurden je 0,5 ml der ECL-Reagenzien 1 und 2 in einem 2 ml Eppendorfgefäß vermischt, mit Vortex-Genie 2 gemischt, auf den Blot gegeben und für 2 Min. inkubiert. Für diesen und die folgenden Schritte befand sich der Blot in einer Fotokassette. Für die Entwicklung in der Dunkelkammer wurde der Film für die gewünschte Zeit zur Belichtung auf den Blot gelegt und anschließend entwickelt. Der Marker wurde mittels Permanentmarker auf den Film übertragen.

Um den vorherigen Antikörper zu entfernen, wurde der Blot in Stripping Puffer für 90 Min. unter dem Abzug inkubiert. Es schlossen sich fünf Waschschriffe in 0,1 % TBS-T für 5 Min. und ein anschließendes Blocken in Blockinglösung für 15 Min. an. Danach wurde der Blot erneut mit Primärantikörper über Nacht bei 4 °C im Macs Mix inkubiert. Die restlichen Schritte entsprachen den obigen.

2.4.4 Lentivirale Transfektion

Bakterielle Transformation

Zunächst wurde LB-Medium mit Agar für 20 Min. autoklaviert und auf ca. 50 °C abgekühlt, dann wurde im noch flüssigen Zustand 1 ml der Chloramphenicol-Stocklösung zugegeben und anschließend zur Herstellung von Agarplatten auf Petrischalen (10 cm) gegossen.

DH5 α -Zellen wurden aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen und auf Eis gestellt, 25 μ l der Bakteriensuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 2,5 μ l des shRNA-Plasmid-Stocks hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Es folgte eine

30-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die Proben für 90 Sek. in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C gestellt (Hitzeschock). Die Proben wurden mit 1 ml LB-Medium ohne Agar versehen und schüttelnd bei 37 °C für 90 Min. inkubiert.

100 µl der Suspension wurden entnommen und auf eine Agar-Platte ausplattiert, die restlichen 900 µl wurden für 5 Min. bei 3.000g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium ohne Agar resuspendiert. Diese Lösung wurde auf eine zweite Agar-Platte gegeben.

Es folgte eine Inkubation bei 37 °C bis zum nächsten Tag.

Am nächsten Tag wurden zwei einzelne Kolonien von den Agarplatten abgenommen und je eine Kultur wurde in jeweils 5 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (34 mg/ml) gegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C wurde diese Vorkultur am nächsten Tag in 150 ml LB-Medium ohne Agar überführt und wieder bei 37 °C inkubiert. Nach ca. 24 h wurde die Kultur bei 3.000g abzentrifugiert.

Maxipräparation

Es folgte die Maxipräparation von insgesamt 300 ml Kultur über drei Säulen, hierfür wurde das endotoxinfreie NucleoBond®PC 500 EF-Kit verwendet. Die angegebenen Lösungen stammten aus diesem Kit; die hier angeführte Beschreibung dieser Methode orientiert sich am Herstellerprotokoll des Kits.

Es erfolgte zunächst ein Zentrifugationsschritt bei 6.000g für 15 Min. bei 4 °C. Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 12 ml Buffer S1-EF + RNase A resuspendiert. Danach wurden 12 ml Buffer S2-EF hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde einige Male invertiert und für 2 – 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. 12 ml des 4 °C kühlen Buffer S3-EF

wurden hinzugefügt. Es folgte erneutes Invertieren, bis eine homogene Lösung erreicht war. Diese wurde für 5 Min. auf Eis inkubiert.

Drei NucleoBond®-Säulen wurden durch Äquilibration mit Buffer N2-EF vorbereitet. Der Rest des Puffers wurde verworfen. Je 100 ml Lösung wurden durch NucleoBond® Folded Filters filtriert. Anschließend wurde das Lysat in eine NucleoBond® AX 500 Säule überführt.

Danach wurden die Säulen gewaschen. Dafür wurden zuerst 2 x 24 ml Buffer N3-EF und folgend 2 x 12 ml Buffer N4-EF verwendet. Das Plasmid wurde in 15 ml Buffer N5-EF gelöst. Anschließend wurden 11 ml Isopropanol hinzugefügt. Es folgte eine Zentrifugation bei 15.000g bei 12 °C für 30 Min.; dann wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 5 ml 70 % Ethanol (Endotoxin-Free) resuspendiert. Erneut wurde mit 15.000g bei Raumtemperatur für 10 Min. zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt und das Pellet für mindestens 5 – 10 Min. luftgetrocknet, bevor es in 1 ml Buffer TE-EF gelöst wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Aufbereitung der 293T-Zellen

Ein im Stickstofftank gelagertes Kryoröhrchen der 293T Zellen wurde im Wasserbad aufgetaut, mit 15 ml 293T-Medium in eine Zellkulturflasche T75 überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zum nächsten Tag inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel.

Eine Konfluenz von 80 % erforderte eine neue Passage der Zellen. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt, die Flasche einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 0,25 % Trypsin bei 37 °C für 5 – 10 Min. inkubiert, bis sich die Zellen lösten. Die Trypsinreaktion wurde mit 14 ml 293T-Medium beendet. Währenddessen wurden vier Zellkulturflaschen T75 mit je 11 ml 293T-Medium versehen und je 4 ml der Zellsuspension pro Flasche hinzugegeben, sodass jede Flasche 15 ml beinhaltete.

Einen Tag vor der geplanten Transfektion wurden die 293T-Zellen gemäß dem Protokoll „Lenti-vpak Packaging Kit Protocol“ auf Petrischalen (10 cm) ausplattiert. Dazu wurde das vorherige Medium entfernt, ein Waschschrift mit PBS durchgeführt und 2 ml 0,25 % Trypsin auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und ein anschließendes Abstoppen der Reaktion mittels 293T-Medium. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 300g für 5 Min. bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml Aufkonzentrationsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Automated Cell Counter Countess II gezählt.

$2,5 \times 10^6$ Zellen wurden in eine Petrischale (10 cm) ausplattiert. Auch hierfür wurde Aufkonzentrationsmedium verwendet.

Produktion und Aufkonzentration der Lentiviren

Es wurden 1,5 ml Opti-MEM, 5 µg des pLenti-shRNA-Konstruktes, 12 µl verbrauchsfertiges Packaging-Plasmid (0,5 µg/µl) und 33 µl Turbofection in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein tropfenweises Pipettieren auf die Zellen und Inkubation bei 37 °C für 12 – 18 h. Danach wurde ein Mediumwechsel mit Aufkonzentrationsmedium durchgeführt. Einen Tag später wurde der erste virale Überstand geerntet und bei 4 °C in 50 ml Reaktionsgefäße gelagert. Außerdem wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde der zweite virale Überstand geerntet und zum ersten hinzugefügt.

Für die Aufkonzentration wurde der gesammelte virale Überstand bei 500g für 5 – 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Filtration durch 0,45 µm-Filter in 50 ml Reaktionsgefäße, um Zelldetritus zu entfernen. Nun wurde Lenti-Konzentratorlösung im Verhältnis 1:4 zum Überstand gegeben und durch Invertieren vermischt; es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Danach wurde bei 3.500g und 4 °C für 25 Min. zentrifugiert, der Überstand

entfernt und erneut für 5 Min. bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde abpipettiert und das Pellet, bestehend aus viralen Partikeln, in kaltem PBS resuspendiert. Das Verhältnis zwischen PBS und ursprünglich geerntetem Überstand betrug 1:100. Die viralen Partikel wurden bei -80 °C gelagert.

Schwanzzellinfektion

Wie bei der Proteinlyse wurde für die Infektion mit hoher Zellkonfluenz (70 – 80 %) und niedriger Fibroblastendichte in einer 6-Well-Platte gearbeitet. Zuerst erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das alte Medium durch ein mit 10 µg/ml Protamin versetztes Schwanzzellmedium ersetzt wurde. Je nach dem zu verwendenden Virus unterschied sich die weitere Vorgehensweise.

Lentiviral vermittelter ADAM9-knock-down

Dieser Versuch wurde mit vier verschiedenen Vestibularisschwannom-Primärzellkulturen durchgeführt.

Die Menge der benötigten Partikel wurde auf die mit Protamin vorbereiteten Zellen gegeben und folgendermaßen berechnet: Die Zellzahl (ca. 95.000/Well) wurde mit dem Multiplicity of Infection (MOI) multipliziert. Als idealer Wert hatte sich in Vorversuchen (AG Breun) ein MOI von 60 herausgestellt. Daraus ergab sich, wie viele Total transducing units (TU) nötig waren. Die Division durch die angegebene Viruskonzentration in TU/ml ergab dann die Gesamtmenge an Virus pro Well in ml. Für den ADAM9-knock-down wurden 57 µl TL314947VB (ADAM9-knock-down) und 120 µl TR30021V (Scrambled) verwendet und auf die Zellen gegeben.

Zur Infektion wurde ein Well benötigt, das virale Partikel für den ADAM9-knock-down erhielt, ein Well zur Kontrolle, das mit sogenannten Scrambled-Partikeln

infiziert wurde und ein Well, bei dem keine Infektion durchgeführt wurde, um die Zelltoxizität von Puromycin bei untransfizierten Schwanzzellen zu demonstrieren (Abbildung 4). Die Scrambled-Partikel übertrugen eine Puromycinresistenz und führten zu einer GFP-Expression in den Vestibularisschwannomzellen, jedoch vermittelten diese Partikel keinen ADAM9-knock-down. Diese Kontrolle sollte zeigen, dass die Effekte der Partikel, die zu einem knock-down führten, nicht durch die reine Konfrontation der Zellen mit viralen Partikeln entstanden, sondern ausschließlich auf die reduzierte ADAM9-Konzentration der Zelle zurückzuführen waren.

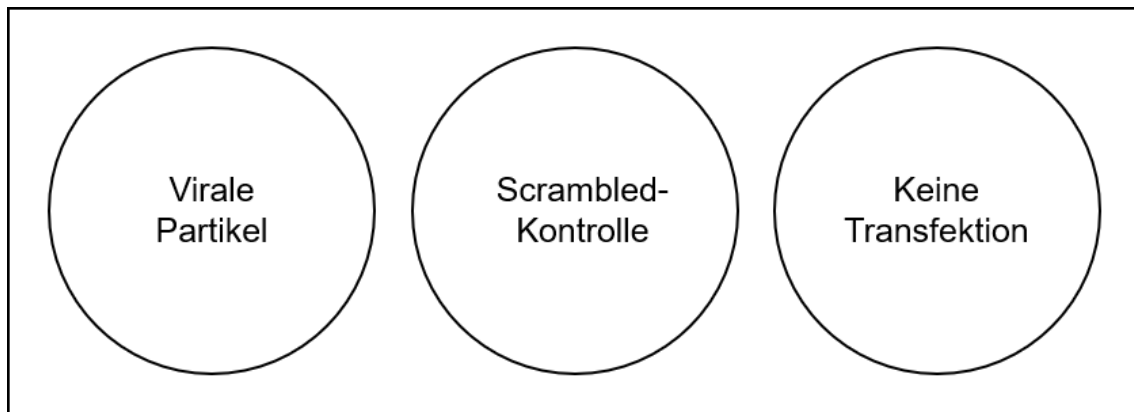


Abbildung 4: Pipettierschema für die ADAM9-Transfektion. Die Vestibularisschwannomzellen im linken Well erhielten die Viruspartikel, die zu einem ADAM9-knock-down führten, die mittleren Zellen wurden mit Viruspartikeln versetzt, die keinen ADAM9-knock-down zur Folge hatten und damit als Kontrolle dienten (Scrambled); bei den Zellen im rechten Well erfolgte keine Transfektion. Eigene unveröffentlichte Abbildung.

An den nächsten beiden Tagen wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf Vitalität begutachtet, an Tag 4 erfolgte eine vorsichtige Spülung jedes Wells mit 1 ml PBS und eine anschließende Zugabe von 2 ml Schwanzzellmedium in jedes Well.

Nach weiteren 24 h an Tag 5 wurde eine Selektion mittels Puromycinmedium (1 µg/ml) durchgeführt, welches das vorherige Medium ersetzte. Um eine Fibroblastenselektion zu erreichen, wurde an Tag 7 das alte Medium abgesaugt und mit 2 ml DMEM versehen. Es folgte ein Mediumwechsel an jedem zweiten Tag wie an Tag 7. Nach drei Medienwechseln mit DMEM wurden von jedem Well fünf Gesichtsfelder unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Hierfür wurde

der Filter L5 ET in 5x-Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von ca. 400 ms verwendet.

Lentiviral vermittelte Merlinüberexpression

Diese Infektion wurde mit drei verschiedenen primären Vestibularisschwannomzellkulturen durchgeführt. Die mit Protamin vorbehandelten Schwannzellen erhielten je 100 µl der mittels Maxipräparation hergestellten viralen NF 2 (NM_000268) Human Tagged ORF Clone Partikel pro Well. Am übernächsten Tag wurde das Medium abgenommen, das Well mit 1 ml PBS gespült und neues Schwannzellmedium auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurde das Transfektionsergebnis fotografisch dokumentiert, indem fünf Gesichtsfelder jeweils unter Durchlicht und unter Fluoreszenz mit dem Mikroskop aufgenommen wurden. Für die Durchlichtaufnahmen wurde im Hellfeld ohne Filter mit einer Belichtungszeit von ca. 35 ms fotografiert, für die Fluoreszenzphotografien wurde der Filter L5 ET mit einer Belichtungszeit von ca. 900 ms verwendet. Die Bilder wurden in der 10x-Vergrößerung aufgenommen.

Nach diesen Schritten wurden die transfizierten Wells sowie ein nicht transfiziertes Kontrollwell zur Durchführung eines Western-Blots lysiert. Die für den Western-Blot verwendeten Antikörper waren gegen NF 2/Merlin 1:200, CXCR4 1:400, ADAM9 1:1.500 und γ -Tubulin 1:5.000 gerichtet.

2.4.5 Auswertungen mittels Image J

Auszählen der Zellzahl

Für die Auszählung der Zellen wurde das Programm Image J verwendet. Unter *File* → *Open* wurde das gewünschte Bild geöffnet, mittels *Image* → *Adjust* → *Brightness/Contrast* → *Auto* ließen sich bessere Kontrastverhältnisse schaffen, die das Zählen erleichterten. Anschließend wurde *Multi-point* per Doppelklick

ausgewählt und jede zu zählende Zelle angeklickt. Dabei registrierte das Programm die Zellzahl und zeigte sie unter *Counter* an.

Bestimmung der Transfektionsrate

Die Transfektionsrate der Schwanzzellinfektion konnte bestimmt werden, indem die mittlere Zellzahl von fünf dokumentierten Gesichtsfeldern unter Fluoreszenz durch die mittlere Zellzahl unter Durchlicht dividiert wurde. Die mittlere Zellzahl erhielt man, wenn man die Summe der Zellzahlen der einzelnen Gesichtsfelder durch die Gesamtanzahl an Gesichtsfeldern dividierte.

