

**Aus der Universitätsklinik für
Neurochirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Tatagiba**

**cDNA Microarray Analyse und Genexpressionsprofil
von sporadischen Vestibularisschwannomen
verglichen mit gesundem Autopsiegewebe: Eine
Betrachtungsweise auf molekularer Ebene unter
Verwendung der Ingenuity Pathway Analysis Software**

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

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

vorgelegt von

Isabel Florence Gugel

aus

Tübingen

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Krischek
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Bornemann

Widmung

Meinen Eltern und meinem Bruder Christian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
A Vorwort.....	6
B Einleitung.....	6
1. Vestibularisschwannome.....	6
1.1 Allgemeine Informationen.....	6
1.2 Epidemiologie.....	7
1.3 Tumortypen.....	8
1.3.1 Sporadische.....	8
1.3.2 Zystische.....	8
1.3.3 Neurofibromatose Typ 2 assoziierte.....	11
1.4 Lokalisation, Mikroskopie und Makroskopie.....	14
1.4.1 Immunzellinfiltrate.....	16
1.4.2 Makroskopische Klassifikationssysteme.....	17
1.5 Klinische Symptomatik.....	20
1.6 Diagnoseverfahren.....	21
1.6.1 Neuro-otologische Diagnostik.....	22
1.6.2 Radiologische Diagnostik.....	25
1.7 Differentialdiagnosen.....	25
1.8 Therapie.....	26
1.8.1 Operative Verfahren und Zugangswege.....	27
1.8.1.1 Retrosigmoidal-Subokzipital.....	29
1.8.1.2 Translabyrinthär.....	31
1.8.1.3 Subtemporal/Transtemporal extradural.....	31
1.8.1.4 Neuromonitoring.....	32
1.8.1.5 Komplikationen.....	34
1.8.2 Fraktionierte Radiochirurgie und Radiotherapie.....	35

1.8.3	Beobachtung.....	37
1.9	Outcome.....	37
1.10	Genetik.....	39
1.10.1	Genetik der Neurofibromatose Typ 2.....	39
1.10.2	Das NF-2 Gen.....	40
1.10.3	Das Proteinprodukt Merlin.....	41
1.10.3.1	Konformations- und Aktivitätszustand.....	42
1.10.3.2	Zellzykluskontrolle, Apoptoseinduktion und Genregulation.....	43
2.	Informationen über das Immunsystem.....	44
2.1	Angeborenes und Erworbenes Immunsystem.....	44
2.1.1	Angeborenes Immunsystem.....	44
2.1.2	Erworbenes Immunsystem.....	46
2.2	Immunantwort und Tumore.....	48
2.3	NFAT-Transkriptionsfaktoren in T-Zellen.....	51
3.	Fragestellung und Zielsetzung der Studie.....	52
C	Problemstellung.....	53
D	Material und Methoden.....	56
1.	Vorbereitung und Planung der Studie.....	56
1.1	Studiendesign.....	57
1.2	Tumorgruppe.....	57
1.2.1	Klinischen Symptomatik und Befundung der Tumorproben.....	59
1.2.1.1	Abbildung Akustische Symptome.....	60
1.2.1.2	Abbildung Fazialisparameter.....	62
1.2.1.3	Abbildung Trigemini-parameter.....	63
1.2.1.4	Abbildung Vestibularisparameter.....	64
1.3	Kontrollgruppe.....	64
2.	Genexpressionsanalyse.....	65

2.1	Gesamt-RNA Isolierung mittels eines Kit Systems.....	65
2.2	Qualitätsbestimmung der RNA durch ein Kit System.....	68
2.3	Affymetrix® GeneChip 3'IVT Express Kit und Human Genome U219 Array Plate.....	68
3.	Softwarepakete und statistische Analyse.....	70
4.	Bioinformatik.....	73
4.1	Ingenuity Pathway Analysis Software.....	73
4.1.1	Signalweganalyse.....	73
4.1.2	Netzwerkanalyse.....	74
4.1.3	Biologische Funktionen.....	74
4.1.4	Kandidatengenanalyse.....	74
E	Ergebnisse.....	75
1.	Genexpressionsprofile durch Verwendung der cDNA Microarray.....	76
2.	Ingenuity Pathways Analysis (IPA) der deregulierten Gene.....	77
2.1	Signalweganalysen.....	78
2.1.1	Signalweg „The Role of NFAT in Regulation of the Immune Response”.....	85
2.1.2	Signalweg „Antigen Presentation Pathway“.....	88
2.1.3	Signalweg „Leukocyte Extravasation Signaling“.....	89
2.1.4	Signalweg „Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses“.....	91
2.1.5	Signalweg „CD28 Signaling in T Helper Cells”.....	93
2.1.6	Signalweg „Cytotoxic T-Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells”.....	95
2.2	Netzwerkanalysen.....	97
2.3	Kandidatengenanalyse.....	102
2.4	Biologische Funktionen.....	105

F	Diskussion.....	106
	1. Signalweganalyse.....	109
	1.1 Tumor-Immunzellinteraktion.....	109
	1.2 MHC II exprimierende Tumorzellen und das Immunsystem... 111	
	1.3 NFAT-veränderte Zytokinexpression und T-Zelldifferenzierung in Vestibularisschwannomen.....	112
	1.4 NFAT – Apoptose und aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) in T-Zellen der Sporadischen Vestibularisschwannome.....	115
	1.5 NFAT – Effekt auf Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung.....	116
	1.6 Vermehrte Infiltration und Entzündungsreaktion in Vestibularisschwannomen.....	117
	1.7 Gesteigerte Elimination von Vestibularisschwannomzellen....	120
	1.8 CTL und CD4+ - basierte Apoptose von Vestibularisschwannomzellen.....	121
G	Zusammenfassung.....	123

Anhang

Abbildungsverzeichnis.....	127
Tabellenverzeichnis.....	129
Literaturverzeichnis.....	131
Danksagung.....	143
Curriculum Vitae.....	144

Abkürzungsverzeichnis

ABR	Auditory Brainstem Responses, syn. BAEP, BERA
ADAM23	ADAM metallopeptidase domain 23
AEP	Akustisch Evozierte Potentiale
Akt/PKB	Proteinkinase B
APAF1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Agonal State, dt. Agonaler Zustand
B7-1	CD80 molecule
B7-2	CD86 molecule
BAEP	Brainstem Auditory Evoked Potentials
BCL-2	Apoptosis regulator Bcl-2
BERA	Brainstem Electric Response Audiometry
BID	BH3 interacting domain death agonist
C1Q	Complement component 1, q subcomponent
C3	Complement component 3
C3AR1	Complement component 3a receptor 1
CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase
CALCA	Calcitonin-related polypeptide alpha
CALM	Calmodulin, syn. CAM
CAM	Zelladhäsionsmoleküle (engl. cell adhesion molecules)
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD25	syn. IL2RA, interleukin 2 receptor, alpha
CD40L	CD40 ligand
CD44	CD44 Molekül
CDC42	Cell division cycle 42
CDH5	Cadherin 5 Typ 2
CDK2	Cyclin-Dependent Kinase 2
CEBP	syn. CEBPA, CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) alpha

CK1	Casein Kinase 1 alpha 1, syn. CSNK1A1
COX2	Cytochrome c oxidase subunit II
CT	Computertomographie
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
CytoC	Cytochrome C
dB	Dezibel
DC	Dendritische Zelle
DD	Differentialdiagnose
EGR	syn. EGR1, Early growth response protein 1
EMG	Elektromyogramm
ENG	Elektronystagmographie
ErbB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ErbB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
FADD	Fas-associated Death Domain Protein
FAEP	Frühe Akustisch Evozierte Potentiale (engl. syn. BAEP, BERA, ABR)
FASL	Fas Ligand, syn. CD95L
FCER	Fc Rezeptor IgE
FCGR	Fc Rezeptor IgG
FOS	Proto-oncogene c-Fos
FSR	Fraktionierte Stereotaktische Radiotherapie
GFAP	engl. Glial Fibrillary Acidic Protein, dt. saures Gliafaserprotein
GKRS	Gamma Knife Stereotactic Radiosurgery
GM-CSF	syn. CSF2RB, colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK	Glycogen Synthase Kinase
HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2
HBG	House und Brackmann Grad

HLA	Humanes Leukozytenantigen, engl. Human Leukocyte Antigen, syn. Haupthistokompatibilitätskomplex-Antigen, Histo-Kompatibilitäts-Antigen, Transplantations-Antigen
IAC	Interner auditorischer Kanal
ICAD	syn. DFFA (DNA fragmentation factor subunit alpha)
ICAM	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interferon, syn. IFNA = Interferon alpha
IFNG	syn. IFNgamma, Interferon-gamma
IgK	Immunoglobulin kappa locus
IL	Interleukin
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ITGA	Integrin alpha
ITPR1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1, syn. IP3R
JAM	Junctional Adhesion Molecule
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
JUN	Jun proto-oncogene
KHBW	Kleinhirnbrückenwinkel
KM	Kontrastmittel
LIF	Laser-induzierten-Floureszenzdetektion
LINAC	Linear Accelerator, dt. Linearbeschleuniger
LUCA-15	syn. RBM5 (RNA binding motif protein 5)
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MEF	Myocyte Enhancer Factor 2A, syn. MEF2A, MEF-2
MEP	Motorisch Evozierte Potentiale
Merlin	Moesin-Ezrin-Radixin-like-Protein
MFT	Microarray Facility Tübingen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. Major Histocompatibility Complex
MIP-1alpha	Macrophage inflammatory protein 1-alpha
MOXD1	Monooxygenase, DBH-like 1
MRT	Magnetresonanztomographie

MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
MYPT-1-PP1δ	Myosinphosphatase-1-Protein-Phosphatase
NALP	NLR family, pyrin domain
NF 2	Neurofibromatose 2 Gen
NF Typ 2	Neurofibromatose Typ 2
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen, engl. Nuclear factor of activated T-cells
NK	Natürliche Killerzelle
NLR	NOD-like receptors, nucleotide-binding domain
NRG1	Neuregulin 1
P2RY13	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13
PAK	P-21 activated Kinase
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PD-1	syn. B7H1, PDCD1 (programmed cell death 1)
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIK3CG	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide, syn. PIK3
PIKE-L	Phosphatidylinositol 3-kinase enhancer, syn. AGAP2 (ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2)
PIKE-L	PI3K enhancer-L
PKA	Proteinkinase A
PKR	syn. EIF2AK2 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2)
PMI	Postmortem-Intervall
PPP3CB	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isozyme
PPR	Pattern Recognition Receptor
pRb-CDK	Retinoblastoma-Cyclin-Dependent Kinase (CDK)
PRPH	Peripherin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1, syn. SELPLG (Selectin P ligand)
PTA	Reintonaudiometrie, engl. Pure Tone Audiogram

PTPN11	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 11
PTX3	Pentraxin 3
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
RIN	RNA Integrity Number/RNA Integritätsnummer
RLR	(RIG-1)-like receptors, retinoid acid-inducible gene 1
RMA	Robust Multichip Average
SDS	Speech Discrimination Score
SEP	Somatisch Evozierte Potentiale
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
SLEPLG	Selectin P ligand
SLP	Stomatin-like protein
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
SRS	Stereotaktische Radiochirurgie
SSEP	Somatosensorisch Evozierte Potentiale
SVS	Sporadische Vestibularisschwannome
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
TCR	T-Zellrezeptor
Th	T Helferzelle
TLR	Toll-like Receptor, d. Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor, syn. TNFA = TNFalpha
TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSG	Tumorsuppressorgen
VCAM	syn. VCAM1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEMP	Vestibulär Evozierte Myogene Potentiale
VS	Vestibularisschwannome

A Vorwort

Die Intention dieser Dissertation war es, tiefere Einblicke im molekularen Verhalten der sporadischen Vestibularisschwannome zu erhalten.

Im Besonderen spielen komplexe Abläufe auf molekularer Ebene für die Ätiologie und Pathogenese eine wichtige Rolle. Durch die folgenden Ergebnisse wird es uns ermöglicht, denkbare Entstehungsmechanismen besser nachvollziehen zu können. Dadurch kann entscheidend Einfluss auf die Therapie genommen werden. Zudem ist denkbar, dass mögliche Screeningverfahren daraus entwickelt werden können. Nach einem kurzen Überblick zum aktuellen Stand der Forschung auf dem Gebiet der Vestibularisschwannome, werden anschließend, neben der Methodik, die Ergebnisse und daraus resultierende Hypothesen im Diskussionsteil vorgestellt.

B Einleitung

1. Vestibularisschwannome

1.1 Allgemeine Informationen zu Vestibularisschwannomen

Vestibularisschwannome (VS), auch im gängigen Klinikjargon als Akustikusneurinome bekannt, sind histopathologisch benigne Tumore die aus den Schwannzellen des VIII. Hirnnerven hervorgehen (1-4).

Andere Bezeichnungen dafür sind Neurinom (5, 6), Neurilemmom (7) und Schwannom (6). Sie stellen mit 80-86% die häufigste Raumforderung im Kleinhirnbrückenwinkel dar (8).

VS sind in 3 Kategorien einzuteilen: unilateral sporadische VS, bilateral Neurofibromatose Typ 2 assoziierte VS und zystische VS (1, 9). Letztere stellen eine schnell und aggressiv wachsende Untergruppe der sporadischen Form dar, die neben soliden Tumoranteilen, zystische Komponenten enthält (10).

Beim hereditären Tumorsyndrom, der Neurofibromatose Typ 2 (NF Typ 2), treten neben anderen klinischen Manifestationen, typischerweise im Laufe der

Zeit, bilaterale VS auf. Somit stellt dies ein pathognomonisches und wegweisendes Merkmal für die Diagnostik der Erkrankung dar (1, 11). Charakteristisch dafür ist zudem eine Manifestation der VS in jüngeren Jahren. Hingegen erkranken Patienten bei der sporadischen VS meist im durchschnittlichen Alter von 50 Jahren (1).

VS sind langsam wachsende Tumore (2, 12, 13) mit einer jährlichen Wachstumsrate zwischen 0.2 - 2mm (8). Die klinische Symptomatik bewegt sich im oto-neurologischen Bereich (14, 15) und wird nicht durch den histologischen Grad und nicht nur durch die Größe (16), sondern andere Faktoren bestimmt, wie beispielsweise die Tumorstadiumsrate (5). Es kommt zu Kompressionssymptomen und in entsprechendem Ausmaß durch ein expansives Wachstum auch zur Hirnstammkompression bis hin zum Tod (12, 17, 18).

1.2 Epidemiologie

VS repräsentieren mit einem Anteil von 80-86% die häufigste Raumforderung im Kleinhirnbrückenwinkel (8, 19). Sie machen ca. 6 – 10 % der intrakraniellen Tumore (8, 19, 20) und 25 - 33% aller Neoplasien der hinteren Schädelgrube aus (8).

Die Inzidenz beträgt 10 pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr (17).

95% der VS sind unilateral sporadisch auftretend (1, 17), in diesem Fall werden sie hauptsächlich zwischen dem 30.- und 70. Lebensjahr, mit einem Manifestationsgipfel um das 40.- und 60. Lebensjahr, symptomatisch (12). 5% der VS sind mit der Neurofibromatose Typ 2 assoziiert. Hierbei kommen sie typischerweise bilateral vor (17) und werden charakteristischerweise bereits im jungen Erwachsenenalter symptomatisch (21, 22).

Unter den Geschlechtern sind Frauen im Vergleich zu Männern häufiger von VS betroffen. Zudem werden Frauen erst zu einem späteren Zeitpunkt symptomatisch (14). Kasantikul et al. wiesen nach, dass Frauen mit einem Anteil von 58%, im Vergleich zu 42% bei den Männern, nicht nur häufiger von VS betroffen sind, sondern zudem eine kürzere Krankheitsdauer aufweisen.

Außerdem besitzen sie größere Tumore, histologisch eine geringere Zelldichte und der Tumor ist stärker vaskularisiert (2, 12). Ein Grund für diesen Unterschied können hormonelle Ursachen sein (12). In der Schwangerschaft kann das Tumorwachstum deutlich beschleunigt sein (2).

1.3 Tumortypen

Die 3 Formen der VS unterscheiden sich einerseits darin, dass sie multiple oder singulär auftreten. Andererseits können sie Bestandteil eines hereditären Tumorsyndroms sein oder kommen sporadisch vor. Zudem können regressive Veränderungen vorkommen, die das Wachstum entscheidend beeinflussen.

1.3.1 Sporadische

Die meisten Befunde und wissenschaftlichen Erkenntnisse beziehen sich auf die sporadische Form dieser Tumore, deshalb soll in diesem Kapitel nicht näher darauf eingegangen werden.

1.3.2 Zystische

Die Formation von zystischen Anteilen in VS tritt mit Inzidenzen zwischen 7.6% und 24% auf (23).

Sie stellen eine aggressivere, das umliegende Gewebe verdrängende, Unterform der unilateral sporadischen VS dar (1). Charakteristisch ist eine schnelle expansive Volumenzunahme (19, 24), die durch die Zunahme der zystischen Komponente, nicht durch eine Vermehrung der Tumorzellen zustande kommt (24). Diese Expansion erfolgt sehr schnell und führt zur rapiden Exazerbation der Klinik mit Kompressionssyndromen in der hinteren Schädelgrube und der umgebenden Strukturen (19, 24). Deshalb weisen Patienten mit dieser Tumorform eine kurze, meist initial atypische Klinik auf (25).

Oft ist durch das Tumorwachstum der N. facialis betroffen und es kommt zu typischen Ausfallerscheinungen dieses Nervs (24).

Zystische Komponenten dieser Tumore entspringen aus dem lockeren Antoni B Gewebe (1, 26, 27). Hier wird vermehrt myxomatöses Material in den kleinen zystischen Arealen produziert. Letztere konfluieren dann zu größeren Zysten und komprimieren, sowie verdrängen, das umliegende Antoni A Gewebe. Gleichzeitig werden aus dem Antoni A Gewebe kapselartige oder membranähnliche Strukturen gebildet (24, 28).

Immunhistochemisch gesehen befindet sich im Antoni A Gewebe der zystischen VS große Mengen an S-100 Protein, Fibronectin, Vimentin und Laminin-positive Fasern. Diese histologischen Merkmale finden sich weniger im Antoni B Gewebe (24).

Radiologisch können zystische VS von den soliden VS sehr gut durch das MRT unterschieden werden (s. Abb. 1). In der T2-gewichteten Aufnahme zeigt sich eine Kombination aus hyperintensiven Zysten und isointensem Tumorgewebe (1, 19). Das Letztere stellt sich wie bei der soliden Form dar. In Gadolinium-haltigen T1-Aufnahmen weisen die Zysten keine Affinität für das Kontrastmittel auf. In der Nativaufnahme des MRT stellt sich ein isointenser Tumor mit hypointensen Arealen dar (1, 19).

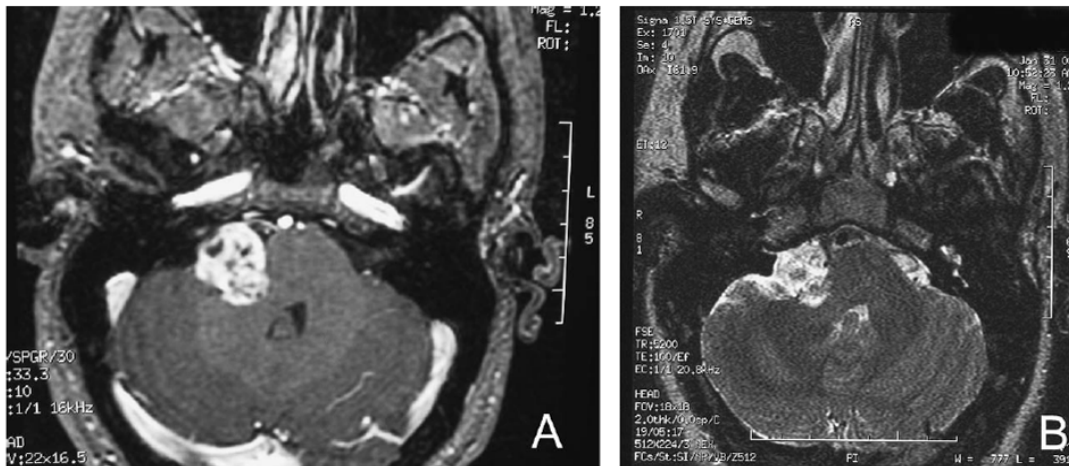


Abb. 1: MRT-Aufnahmen eines zystischen Vestibularisschwannoms.

(A) T1-gewichtete, axiale Aufnahme mit dem Kontrastmittel (KM) Gadolinium. Als KM-affine Raumforderung stellt sich rechtsseitig ein VS mit zentraler Signalabschwächung dar, welche am ehesten den zystischen Komponenten entspricht, die sich nicht mit KM anreichern. (B) T2-gewichtete, axiale Aufnahme mit hier untypischer gesteigerter Intensität im Vergleich zu sporadischen VS. Gewöhnlich zeigt sich der Tumor isointenser. Zudem liegen Arealen mit Hyperintensität vor, die den Zysten entsprechen (1).

Quelle: Neff et al. 2006 (1)

Therapeutisch gesehen muss gehandelt werden. Konservative Behandlung ist nicht empfehlenswert, denn die Wachstumsrate ist unvorhersehbar und das Risiko zur schnellen Expansion der Zysten ist hoch (24). Nicht nur die Therapie auch evtl. Resttumor unterscheidet sich zur soliden Form. Kameyama et al. beschrieb, dass Resttumore der zystischen VS im Vergleich zu den Residuen der soliden Form zu einem erneutem, erhöhten und beschleunigtem Wachstumspotential neigen und oft mit vielen weiteren Sekundäreingriffen behaftet sind (13).

1.3.3 Neurofibromatose Typ 2 assoziierte

Die Neurofibromatose Typ 2 (NF2) ist ein autosomal-dominant vererbtes Tumorsyndrom (21, 29). Es tritt mit einer jährlichen Inzidenz von 1:25.000 Lebendgeburten und einer Prävalenz von 1 in 60.000 Einwohnern in Erscheinung (30).

Symptomatisch werden die Patienten vor allem im frühen Erwachsenenalter, zwischen 20-22 Jahren mit Symptomen wie Schwerhörigkeit, Tinnitus und Gleichgewichtsstörungen (21, 22). Als autosomal dominantes Krankheitsbild liegt mit 60 Jahren eine vollständige Penetranz vor (29). Durch unterschiedliche Mutationsmechanismen wird bei diesem Krankheitsbild das Tumorsuppressorgen NF2, das sich auf dem Chromosom 22q12 befindet, inaktiviert (29). Dadurch kommt es zur fehlerhaften bzw. mangelhaften Funktion seines Proteinprodukts Merlin (4). Charakteristisch ist für die NF 2 das mit 96% dotierte Auftreten von bilateralen VS (11), meist vom N. vestibularis superior (21) ausgehend. Daneben treten weitere Tumore, wie Schwannome anderer Hirnnerven, peripherer und spinaler Nerven auf. Zudem kommen intraspinale und intrakranielle Meningeome und niedrigmalige Tumore des ZNS, wie Ependymome und Gliome, vor. Außerdem sind okuläre Symptome, in Form von Katarakten möglich. Kutane Manifestationen, wie subkutane noduläre Knoten und Café-au-Lait Flecken sind ebenso häufig anzutreffen (s. Abb. 2) (4, 17, 21, 22, 29).

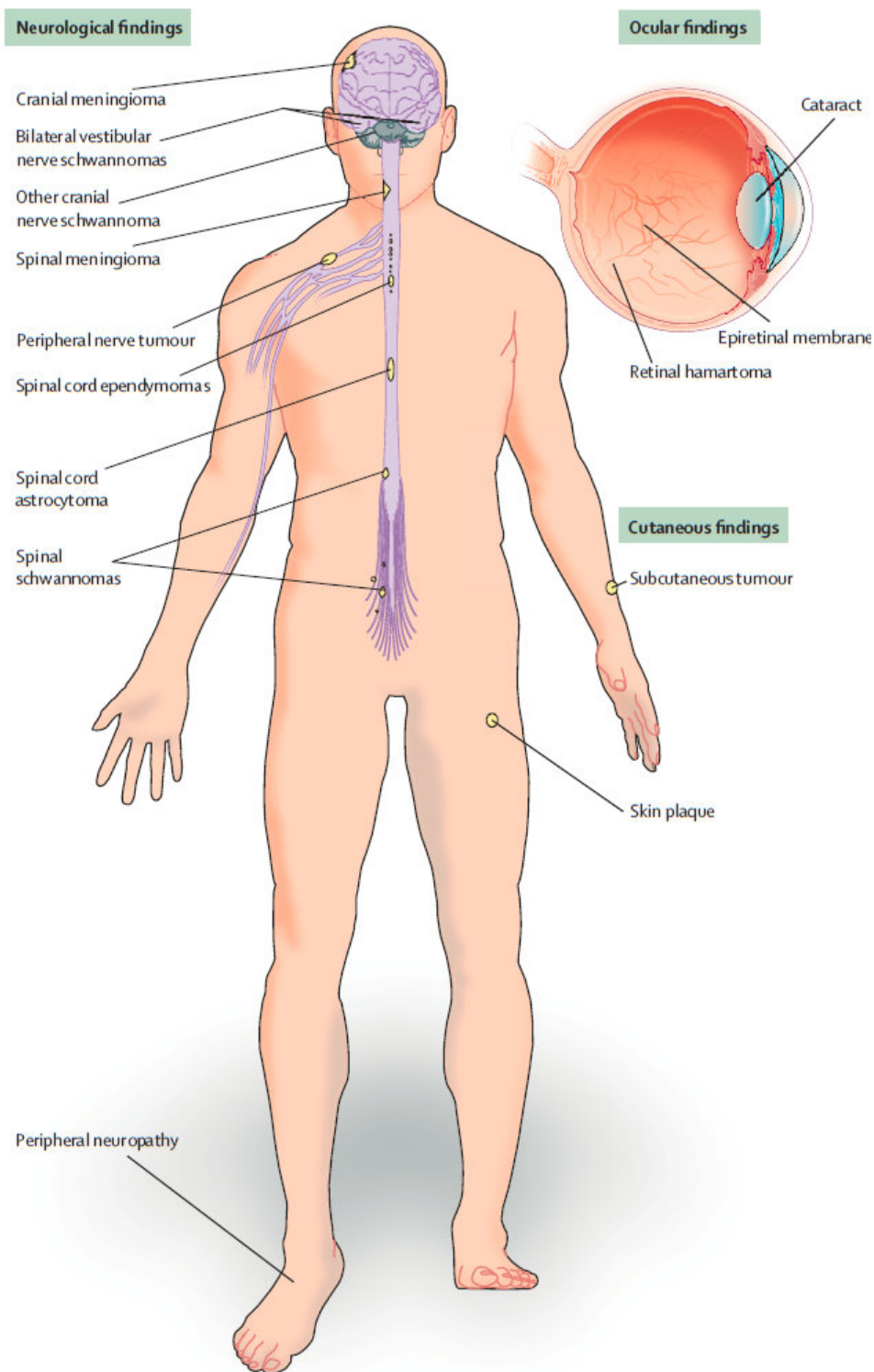


Abb. 2: Klinische Manifestationen bei der Neurofibromatose Typ 2.
 Quelle: Asthagiri et al. 2009 (31)

Die Diagnose einer NF 2 wird klinisch (neurologisch, ophthalmologisch und dermatologisch), radiologisch und molekulargenetisch gestellt (29). Dazu gibt es einerseits signifikante Klassifikationssysteme, wie die Manchester Kriterien (s. Tab. 1) (21), oder T1/T2-gewichtete MRT-Aufnahmen, die vor allem die VS gut darstellen (s. Diagnostik der VS). Zudem kann eine positive Familienanamnese mit den zugehörigen Symptomen auf eine NF 2 hindeuten (29).

Tab. 1: Kriterien zur Diagnose der Neurofibromatose Typ 2 nach Manchester.
Quelle: Evans et al. 1992 (21)

A: bilaterale Vestibularisschwannome (VS) oder
B: Verwandter 1. Grades mit NF Typ II und einseitigem VS oder Folgendem: Meningeom, Schwannom, Gliom, Neurofibrom, juvenile posteriore subkapsuläre Linsentrübung
C: einseitiges VS und 2 der folgenden Erscheinungen: Schwannom, Gliom, Neurofibrom, juvenile posteriore subkapsuläre Linsentrübung
D: multiple Meningeome (≥ 2) und einseitiges VS oder 2 der folgenden Erscheinungen: Schwannom, Gliom, Neurofibrom, Katarakt

Symptome werden jeweils durch den Befall der betroffenen Strukturen ausgelöst (21), jedoch im Falle des VS sind die initialen Erscheinungen Hörverlust, Tinnitus und Gleichgewichtsstörungen. Diese treten einzeln oder in Kombination miteinander auf. Meist ist das erste Symptom ein unilateraler Hörverlust, den ein Tinnitus begleitet oder vorausgeht. Erst später beziehungsweise weniger häufig zeigen sich Symptome wie Übelkeit und Erbrechen, sowie Schwindel (21, 29).

Die Hauptdifferentialdiagnose der NF 2 ist die Schwannomatose, eine Neurofibromatose-ähnliche Erkrankung, bei der jedoch auch unilaterale VS auftreten können (29, 32).

Die hohe Komorbidität und schwere Morbidität ist für den Patienten sehr belastend und schränkt ihn in seiner Lebenserwartung enorm ein (17, 29). Mit 70 Jahren sind 100% der NF 2 Patienten verstorben (21). Die Therapie ist

dementsprechend nicht kurativ, sondern funktionserhaltend und palliativ ausgerichtet (29).

1.4 Lokalisation, Mikroskopie und Makroskopie

VS werden dem WHO Grad I (20) zugeordnet und sind histopathologisch benigne Tumore, die von den peripheren Schwannzellen des VIII. Hirnnerven ausgehen (1, 2, 4, 7, 13, 17). Die Bezeichnung Vestibularisschwannom ist treffender und histologisch korrekter, da sie vom vestibulären Anteil, sowohl vom N. vestibularis superior, als auch vom N. vestibularis inferior gleichermaßen ausgehen (1, 17, 33). VS entstehen an einer Transitionszone, auch Redlich-Obersteiner Zone genannt. Sie befindet sich ca. 8-12 mm von der Pons entfernt und markiert den Übergang vom zentralen ins periphere Myelin. Somit stellt sie die Grenze zwischen dem ZNS und PNS dar (4, 8, 16, 17, 34).

Von der Tumorstruktur ausgehend werden 2 Anteile unterschieden, ein Schaft der im Meatus acusticus internus liegt und ein extra-temporaler Anteil, der den Hauptteil des Tumors bildet (s. Abb. 3) (5).

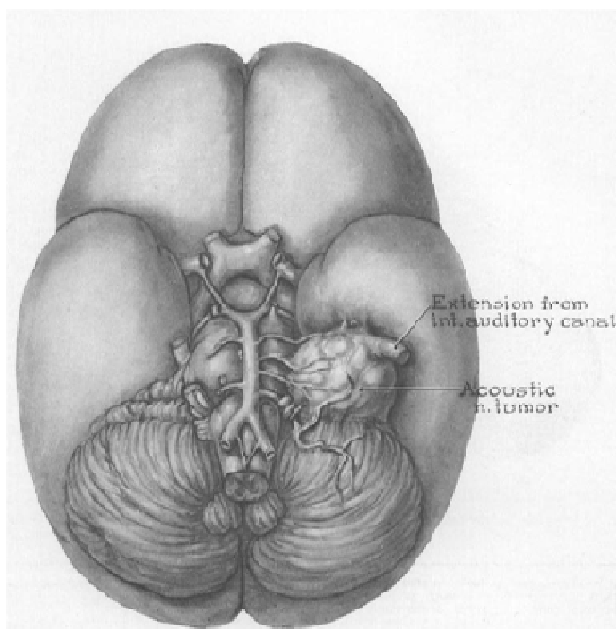


Abb. 3: Makroskopische Lokalisation eines Vestibularisschwannoms.
Quelle: Nager et al. 1969 (5)

Makroskopisch gesehen sind VS gut abgrenzbare, bekapselte Tumore, die eine blasse Farbe und eine harte, derbe Konsistenz aufweisen (5). Durch myxoide Degenerationen wird eine gelbliche Schnittfläche sichtbar (6). Kleine Tumore differenzieren sich von größeren dadurch, dass sie spheroidal lokalisiert sind und milchig-weiß, sowie elastisch erscheinen. Hingegen sind größere VS in ungleichmäßige Lobuli unterteilt (5). Die Farbe variiert je nach dem Anteil der regressiven Veränderungen. Blutige, hyalin-degenerative, ödematöse, fettige und zystische Veränderungen sind vorzufinden (5).

In VS finden sich zwei histologische Subtypen, die nach Antoni in Typ A und B eingeteilt werden (19, 20, 24).

Antoni Typ A Gewebe ist ein faserreiches Areal mit kompakter Struktur (s. Abb. 4) (6, 20, 24). Die Tumorzellen sind spindelförmig, faszikulär und gebündelt angeordnet und besitzen eine ovale bis längliche Form (6, 7, 20, 24, 35). Das Zytoplasma ist eosinophil (35). Ihre Zellkerne sind oft zug- und wirbelförmig oder dicht nebeneinander in Palisadenstellung angeordnet. Liegen die Kerne dicht Seite an Seite, dann werden sie auch als Verocay-Körperchen bezeichnet. Durch die Zytoplasmafortsätze, die die Zellkerne voneinander trennen, erscheint das Gewebemuster fischzugartig. Die Zellen sind insgesamt sehr unscharf voneinander abgrenzbar, dicht gepackt und erscheinen konfluierend (7).

Im Gegensatz dazu weist das Antoni Typ B Gewebe eine sehr lockere, faser- und zellarme Struktur auf (s. Abb. 5) (6, 7, 20). Das Gewebe erscheint kleinzystisch und enthält sternförmige Tumorzellen (24, 35). Daneben finden sich dafür typische regressive Veränderungen in Form von Makrophagenansammlungen, Verfettungen, Hyalin- und Hämosiderinablagerungen (24). Außerdem ist die myxoide Matrix schwach anfärbbar (7).

Der Anteil an Antoni Typ A und B Gewebe ist innerhalb des Tumors sehr variabel (35).

Immunhistologisch gesehen exprimieren Schwannome typischerweise das S100 Protein. Zusätzlich jedoch auch Vimetin und manchmal sind sie auch positiv für das saure Gliafaserprotein (GFAP) (7, 35).

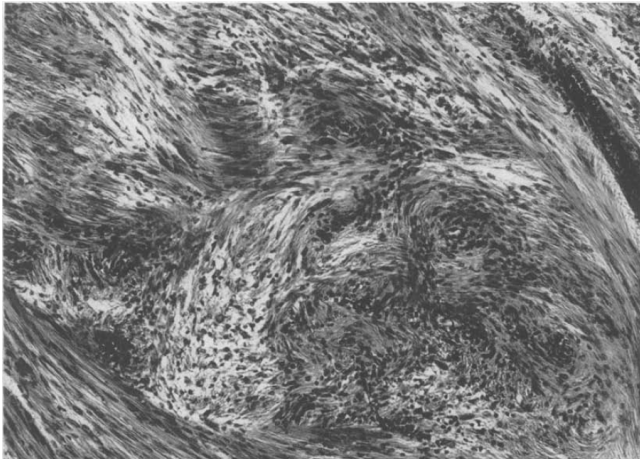


Abb. 4: Histologischer Schnitt mit Antoni Typ A und B Gewebe. Fibrilläres, kompaktes Antoni Typ A Gewebe neben faserarmen, retikulären Antoni Typ B Gewebe. Quelle: Nager et al. 1969 (5)

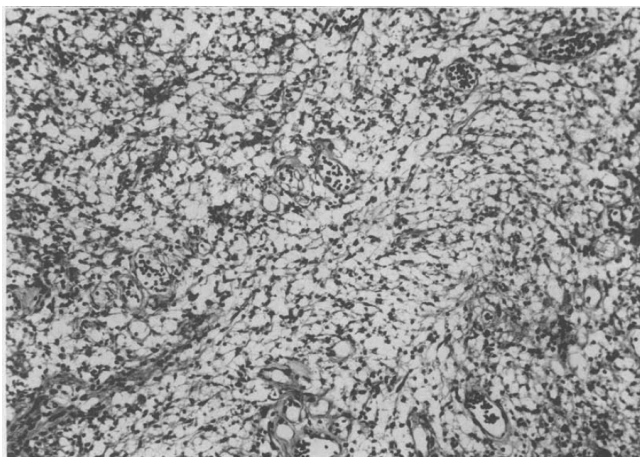


Abb. 5: Retikuläre Struktur des Antoni Typ B Gewebes im histologischen Schnitt. Quelle: Nager et al.1969 (5)

1.4.1 Immunzellinfiltrate

In Vestibularisschwannomen finden sich neben dem Antoni Typ A und B Gewebe, histologische Korrelate für chronische Entzündungsprozesse, wie

beispielsweise Immunzellen (36). Rossi et al. wiesen durch monoklonale Antikörperanfärbung das Vorhandensein spezifischer Immunzellsorten in VS nach. Danach waren in 96% der Fälle Makrophagen, zu 87% CD8+ T-Zellen, zu 23% CD4+ T-Zellen und zu einem geringeren Prozentsatz auch B-Zellen vorhanden. Natürliche Killerzellen waren in den Präparaten nicht anzutreffen (37). Daneben finden sich zahlreiche Blutgefäße, narbige Deformationen und auch Thromben (36).