Western-Blot-Quantifizierung

Für die Semiquantifizierung eines Western-Blots mittels Image J wurde wie folgt vorgegangen: Zuerst wurde die Bilddatei mit *Open* geöffnet und das entsprechende Bild ausgewählt. Anschließend folgte *Image* → *Type* → *32-Bit*. Nun wurde mittels *Rectangle* ein Kasten um die erste zu bestimmende Bande gezogen. Unter *Analyze* → *Gels* → *Select First Lane* wurde mit der Auswahl der Banden begonnen. Danach wurde der Kasten, der zuvor gezogen wurde, mit der Maus auf die nächste Bande geschoben und *Analyze* → *Gels* → *Select Next Lane* ausgewählt. So wurde verfahren, bis alle zu bestimmenden Banden mit einem Kasten versehen waren.

Waren alle zu quantifizierenden Banden ausgewählt, folgte *Analyze* → *Gels* → *Plot Lanes*. Es erschien ein neues Fenster, das die Bandenstärken als Peaks angab. Diese Peaks wurden nun mittels *Straight* markiert, sodass eine Fläche unter dem Peak entstand. Waren alle Peaks markiert, wurde mit *Wand* in die im vorherigen Schritt entstandenen Flächen geklickt. Ein neues Fenster namens *Results* öffnete sich und gab die Bandenstärke als willkürliche Einheiten an. Diese Werte sind in dieser Arbeit in arbitrary units [a.u.] angegeben. Über

Analyze → *Gels* → *Label Peaks* erhielt man den prozentualen Wert der einzelnen Bandenstärken.

2.4.6 Statistische Auswertung mittels Excel und GraphPad Prism 6

Auswertung der ausgezählten Zellzahlen

Die mittels Image J ausgezählten Zellzahlen wurden in GraphPad Prism 6 eingefügt. Hier wurden die erhobenen Daten durch einen t-Test für unabhängige Stichproben (*Analyze* → *Column analyses* → *t tests* → *unpaired t-test*) auf signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl untersucht, p-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet.

Auswertung der gemessenen Bandenstärken der ERK- und AKT-Signalwege

Die mittels Image J erhaltenen Werte der einzelnen Bandenstärken in [a.u.] wurden in eine Excel-Tabelle kopiert. Dort wurde mit den Werten der Ladekontrolle (γ -Tubulin) begonnen: Der Wert der Kontrolle (in diesem Fall H₂O) wurde durch den Wert der zu beurteilenden Bande (AMD3100 bzw. SDF1) geteilt. Dadurch entstand ein Faktor, mithilfe dessen die übrigen Banden des Western-Blots (ERK, pERK, AKT, pAKT) multipliziert und damit angeglichen werden konnten. Dies wurde für jeden untersuchten Tumor separat berechnet. Anschließend wurden Mittelwerte aus den angepassten Bandenstärken jedes Tumors berechnet und in GraphPad Prism 6 importiert, um einen t-Test durchzuführen.

Hierzu wurden die Mittelwerte der unterschiedlichen Behandlungen (AMD3100, SDF1, H₂O) in drei verschiedene Spalten eingetragen (Group A, B, C) und anschließend über die Funktion *Analyze* → *Column analyses* → *t tests* analysiert. Es wurde ein t-Test für verbundene Stichproben ausgewählt, da die verschiedenen Behandlungen jeweils an Zellen desselben Tumors durchgeführt

worden waren. Unter dem Reiter *Results* ließ sich nun das Ergebnis des t-Tests für verbundene Stichproben ablesen. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt; lag der p-Wert darüber, wurde die Hypothese der Gleichheit der Mittelwerte abgelehnt.

Auswertung der gemessenen Bandenstärken der lentiviral vermittelten Merlinüberexpression

Hier wurde exakt so verfahren wie zur Auswertung der gemessenen Bandenstärken der ERK- und AKT-Signalwege, jedoch wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, da Werte verschiedener Tumoren untereinander verglichen wurden.

2.4.7 Untersuchung der ERK- und AKT-Signalwege nach Stimulation und Inhibition von CXCR4 durch SDF1 bzw. AMD3100

Dieser Versuch wurde mit fünf verschiedenen Vestibularisschwannomzellkulturen durchgeführt.

Die Zellen erhielten eine siebentägige Behandlung mit dem CXCR4-Inhibitor AMD3100 (Plerixafor) bzw. dem CXCR4-Aktivator SDF1 (CXCL12). Hierfür wurden drei Wells einer Tumorzellkultur mit ca. 70 – 80 % Konfluenz benötigt. Im Vorfeld wurde der Tumor mittels Western-Blot positiv auf CXCR4-Expression überprüft.

AMD3100-Lösung, SDF1-Lösung und H₂O-Lösung wurden in sechs 1,5 ml Eppendorfgefäße zu je 1,5 ml aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Das alte Schwannzellmedium wurde abgesaugt und je 1,5 ml der jeweiligen Medien entsprechend Abbildung 5 auf die Zellen gegeben:

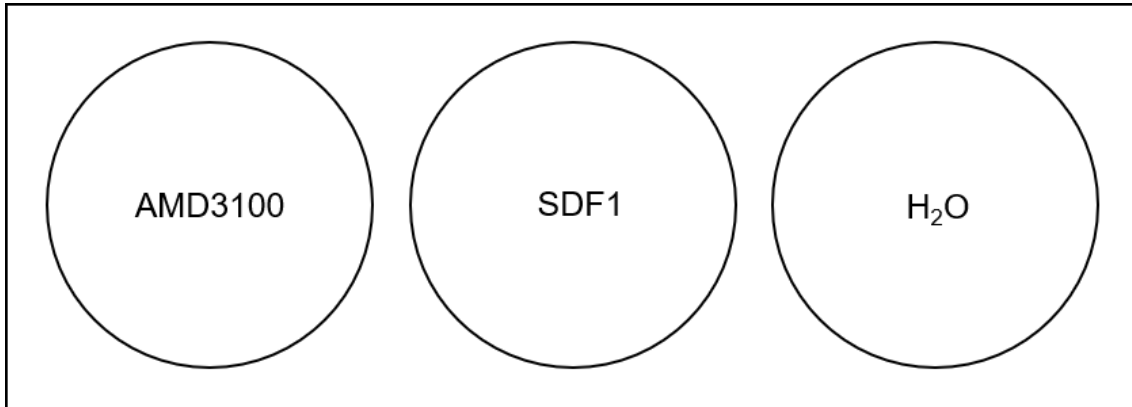


Abbildung 5: Pipettierschema für die Stimulation und Inhibition von CXCR4. Je ein Well einer Vestibularisschwannom-Primärzellkultur wurde über sieben Tage mit AMD3100 (CXCR4-Inhibition, linkes Well), SDF1 (CXCR4-Stimulator, mittleres Well) und H₂O (Kontrollwell ohne Intervention, rechtes Well) behandelt. Eigene unveröffentlichte Abbildung.

Nachdem die Tumorzellen sieben Tage mit den beschriebenen Medien behandelt worden waren, erfolgte eine Proteinlyse und ein anschließender Western-Blot mit den Antikörpern Anti-ERK1 + ERK2 1:10.000, AKT (pan) 1:1.000 und Anti-Phospho-AKT (Ser473) 1:400.

2.4.8 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung auf ADAM9 und Integrin $\alpha 6$ bzw. Integrin $\alpha 2\beta 1$

Dieser Versuch wurde mit elf (Integrin $\alpha 6$) bzw. neun (Integrin $\alpha 2\beta 1$) verschiedenen Vestibularisschwannomen durchgeführt.

Die zu färbenden Objektträger trugen 3 μ m dicke Paraffinschnitte der Tumoren. Als Positivkontrolle diente ein humaner Lymphknoten, der durch das Pathologische Institut der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt wurde. Zuerst erfolgte ein Entparaffinieren der Schnitte mittels einer Xylol-/Alkoholreihe in Glaswannen, in die die Objektträger auf einem Glasschlitten getaucht wurden (Tabelle 15).

Die Objektträger wurden aus dem Glasschlitten in einen Färberahmen aus Metall umgebettet und für 20 Min. im Dampfgarer in Citratpuffer geköchelt.

Anschließend wurde der Inhalt des Dampfgeräts ins Waschbecken gestellt und für 10 Min. mit fließendem Leitungswasser übergossen. Es folgten zwei weitere fünfminütige Waschschrte im TBS-Triton-X-Puffer, danach wurde die überschüssige Flüssigkeit auf dem Objektträger entfernt und der Schnitt mittels PAP-Pen umrandet, um einen Auslaufschutz für die folgende IF-Blockinglösung herzustellen.

Tabelle 15: Xylol-/Alkoholreihe zum Entparaffinieren der Präparate.

Lösung	Dauer
Xylol	10 Min.
Xylol	10 Min.
100 % Ethanol	30 Sek.
100 % Ethanol	5 Min.
96 % Ethanol	30 Sek.
96 % Ethanol	5 Min.
70 % Ethanol	30 Sek.
70 % Ethanol	5 Min.
50 % Ethanol	kurz schwenken
50 % Ethanol	kurz schwenken
50 % Ethanol	kurz schwenken
Aqua dest.	kurz schwenken
TBS-T	kurz schwenken

Jeder Schnitt wurde mit 100 µl IF-Blockinglösung komplett bedeckt und für 2 h inkubiert. Danach wurde die IF-Blockinglösung entfernt, das Präparat mit 100 µl Antikörperverdünnung versehen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zweimalig für 5 Min. in TBS-Triton-X-Puffer gewaschen und erhielten anschließend im Dunkeln 100 µl des Sekundärantikörpers (Alexa Fluor™ Plus 555; Goat anti-Rabbit IgG). Nach einer einstündigen Inkubationszeit erfolgten drei fünfminütige Waschschrte in TBS-T,

danach wurde Fluoroshield Mounting Medium with DAPI auf das Präparat gegeben, dieses mit einem Deckglas bedeckt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Die mikroskopische Kontrolle folgte mittels der Fluoreszenzfunktion des Mikroskops DMI 3.000B der Firma Leica. Hierfür wurde in 40x-Vergrößerung der Filter A zur Detektion der mit DAPI gefärbten Zellkerne verwendet (Belichtungszeit 77 ms); Filter L5 ET detektierte das grün gefärbte Integrin (Belichtungszeit 2,5 Sek.) und Filter Y3 ET bzw. TXR ET das rot leuchtende ADAM9 (Belichtungszeit 1,5 Sek.). Anschließend ermöglichte es die Kamerasoftware DFC 450C, die Färbung fotografisch festzuhalten und die Bilder als „Image Overlay“ übereinanderzulegen, um mögliche Kollokalisierungen zu erkennen.

2.4.9 Cytokin-Screen

Dieser Versuch wurde mit drei verschiedenen Vestibularisschwannomen und einem gesunden, durch Autopsie gewonnenen N. vestibularis gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt.

40 mg frisches Tumormaterial wurden zerkleinert und in 400 µl Cell-Lysis-Buffer gegeben. Mittels Glas-Homogenisator erfolgte ein Homogenisieren des Materials, welches anschließend für 20 – 30 Min. bei 11.000g bei 4 °C zentrifugiert wurde. Mit dem gesunden Kontrollnerven wurde ähnlich verfahren: 40 mg frisches Nervenmaterial wurden mit 1 ml Cell-Lysis-Buffer versetzt, homogenisiert und wie beschrieben abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Qubit® bestimmt und mittels Cell-Lysis-Buffer eine Konzentration von 1 – 5 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde so viel Blockingbuffer hinzugegeben, dass sich 1 ml Lösung mit der gewünschten Proteinkonzentration im Eppendorfgefäß befanden. Nun wurde die Cytokine Antibody Array Membran mit der bedruckten Seite nach oben in eine Schale

eines 8-Well-Trays platziert und schüttelnd in 2 ml des 1x Blockingbuffers für 30 Min. mit 0,5 – 1 Umdrehungen pro Sekunde inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit und Absaugen des Blockingbuffers wurde 1 ml der Probe in das Well pipettiert. Nun erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C, bei welcher das Tray wie oben bereits beschrieben geschüttelt wurde.

Am nächsten Tag wurden zunächst die Wash Buffer 1 und 2 hergestellt und die Membran schüttelnd (0,5 – 1 Umdrehungen/Sekunde) in 22 ml des Wash Buffer 1 für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschrte (schüttelnd) mit je 2 ml des Wash Buffer 1 für je 5 Min. bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde das Biotin-Conjugated Anti-Cytokine 2.000x Vial mit 2 ml 1x Blocking Buffer versehen und die Membran für 1,5 – 2 h schüttelnd damit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten erneut drei Waschschrte mit Wash Buffer 1 wie oben beschrieben und zwei weitere Waschschrte mit Wash Buffer 2 unter gleichen Bedingungen.

Im Folgenden wurden 2 µl HRP-Conjugated Streptavidin (1.000x Stock) mit 2 ml 1x Blocking Buffer vermischt, auf die Membran pipettiert und 2 h bei 0,5 – 1 Umdrehungen pro Sekunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder folgten drei Waschschrte mit Wash Buffer 1 und zwei weitere Waschschrte mit Wash Buffer 2.

Für die Detektion wurde der Detection Buffer Mix aus je 250 µl Detection Buffer C und 250 µl Detection Buffer D auf die Membran pipettiert und diese für 2 Min. inkubiert. Anschließend wurde die Membran luftdicht zwischen die Folien einer lichtgeschützten Kassette gelegt und in der Dunkelkammer entwickelt. Dafür wurde der Film für ca. 5 Sek. bis 2 Min. belichtet. Zur Aufbewahrung wurde die Membran in Folie bei -20 °C gelagert.

3 Ergebnisse

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen CXCR4 und ADAM9. In den nachfolgenden Ergebnissen wird gezeigt, welche Rolle sie für die Pathogenese des Vestibularisschwannoms spielen könnten, mit welchen Proteinen sie potenziell interagieren und in welchem Zusammenhang sie mit dem Tumorsuppressorprotein Merlin stehen könnten.

3.1 Proteinexpression von CXCR4 und ADAM9 in Vestibularisschwannomen

Jedes Vestibularisschwannom wurde hinsichtlich seiner CXCR4- und ADAM9-Expression untersucht. Im Folgenden werden exemplarisch zwei Western-Blots zur Veranschaulichung gezeigt. Für CXCR4 sind viele verschiedenen Isoformen, also verschieden große Formen des Proteins, bekannt. Besonders prominent erschienen die Banden der Größe 90 kDa, 55 kDa, 43 kDa sowie 34 kDa. In jedem der untersuchten Tumoren konnte eine deutliche CXCR4-Expression im Western-Blot nachgewiesen werden. Die Bande von ADAM9 wurde mit dem verwendeten Antikörper bei 47 kDa detektiert und war ebenfalls in jedem der untersuchten Vestibularisschwannome nachweisbar (Abbildung 6) (Nattmann et al. 2020).