VS enthalten zudem sogenannte Tumor assoziierte Antigene (TAA) auf. Dies sind Oberflächenmembranantigene, die auf normalem Gewebe nicht exprimiert werden (38).

1.4.2 Makroskopisches Klassifikationssysteme

Es gibt verschiedene Klassifikationssysteme, die anhand der Makroskopie und Radiologie die VS einteilen können. Ein weit verbreitetes Klassifikationssystem ist die Hannover-Klassifikation nach Samii et al. 1997 (s. Tab. 2, s. Abb. 6) (39).

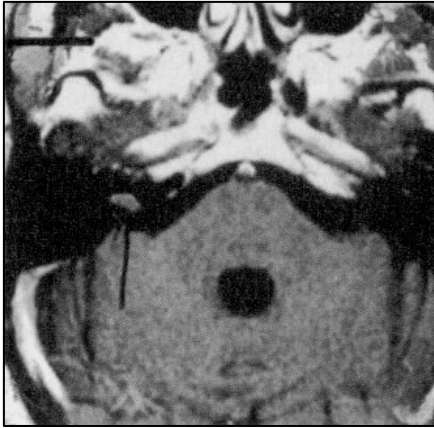
Auf einem Konsensusmeeting in Tokyo, 2003, wurde ein weiteres einheitliches System von Kanzaki et al. 2003 entwickelt (s. Tab. 3) (40).

Tab. 2: Einteilung der Tumorstadien mittels Hannover-Klassifikation nach Samii et al. 1997 (39).

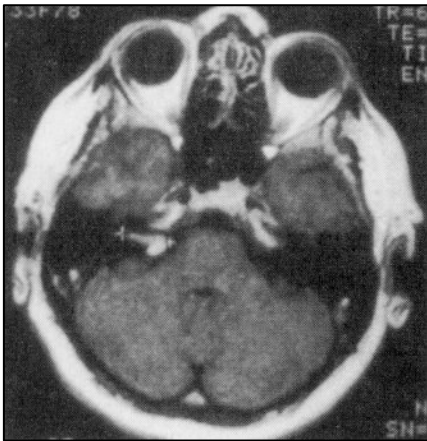
T1	a	Intrameatal , mediale Hälfte der IAC
	b	Ausdehnung laterale Hälfte des IAC, den Fundus nicht erreichend
	c	Erreicht den Fundus bis in die Cochlea oder die Bogengänge
	d	Infiltriert die Cochlea oder die Bogengänge
T2		Intra- und extrameatal
T3	a	Füllt die cerebello-pontine Zisterne
	b	Erreicht den Hirnstamm
T4	a	Komprimiert den Hirnstamm
	b	Verlagert den Hirnstamm und komprimiert den 4. Ventrikel, Liquoraufstau (Hydrozephalus)

Tab. 3: Klassifikationssystem nach Kanzaki et al. 2003 (40).

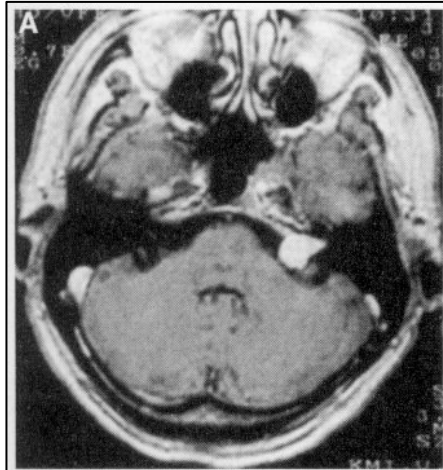
Grad	Definition	Kriterium
1	Small	1-10 mm extrameatal
2	Medium	11-20 mm
3	Moderately large	21-30 mm
4	Large	31-40 mm
5	Giant	>40 mm



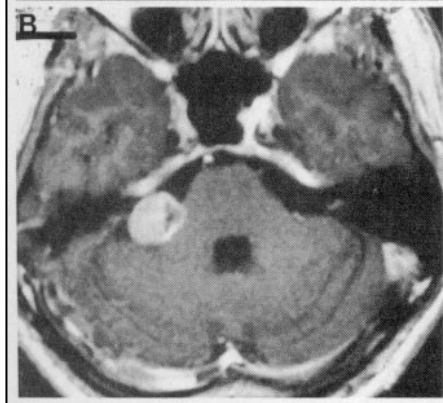
T1 intrameatal



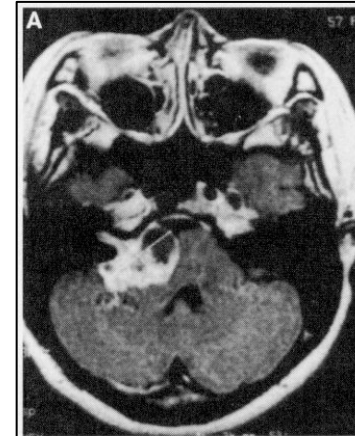
T2 intra-und extrameatal



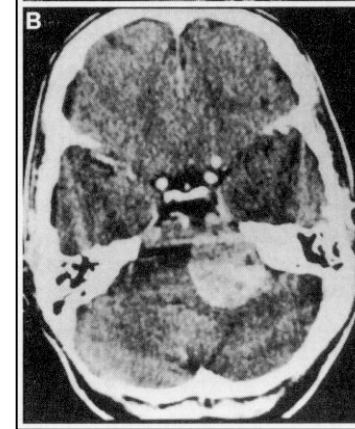
(A) T3a: füllt die zerebellopontine Zisterne



(B) T3b: erreicht den Hirnstamm



(A) T4a: komprimiert den Hirnstamm



(B) T4b: verlegt schwerwiegend den Hirnstamm und komprimiert den 4. Ventrikel

Abb. 6: Radiologische Einteilung der Tumorstadien in T1-T4 anhand der Hannoverklassifikation. Quelle: Samii et al. 1997 (39)

1.5 Klinische Symptomatik

Bei den VS wird die Klinik nicht nur durch die Größe der Tumoren bestimmt (16). Sie ist wesentlich abhängig von der Tumorwachstumsrate, der Ausdehnung des Kleinhirnbrückenwinkels, der Zisternengröße und der Relation des Hirnvolumens zur Größe des Schädels (5).

Bei den Symptomen handelt es sich um Kompressionsymptome der direkt involvierten und umliegenden Strukturen. Davon betroffenen sind beispielsweise die Hirnnerven N. vestibulocochlearis, N. trigeminus und N. facialis (s. Abb. 7). Auch angrenzende Strukturen wie der Hirnstamm, das Kleinhirn und die Liquorabflusswege sind miteinbezogen (12, 17, 18). Dabei reicht das Ausmaß von leichten Hörstörungen bis zur vollständigen Verlegung des Hirnstamms mit bis zu lebensbedrohlichen Ausmaßen (17).

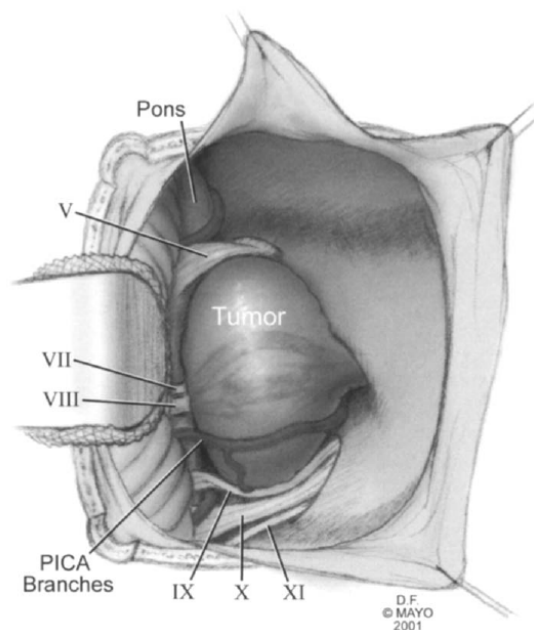


Abb. 7: Beziehung des Vestibularisschwannom zu den umliegenden Hirnnerven (V, VII-XI).
Quelle: Cohen-Gadol et al. 2001 (41)

Meistens treten in 95% akustische Symptome auf (14, 15, 42). Diese äußern sich in Form einer einseitigen Hörminderung, die schleichend, progredient oder akut, als einmaliger oder rezidivierender Hörsturz auftreten kann (16, 21, 29, 42).

Teilweise geht dem Hörverlust ein Tinnitus voraus oder begleitet ihn (21, 29).

Folglich ist der Othologe meist die erste Anlaufstelle für die primäre Diagnostik eines Akustikusneurinoms (16).

Zusätzlich, leiden 61% der Patienten unter vestibulären Symptomen (14, 15). Diese können sich als Gleichgewichtsstörungen äußern, die vor allem im Dunkeln, durch Wegfall des visuellen Ausgleichs auftreten. Oder sie treten in Form einer Schwindelsymptomatik auf, die sich vorwiegend als Schwankschwindel zeigt (16).

Der Trigeminus wird in 9% der Fälle befallen und seine Störungen umfassen Hypästhesien und abgeschwächte Kornealreflexe (14, 15, 18).

Mit einem kleineren Anteil von 6% liegen Fazialispathologien, wie beispielsweise Paresen, vor (14, 15). Die Einteilung der Fazialisstörung wird prä- und postoperativ anhand der House und Brackmann Klassifikation eingeteilt und bewertet (s. Tab. 4) (43).

Bei großen Tumoren $\geq 3\text{cm}$ ist es möglich, dass durch die Hirnstamm und Hirnnervenkompression ein ataktisches Gangbild, Doppelbilder, Schluckstörungen und Liquoraufstau hervorgerufen werden (18). Auch Zeichen eines erhöhten Hirndrucks, wie Übelkeit und Erbrechen, sind vorzufinden (29). Jedoch zu einer geringeren Häufigkeit und zu einem späteren Zeitpunkt (21). Die Dauer der Symptome ist sehr unterschiedlich. Größere Tumoren haben meist eine kürzere und prägnantere Symptombdauer als kleinere Tumore. Letztere machen mit 80% den Großteil der Tumoren aus und deshalb leidet die Mehrzahl der Patienten sehr lange unter den Symptomen. Teilweise erstreckt dies sich über einen Zeitraum von 2 Jahren und mehr (12).

1.6 Diagnoseverfahren

Wie schon erwähnt wurde ist die Diagnostik des VS ein multidisziplinäres Verfahren zwischen HNO-Ärzten, Neuroradiologen und Neurochirurgen. Dabei spielt die ausführliche Anamnese eine ebenso wichtige Rolle wie ein MRT der Schädelbasis. Primäre Anlaufstelle stellen meist die HNO Ärzte dar, denn die akustischen Symptome stehen anfänglich im Vordergrund.

1.6.1 Neuro-Otologische Diagnostik

Initiales Symptom ist meist ein unilateraler, progressiver und asymmetrischer sensorischer Hörverlust der sich im Hochtonbereich vorfindet. Dieser Befund findet sich bei > 95% der Patienten mit Vestibularisschwannom (44, 45). Durch das Vorhandensein einer Schallempfindungsstörung zeigt sich im Stimmgabelversuch nach Weber eine deutliche Lateralisation zur gesunden Seite (45, 46). Gemäß einer intakten Schalleitung ist der Rinne Versuch beidseitig positiv (45-47). Die erste Diagnostik, die veranlasst wird, ist das Reintonaudiogramm (18, 42, 45, 46). Hier findet sich eine Hochtonschwäche oberhalb von 1000Hz (45, 46). Jedoch liegt nur bei 1 von 1000 Patienten mit diesem Befund ein VS vor (45). Sie wird auch zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs angewendet. Die Sprachdiskrimination gibt das grobe Hörvermögen des Patienten wieder. Sie wird weniger als Basisdiagnostik verwendet, sondern eher im Verlauf der Erkrankung oder innerhalb der Therapie getestet. Zusammen können die Reintonaudiometrie und die Sprachdiskrimination mit der Klassifikation von Gardner und Robertson beurteilt werden (s. Tab. 4) (45, 48).

Tab. 4: Gardner & Robertson Klassifikation.

PTA = Pure Tone Audiogram, Reintonaudiometrie

SDS = Speech Discrimination Score, Sprachdiskrimination

dB = Dezibel

Quelle: Gardner et al. 1988 (48)

Klasse	Beschreibung	PTA (dB)	SDS (%)
1	gut bis sehr gut	0 - 30	70 - 100
2	alltagsdienlich	31 - 50	50 - 59
3	alltagsuntauglich	51 - 90	5 - 49
4	schwach	91 - maximaler Verlust	1 - 4
5	fehlt	nicht testbar	0

Ein wichtiges Verfahren zur objektiven Messung des Hörvermögens, ist die Messung der Hirnstammpotentiale früher Latenz (FAEP = frühe akustisch

evozierte Potentiale, englisch: BAEP = brainstem auditory evoked potentials, BERA = brainstem electric response audiometry, ABR = auditory brainstem responses). Bei deren Messung werden die Potentiale der anatomische Wegstrecke des Hörnervs und des Hirnstamms in Form von 6 Wellen abgeleitet um Pathologien zu erkennen (s. Abb. 8) (46). Sie ist immer noch der Goldstandard in der Audiologischen Diagnostik des VS (44). Fällt hier ein pathologischer Befund auf, ist die Indikation zur MRT gegeben (44). Sie wird vor allem auch zur Detektion von kleinen Tumoren $\leq 15\text{mm}$ eingesetzt (45). Als pathologische Zeichen finden sich vor allem verlängerte Interpeaklatenzen der Wellen I-III und I-V (18, 45). Primär ist jedoch der Befund der BAEP wichtig für die prognostische Beurteilung des Hörvermögens (45).

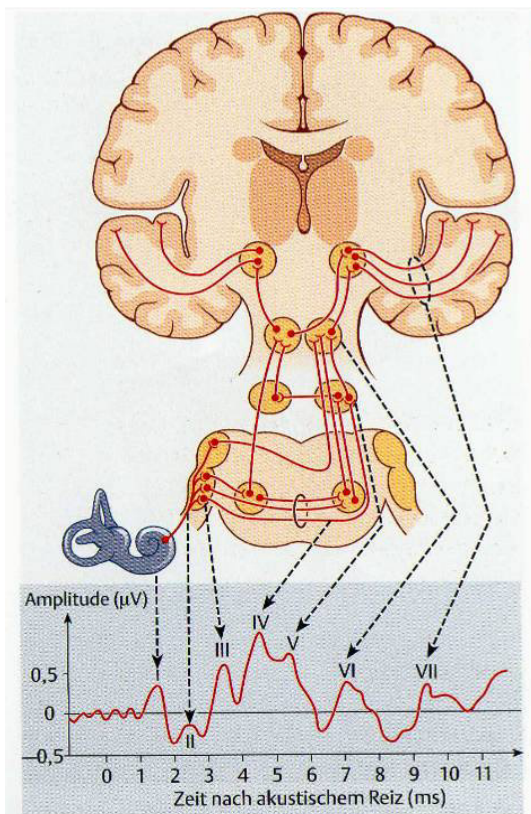


Abb. 8: BERA

(Hirnstammaudiometrie). Sie besteht aus 6 Wellen (I-VI), die jeweils anatomische Gebiete der Hörbahn widerspiegeln.

Quelle: Behrbohm et al. 2009 (46)

Tumoren in der Region des N. vestibularis inferior können durch die VEMP (Vestibulär Evozierte Potentiale) und im Bereich des superioren Teil durch die ENG (Elektronystagmographie) entdeckt werden (45). Bei der thermischen Labyrinthprüfung wird die Schwindelsymptomatik durch eine Untererregbarkeit

des Labyrinths aufgedeckt (46). Die Beurteilung des N. facialis kann in der Initialdiagnostik sowie im Verlauf durch die House und Brackmann Klassifikation beurteilt werden (s. Tab. 5) (4, 43, 45).

Tab. 5: Klassifikation der Fazialisfunktion nach House & Brackmann (43)

Grad	Parese	Charakteristik
1	Keine	Normal
2	Leicht	Geringe Schwäche, Ruhesymmetrie, geringe Mundasymmetrie bei Innervation
3	Mäßig	Leichte Asymmetrie, Lidschluss mit Anstrengung, leichte Mundastschwäche
4	Ausgeprägt	Stirnast plegisch, inkompletter Lidschluss, asymmetrischer Mundast bei maximaler Anstrengung
5	Schwer	Ruheasymmetrie, inkompletter Lidschluss, geringe Bewegung der Mundwinkel
6	Plegie	Keine Bewegung

Bei der neurologischen Untersuchung sollten alle relevanten Symptome abgefragt und im Speziellen die Hirnnerven V, VII-XI geprüft werden. Auch auf klinische Zeichen einer NF Typ 2 muss geachtet werden (4). Weitere diagnostische Mittel sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Zusätzliche Diagnostik. Quelle: Lumenta et al. 2007 (4)

Untersuchung	Symptom bzw. Indikation
EMG des N. facialis	Fazialisparese
Spinale MRT	Bei Patienten < 35 Jahren zur Abklärung einer NF 2
Motorisch evozierte Potentiale (MEP) und somatosensorisch evozierte Potentiale (SSEP)	Ataxie, Hemiparese
Trigeminus-SEP	Funktionsstörung des N. trigeminus
Vestibularisfunktionsprüfung	Zur Abklärung der Vestibularisfunktion

1.6.2 Radiologische Diagnostik

Mit einer Spezifität und Sensitivität von nahezu 100% ist das MRT das Mittel der Wahl in der VS Diagnostik (16, 18, 42, 49). In den T1-gewichteten Aufnahmen stellt sich das VS hypo-isointens dar und zudem reichert es sich nach Gadolinium-Injektion stark mit dem Kontrastmittel an (49). In den T2-gewichteten Aufnahmen, die vor allem das neurovaskuläre Bündel und dessen topographischen Lageverhältnisse zum Tumor aufzeigen, zeigt sich das VS hyperintens (49).

Indiziert ist ein MRT immer dann, wenn eine unklare einseitige Hörstörung vorliegt (16). Außerdem werden Zusatzerscheinungen wie Mikroblutungen (50), Zysten (1, 19) und bei ein Fünftel auch ein Hydrozephalus abgebildet (49). Letzterer kommt entweder durch eine Liquorabflussverlegung oder durch eine Sekretion von eiweishaltigem Material aus dem Tumor zustande (49). Als Ersatzdiagnostik und zur Kontrolle der postoperativen Gegebenheiten, ist auch das CT ein dienliches Mittel. Zudem werden hierbei die knöchernen Strukturen und die gegebenen anatomischen Verhältnisse visualisiert, die für den Operateur präoperativ eine wichtige Rolle spielen. Dies sind z.B. die Aufweitung des inneren Gehörgangs und die genaue Lage der Bogengänge und der Cochlea. Auch komplizierende Faktoren, wie eine Hochstand der Bulbus venae jugularis und eine dorsal ausgeprägte Pneumatisation der Mastoidzellen können dadurch festgestellt werden(4, 18, 49).

1.7 Differentialdiagnose

Die Hauptdifferentialdiagnose des Vestibularisschwannoms ist das Meningeom des Kleinhirnbrückenwinkels (KHBW) (18, 45, 47). Es ist neben dem VS der 2. häufigste Tumor in diesem Gebiet (20). Weniger häufig finden sich Epidermoide, Dermoide und Schwannome anderer Hirnnerven, wie z.B. im Foramen jugulare (IX, X, XI) oder das Trigemimusneurinom. Auch differentialdiagnostisch selten anzutreffen sind Gliome, Ependymome, Medulloblastome, Glomustumore und Metastasen (18, 47).

Neben den Differentialdiagnosen (DD) des KHBW müssen die DD der typischen Symptome des VS berücksichtigt werden. Dazu zählen der klassische Hörsturz, die Morbus Menière Erkrankung und eine Presbyakusis. Zudem kommen entzündliche Erkrankungen, wie die Neuronitis vestibularis, oder vaskuläre Ursachen, sowie vertebrobasiläre Insuffizienzen in Frage(4).

1.8 Therapie

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten und Indikationen (s. Tab. 7) VS zu behandeln. Dabei müssen verschiedene Kriterien, wie das Alter, der gesundheitliche Ausgangszustand des Patienten, der Tumortypus, die Klinik, das Tumorwachstum und natürlich der Wunsch des Patienten berücksichtigt werden (3, 8, 51). Generell unterscheiden wir zwischen den vier Therapiemodalitäten der Mikrochirurgischen Resektion, der Beobachtung, auch „Wait and Watch“ Methode genannt, der Radiochirurgie und der fraktionierten Radiotherapie (51, 52). Es gibt verschiedene Empfehlungen unter welchen Bedingungen eine Therapie eingesetzt werden sollte (s. Tab. 7).

Tab. 7: Therapieempfehlungen unter Standardbedingungen. HN = Hirnnerven.
Quelle: Lumenta et al. 2007 (4)

Situation	Therapieentscheidung	Begründung
Kleines, intrameatales VS, gutes Hörvermögen	Beobachtung	Therapierisiken nicht gerechtfertigt. 20-50% Risiko eines Hörverlustes bei Op
Kleines, intrameatales VS, erloschenes Hörvermögen	Beobachtung	Aktuell keine Therapienotwendigkeit
Kleines intrameatales VS; Fazialisparese	Operation	Entlastung des N. facialis
Großes VS, Hirnstammkompression	Operation oder Kombination Operation + Bestrahlung	Vitale Bedrohung, hohes Tumolvolumen
Extrameatales VS, gute HN-Funktion	Bestrahlung oder Operation	Therapie indiziert, in dieser Situation oft geringeres Risiko der Radiochirurgie

1.8.1 Operative Verfahren und Zugangswege

Operative Verfahren werden von Neurochirurgen und HNO Ärzten durch unterschiedliche Operationszugänge durchgeführt. Die operative Resektion eines VS stellt die beste Möglichkeit dar, das Tumolvolumen zu reduzieren (16, 53). Es wird vor allem bei größeren Tumoren eingesetzt, die zu Kompressionssyndromen, Obstruktionen und Verschiebungen der umliegenden Strukturen führen können (53).

Außerordentliche Operationsindikationen stellen ein Verschlusshydrozephalus im Bereich des 4. Ventrikels und große, zystische Tumore dar. Zystische VS können zu Einblutungen und zur raschen Zystenexpansion führen (18).

Hauptsächlich gibt es drei Zugangswege, den retrosigmoidal-subokzipitalen, den translabyrinthären und den subtemporal-extraduralen Zugangsweg (51). Letzterer wird auch als transtemporal-extraduraler Zugangsweg bezeichnet. Der retrosigmoidal-subokzipitale Zugangsweg ist der am häufigsten verwendete Zugangsweg in der Vestibularisschwannomchirurgie (s. Abb. 9). Im Folgenden soll vor allem auf diesen Zugangsweg detailliert eingegangen werden, da dieser hauptsächlich von den Neurochirurgen durchgeführt wird.

Grundsätzlich hängt die Entscheidung für einen der Zugangswege von der TumorgroÙe, des Tumorausmasses, dem präoperativen Hörvermögen und der Expertise des Chirurgen ab (42). Das Hörvermögen kann beim retrosigmoidal-subokzipitalen und dem subtemporal-extraduralen Zugangsweg erhalten werden. Der translabyrinthäre und retrosigmoidale-subokzipitale Zugangsweg ist für jegliche TumorgroÙe geeignet, wohingegen der subtemporal-extradurale Zugangsweg, vor allem für intrakanalikulär lokalisierte und kleine Tumore verwendbar ist (42). Ziel in der VS Chirurgie ist, die komplette Tumorentfernung unter Erhalt der neurologischen Funktionen, vor allem des N. acusticus und N. facialis (16, 51). Dabei kann auch eine subtotale Entfernung ausreichen, wenn dafür die Funktionen, wie beispielsweise des N. facialis, erhalten werden können (16, 33).

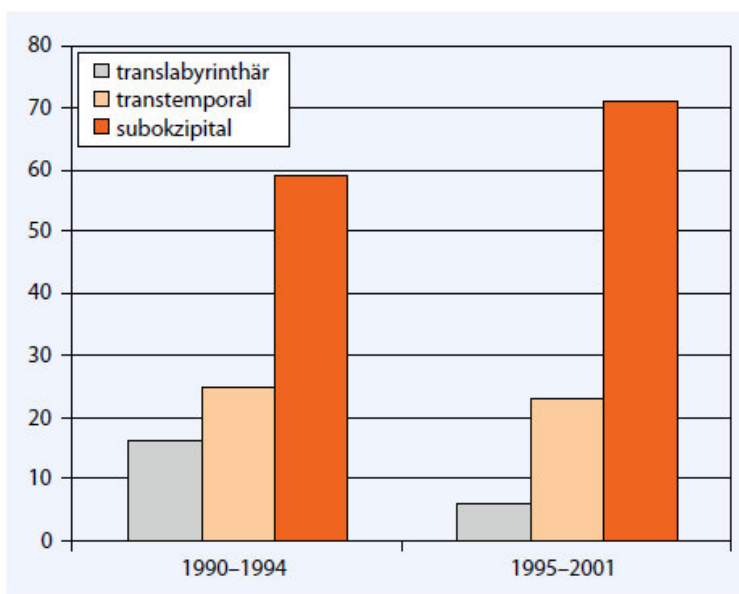


Abb. 9: Häufigkeiten der verschiedenen Zugangswege von 1990 - 2001 an der Universitäts-HNO-Klinik Würzburg. Quelle: Schwager et al. 2011 (16)

1.8.1.1 Retrosigmoidal-Subokzipital

Dieser Zugang wird meist von der neurochirurgischen Disziplin durchgeführt und ist der häufigste Zugangsweg in der Akustikusneurinomchirurgie (s. Abb. 9) (16, 18).

Unter einem kontinuierlichen Neuromonitoring, dass aus den SEP, MEP, Fazialismonitoring und den AEP Ableitungen besteht, wird der Operationsverlauf kontrolliert (18, 47).

Der Patient befindet sich bei größeren Tumoren, je nach anästhesiologischer Expertise, in halbsitzender Lage.

Bei offenem Foramen ovale, schwerwiegenden kardiovaskulären Vorerkrankungen und kleineren Tumoren bis zu 2 cm wird die Seitenlage (s. Abb. 10:) bevorzugt (18).

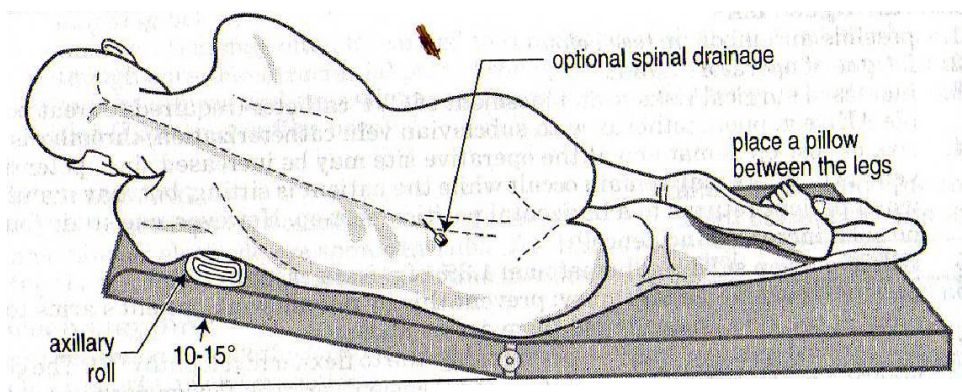


Abb. 10: Lagerung in Seitenlage (Parkbankposition). Der Thorax wird um 10-15° angehoben. Es kann auch eine Lumbaldrainage, bei vor allem größeren Tumoren, gelegt werden. Quelle: Greenberg et al. 2010 (45)

Der Kopf ist geneigt und um 30 Grad in Richtung der betroffenen Seite rotiert. Unter vertikaler Schnittführung wird hinter dem Mastoid, ca. 2 Querfinger vom Ohransatz entfernt, eine medial ausgedehnte Kraniotomie vorgenommen (s. Abb. 11) (18, 45, 47).

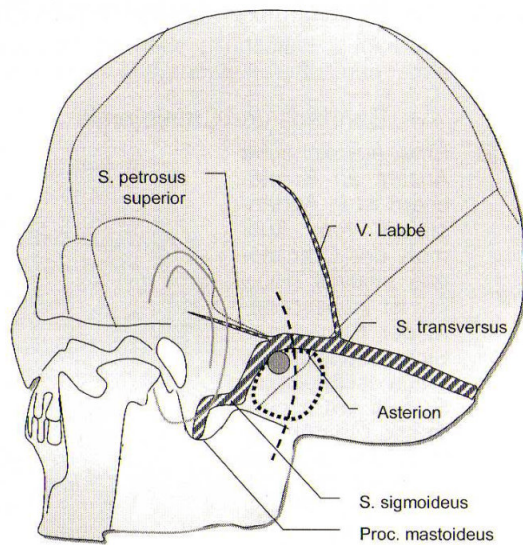


Abb. 11: Retrosigmoidaler Zugang. Hautschnitt, Bohrloch, Craniotomie. Lageverhältnisse zwischen Sinusvenen, Hautinzision und Craniotomie. Landmarken: Mastoidspitze, Asterion, äußerer Gehörgang. Quelle: Hölper et al. 2007 (47)

Die Craniotomie sollte den Winkel zwischen den beiden Sinus transversus auf der kranialen und dem Sinus sigmoideus auf der lateralen Seite freilegen. Die Dura wird lateral konvex, entlang des Verlaufs des Sinus inzidiert und eröffnet. Die Zisternen werden dargestellt und zur Liquorentlastung wird die zerebromedulläre Zisterne eröffnet. Das Zerebellum wird mit einem Spatel retrahiert. Somit wurde die Sicht auf den Hirnstamm und die hintere Wand des IAC (Internen auditorischen Kanal), worin der extrameatale Tumoranteil liegt, freigelegt. Die Dura wird am posterioren Teil des IAC entfernt und der Kanal wird mit einem Diamantbohrer, unter Respektierung des Bulbus v. jugulare und der posterioren und lateralen semizirkulären Kanäle, eröffnet. Dies stellt die Basis der schrittweisen Tumorentfernung im IAC dar. Anschließend wird der extrameatale intrakapsuläre Anteil entfernt. Je nach Vergesellschaftung des Tumors mit dem 8. Hirnnerven kann der Tumor oft komplett entfernt werden. Die neuralen Strukturen und Gefäß-Nerven-Bündel werden unter Zuhilfenahme einer Pinzette dargestellt. Unter kontinuierlichem Neuromonitoring wird auch zuletzt noch der intrameatal gelegene Anteil des Tumors unter Eröffnung des IAC entfernt (18, 45, 47).

Während der Operation wird die Hämostase von der anästhesiologischen Seite aus kontrolliert. Dadurch können mögliche Komplikationen wie beispielsweise Luftembolien, die vor allem in der halbsitzenden Position vorkommen können,

vorgebeugt und früh diagnostiziert werden. Am Schluss werden noch offene Mastoidzellen am IAC durch Muskelstückchen und mit Hilfe von Gewebekleber, sowie die Dura mater, wasserdicht verschlossen (18, 39, 47).

1.8.1.2 Translabyrinthär

Dieser Zugang ist meist für taube Patienten geeignet, da durch die Zerstörung der vestibulären Anteile des Innenohrs und beim Eröffnen des Vestibulums, das Gehör nicht erhalten werden kann (16, 47). Er wird primär von den Otochirurgen durchgeführt und stellt eine Möglichkeit dar, Tumore zu reseziieren, die sich vorwiegend intrameatal ausdehnen und rezidiviert haben. Zudem kann er für Tumore mit einer atypischen Lage verwendet werden (16, 18). Zusätzlich bleibt auch durch die ferne Lage des N. facialis vom Operationsgebiet, dieser Nerv nahezu unberührt. Lediglich der mastoidale Anteil des Nervs kann tangiert werden.

Bei Patienten, deren Hörnerv erhalten werden kann, gibt es die Möglichkeit ein Cochleaimplantat einzusetzen (16).

1.8.1.3 Subtemporal-extradural/Transtemporal-extradural

Dieser Zugang ermöglicht es über die mittlere Schädelgrube vor allem kleinere, intrameatal gelegene Tumore zu erreichen, die bei den Patienten das Hörvermögen noch nicht gravierend beeinflusst haben (47).

Er wird auch typischerweise von Otochirurgen durchgeführt. Neben der hörerhaltenden Tumorentfernung, können zudem auch, nach der erweiternden Form nach Wigand, größere Tumore damit exzidiert werden. Der innere Gehörgang wird von der oberen Seite eröffnet, der N. cochlearis liegt im unteren, der N. facialis im oberen Bereich. Letzterer muss zur Seite verlagert werden, sodass es oft zu passageren Frühpareesen kommen kann. Diese sind jedoch meistens reversibel (16).

Weitaus kritischer anzusehen ist das Anheben des Temporallappens bei diesem Eingriff. Hierbei kann es zu Komplikationen kommen, die läsionelle und

strukturelle Veränderungen nach sich ziehen. Auch ist es möglich, dass kognitive Einschränkungen und affektive Funktionsstörungen auftreten (16, 54).

1.8.1.4 Neuromonitoring

Das intraoperative Monitoring ist dazu da, bestimmte Strukturen, die bei dieser OP tangiert oder beschädigt werden können zu überwachen. Es hilft Komplikationen vorzubeugen und Rückschlüsse auf das Outcome zu ziehen.

Ein wichtiger Aspekt bei der Vestibularisschwannomchirurgie ist der Erhalt der Funktion des N. facialis (33). Er besitzt eine enge Lagebeziehung zum Tumor und berührt oder haftet an diesem an (33). Durch Zug oder Manipulation am Nerven während der Operation kann es zur ödematösen Schwellung kommen und der Nerv kann verletzt werden (55).

Das Monitoring des N. facialis erfolgt über die elektrische Stimulation des Nervs (s. Abb. 12) (33). Dies kann über ein kontinuierliches, frei-laufendes spontanes Elektromyogramm (EMG) erfolgen (33, 56, 57), bei dem fortlaufend Potentiale abgegeben werden. Oder aber der Nerv erhält diskontinuierliche elektrische Stimuli die seine Funktion testen (33).

Das EMG erfolgt über subkutane Nadelelektroden, die in den M. frontalis und den M. orbicularis oculi und oris eingebracht werden (18, 33, 58). Zudem befindet sich eine Oberflächenelektrode im Gesicht des Patienten um Bewegungen der mimischen Muskulatur zu registrieren (58). In 67 - 94% der Fälle konnte bei überwachten Patienten ein anatomischer Erhalt des Nervs verzeichnet werden (56, 57). Im Vergleich dazu wird bei Verzicht auf das Monitoring nur in 33% der Fälle die Anatomie des Nervs erhalten (56).

Die Funktion des Nervs kann mit Hilfe der House und Brackmann (HB) Klassifikation bemessen werden (s. Tab. 5) (43). Neff et al. 2005 stellten fest, dass nach dem 1. postoperativen Jahr, 89% aller operierten Fälle einen HB Grad I oder II aufwiesen (55). Zusammenfassend konnte durch die Überwachung des Fazialisnervs die Inzidenz der postoperativen Paresen gesenkt werden (55). Jedoch muss bedacht werden, dass durch die

kontinuierliche, frei-laufende EMG-Ableitung nicht die Lokalisation und das Ausmaß des Schadens angegeben werden kann (55).

Neben dem N. facialis ist es vor allem wichtig das Hörvermögen zu kontrollieren. Dies kann durch eine Hirnstammableitung (engl. BAEP) erfolgen (s. Abb. 8) (58, 59).

Es besteht eine Korrelation zwischen den BAEP und dem postoperativen Hörvermögen (60). Sie zeigen einen Schaden oder Funktionsstörung des Ohres, des VIII. Hirnnerven, des Hirnstamms, bis zum Mesencephalon, an. Wird der N. vestibulocochlearis mechanisch oder thermisch gereizt, findet sich eine Verzögerung der Welle III und V vor. Die Welle I bleibt normgerecht. Bereits bei der Präparation kann es intraoperativ zu Latenzen kommen. Wird das Kleinhirn und der Hirnstamm retrahiert, kommt es automatisch zu Dehnung des N. vestibulocochlearis. Dann finden sich verzögerte Interpeaklatenzen zwischen der Welle I und III, die jedoch meist reversibel sind (59).

Liegen vor allem große Tumore vor, erscheint es von Vorteil den N. trigeminus zu überwachen (58). Hier wird eine Elektrode im M. masseter platziert, die während der Operation stimuliert werden kann (s. Abb. 12) (18, 58). Auch andere Hirnnerven können mit Elektroden kontrolliert werden. Zur Ableitung von Potentialen für den N. glossopharyngeus werden Elektroden in die Pharynxmuskulatur eingeführt (18). Elektroden in der Zungenmuskulatur geben die Funktion des N. hypoglossus wieder. Möchte man nähere Informationen über den Hirnstamm gewinnen können die Medianus SSEP (Somatosensorischen Evozierten Potentiale) abgeleitet werden (18). Das Monitoring ist ein wichtiger Bestandteil und zur Routine in der Vestibularisschwannomchirurgie geworden.

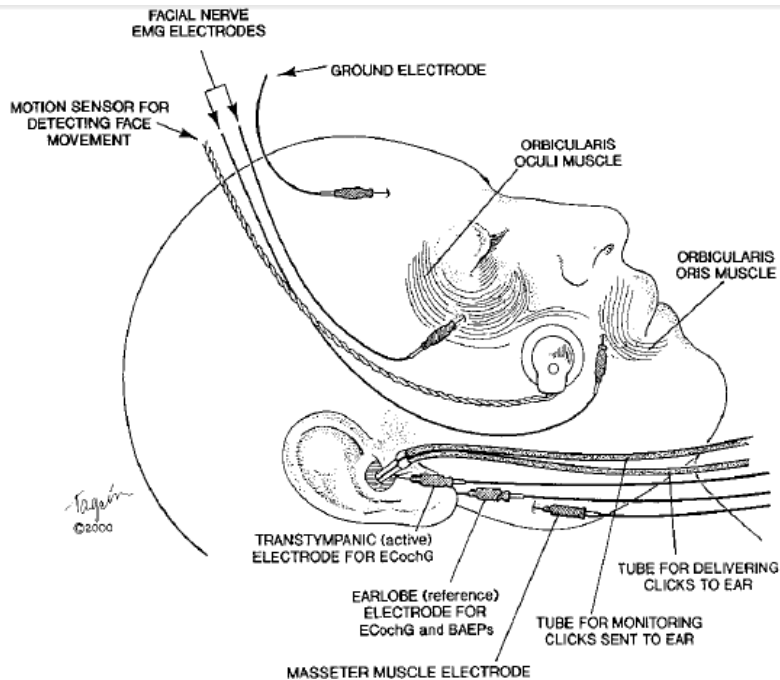


Abb. 12: Abbildung eines Neuromonitoring während einer Vestibularisschwannomoperation. Die Funktion des N. facialis wird durch das EMG (Elektromyogramm) kontrolliert. Hierbei werden Elektroden in den M. orbicularis oris und oculi eingebracht und ein Bewegungssensor wird am Gesicht platziert. Bei größeren Tumoren wird der N. trigeminus über Elektroden im M. masseter überwacht. Zudem wird über die BAEP (brainstem auditory evoked potentials; deutsch: Hirnstammaudiometrie) und eine Elektrocochleografie (ECochG) der Erhalt des Hörvermögens kontrolliert. Quelle: Ojemann et al. 2001 (58)

1.8.1.5 Komplikationen

Meist erfolgt die mikrochirurgische Resektion sehr erfolgreich. Jedoch können auch vorübergehende und dauerhafte Schäden entstehen. Die häufigste Komplikation ist eine Liquorfistel, die sich in Form einer Rhinorrhoe äußert. Ca. 4,27% der Patienten besitzen solch eine Komplikation postoperativ. Diese kann in 6% der Fälle in eine Meningitis münden und gelegentlich fordert sie einen Sekundäreingriff. Die höchste dauerhafte Morbidität bringen vaskuläre Folgeschäden, wie Ischämien und Blutungen, in der hinteren Schädelgrube mit

sich. Nicht als sehr häufig anzusehen sind kaudale Hirnnervenstörungen, die sich beispielweise als Schlückstörungen äußern. Auch Störungen der Hirnstammfunktion in Form von Hemiparesen und Vigilanzminderungen, können vorkommen. Als Folge eines Liquoraufstaus kann es auch zum Anstieg des intrakraniellen Drucks kommen. Desweiteren liegen in 11 - 22% der Fälle vorübergehende oder dauerhafte Funktionsstörungen des N. trigeminus vor (18, 61). Die häufigste Komplikation bei einem retrosigmoidal-subokzipitalen Zugangsweg ist ein persistierender Kopfschmerz nach der Operation (62). Noch während der Op, kann es bei Lagerung in halbsitzenden Position durch Aspiration von Luft ins venöse Unterdrucksystem zu einer Lungenembolie kommen. Dieser kann jedoch durch eine transösophageale Echokardiographie vorgebeugt werden (63).

1.8.2 Fraktionierte Radiochirurgie und Radiotherapie

Die Stereotaktische Radiochirurgie (SRS) und die Fraktionierte Stereotaktische Radiotherapie (FSR) stellen eine adäquate, nicht-invasive Alternative im Vergleich zum operativen Verfahren dar. Sie eignen sich vor allem für Tumore mit einer Maximalgröße von 3 cm. Dieses Größenlimit wurde deshalb festgelegt, da es bis zu einem Jahr nach der Bestrahlung zu einer postradiogenen Ödembildung kommen kann. Diese führt zur vorübergehenden Vergrößerung des Tumors und kann zu einer Kompression des Hirnstamms führen (64).

Die SRS besteht aus der Gamma-Knife Radiochirurgie (GKRS, Leksell 1951 (65)), der LINAC-Technologie und aus dem Cyberknife (Adler 1997 (66)) (64, 67). Sie ist eine einzeitige, von bis zu maximal 5 Sitzungen ablaufende Methode, die mit einer gezielt hohen Strahlendosis im gewünschten Areal arbeitet (64, 67). Das umliegende Gewebe wird verschont (64). Ein stereotaktischer Rahmen oder ähnliche Systeme am Patienten helfen bei der Durchführung mit dieser Methode (64, 67, 68). Die Randdosis beträgt zwischen 12 und 13 Gy mit einem durchschnittlichen Wert von 12 Gy bei der Gamma-Knife Bestrahlung (3, 42, 64, 68). Die Methode per se erzielt bessere

Ergebnisse im Bezug auf behandlungsbedingte Folgeschäden im Vergleich zur Mikrochirurgie. Auch neuropathische Nebenwirkungen aufgrund der Bestrahlung treten selten auf (64). Die FSR ist eine Methode, die typischerweise mehrzeitig in 5-10 Sitzungen durchgeführt wird. Die Randdosis beträgt hier 5 – 3 Gy (64, 69).

Ziel von beiden Verfahren ist es das Wachstum des Tumors zu stoppen bzw. zu kontrollieren und parallel die neurologischen Funktionen aufrecht zu erhalten (64, 68, 69). Die Begriffe sind in der Literatur sehr schwammig beschrieben. Als Radiotherapie wird sowohl die FSR und die SRS mit ihren Unterformen der Gamma-Knife-, der LINAC- und der Cyberknife - Methode (64). Die FSR kommt im Bereich der VS Therapie nur wenig zum Einsatz und beruht überwiegend auf der LINAC - Methode. Insgesamt ist GKRS für den N. facialis schonender und auch das Hörvermögen wird eher mit der SRS, als mit der Mikrochirurgie erhalten (70, 71). Die Nebenwirkungen der SRS und FSR sind postinterventionelle Kopfschmerzen und Übelkeit, die vorübergehend für einige Tage auftreten. Es wird keine Verschlechterung der präoperativen Klinik verzeichnet. Nur in ca 4% der Fälle kommt es zum erneuten Größenwachstum nach dieser Intervention. Bei dieser Behandlungsmethode sind jahrelange postoperative Nachkontrollen mittels MRT erforderlich (s. Abb. 13) (64).

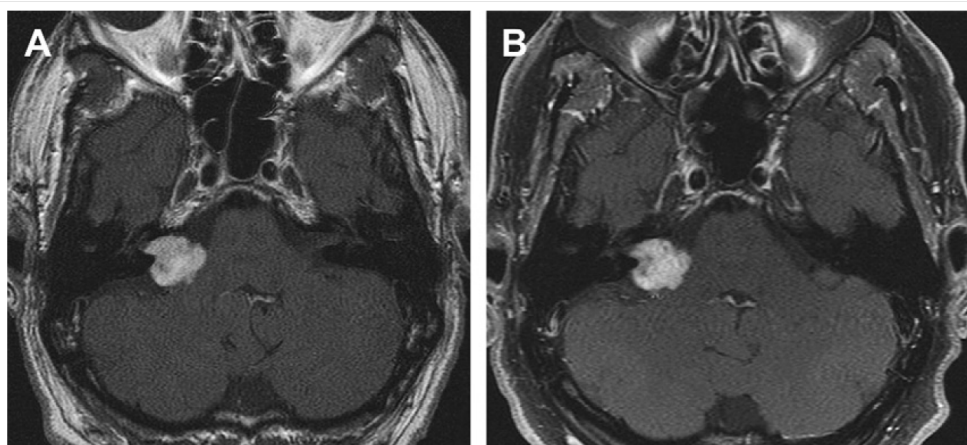


Abb. 13: MRT Beurteilung der radiochirurgischen Behandlung. Axiale T1-gewichtete Gadolinium-angereicherte MRT-Aufnahme (A) vor der Cyberknife Radiochirurgie und (B) nach der Behandlung. Es zeigt sich 6 Jahre später keine Größenprogredienz. Quelle: Sakamoto et al. 2009 (52)

1.8.3 Beobachtung

Die Mehrheit der VS stagniert im Wachstum und ein kleiner Prozentsatz bildet sich sogar zurück (18, 42). Aufgrund dieser Tatsache können die Tumore, ohne größeren Schaden anzurichten, beobachtet werden. Dies erfolgt durch regelmäßige MRT Serien und klinische Verlaufbeobachtungen, die in einem definierten Zeitraum erfolgen (72).

Indiziert ist diese Methode bei kleinen-mittelgroßen Tumoren und bei älteren Patienten. Auch bei Patienten, die in schlechter gesundheitlicher Verfassung sind, sowie zahlreiche Komorbiditäten aufweisen wird diese Methode verwendet (42, 73, 74). Außerdem wird sie angewendet bei Patienten mit einer NF Typ 2, die einseitig ertaubt sind und bei Patienten, bei denen das einzige, oder besser hörende Ohr vom Tumor befallen ist. Natürlich muss auch eine ablehnende Haltung des Patienten gegenüber der Operation berücksichtigt werden. Hier stellt die Observation neben der Bestrahlung eine weitere Alternative dar (18, 72).

Entscheidend für die Prognose ist die initiale Größe bei Diagnosestellung und das Wachstumsverhalten im ersten Jahr, unter radiologischer Kontrolle (74).

Aktive Therapiemodalitäten werden dann eingeleitet, wenn ein signifikantes Wachstum über einem Zentimeter pro Jahr radiologisch nachweisbar ist. Auch wenn die Symptomatik sich progressiv entwickelt oder der Patient es wünscht, kann das aktive Verfahren eingeschlagen werden (18, 42).

1.9 Outcome

In diesem Abschnitt soll primär auf das Outcome der chirurgischen Therapie eingegangen werden.

Ziel der operativen Therapie ist im Bereich der Akustik ein Erhalt des Hörvermögens (16). Mit steigender Tumorgöße, nimmt jedoch diese Wahrscheinlichkeit ab, dass dieses erhalten werden kann (16). Ca. zwei Drittel der Patienten erleiden postoperativ einen Hörverlust (18). Dabei kann ein funktioneller Erhalt des cochleären Anteils in 39,5% und ein anatomischer Erhalt in 68% der Fälle erreicht werden (39). Zudem muss berücksichtigt

werden, dass die Mehrheit der Patienten bereits präoperativ ein eingeschränktes Hörvermögen aufweist (16). Kleinere Tumore sind günstiger hinsichtlich der Hörfunktion anzusehen, denn nach deren Entfernung besteht bei 60% das vorherige Hörvermögen (75). Je größer der Tumor ist, desto größer ist der Hörverlust (16). Meist liegt auch ein Tinnitus am betroffenen Ohr vor, der zu einem Viertel verschwindet und in 10% sich progredient verschlechtert (76).

Ein Teil des vestibulären Nervs muss gezwungenermaßen durchtrennt werden, somit wird eine Schwindelsymptomatik ausgelöst, oder verschlechtert. Je stärker der Schwindel vor der Operation vorhanden war, desto schwächer ist die Symptomatik postoperativ und umgekehrt (16). Persistierende und beeinträchtigende Gleichgewichtsstörungen, die vor allem im Dunkeln bestehen, zeigen sich in 10% der Fälle (77). Eine Restitutio ad integrum findet hierbei nicht statt. Der Zustand kann lediglich durch Rehabilitationsmaßnahmen verbessert werden (16).

Über postoperative Cephalgien klagen ein Drittel der Patienten (16). Meist sind diese nach retrosigmoidalen Eingriffen vorzufinden (78). Mit einer Wahrscheinlichkeit von 10% bleiben diese bestehen (16, 51).

Die Einteilung über das Ausmaß der Fazialisfunktion prä- sowie postoperativ erfolgt über die House und Brackman Klassifikation (s. Tab. 5) (16, 43).

Der Erhalt der Fazialisfunktion hängt vor allem von der Tumorgroße ab (79-82). Kleinere Tumore tragen nur eine geringere Fazialisschädigung davon im Vergleich zu größeren Tumoren (18, 79-82). Auch das Alter des Patienten, der chirurgische Zugangsweg und das intraoperativen Monitoring nehmen Einfluss auf die Fazialisfunktion (79). Patienten mit zystischen oder Neurofibromatose Typ 2 assoziierten VS haben hinsichtlich des N. facialis eine ungünstigere postoperative Prognose (17, 55, 83). Bei älteren Patienten (> 65 Jahren) ist die Prognose des Fazialiserhalts günstiger, als bei jüngeren Patienten (< 65 Jahren). Nach der chirurgischen Interventionstechnik hat der transtemporale Zugangsweg das beste Outcome mit 85% Nervenerhalt (79). Im Vergleich zum operativen Eingriff schneidet die Radiochirurgie hinsichtlich des Erhalts des N. facialis besser ab (80% vs. 90%) (18).

Ein Monitoring des N. Facialis intraoperativ führt zu einer geringeren Rate an Folgeschäden (s. Abb. 14) (79).

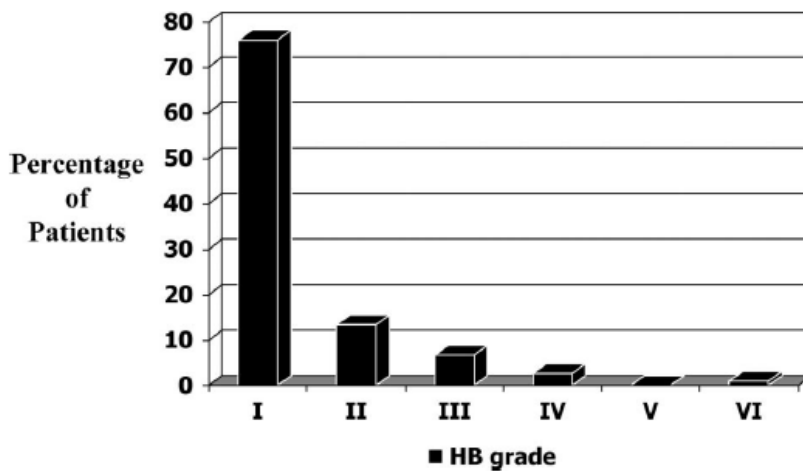


Abb. 14: Postoperative Fazialisfunktion 1 Jahr nach Operation. Die Funktion wurde anhand der House und Brackmann Graduierung (HBG) (43) in HBG I-VI eingeteilt. Quelle: Neff et al. 2005 (55)

1.10 Genetik

1.10.1 Genetik der Neurofibromatose Typ 2

Die Tumorgenese unterscheidet sich bezüglich der 2-Treffer-Hypothese nach Knudson [Alfred Knudson, 1971] mit jener der sporadischen VS. Bei den NF Typ 2 assoziierten VS findet sich im 1. Allel entweder eine vererbte Keimbahnmutation oder eine de novo Mutation, die im postzygotischen Stadium ihren Ausgang nimmt (84). Das 2. Allel wird durch eine somatische Mutation inaktiviert (31, 85). Insgesamt kommt es durch die biallelische Inaktivierung zu einem Abbruch der Proteinsynthese. Bezogen auf das Krankheitsbild muss in diesem Fall mit einem folgenschwereren Phänotypen gerechnet werden, als bei jenen Inaktivierungen, die nicht zum Abbruch der Synthese führen. Diese Genotyp-Phänotyp Korrelation wird bei der NF Typ 2 durch Punktmutationen, wie Nonsense und Frameshift Mutationen, hervorgerufen (1, 29).

Im Gegensatz dazu kommt es bei den sporadischen VS sowohl im 1., als auch im 2. Allel zu somatischen Mutationen, die wiederum nicht zum Abbruch der Proteinsynthese führen und deren Krankheitssymptomatik weniger schwer ausgeprägt ist (84, 85).

Hierbei handelt es sich hauptsächlich um kleine Deletionen (1).

Unter den de novo Mutationen des 1. Allels finden sich 33 - 60% Mosaik. Ein Betroffener mit Mosaik zeigt hinsichtlich des Phänotyps keine bis milde klinische Ausprägungen. Lediglich die Weitervererbung ist angespannt zu betrachten, denn es besteht ein nahezu 50% Risiko der Nachkommen ein somatisches Mosaik zu erben. Dann jedoch ist bei diesem Patienten die Mutation in allen Zellen anzutreffen und dadurch entwickelt sich ein gravierendes Krankheitsbild (29, 31).

1.10.2 Das NF 2 Gen

Bei allen 3 Typen der VS ist ein Gen vorhanden, das für die tumorale Genese äußerst wichtig erscheint, das NF 2 Gen. Dieses, als Tumorsuppressorgen fungierende Gen, befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q12) (9, 31, 86). Es besteht aus 17 Exonen, die sich durch alternatives Spleißen in verschiedene Transkripte abwandeln (s. Abb.15) (1, 87).

Allen voran sind die Isoformen I und II. Bei der Ersteren finden sich alle 17 Exone wieder, Isoform II lässt das Exon 16 missen. In einer milden Form der NF 2 ist ausschließlich eine 3. Isoform vorhanden, deren Exone 15 und 16 durch Deletionen abhanden gekommen sind (s. Abb. 15) (88).

NF2 Isoform

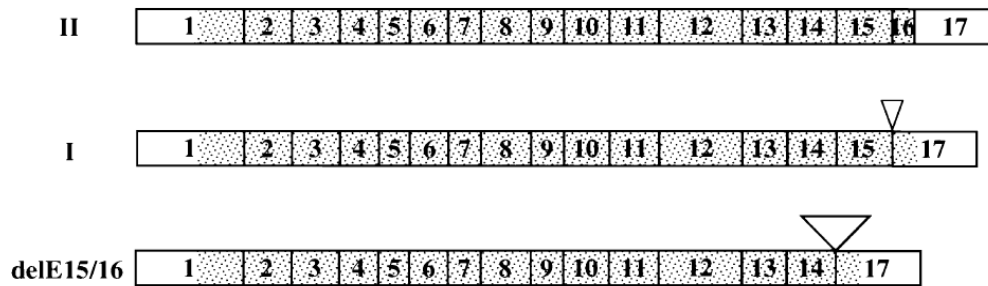


Abb. 15: Die Isoformen der transkribierten mRNA des NF 2 Gens. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene mRNA Transkripte oder Isoformen. Isoform I, II und delE15/16 sind die am häufigsten anzutreffenden Isoformen in Vestibularisschwannomen. Quelle.: Neff et al. 2006 (1)

Ein wichtiger Schritt in der Formation der VS ist die Inaktivierung des Gens, einerseits über Mutationen, andererseits über den Verlust der Heterozygotität (89, 90).

Hauptsächlich finden sich pathogene Mutationen in den ersten 15 Exonen (85). Vor allem betroffen sind hier die Exone 2 und 3. Diese beiden sind wichtig für seine Funktion als Tumorsuppressorgen. In den Exonen 16 und 17 kommt es zu keiner Veränderung des Erbguts, denn sie bestimmen die jeweilige Isoform (91).

1.10.3 Das Proteinprodukt Merlin

Das NF 2 Gen kodiert für ein Protein mit dem Namen Merlin, auch Schwannomin, oder Neurofibromin 2 genannt. Der Name leitet sich ab von den mit ihm verwandten homologen Proteinen Moesin, Ezrin und Radixin (**Moesin-Ezrin-Radixin-like-Protein**) (9). Diese gehören zur Familie der ERM-Proteine und sind untergeordneter Bestandteil der Protein 4.1 Superfamilie (85, 87). Strukturell sind diese, sowie Merlin, identisch aufgebaut und bestehen aus 3 Domänen: der FERM Domäne am N-Terminus mit konservierten Sequenzen, direkt gefolgt von einem alpha-helix Abschnitt mit dem sich anschließendem C-Terminus (s. Abb. 16) (1, 31, 89).

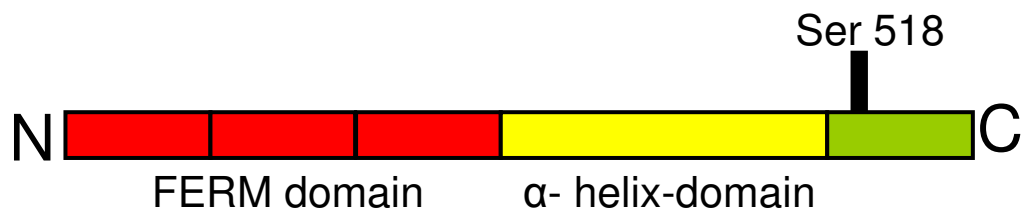


Abb. 16: Domänen der ERM-Proteine.

E = Ezrin, R = Radixin, M = Moesin, Ser518 = Serinrest 518

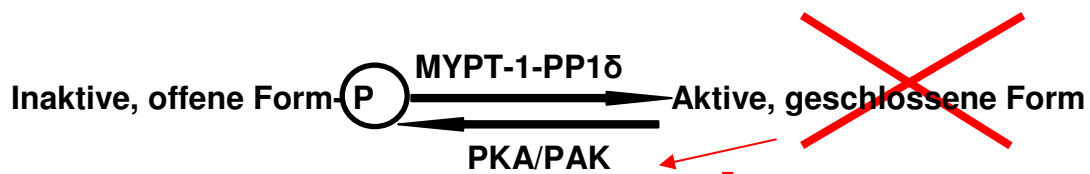
Sie sind involviert in Prozesse, die die Zellmembran und das Zytoskelett miteinander verbinden und sind in kortikalen Aktinzytoskelettstrukturen nahe der Plasmamembran anzutreffen (89, 92). Aufgrund dieser Lokalisation wirken sie über Kontakte mit Proteinen des Zytoskeletts und der Zellmembran an Umgestaltungsvorgängen der Zelle mit (1).

Die Proteine der ERM-Familie besitzen die Fähigkeit intramolekulare, intermolekulare und Merlin-assoziierte Interaktionen zu tätigen (87, 89). Auch Merlin nimmt solche Fähigkeiten wahr und verändert seine Konformation über bestimmte, enzymatisch induzierte Veränderungen an seiner molekularen Struktur. Dabei wird der Serinrest (Ser 518) am C-Terminus phosphoryliert, oder dephosphoryliert und dies ermöglicht so ein Übertreten in verschiedene Aktivitätsgrade (s. Abb. 16) (1, 9).

1.10.3.1 Konformations- und Aktivitätszustand

Über eine Veränderung der räumlichen Anordnung der alternativ gespleißten Transkripte, besitzen diese die Fähigkeit modulierend auf Proliferationsprozesse einzuwirken. Letztendlich hat dies Auswirkungen auf die Tumorsuppressorfunktion von Merlin. Infolge einer Dephosphorylierung wird die Isoform I in eine aktive, strukturell geschlossene Form überführt (s. Abb. 17) (9, 93). In dieser Gestalt inhibiert Merlin proliferative, neoplastische Prozesse (9). Das Enzym, welches diesen Schritt katalysiert, ist die Myosinphosphatase (MYPT-1-PP1δ) (91, 94).

Umgekehrt phosphorylieren die Gegenspieler PKA, PAK (PAK 1, PAK 2) und Mitglieder der Rho GTPase Familie (Rac 1, Cdc 42) die Isoform II und transferieren diese in eine inaktive, die Proliferation fördernde, offene Konformation (9, 84, 93). Wann Merlin den jeweiligen Zustand einnimmt, hängt von Bedingungen ab, die für oder gegen eine Progression sprechen. Generell führen eine hohe Zelldichte, ein Verlust der Zelladhäsion und eine Serumdeprivation den hypophosphorylierten Aktivitätszustand herbei (84, 89) .



Tumorsuppressoraktivität geht verloren!

Abb. 17: Konformationszustand von Merlin abhängig vom Phosphorylierungsgrad. In der aktiven dephosphorylierten Form nimmt Merlin einen geschlossenen Zustand an und kann nicht als Tumorsuppressorgen agieren.

1.10.3.2 Zellzykluskontrolle, Apoptoseinduktion und Genregulation
 VS weisen eine Vielzahl von Genen auf, die im Vergleich zu gesundem, vestibulärem Nervengewebe unterschiedlich hoch- oder herunterreguliert werden. Zu den hochregulierten Genen zählen der Angiogenefaktor Osteonectin, die Rho GTPase zur Induktion der Phosphorylierung und Endoglin, ein Endothelmarker zum Nachweis der Angiogenese. Im Unterschied zu den anderen VS wird Endoglin in den zystischen VS jedoch nicht hochreguliert (1).

Gleichermaßen wird das Gen für die PKB/Akt in VS hochreguliert. Dieses Enzym ist Bestandteil des PI3 Kinase/Akt Signalwegs, ein Signalweg, der in vielen Tumoren, so auch in den VS, aktiviert wird. Er ist in komplexe Mechanismen einbezogen, die die Zellproliferation, das Zellwachstum- und

überleben, die Apoptose und die Tumorgenese betreffen. Merlin verhindert über eine Bindung mit PIKE-L die Aktivierung der PI3K, die normalerweise über eine Aktivierung der Akt die Einleitung der Apoptose hemmt. Somit wirkt Merlin im aktiven Zustand als Apoptoseinduktor (9, 91).

Auf der anderen Seite gibt es in den VS eine Reihe an herunterregulierten Genen, wie Ezrin, aber auch LUCA-15, ein TSG, welches bei Bronchialkarzinomen anzutreffen ist (1, 10).

Auch das Gen für die CDK 2, ein Enzym des (pRb)-cyclin-dependent kinase (CDK) Signalwegs, wird in VS herunterreguliert. Dieser beeinflusst durch seine involvierten Enzyme die Progression von der G1 in die S-Phase. Demzufolge ist der regelrechte Zellzyklus in VS gestört (1, 95).

2 Informationen über das Immunsystem

2.1 Angeborenes und Erworbenes Immunsystem

2.1.1 Angeborenes Immunsystem

Die angeborene, natürliche Immunität ist die erste direkte Instanz in der Abwehr von Pathogenen, die in den Organismus eingedrungen sind. Sie kommt in der frühen Phase der Immunantwort zum Einsatz (96-98). Immunzellen der natürlichen Abwehr sind Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK). Sie eliminieren die Erreger direkt über Phagozytose, über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies oder Nitrogenspezies. Vor allem Dendritische Zellen und Makrophagen eliminieren Pathogene über Phagozytose (96, 97). Pathogene besitzen für sie spezifische Strukturen, die PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), wodurch sie von den Rezeptoren der Immunzellen, den PRR (pattern recognition receptors) erkannt werden. Zu den PRR gehören Oberflächenrezeptoren, wie die Toll-like Rezeptoren (TLR) und zytosolische Rezeptoren, wie die NLR (NOD-like receptors, nucleotide-binding domain) und die RLR ((RIG-I)-like receptors, retinoid acid-inducible gene I) (96-98). Durch sie kann das Immunsystem

zwischen eigen und fremd unterscheiden (96-98). Ihre Aktivierung induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, die die Genexpression aktiviert und zur Synthese von Zytokinen, Chemokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Immunrezeptoren führt (96, 97). Diese Produkte sind wichtig, dass Entzündungszellen in den entzündlichen Herd rekrutiert werden und ins Gewebe migrieren (98). Entzündungszellen sind Neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Lymphozyten (96, 99). Chemotaktische Signale und Zelladhäsionsmoleküle locken die Leukozyten an, sie rollen durch Adhäsionsmoleküle gesteuert am Gefäßendothel entlang und migrieren schließlich zwischen den Endothelzellen hindurch ins Gewebe (s. Abb. 18) (98, 99).

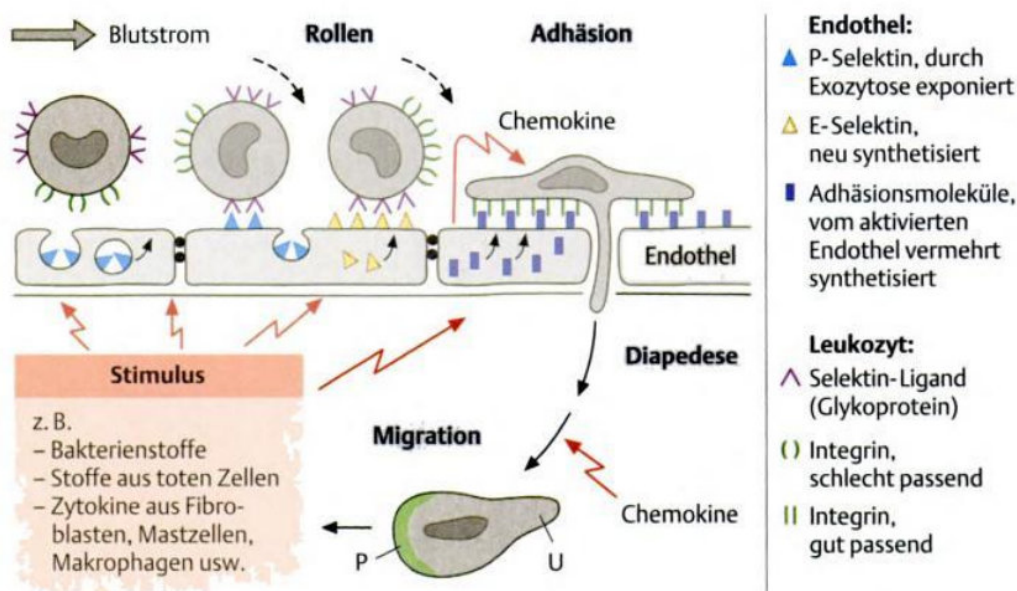


Abb. 18: Transmigration der Leukozyten.

Die Leukozyten werden durch Zytokine aus dem Interstitium angelockt und das Endothel wird aktiviert. Letzteres exprimiert dadurch Adhäsionsmoleküle, wie Selektine, und es findet eine Leukozyten-Gefäßendothel-Verbindung statt. Die Leukozyten adherieren am Endothel und es werden Integrine auf den Leukozyten aktiviert. Es folgt die Transmigration, auch Diapedese genannt, durch die Endothelzellen hindurch ins Interstitium. Hier locken Chemokine die Leukozyten an den Ort der Entzündung. P = Pseudopodium, U = Uropodium

Quelle: Lüllmann-Rauch 2006 (99)

2.1.2 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem wird vor allem durch B- und T-Zellen repräsentiert. Charakteristisch für diese Zellen ist die Th2-abhängige Aktivierung von B-Zellen mit Plasmazellbildung und Bildung von spezifischen Antikörpern durch B-Zellen. Außerdem werden infizierte Zellen durch CTL (CD8+ T-Zellen) eliminiert und durch Th1 Zellen werden Makrophagen aktiviert die Pathogene vermehrt phagozytieren (100).

Reife T-Zellen exponieren an ihrer Oberfläche den TCR, den spezifischen CD3 Komplex und CD Moleküle zur Bindung von MHC Molekülen (100-102).

Durch Bindung an das MHC Molekül im Lymphknoten werden sie aktiviert und von naiven zu reifen Effektorzellen. CD4+ T-Zellen binden MHC Klasse II Moleküle auf Makrophagen oder B-Zellen und werden zu T Helferzellen. CD8+ T-Zellen binden an MHC Klasse I Moleküle auf Dendritischen Zellen und werden zu Zytotoxischen T-Zellen (CTL) (100, 101, 103). Je nach MHC Molekültyp werden unterschiedliche Erreger präsentiert. Über die MHC Klasse I Moleküle werden meist intrazelluläre Erreger, wie z.B. Viren präsentiert. Extrazelluläre Erreger, wie beispielsweise Bakterien werden über MHC Klasse II Moleküle präsentiert.

T Helferzellen können noch weiter differenziert werden in Th1 und Th2 (100, 101).

Neben dem TCR und seinen Korezeptoren CD4 und CD8, gibt es noch den Korezeptor CD28, der spezifisch seine kostimulatorischen Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf Antigenpräsentierenden Zellen bindet. Dieses Signal ist wichtig für die vollständige Immunzellaktivierung (100, 104, 105).

Die Th Zellaktivierung und Differenzierung erfolgt, je nach Zytokintyp, Antigentyp, Antigendichte, Form der Antigenpräsentierenden Zelle und Art des kostimulatorischen Moleküls in Th1 oder Th2 (s. Abb. 19) (98, 106-108). Bei der Anwesenheit von IFN-gamma und IL-12 entstehen Th1 Zellen, die wiederum IL-2, IFN-gamma, TNF-alpha und TNF-beta exprimieren. Dadurch werden vor allem intrazelluläre Pathogene (z.B. Viren) beseitigt und die zelluläre Antwort in Gang gesetzt. Liegt das Zytokin IL-4 vor und fehlt IL-12, dann werden Th2

Zellen gebildet, die IL-4 und IL-5 exprimieren und zur Aktivierung von B-Zellen beitragen und die humorale Immunantwort stimulieren. Sie ist vor allem wichtig für die Elimination von extrazellulären Pathogenen (98, 103, 106-108).

Th-Zellen sind wichtig für die Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen und somit die Bildung von Antikörpern. Die naive B-Zelle nimmt ein Antigen auf, prozessiert es und präsentiert es den Th2 Zellen über MHC II Moleküle. Zusammen bilden sie ein T-B-Konjugat. Durch die Bindung bildet die Th2 Zelle ihre Zytokine und stimuliert die B-Zelle zur B-Zellklonbildung und zum Antikörperklassenwechsel. Auch Th1 Zellen können mit B-Zellen interagieren, jedoch mit geringerer Affinität als Th2 Zellen. Je nach Zytokintyp entstehen bei Th2 Typ und IL4 Expression IgE Antikörper, bei Th1 Typ und IFN-gamma Expression vorwiegend IgG2 und IgG3. B-Zellen, die in großen Mengen Antikörper produzieren, werden als Plasmazellen bezeichnet (100, 101).

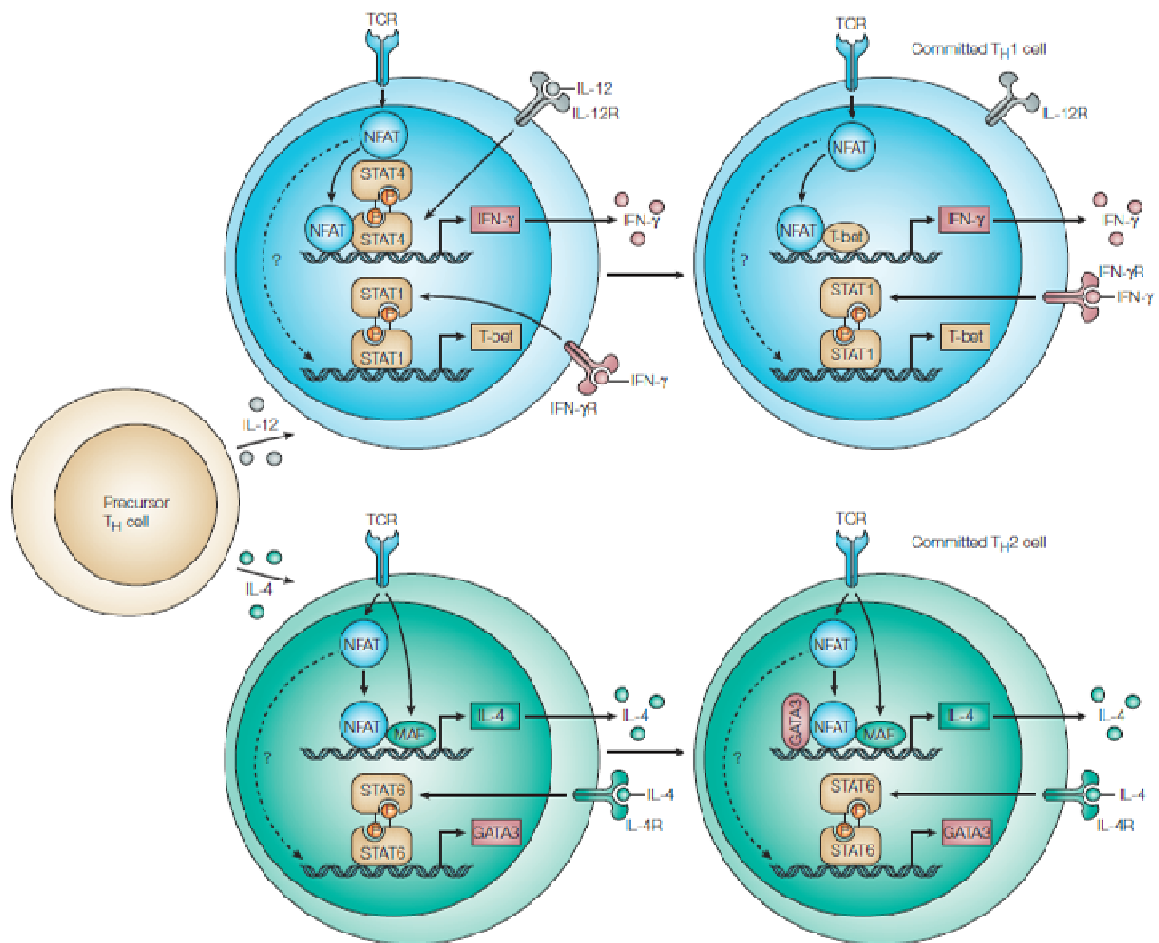


Abb. 19: T Helferzellendifferenzierung.