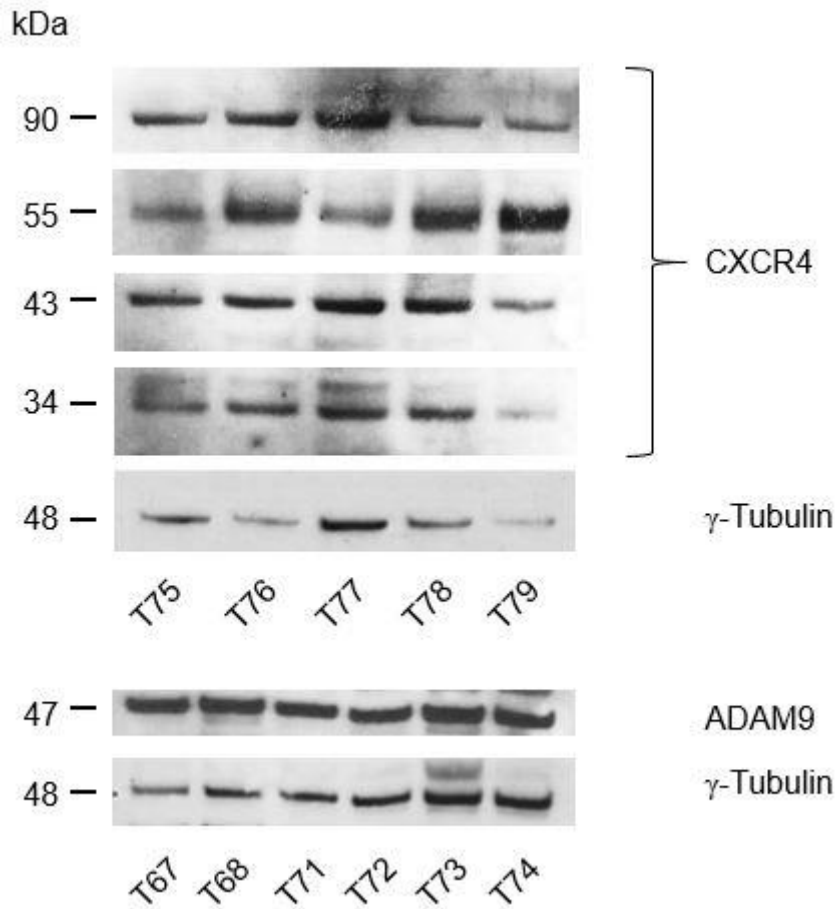
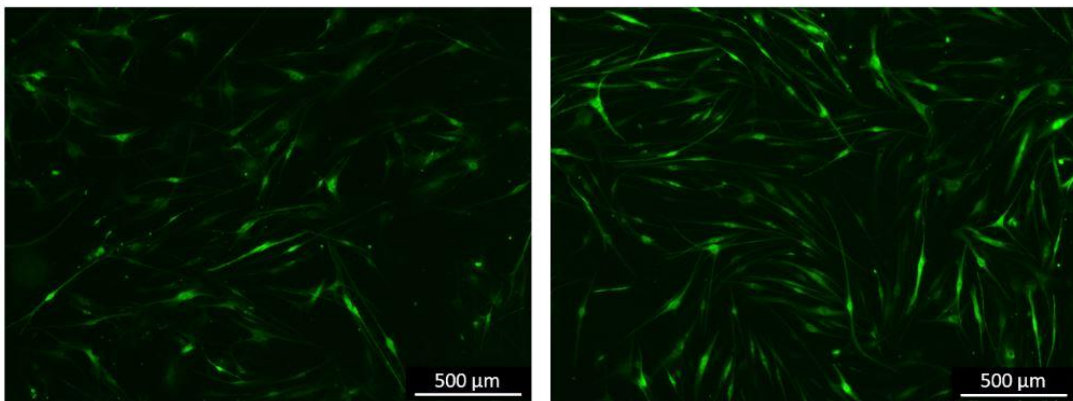


Abbildung 6: Western-Blots zum CXCR4- und ADAM9-Nachweis Die Proteinlysate der Tumoren T75, T76, T77, T78 und T79 wurden per Western-Blot auf ihre CXCR4-Proteinexpression untersucht; in jedem Tumor konnte CXCR4 in verschiedenen Isoformen (34, 43, 55 und 90 kDa) nachgewiesen werden. Die Proteinlysate der Tumoren T67, T68, T71, T72, T73 und T74 wurden per Western-Blot auf ihre ADAM9-Proteinexpression untersucht. In jedem untersuchten Vestibularisschwannom zeigte sich eine deutliche ADAM9-Bande bei 47 kDa. γ -Tubulin diente als Ladekontrolle. Bildquelle: „ADAM9 was not regulated by Merlin in VS.“ von Nattmann et al. 2020, modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 [3].

3.2 Reduzierte Zahl von Vestibularisschwannomzellen nach lentiviral vermitteltem ADAM9-knock-down

Die Vestibularisschwannomzellen, die durch Transfektion einen ADAM9-knock-down erhielten, fielen durch eine deutlich erniedrigte Zellzahl im Vergleich zur Scrambled-Kontrolle auf. Diese Veränderung war statistisch signifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 7) (Nattmann et al. 2020).

a)



b)

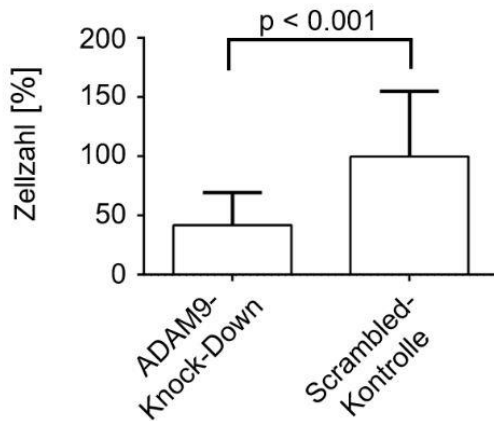


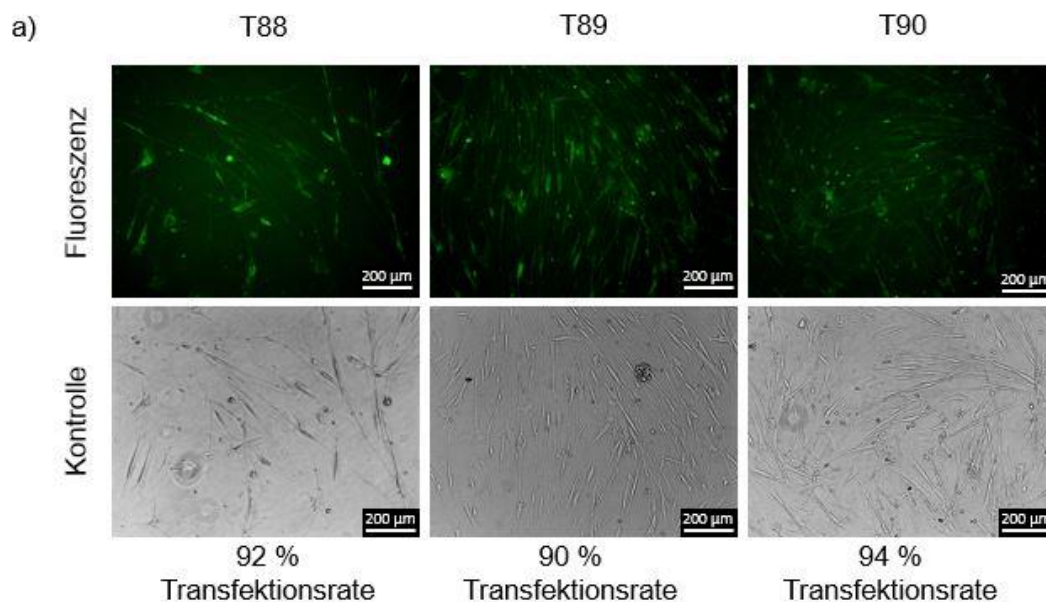
Abbildung 7: Zellreduktion nach ADAM9-knock-down. a) *Links:* GFP-fluoreszierende Vestibularisschwannomzellen mit ADAM9-knock-down. *Rechts:* Scrambled-Kontrolle. Repräsentative Abbildungen von $n = 4$. b) Die Zellzahl mit ADAM9-knock-down war im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert ($p < 0,001$), vier Versuchswiederholungen sind in die Quantifizierung eingeflossen. Bildquelle: „ADAM9 was involved in controlling VS primary cell proliferation.“ von Nattmann et al. 2020, modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 [4].

3.3 Merlin-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Expression von CXCR4 und ADAM9 in Vestibularisschwannomzellen

Vestibularisschwannomprimärzellkulturen wurden lentiviral mit Merlin transfiziert. Dabei ergaben sich hohe Transfektionsraten von 92 % (T88), 90 % (T89) und 94 % (T90) (Abbildung 8a).

Im Western-Blot bestätigte sich die Merlinüberexpression ebenfalls auf Proteinebene (Abbildung 8b). Die 90 kDa-Isoform konnte ausschließlich in den transfizierten Zellen festgestellt werden. Die Expression der 70 kDa-Merlin-Isoform erhöhte sich ebenfalls, wenn auch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abbildung 8c).

Um zu untersuchen, ob die Merlin-Überexpression auch die Proteinexpression von CXCR4 und ADAM9 beeinflusst, wurden auch diese Proteine im Western-Blot analysiert. Allerdings blieb die Expression beider Proteine unverändert (Abbildung 9) (Nattmann et al. 2020).



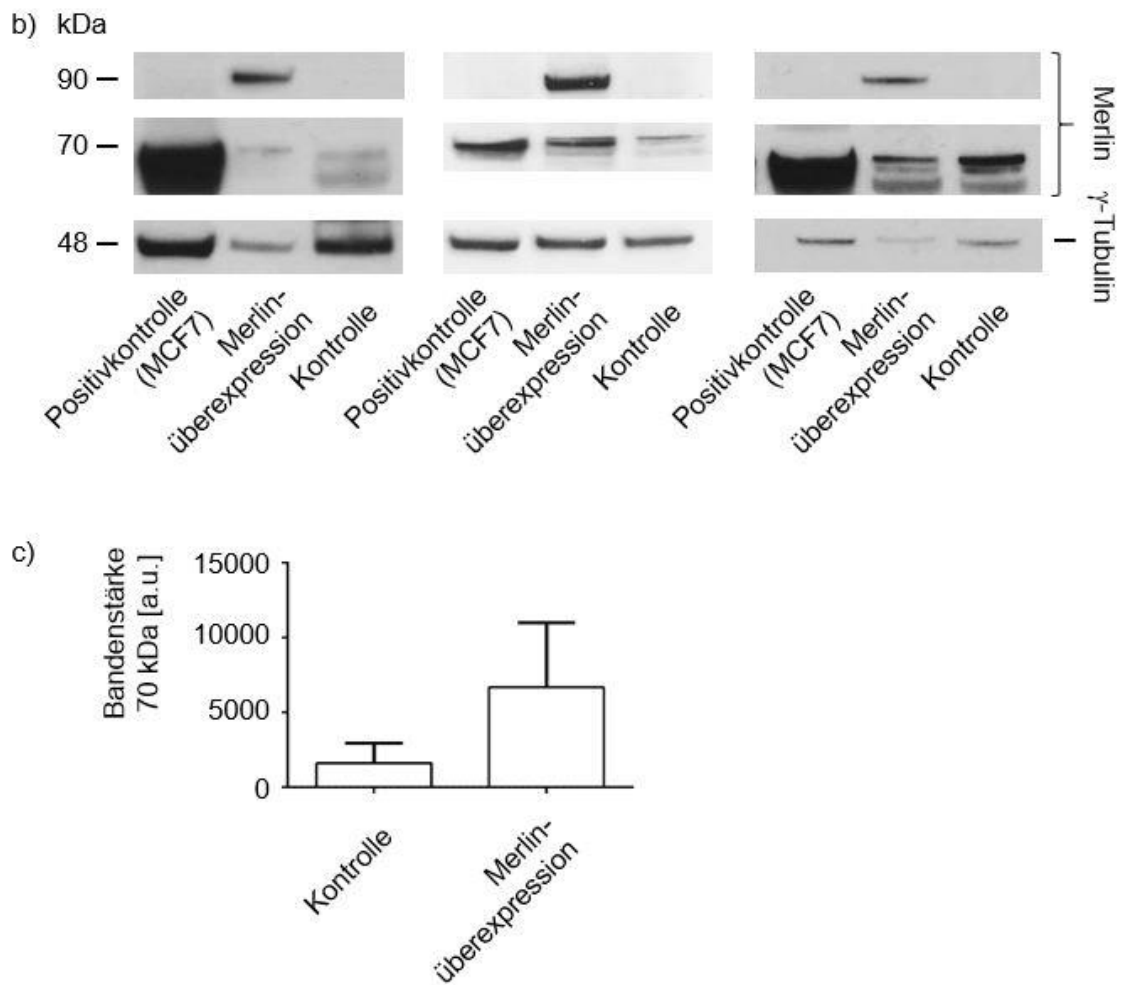


Abbildung 8: Merlintransfektion von Vestibularisschwannomzellen a) zeigt die Gegenüberstellung von Vestibularisschwannomzellen, die mittels lentiviraler Transfektion vermehrt Merlin exprimieren. Die obere Abbildung stellt die Zellen unter Fluoreszenz dar, die untere Aufnahme präsentiert das gleiche Gesichtsfeld unter Durchlicht (Kontrolle). Man sieht, dass fast alle Zellen des Bildausschnitts GFP exprimierten, was auf eine erfolgreiche Transfektion hindeutet. Dies unterstreichen die hohen Transfektionsraten. b) Western-Blots zum Nachweis der lentiviral vermittelten Merlin-Überexpression. Die Primärzellkulturen der Vestibularisschwannome T88, T89 und T90 zeigten im semiquantitativen Vergleich eine erhöhte Proteinmenge bei 70 kDa im Gegensatz zu den unbehandelten Tumorzellen (Kontrolle), die 90 kDa-Bande ließ sich ausschließlich bei den transfizierten Zellen darstellen. c) Die Proteinmenge der 70 kDa-Isoform Merlins war im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Kontrolle) erhöht. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bildquelle: „ADAM9 was not regulated by Merlin in VS.“ von Nattmann et al. 2020, modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 [3].