Durch Antigen-MHC Komplexe auf Antigenpräsentierenden Zellen werden die T-Zellrezeptoren (TCR) auf naiven T-Zellen aktiviert. Es kommt zur Differenzierung in Th1 oder Th2 Zellen. Bei Th1 wird überwiegend IFN-gamma und bei Th2 vorwiegend IL-4 exprimiert. Je nachdem kommt es dann zur zellulären (Th1) oder humoralen (Th2) Immunantwort und zur Elimination von intrazellulären (Th1) oder extrazellulären (Th2) Pathogenen.

Quelle: Macian et al. 2005 (107)

2.2 Immunantwort und Tumore

Die Anti-Tumorantwort erfolgt hauptsächlich über Zytotoxische T-Zellen (CTL), die die Fähigkeit besitzen Tumorzellen direkt durch Lyse abzutöten. Diese Zellen können durch Th1 und Th2 Zellen aktiviert werden (103, 109, 110).

Außerdem findet eine Aktivierung über Tumorantigene statt, die hauptsächlich intrazelluläre Proteine darstellen und über MHC Klasse I den CTL präsentiert werden.

Th Zellen sezernieren IL-2, was direkt aktivierend, wachstumsfördernd und proliferierend auf CD8+ T-Zellen wirkt (103, 110).

Intrazelluläre Proteine können nicht nur über MHC Klasse I sondern auch über MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden, was den CD4+ T-Zellen eine größere Bedeutung zukommen lässt. Vor allem die Th1 Zellen, spielen eine wichtige Rolle in der Tumorantwort. Sie können diese direkt, über die Freisetzung von Zytokinen, die wiederum Todesrezeptoren, wie FAS, auf der Tumorzelloberfläche aktivieren, abtöten. Zudem induzieren sie eine Aktivierung von APC und es werden Antikörper freigesetzt, die opsonisierend auf den Tumorzellen andocken und zur vermehrten Aufnahme von diesen in APC führen. Dadurch werden mehr Tumorzellen, oder auch infizierte Zellen phagozytiert und prozessiert. Zusätzlich rekrutieren sie die Antigen-spezifischen-Effektorzellen und die Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie Makrophagen und Mastzellen (103, 111). Die tumorantigen-spezifischen Th Zellen werden indirekt über APC oder direkt über MHC Klasse II exprimierende Tumore aktiviert (103). Tumore besitzen die Fähigkeit MHC Klasse I und II Moleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (103, 110). Durch die MHC II Expression fungieren sie somit als APC. Obwohl die meisten Tumorzellen keine MHC II ausbilden, besitzt jedoch ein signifikanter Anteil der Tumorzellen ein oder mehr Gene an MHC Klasse II Gene. Tumoren, für die dies zutrifft, sind Melanome, Bronchial- und Mammakarzinome und Osteosarkome (103, 112, 113).

Die Hilfe von B-Zellen bekommen Th Zellen, indem Th2 Zellen diese zur Antikörper- und Plasmazellbildung aktivieren. Hier werden dann tumor-spezifische Antikörper produziert, die zur antitumoralen Immunität beitragen (110).

Die Antitumorantwort von Th Zellen wird über verschiedene Mechanismen ausgelöst. Einerseits exprimieren sie Zytokine, die das Immunsystem verstärken, direkt zytotoxisch auf die Tumorzellen wirken oder aber sie

stimulieren und rekrutieren die CTL. Außerdem werden dadurch Immunzellen der angeborenen Abwehr angelockt und aktiviert. Somit wird eine Tumor-Mikroumgebung geschaffen, die aus verschiedenen Immunzellen, ihren Produkten den Zytokinen und den Tumorzellen besteht (s. Abb. 20) (103).

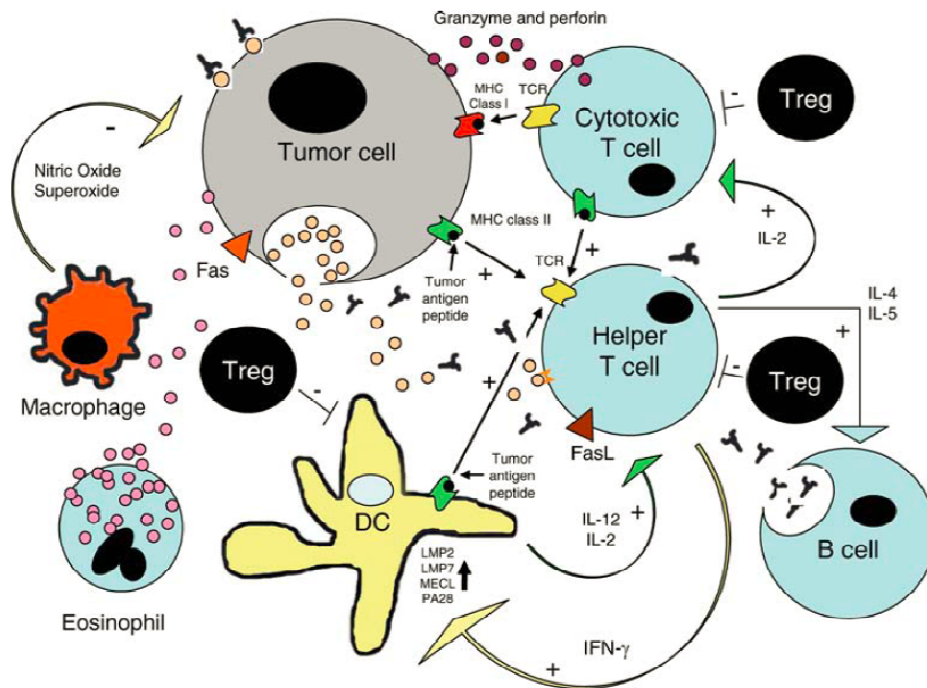


Abb. 20: Die Rolle der Th Zellen in der Tumor-Mikroumgebung. Th Zellen interagieren mit Effektor-Immunzellen und Tumorzellen über einen Kontakt-abhängigen und einen Kontakt-unabhängigen Mechanismus. Ein Positivzeichen trägt zur antitumor-Antwort, ein Negativzeichen einen pro-tumoralen Effekt. Treg = Regulatorische T-Zelle; DC = Dendritische Zelle. Quelle: Knutson et al. 2005 (103)

2.3 NFAT (Nuclear Factors of Activated T Cells) – Transkriptionsfaktoren in T-Zellen

Nuclear factors of activated T cells (NFAT) sind eine Proteinfamilie, die aus 5 Mitgliedern, NFAT 1-5, besteht. Vier von ihnen werden durch den Calcium/Calcineurin Signalweg (NFAT1, 2, 4 und 5) reguliert. Die Mitglieder NFAT1 (auch als NFATp oder NFATc2 bekannt), NFAT2 (bezeichnet als NFATc oder NFATc1) und NFAT3 (NFATc4) werden in T-Lymphozyten exprimiert (107, 114-116). Über die Regulation der Zytokinexpression und andere T-Zell-aktivierende Moleküle nehmen sie an verschiedenen T-Zell-Prozessen teil. Sie regulieren die Aktivierung, Differenzierung (107, 115, 117, 118), Proliferation (115, 117, 119), Apoptose (107, 114, 115, 119, 120), Anergie (107), und den Zellzyklus (107, 114, 119, 121) in diesen Zellen. Vor allem in Immunzellen ist die Funktion und Regulation der NFAT Moleküle am Besten untersucht, obwohl sie auch in Tumorzellen oder anderem Gewebe exprimiert und reguliert werden (107, 122). Insbesondere in T Helferzellen werden NFAT1 und NFAT2 beschrieben. Beide finden sich gleichermaßen in Th1 und Th2 Zellen, aber üben dort unterschiedliche Funktionen aus, worauf im Diskussionsteil näher eingegangen wird (107, 115, 118, 123).

Bei der Aktivierung der T-Zelle wird der T-Zellrezeptor (TCR) aktiviert. Dies stellt den Ausgangspunkt zur Einleitung des Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalwegs dar. NFAT Proteine regulieren die Expression einer Reihe von Genen, wie den Zytokinen IL-2 (114, 115, 117, 119, 124-126), IL-3 (114, 119, 126) und GM-CSF(126). Auch die Expression der drei Th2 Zytokine (115, 117, 126) IL-4 (114, 115, 119, 126), IL-5 (114, 115, 119) and IL-13 werden von NFAT Molekülen reguliert. Desweiteren steht auch die Expression von IFN gamma (114, 119), einem Th1 Lymphokin und das proinflammatorische TNFA (115, 126) unter der Kontrolle der NFAT Gene.

Neben der Zytokinexpression unterstützen sie außerdem die Transkription von Genen, die für die Oberflächenrezeptoren CD40L (115), FASL (115), CD5 (126), IgK (126) und CD25 (126) kodieren. Auch die Chemokine IL-8 (126) und MIP-1alpha (126) und das Gen COX2 (115, 126) wird über sie reguliert.

In Kooperation mit ihren transkriptionellen Partnern AP-1 (107, 115, 124), EGR1 and EGR4 (107, 115), MAF (107), CEBP (107), MEF2 (107) und IRF4 (107, 127), induzieren sie die Expression von Zytokinen und anderen T-Zell-aktivierenden Proteinen.

3 Fragestellung und Zielsetzung der Studie

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur wenige cDNA Microarray Studien auf dem Gebiet der Vestibularisschwannomforschung. Hinsichtlich der Interaktion mit dem Immunsystem sind sehr wenige Studien vorhanden. Hauptsächlich wird hier der histologische Aspekt betrachtet und weniger die Molekularbiologie. Bei den cDNA Microarray Studien gibt es noch keine Studie, die vorwiegend die Auswertung mit der Software Ingenuity Pathway Analysis ausführt. Auch werden primär Kandidatengene untersucht und die Gene werden nicht bei den funktionellen Interaktionen, in Form von Signalwegen und Netzwerken, beobachtet. Somit kann in dieser Studie wenig Bezug auf andere Studien genommen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es eine Übersicht über die molekularen Interaktionen zwischen den unterschiedlich exprimierten Genen zu erhalten und daraus eventuell Rückschlüsse auf die Genese zu ziehen. Auch werden die Differenzen zwischen den Vestibularisschwannomen und gesundem Nervengewebe auf molekularer Ebene deutlich.

Insbesondere soll durch diese Arbeit die Wechselbeziehung zwischen den Tumor- und Immunzellen hervorgehoben werden, die sich in der unterschiedlichen Genexpression und in molekularen Kaskaden widerspiegelt.

Methodisch sollte hierfür die Software Ingenuity Pathway Analysis (www.ingenuity.com) genutzt werden. Sie ermöglicht es durch ihre zahlreichen Funktionen, wie beispielsweise durch Signalweg- und Netzwerkanalysen, eine breite Sicht auf die molekularbiologischen Interaktionen zu erhalten.

Insgesamt soll durch diese Thesis ein Anreiz für zukünftige Studien gesetzt werden, an die vorliegenden Erkenntnisse anzuknüpfen, sie auszubauen und weitere Interaktionen auf molekularer Ebene aufzufindig zu machen.

C Problemstellung

Die Genese von Vestibularisschwannomen ist noch, mit Ausnahme der genetischen Forschung am NF 2 Gen, größtenteils ungeklärt.

Durch den Vorteil innerhalb einer Microarray ein breites Spektrum an Genen hinsichtlich ihrer Expression zu screenen, nahm die Anzahl der Microarray Studien in den letzten Jahren enorm zu.

Bei einer Microarray resultiert eine große Datenmenge, die der Interpretation keine Grenzen mehr setzt. Gleichzeitig besteht die Gefahr sich in der Datenfülle zu verlieren. Die Methode per se ist heutzutage ein standardisierter Vorgang, bei dem, aus technischer Hinsicht, nahezu keine Einschränkungen bestehen.

Ein weitaus schwierigeres Unterfangen stellt die Auswahl des Kontrollgewebes für Microarrayuntersuchungen dar. Als optimales Gewebe erscheint nicht-neoplastisches, vividus Gewebe des Nervus vestibularis. Eine ethisch vertretbare und den Patienten schonende Gewinnung gelingt nur bei der Neurektomie des Nervus vestibularis innerhalb der Therapie der Morbus Menière Erkrankung (92, 128, 129).

Hier wird der Nervus vestibularis im meatalen Segment exziiert unter Erhaltung der cochleären Funktion (130). Dennoch wird eine Exzision des Nervus vestibularis erst empfohlen, wenn die konservativen Maßnahmen ausgeschöpft sind (130).

Eine andere Möglichkeit ist es innerhalb der Tumorsektion angrenzendes, gesundes Nervengewebe, das histologisch gesichert wurde, zu gewinnen (131, 132). Zudem können im Zuge von Autopsien den Verstorbenen schonend, Gewebeproben entnommen werden (133). Daneben gibt es publizierte Ergebnisse im Vergleich mit anderen Nerven, wie beispielsweise des Nervus

tibialis (134), Nervus ischiadicus (129), Nervus auricularis magnus (129), Nervus glossopharyngeus (92), Nervus vestibulocochlearis (132) und dem Ganglion vestibulare (Scarpa ganglion) (128). Des Weiteren wurde nicht-neoplastisches, postmortales Hirngewebe (34) und periphere Blutproben (135) eingesetzt. Oft wurde auch eine Kombination aus mehreren Gewebearten verwendet (34, 92, 129) wie beispielsweise Hirngewebe, Blutproben und peripheres Nervengewebe (136). Das Letztere wird im Rahmen von Amputationseingriffen (134) und bei Autopsien gewonnen (136).

Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden solitäre, periphere Nerven (134), das Scarpa ganglion (128) und andere Hirnnerven, wie der Nervus cochlearis (129) und Nervus glossopharyngeus verwendet. Letzterer wurde im Zuge einer Neuralgie-Operation (92) entnommen.

Von großer Bedeutung für eine erfolgreiche cDNA Microarray-Analyse sind quantitativ ausreichende RNA Mengen und eine qualitativ hochwertige RNA.

Die überaus sensitive RNA, die durch eine vorzeitige Degradierung die Ergebnisse negativ beeinflussen kann, stellt eine Herausforderung dar.

Degradierungen entstehen durch RNasen, die ubiquitär vorkommen (137). Bei Postmortemgewebe gilt es 2 wichtige Einflussfaktoren zu berücksichtigen: der Postmortem-Intervall (PMI) und die Agonale Phase (138, 139). Letztere beschreibt die Ereignisse, die sich beim Patienten prä- und perimortal abspielen, wie beispielsweise Hypoxie, Koma (138-140) und Hyperpyrexie (139). Der PMI ist das Zeitintervall vom Todeszeitpunkt bis zum Einfrieren bzw. Fixieren des Gewebes (139). Es wird vermutet, dass der PMI im Vergleich zur Agonalen Phase einen geringeren Einfluss auf die RNA ausübt (140).

Einige Studien beschreiben, dass kein Zusammenhang zwischen dem RNA Zerfall und dem PMI besteht, er somit keinen Einfluss auf die RNA Qualität nimmt (141, 142).

Beim PMI werden generell Zeiten bis zu 48h toleriert, ohne dass Auswirkungen auf die RNA zu befürchten sind (143). Andere Studien tolerieren PMIs von bis zu 118h (141) oder 120h (144). Mengod et al. vermutet, dass über einen PMI von 36 - 48h Abfälle in den mRNA Beträgen zu verzeichnen sind (145). Auch

bei Catts et al. fällt innerhalb von 48h der RNA Gehalt beträchtlich ab. Zudem sinkt der pH Wert als Reaktion auf den steigenden PMI (137). Ob und wiefern der PMI Einfluss auf die RNA nimmt ist noch unklar.

Ein guter Parameter die RNA Quanti-und Qualität zu messen ist die RNA-Integritätsnummer (RIN). Sie korreliert vor allem in den unteren RIN Bereichen (< 7) mit dem PMI und generell mit dem pH-Wert, der als Marker für die Gewebequalität dient (139).

Eine gute Gewebequalität findet sich bei niedrigen Postmortem-Intervallen (< 24h) und hohen RINs (> 7) (139). Von vormals 10 Kontrollproben fielen 3 Proben wegen RIN Werten von 2, 4; 3,3 und 4,4 aus der Analyse. Die restlichen verwendeten Kontrollproben besaßen RIN von mindestens 5,1 bis maximal 6,5 (s. Abb. 21). Tumorproben zeigten RIN Werte von 7,1 - 9,8. RIN von < 5,1 wurden nicht mehr zur Analyse toleriert. Grund für die Akzeptanz des mittleren RIN Bereichs bei den Kontrollen war einerseits, dass niedrige RIN Beträge durch Verwendung von erhöhten RNA Erträgen ausgeglichen werden konnten und andererseits die Gewinnung von Proben mit RIN Werte >7 schwer durchführbar war

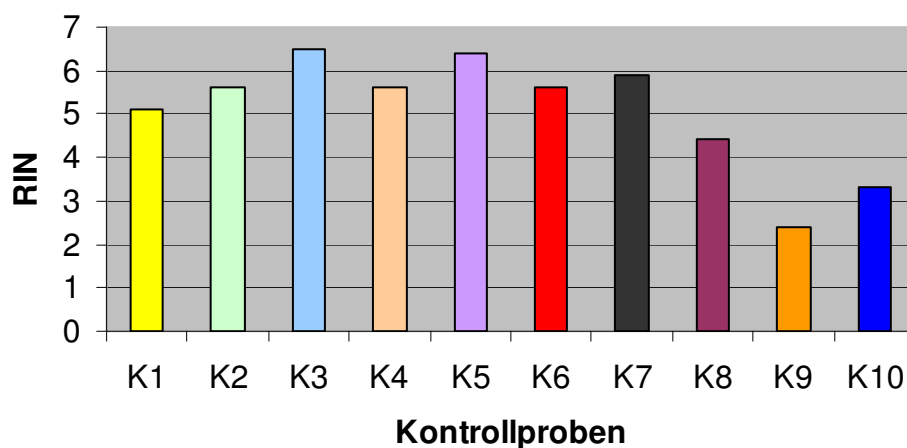


Abb. 21: RNA-Integritätsnummer (RIN) der Kontrollproben.

K = Kontrollprobe.

Mit einem durchschnittlichen PMI von 42,2h und einer Spannbreite von 20h bis maximal 72h liegen die Werte der Kontrollproben im oberen PMI Bereich (s. Tab. 8). Durch die mittelmäßigen RIN Werte, ist es möglich, dass ein RNA

Zerfall bereits stattgefunden hat. Inwieweit sich dies auf die Analyse ausgewirkt hat ist nicht untersucht worden.

Tab. 8: Alter und Postmortem-Intervall (PMI) der Kontrollproben. Fett unterlegte Proben wurden aus der Analyse wegen zu niedrigen RIN Werten ausgeschlossen. Die Kontrollproben, die zur Analyse zugelassen wurden besaßen einen mittleren PMI von 42,2h.

Proben-Nr.	Alter bei Todeszeitpunkt in Jahren	Postmortem-Intervall (PMI) in Stunden (h)
ES 21/10	62	20
ES 31/10	64	45
ES 32/10	4	40
ES 34/10	70	45
ES 43/10	43	72
ES 45/10	71	54
ES 51/10	53	20
ES 15/09	38	18
ES 33/10	33	26
ES 42/10	0,2	2

D Material und Methoden

1. Vorbereitung und Planung der Studie

Diese Studie wurde durch die Ethik-Kommission unter vorheriger Antragsstellung geprüft und genehmigt (Prüfungsnummer: 236/2009BO2).

Bei der operativen Aufklärung erteilten die Patienten ihr schriftliches Einverständnis, einen Teil des Gewebes für die hiesige Studie verwenden zu lassen. Das restliche Gewebe wurde im Rahmen der routinemäßig durchgeführten neuropathologischen Untersuchung, unter histologischen Gesichtspunkten auf das Vorhandensein eines Schwannoms mit WHO Grad I überprüft und abgesichert.

1.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde als Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, um die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufzuzeigen. Dazu wurden 2 Gruppen betrachtet:

▪ **Tumorgruppe:**

Von Juli 2007 – Juli 2010 wurden an der Neurochirurgischen Klinik der Universität Tübingen 36 Patienten rekrutiert, die an sporadischen Vestibularisschwannomen über einen retrosigmoidal-subokzipitalen operiert wurden.

Keiner der Patienten wurde präoperativ auf der ipsilateralen Seite radiochirurgisch oder radiotherapeutisch behandelt. Durch die präoperative MRT Bildgebung und die klinische Untersuchung konnten Patienten mit zystische Komponenten und mit dem Tumorsyndrom der Neurofibromatose Typ 2 ausgeschlossen werden.

▪ **Kontrollgruppe:**

Die Kontrollproben wurden von der Abteilung für Neuropathologie der Universität Tübingen für diese Studie zur Verfügung gestellt. Hierzu wurde bei 10 Verstorbenen einseitig der Nervus vestibulocochlearis (VIII.) innerhalb einer Autopsie exzidiert und untersucht.

1.2 Tumorgruppe

Die Diagnose der sporadischen VS wurde durch anhand der neurologischen und otologischen Symptomatik aufgestellt. Dazu gehören Symptome wie Hörminderung, Hörsturz, Tinnitus, Gleichgewichtsstörungen, Schwindel, Fazialisparesen und Symptome anderer kaudaler Hirnnerven (14-16, 18, 21, 29). Mit Hilfe der neuroradiologischen Bildgebung wurde die Diagnose bestätigt. Die präoperative Symptomatik der Patienten wird nachfolgend näher ausgeführt. Hinzugezogen wurden zudem funktionelle Tests, wie Ton- und

Sprachaudiometrie, die Messung der Akustisch Evozierten Potentiale (AEP) um die Symptomatik weiter zu objektivieren.

Um eine einheitliche Klassifikation zu erlangen, wurden alle Tumore mittels des Hannover-Klassifikationssystems (s. Abb. 6, s. Tab. 2) (39) für Akustikusneurinome von Tumorgrad T1 - T4, sowie deren Unterteilungen, normiert. Es wurden 11 Tumore der Größe T3 und 25 Tumore der Größe T4 ausgewählt (s. Abb. 22). Der Fokus lag auf T3 und T4 Tumore, da hierbei die größte Gewebemenge zur Verfügung stand.

Die Tumorgröße nach der Hannoverklassifikation (39) war bei der Auswahl der Tumorproben entscheidend, die Klinik war hintergründig.

Direkt nach der Tumorresektion wurde ein Teil des Gewebes in einem polypropylenhaltigen Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss mit 0,9% NaCl eingelegt. Unmittelbar nach Entnahme wurde das Gewebe bei -80°C eingefroren und bis zur Analyse in diesem Zustand gelagert. Der restliche Anteil wurde zur histologischen Diagnostik der Neuropathologie zugesandt und dort histologisch auf das Vorliegen eines Schwannoms mit WHO Grad I untersucht.

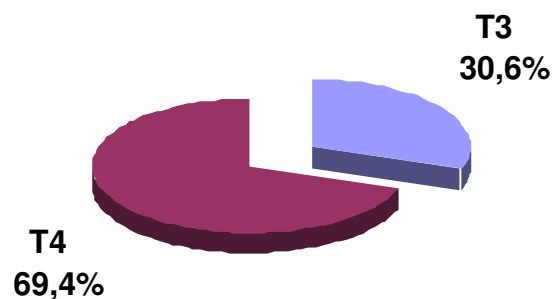


Abb. 22: Einteilung der Tumorproben anhand des Hannover-Klassifikationssystems (39).

Weiter setzte die Gruppe sich aus 13 Frauen und 23 Männern (s. Abb.: 23) zusammen.

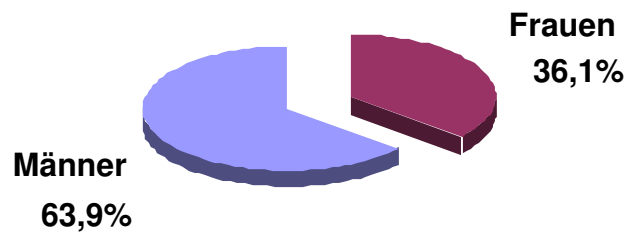


Abb. 23: Verhältnis zwischen Frauen und Männern unter den Tumorproben.

Im Durchschnitt waren die Patienten bei der Diagnosestellung 45,14 Jahre alt und die Altersspanne erstreckte sich über eine Breite von 25 – 76 Jahren.

1.2.1 Klinische Symptomatik und Befundung der Tumorproben

Die präoperativen, klinischen Daten der Patienten wurden aus den präoperativen, operativen und postoperativen Patientenakten entnommen.

Die Befunde wurden aus der präoperativen Anamnese und Aufnahmeuntersuchung, sowie der objektiven, otologischen und neurophysiologischen Untersuchungen herausgelesen. Bei diesen apparativen Untersuchungen wurden AEP-Messungen, Sprach- und Tonaudiometrien sowie EMG-Messungen des Nervus facialis durchgeführt.

Alle Symptome beziehen sich jeweils auf die vom Tumor betroffene Seite.

Die Daten umfassen sämtliche Symptomatik, die innerhalb des Krankheitsprozesses bis zum Zeitpunkt der Operation aufgetreten ist.

Spezifische Informationen, die sich explizit auf die Abbildungen und Tabellen beziehen werden separat aufgeführt. Teilweise gibt es unter den Befunden Diskrepanzen über das Ausmaß der Symptomatik. Jegliche Abweichung wird in der Abbildung mit aufgeführt, oder erwähnt.

Weitere Befunde werden im Folgenden nicht grafisch und tabellarisch aufgeführt:

- Hydrozephalus, Gangataxie
- Dysdiadochokinese, Bradidiadochokinese

- Dysmetrie
- Müdigkeit
- Kognitionsstörungen
- Kopfschmerzen
- Intrakranielles Druckgefühl
- Schluckstörungen
- Heiserkeit
- Deviation des Gaumensegels oder Parese
- Dysosmie
- Abgeschwächter/Erloschener Würgereflex
- Doppelbilder

1.2.1.1 Abbildung Akustische Symptome

Unter den 36 Tumorpatienten befand sich ein Patient, der eine beidseitige, audiologisch bestätigte Normakusis hatte, die anderen waren alle in ihrem Hörvermögen eingeschränkt. Im Folgenden wird eine Übersicht zu den akustischen Symptomen (s. Abb. 24), zur Hypakusis (s. Abb. 25), zum Tinnitus (s. Abb. 26), zum Hörsturz (s. Abb. 27) und zur Anakusis (s. Abb. 28) gegeben.

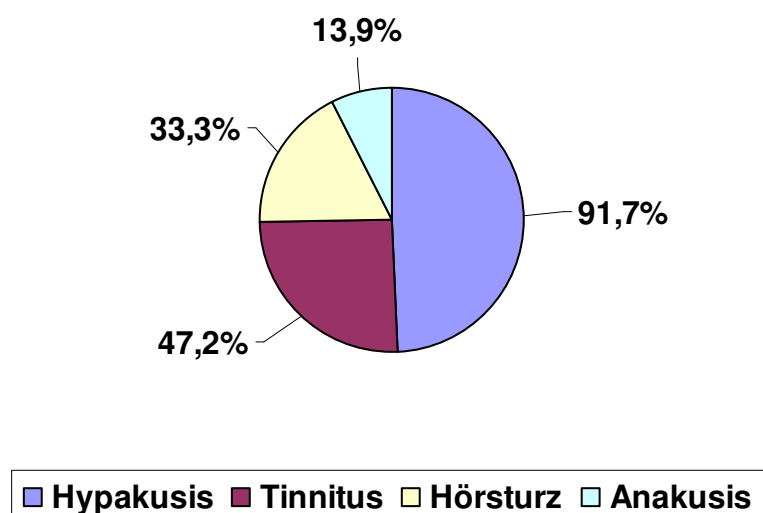


Abb. 24: Übersicht über den Anteil der Akustischen Symptome unter den Tumorpatienten.

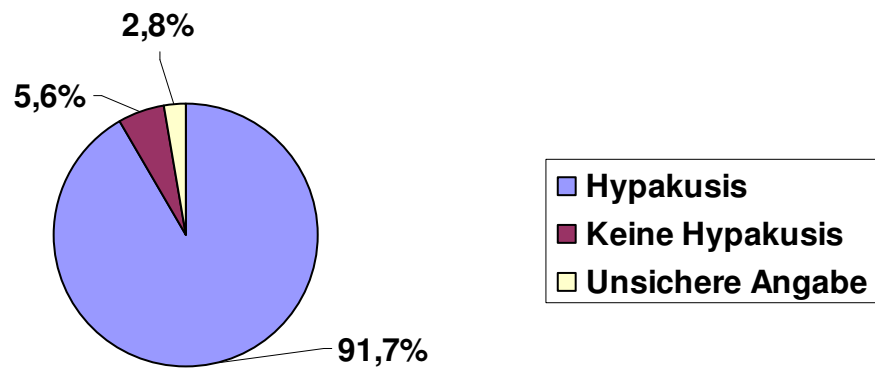


Abb. 25: Anteil der Tumorpatienten mit Hypakusis.
 Unsichere Angaben beziehen sich auf die Patienten-/Arztangaben. Eine eindeutige Diagnose war hier nicht möglich zu stellen.

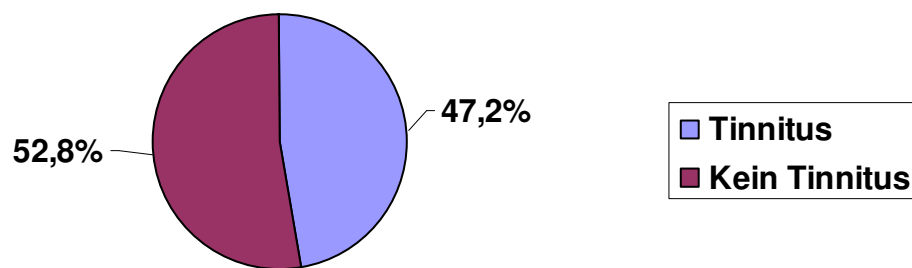


Abb. 26: Anteil der Tumorpatienten mit Tinnitus.

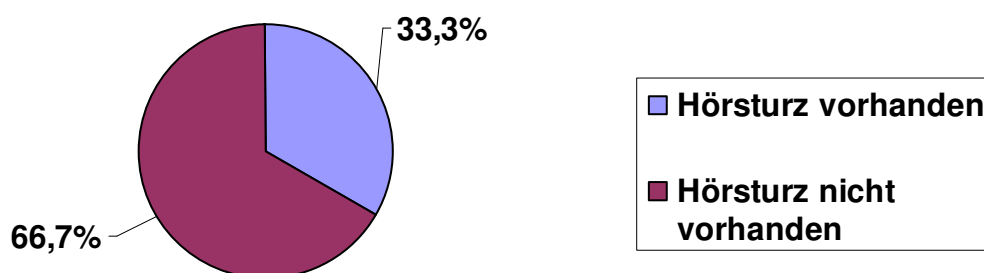


Abb. 27: Anteil der Tumorpatienten mit Hörsturz.

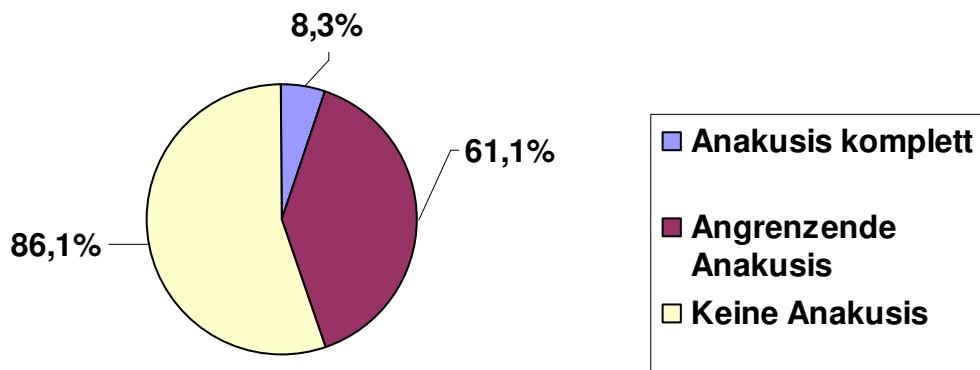


Abb. 28: Anteil der Tumorpatienten mit Anakusis.

Eine in den Patientenakten erwähnte inkomplette Anakusis wurde zur Hypakusis gezählt.

1.2.1.2 Abbildung Fazialisparameter

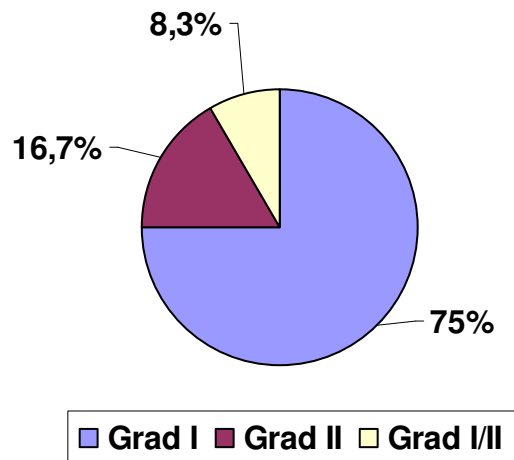


Abb. 29: Anteil der Tumorpatienten mit Fazialisparese. Einteilung nach der House und Brackmann Graduierung (HBG) (43). Bei minimalen Veränderungen hinsichtlich H&B Grad I und II, wurden bei unklarer Anamnese, jeweils beide Befunde aufgeführt. H&B: House und Brackmann.

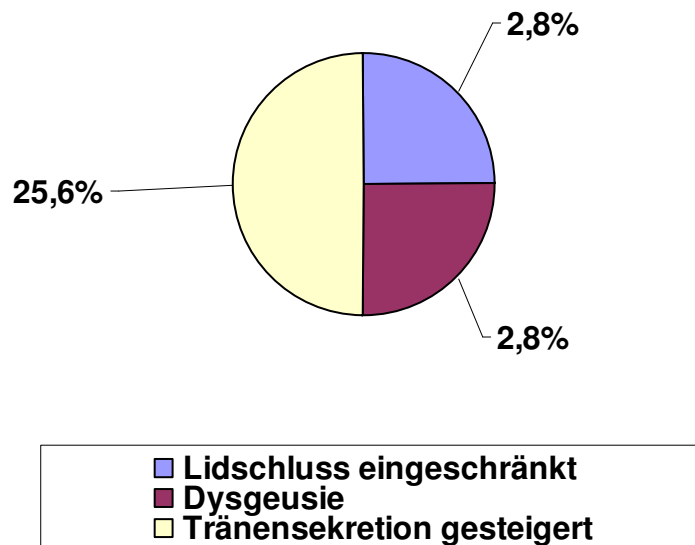


Abb. 30: Einteilung und Anteil der Fazialispathologien unter den Tumorpatienten.

1.2.1.3 Abbildung Trigeminusparameter

Die folgenden Patienten zeigten eine Affektion in den Qualitäten (Hypästhesie, Parästhesie und Neuralgie) und Reflexeinbindung des N. trigeminus.

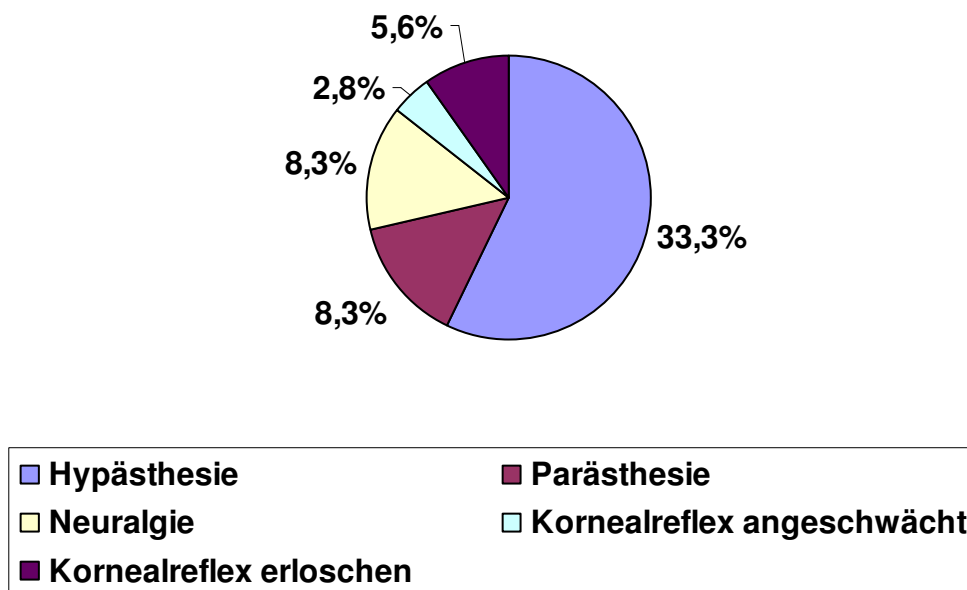


Abb. 31: Anteil der Trigeminuspathologien unter den Tumorpatienten.