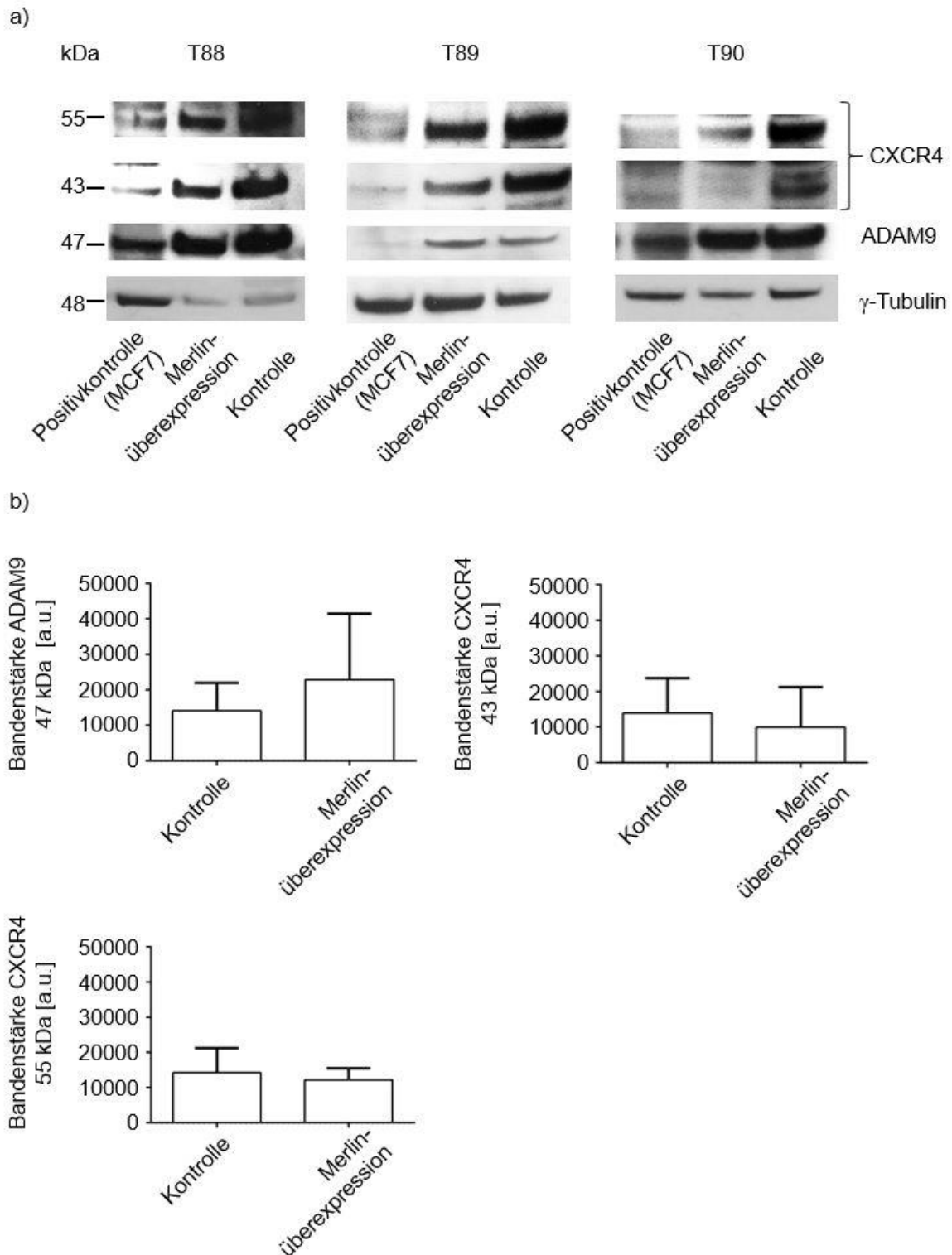
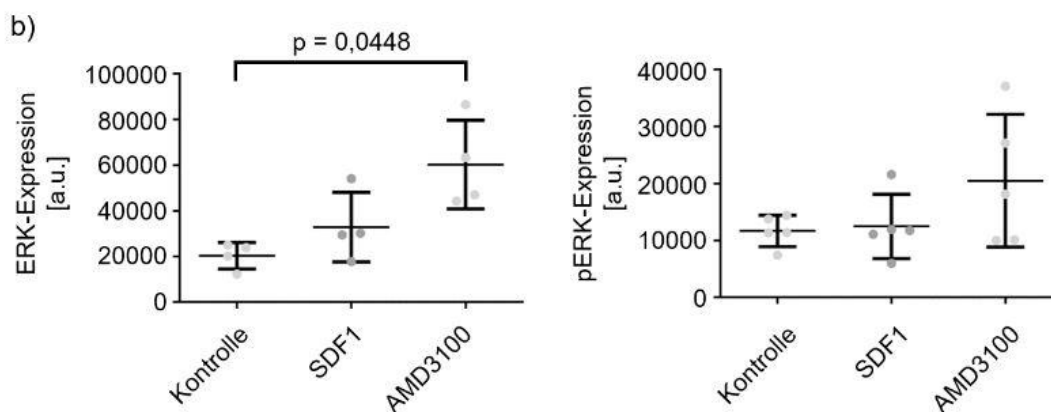
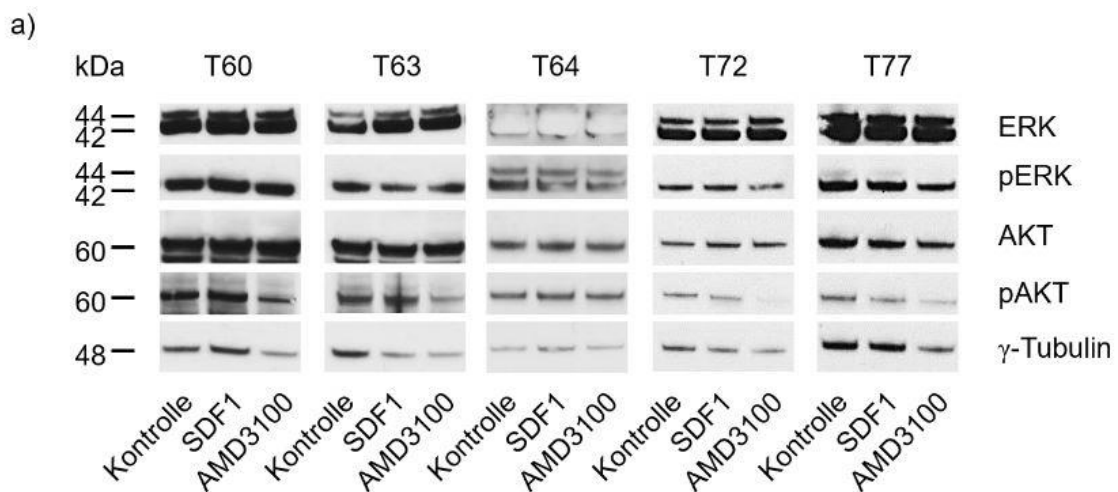


Abbildung 9: Kein Einfluss der Merlintransfektion auf ADAM9- und CXCR4-Proteinexpression. a) Nach der lentiviralen Merlinüberexpression wurden die transfizierten Tumoren auf eine geänderte Proteinexpression von ADAM9 und CXCR4 getestet. Hierbei ließen sich besonders die 47 kDa-Isoform ADAM9s und die 43- und 55 kDa-Isoformen CXCR4s beurteilen. b) Die Merlinüberexpression führte im Vergleich zu unbehandelten Vestibularisschwannomzellen desselben Tumors zu keiner signifikanten Änderung der Proteinexpression von ADAM9 und CXCR4. Bildquelle: „ADAM9 was not regulated by Merlin in VS.“ sowie „ADAM9 was involved in controlling VS primary cell proliferation.“ von Nattmann et al. 2020, modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 [3], [4].

3.4 CXCR4 regulierte weder den ERK- noch den AKT-Signalweg in Vestibularisschwannomprimärzellkulturen

Primärzellkulturen der Tumoren T60, T63, T64, T72 und T77 wurden hinsichtlich ihrer ERK/pERK- und AKT/pAKT-Expression nach einer einwöchigen Behandlung mit AMD3100 zur Inhibition und mit SDF1 zur Stimulation von CXCR4 im Western-Blot verglichen (Abbildung 10a). Kontrolle war eine Behandlung mit H₂O-Lösung. Dabei fiel auf, dass eine CXCR4-Inhibition durch AMD3100 zwar zu einer signifikant erhöhten ERK-Expression ($p = 0,0448$) aber lediglich zu einer nicht signifikanten tendenziellen Erhöhung von pERK führte. AKT zeigte nur deskriptive Veränderungen, ohne dass pAKT beeinflusst wurde. Die Stimulation von CXCR4 durch SDF1 hatte ähnliche, aber durchweg nicht signifikante Effekte (alle $p > 0,05$) (Abbildung 10b, c).



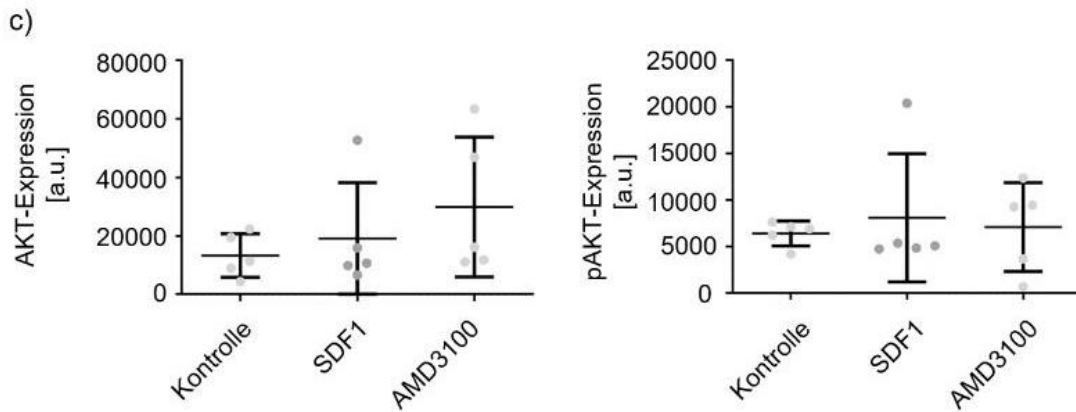


Abbildung 10: Expression von ERK/pERK sowie AKT/pAKT durch Vestibularisschwannomzellen nach CXCR4-Stimulation durch SDF1 bzw. -Inhibition durch AMD3100. a) Western-Blot-Analyse von fünf Vestibularisschwannom-Primärzellkulturen. b) Semiquantitativer Vergleich der ERK- (links) und pERK (rechts) sowie c) der AKT- (links) und pAKT-Expression (rechts) aus a). Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte +/- Standardabweichung; n = 5 (bzw. n = 4 bei ERK). γ -Tubulin diente als Ladekontrolle. Eigene unveröffentlichte Abbildung.

3.5 Kolokalisation von ADAM9 und Integrin $\alpha 6$ in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Es sollte untersucht werden, ob ADAM9 und Integrin am gleichen Ort im Vestibularisschwannom lokalisiert sind. Als Vorversuch wurden deshalb vier Tumoren darauf getestet, ob sie Integrin $\alpha 6$ exprimierten. Dies war bei allen Tumoren der Fall (Abbildung 11), die Banden bei 120 kDa und 140 kDa sind deutlich zu erkennen.

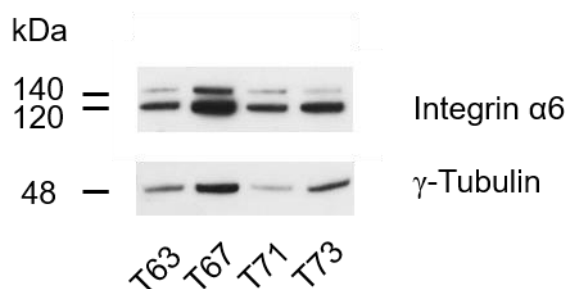


Abbildung 11: Western-Blot zum Nachweis von Integrin $\alpha 6$. Vier Tumoren wurden auf ihre Integrin $\alpha 6$ -Expression getestet. In allen Tumoren war Integrin $\alpha 6$ (Molekulargewicht 120 und 140 kDa) nachweisbar, wobei die 120 kDa-Isoform stärker als die 140 kDa-Isoform exprimiert war. γ -Tubulin diente als Ladekontrolle. Eigene unveröffentlichte Abbildung.

Die Färbung für Integrin $\alpha 6$ und ADAM9 wurde bei elf Tumoren durchgeführt, in zehn davon war Integrin $\alpha 6$ nachweisbar. ADAM9 war in jedem histologischen Schnitt nachweisbar und gleichmäßig im Vestibularisschwannom exprimiert (besonders stark an Gefäßen), Integrin $\alpha 6$ zeigte ein inhomogenes Verteilungsmuster: Areale mit fehlendem Protein v.a. im Inneren des Tumors wechselten sich mit Bereichen starker Expression (Abbildung 12a) ab. An den Stellen, an denen Integrin $\alpha 6$ nachgewiesen werden konnte, gab es eine Kolokalisation von Integrin $\alpha 6$ mit ADAM9. Im Fall einer solchen Kolokalisation der beiden Proteine erscheinen diese als gelbes Areal im Präparat. Diese Kolokalisation findet sich vor allem in bindegewebsreichen Regionen des Tumors (Abbildung 12b), an Gefäßen (Abbildung 12c) und in der Nähe der Tumorkapsel (Abbildung 12e, f). In einem einzelnen Tumor ließ sich keine Kolokalisation erkennen; ADAM9 war hier reichlich vorhanden, eine Integrin $\alpha 6$ -Expression hingegen war nicht nachweisbar (Abbildung 12d) (Nattmann et al. 2020).

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von ADAM9 und Integrin $\alpha 2\beta 1$ wurde an neun Vestibularisschwannomen durchgeführt und hinsichtlich der Kolokalisation der beiden Proteine beurteilt (Abbildung 12g, h). ADAM9 war auch hier in jedem Tumor vertreten, die Expression von Integrin $\alpha 2\beta 1$ fiel allerdings deutlich geringer aus als die Expression von Integrin $\alpha 6$. Nur bei zwei der gefärbten Tumoren war Integrin $\alpha 2\beta 1$ deutlich angefärbt, die anderen Tumoren wiesen eine geringe bis fehlende Expression auf (Abbildung 12h). Eine Kolokalisation konnte nur bei zwei der untersuchten Tumoren vereinzelt beobachtet werden (Abbildung 12g). Außerdem ließ sich kein Trend hinsichtlich Tumorkapsel oder -binnengewebe feststellen, wie dies bei Integrin $\alpha 6$ der Fall war (Nattmann et al. 2020).

Insgesamt konnte bei 91 % der Vestibularisschwannome per Immunfluoreszenz Integrin $\alpha 6$ nachgewiesen werden, Integrin $\alpha 2\beta 1$ nur in 22 % (Abbildung 13) (Nattmann et al. 2020).