1.2.1.4 Abbildung Vestibularisparameter

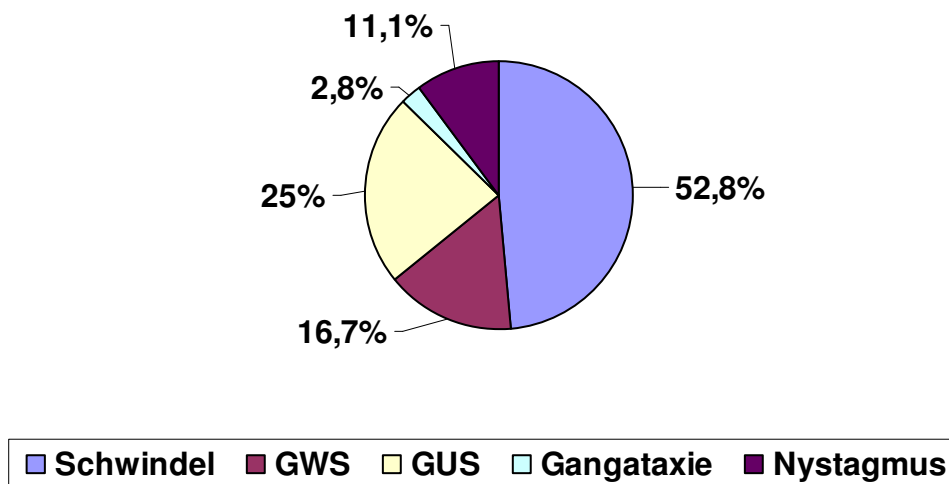


Abb. 32: Anteil der Vestibularispathologien unter den Tumorpatienten.
GUS $\hat{=}$ Gangunsicherheit, GWS $\hat{=}$ Gleichgewichtsstörung.

1.3 Kontrollgruppe

Als Vergleichsgruppe wurden 10 Proben an Nervi vestibulocochlearis (VIII.) von der Neuropathologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden bei Autopsien, die im Zeitraum von Februar 2009 - September 2010 stattfanden gesammelt. Die Patienten waren zwischen 0,2 und 71 Jahre alt, mit einem durchschnittlichen Todesalter von 43,8 Jahren. Darunter befanden sich 3 Frauen und 7 Männer (s. Abb. 33).

Bis zur Entnahme der Probe post mortem vergingen 2 – 72 Stunden (Durchschnitt: 34,2 Stunden).

Im Anschluss an die Biopsie wurden die Proben in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren und gelagert.

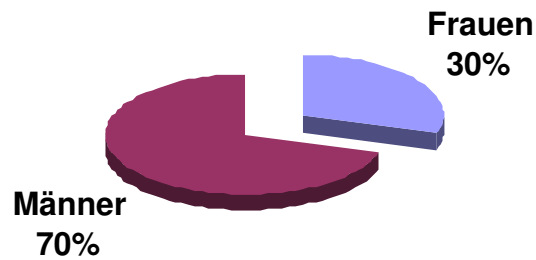


Abb. 33: Das Verhältnis von Frauen zu Männern unter den Kontrollproben.

2. Genexpressionsanalyse

Die Analyse der Tumor- und Kontrollproben wurde durch die Microarray Facility Tübingen (MFT Services) der Abteilung für Medizinische Genetik der Universität Tübingen durchgeführt. Dort fanden die Isolation der Gesamt-RNA mit anschließender cDNA Microarray Analyse, die statistische Bearbeitung der Rohdaten und die Einspielung der Daten in die Software, Ingenuity Pathway Analysis, statt. Initial wurden 10 Kontrollproben analysiert. Aufgrund von zu niedrigen RNA-Integritätsnummern wurden 3 Proben nach der RNA Qualitätsanalyse aussortiert und die verbleibenden 7 Proben weiter analysiert. RIN ist die RNA Integritätsnummer, die die Qualität der Gesamt-RNA widerspiegelt (146). Auf sie wird an einem spätern Abschnitt näher eingegangen.

2.1 Gesamt-RNA Isolierung mittels eines Kit Systems

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus den humanen Gewebeproben wurde das RNeasy Microarray Tissue Mini Kit System der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) benutzt. Der Versuchsablauf orientierte sich streng an dem Versuchsprotokoll des Herstellers (www.qiagen.com).

Eine Übersicht zum Versuchsablauf von der Bearbeitung des Gewebes bis zur Gesamt-RNA Isolierung zeigt Abbildung 34.

Die folgenden Informationen wurden aus dem Versuchsprotokoll des Herstellers entnommen.

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Tumor- und Kontrollgewebe wurde jeweils 10mg tiefgefrorenes Gewebe zerteilt und zu einer homogenen Masse mittels des TissueLyser Systems (TissueLyser LT), der Firma Qiagen (www.qiagen.com) verarbeitet. Tissue Lyser Systeme basieren auf dem Prinzip einer Kugelmühle. In das Probengefäß wird ein Edelstahlkügelchen und der Lysepuffer (QIAzol Lysis Reagenz) zusammengeführt. Dann wird in einer bestimmten Zeit mit einer bestimmten Oszillationsfrequenz (15 - 50Hz) das Gemisch „gemahlen“ bzw. homogenisiert. Hierbei wurden mittels mechanischer Scherkräfte zelluläre Fragmente aufgebrochen und die RNA freigesetzt. Um RNA Vertragsverluste zu vermeiden wurden die Proben mit Hilfe von Trockeneis und vorgekühlten Gefäßen des TissueLyser LT Systems kühl gehalten. Der TissueLyser LT ermöglichte es 12 Gewebeproben gleichzeitig zu homogenisieren. In Verbindung mit dem TissueLyser LT Adapter, der 12x2 ml Mikrozentrifugengefäße und Edelstahlkügelchen von 5 oder 7 mm Durchmesser beinhaltet, wurde so in vier Durchgängen alle Proben bearbeitet. Anschließend erfolgt die Phasentrennung, in der die obere, wässrige Phase die RNA enthält. Diese RNA kann durch Ethanol ausgefällt werden. In der RNeasy Mini Spinsäule bindet die RNA durch mehrmaliges Zentrifugieren nun an die Säulenmembran. Durch zweimaliges Waschen mit RNase freiem Wasser wird die RNA ab gespült und somit abgelöst.

Durch diese Versuchsschritte wird die Gesamt-RNA isoliert. Diese bindet an einen Biotin-Marker (labeled cRNA) und ist ein wichtigster Bestandteil für die Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray Technologie.

RNeasy Microarray Tissue Procedure

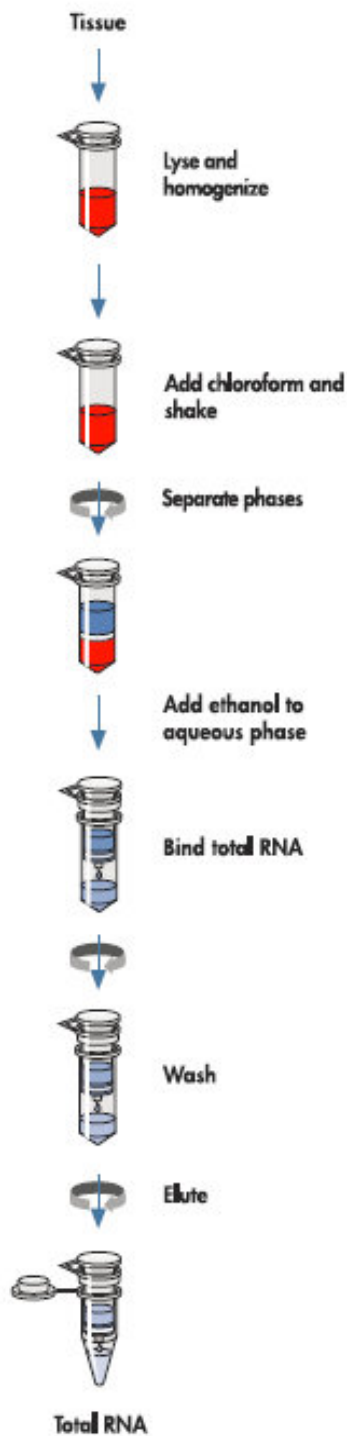


Abb. 34: Übersicht zum Versuchsablauf des RNeasy Microarray Tissue Mini Kit der Firma Qiagen (www.qiagen.com). Quelle: Qiagen Handbuch (Qiagen, Hilden, Germany).

2.2 Qualitätsbestimmung der RNA durch ein Kit System

Der qualitative und quantitative Zustand der RNA wurde unter Gebrauch des Agilent 2100 Bioanalyzer, unter Verknüpfung des RNA 6000 Nano Kit System (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), geprüft.

Diese Technologie kombiniert eine mikrofluidische, mikrokapilläre Elektrophorese mit der Laser-induzierten-Floureszenzdetektion (LIF) und wertet die Daten mit Hilfe einer biosizing Software in aus. In diesem Zug werden die Daten anhand von Elektropherogrammen, Abbildungen und in tabellarischer Form digitalisiert und visualisiert.(147) Der Algorithmus bestimmt auf Basis einer Bayessche Statistik eine RNA Integritätsnummer (RIN), die die Integrität und Qualität in einer dezimalen Skala von 1 (vollständig degradiert) – 10 (vollständig intakt) darstellt. (146, 148)

Dieses System nutzt die Gelelektrophorese und einen Floureszenzfarbstoff zur Integritäts- und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA, basierend auf einer Lab-on-a-Chip Technologie. Durch einen Software Algorithmus wird eine RNA Integritätsnummer (RIN) von 1 - 10 (1 = degeneriert, 10 = vollständig intakt) (146) generiert, die eine objektive Bewertung der RNA-Qualität und Quantität zulässt.

Die RIN wurde für alle Tumor- und Kontrollproben errechnet. Die festgelegte RIN von ≥ 5 entsprach für unsere Studie einer guten RNA Qualität. Alle Tumorproben erfüllten dieses Kriterium, bei den Kontrollproben erfüllten drei nicht die geforderte RIN und wurden deshalb von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

2.3 Affymetrix® GeneChip 3'IVT Express Kit und Human Genome U219 Array Plate

Hierbei wurde das Benutzerhandbuch für das GeneChip 3'IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) verwendet. Eine Übersicht und kurze

Beschreibung der Methode zeigt die Abbildung 35. Die anschließende Hybridisierung erfolgte auf die Affymetrix® Human Genome U 219 Array Plate (HG-U219 Array Plate). Dies ist eine Array Plate mit 530.000 „probe sets“ und sie umfasst über 36.000 Transkripte bzw. >20.000 humane Gene. Einzelne Gene sind mehrfach repräsentiert.

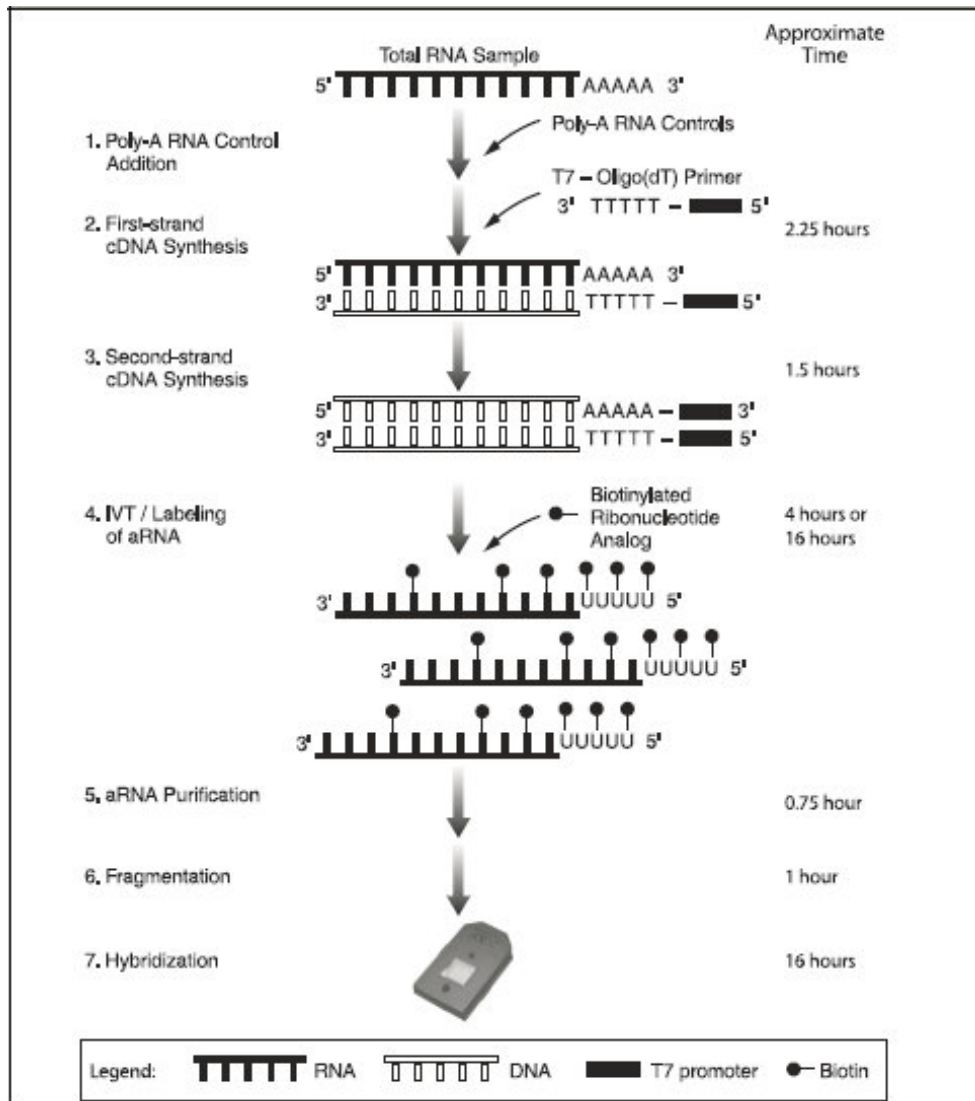


Abb. 35: Versuchsablauf des Affymetrix GeneChip 3'IVT Express Kit Labelling Assay.

Quelle: Affymetrix Handbuch des GeneChip 3'IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Um eine angemessene Hybridisierung sicherzustellen und Artefakte auszuschließen, wurden die Bilder visuell einzeln geprüft. Mit den Intensitätswerten der Signale wurde sogenannte Cel Files mit der AGCC 3.0 (Affymetrix GeneChip Command Console 3.0) Software generiert.

3. Softwarepakete und statistische Analyse

Der folgende Abschnitt wurde von der MFT Services Tübingen der Medizinischen Genetik Tübingen ausgeführt. Diese bearbeitete die Affymetrix-Daten mit verschiedenen Softwarepaketen und führte die statistischen Analysen durch. Dabei wurde die Qualität der Daten kontrolliert, die Daten normalisiert und mit der Hauptkomponentenanalyse (PCA; Principal Component Analysis) reduziert.

Mit der statistischen, freien Programmiersprache R 2.12.0 (www.r-project.org), wurden die Rohdaten mit den in Tabelle 9 (s. Tab. 9) aufgelisteten Bioconductor Paketen (www.bioconductor.org), statistisch ausgewertet (149).

Tab. 9: Verwendete Softwarepakete.

Fett unterlegt sind die Bioconductor Pakete (www.bioconductor.org).

Softwarepaket	Version
KEGG.db	2.4.5
Xtable	1.5-6
GO.db	2.4.5
hgu219.db	2.4.5
org.Hs.eg.db	2.4.6
GOstats	2.16.0
RSQLite	0.9-4
DBI	0.2-5
Graph	1.28.0
Category	2.16.0

AnnotationDbi	1.12.0
Genefilter	1.32.0
Limma	3.6.8
Gplots	2.8.0
caTools	1.10
Bitops	1.0-4.1
Gdata	2.8.1
Gtools	2.6.2
scatterplot3d	0.3-31
hgu219cdf	2.7.0
Affy	1.28.0
Biobase	2.12.0
Affyio	1.18.0
Annotate	1.28.0
GSEABase	1.12.1
preprocessCore	1.12.0
RBGL	1.26.0
Splines	2.12.0
Survival	2.36-2
Tools	2.12.0
XML	3.2-0.2
affyQCReport	1.28.0
Lattice	0.19-13
RColorBrewer	1.0-2
affyPLM	1.26.0
Biostrings	2.18.2
Gcrma	2.22.0
Genefilter	1.32.0
IRanges	1.8.4
Simpleaffy	2.26.0

Durch eine multivariante Hauptkomponentenanalyse, auch PCA (Principal Component Analysis) genannt, wurden die umfangreichen Datensätze reduziert, vereinfacht und visualisiert.

Die Probenintensitäten der Array Plate wurden unter Gebrauch des RMA Express (Robust Multichip Average) mit der RMA Methode normalisiert. Die Robust Multichip Average (RMA) Methode stellt eine Möglichkeit dar, den Hintergrund zu korrigieren, die Daten unter Verwendung einer Quantilnormalisierung zu normalisieren und sie letztendlich zusammenzufassen (150, 151).

Die sich ergebenden log₂ Signalwerte wurden mit einem linearen Modell wieder rücktransformiert. Zum Entfernen von nicht informationsträchtigen Transkripten wurde ein unspezifischer Varianzfilter verwendet. Für die restlichen Transkripte wurden die Koeffizienten des linearen Modells kalkuliert, die das Expressionsniveau des einzelnen Moleküls beschreiben.

Desweiteren wurde eine Kontrastmatrix festgelegt, und die F-Statistik für den Vergleich eruiert. Eine Moderation der Standardfehler fand über ein empirisches Bayesische Modell statt (Funktion eBayes) (152).

Aus der F Statistik konnte für alle Transkripte ein p-Wert errechnet und über Benjamini-Hochberg für multiples Testen korrigiert werden (153). Eine Decision Matrix wurde gebildet um die Daten nach ihrer Signifikanz zu rastern. Hierzu wurden jedem einzelnen Transkript die Werte +1 für eine Überexpression und -1 für eine Unterexpression, sowie die Zahl 0 für keine signifikante Expressionänderung zugeteilt.

Ein korrigierter p-Wert von 0,01 nach Korrektur durch Benjamini-Hochberg und ein log Fold Change (logFC) von größer 1 wurden als signifikante Kriterien bestimmt. Tabellarisch gesehen wurden den überexprimierten Transkripten die Farbe Rot, den unterexprimierten die Farbe Grün zugeteilt.

Die Expressionsstärke wird durch den M-Wert angegeben. Er kommt dem log₂ des Fold Change gleich. M = 1 entspricht einer zweifachen, M = 2 einer vierfachen Erhöhung der mittleren Expression. Analog dazu ist mit M = -1 eine zweifache und mit M = -2 eine vierfache Abnahme zu verzeichnen. Ab einem M-Wert von 1 werden die Transkripte rot bzw. für M = -1 grün markiert.

Gene, die einen korrigierten p-Wert von $< 0,01$ und ein logarithmierter Fold Change von > 1 aufwiesen wurden als signifikante Kriterien angesehen.

4. Bioinformatik

4.1 Ingenuity Pathway Analysis Software

Die gewonnenen Daten wurden unter Zuhilfenahme der Ingenuity Pathway Analysis Software der Firma Ingenuity Systems analysiert (www.ingenuity.com). Diese Software basiert auf der Ingenuity Knowledge Base, einem Wissenspool, der sich auf publizierte Studien und Reviews, Lehrbuchwissen und bekannten Datenbanken (z.B. Gene Ontology (www.geneontology.org/), KEGG (www.genome.jp/kegg/), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)) beruft und hinsichtlich Aktualität und Inhalt von PhD. Wissenschaftlern überprüft und generiert wird (www.ingenuity.com).

4.1.1 Signalweganalyse

Canonical Pathways sind präformierte, wissenschaftlich erstellte, den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen entsprechende Signalwege, in deren Kaskaden die signifikant deregulierten Gene integriert sind. Dadurch können die Gene innerhalb eines funktionellen Systems beobachtet werden.

Ingenuity generiert automatisch über den exakten Fisher-Test einen p-Wert von 0,05. Dieser wird mit dem in IPA bezeichneten Schwellenwert („Threshold“) gleichgesetzt. Der Schwellenwert ist variabel veränderbar und wurde zur Signifikanzsteigerung auf 0,0001 erniedrigt. Damit könnte die Datenmenge eingeschränkt und noch effizienter analysiert werden.

4.1.2 Netzwerkanalyse

Netzwerke stellen direkte (durchgezogene Linie) und indirekte (gestrichelte Linie) Verknüpfungen zwischen den Genen dar. Dadurch können Verbindungen zwischen den Molekülen näher erruiert werden und der Einfluss der Moleküle untereinander wird visualisiert und verdeutlicht. Der Score des Netzwerkes, ist ein generierter p-Wert, der das Ergebnis des negativen Exponenten des exakten Fisher-Test (right-tailed) darstellt. Je größer der Wert ist, desto geringer wird der p-Wert, das heißt umso signifikanter ist die Stellung des Netzwerkes.

Zu den Focus Molecules zählen die Moleküle des Datensatzes, die ein Netzwerk bilden. Der Maximalwert liegt bei 35.

4.1.3 Biologische Funktionen

Biological Functions werden nach dem Vorbild des Gene Ontology Projekts in 3 Kategorien eingeteilt: "*Diseases and Disorders*", "*Molecular and Cellular Function*" und "*Physiological System Development and Function*". Dies ermöglicht es die Datenmenge in Kategorien zu organisieren und dadurch einen Überblick zu erhalten, in welchen biologischen Systemen, Krankheiten und Prozessen die Moleküle involviert sind. Zudem wird gewährleistet, dass eine detailliertere Betrachtung innerhalb der Kategorien vorgenommen werden kann.

4.1.4 Kandidatengene

Als Kandidatengene werden Moleküle bezeichnet, die aus dem Datensatz heraus als sehr signifikant über-oder unterexprimiert gelten. Ingenuity listet hierfür die 10 am signifikantesten über-oder unterexprimierten Gene auf.

Diese Funktion kann dabei helfen eventuelle Kandidatgene zu identifizieren und näher zu analysieren.

E Ergebnisse

Für die Studie wurden 36 sporadische Vestibularisschwannome und 10 Gewebeproben an gesunden Nervi vestibulocochlearis gesammelt und hinsichtlich ihrer genetischen Unterschiede mit Hilfe einer cDNA Microarray analysiert.

In der anschließenden Auswertung waren 36 Fall- und 7 Kontrollproben unter Ausschluss von 3 Kontrollproben aufgrund zu niedriger RIN Werte beteiligt.

Eine Übersicht zum Studiendesign zeigt Abbildung 36 (s. Abb. 36).

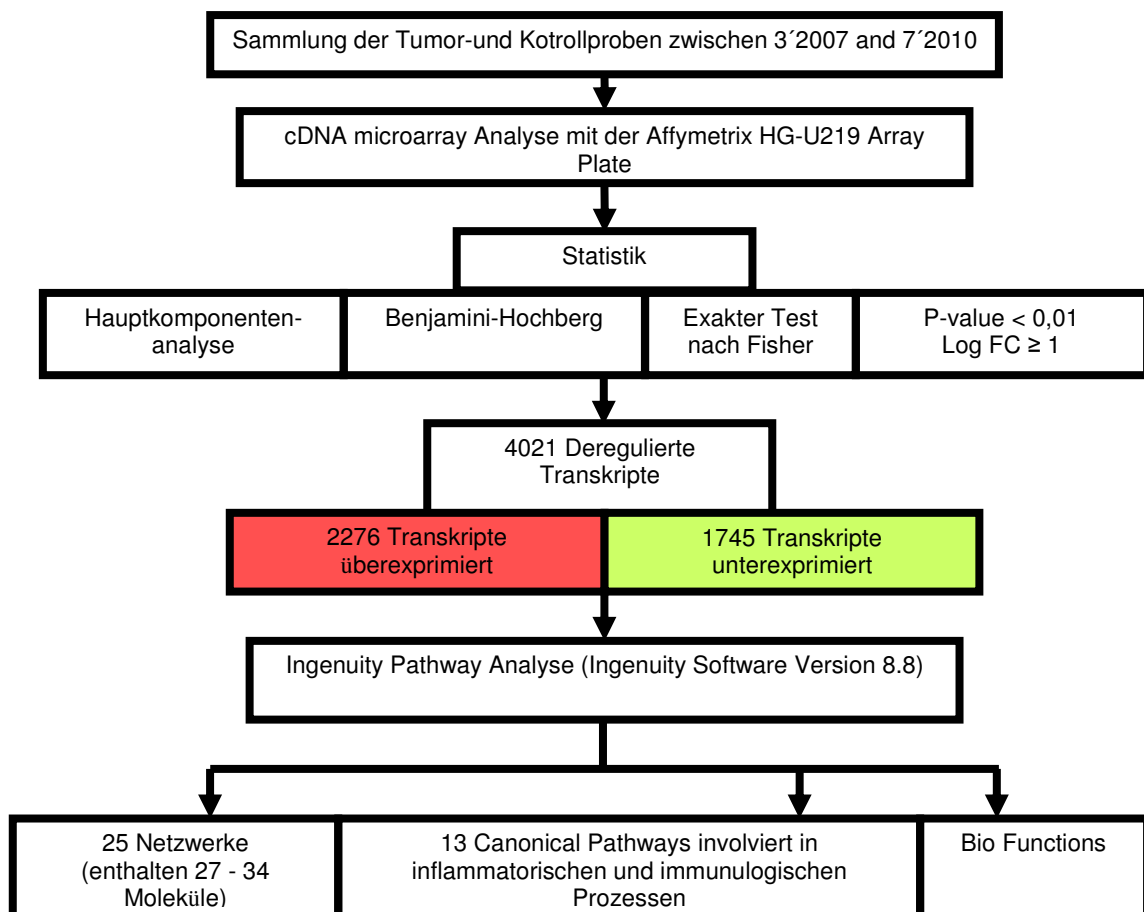


Abb. 36: Technischer Arbeits- und Versuchsablauf der Studie.

1. Genexpressionsprofile durch Verwendung der cDNA Microarray

Um eine genomweite Expressionanalyse von Tumor- und Kontrollgewebe durchzuführen wurde eine cDNA Microarray vorgenommen.

Hierzu wurde Gesamt-RNA aus 36 Gewebeproben von Patienten mit sporadischem VS und 7 Autopsiegewebeproben an gesundem Nervus vestibulocochlearis isoliert und anschließend mit der Affymetrix HG U219 Array Plate analysiert (s. Abb. 37).

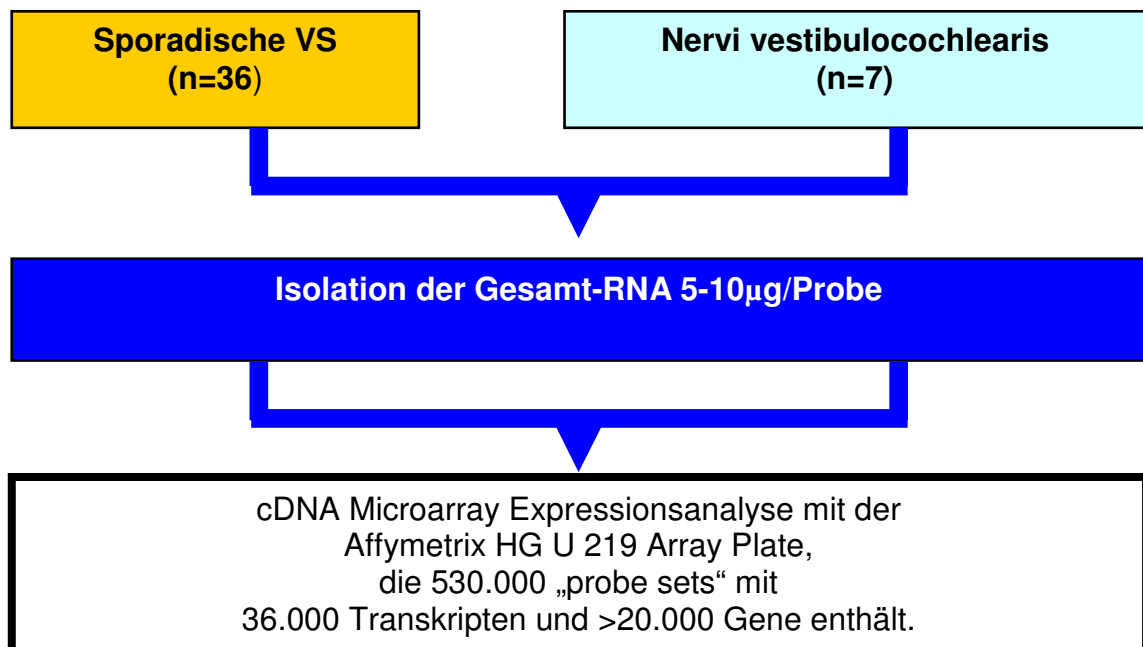


Abb. 37: Versuchsablauf der cDNA Microarray Analyse mit der HG U 219 Array Plate von Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Ein Transkript wurde als signifikant differentiell exprimiert angesehen, wenn es einen p-Wert von $< 0,01$ und einen log Fold Change (logFC) von ≥ 1 aufwies. Bei einer Gesamtmenge von 4021 deregulierten Transkripten die sich ergab, waren 2276 ($\approx 56,60\%$) Transkripte überexprimiert und 1745 ($\approx 43,40\%$) unterexprimiert (s. Abb. 38).

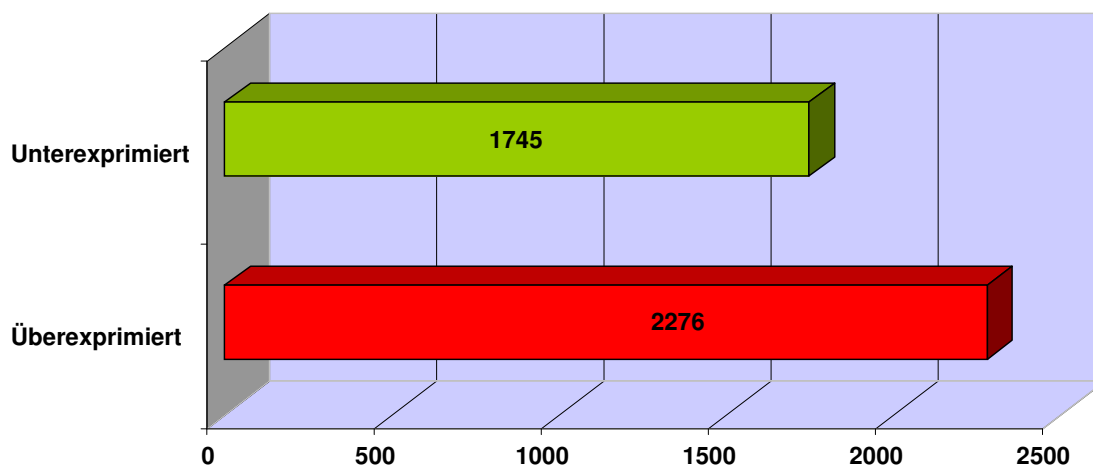


Abb. 38: Anzahl und Expressionsgrad der deregulierten Gene.

Da einzelne „probe sets“ mehr als nur ein Transkript repräsentieren, waren gewisse „probe sets“ mehrfach aufgelistet (154). Harbig et al. nahmen an, dass mehr als ein Drittel der „probe sets“ multiple Transkripte vertreten (155). Unter Wegfall der multiplen Transkripte, die einen Anteil von 1327 „probe sets“ (33,0%) ausmachten, entsprach dies ca. dem Wert eines Drittels. Falls „probe sets“ mehrfach aufgeführt waren, wurde jeweils das „probe set“ mit dem höchsten Fold Change ausgewählt um die maximale Signifikanz zu erreichen.

Das NF2 Gen war im Sinne eines multiplen Transkripts dreifach aufgeführt, mit einem p-Wert von 0,0156; 0,0289 und 0,0738 und einem Fold Change von -0,332; -0,318 und -0,327. Dadurch erfüllte es nicht die signifikanten Kriterien, erschien aber tendenziell herunterreguliert.

2. Ingenuity Pathways Analysis (IPA) der Deregulierten Gene

Die normalisierten Rohdaten wurden in die Ingenuity Pathway Analysis Software (www.ingenuity.com, Version 8.8) eingespielt und ausgewertet. Ingenuity generiert automatisch einen p-Wert von $< 0,05$ als signifikantes

Kriterium. Dieser wird von der Software mit dem exakten Test nach Fisher (right-tailed) berechnet. Mit Hilfe der Ingenuity Summary Übersicht und den verschiedenen Tools konnten die Gene in einen komplexen Zusammenhang eingeordnet werden.

2.1 Signalweganalysen

Um die Moleküle in einen funktionellen Zusammenhang zu bringen und eine Übersicht zu erhalten wurden primär die Canonical Pathways fokussiert und ausgewertet. Der p-Wert wurde auf 0,0001 festgelegt um die Datenmenge zu begrenzen und gleichzeitig eine hohe Signifikanz zu erreichen. Mit dem genannten Kriterium generierte IPA mit unserem Datensatz 231 Signalwege in denen 4835 differentiell exprimierte Gene beteiligt waren. Aus der großen Genmenge wurde ersichtlich, dass manche Gene an mehreren Signalwegen teilnehmen. Es fanden sich 13 Signalwege, die unterhalb des geforderten Threshold von 0,0001 lagen (s. Abb. 40). Der Threshold entspricht dem p-Wert. Er zeigt vor allem grafisch, welche Signalwege, Netzwerke und Biologischen Funktionen unter dem festgelegten p-Wert liegen.

An den 13 Canonical Pathways waren 554 Moleküle des Datensatzes beteiligt, darunter fanden sich 386 überexprimierte und 168 unterexprimierte Gene (s. Abb. 39, s. Abb. 40 und s. Tab. 10).

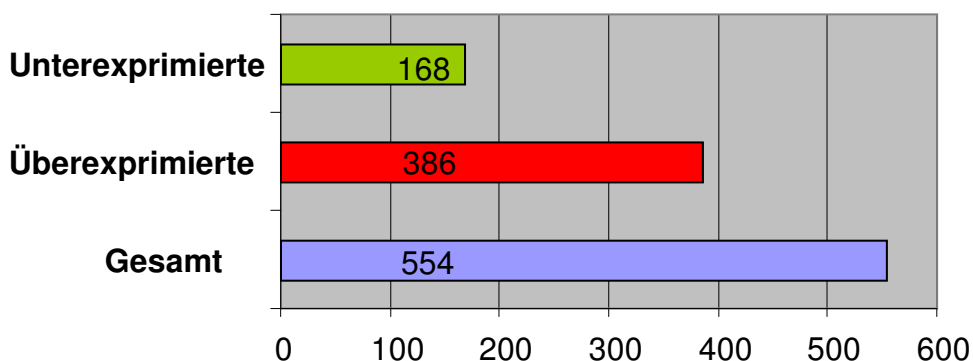


Abb. 39: Anzahl und Expressionsgrad der Canonical Pathways Moleküle, die den Threshold von 0,0001 erfüllt haben.

Die Signalwege wurden vorwiegend nach ihren p-Werten kategorisiert.

Die Molecule Ratio ist das Verhältnis der deregulierten Gene des Datensatzes, die am Signalweg teilnehmen, im Vergleich zur Gesamtzahl der Moleküle, die einen Signalweg generieren (www.ingenuity.com). Sie ist ein gutes Mittel die Partizipation der eigenen Moleküle an einem Signalweg zu betrachten.

Mit einem Anteil von 6 von 13 Signalwegen ist das Immunsystem mit den Kategorien *Cellular Immune Response*, *Humoral Immune Response* und *Cytokine Signaling* vertreten. Ausgeschlossen davon wurden Signalwege, die in Immunprozessen involviert waren, aber eine krankheitsspezifische Komponente (Disease-Specific Pathways, inklusive HIV abhandelnde Signalwege) besaßen (Signalweg 2, 4, 7, 10, 11, 12 und 13). Somit sind 46,2% der Signalwege in der Immunantwort involviert. Die Signalwege sind im Einzelnen in der Tabelle (s. Tab. 10) näher ausgeführt.