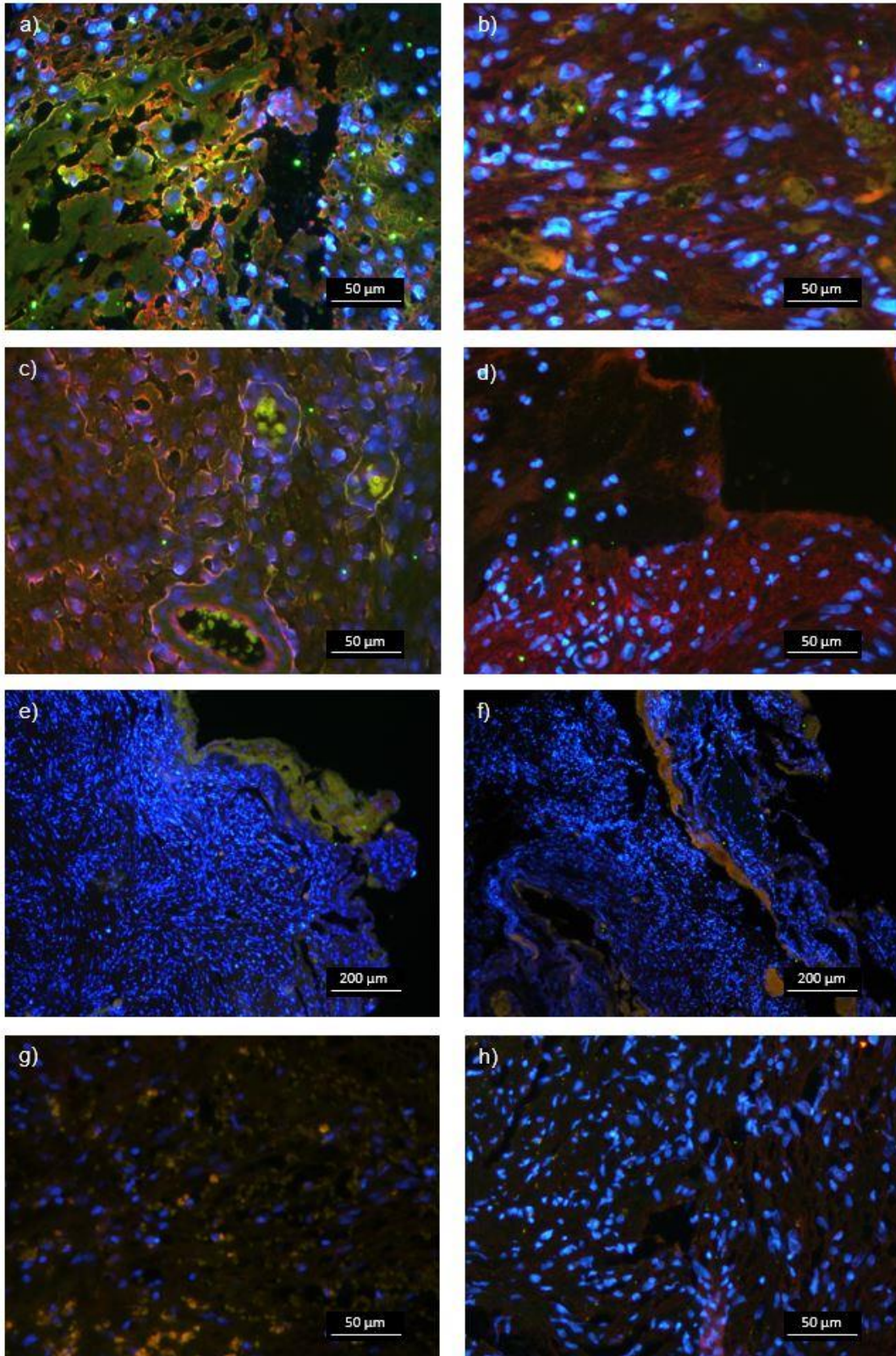


Abbildung 12 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von ADAM9 und Integrin. a-f) Doppelfärbung von ADAM9 und Integrin $\alpha 6$ in 40x-Vergrößerung. e) und f) Kapselbetonte Kolokalisation der beiden Proteine in 10x-Vergrößerung. g) und h) ADAM9 und Integrin $\alpha 2\beta 1$ 40x vergrößert. Die Zellkerne der Schwanzzellen erscheinen durch DAPI-Färbung blau, ADAM9 rot und das Integrinmolekül grün. Bildquelle: „Co-localization of ADAM9 with Integrin $\alpha 6$ and Integrin $\alpha 2\beta 1$ in VS tumor samples.“ von Nattmann et al. 2020, modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 [5].

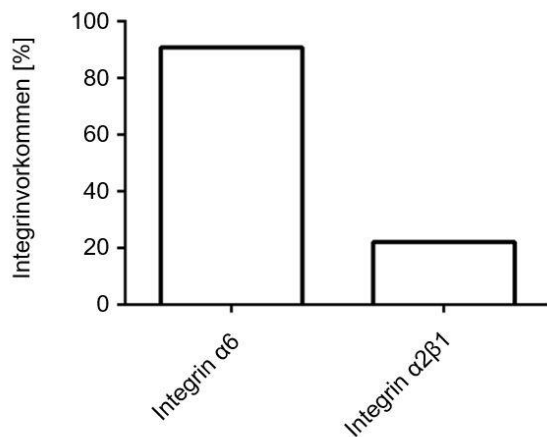


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Vestibularisschwannome mit Integrinexpression. Integrin $\alpha 6$ konnte in 91 % der per Immunfluoreszenz untersuchten Vestibularisschwannome nachgewiesen werden, Integrin $\alpha 2\beta 1$ nur in 22 %. Eigene unveröffentlichte Abbildung.

3.6 Cytokin-Screen ausgewählter Vestibularisschwannome im Vergleich zum gesunden Nerven

Um weitere, potenziell an der Pathogenese des Vestibularisschwannoms beteiligte Signalwege zu identifizieren, wurde ein Cytokin-Screen auf 80 verschiedene Cytokine durchgeführt. Ziel war es, Cytokine zu finden, die in Vestibularisschwannomen im Vergleich zum gesunden Nerven verändert exprimiert werden. Abbildung 14a listet die untersuchten Cytokine ausführlich auf. Die untersuchten Cytokine mit veränderter Expression wurden in Abbildung 14b farblich hervorgehoben. Im Vergleich zum gesunden N. vestibulocochlearis waren Cytokine Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF) und Macrophage-derived Cytokine (MDC) in den Tumoren T65, T68 und T72 vermindert exprimiert. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) war dagegen nur in Tumor T72 erniedrigt, während die Tumoren T65 und T68 im Vergleich zum gesunden Nerven keine Änderung zeigten. In allen drei untersuchten Tumoren wiesen Angiogenin, Neutrophil Activating Peptide-2 sowie Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) eine erhöhte Expression im Vergleich zum gesunden Nerven auf.

a)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	PK	PK	PK	PK	NK	NK	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α
2	I-309	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF ↓	MDC ↓	MIG	MIP-1b
4	4 MIP-15	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Angiogenin
5	Onco-statin M	Thrombo-poietin	VEGF	PDGF-BB	Leptin	BDNF ↓	BLC	Ck β 8-1	Eo-taxin	Eo-taxin-2	Eo-taxin-3
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	FIt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2 \uparrow	NT-3
8	NT-4	Osteopontin	Osteoprotegerin	PARC	PIGF	TGF- β 2	TGF- β 3	TIMP-1	TIMP-2 \uparrow	PK	PK

b)

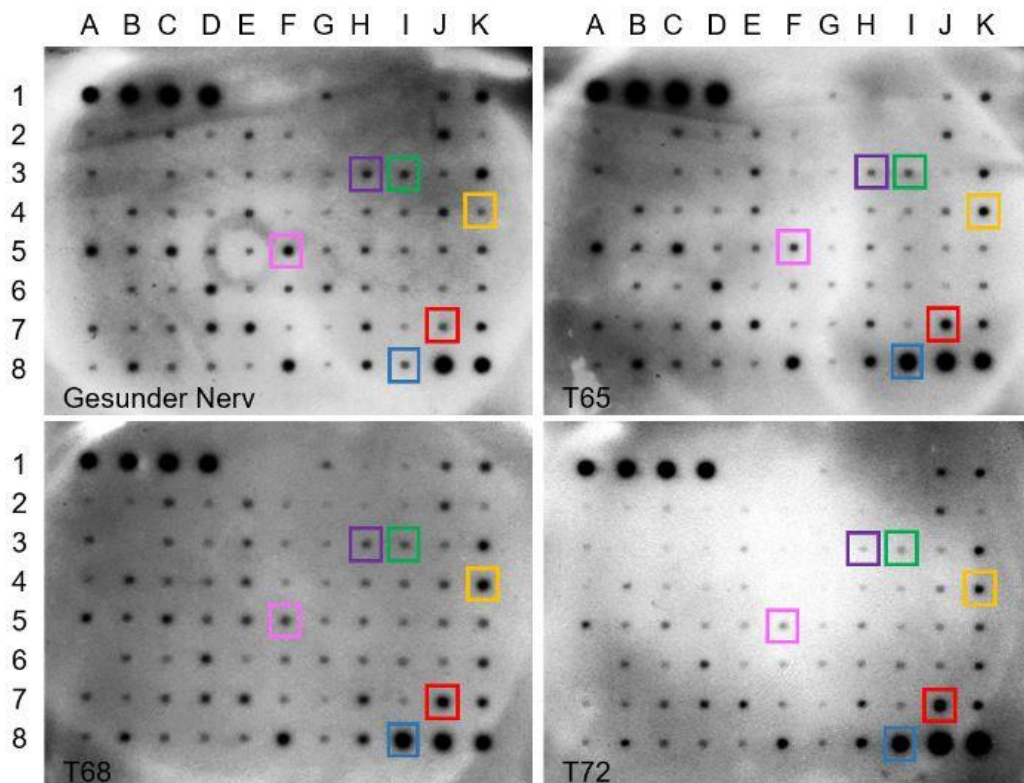


Abbildung 14: Cytokinexpression der Tumoren T65, T68 und T72 im Vergleich zu einem gesunden N. vestibulocochlearis. a) Tabellarische Auflistung der untersuchten Cytokine. Die farblich hervorgehobenen Cytokine entsprechen den farbigen Markierungen in b). Ein \uparrow markiert eine höhere Proteinmenge, ein \downarrow weist auf eine geringere Proteinmenge im Vergleich zum gesunden Nerv hin. b) Cytokine Antibody Array Membranen der vier Tumoren. Hervorgehoben wurden Cytokine mit veränderter Expression: violett MCSF, grün MDC, pink BDNF, orange Angiogenin, blau TIMP-2, rot NAP-2. Eigene unveröffentlichte Abbildung.

4 Diskussion

Es ist bekannt, dass die ERK- und AKT-Signalwege in Schwannomen verstärkt aktiviert sind (Ammoun et al. 2008). Durch eine inaktivierende Merlinmutation, dem Haupt-Pathomechanismus des Vestibularisschwannoms, kommt es u.a. zu einer Überaktivierung des Schwanzzell-Mitogens Neuregulin 1 (NRG1), welches vermehrt Rezeptoren auf der Zellmembran von Schwanzzellen ausbildet und dadurch die oben genannten Signalwege aktiviert (Carroll 2012). Da aber auch CXCR4 eine solche aktivierende Rolle übernehmen kann (Domanska et al. 2013) und eine erhöhte Expression im Vestibularisschwannom nachgewiesen wurde (Breun et al. 2018), wurde vermutet, dass neben Merlin auch CXCR4 an der Aktivierung dieser Signalwege im Vestibularisschwannom beteiligt und über diesen Mechanismus entscheidend für die Tumorentstehung und -proliferation des Vestibularisschwannoms sein könnte.

Generell wurde erkannt, dass CXCR4 eine bedeutende Rolle für Entstehung und Wachstum maligner neuronaler und glialer Hirntumoren spielt, so etwa bei Glioblastoma multiforme, Medulloblastom oder dem Astrozytom. Das Wachstum dieser Tumoren konnte durch den CXCR4-Inhibitor AMD3100 im Xenograftmodell reduziert werden (Rubin et al. 2003). Auch in vitro konnte AMD3100 die durch Aktivierung von ERK und AKT hervorgerufenen wachstumsfördernden Effekte von SDF1 in Glioblastomzelllinien blockieren (Rubin et al. 2003). Mit AMD3100 behandelte Vestibularisschwannomzellkulturen zeigten eine Wachstumshemmung (Breun et al. Manuskript in Vorbereitung). Es wurde daher in dieser Arbeit analysiert, ob durch gezielte SDF1 vermittelte CXCR4-Stimulation bzw. dessen Inhibition durch AMD3100 eine Veränderung der Aktivität der genannten Signalkaskaden erreicht werden kann. Hierzu wurde per Western-Blot eruiert, ob sich die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von ERK bzw. AKT verändert. Dies war allerdings nicht der Fall.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die gesteigerte Expression von CXCR4 nicht maßgeblich an einer Aktivierung der ERK- und AKT-Signalwege im

Vestibularisschwannom beteiligt ist. Im Cytokin-Screen konnte bei allen untersuchten Vestibularisschwannomen eine erhöhte Expression des Chemokins CXCL7 (Synonym: NAP-2) festgestellt werden. Eine solche Beobachtung wurde nach Kenntnis der Autorin bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. CXCL7 fördert die Zellproliferation, indem es an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 bindet und dadurch Endothelzellproliferation und Angiogenese stimuliert (Grépin et al. 2014). Beide spielen eine Rolle in verschiedenen malignen Prozessen, wie z. B. der Pathogenese des Mamma-, Nieren- und Colonkarzinoms (Guo et al. 2017). Die Inhibition von CXCR1 und -2 durch SB225002 konnte im klarzelligen Nierenkarzinom eine Verringerung von pERK und pAKT hervorrufen. Des Weiteren wiesen Mäuse mit diesem Tumor, die mit einem CXCL7-Antikörper behandelt worden waren, signifikant reduzierte Aktivitäten von ERK und AKT auf (Grépin et al. 2014). Daher könnten CXCR1 und CXCR2 interessante Ansatzpunkte für die weitere Erforschung des Vestibularisschwannoms darstellen. Da es hierzu keine Vorarbeiten gibt, sollte überprüft werden, ob beide Rezeptoren im Vestibularisschwannom im Vergleich zum gesunden Nerven höher exprimiert werden. Der Cytokin-Screen zeigte, dass CXCL7 in Vestibularisschwannomen hochreguliert war und daher für die Regulation dieser Signalwege eine Rolle spielen könnte. Daher könnten diese Daten darauf hindeuten, dass nicht CXCR4, sondern CXCR1 und CXCR2 nach Aktivierung durch CXCL7 zur Aktivierung der ERK- und AKT-Signalwege führen könnten.