Analysis: spo - con

■ spo - con ■ Ratio

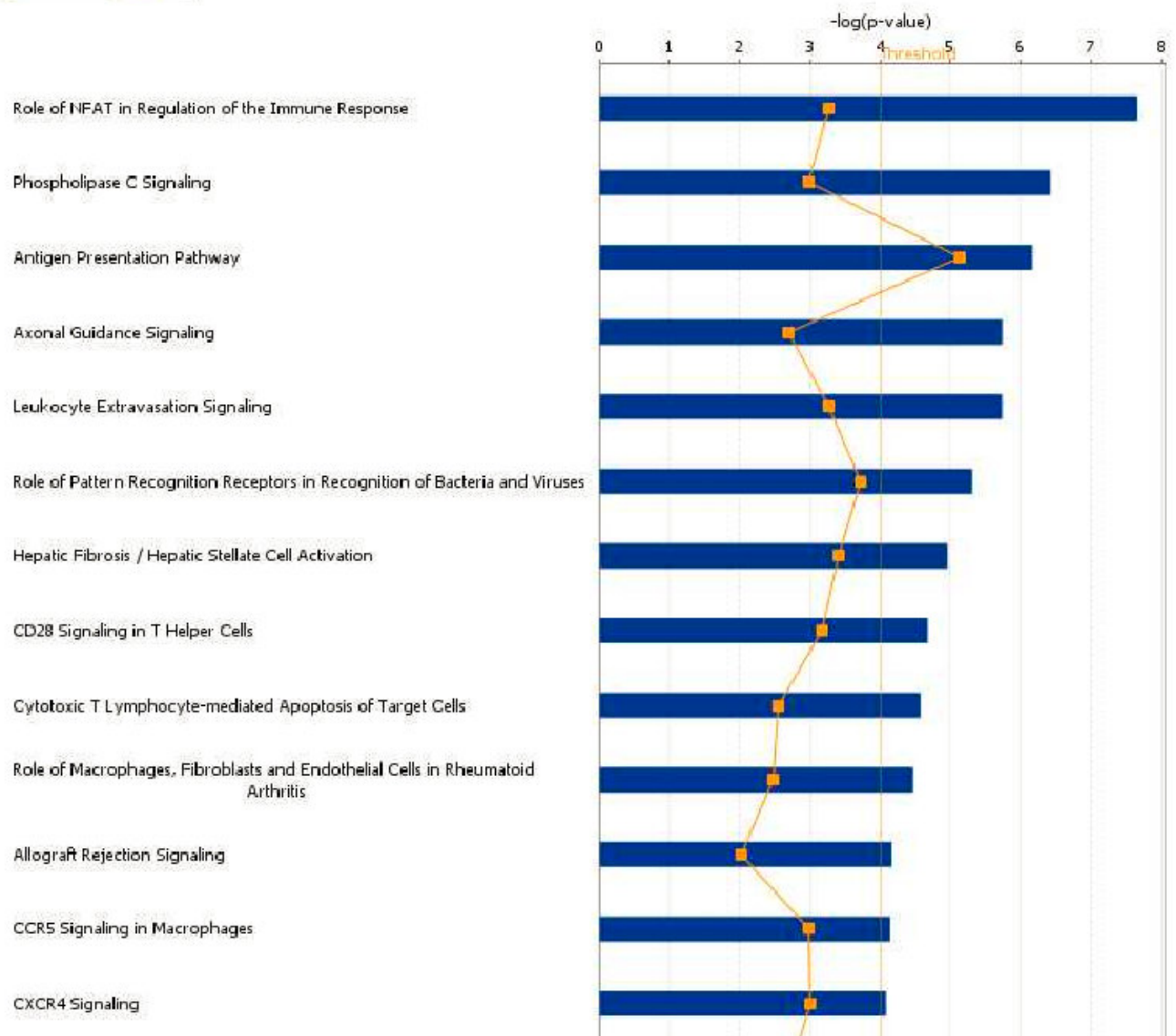


Abb. 40: 13 Canonical Pathways, die einen p-Wert von $\leq 0,0001$ aufweisen. Der Threshold ist der grafische p-Wert, der in Form einer gelben Linie anzeigt, welche Signalwege unter dem geforderten p-Wert liegen. Die andere Linie mit Quadraten ist das Molekülverhältnis, auch Molecule Ratio genannt. Ihre Bedeutung wurde im Text erläutert.

Quelle: Ingenuity Pathway Analysis Software (www.ingenuity.com).

Tab. 10: Die 13 Top signifikanten (p-Wert $\leq 0,0001$) Canonical Pathways, die den Threshold von $\leq 0,0001$ erfüllten. Die überexprimierten Gene sind fett unterlegt, Gene in normaler Schrift sind unterexprimiert. 6 der Signalwege (Nr. 1, 3, 5, 6, 8 und 9) waren an Prozessen des Immunsystems beteiligt (grau hinterlegt). Die Disease Specific Pathways (inklusive HIV-Signalwege) mit Immunkomponente wurden davon ausgeschlossen. Quelle: generiert und modifiziert aus der Ingenuity Pathway Analysis Software (www.ingenuity.com).

Ingenuity Canonical Pathways	p-Wert	Ratio	Moleküle	Signalwegkategorien	Top Funktionen und Erkrankungen
1. Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	2,18E-08	2,66E-01 (0,266)	FCGR2C, RAC2, PLCB2, HLA-DOA, CD4, PIK3R1, RCAN2, FCER1A, HLA-DRB1, HLA-DMB, FCGR1A, GNB1, GNB3, PIK3CG, PLCB1, GNG12, null, GNG3, ITPR1, GNAZ, HLA-DQB1, SYK, PLCG2, GNAO1, CD86, LCP2, GNAL, FCGR3B, BLNK, HLA-DQA1, PIK3R5, FCGR2B, GNG7, JUN, PPP3CB, HLA-DRA, GNG4, FCGR1B, FCGR3A, HLA-DMA, FCGR2A, GNAI1, MEF2A, NFATC1, NFATC4, CD3D, BTK, FOS, PLCB4, RRAS2, FCER1G, LYN, NFATC2, MEF2C	Cellular Immune Response; Humoral Immune Response; Intracellular and Second Messenger Signaling	Cellular Development; Hematological System Development and Function; Hematopoiesis
2. Phospholipase C Signaling	3,79E-07	2,42E-01 (0,242)	FCGR2C, PLCB2, ADCY4, DIRAS3, GNB1, PLCE1, GNB3, PLCB1, PRKD3, GNG12, ITGA4, ARHGEF4, null, PPP1R14A, RHOJ, RAPGEF3, ITPR1, GNG3, RAP1A, MYL9, RND3, SYK, PRKCD, PLCG2, ARHGEF16, ARHGEF6, PRKCH, FNBP1, LCP2, BLNK, NAPEPLD, RPS6KA3, HDAC9, PLA2G2A, FCGR2B, RHOH, GNG7, TGM2, PPP3CB, RHOU, ARHGEF2, ARHGEF3, MARCKS, GNG4, PRKCA, ADCY2, FCGR2A, ITGA2, MEF2A, NFATC1, NFATC4, CD3D, BTK, PLD4, PLA2G4A, PLCB4, RRAS2, ARHGEF10, FCER1G, LYN, NFATC2, MEF2C, ADCY7	Intracellular and Second Messenger Signaling	Hematological System Development and Function; Cell Signaling; Molecular Transport

3. Antigen Presentation Pathway	6,84E-07	4,19E-01 (0,419)	HLA-DMA, PSMB9, HLA-DOA, PDIA3, HLA-DQA1, CIITA, HLA-DRB1, HLA-DMB, PSMB8, CD74, HLA-DPA1, MR1, HLA-F, HLA-DRA, HLA-B, HLA-DPB1, TAP2, HLA-C	Cellular Immune Response; Humoral Immune Response	Immunological Disease; Connective Tissue Disorders; Inflammatory Disease
4. Axonal Guidance Signaling	1,84E-06	2,2E-01 (0,22)	RAC2,PLCB2,GLI2,PIK3R1,WNT6,GNB1,VEGFA,PAK1,GNB3,SEMA3D,ADAM28,PIK3CG,ABLIM3,PLCB1,ADAM23,ABLIM2,PRKD3,RTN4R,BMP8A,GNG12,ITGA4,ACTR2,NGEF,SEMA5A,PTCH1,L1CAM,GNG3,GNAZ,RAP1A,PDGFB,MYL9,PTPN11,SEMA6D,PRKCD,ARHGEF6,GNAO1,RTN4,PRKCH,PDGFD,GNAL,FZD10,NTF3,SLIT1,ARPC1B,PIK3R5,PLXNA2,NGF,PDGFC,ROBO1,SEMA6C,GNG7,PRKAG1,PGF,NTNG1,EFNB2,PPP3CB,IGF1,SDC2,EFNA5,EFNB1,ARPC3,GNG4,PRKCA,PLXNC1,NRP2,CXCR4,null,ITGA2,GNAI1,NFATC1,NFATC4,EPHA3,EFNA1,SEMA3A,PLCB4,WIPF1,SEMA4D,NTRK2,PRKAR2B,RRAS2,PAK3,NTRK3,CXCL12,PLXNB1,NFATC2,SEMA3C,BMP6,GLI1,WNT5A,SEMA7A	Neurotransmitters and Other Nervous System Signaling; Organismal Growth and Development	Nervous System Development and Function; Cellular Assembly and Organization; Cellular Function and Maintenance
5. Leukocyte Extravasation Signaling	1,85E-06	2,66E-01 (0,266)	RAC2, CLDN19, PIK3R1, JAM2, MLLT4, CYBA, PIK3CG, EZR, CYBB, ARHGAP12, PRKD3, ITGA4, RDX, THY1, RAPGEF3, NCF4, RAP1A, TIMP4, ITGAM, CDH5, PTPN11, PLCG2, PRKCD, NCF2, PRKCH, VAV1, CLDN11, CLDN20, MMP14, MMP15, PIK3R5, RHOH, SIPA1, MMP11, PRKCA, MMP19, VCAM1, CXCR4, ARHGAP4, GNAI1, DLC1, ITGAL, SELPLG, BTK, ITGB2, WIPF1, CLDN5, ARHGAP9, CLDN1, CXCL12, CD44, MSN, ARHGAP8/PRR5-ARHGAP8	Cellular Immune Response	Cell-To-Cell Signaling and Interaction; Tissue Development; Cellular Movement

6. Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	4,91E-06	3,03E-01 (0,303)	TLR1, PIK3R1, PIK3R5, TLR8, C1QC, C1QA, CCL5, C1QB, PIK3CG, TLR7, CASP1, TLR3, NLRC4, PTX3, OAS1, C3, NLRP3, OAS2, MYD88, OAS3, TLR2, CLEC7A, TLR5, SYK, DDX58, TNF, C3AR1	Cellular Immune Response; Pathogen-Influenced Signaling	Inflammatory Response; Cell-To-Cell Signaling and Interaction; Hematological System Development and Function
7. Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1,1E-05	2,79E-01 (0,279)	IGFBP4,CCR5,CTGF,TGFBR1,FGF2,LEPR,IL1RL1,MYH11,CCL5,PDGFC,FAS,PGF,TGFBR2,COL1A2,VEGFA,IGF1,TGFB1,PDGFRA,STAT1,IL1RAP,TNFRSF11B,AGT,EGFR,VCAM1,EDNRB,FGFR1,FGFR2,BAMBI,IFNGR1,BA X,IL1R1,PDGFB,FGF1,MET,MYL9,COL1A1,LY96,IL10RA,CD14,TNF,COL3A1	Disease-Specific Pathways; Ingenuity Toxicity List Pathways	Cellular Movement; Organismal Injury and Abnormalities; Organismal Development
8. CD28 Signaling in T Helper Cells	2,11E-05	2,59E-01 (0,259)	RAC2, HLA-DOA, ARPC1B, PIK3R1, CD4, PIK3R5, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DMB, PTPRC, PAK1, JUN, PPP3CB, PIK3CG, HLA-DRA, ARPC3, HLA-DMA, ACTR2, PTPN6, null, CSK, NFATC1, ITPR1, NFATC4, CD3D, HLA-DQB1, FOS, PTPN11, SYK, FCER1G, CD86, NFATC2, VAV1, CARD11, LCP2	Cellular Immune Response	Cell-mediated Immune Response; Cellular Development; Cellular Function and Maintenance
9. Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	2,67E-05	2,07E-01 (0,207)	HLA-DMA, HLA-DOA, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DMB, CD3D, HLA-DPA1, FAS, HLA-F, FADD, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-B, FCER1G, BID, CASP8, HLA-DPB1, HLA-C	Apoptosis; Cellular Immune Response	Cell Death; Cell-mediated Immune Response; Cellular Development

10. Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	3,39E-05	2,01E-01 (0,201)	TLR1,SOCS1,RAC2,PLCB2,PIK3R1,TLR8,KLK6,WNT6,CCND1,FCGR1A,TCF7,VEGFA,TLR10,PLCE1,CAMK2A,TGFB1,PIK3CG,PLCB1,IL1RAP,PRKD3,TNFSF13B,TNFRSF11B,ADAMTS4,null,PDGFB,TLR2,IL18,KLK7,PLCG2,PRKCD,GNAO1,PRKCH,SFRP1,PDGFD,TNF,PRSS35,IL6ST,FZD10,SFRP2,IL1RL1,FGF2,PDIA3,PIK3R5,CCL5,IL17RA,PDGFC,PGF,ROR2,JUN,PPP3CB,DKK3,TLR7,CBPA,TLR3,PLCD4,FCGR3A,PRKCA,CAMK2B,VCAM1,MYD88,IL15,NFATC1,NFATC4,IL1R1,IRAK3,FOS,PLCB4,HP,RRAS2,TLR5,CXCL12,NFATC2,IRAK4,WNT5A	Disease-Specific Pathways	Tissue Development; Cellular Development; Cell-To-Cell Signaling and Interaction
11. Allograft Rejection Signaling	6,84E-05	1,65E-01 (0,165)	HLA-DMA, HLA-DOA, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DMB, HLA-DPA1, FAS, HLA-F, HLA-DQB1, HLA-DRA, FCER1G, HLA-B, CD86, HLA-DPB1, TNF, HLA-C	Cellular Immune Response; Disease-Specific Pathways	Cell-To-Cell Signaling and Interaction; Hematological System Development and Function; Immune Cell Trafficking
12. CCR5 Signaling in Macrophages	7,21E-05	2,42E-01 (0,242)	CCR5, null, CD4, GNAI1, GNG3, CCL5, CCL3, CD3D, FAS, GNG7, GNB1, FOS, GNB3, JUN, CCL4, PLCG2, PRKCD, FCER1G, PRKCH, GNG4, PRKD3, GNG12, PRKCA	Cellular Immune Response; Cytokine Signaling	Cell Signaling; Molecular Transport; Vitamin and Mineral Metabolism
13. CXCR4 Signaling	8,26E-05	2,46E-01 (0,246)	RAC2, PLCB2, DIRAS3, ADCY4, CD4, PIK3R1, PIK3R5, RHOH, GNG7, GNB1, PAK1, GNB3, JUN, PIK3CG, RHO, PLCB1, GNG4, PRKD3, GNG12, PRKCA, ADCY2, CXCR4, EGR1, GNAI1, RHOJ, GNAZ, ITPR1, GNG3, MYL9, FOS, PLCB4, RRAS2, RND3, PAK3, PRKCD, CXCL12, GNAO1, LYN, PRKCH, ADCY7, FNBP1, GNAL	Cellular Immune Response; Cytokine Signaling	Cellular Development; Cell Morphology; DNA Replication, Recombination, and Repair

2.1.1 Signalweg „The Role of NFAT in Regulation of the Immune Response“

Zentraler Signalweg der Analyse war der mit einem p-Wert von 2,18E-08 am signifikantesten gelistete Signalweg „*The Role of NFAT in Regulation of the Immune Response*“ (s. Abb. 42). In diesem Signalweg sind von insgesamt 203 teilnehmenden Molekülen, 54 Moleküle des Datensatzes vertreten. 40 Moleküle sind überexprimiert und 14 unterexprimiert. Demnach kann von einem vorwiegend überexprimierten Signalweg gesprochen werden. Nach einer ausführlichen Literaturrecherche wurden die Gene der NFAT Familie als zentraler Punkt des Signalwegs und der Analyse

angesehen. Das **überexprimierte NFAT1** und die **unterexprimierten NFAT2 und 3** sind in diesem Signalweg von der NFAT Molekülfamilie vertreten.

Die Signalwegmoleküle waren involviert in Krankheiten und Funktionen wie „*Cellular Development*“, „*Hematological System Development and Function*“ und „*Hematopoiesis*“.

Die Symbole des Signalwegs haben folgende Bedeutung (s. Abb. 41):

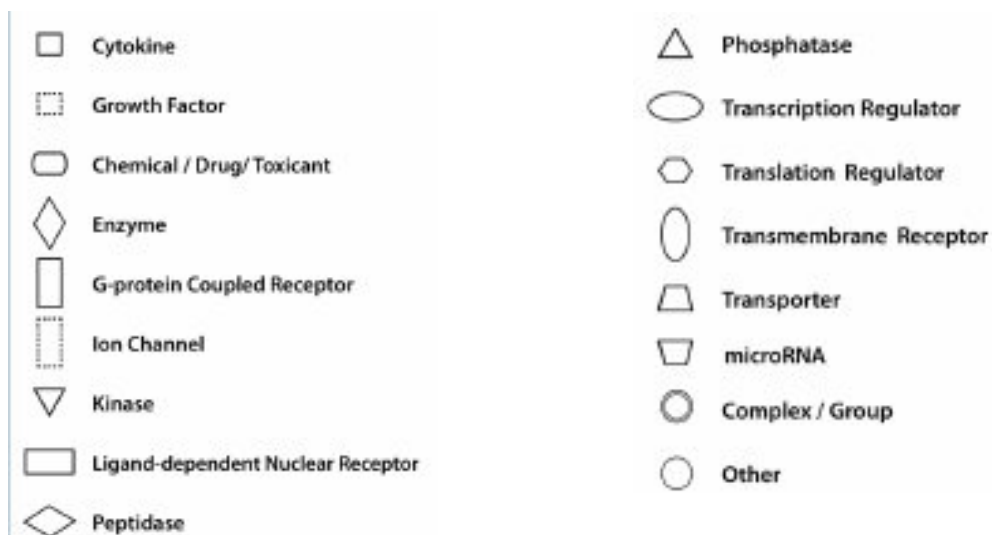


Abb. 41: Legende der Canonical Pathways.

werden um die Grafik zu vervollständigen, da sie an relevanten Interaktionen beteiligt sind. Die Interaktionen können einseitig oder beidseitig verlaufen. Die Erklärung der Symbolik der Grafik und die Signalwegbeschreibung sind im Haupttext näher ausgeführt. Quelle: Ingenuity Pathway Analysis Software (www.ingenuity.com).

Zusammenfassend sind NFAT Moleküle Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelltypen, speziell in Immunzellen, wie Lymphozyten, die durch eine Calcium-Calcineurin-abhängige Signalkaskade dephosphoryliert und somit aktiviert werden. Die Aktivierung findet über stimulierte Immunrezeptoren und deren Korezeptoren statt, die über Tyrosinkinasen und Adaptormoleküle zur Aktivierung der Phospholipasen führt. Diese sorgen für einen Calciumeinstrom von extrazellulär und damit zur Aktivierung von Calcineurin. Calcineurin besitzt die Fähigkeit NFAT zu dephosphorylieren. In diesem Zustand kann es in den Nucleus transloziert werden und die Transkription mediieren. Durch die Interaktion mit diversen Transkriptionspartnern wie MEF-2 und dem Fos-Jun Komplex kann die Immunantwort gleichmäßig reguliert werden. Kommt es zur Unterbrechung der NFAT-cFos-cJun-Interaktion geht die Immunzelle durch Anergie zugrunde.

NFAT Moleküle können durch ihre Phosphorylierung, die durch die Moleküle wie GSK, CK1, p38 und JNK eingeleitet wird, inaktiviert werden. In unserem Datensatz ist **NFAT1 überexprimiert** und **NFAT2 und 3 unterexprimiert**.

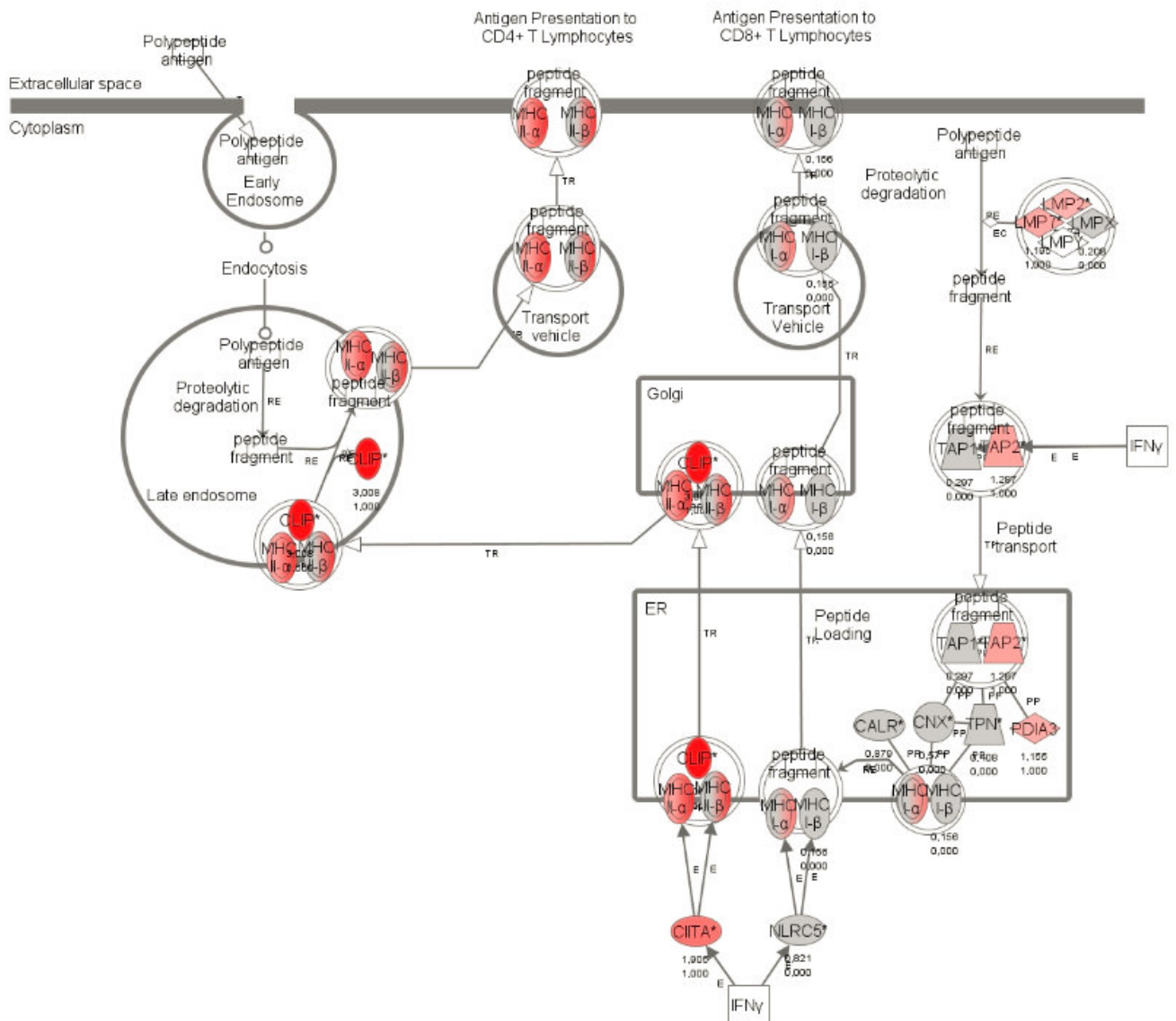
Das inhibitorische Molekül GSK wird durch die PI3K/Akt Signalkaskade kontrolliert. Im aktivierten Zustand der Zelle wird diese Kaskade über das koregulatorische Molekül CD28 eingeleitet.

Überexprimiert sind die humanen Neutrophilenrezeptoren FCGR3B (CD16B), FCGR2A (CD32A) (156), FCGR3A und FCGR2C (157), sowie der Mastzellrezeptor FCER1 (158).

2.1.2 Signalweg „Antigen Presentation Pathway“

In diesem Signalweg sind in der Gesamtzahl 43 Moleküle involviert, davon 18 Moleküle des Datensatzes, die allesamt überexprimiert sind. Vor allem die MHC II Antwort ist mit 8 überexprimierten Molekülen (HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DRB1) im Vergleich zu 3 Molekülen (HLA-B, HLA-C, HLA-F) bei der MHC I Antwort, stark vertreten (s. Abb. 43).

Antigen Presentation Pathway



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 43: Signalweg der Antigenpräsentation.

Um die erworbene und angeborene Immunität zu entwickeln benötigt der Organismus den Kontakt mit Antigenen. Diese sind intrazelluläre oder extrazelluläre Proteine, die in der Zelle prozessiert und über MHC Molekülen den T-Zellen (CD8+ oder CD4+ T-Zellen) präsentiert werden. Intrazelluläre Proteine (endogene) wie beispielsweise virale Proteine werden über MHC I den CD8+ T-Zellen präsentiert. Extrazelluläre Proteine (exogene) sind z.B. Bakterien, die den CD4+ T-Zellen präsentiert werden.

Quelle: (Ingenuity Pathway Report, www.ingenuity.com)

2.1.3 Signalweg „Leukocyte Extravasation Signaling“

Von einer Gesamtzahl von 199 Molekülen nehmen 53 Moleküle des Datensatzes an diesem Signalweg teil. Davon sind 36 Moleküle überexprimiert und 17 unterexprimiert. Moleküle, die am Andocken, Leukozyten-Rollen und Transmigrieren durch die Endothelzelle beteiligt sind, wie beispielsweise (ITGAL; ITGA4, ITGAM, CXCR4, PSGL-1 und CD44) sind überexprimiert. Kontaktgene zwischen den Endothelzellen, wie CAM und CDH5 sind unterexprimiert (s. Abb. 44).

Abb. 44: Leukozytenmigrations-Signalweg.

Während eines Entzündungsprozesses wandern Leukozyten aus dem Blut ins entzündete Gewebeareal aus. Dieser Prozess läuft in 3 Schritten ab:

1. Einfangen und Rollen der Leukozyten: Leukozyten werden von Selektinen (P/E-Selectin), welches sich auf aktiviertem Endothel befindet, aus dem Blutstrom eingefangen. Anschließend rollen sie an der Blutgefäßwand entlang.
2. Rollen und feste Adhesion: Makrophagen und Endothelzellen sezernieren Chemokine, die Leukozyten aktivieren und dafür sorgen, dass die Leukozyten-Integrin-Bindung stärker wird.
3. Invasion: Unter Zuhilfenahme von Pseudopodien migrieren Leukozyten durch die Endothelzellen hindurch in das entzündete Gebiet.

Quelle: (Ingenuity Pathway Report, www.ingenuity.com)

2.1.4 Signalweg „Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses“

Bei einer Gesamtzahl von 89 Molekülen sind 27 Moleküle des Datensatzes am Signalweg beteiligt. Letztere sind allesamt hochreguliert. Es finden sich 6 membrangebundene PRRs, die Toll-like Rezeptoren (TLR) 1, 2, 3, 5, 7 und 8 (TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR7 und TLR8). Zudem sind Bestandteile des Komplementsystems, wie C3, C1QA, C1QB, C1QC und der Rezeptor C3AR1 darin enthalten. Auch ein Pentraxin, PTX3, ist im überexprimierten Zustand vorhanden (s. Abb. 45).

Abb. 45: Die Rolle der Pattern Recognition Receptors (PRRs) bei der Erkennung von Bakterien und Viren.

Pattern Recognition Receptors (PRRs) sind Rezeptoren, die mikrobielle Strukturen oder Pathogen-assoziierte Moleküle erkennen und eine Zellantwort auslösen. Wir unterscheiden 3 Formen:

1. Membrangebundene PRRs: Toll-like Rezeptoren (TLR) sind membrangebundene Rezeptoren, die durch Interaktion mit anderen Molekülen als Antwort auf einen Pathogenkontakt, die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine induziert.
2. Extrazelluläre PRRs: Komplementproteine, Pentraxine und Kollektine, werden viral oder bakteriell getriggert und vermitteln eine Opsonisierung, Phagozytose oder Apoptose der Zelle.
3. Zytoplasmatische PRRs: NOD, NALPs und PKRs, induzieren die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.

Quelle: (Ingenuity Pathway Report, www.ingenuity.com)

2.1.5 Signalweg „CD28 Signaling in T Helper Cells“

In diesem Signalweg sind insgesamt 135 Gene involviert, davon sind 35 Gene aus dem Datensatz. Von letzteren sind 30 Gene überexprimiert und 5 unterexprimiert (s. Abb 46).

Zu den letzteren zählen CALM3, **NFATC1 (NFAT2)**, **NFATC4 (NFAT3)**, PPP3CB und PTPN11. Die NFAT Moleküle sind auch hier am Signalweg beteiligt. **NFATC2** ist jedoch im Vergleich zu NFATC1 und NFATC4 überexprimiert. Außerdem finden sich auch die MHC II Moleküle (HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DRB1) wieder. Zwei weitere Moleküle der NFAT Signalkaskade nämlich das Enzym PIK3, hier die Form PIK3CG und der IP3 Rezeptor (ITPR1) sind überexprimiert.

CD28 Signaling in T Helper Cells

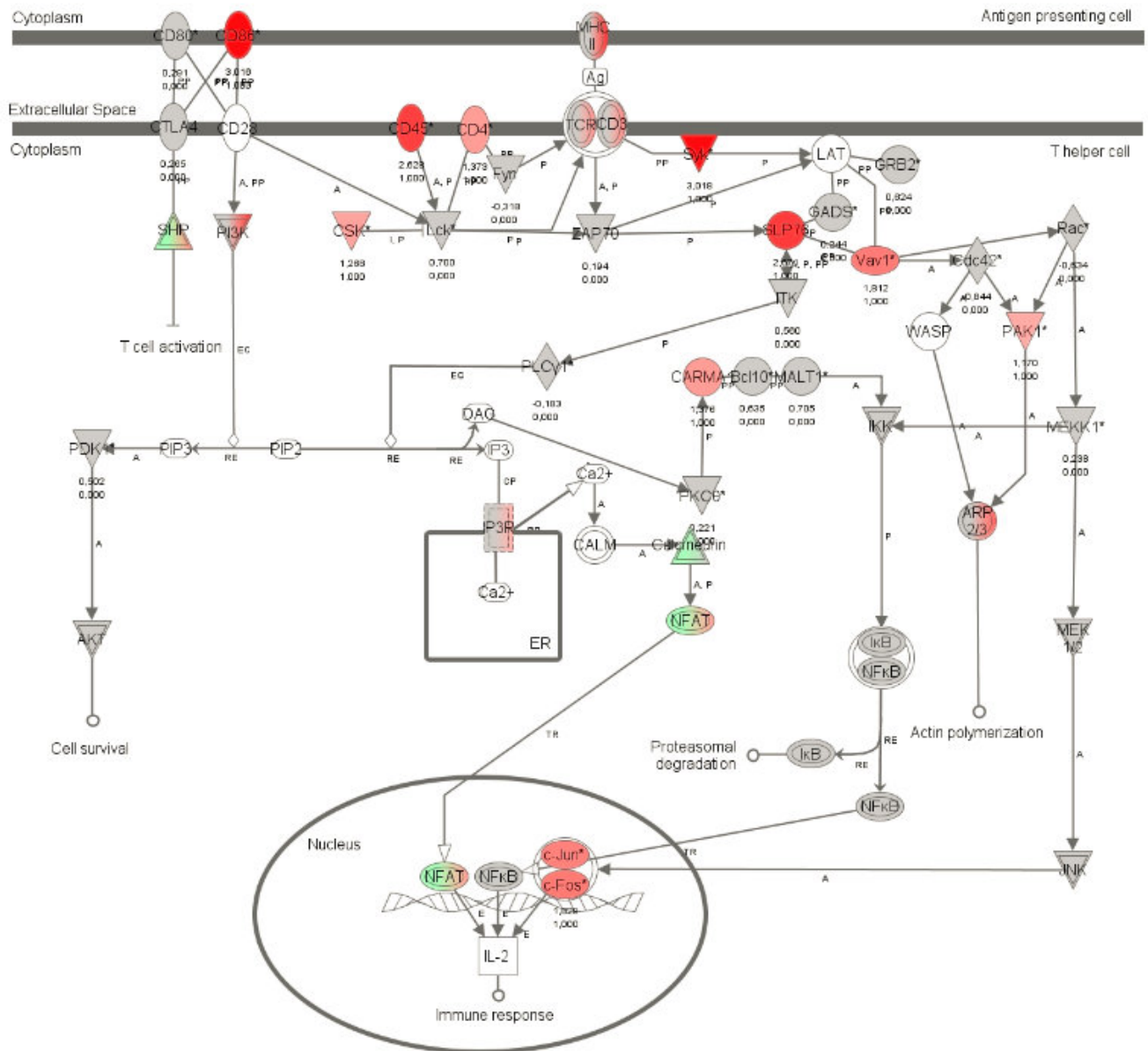


Abb. 46: CD28 Signalweg in T Helferzellen.

CD28 ist ein Korezeptor des TCR/CD3 Komplexes. Er wird vor allem für die T-Zellaktivierung benötigt. Auch die Prägung von naiven T-Zellen in lymphoidem Gewebe wird durch CD28 und seine Partnermoleküle CD80 und CD86 gesteuert. Weiter fördert CD28 die IL-2 mRNA Produktion, die T Helferzellendifferenzierung, den Immunglobulin-Isotypen-Wechsel, das T-Zell-Überleben und den Eintritt in den Zellzyklus. Dabei nimmt die NFAT Familie wieder eine zentrale Rolle ein. Über die Aktivierung von CD28 wird eine

Signalkaskade eingeleitet, die über PI3K, den IP3 Rezeptor, Calcium und die NFAT Moleküle die Expression von IL-2 steuert.

Quelle: (Ingenuity Pathway Analysis, www.ingenuity.com)

2.1.6 Signalweg „Cytotoxic T-Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells“

Insgesamt wird dieser Signalweg aus 87 Molekülen gebildet. 18 Moleküle sind aus dem Datensatz (s. Abb. 47). Vier Moleküle waren überexprimiert (Fas, FADD, Caspase 8 und BID) und 8 Moleküle waren weder über- noch unterexprimiert (APAF1, BCL-2, CAD, Caspase 9, CytoC, GranzymeB, ICAD und Perforin).

Die Komplexe TCR-CD3 und MHC I/II (MHC) waren im Signalweg überexprimiert dargestellt, jedoch basierten sie in der Molekülliste des Signalwegs keinen über- oder unterexprimierten Expressionsgrad. Ebenso die restlichen Moleküle.

Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells

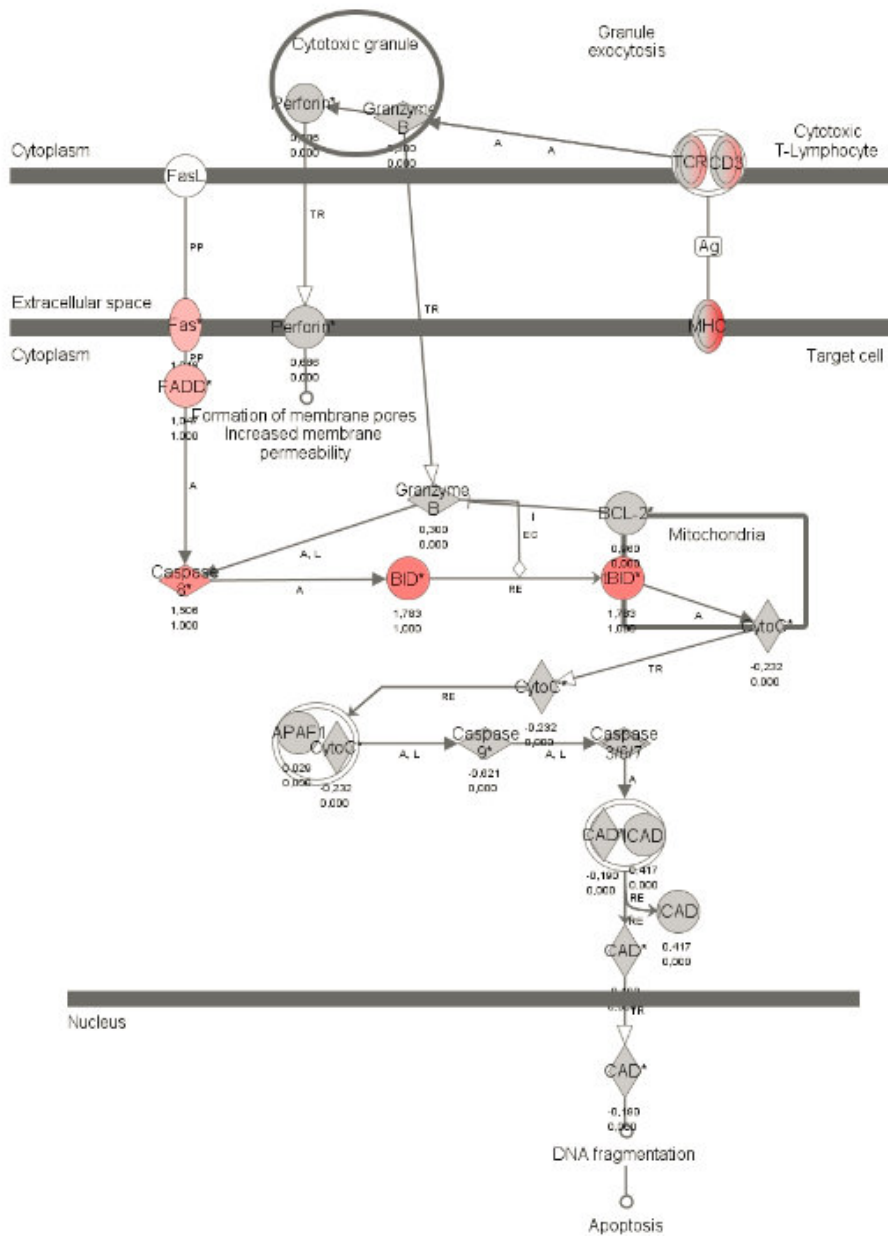


Abb. 47: Zytotoxische T-Lymphozyten-vermittelte Apoptose von Zielzellen. Zytotoxische T-Lymphozyten (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) werden auch T-Killerzellen genannt. Diese sind wichtig für die Erkennung von fremden Epitopen auf virusinfizierten Zellen, Zellen mit intrazellulären Bakterien und Krebszellen. Mit Hilfe zahlreicher anderer Moleküle, wie beispielsweise der Caspase 8, werden diese Zellen über den programmierten Zelltod, die Apoptose, eliminiert.

CTL sprechen nur auf Antigene an, die ihnen über MHC I Moleküle präsentiert werden. Quelle: (Ingenuity Pathway Report, www.ingenuity.com)

2.2 Netzwerkanalysen

Insgesamt erzeugte Ingenuity 25 Netzwerke mit einem Score von 24 - 37 und einer Focus Molecules Anzahl von 27 - 34. Der „Network Score“ ist ein statistisches Mittel, basierend auf einem p-Wert, der das Ergebnis des negativen Exponenten des exakten Fisher-Test (right-tailed) darstellt (www.ingenuity.com). Je größer der Score ist, desto kleiner wird der p-Wert und desto höher ist die Signifikanz. Focus Molecules geben die Anzahl der Moleküle des Datensatzes an, die an einem Netzwerk teilnehmen (www.ingenuity.com). Maximal können 35 Moleküle an einem Netzwerk teilnehmen. Summa summarum beteiligten sich 746 Moleküle an den Netzwerken.

Es gab keine Überschneidungen zwischen den Netzwerken, die Netzwerk-moleküle waren jeweils nur an einem Netzwerk beteiligt.

Die Netzwerke wurden in verschiedene Kategorien eingeteilt (s. Tab. 11). Die Kategorie „*Genetic Disorder*“ führte mit 6 involvierten Netzwerken die Liste an, dicht gefolgt von der Kategorie „*Cell to Cell Signaling and Interaction*“ mit 5 Netzwerken. Im Bereich der Genetik war neben der führenden, die Kategorie „*Gene Expression*“ (Netzwerk Nr. 20) vertreten. Hinsichtlich Prozesse, die vor allem bei Tumoren aufzufinden sind, sind die Kategorien „*Cell Death*“ (Netzwerk Nr. 7 und Nr. 24), „*Cancer*“ (Netzwerk Nr. 10 und Nr. 13) und „*Cellular Growth and Proliferation*“ (Netzwerk Nr. 15) anzuführen. Auf Ebene des Immunsystems sind die Kategorien „*Immune Cell Trafficking*“ (Netzwerk Nr. 14) und „*Cell mediated Immune Response*“ (Netzwerk Nr. 20) hervorzuheben. Zell-Zell-Interaktionen spiegeln sich vor allem in den Kategorien „*Cell to Cell Signaling and Interaction*“ (Netzwerk Nr. 2, 11, 14, 15 und 17), „*Cellular Movement*“ (Netzwerk Nr. 1 und 22), „*Cell Signaling*“ (Netzwerk Nr. 8 und 9) und „*Molecular Transport*“ (Netzwerke Nr. 8, 9 und 12) wieder.

Tab.: 11: Übersicht zu den Netzwerken, mit einem IPA generierten p-Wert von $\leq 0,05$. Fett unterlegte Gene sind überexprimiert und kursive Gene sind Moleküle, die nicht im Datensatz vertreten sind, von IPA hinzugefügt worden sind, da sie wichtige Interaktionen eingehen. Alle anderen Gene sind unterexprimiert. Die Top Funktionen zeigen Kategorien an, an denen sich die Netzwerke beteiligen. Die Beschreibungen des Netzwerk-Scores und der „Focus Molecules“ finden sich im Haupttext wieder. Quelle: generiert und modifiziert aus der Ingenuity Pathway Analysis Software (www. Ingenuity.com).

ID	Moleküle	Score	Focus Molecules	Top Funktionen
1	ADCYAP1R1,APLNR, BAI2 , CCRL2 , CXCR6 (includes EG:10663), CYSLTR1 , FPR3 ,FZD10, <i>Gpcr</i> ,GPR4, GPR34 , GPR65 , GPR82 , GPR83 , GP R120 ,GPR133,GPR146, GPR155 , GPR160 , GPR176 , GPR183 ,GPRC5A,GPRC5B,GP RC5C,HRH1,LGR5, LPAR2 , LPAR5 , LPAR6 , NPY1R , OPRL1 , P2RY12 , P2RY13 , PTAF R ,PTGDR	37	34	Cellular Movement, Behavior, Digestive System Development and Function
2	ABI1 , ASAH1 , CCDC90B , CDC14B , CENPF ,CREB3L2, FAM176A , FAM83H , FMNL1 , F RMD6 , GAS7 , GBP2 , KANK1 ,LAMA3,LAMA4, LAMC1 , MAN2A1 , MIR124 , NCKAP1L , N EK6 , PTTG1IP , QSER1 , RDH10 , RGS1 , SAT1 ,SLC16A1,SPAG5, SUCLG2 , SURF4 , TM BIM1 , TNFRSF21 ,TSC22D1,TSC22D4,TSKU,UCK2	37	34	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Connective Tissue Development and Function, Reproductive System Development and Function
3	ALDH1A1 , ANP32A , CHPF2 (includes EG:54480), CITED2 , DKK3 , FKBP9 ,ITM2A,LMO3, LYPD1 ,MAP4,MPZL2,MSRB3 (includes EG:253827),MYCN, NMI ,NMNAT2,PHGDH,RORA,RPL37,RPL37A (includes EG:6168),RPS28,SEPT3,SEPT4, SEPT6 ,SEPT8, <i>Septin</i> ,SETBP1, ST3GAL6 , ST6GA L1 , STAT5a/b ,TGM2,TM6SF1,VSNL1, ZFAND5 ,ZHX2, ZNF217	35	33	Post-Translational Modification, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry
4	AOX1,ARNT2, BST1 , CAPRIN1 , CD52 , COL12A1 ,CPXM2,GLDC,GLUL, HLA-B ,ITIH3, MHC I-α , MR1 , MYCL1 ,NAALAD2,NDUFS1, NDUFS2 ,NXN,PFKP, PLEKHF2 (includes EG:79666),PTP4A3,RANGAP1, RGS10 ,RTN1,RTN4, SERPINA1 , SERPINA5 , SNN ,S RPX,SSR1, <i>thioredoxin-disulfide reductase</i> ,TKT, TXNRD2 ,TXNRD3,ZNRF1	35	33	Genetic Disorder, Metabolic Disease, Infectious Disease
5	CDC25B, DLK1 ,ELN,Estrogen Receptor,EYA2,FBLN1,FBLN5,FXDYD6, GAA ,GAL,GAS1, GLB1 ,HES1, HES6 ,HEY2,I D1,JAG1, MAML1 ,MFAP5, NFIB ,NID1,NOTCH2,NOTCH3, <i>Notch</i> , NOV , <i>Nuclear factor 1</i> , OXR , PTPRF , SDC3 ,SIX1,TAGLN, THBS2 , TLE1 ,TLE2, TRIO	33	32	Organ Development, Genetic Disorder, Developmental Disorder

6	<i>Ampa Receptor</i> , ANPEP, ASCC3 , ATP1A1, CDCP1 , CHL1 , CSTA , <i>Dishevelled</i> , FCGBP (includes EG:8857), FLNB, FOLH1, FRAT1 , FXYD7, <i>glutathione transferase</i> , GSTM3 (includes EG:2947), GSTZ1 (includes EG:2954) , HLF (includes EG:3131), HPGDS , JUN , LTBP1, LTC4S , MGST1, NBPF1 , OTUD1 , PENK , PKIB , PLEKH01 , <i>prostaglandin-D synthase</i> , PTGDS, PTGES, ROR2 , ST14 , WNT5A , ZAK , ZNF33A	31	31	Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Drug Metabolism
7	<i>3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase</i> , ALOX5 , CALCA, CCDC88B , COTL1 , <i>Creb</i> , DDX28 , DHCR7, DISC1 , FABP7, <i>Gsk3</i> , HOXB2, KIF3C, LDLR, MEIS1, PBX2 , PCBP3, <i>Pde</i> , PDE1A, PDE3B , PDE4A , PDE5A , PDE6B , PDE7B, PKNOX1, PLAT , PLAU , PSIP1, RAMP1, RPS6KC1 , SLC31A2 , TAC1, TANC1 , TNIK, TYMS	29	31	Cardiovascular Disease, Cell Death, Gastrointestinal Disease
8	ABI3 , APBB1IP , ARHGEF2, CHGB, DOCK2 , ENAH, EPB41L1, ERLIN2 , EVL , FKBP1A , FYB , GLRB , HCK , HMGCR, HOMER1, HOMER3 , <i>Homer</i> , ITPR1 , ITPR , KAL1 , NFATC1, PIK3CG , <i>PP1 protein complex group</i> , <i>Profilin</i> , RAP1A , RYR1 , RYR3, Ryr, SDC2, SEMA6D , SGK223 , SH3BP1 , SKAP2 , S TARD13 , WIPF1	29	30	Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism
9	ANK3 , <i>Beta Arrestin</i> , CACNA1A, CNTN1 , CPLX1, CPLX2, DNER, DUSP6 , <i>ENaC</i> , ERK1/2 , FGF1, FGF BP2, NAPB, NFASC, PTPRZ1 , S100A13, SCN1B , SCN2A , SCN2B, SCN3B, SCN4B, SEP T5, SNAP25, <i>Snare</i> , SPTBN4, STX3 , STX1A, STXBP6, SV2B, <i>Syntaxin</i> , SYT1, SYT2, TRI B1 , VAMP1, VAMP8	29	30	Cell Signaling, Cellular Function and Maintenance, Molecular Transport
10	ANXA3 , BCR, <i>Beta Tubulin</i> , C10ORF10 , CADM1 , CADM3, <i>Casein</i> , <i>Cytokeratin</i> , DES, DSP, EPB41L2 , EPB41L3 , IGSF21 , KRT14, KRT18, KRT19, LRRK1 , MAD2L1BP , MOBKL1B , NBL1, PGM1 , <i>Pik3r</i> , PRMT2 , PRMT6 , ROBO1, <i>S100</i> , S100A1, S100A8, S100P, SLIT1, TCF7 , TM4SF1, TUBA4A, TUBB3, TUBB4	29	30	Cancer, Reproductive System Disease, Cardiovascular Disease
11	<i>Actin</i> , <i>Alpha Actinin</i> , BOC, <i>Cadherin</i> , <i>Cadherin (E, N, P, VE)</i> , CDH2 , CDH3, CDH7, CDH11, CDH19 , CDH4 (includes EG:1002) , CLIC5, CTNND2, DDX11, DSC2 , DSG2, ERMAP , GBP7 , HAVCR2 , HES4, JUP, KIF5C, LGALS9 , MAGOH , MYO16 , NELF, NEO1, NRXN1 , OASL , PARVG , PDZD2 , RBM8A, <i>RGMA</i> , <i>RNA polymerase II</i> , RPRM	29	30	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Tissue Development, Cardiovascular Disease
12	ABCC3 , APOC1 , APOE , BCAT2, CALU , CELF2 , CPT1A, CRABP1, CRABP2, CTH, FOS , MGAT4A , MT3, MT1A, NCOA4 , NR1H3, NR5A2, PALLD , PCYT2, PRRX1, <i>Rar</i> , RBP4 , <i>RbP7</i> , <i>Rbp</i> , RDH5, RRP12, <i>Rxr</i> , SELENBP1 , SERPINE2 , STRA6, SWI-SNF, THR3, <i>Thyroid hormone receptor</i> , TTR, VLDLR	29	30	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry

13	AKR1C2, ALOX5AP , ANTXR2 ,APOL1, CEBPA , COL4A3 , COL4A4 (includes EG:1286), <i>Collagen type IV</i> , CREG1 ,DGAT2,EPHX1, GLIPR1 , GLRX ,HBA1,HBB (includes EG:3043), <i>Hemoglobin</i> ,HP,HSD11B1, <i>Integrin alpha V beta 3</i> , ITGAV , KCNMB1 , KCNMB4 ,KLK6,KLK7, LST1 , MMP19 , MNDA ,NFIL3, PRSS35 ,SERPING1, SPINT2 , TBXAS1 , <i>Tenascin</i> ,TNXB, <i>Trypsin</i>	29	30	Cancer, Reproductive System Disease, Genetic Disorder
14	ADCYAP1, ADD1 , CCL3 , CCL4 , CCL5 ,CCL19,CCL26 (includes EG:10344), CCL3L1 , CCL4L1 , CCR1 , CCR2 , <i>Ccr</i> , <i>CD3</i> , CD4 , CD44 , CD68 , CD3D , CD8A , <i>CHEMOKINE</i> , <i>CHEMOKINE RECEPTOR</i> , COL14A1 ,CPAMD8 (includes EG:27151),CX3CL1,CXCL1, CXCL12 , CXCL14 , CXCL16 , CXCR4 ,DARC,DPP4,FOXC1,FOXC2,Laminin1,TBX1, XCL2	28	30	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking
15	<i>Ant</i> ,AQP3, ARHGAP4 ,ARHGAP8, ARHGAP9 , ARHGAP12 ,CAV1,CAV2, DIRAS3 ,DLC1, EDNRB ,FNBP1,GJB1,GJB2, HPSE , <i>IL-1R</i> , MERTK , <i>Pkc(s)</i> , PKN2 ,PRKCA, PROS1 , <i>Ras</i> , <i>Ras homolog</i> , RDX ,RGNEF, <i>RhoGap</i> , RHOH , RHOJ ,RHO, RND3 , SCP2 ,SLC25A10,TENC1,TFPI, TNS3	27	29	Cellular Assembly and Organization, Cellular Growth and Proliferation, Cell-To-Cell Signaling and Interaction
16	Alp,ALPL, APOBEC3G ,ARHGAP29,C4A,CR1, EIF4A2 , <i>EIF4A</i> , <i>Eif4g</i> ,ELAVL4, EPB41L4B , HAND2 ,HEYL,HIPK3, <i>inositol-trisphosphate 3-kinase</i> ,IP6K2, IP6K3 ,ITPKB, KCNJ2 , LAPTM5 ,LRRC8A, <i>MIR1</i> , MMD , MXD4 , NAT1 , <i>Nos</i> , PDCD4 , RBM47 , RUNX2 , SH3PXD2B ,SNTA1,SSTR2,TNFRSF11B,TWIST1, WWP1	27	29	Skeletal and Muscular Disorders, Connective Tissue Development and Function, Skeletal and Muscular System Development and Function
17	Alpha catenin, CASK , CD69 ,CDH5, CDH6 ,CLDN1,CLDN5,CLDN11,CLDN19,CLDN20, <i>cldn</i> ,EFNA1,EFNA5,EFNB1,EFNB2, EPHA3 , <i>EPHA</i> , GJC1 ,Guk,INADL,JAM2, <i>JAM</i> , <i>KIR</i> , KIRREL3 ,LMO7,MEOX2,NGEF,NRXN2, PTX3 ,S1PR1, SFRP1 ,TJP1,TJP2,TSPYL2, ZEB2	27	29	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Assembly and Organization, Tissue Development
18	BCL3,CARS,CNTF,DDX25,DUSP26,FABP3, <i>FABP</i> ,GLI2,HSF4, IL18 ,IL17B,IL17RB, IL6ST ,LIF, MEF2C ,NR4A2, PARP8 , PARP14 , <i>PARP</i> , PDK4 ,PIR, <i>PP1-C</i> ,PPP1R1A, <i>Pro-inflammatory Cytokine</i> , REL , SALL1 ,SCG2,SPOCK1,TCEAL5, <i>TH1 Cytokine</i> , TNF ,TWIST2, <i>tyrosine kinase</i> ,UACA,ZIC2	27	29	Cellular Development, Nervous System Development and Function, Tissue Development
19	ARHGEF3 ,ARHGEF4,ARHGEF10,ARHGEF16, CNR1 , CYTIP ,DBN1, DUSP10 ,Erm,ETV4,FGF13,Gef,GPRASP1, HCLS1 , <i>JIP1/2/3</i> , <i>Jnk</i> , <i>LRP</i> , MAP4K1 ,MAPK8IP1,MAPK8IP2, MSN , NFAM1 , <i>P38</i> <i>MAPK</i> , PAG1 ,PAX3, PIK3AP1 , PRSS23 , RGS19 , <i>Rsk</i> , SELPLG , SH3RF1 ,STMN2, SYK ,TBX15,TBX18	25	28	Connective Tissue Development and Function, Skeletal and Muscular System Development and Function, Tissue Development

20	ALAS2,ETV6 , <i>Glucose Transporter</i> , <i>Hdac</i> , HDAC9 (includes EG:9734), <i>HLA-B27</i> , IDO1,IL10RA,LILRA1,MHC Class I (complex),N-cor,ODF3B,OLR1,P4HB,PDIA3,phosphorylase,PSMB8,PSMB9,PYGL,RUNX1T1,SAP30,SLC2A1,SLC2A3,SLC2A5,SOAT1,STAT1,TAP2, Tap,TRIM22,TSHZ3,TYMP,USP18,WARS,ZNF467,ZNF652	25	28	Gene Expression, Cell-mediated Immune Response, Cellular Development
21	ADAMTS1,CCDC71,COL11A1,COL16A1,COL20A1,COL3A1,COL5A1,COL5A2,colagen,FOXD1,HEXIM1,HIF3A,Histone h3,HYOU1,Importin alpha,Importin beta,KIAA1199,LARP1B (includes EG:55132), MAGED2,MATN2,MT1G,Neuropilin,NPTX1,NRP2,PGF,PLXNA2,Sema3,SEMA3A,SEMA3C,SEMA3D,SPARC,THBS4,Vegf,VEGFA,WWC1	24	28	Connective Tissue Disorders, Genetic Disorder, Cardiovascular System Development and Function
22	<i>Adaptor protein 1,Adaptor protein 2,AP-3,AP1B1,AP1S1,Ap2 alpha,ARRHGAP21,ARRHGEF6,ARRB2,Beta adaptin,BSN,BST2,CACNB4,CD1D,Clathrin,CLTA,CLTB,CLTCL1,DAB2,DNM1,Dynamin,Endophilin,L1CAM,LRRN3,MYO1E,NCALD,NUMB,PICALM,PLCE1,REPS2,S100A9,SH3GL2,SHANK2,SNAP91,SYP</i>	24	27	Cellular Function and Maintenance, Cellular Assembly and Organization, Cellular Movement
23	ADORA3,CYBA , <i>Cyba-Ncf1c-Ncf2-Nox-Ncf4</i> , CYBB,DEF6,GATA2 , <i>Gi-coupled receptor,HHEX,LATS2,LYL1,MLLT4,NCF1,NCF2,NCF4,Par6,Phox,RAC2,Raf,Rap1,Rap1-gp91-p22 phox-p40 phox-p47 phox-p67 phox,RAPGEF3,RASGRP1,RASSF4,RIN2,RIT1,RNASE1,RNASE2,RNASE6,RNase A,RRAS2,SIPA1,SORBS2,STK4,TRIM9,ZFPM2</i>	24	27	Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Genetic Disorder
24	Akt,CD300A,CD33 (includes EG:945), DUSP4,ERK,GABBR2,Hsp27,KIT,KLRC1,LAIR1,LILRB4,MAP3K8,MAPK4,Mapk,MAPKAPK3,MSR1,PILRA,PLAC8, Ppp2c,PTPN6,PTPN11,PTPRO,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,RPS6KA,SCARA3,SCARA5,SCAVENGER RECEPTOR CLASS A,SHP,SIGLEC7,SIGLEC14,SMG7,TREM2,TYROBP	24	27	Cell Death, Genetic Disorder, Neurological Disease
25	ACAT2 , <i>alcohol group acceptor phosphotransferase,Alpha tubulin,ANXA5,BCL6,BCR,BLNK,CCNA1,CDK18,CMTM3,Cofilin,CORO1A,ERP29,FAM101A,Fcer,FDFT1,Filamin,GAD,GANAB,KCTD12,MCC,NEDD4,NEDD4L,PAK1,PAK3,Pak,PRKCD,PRKCH,RASAL2,RASGRP3,RIPK4,SGK1,SSH2,TESK2,TMX1</i>	24	27	Cellular Assembly and Organization, Amino Acid Metabolism, Post-Translational Modification

2.3 Kandidatengenanalyse

Eine weitere Betrachtung galt den Top 10 über- und unterexprimierten Genen. Der Fold Change der Top 10 überexprimierten Gene lag im Bereich von 19,92 - 32,27 (s. Tab. 12) bei den unterexprimierten zwischen -31,02 und -103,71 (s. Tab 13). Mit Hilfe der Genübersicht (GeneView) aus der Ingenuity Software (www.ingenuity.com) wurden die Daten aus der Tabelle 12 und 13 erstellt.

Unter den Top 10 überregulierten Genen waren 4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (P2RY13, GPR34, GPR83, CX3CR1) unter denen sich mit CX3CR1 ein Chemokinrezeptor befand, 2 Chemokinliganden (CCL4, CCL3), 1 Transkriptionsfaktor (HAND2), 2 Enzyme (die Monooxygenase MOXD1 und die Peptidase ADAM23) und 1 transmembranärer Rezeptor (SFRP1) (s. Tab. 12).

Die Genübersicht ermöglichte es überdies einen Überblick zu erhalten in welchen Zellen und Geweben die Gene vorkommen. Der Fokus dieser Analyse lag auf Zellen und Geweben des Immunsystems. Die Gene P2RY13, CCL3, CCL4, ADAM23 und SFRP1 waren in Geweben, wie dem Knochenmark, den Lymphknoten, dem Blut und dem Thymus als immunologische Gewebe exprimiert. Zudem waren sie in Zellen der natürlichen (natürliche Killerzelle, Neutrophile und Eosinophile Granulozyten, Dendritische Zellen, Makrophagen ect.) und angeborenen Abwehr (T-Zellformen, B-Zellen, tumorinfiltrierende Lymphozyten) exprimiert. Die Zell- und Gewebeexpressionen werden in der Tabelle nicht aufgeführt.

Auch bei den unterexprimierten war das Molekül PRPH in Schwannomzelllinien vorhanden und das Molekül SLP in Monozyten. Das Gen CALCA war positiv in Geweben und Zelllinien von infektiösem und inflammatorischen Ursprung exprimiert. Alle weiteren Moleküle waren nicht mit immunologischen Prozessen assoziiert.

Tab. 12: Top 10 überexprimierte Gene.
Die Identifikationsnummer (ID-Nummer) entspricht der Affymetrix Nummer.

ID-Nummer	Gensymbol	Entrez Gene Name	Beschreibung	Fold Change
11731728_at	P2RY13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13	G-protein coupled receptor	32.27
11751273_a_at; 11726375_x_at	GPR34	G protein-coupled receptor 34	G-protein coupled receptor	31.74
11729290_a_at	HAND2	heart and neural crest derivatives expressed 2	Transcription factor	27.24
11746954_s_at; 11718982_s_at	CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	Cytokine	26.85
11720994_x_at	CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	Cytokine	26.04
11731825_at	GPR83	G protein-coupled receptor 83	G-protein coupled receptor	23.86
11719601_a_at	MOXD1	monooxygenase, DBH-like 1	Enzyme	23.39
11736770_a_at	ADAM23	ADAM metalloproteinase domain 23	Peptidase	21.65
11723247_a_at; 11723245_a_at	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	Transmembrane receptor	20.55
11723048_at	CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	G-protein coupled receptor	19.92

Tab. 13: Top 10 unterexprimierte Gene.

ID-Nummer	Gensymbol	Entrez Gene Name	Beschreibung	Fold Change
11717825_a_at; 11717826_x_at; 11751844_a_at; 11758790_a_at	STMN2	stathmin-like 2	Protein binding	- 103.71
11722051_at	PRPH	peripherin	Protein binding	- 71.48
11730415_s_at	CALCA	calcitonin-related polypeptide alpha	Peptide	- 69.18
11719268_at	TNNC1	troponin C type 1 (slow)	calcium ion binding, carboxy terminal domain, EF-Hand, inhibitory domain, protein homodimerization, regulatory domain	- 57.08
11746898_x_at; 11722995_at; 11746322_x_at; 11747167_x_at	ADH1B	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	Enzyme	- 50.58
11716033_at	SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	Protease inhibitor	- 47.24
11721844_a_at	MFAP5	microfibrillar associated protein 5	carboxy terminal domain, extracellular matrix constituent conferring elasticity, extracellular matrix structural constituent	- 38.33
11727459_x_at	KRT14	keratin 14	Protein binding	- 31.38
11725749_a_at	GAL	galanin prepropeptide	G-protein-coupled receptor binding	- 31.38
11733727_s_at	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa	carboxy terminal domain, coiled-coil domain, myosin binding, palmitoylation site, protein binding, protein N-terminus binding, SNAP receptor, SNARE binding, syntaxin-1 binding, transporter, t-SNARE domain, voltage-gated potassium channel	- 31.02

2.4 Biologische Funktionen

Diese Funktion aus Ingenuity stellt ein sehr gutes Mittel dar, die Gene nach dem Vorbild des Gene Ontology Projekts (www.geneontology.org) zu gruppieren. Es gibt wie schon erwähnt 3 Gruppen, wie die Gruppe der Krankheiten und Gesundheitsstörungen, der molekularen und zellulären Funktionen und die Gruppe über die Entwicklung und Funktion des physiologischen Systems.

Ingenuity generiert für die Biologischen Funktionen automatisch einen p-Wert von 0,05; erstellt eine Übersicht zu den signifikantesten Funktionen und gruppiert sie in die 3 Kategorien wie oben beschrieben (s. Abb. 48).

Die einzelnen Blöcke der IPA Kategorien wurden weiter in Gruppierungen eingeteilt, die sich auf das Immunsystem, Entzündungsprozesse, tumorbezogene und zelluläre Prozesse beziehen.

In dieser Studie beinhaltet die erste Gruppe Prozesse und Funktionen, die sich vorwiegend in Tumoren abspielen, wie beispielsweise *Cancer*, *Cellular Growth and Proliferation*, *Tumor Morphology* und *Cell Death*.

Die zweite Gruppe enthält Gene, die in Prozessen des Immunsystems und in Entzündungsprozessen involviert sind, wie *Inflammatory Response*, *Inflammatory Disease*, *Immunological Disease*, *Cell-mediated Immune Response*, *Antigen Presentation*, *Humoral Immune Response*, *Hypersensitivity Response*, *Infectious Disease*, *Lymphoid Tissue Structure and Development*, *Infection Mechanism* und *Immune Cell Trafficking*.

In der 3. Gruppe werden Zell-Zell-Interaktionen hervorgehoben. Hierbei spielen das *Cellular Movement* und die *Cell-To-Cell Signaling and Interaction*, *Cell Signaling* und *Molecular Transport* eine große Rolle.

In eine Untergruppe des Immunsystems konnten die Komponenten *Hematological System Development and Function*, *Hematopoiesis* und *Hematological Disease* zugeordnet werden.

Eine andere Betrachtungsweise gilt dem Signifikanzniveau. Hier werden diejenigen Kategorien vorwiegend betrachtet, die den niedrigsten p-Wert besitzen und die meisten Moleküle enthalten. Dabei waren in der Gruppe der „Krankheiten und Gesundheitsstörungen“ die Neurologischen Krankheiten

führend. Bezogen auf die „molekularen und zellulären Funktionen“ stand die zelluläre Bewegung an erster Stelle. Hingegen in der Gruppe der „Entwicklung und Funktion des physiologischen Systems“ war die Gewebeentwicklung rangiertere Kategorie.

Abb. 48: IPA Überblick über die Biologischen Funktionen und ihre Unterteilung in einzelne Kategorien.

Summary of Analysis - spo - con

Top Bio Functions

Diseases and Disorders

Name	p-value	# Molecules
Neurological Disease	8,51E-34 - 9,74E-07	925
Genetic Disorder	1,63E-32 - 1,13E-06	1397
Cancer	5,22E-31 - 3,20E-06	798
Inflammatory Response	1,10E-30 - 3,49E-06	432
Inflammatory Disease	1,05E-26 - 3,34E-07	714

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	1,58E-30 - 2,90E-06	484
Cellular Growth and Proliferation	2,20E-30 - 1,71E-06	679
Cell Death	7,42E-25 - 2,12E-06	653
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	7,46E-25 - 3,33E-06	460
Cellular Development	1,25E-22 - 1,71E-06	603

Physiological System Development and Function

Name	p-value	# Molecules
Tissue Development	7,46E-25 - 3,10E-06	452
Hematological System Development and Function	8,59E-22 - 2,90E-06	484
Immune Cell Trafficking	8,59E-22 - 2,90E-06	296
Hematopoiesis	7,79E-20 - 1,81E-06	282
Tissue Morphology	7,67E-18 - 2,99E-06	288

F Diskussion

Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist die Pathogenese und Ätiologie der sporadischen Vestibularisschwannome noch ungesichert. Es gibt Hinweise in Studien, dass die genetische Komponente und die molekularen Mechanismen ätiologisch eine Rolle spielen. Hierzu sind cDNA Microarray Studien eine gute Möglichkeit viele Gene und ihren Expressionsgrad zu betrachten und mit weiteren Anwendungen zu analysieren. In der VS Forschung gibt es aktuell nicht allzu viele cDNA Microarray Studien (s. Tab. 14).

Tab. 14: cDNA Microarray Studien in der Vestibularisschwannomforschung.

ZYS = zystische Vestibularisschwannome.

NF 2 = Neurofibromatose Typ 2 assoziierte Vestibularisschwannome.

GKS = bestrahlte Vestibularisschwannome nach Gamma-Knife Radiochirurgie.

SVS = sporadische Vestibularisschwannome.

Autor, Jahr	Tumorproben	Kontrollprobe(n)	Methode(n)
Aarhus et al. 2010 (134)	15 SVS, 7 ZYS, 3 GKS	3 Nn. tibialis	cDNA Microarray, rt-PCR, Immunhistochemie
Cayé-Thomasen et al. 2010 (132)	16 SVS	3 Nn. vestibularis	cDNA Microarray
Lassaletta et al. 2009 (135)	11 SVS	11 Blutproben	cDNA Microarray, rt-PCR
Welling et al. 2002 (10)	3 SVS, 1 NF2, 3 ZYS	1 N. vestibularis	cDNA Microarray, rt-PCR, Immunhistochemie

Cayé-Thomasen et al. führten eine ähnliche cDNA Microarray Analyse durch (132). Sie verglichen 16 sporadische VS mit angrenzendem, gesundem N. vestibularis, der bei der Tumoroperation mit exzidiert wurde. Daraus ergaben sich 78 differentiell exprimierte Gene, unter denen 75 Gene überexprimiert und 3 Gene unterexprimiert waren. Anhand der Gene Ontology (GO) Klassifikation teilten sie die Gene in Gruppen ein. Darin waren Gene, die in Zelladhäsion, Extrazellulärer Matrix und Proteinbindung involviert waren, besonders interessant für die Tumorgenese anzusehen. Sie entdeckten zahlreiche Kandidatgene und verglichen diese mit den Studien von Welling et al. 2002 (10), Neff et al. 2006 (131), Lasak et al. 2002 (95) und Lassaletta et al. 2007 (159), die ebenfalls Vergleichsstudien durchgeführt haben.

Es gibt momentan 5 Studien, die den Vergleich zwischen sporadischen VS und Kontrollgewebe untersuchten (s. Tab. 15). Das Kontrollgewebe ist hierbei sehr unterschiedlich, was die Tatsache widerspiegelt, dass es sehr schwer ist ein adäquates Vergleichsgewebe zu finden. Nach Cayé-Thomasen et al. gibt es kein optimales Kontrollgewebe (132).

Tab. 15: Vergleichsstudien zwischen sporadischen Vestibularisschwannomen (SVS) vs. Kontrollgewebe.

Autor, Jahr	Tumorproben	Kontrollprobe(n)	Methode(n)
Cayé-Thomas et al. 2010 (132)	16 SVS	3 Nn. vestibularis	cDNA Microarray
Lassaletta et al. 2009 (135)	11 SVS	11 Blutporben	cDNA Microarray, rt-PCR
Lu et al. 2008 (92)	54 SVS	2 Nn. vestibularis, 2 Nervi glossopharyngeus	Immunhistochemie, Western Blot
Löttrich et al. 2007 (133)	40 SVS	3 Nn. vestibularis (Autopsie)	Immunhistochemie, rt-PCR
Neff et al. 2006 (131)	15 SVS	15 Nn. vestibularis	Immunhistochemie

Die Interaktion zwischen den VS und dem Immunsystem wurde von Archibald et al. beschrieben (160). Hier wurden B7-H1 exprimierende VS beschrieben, die mit dem Rezeptor PD-1 auf Immunzellen interagieren und eine zelluläre Immunantwort auslösten.

Ziel dieser Studie war es die genetischen Unterschiede zwischen sporadischen VS und N. vestibulocochlearis herauszuarbeiten um mögliche Hypothesen hinsichtlich der Genese dieser Tumorgruppe aufzustellen. Dies kann zudem wichtig für zukünftige Therapiemodalitäten und Screeningverfahren sein. Auch sollte der Zusammenhang zwischen den Tumoren und dem Immunsystem näher dargestellt werden.

Auf Grundlage einer ausführlichen Literaturrecherche waren der Signalweg und seine Moleküle „The Role of NFAT in Regulation of the Immune Reponse“ zentraler Bestandteil der Analyse. Desweiteren wurden von den 13 signifikanten Signalwegen alle Signalwege mit immunologischer Komponente betrachtet um die Tumor-Immunzellinteraktion weiter herauszuarbeiten. Davon waren jedoch nicht krankheitsspezifische Signalwege miteingeschlossen. Somit blieben 6 Signalwege für die Analyse übrig. Auf besondere Gene aus den Signalwegen wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

1. Signalweganalysen

Um cDNA Microarray Daten auszuwerten stehen eine Reihe kommerziell erwerblicher Softwarepakete zur Verfügung, zu denen auch Ingenuity Pathway Analysis (www.ingenuity.com) zählt. Mit Hilfe der Software und seinen Funktionen wird es möglich die Gene innerhalb ihrer Interaktionen zu betrachten. Dies gibt dem Betrachter die Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Genese der Erkrankung zu ziehen und mögliche Therapieansatzpunkte zu entdecken.

Die Signalweganalyse bezog sich auf 6 Signalwege, die in Prozessen des Immunsystems involviert waren und den signifikanten p-Wert von $<0,0001$ nicht überschritten.

1.1 Tumor-Immunzellinteraktion

In der Umgebung von sporadischen Vestibularisschwannomen sind Immunzellen, die mit den Tumorzellen über ihre Rezeptoren und Liganden interagieren (160). Dadurch nehmen sie Einfluss auf die Immunantwort. 6 der 13 signifikanten Signalwege beschreiben eine solche Wechselbeziehung. Meist interagieren APC mit T-Lymphozytenformen (100, 103).

Im Signalweg „The Role of NFAT in Regulation of the Immune Response“ ist eine APC vorhanden, die mit einem T-Lymphozyt wechselwirkt. APC exprimieren typischerweise MHC II Moleküle und kostimulatorische Moleküle, wie CD86 (100, 104). Auch Tumorzellen besitzen die Möglichkeit über eine MHC II Expression als APC zu agieren (103).

Partnerzelle der APC im Signalweg ist ein T-Lymphozyt in Form einer CD4+ T-Zelle.

T-Zellen besitzen einen spezifischen TCR der mit den Molekülen auf APC interagiert (100, 101). Daneben bildet der TCR einen Komplex mit dem CD3 Molekül, was als ein spezifisches Merkmal für T-Zellen anzusehen ist (101). Außerdem sind auf T-Zellen kostimulatorische Moleküle vorhanden, wie das

CD4 und das CD8 Molekül, was letztendlich die Differenzierung in eine T-Helferzelle (CD4+) oder Zytotoxische T-Zelle (CD8+) bestimmt (100, 101). Es liegen noch FC Rezeptoren vor, die für Zellen der natürlichen Abwehr, wie beispielsweise Neutrophile Granulozyten (FCGR) (156, 157), Monozyten und Dendritische Zellen (DZ) sprechen (156). Auch Mastzellen, mit ihrem FCE Rezeptor 1 (FCER1) kommen nach dem exprimierten Molekül in Frage, jedoch spielen sie eher bei Hypersensitivitätsreaktionen eine Rolle (158).

Normalerweise ist der FcRezeptor den Zellen der angeborenen Abwehr vorbehalten (161). Es gibt jedoch eine Gruppe von T-Zellen, die neben dem CD3 Rezeptor, FC Rezeptoren, der IgG und IgE Familie exprimieren. Im Speziellen können sie den CD16 Rezeptor der Natürlichen Killerzellen (NK) und den FCER der Mastzellen und Monozyten ausbilden (161-164).

Im Signalweg „CD28 Signaling in T Helper Cells“ wird die Interaktion zwischen einer APC und eine T Helferzelle beschrieben. Es liegen die typischen Rezeptoren für die Th Zelle, wie der TCR/CD3 Komplex und das CD4 Molekül vor (100). Die APC exprimiert das für sie typische kostimulatorische Molekül CD86 und das MHC II Molekül (100, 104). Als Antigenpräsentierende Zellen kommen Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen oder eine MHC II exprimierende Tumorzelle in Betracht (103, 105).

Im Zusammenhang mit der Tumor-Immunzellinteraktion beschrieb die Arbeitsgruppe von Archibald et al. den Sachverhalt, dass VS ein koregulatorisches Molekül der T-Zelle, B7-H1, exprimieren, das mit seinem Korezeptor PD-1 interagiert. Es ist außerdem mit Immuntoleranzprozesse verknüpft ist und stellt ein schädliches Merkmal von verschiedenen malignen Tumorentitäten dar (s. Abb. 49) (160).