Des Weiteren gibt es noch andere Signalkaskaden, die für das Vestibularisschwannom wichtig sind und durch CXCR4 reguliert werden könnten. So führt die Stimulation von CXCR4 durch SDF1 zur Aktivierung der Rac/Rho/p38-Signalkaskade, die ebenfalls die Proliferation und das Zellüberleben sichert (Chatterjee et al. 2014). Dieser Zusammenhang wurde für das Vestibularisschwannom bislang noch nicht untersucht.

Auch daher bleibt CXCR4 ein wichtiger Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten, die sich mit der Pathogenese des Vestibularisschwannoms

beschäftigen. Dass eine Inhibition von CXCR4 für die Behandlung dieses Tumors von Vorteil sein könnte, legt die Beobachtung nahe, dass CXCR4-mRNA in Vestibularisschwannomen 4,6-fach höher exprimiert wurde als in gesunden Kontrollen und auch positiv mit dem Hörverlust der betroffenen Patienten korrelierte (Breun et al. 2018). Darüber hinaus war es möglich, die CXCR4-Expression in Vestibularisschwannomen bei Patienten mittels eines [⁶⁸Ga]-Pentixafor PET/CT darzustellen (Breun et al. 2019).

Auch Merlin inhibiert den ERK- und AKT-Signalweg (Sughrue et al. 2011; Carroll 2012). Eine Erhöhung der Merlin-Expression in Schwannzellen führte zu einer verringerten Proliferations- und einer erhöhten Apoptoserate (Schulze et al. 2002). Diese Ergebnisse ließen sich in dieser Arbeit replizieren. Die Überexpression von Merlin führte zu einer verminderten Schwannzellproliferation. Merlin ist das Produkt eines Tumorsuppressorgens und moduliert Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Migration (Sughrue et al. 2011) und reduziert dadurch das Wachstum von Vestibularisschwannomzellen. Normalerweise ist in Vestibularisschwannomen die Funktion von Merlin durch Mutationen ausgeschaltet, was den wesentlichen Schritt in der Schwannomentstehung darstellt (Sughrue et al. 2011).

Die lentivirale Merlinüberexpression führte zu einer Überexpression der 70 kDa-Isoform Merlins. Allerdings war die Erhöhung der Proteinmenge dieser Isoform nicht signifikant, die Erhöhung der 90 kDa-Isoform dagegen schon. In der Literatur sind posttranslationale Modifikationen Merlins durch Phosphorylierung an verschiedenen Stellen im Protein beschrieben (Michie et al. 2019). Eine Phosphorylierung, die am C-terminalen Ende stattfindet, führt zum Wechsel von geschlossener, also inaktiver, zur geöffneten, aktiven Formation, in der Merlin an Zelladhäsionsmoleküle und Aktinfilamente binden kann (Sato und Sekido 2018). Findet eine Phosphorylierung hingegen z. B. an Serin 518 statt, führt dies zur Inaktivierung Merlins (Sato und Sekido 2018). Es wäre möglich, dass durch posttranslationale Phosphorylierung der 70 kDa-Bande das Molekulargewicht erhöht wird und in den Versuchen dieser Arbeit daher vor allem die 90 kDa-Isoform vermehrt detektiert werden konnte. Leider sind auf der Basis der in dieser

Arbeit durchgeführten Versuche keine definitiven Rückschlüsse auf die Art der Phosphorylierung möglich, es könnte jedoch von einer aktivierenden Modifikation ausgegangen werden.

CXCR4 und ADAM9 sind im Vestibularisschwannom im Vergleich zum gesunden Nerven in ihrer Expression hochreguliert (Breun et al. 2018; Breun et al. 2019; Breun et al. 2020). Nun wurde untersucht, ob dies auf den Funktionsverlust von Merlin zurückzuführen ist oder ob diese Veränderung unabhängig von Merlin entstanden ist.

Nach Merlinüberexpression zeigte sich keine veränderte CXCR4-Konzentration im Western-Blot im Vergleich zu einem untransfizierten Tumor. Die Konzentration der 55 kDa- und 43 kDa-Isoformen blieben unverändert. Über andere CXCR4-Isoformen konnte aufgrund zu schwacher Bandenstärke im Western-Blot keine Aussage getroffen werden.

Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich für ADAM9. Dies bezieht sich allerdings nur auf die 47 kDa-Isoform, da die anderen bekannten ADAM9-Isoformen, die eine Größe von 68 kDa und 84 kDa aufweisen, mit dem verwendeten Antikörper nicht nachgewiesen werden konnten. Bei der detektierten Isoform handelt es sich um die proteolytisch gekürzte membrangebundene Form von ADAM9, die über eine Metalloprotease- und eine katalytische Domäne verfügt (Klein und Bischoff 2011). Es wäre also durchaus im Bereich des Möglichen, dass es einen Effekt auf die anderen Isoformen geben könnte. Diese Untersuchung konnte somit erstmals zeigen, dass der Merlin-Verlust nicht in ursächlichem Zusammenhang mit der Überexpression von CXCR4 und ADAM9 in Vestibularisschwannomen steht (Nattmann et al. 2020).

Um die Rolle der beobachteten ADAM9-Überexpression (Breun et al. 2020) weiter zu untersuchen, wurde in Vestibularisschwannomprimärzellkulturen ein knock-down induziert.

In der Tat proliferierten knock-down-Zellen weniger als Vestibularisschwannomzellen, deren ADAM9-Expression nicht verändert worden war (Nattmann et al. 2020). Diese Beobachtung legt nahe, dass ADAM9 an der Pathogenese des Vestibularisschwannoms beteiligt sein könnte und damit nicht nur für die Entstehung maligner Tumoren wie dem Pankreaskarzinom relevant ist (Grützmann et al. 2004), sondern auch eine Rolle für die Entwicklung primär benigner Tumoren wie dem Vestibularisschwannom spielen könnte.

Proteine der ADAM-Familie verfügen über je eine transmembran-, cytoplasmatische-, Disintegrin-, cysteinreiche- und EGF-ähnliche Domäne. Während die Funktion der EGF-ähnlichen Domäne bisher ungeklärt ist, stellen die Disintegrin- und die cysteinreiche Domäne Kontakt zwischen dem Zytoskelett der Zelle und der Extrazellulärmatrix bzw. den Nachbarzellen her, indem Disintegrin an Integrine und die cysteinreiche Domäne an Proteoglykane bindet (Klein und Bischoff 2011). ADAM9 durchspannt die Zellmembran und interagiert über den cytoplasmatischen Anteil mit intrazellulären Proteinen. Metalloproteasen der ADAM-Familie verdauen Proteine der Extrazellulärmatrix, ermöglichen die Loslösung einzelner Zellen aus dem Zellverband und fördern damit das Wachstum und die Invasivität von Tumoren. So konnte in Lebermetastasen die höchste ADAM9-Expression in Arealen nachgewiesen werden, die ein stark invasives Wachstum zeigten (Klein und Bischoff 2011). Da Tumorentstehung nicht selten mit dem Verlust von Zell-Zell-Kontakten einhergeht, liegt es nahe, dass die erhöhte ADAM9-Expression auch hier zur Pathogenese beitragen könnte (Nattmann et al. 2020).

Integrine sind Moleküle, die aus den beiden Untereinheiten α und β bestehen und die Haftung einer Zelle an der Basallamina (BL) vermitteln. Hierfür durchspannen sie als Adhäsionsmolekül die Zellmembran und binden in der Lamina rara der BL an Laminin, welches in der Lamina densa der BL verankert ist (Lüllmann-Rauch 2012). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob ADAM9 mit den verschiedenen Integrinmolekülen $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 6$ assoziiert ist, woraus sich eine mögliche Modifikation des Zytoskeletts von Vestibularisschwannomzellen durch ADAM9 ableiten lassen könnte.

Eine Interaktion zwischen ADAM9 und Integrin $\alpha 2\beta 1$ ist für Lebermetastasen beschrieben (Klein und Bischoff 2011). Es sollte daher getestet werden, ob dies auch für Vestibularisschwannome zutrifft. Da eine Kolokalisation jedoch nur bei zwei von neun Tumoren beobachtet werden konnte, scheint Integrin $\alpha 2\beta 1$ nicht das primäre Substrat von ADAM9 im Vestibularisschwannom zu sein (Nattmann et al. 2020).

ADAM9 bindet an Integrin $\alpha 6\beta 1$ auf der Oberfläche von Fibroblasten und agiert hier durch seine Disintegrin-Domäne als Adhäsionsmolekül, wodurch die Zellmotilität gesteigert wird (Nath et al. 2000). Die Disintegrin-Domäne, mit der ADAM9 eine Integrin-Bindung eingeht, ist einzigartig und wurde bei keinen anderen Oberflächenproteinen außerhalb der ADAM-Familie festgestellt (Klein und Bischoff 2011). Integrin $\alpha 6$ kommt auch in Schwannzellen vor (Hogervorst et al. 1993) und wurde im Western-Blot in dieser Arbeit auch in vier Vestibularisschwannomen nachgewiesen. Außerdem wurde eine Hochregulation von Integrin $\alpha 6$ in Schwannomzellen im Vergleich zu physiologischen Schwannzellen beobachtet (Hanemann et al. 2006). Tatsächlich ließ sich in 10 von 11 untersuchten Vestibularisschwannomen eine Kolokalisation von Integrin $\alpha 6$ und ADAM9 feststellen. Diese Kolokalisation trat häufig in bindegewebigen Rand- und Kapselbereichen des Tumors auf, weniger jedoch in Bereichen, in denen Schwannzellen überwogen. Daher kann bei unseren Ergebnissen nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Kolokalisation vor allem an der Oberfläche von Fibroblasten beobachtet wurde und nicht direkt an der Vestibularisschwannomzelle. Dennoch zeigen diese Befunde, dass die Interaktion von Integrin $\alpha 6$ und ADAM9 in Vestibularisschwannomen eine Rolle spielt, indem die Zellmotilität der Vestibularisschwannomzellen gesteigert und damit die Tumorentstehung und -proliferation gefördert wird (Nattmann et al. 2020).

In menschlichen Glioblastomzellen wurde die ADAM9-Expression experimentell mittels Licochalcone A und dem MAPK-Kinase-Inhibitor PD98059 inhibiert; reduzierte Zellmigration und -invasion und eine reduzierte Aktivierung des ERK-Signalweges waren die Folge (Huang et al. 2018). Eine solche ADAM9-Inhibition

könnte auch im Vestibularisschwannom getestet werden, zumal der ADAM9-knock-down in vitro zu einer verringerten Proliferation von Vestibularisschwannomzellen führte. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass ADAM9 nun nicht mehr über Integrin $\alpha 6$ an das Laminin bindet und es nicht mehr verdaut. Damit würde die Teilung der Vestibularisschwannomzellen erschwert.

ADAM9 hat Relevanz für das Überleben von Tumorzellen. Nach seiner Inhibition wurde beispielsweise apoptotischer Zelltod von Prostatakarzinomzellen beschrieben (Klein und Bischoff 2011). Da der ADAM9-knock-down in Vestibularisschwannomprimärzellkulturen zu einer deutlich reduzierten Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle führte, könnte dies nicht nur auf eine verringerte Proliferation, sondern auch auf eine gesteigerte Apoptose zurückzuführen sein. Eine hohe Expression von ADAM9 ging mit einer schlechten Prognose und einem hohen Rezidivrisiko bei Prostatakarzinompatienten einher (Klein und Bischoff 2011). Daher sollten zukünftige Vestibularisschwannomrezidive eventuell auf erhöhte ADAM9-Konzentrationen im Vergleich zu sporadischen Primärtumoren untersucht werden.

Interessanterweise werden Metalloproteasen der ADAM-Familie nicht von TIMPs inhibiert (Amour et al. 2002). Daher verwunderte es zunächst, dass im Cytokin-Screen für alle untersuchten Tumoren eine erhöhte Expression von TIMP-2 gefunden wurde. Ein Zusammenhang zwischen Vestibularisschwannomen und TIMP-2-Expression wurde bislang noch nicht berichtet. Daher liegt die Vermutung nahe, dass weitere Matrix-Metalloproteasen (MMP) im Vestibularisschwannom eine Rolle spielen.

So sind z. B. MMP-11 und MMP-14 im Schwannom herunterreguliert (Hanemann et al. 2006). Eigentlich führt CXCL12 und die damit verbundene Aktivierung von CXCR4 zumindest in Prostatakarzinomzellen zu erhöhten MMP-Spiegeln, darunter auch von MMP-11 und MMP-14 (Singh et al. 2004). Ob dies auch für Vestibularisschwannome gilt, muss noch untersucht werden. TIMP-2 könnte auch als Antagonist aktiv sein und die durch CXCL12 vermehrt aktivierten

MMPs inhibieren. MMP-11 ist ein Substrat von MMP-14, während letztere von TIMP-2 inhibiert wird (Buache et al. 2014). MMP-11 und MMP-14 spielen eine wichtige Rolle in der Invasivität und Ausbreitung maligner Tumoren (Buache et al. 2014). Bei MMP-14 handelt es sich um eine membrangebundene Metalloproteinase, die in der Lage ist, ADAM9 zu inaktivieren (Chan et al. 2012). Da ADAM9 in Vestibularisschwannomen vermehrt (Breun et al. 2020), MMP-14 jedoch vermindert exprimiert wird (Hanemann et al. 2006), könnte die Interaktion von TIMP-2 und MMP-14 einen neuen Angriffspunkt für eine zukünftige Vestibularisschwannomtherapie darstellen.

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass ein ADAM9-knock-down in Mäusen zu einer signifikanten Reduktion von retinaler Neovaskularisation führt, wogegen es in Wild-Typ-Mäusen in pathologischen retinalen Gefäßen besonders stark exprimiert ist (Guaiquil et al. 2009). Außerdem wird vermutet, dass Hypoxie und damit entstehende reaktive Sauerstoffspezies zu einer höheren Expression von ADAM9 führen, wodurch ADAM9 durch „shedding“ von Membranproteinen wiederum zu einer erhöhten Freisetzung von proangiogenen Faktoren führt (Guaiquil et al. 2009). Auffällig war in dieser Arbeit die häufige Detektion von ADAM9 in der unmittelbaren Umgebung von Tumorgefäßen in den Immunofluoreszenzfärbungen, was nahelegt, dass auch Vestibularisschwannome mit fortschreitendem Wachstum auf die Bildung neuer Blutgefäße angewiesen sein könnten, um den steigenden Nährstoffbedarf decken zu können. Obwohl Vestibularisschwannome als wenig vaskularisierte Tumoren gelten, die keinen ausgeprägten Hang zu Neovaskularisationen zeigen (Brieger et al. 2003), konnte beobachtet werden, dass eine Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab bei einigen NF 2 Patienten zu einem Tumorrückgang führte (Plotkin et al. 2012). Daher sollten Prozesse der Neoangiogenese als neue Angriffspunkte im Vestibularisschwannom weiterverfolgt werden (Nattmann et al. 2020).

Hierfür spricht auch das im Cytokin-Screen in allen drei untersuchten Vestibularisschwannomen erhöhte Angiogenin, das neben Tumorzellüberleben und -proliferation maßgeblich an der Ausbildung pathologischer Tumorgefäße

beteiligt ist (Vanli und Guo-Fu 2015). Bisher gibt es keine Arbeiten zu erhöhten Angiogeninexpressionen in Vestibularisschwannomen. An dieser Stelle wäre es von Interesse, Vestibularisschwannomzellen mit ADAM9-knock-down auf potenziell reduzierte Angiogeninkonzentrationen zu screenen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen ADAM9 und Angiogenin zu untersuchen.

Insgesamt erscheinen vor allem die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf ADAM9 vielversprechend. Es sollten weitere Untersuchungen zu Inhibition bzw. knock-down durchgeführt werden, um die Bedeutung einer ADAM9-Reduktion in Vestibularisschwannomzellen besser zu verstehen. Dies gilt auch für die Interaktion von ADAM9 und Integrin. Ferner sollten die Proteine, die im Cytokin-Screen aufgefallen waren, näher beleuchtet werden. Für CXCR4 gilt Ähnliches: Obwohl die hier durchgeführten Versuche negative Ergebnisse lieferten, scheint der Rezeptor ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese des Vestibularisschwannoms zu spielen und sollte daher weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Obwohl es sich bei Vestibularisschwannomen um benigne Tumoren handelt, können sie die Lebensqualität der betroffenen Patienten deutlich beeinträchtigen. Gerade bei Patienten, die an einer NF 2 leiden und sich daher wiederholt operativen Eingriffen unterziehen müssen, ist es notwendig, eine medikamentöse Therapiealternative anbieten zu können, die ohne die Notwendigkeit einer operativen Intervention auskommt und gleichzeitig schwerwiegenden Folgen der Tumorerkrankung – wie dem drohenden Hörverlust – Einhalt gebietet. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, sich dieser medikamentösen Therapiealternative einen Schritt anzunähern, indem molekulare Pathomechanismen, die dem Vestibularisschwannom zugrunde liegen könnten, untersucht wurden. Im Mittelpunkt standen der Chemokinrezeptor CXCR4, das Tumorsuppressorprotein Merlin und die Metalloprotease ADAM9. Für CXCR4 ließen sich keine Effekte in Bezug auf die Aktivierung der ERK- und AKT-Signalwege erkennen. Auch beeinflusste eine Merlinüberexpression in Vestibularisschwannomzellen die CXCR4- und ADAM9-Proteinexpression nicht. Für ADAM9 zeigte sich eine potenzielle Relevanz für die Pathogenese des Vestibularisschwannoms: Wurde die ADAM9-Konzentration durch einen knock-down reduziert, hatte dies eine verminderte Vestibularisschwannomzellzahl zur Folge. Des Weiteren scheint Integrin $\alpha 6$ ein Substrat von ADAM9 zu sein, das möglicherweise in die Zytoskelettmodifikation durch ADAM9 involviert ist. Somit stellt die ADAM9-Inhibition einen interessanten Angriffspunkt für eine mögliche medikamentöse Behandlung von Vestibularisschwannomen dar. Ferner wurden Cytokine gefunden, die bisher nicht in einen Zusammenhang mit dem Vestibularisschwannom gebracht worden waren. Vor allem die Bedeutung der Cytokine TIMP-2 und CXCL7 sollte für das Vestibularisschwannom näher untersucht werden. Somit konnte diese Arbeit weitere Aspekte aufdecken, die für die Pathogenese des Vestibularisschwannoms relevant sein könnten und an die zukünftige Forschung anknüpfen sollte.

6 Literaturverzeichnis

Ammoun, S.; Flaiz, C.; Ristic, N.; Schuldt, J.; Hanemann, C. O. (2008): Dissecting and targeting the growth factor-dependent and growth factor-independent extracellular signal-regulated kinase pathway in human schwannoma. In: *Cancer Research* 68 (13), S. 5236–5245. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5849.

Amour, A.; Knight, C. G.; English, W. R.; Webster, A.; Slocombe, P. M.; Knäuper, V.; Docherty, A. J. P.; Becherer, J. D.; Blobel, C. P.; Murphy, G. (2002): The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. In: *FEBS Letters* 524 (1), S. 154–158. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)03047-8.

Belyaev, A.; Usachev, D.; Shimansky, V.; Odamanov, D.; Shishkina, L.; Ryzhova, M.; Golanov, A. (2018): Spontaneous Transformation of Vestibular Schwannoma into Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. In: *Asian Journal of Neurosurgery* 13 (3), S. 810–813. DOI: 10.4103/ajns.AJNS_251_16.

Bräuer, L. (2015): Hirnnerven. In: J. Waschke, T. M. Böckers und Paulsen F. (Hg.): *Anatomie. Das Lehrbuch*. 1. Aufl.: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, S. 452–467.

Breun, M.; Monoranu, C. M.; Kessler, A. F.; Matthies, C.; Löhr, M.; Hagemann, C.; Schirbel, A.; Rowe, S. P.; Pomper, M. G.; Buck, A. K.; Wester, H.-J.; Ernestus, R.-I.; Lapa, C. (2019): 68Ga-Pentixafor PET/CT for CXCR4-Mediated Imaging of Vestibular Schwannomas. In: *Frontiers in Oncology* 9 (503), S. 1–6. DOI: 10.3389/fonc.2019.00503.

Breun, M.; Schwerdtfeger, A.; Martellotta, D. D.; Kessler, A. F.; Monoranu, C. M.; Matthies, C.; Löhr, M.; Hagemann, C. (2020): ADAM9: A novel player in vestibular schwannoma pathogenesis. In: *Oncology Letters* 19 (3), S. 1856–1864. DOI: 10.3892/ol.2020.11299.

Breun, M.; Schwerdtfeger, A.; Martellotta, D. D.; Kessler, A. F.; Perez, J. M.; Monoranu, C. M.; Ernestus, R.-I.; Matthies, C.; Löhr, M.; Hagemann, C. (2018):

CXCR4: A new player in vestibular schwannoma pathogenesis. In: *Oncotarget* 9 (11), S. 9940–9950. DOI: 10.18632/oncotarget.24119.

Brieger, J.; Bedavanija, A.; Lehr, H.-A.; Maurer, J.; Mann, W. J. (2003): Expression of angiogenic growth factors in acoustic neurinoma. In: *Acta Oto-Laryngologica* 123 (9), S. 1040–1045. DOI: 10.1080/00016480310005101.

Brodhun, M.; Stahn, V.; Harder, A. (2017): Pathogenese und Molekularpathologie des Vestibularisschwannoms. In: *HNO* 65 (5), S. 362–372. DOI: 10.1007/s00106-016-0201-3.

Buache, E.; Thai, R.; Wendling, C.; Alpy, F.; Page, A.; Chenard, M.-P.; Dive, V.; Ruff, M.; Dejaegere, A.; Tomasetto, C.; Rio, M.-C. (2014): Functional relationship between matrix metalloproteinase-11 and matrix metalloproteinase-14. In: *Cancer Medicine* 3 (5), S. 1197–1210. DOI: 10.1002/cam4.290.

Carroll, S. L. (2012): Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. In: *Acta Neuropathologica* 123 (3), S. 321–348. DOI: 10.1007/s00401-011-0928-6.

Chamoun, R.; MacDonald, J.; Shelton, C.; Couldwell, W. T. (2012): Surgical approaches for resection of vestibular schwannomas: translabyrinthine, retrosigmoid, and middle fossa approaches. In: *Neurosurgical Focus* 33 (3), E9 S. 1–5. DOI: 10.3171/2012.6.FOCUS12190.

Chan, K. M.; Wong, H. L. X.; Jin, G.; Liu, B.; Cao, R.; Cao, Y.; Lehti, K.; Tryggvason, K.; Zhou, Z. (2012): MT1-MMP Inactivates ADAM9 to Regulate FGFR2 Signaling and Calvarial Osteogenesis. In: *Developmental Cell* 22 (6), S. 1176–1190. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.04.014.

Chatterjee, S.; Azad, B. B.; Nimmagadda, S. (2014): The intricate role of CXCR4 in cancer. In: *Advances in Cancer Research* 124, S. 31–82. DOI: 10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1.

Domanska, U. M.; Kruizinga, R. C.; Nagengast, W. B.; Timmer-Bosscha, H.; Huls, G.; de Vries, E. G. E.; Walenkamp, A. M. E. (2013): A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. In: *European Journal of Cancer* 49 (1), S. 219–230. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.05.005.

Fortnum, H.; O'Neill, C.; Taylor, R.; Lenthall, R.; Nikolopoulos, T.; Lightfoot, G.; O'Donoghue, G.; Mason, S.; Baguley, D.; Jones, H.; Mulvaney, C. (2009): The role of magnetic resonance imaging in the identification of suspected acoustic neuroma: a systematic review of clinical and cost effectiveness and natural history. In: *Health Technology Assessment* 13 (18), iii-iv, ix-xi, 1-154. DOI: 10.3310/hta13180.

Grépin, R.; Guyot, M.; Giuliano, S.; Boncompagni, M.; Ambrosetti, D.; Chamorey, E.; Scoazec, J.-Y.; Negrier, S.; Simonnet, H.; Pagès, G. (2014): The CXCL7/CXCR1/2 axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma. In: *Cancer Research* 74 (3), S. 873–883. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1267.

Grützmann, R.; Lüttges, J.; Sipos, B.; Ammerpohl, O.; Dobrowolski, F.; Alldinger, I.; Kersting, S.; Ockert, D.; Koch, R.; Kalthoff, H.; Schackert, H. K.; Saeger, H. D.; Klöppel, G.; Pilarsky, C. (2004): ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumour type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma. In: *British Journal of Cancer* 90 (5), S. 1053–1058. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601645.

Guaiquil, V.; Swendeman, S.; Yoshida, T.; Chavala, S.; Campochiaro, P. A.; Blobel, C. P. (2009): ADAM9 is involved in pathological retinal neovascularization. In: *Molecular and Cellular Biology* 29 (10), S. 2694–2703. DOI: 10.1128/MCB.01460-08.

Guo, Q.; Jian, Z.; Jia, B.; Chang, L. (2017): CXCL7 promotes proliferation and invasion of cholangiocarcinoma cells. In: *Oncology Reports* 37 (2), S. 1114–1122. DOI: 10.3892/or.2016.5312.

Gutmann, D. H.; Giordano, M. J.; Fishback, A. S.; Guha, A. (1997): Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. In: *Neurology* 49 (1), S. 267–270. DOI: 10.1212/WNL.49.1.267.

Hanemann, C. O.; Bartelt-Kirbach, B.; Diebold, R.; Kämpchen, K.; Langmesser, S.; Utermark, T. (2006): Differential gene expression between human

schwannoma and control Schwann cells. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32 (6), S. 605–614. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2006.00769.x.

Heinrich, P. C.; Haan, S.; Hermanns, H. M.; Müller-Newen, G.; Schaper, F. (2014): Rezeptoren und ihre Signaltransduktion. Rezeptoren mit intrinsischer Kinase (Rezeptorkinasen). In: P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve und G. Löffler (Hg.): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch), S. 420–425.

Hogervorst, F.; Admiraal, L. G.; Niessen, C.; Kuikman, I.; Janssen, H.; Daams, H.; Sonnenberg, A. (1993): Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin $\alpha 6$ subunit. In: *The Journal of Cell Biology* 121 (1), S. 179–191. DOI: 10.1083/jcb.121.1.179.

Huang, C.-F.; Yang, S.-F.; Chiou, H.-L.; Hsu, W.-H.; Hsu, J.-C.; Liu, C.-J.; Hsieh, Y.-H. (2018): Licochalcone A inhibits the invasive potential of human glioma cells by targeting the MEK/ERK and ADAM9 signaling pathways. In: *Food & Function* 9 (12), S. 6196–6204. DOI: 10.1039/c8fo01643g.

Huovila, A.-P. J.; Turner, A. J.; Pelto-Huikko, M.; Kärkkäinen, I.; Ortiz, R. M. (2005): Shedding light on ADAM metalloproteinases. In: *Trends in Biochemical Sciences* 30 (7), S. 413–422. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.05.006.

Jacob, A.; Lee, T. X.; Neff, B. A.; Miller, S.; Welling, B.; Chang, L.-S. (2008): Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation in human vestibular schwannoma. In: *Otology & Neurotology* 29 (1), S. 58–68. DOI: 10.1097/mao.0b013e31816021f7.

Kaye, A. H.; Briggs, R. J. S. (2001): Acoustic neurinoma (vestibular schwannoma). In: A. H. Kaye und E. R. Laws (Hg.): *Brain tumors. An encyclopedic approach*. 2. Aufl. London, New York: Churchill Livingstone, S. 619–669.

Klein, T.; Bischoff, R. (2011): Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. In: *Journal of Proteome Research* 10 (1), S. 17–33. DOI: 10.1021/pr100556z.

Koerbel, A.; Gharabaghi, A.; Safavi-Abbasi, S.; Tatagiba, M.; Samii, M. (2005): Evolution of vestibular schwannoma surgery: the long journey to current success. In: *Neurosurgical Focus* 18 (4), S. 1–6. DOI: 10.3171/foc.2005.18.4.11.

Kossmann, C. M.; Annereau, M.; Thomas-Schoemann, A.; Nicco-Overney, C.; Chéreau, C.; Batteux, F.; Alexandre, J.; Lemare, F. (2017): ADAM9 expression promotes an aggressive lung adenocarcinoma phenotype. In: *Tumor Biology* 39 (7), 1-11. DOI: 10.1177/1010428317716077.

Lenarz, T.; Boenninghaus, H.-G. (2012): Klinik des Innenohres. In: T. Lenarz und H.-G. Boenninghaus (Hg.): Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 14. Aufl.: Springer Verlag, S. 112–135.

Lin, E. P.; Crane, B. T. (2017): The Management and Imaging of Vestibular Schwannomas. In: *American Journal of Neuroradiology* 38 (11), S. 2034–2043. DOI: 10.3174/ajnr.A5213.

Lüllmann-Rauch, R. (2012): Binde- und Stützgewebe. In: R. Lüllmann-Rauch (Hg.): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme, S. 119–173.

Matthies, C.; Samii, M. (1997): Management of Vestibular Schwannomas (Acoustic Neuromas): The Value of Neurophysiology for Evaluation and Prediction of Auditory Function in 420 Cases. In: *Neurosurgery* 40 (5), S. 891–902. DOI: 10.1097/0006123-199705000-00007.

Michie, K. A.; Bermeister, A.; Robertson, N. O.; Goodchild, S. C.; Curmi, P. M. G. (2019): Two Sides of the Coin: Ezrin/Radixin/Moesin and Merlin Control Membrane Structure and Contact Inhibition. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8), S. 1–40. DOI: 10.3390/ijms20081996.

Monsell, E. M.; Balkany, T. A.; Gates, G. A.; Goldenberg, R. A.; Meyerhoff, W. L.; House, J. W. (1995): Committee on Hearing and Equilibrium Guidelines for the Evaluation of Hearing Preservation in Acoustic Neuroma (Vestibular Schwannoma): Committee on Hearing and Equilibrium. In: *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 113 (3), S. 179–180. DOI: 10.1016/S0194-5998(95)70101-X.

Mygind, K. J.; Schwarz, J.; Sahgal, P.; Ivaska, J.; Kveiborg, M. (2018): Loss of ADAM9 expression impairs $\beta 1$ integrin endocytosis, focal adhesion formation and cancer cell migration. In: *Journal of Cell Science* 131 (1), S. 1–12. DOI: 10.1242/jcs.205393.

Nadi, M.; Rutka, J. T. (2015): Molecular Markers and Pathways in Brain Tumorigenesis. In: M. Bernstein und M. S. Berger (Hg.): *Neuro-oncology. The essentials*. 3. Aufl. New York: Thieme, S. 35–46.

Nath, D.; Slocombe, P. M.; Webster, A.; Stephens, P. E.; Docherty, A. J.; Murphy, G. (2000): Meltrin γ (ADAM-9) mediates cellular adhesion through $\alpha 6\beta 1$ integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. In: *Journal of Cell Science* 113, S. 2319–2328.

Nattmann, A.; Breun, M.; Monoranu, C. M.; Matthies, C.; Ernestus, R.-I.; Löhr, M.; Hagemann, C. (2020): Analysis of ADAM9 regulation and function in vestibular schwannoma primary cells. In: *BMC Res Notes* 13 (1), S. 596. DOI: 10.1186/s13104-020-05378-7.

Neff, B. A.; Voss, S. G.; Schmitt, W. R.; Driscoll, C. L. W.; Link, M. J.; Beatty, C. W.; Kita, H. (2012): Inhibition of MEK pathway in vestibular schwannoma cell culture. In: *The Laryngoscope* 122 (10), S. 2269–2278. DOI: 10.1002/lary.23472.

Plotkin, S. R.; Merker, V. L.; Halpin, C.; Jennings, D.; McKenna, M. J.; Harris, G. J.; Barker, F. G. (2012): Bevacizumab for progressive vestibular schwannoma in neurofibromatosis type 2: a retrospective review of 31 patients. In: *Otology & Neurotology* 33 (6), S. 1046–1052. DOI: 10.1097/MAO.0b013e31825e73f5.

Propp, J. M.; McCarthy, B. J.; Davis, F. G.; Preston-Martin, S. (2006): Descriptive epidemiology of vestibular schwannomas. In: *Neuro-Oncology* 8 (1), S. 1–11. DOI: 10.1215/S1522851704001097.

Rosahl, S.; Bohr, C.; Lell, M.; Hamm, K.; Iro, H. (2017): Diagnostik und Therapie des Vestibularisschwannoms – eine interdisziplinäre Herausforderung. In: *Laryngo-Rhino-Otologie* 96 (S 01), 152-182. DOI: 10.1055/s-0042-122386.

Rubin, J. B.; Kung, A. L.; Klein, R. S.; Chan, J. A.; Sun, Y.; Schmidt, K.; Kieran, M. W.; Luster, A. D.; Segal, R. A. (2003): A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23), S. 13513–13518. DOI: 10.1073/pnas.2235846100.

Rutkowski, M. J.; Oh, T.; Parsa, A. T. (2015): Vestibular Schwannomas. In: M. Bernstein und M. S. Berger (Hg.): *Neuro-oncology. The essentials*. 3. Aufl. New York: Thieme, S. 430–438.

Samii, M.; Matthies, C. (1997): Management of 1000 Vestibular Schwannomas (Acoustic Neuromas): Hearing Function in 1000 Tumor Resections. In: *Neurosurgery* 40 (2), S. 248–262. DOI: 10.1097/0006123-199702000-00005.

Sato, T.; Sekido, Y. (2018): NF2/Merlin Inactivation and Potential Therapeutic Targets in Mesothelioma. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4), S. 1–18. DOI: 10.3390/ijms19040988.

Scheithauer, B. W.; Louis, D. N.; Hunter, S.; Woodruff, J. M.; Antonescu, C. R. (2007): Schwannoma. In: *WHO classification of tumours of the central nervous system*. 4. Aufl. Lyon: International agency for research on cancer (World health organization classification of tumours, 1), S. 152–155.

Schulze, K. M. M.; Hanemann, C. O.; Müller, H. W.; Hanenberg, H. (2002): Transduction of wild-type merlin into human schwannoma cells decreases schwannoma cell growth and induces apoptosis. In: *Human Molecular Genetics* 11 (1), S. 69–76. DOI: 10.1093/hmg/11.1.69.

Singh, S.; Singh, U. P.; Grizzle, W. E.; Lillard, J. W. (2004): CXCL12–CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. In: *Laboratory Investigation* 84 (12), S. 1666–1676. DOI: 10.1038/labinvest.3700181.

Stemmer-Rachamimov, A. O.; Wiestler, O. D.; Louis, D. N. (2007): Neurofibromatosis type 2. In: *WHO classification of tumours of the central nervous system*. 4. Aufl. Lyon: International agency for research on cancer (World health organization classification of tumours, 1), S. 210–214.

- Strasilla, C.; Sychra, V. (2017): Bildgebende Diagnostik des Vestibularisschwannoms. In: *HNO* 65 (5), S. 373–380. DOI: 10.1007/s00106-016-0227-6.
- Sughrue, M.I E.; Yeung, A. H.; Rutkowski, M. J.; Cheung, S. W.; Parsa, A. T. (2011): Molecular biology of familial and sporadic vestibular schwannomas: implications for novel therapeutics. In: *Journal of Neurosurgery* 114 (2), S. 359–366. DOI: 10.3171/2009.10.JNS091135.
- Tatagiba, M.; Ebner, F. H. (2015): Kleinhirnbrückenwinkelprozesse. In: D. Moskopp und H. Wassmann (Hg.): *Neurochirurgie*. 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer GmbH (Neurologie), S. 596–608.
- Twist, E. C.; Rutledge, M. H.; Rousseau, M.; Sanson, M.; Papi, L.; Merel, P.; Delattre, O.; Thomas, G.; A.Rouleau, G. (1994): The neurofibromatosis type 2 gene is inactivated in schwannomas. In: *Human Molecular Genetics* 3 (1), S. 147–151. DOI: 10.1093/hmg/3.1.147.
- Vanli, N.; Guo-Fu, H. U. (2015): Mechanism and Function of Angiogenin in Prostate Cancer. In: *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 31 (12), S. 1261–1266. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2015.12.06.
- Vernooij, M. W.; Ikram, M. A.; Tanghe, H. L.; Vincent, A. J. P. E.; Hofman, A.; Krestin, G. P.; Niessen, W. J.; Breteler, M. M. B.; van der Lugt, A. (2007): Incidental findings on brain MRI in the general population. In: *The New England Journal of Medicine* 357 (18), S. 1821–1828. DOI: 10.1056/NEJMoa070972.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. (2019): Biochemische Signale. In: D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, B. Häcker und A. Prowald (Hg.): *Lehrbuch der Biochemie*. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, S. 487–536.
- Wang, X.; Ramaswamy, V.; Taylor, M. D. (2015): Familial Tumor Syndromes. In: M. Bernstein und M. S. Berger (Hg.): *Neuro-oncology. The essentials*. 3. Aufl. New York: Thieme, S. 505–514.
- Whitehouse, K.; Foroughi, M.; Shone, G.; Hatfield, R. (2010): Vestibular schwannomas - when should conservative management be reconsidered? In:

British Journal of Neurosurgery 24 (2), S. 185–190. DOI:
10.3109/02688690903272634.

7 Internetquellen

www.gelifesciences.com (letzter Zugriff am 05.03.2019)

<https://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/> (letzter Zugriff am 27.06.2019)

8 Bildquellen

[1] „Schwannoma“ von Dr. Roshan Nasimudeen,
(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schwannoma.jpg>), zugeschnitten von Anja Nattmann, verfügbar unter der Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported Lizenz, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>.

[2] „Schwannom am Kleinhirnbrückenwinkel rechts (links im Bild) in der MRT T2 axial“ von Hellerhoff (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6a/Akustikus-Schwannon_rechts_MRT_T2_axial_001.jpg), verfügbar unter der Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported Lizenz, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>.

[3] „ADAM9 was not regulated by Merlin in VS.“ von Nattmann et al. 2020, Modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 (CC BY 4.0); <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

[4] „ADAM9 was involved in controlling VS primary cell proliferation.“ von Nattmann et al. 2020, modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 (CC BY 4.0); <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

[5] „Co-localization of ADAM9 with Integrin $\alpha 6$ and Integrin $\alpha 2\beta 1$ in VS tumor samples.” von Nattmann et al. 2020, modifiziert von Anja Nattmann, Nutzung gemäß Creative Commons Attribution Licence 4.0 (CC BY 4.0); <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
293T-Zellen	Human embryonic kidney 293 cells
a.u.	arbitrary units
ADAM9	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9
AKT	Proteinkinase B
AMD3100	Plerixafor
Aqua dest.	Destilliertes und entkalktes Wasser
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BERA	Brainstem-evoked response audiometry
BLC	B lymphocyte chemoattractant
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CK β 8-1	Genprodukt des MPIF1-Gens
CT	Computertomographie
CXCL7	Chemokine (C-X-C motif) ligand 7
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N, N, N', N'-tetraessigsäure
ENA-78	Epithelial neutrophil-activating protein 78
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
et al.	et alii (und andere)
FBS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor

Flt-3	Fms like tyrosine kinase 3
GCP-2	Human granulocyte chemotactic protein-2
GCSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GRO	Growth-regulated oncogene
HGF	Hematopoetic growth factor
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
I-309	Entspricht CCL1 (CC-chemokine ligand 1)
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon- γ
IGEPAL CA-630	Octylphenoxyethoxyethanol
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP	Insulin-like growth-factor-binding protein
IL	Interleukin
IP-10	Interferon- γ induced protein 10 kD
kDa	Kilodalton
KHBW	Kleinhirnbrückenwinkel
LIF	Leukemia inhibitory factor
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
MCSF	Macrophage colony stimulating factor
MDC	Macrophage-derived cytokine
MEK	MAPK/ERK Kinase
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIG	Monokine induced by gamma interferon
Min.	Minuten
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP	Matrix metalloproteinases

MPIF1	Myeloid progenitor inhibitory factor 1
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
NAP-2	Neutrophil activating protein-2
NF 2	Neurofibromatose Typ 2
NRG1	Neuregulin 1
NT	Neurotrophin
pAKT	Proteinkinase B im phosphorylierten Zustand
PARC	Pulmonary and activation-regulated chemokine
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
pERK	Phosphorylierte ERK
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphatidylinositid-3-Kinase
PLGF	Placental growth factor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma (Serin/Threonin-Kinase)
RANTES	Regulated and normal T cell expressed and secreted
Ras	Rat sarcoma, (monomeres G-Protein)
SCF	Stem cell factor
SDF1	Stromal cell-derived factor 1 (CXCR4-Aktivator)
SDS	Speech discrimination score
Sek.	Sekunden
T1/T2	MRT-Wichtungen
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween [®] 20
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
w/o	without
WB	Western-Blot
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schwannom.....	2
Abbildung 2: Magnetresonanztomografie eines Vestibularisschwannoms.	8
Abbildung 3: Primäre Schwanzzellkultur.	41
Abbildung 4: Pipettierschema für die ADAM9-Transfektion.....	50
Abbildung 5: Pipettierschema für die Stimulation und Inhibition von CXCR4. ...	55
Abbildung 6: Western-Blots zum CXCR4- und ADAM9-Nachweis.	60
Abbildung 7: Zellreduktion nach ADAM9-knock-down.....	61
Abbildung 8: Merlintransfektion von Vestibularisschwannomzellen.....	63
Abbildung 9: Kein Einfluss der Merlintransfektion auf ADAM9- und CXCR4- Proteinexpression..	64
Abbildung 10: Expression von ERK/pERK sowie AKT/pAKT durch Vestibularisschwannomzellen nach CXCR4-Stimulation durch SDF1 bzw. -Inhibition durch AMD3100.	66
Abbildung 11: Western-Blot zum Nachweis von Integrin $\alpha 6$	66
Abbildung 12 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von ADAM9 und Integrin.....	68
Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Vestibularisschwannome mit Integrinexpression.	69
Abbildung 14: Cytokinexpression der Tumoren T65, T68 und T72 im Vergleich zu einem gesunden N. vestibulocochlearis.....	70

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Symptomatik.....	6
Tabelle 2: Klassifikation der Vestibularisschwannome.....	8
Tabelle 3: Klassifikation des Hörvermögens.....	9
Tabelle 4: Hannover-Klassifikation.....	10
Tabelle 5: Geräte und Utensilien.....	26
Tabelle 6: Verbrauchsmaterial.....	28
Tabelle 7: Chemikalien.....	29
Tabelle 8: Zellen.....	32
Tabelle 9: Bakterien.....	32
Tabelle 10: RNA.....	32
Tabelle 11: Kits.....	33
Tabelle 12: Antikörper.....	33
Tabelle 13: Verwendete Computerprogramme.....	34
Tabelle 14: Zusammensetzung verwendeter Medien und Lösungen.....	35
Tabelle 15: Xylol-/Alkoholreihe zum Entparaffinieren der Präparate.....	56

IV. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Mario Löhr und Frau Dr. med. Maria Breun für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes im Tumorbioologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg und der intensiven Betreuung der Arbeit.

Genauso danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Carsten Hagemann, der für sämtliche Probleme und deren Lösungen, die im Verlauf dieser Dissertation aufgetreten sind, als zuverlässiger Ansprechpartner bereitstand („Das ist Forschung!“). Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Katharina Grüning, Frau Elisabeth Karl und Frau Siglinde Kühnel für die hervorragende technische Unterstützung im Labor, ohne die der reibungslose Ablauf unmöglich gewesen wäre.

Zuletzt richtet sich mein Dank an Herrn Dr. med. Rüdiger Klein für die Bereitstellung einiger histologischer Schnitte, um die mikroskopische Darstellung eines Schwannoms grafisch zu verdeutlichen.

V. Lebenslauf

VI. Eigene Veröffentlichung und Kongressteilnahme

Veröffentlichung:

11/2020

Analysis of ADAM9 Regulation and Function in Vestibular Schwannoma Primary Cells. Nattmann A, Breun M, Monoranu CM, Matthies C, Ernestus R-I, Löhr M, Hagemann C, BMC Res Notes. 2020;13:596. doi:10.1186/s13104-020-05378-7

Kongressteilnahme:

05/2019

10. Brain Tumor Meeting 2019: Posterpräsentation „The significance of ADAM9 expression regarding the pathogenesis of vestibular schwannoma”