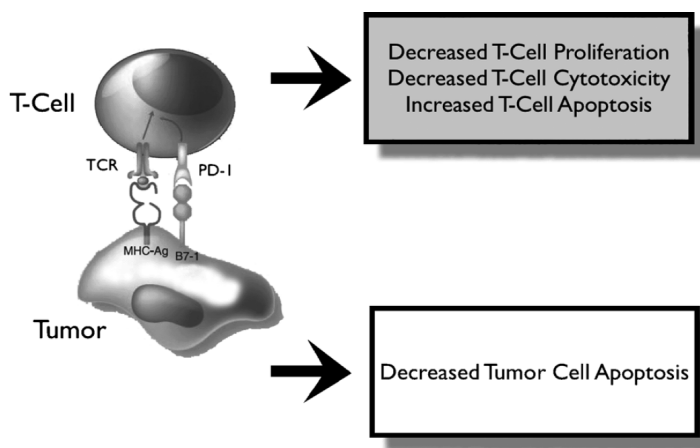


Abb. 49: B7-H1/PD-1 Interaktion zwischen Vestibularis-schwannom- und Immunzelle in der Tumor-Mikroumgebung.
Quelle: Archibald et al. 2010 (160)

Histologisch gilt das Vorhandensein von Immunzellen, wie T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen als gesichert. Natürliche Killerzellen konnten bisher nicht nachgewiesen werden (37).

1.2 MHC II exprimierende Tumorzellen und das Immunsystem

In unserer Studie werden MHC Klasse II Moleküle (HLA-Moleküle) von den sporadischen Vestibularisschwannomen oder von den umliegenden APC exprimiert. Dadurch findet eine Tumor-Immunzellinteraktion mit Antigenprozessierung, Antigenpräsentation und zellulärer sowie humoraler Immunantwort statt. Hierin sind vor allem T-Lymphozyten der spezifischen Abwehr beteiligt. In den Signalwegen „The Role of NFAT in Regulation of the Immune Response“, „Antigen Presentation Pathway“, „CD28 Signaling in T Helper Cells“ und im „Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells“ sind MHC Moleküle, vorwiegend der Klasse II aber auch der Klasse I zahlreich vertreten und allesamt überexprimiert.

MHC Klasse II Moleküle bestehen aus den Untereinheiten DR, DQ und DP (165). Die involvierten Signalwegmoleküle enthalten die HLA-DR Untereinheiten HLA-DRA und HLA-DRB1. Desweiteren finden sich die MHC II Moleküle HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DPB1 und HLA-DQA1 und die MHC I Moleküle HLA-B, HLA-C und HLA-F.

Rossi et al. wiesen nach, dass fast alle umliegenden Makrophagen und 54,2% der Vestibularisschwannomzellen das HLA-DR Antigen exprimieren (37). Zudem zeigt sich in Hypophysenadenomen (166) und bei niedriggradigen Astrozytomen (167) das gleiche Bild. Normalerweise werden HLA-DR Antigene auf B-Zellen, Langerhanszellen, Makrophagen, endothelialen Zellen, T-Zellen (168) und regelmäßig auch auf VS Zellen (37) exprimiert. Herausragender Signalweg der die MHC Moleküle hervorhebt ist der „Antigen Presentation Pathway“. Hier wird deutlich, dass vor allem die MHC Klasse II Moleküle, aber auch Klasse I Moleküle eine wichtige Rolle in der Genese spielen. Es wird deutlich, dass in VS vermehrt eine erhöhte Antigenprozessierung mit Antigenpräsentation über MHC Klasse II abläuft. Knutson et al. entdeckten, dass Tumor-spezifische T Helferzellen indirekt durch eine APC, oder direkt durch eine MHC II exprimierende Tumorzelle aktiviert werden können. Die Aktivierung erfolgt, wie am Beispiel des Metastasierungs Vorgangs, wenn das Tumorantigen direkt in den Lymphknoten gelangt, oder indirekt getragen von einer APC dort präsentiert wird. Somit können Tumoren direkt als APC agieren und eine Th Zellantwort in Gang setzen (103).

Sporadische VS besitzen für sie typische Antigene (Tumor Assoziierte Antigene), die präsentiert werden.

Sie führen dazu, dass vermehrt die zelluläre Antwort in Gang gesetzt wird. Die humorale Antwort blieb in der Studie von Harker et al. nahezu unberührt, denn die Serumwerte für Immunglobuline (IgG, IgM und IgA) waren unverändert vorzufinden (38).

Es liegt nun die Vermutung nahe, dass VS über die Expression von MHC II Moleküle ihre TAA den T Helferzellen präsentieren und dadurch eine primär zelluläre Immunantwort auslösen.

1.3 NFAT - Veränderte Zytokinexpression und T-Zelldifferenzierung in Vestibularisschwannomen

Durch eine Überexpression von NFAT1 und eine Unterexpression von NFAT2 und NFAT3 findet in VS eine veränderte Zytokinexpression statt. Diese wirkt

sich auf die zelluläre und humorale Immunantwort aus. NFAT Moleküle regulieren die T-Zelleffektorfunktion (z.B. Zytokinexpression), die T-Zelldifferenzierung und die T- sowie B-Zellproliferation (107, 115, 117, 119). Obwohl NFAT 1 und NFAT 2 eine 72% Übereinstimmung hinsichtlich ihrer Struktur aufweisen, üben sie größtenteils unterschiedliche Effekte in der Zelle aus (114, 119, 169).

NFAT 1 reguliert die IL-4 Zytokinexpression. In NFAT 1 negativen Mäusen zeigten sich erhöhte Spiegel an IL-4 und eine vermehrte Th2 Antwort mit einer gesteigerten Expression der Th2 Zytokine IL-4, IL5 und IL-13. Auch die Antikörperspiegel, waren angestiegen. Die Level an IFN gamma und IL-2 blieben meist unangetastet, was darauf schließen lässt, dass NFAT1 typischerweise die IL-4 Zytokinexpression reguliert (118, 170, 171). Jedoch gibt es eine Studie von Monticelli et al. in der sowohl NFAT 1 als auch NFAT 2 positive Effekte auf den IL-4 Spiegel und die Th2 Antwort ausübten. NFAT 1 gilt hier nicht als direkter Repressor von IL-4 (172).

Im Bezug auf die IL-2 Expression liegen bei steigenden Spiegeln an NFATc2 (NFAT1) fallende Spiegel an IL-2 vor. Dadurch kommt es zu defekten Immunabwehr und zur Infektanfälligkeit (173). Interleukin-2 besitzt antiapoptotische Eigenschaften für die T-Zelle und bewahrt sie vor dem Zelltod (174). Wird jedoch nun durch eine Überexpression von NFAT1 dieses Interleukin inhibiert, dann geht die T-Zelle durch vermehrte Apoptose zugrunde. In sporadischen VS scheint diese Situation vorzuliegen. Dadurch gehen vermehrt T-Zellen durch Apoptose zugrunde.

NFATc (NFAT2) defiziente T-Lymphozyten wiesen eine gestörte T-Lymphozytenaktivierung und eine defekte IL-4 Sekretion auf. B-Zellen mit einem Mangel an NFAT2 proliferierten weniger und es gab ein Verlust an IL-4 induzierten Immunglobulin-Isotypen. Somit ist NFAT 2 wichtig für die Bildung und Funktion von reifen T- und B-Zelllinien, was vor allem durch den Effekt von IL-4 beeinflusst wird (175). Hingegen ist die IL-2 Produktion normal und das IL-6 Zytokin wird analog dem IL-4 weniger gebildet (117). Wird weder NFAT 1

noch NFAT 2 exprimiert liegt eine gestörte Funktion der T- und B-Lymphozyten vor. T-Zellen exprimieren weniger Th2 Zytokine und B-Zellen hyperproliferieren und bilden vermehrt Antikörper und Plasmazellen (176).

Ein weiteres Zytokin ist IFN gamma, das vor allem von Th1 Zellen gebildet wird und eine zelluläre Immunantwort auslöst. Mäusen, denen NFAT1 fehlt, zeigten eine gestörte IFN gamma Produktion und eine erhöhte Infektanfälligkeit (177).

Insgesamt hat jedoch NFATc1 (NFAT2) einen positiven, proliferativen Effekt und NFATc2 (NFAT1) einen depressiven, inhibierenden Effekt auf die Immunabwehr (176).

In unserem Datensatz sind die Interleukine IL2, IL-4, IL-5 und IL-13 nicht exprimiert. Tendenziell besteht hinsichtlich des IL-2 Rezeptors eine Überexpression und betreffend des IL-4 Rezeptors eine Unterexpression, die jedoch keine Schlüsse auf die vorliegenden Erkenntnisse ziehen lässt. Auch werden im Datensatz keine B-Zell-Immunglobuline oder das IFNG exprimiert. Der IFNG Rezeptor ist überexprimiert. Um weitere Informationen hinsichtlich der Über- oder Unterexpression dieser Gene zu erhalten sind weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend wird vermutet, dass in VS aufgrund der Überexpression von NFAT1 und Unterexpression von NFAT 2 eine gestörte T-Zelldifferenzierung, B-Zell- und Antikörperbildung und gestörte Effektorfunktion vorliegt. Dies wird hervorgerufen, durch eine Inhibition von IL-4, die durch erhöhte NFAT1 und erniedrigte NFAT2 Expression zustande kommt. Dadurch kommt es weniger zur Th2 Immunantwort und die damit verbundenen Th2 Zytokinspiegel an IL4, IL5 und IL13 sind vermindert. Durch das fehlende IL-4 werden weniger IL-4 getriggerte Antikörper-Isotypen von B-Zellen gebildet, somit ist die humorale Komponente auch eingeschränkt. Außerdem lässt eine Überexpression von NFAT 1 vermuten, dass vermehrt IFN gamma produziert wird und es verstärkt zu einer Th1 Antwort mit zellulärer Immunkomponente kommt. Durch die Inhibition des antiapoptotischen IL-2 durch NFAT1 gehen vermehrt T-Zellen durch Apoptose zugrunde. Somit liegt in VS eine verminderte Th2 Antwort, bei gleichzeitig gesteigerter Th1 Antwort vor. T-Zellen unterliegen gehäuft dem Zelltod und sorgen so für ein Ungleichgewicht im Tumor-Immunzellverhältnis.

1.4 NFAT – Apoptose und aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) in T-Zellen der SVS

Apoptose und dessen Unterform der „Activation-induced cell death (AICD)“ gehören zur natürlichen Homöostase der Immunzellen. Sie dienen dazu die Immunantwort kontrolliert zu limitieren und dadurch die Homöostase zu erhalten (114, 119, 169). Gerät dieser Prozess ins Ungleichgewicht finden wir beispielsweise Erkrankungen autoimmuner Genese oder Krebs vor (119). NFAT Moleküle regulieren die Expression von Apoptosegenen in T-Lymphozyten (114, 115). Ein Förderer der Apoptose ist das NFAT1 Gen, indem es über die Expression von apoptotischen Genen, wie des FAS Liganden (115, 120, 174) oder aber die Reduktion von anti-apoptotisch (174) wirkenden Genen, am Beispiel des IL-2 Zytokins (173), diese einleitet. Oft arbeitet es hierbei mit den Transkriptionspartnern AP-1 (178) oder EGR2 (123) und EGR3 (123) zusammen, die synergistisch auf NFAT1 einwirken (107, 116).

Im Fall des AICD, der über die so genannten Todesrezeptoren (z. B. FAS, TNFR) eingeleitet wird, induzieren NFAT die Expression der zugehörigen Liganden, wie beispielsweise dem schon erwähnten FAS Liganden, oder TNFalpha (TNFA, TNF) (114, 115, 119, 169, 174). Im letzteren Fall muss angemerkt werden, dass NFAT1, nicht aber NFAT2 den Promoter von TNFA bindet und die Expression des Proteins steigert (119). Diese Resultate können durch Chuvpilo et al. 2002 bestätigt werden, die aufzeigten, dass T-Zellen, denen NFAT1 fehlt, eine deutlich verminderte TNFA- und FASL- Expression aufwiesen. Zudem zeigten sie eine Resistenz gegenüber apoptotischen Vorgängen (114, 115, 119).

NFAT 1 ist überexprimiert und kann vermehrt in VS die Apoptose von T-Zellen über eine gesteigerte Expression der Todesrezeptor-Liganden TNF alpha und FASL, hervorrufen. TNF alpha ist mit einigen seiner Rezeptoren (TNFRSF10C, TNFRSF12A, TNFRSF19, TNFRSF21) überexprimiert. Nur zwei seiner Rezeptoren sind unterexprimiert (TNFRSF11B, TNFRSF25). Der FAS Rezeptor ist auch überexprimiert. Sein Ligand FASL ist im Datensatz nicht vorhanden.

1.5 NFAT – Effekt auf Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung

Durch eine Unterexpression von NFAT3 und Calcineurin B1 wird die Differenzierung der Schwannzellen und damit in der Myelinisierung in SVS gestört.

Kao et al. untersuchte die Bedeutung des Calcium-Calcineurin-NFAT Signalwegs hinsichtlich der Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung (s. Abb. 50). Über die Rezeptoren Neuregulin 1 (NRG1) und der Erb-Familie (ErbB2, ErbB3) wird dieser Signalweg eingeleitet. Schwannzellen entwickeln sich aus multipotenten Neuralleistenzellen. Ein Mangel an Calcineurin B1 in Neuralleistenzellen von Mäusen führte zu einer gestörten Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung. Das NFAT Mitglied NFATc4 (NFAT3) und sein Transkriptionspartner Sox10 aktivieren Egr2, welches die Expression von Myelinisierungsgenen induziert. Somit liegt in VS eine gestörte Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung vor.

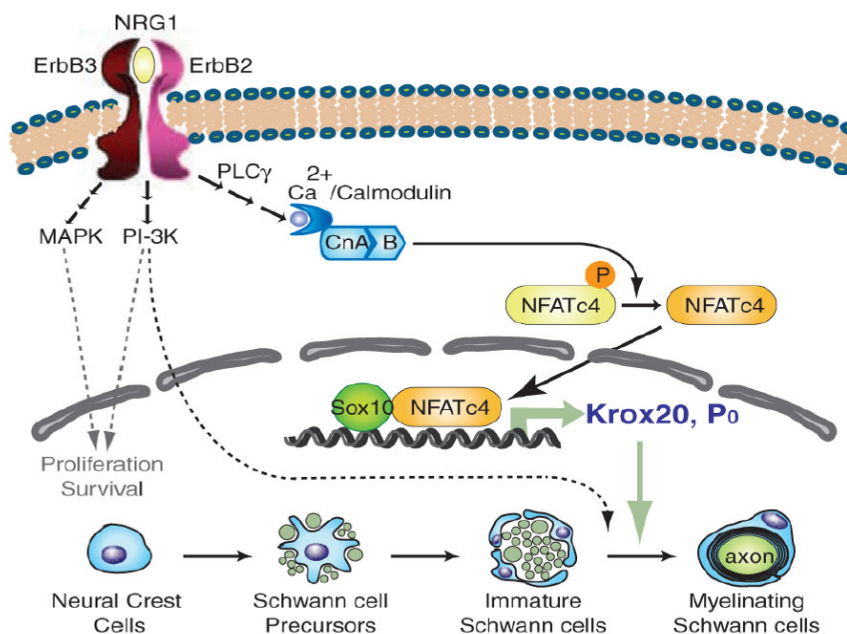


Abb. 50: Calcium-Calcineurin-NFAT Signalweg in der Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung.

Durch die Aktivierung der Rezeptoren Neuregulin 1 (NRG1) und der Erb Rezeptoren (ErbB2, ErbB3) wird durch eine Calcium-Calcineurin-Kaskade

NFATc4 aktiviert. NFATc4 und sein Transkriptionspartner Sox10 aktivieren synergistisch den Krox20 und Po Promotor. Die Genexpression von Myelinisierungsgenen wird dadurch eingeleitet. CnA/B = Calcineurin A/B
Quelle: (Kao et al. 2009) (179)

1.6 Vermehrte Infiltration und Entzündungsreaktion in VS

Die Erkennung von PAMP auf Pathogenen wird über PRR (z. B. TLR) initiiert. TLR werden auf Immunzellen, wie Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert (97). Durch Phagozytose produziert die Immunzelle proinflammatorische Zytokine, wie CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4 und CCL5 (98, 180, 181). Zusätzlich wird eine Signalkaskade gestartet, die über das Protein Myd 88 abläuft (s. Abb. 51) (96, 97). Dadurch wird die Expression von Adhäsionsmolekülen eingeleitet, die wichtig für die Leukozyten-Rekrutierung sind. Adhäsionsmoleküle sind Integrine, Selektine und Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAM) wie beispielsweise VCAM, JAM und ICAM (98, 181). Auch werden vermehrt chemotaktische Chemokine gebildet, die die Leukozyten ins entzündliche Gewebe locken. Adhäsionsmoleküle steuern neben den Chemokinen, das Rollen, Adhärenz und Migrieren der Neutrophilen und Monozyten ins Gewebe. Dadurch entsteht nun eine Tumor-Mikroumgebung, die aus Tumorzellen, Immunzellen, Extrazellulärer Matrix und Fibroblasten besteht (97). Sie kann für den Tumor förderlich oder schädlich sein, in dem suppressive oder supportive Faktoren, in Form von Zytokinen auf den Tumor einwirken (182). Der Tumor könnte somit den TLR Signalweg über Myd 88 für seine Genese nutzen. Es besteht auch noch die Möglichkeit, dass Tumorzellen auf ihrer Oberfläche selbst TLR exprimieren und damit den fördernden Entzündungsprozess aufrechterhalten (97, 183). In Ovarialkarzinomen werden beispielsweise die TLR Typen 2, 3, 4 und 5 ausgebildet (184). Durch TLR ist es möglich, dass ein Tumorprogress, über die Stimulation von Krebszellen durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, stattfindet. Dabei hängt die Zytokinexpression vom TLR ab. Bei Stimulation von TLR 2, 4 und 5 werden

vermehrt inflammatorische Zytokine gebildet. Werden hingegen die TLR 7 und 9 aktiviert werden vermehrt Typ I IFN Gene produziert (96, 97).

In unserem Datensatz sind die Zytokine CCL2 und CCL5 überexprimiert, was darauf schließen lässt, dass vermehrt ein chemotaktisches Signal über diese Moleküle auf Leukozyten einwirkt. Desweiteren werden die Toll-like Rezeptoren 1, 2, 3, 5, 7 und 8 hochreguliert. Dies spricht dafür, dass vermehrt inflammatorische Zytokine und IFN Gene produziert werden, was den Entzündungsprozess in SVS aufrecht erhält. Im Prozess der Leukozytenrekrutierung sind die Integrine ITGAM, ITGA4, ITGAL und ITGB2 überexprimiert, die Adhäsionsmoleküle JAM2 und VCAM unterexprimiert. Selektine sind nicht exprimiert, nur der Selektinligand SLEPLG ist überexprimiert.

Folglich werden zwar vermehrt Leukozyten angelockt, durch die Überexpression der Chemokine, jedoch ist die eigentliche Leukozytenmigration gestört, durch die unterschiedliche Expression der Adhäsionsmoleküle. Dennoch steuern Integrine die Zelladhäsion nicht nur über die CAMs, sondern auch über Extrazelluläre Matrix-Proteine (181).

In SVS findet durch die Überexpression von TLR und Chemokinen eine vermehrte Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe statt. Dabei werden proinflammatorische Zytokine gebildet, die den förderlichen, entzündlichen Prozess in den Tumorzellen aufrecht erhalten. Dabei exprimieren entweder Immunzellen oder die Tumorzellen selbst die TLR 1, 2, 3, 5, 7 und 8.

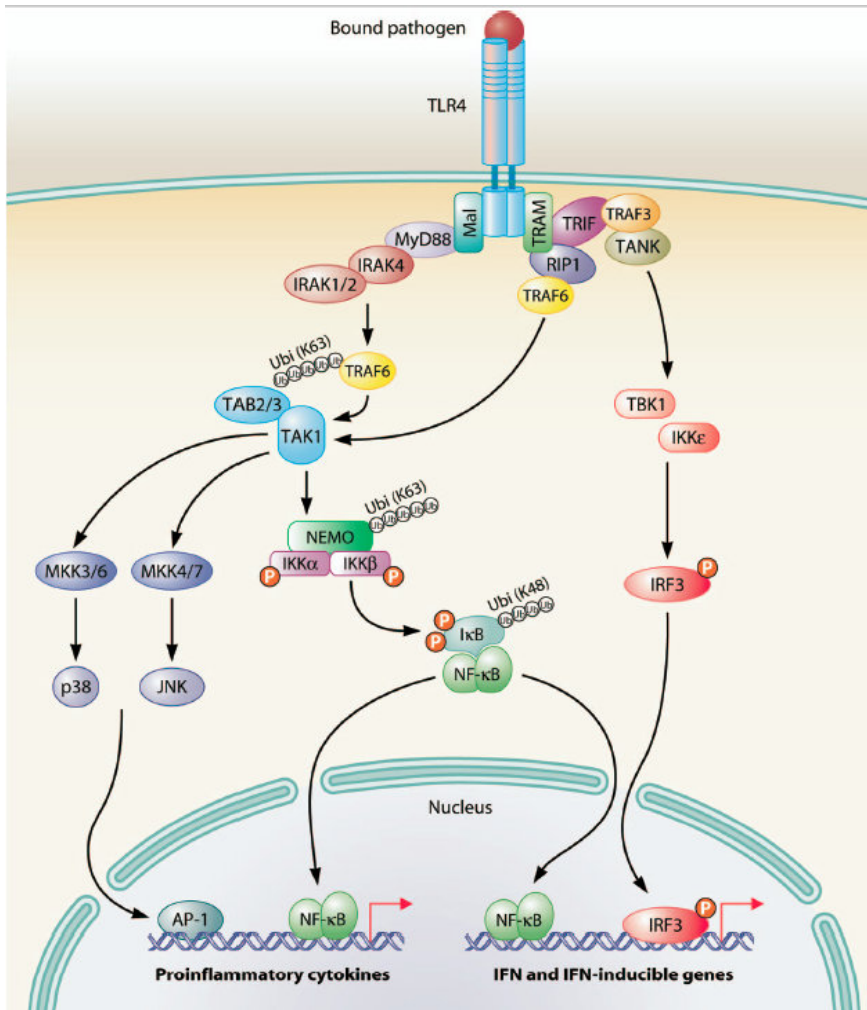


Abb. 51: TLR Signalweg am Beispiel des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4).

Abgebildet sind die MyD 88-abhängige, die MyD 88-unabhängige und die TRIF-abhängige Signalkaskade. Die MyD-abhängige Signalkaskade führt zur Induktion der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen, die MyD 88-unabhängige und TRIF-abhängige Signalkaskaden zur vermehrten Genexpression von IFN-beta und IFN-induzierbaren Genen. Quelle: Mogensen et al. 2009 (96)

1.7 Gesteigerten Elimination von Vestibularis-schwannomzellen

Im Signalweg „CD28 Signaling in T Helper Cells“ agiert die Vestibularisschwannomzelle durch eine Überexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 als natürliches Tumorzellvakzin. Durch damit verbundene, vermehrte Antigenpräsentation wird die Tumorzelle durch gesteigerte Elimination im Wachstum gestoppt.

Eine Interaktion zwischen dem kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf T-Zellen und den kostimulatorischen Liganden CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) ist notwendig für eine intakte und vollständige Immunantwort (104). Kostimulatorische Moleküle befinden sich auf der Oberfläche von Antigenpräsentierenden Zellen (APC wie Dendritische Zellen, Makrophagen und antigenpräsentierenden B-Zellen) (104, 185). Tumorzellen exprimieren normalerweise nur selten bis gar nicht diese Moleküle (104, 105, 185). Dadurch sind sie vor allem in der Anfangsphase für das Immunsystem unsichtbar und können ungestört und schnell im Wachstum voranschreiten und gegebenenfalls metastasieren. Im späten Stadium wird über Tumornekrose und Entzündungsprozesse viel Zellabfall freigesetzt. Dieser wird prozessiert und von APC, die kostimulatorische Moleküle enthalten, präsentiert. Bis dahin ist der Tumor jedoch in soweit gewachsen, dass eine vollständige Eradikation unmöglich erscheint (104, 185).

Durch Transfektion oder Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80, wird die Eradikation durch das Immunsystem erhöht (s. Abb. 52) (104, 185). Dies geschieht durch eine vermehrte Antigenpräsentation über MHC Klasse I und II Moleküle und durch eine gesteigerte Induktion von Adhäsionsmolekülen (185). Eine Studie von Matulonis et al. untersuchte die Tumorzellvakzination anhand von CD80 und CD86 transfizierten Leukämiezellen in Mäusen. Bei CD80 sprach die Immunantwort besser an als bei CD86 (104, 185). Gewöhnlich agieren CD80 und CD86 Moleküle gleichermaßen und führen zu denselben Effekten, auch wenn es unterschiedliche Meinungen dazu gibt (185, 186).

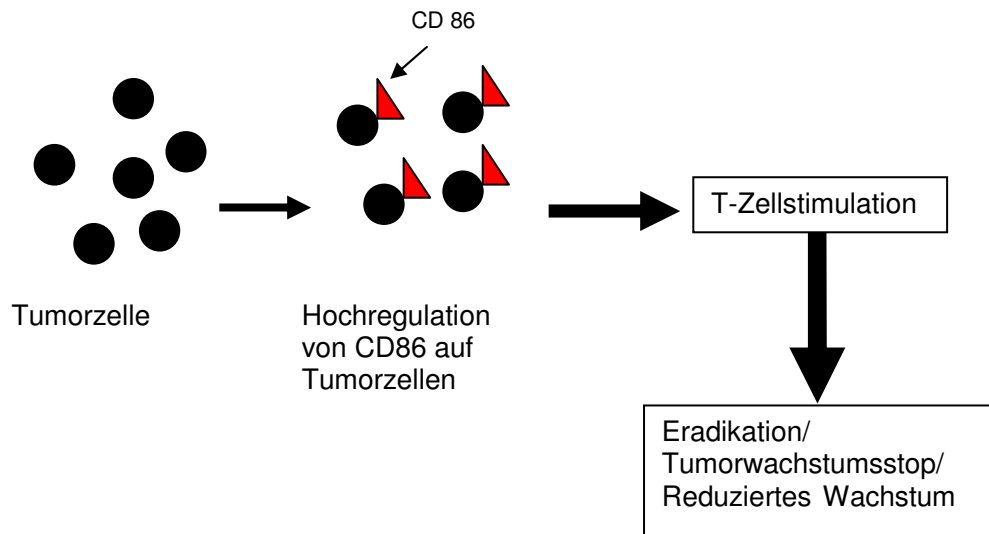


Abb. 52: Auswirkung der hochregulierten Kostimulation auf die Tumorzellen.
Erklärung dazu siehe Text.

1.8 CTL und CD4+ basierte Apoptose von Tumorzellen in VS
Der Signalweg „Cytotoxic T-Lymphocyte-mediated Apoptosis if Target Cell“ beschreibt das Phänomen, dass Zellen durch die Aktivierung von CTL dem Zelltod, der Apoptose, unterliegen. Die Eradikation von Tumoren läuft vorwiegend über die CD8+ CTL ab (103, 111). Sie können durch Th Zellen aktiviert werden, die direkt das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung zu Effektorzellen der CTL über die Freisetzung von IL-2 stimulieren. Auch werden sie über die Präsentation von intrazellulären Tumorantigenen über MHC Klasse I aktiviert (103, 187). Sowohl Th1 als auch Th2 Zellen besitzen die Fähigkeit die CTL zu aktivieren (103). Findet eine Aktivierung der CTL statt, dann können diese Tumorzellen direkt lysieren und sezernieren zudem Zytokine, wie IL-2, TNF und IFN gamma welche indirekte antitumorale Effekte besitzen (188).

Es gibt 2 verschiedene Hauptmechanismen wie CTL ihre Zielzellen abtöten (s. Abb. 53). Der eine Weg ist ein Perforin-Granzyme-basierter Mechanismus. CTL setzen Granula frei, die Poren-formende Moleküle, wie Perforine und Granzyme enthalten. Durch diese Proteinase unterliegt die Zielzelle der Apoptose einerseits über Porenbildung durch Perforine, andererseits über die

Granzyme, die in die Zelle eindringen und zur DNA Fragmentierung führen. Der andere Weg ist der FAS-FASL-basierte Mechanismus. CTL enthalten auf ihrer Oberfläche einen FAS Liganden, der mit dem Todesrezeptor, FAS, auf der Zielzelle interagiert und eine Caspase-Kaskade einleitet. Es werden Zysteineproteinasen aktiviert, die die Zelle in die Apoptose treiben (187, 189). Weiterhin werden diese Mechanismen durch die Freisetzung von Zytokinen, wie IL-2, TNF alpha und IFN gamma unterstützt, die indirekte antitumorale Eigenschaften besitzen. Zusammenfassend enthält der rezeptor-vermittelte Signalweg den Rezeptor FAS mit seinem Liganden FASL, das Adaptormolekül FADD (Fas-associated Death Domain Protein) und die Caspase 8. Der Granula-vermittelte Weg enthält Perforin und Granzym Moleküle. In unserem Datensatz ist der Rezeptor FAS, das FADD und die Caspase 8 überexprimiert, was darauf hindeutet, dass vermehrt der 2. Signalweg die Caspase-Kaskade über die Todesrezeptoren FAS abläuft. Die Moleküle Perforin und Granzyme B sind unterexprimiert, was darauf schließen lässt, dass der Tumor versucht, durch die Unterexpression seine Apoptose über den Granulaweg zu umgehen.

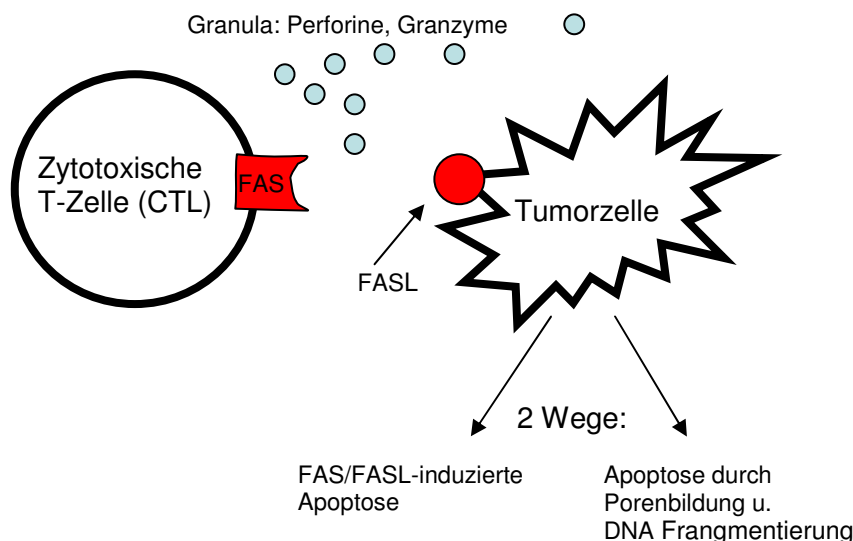


Abb. 53: Zytotoxische T-Zelle-medierte Apoptose. Erläuterung im Haupttext.

G Zusammenfassung

Vestibularisschwannome (VS) sind benigne, langsam wachsende Tumore, die von den Schwannzellen des N. vestibularis ausgehen. Sie kommen unilateral-sporadisch, oder bilateral, mit der Neurofibromatose Typ 2 assoziiert vor. Letzteres ist eine autosomal-dominantes Krankheitsbild bei der neben den pathognomonischen bilateralen Vestibularisschwannomen, zudem Meningeome, Ependymome, Schwannome anderer Hirnnerven, Katarakte, subkutane noduläre Knoten und Café-au-Lait Flecken auftreten. Typisch dafür ist ein frühes Auftreten in jungen Jahren im Vergleich zur sporadischen Form, die im späten Erwachsenenalter auftritt. VS rufen Kompressionssyndrome der befallenen und umgebenden Strukturen hervor und können im schlimmsten Falle zum Tod führen. Es resultieren charakteristischerweise ein Hörverlust, Hörsturz und Tinnitus, aber auch Gleichgewichtsstörungen, Schwindel, sowie Übelkeit und Erbrechen. Diagnostisch gesehen werden audiologische Untersuchungen veranlasst, die letztendlich durch eine MRT bestätigt werden. Aus therapeutischer Sicht gibt es die Möglichkeit der Observation, der Mikrochirurgie, der Radiochirurgie und – therapie. Ursächlich liegt ein Defekt im Tumorsuppressorgen, dem NF2 Gen, auf Chromosom 22q12 zugrunde, was in einem gestörten Proteinprodukt, auch Merlin genannt, resultiert. Weitere genetische Ursachen werden vermutet und der Bezug zum Immunsystem wurde untersucht. Ziel der Studie war es, genetische Unterschiede zwischen Tumoren und gesunden Kontrollen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Expression und Interaktion aufzudecken. Dadurch können Hinweise auf die Genese, Prävention und Therapie gewonnen werden. In unserer Studie untersuchten wir, mit Hilfe einer cDNA Microarray, 36 sporadische Vestibularisschwannome im Vergleich zu 7 Kontrollproben an totem, gesundem N. vestibulocochlearis. Für die hierfür benötigte Gesamt-RNA sammelten wir 36 Proben an sporadischen VS und 10 Autopsieproben an gesunden Nn. vestibulocochlearis. 3 Kontrollproben wurden wegen unzureichender Gesamt-RNA Qualität aus der Analyse ausgeschlossen.

Mit einem geforderten p-Wert von unter 0,01 und einem logFold Change von größer 1, waren 4021 differentiell exprimiert, davon 2276 überexprimiert und 1745 Gene unterexprimiert. Diese Gene wurden mit Hilfe der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) hinsichtlich ihrer funktionellen Interaktionen in Netzwerken, Signalwegen und Biologischen Funktionen, analysiert. Der ursprünglich von IPA generierte p-Wert von 0,05 wurde für die Signalweganalyse auf 0,0001 gesetzt und unter diesem Wert lagen 13 Signalwege. 6 Signalwege zeigten Prozesse des Immunsystems auf und waren nicht krankheitsspezifisch und wurden hinsichtlich ihrer Geninteraktionen analysiert. Eine Validierung der Ergebnisse wurde nicht vorgenommen, da Vorgängerstudien bezüglich einer rt-PCR oder Immunhistochemie, die Ergebnisse der Microarray stets bestätigten.

In unseren Signalwegen interagieren Immunzellen, meist CD4+ Zellen mit einer MHC Klasse II exprimierenden Antigenpräsentierenden Zelle. Auch Tumorzellen können MHC Klasse II auf ihrer Oberfläche exprimieren. Durch die MHC II Expression präsentieren die Vestibularisschwannomzellen ihre spezifischen Tumor Assoziierten Antigene (TAA) den T Helferzellen und lösen dadurch vorwiegend eine zelluläre aber auch humorale Immunantwort aus.

NFAT Moleküle und ihr Signalweg „The Role of NFAT in Regulation of the Immune Response“ sind auch aufgrund einer Literaturrecherche zentraler Bestandteil unserer Analyse.

NFAT Moleküle sind Transkriptionsfaktoren in T-Zellen und steuern dort vorwiegend die Zytokinexpression. Dadurch nehmen sie Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung und die Effektorfunktion von T- und B-Zellen (Zytokinexpression und Antikörperbildung). Dadurch wird insgesamt die zelluläre und humorale Immunantwort gesteuert. Es ist eine Proteinfamilie, die aus 5 Mitgliedern besteht und vorwiegend in T-Zellen anzutreffen ist. Durch eine Überexpression von NFAT1 und eine Unterexpression von NFAT2 liegt eine gestörte Effektorfunktion (z. B. Zytokinexpression) von T-Zellen zugrunde. Über die Suppression von IL-4, IL-2 und eine gesteigerte Expression von IFN gamma wird die Th2 Zellantwort supprimiert, es kommt weniger zu Th2

getriebenen B-Zellantikörperbildung. Auch die Apoptose in den T-Zellen ist durch die Unterdrückung des antiapoptotischen IL-2 erhöht. Desweiteren verschiebt sich das Th1-Th2 Gleichgewicht in Richtung Th1, denn es wird vermehrt IFN gamma unter dem NFAT1 Einfluss gebildet. Die Apoptose wird auch insofern beeinflusst, dass NFAT1 die Expression von Todesrezeptorliganden FASL und TNFA steigert.

NFAT Moleküle sind auch wichtig für die Differenzierung von Schwannzellen in peripheren Nerven. Eine verminderte Bildung von NFAT3 und Calcineurin B1 führt zu einer gestörten Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung in sporadischen Vestibularisschwannomen.

In den Vestibularisschwannomen findet ein chronisch entzündlicher Prozess statt, der sich histologisch und über Signalkaskaden nachweisen lässt. Dieser hat für den Tumor fördernden oder suppressiven Einfluss. Um eine entzündliche Reaktion auslösen zu können wird eine Interaktion von Pattern Recognition Receptors (PRR), wie Toll-like Rezeptoren (z. B. TLR3), die auf Immun- oder Tumorzellen sitzen mit ihren PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) benötigt, die auf Pathogenen lokalisiert sind.

Dadurch wird eine Myd 88 abhängige Signalkaskade eingeleitet, die zur vermehrten Expression von inflammatorischen Zytokinen führt. Zudem werden chemotaktische Chemokine, wie CCL2 und CCL5 und Adhäsionsmoleküle gebildet. Beide sind wichtig für die Rekrutierung, Adhäsion und Migration von Leukozyten ins Gewebe.

Adhäsionsmoleküle wie Integrine sind überexprimiert und Zelladhäsionsmoleküle wie VCAM und JAM sind unterexprimiert. Das lässt vermuten, dass eine vermehrte chemotaktische Rekrutierung stattfindet, jedoch die Migration ins Gewebe in SVS gestört ist.

Sporadische Vestibularisschwannome überexprimieren das kostimulatorische Molekül CD 86 und dienen dadurch als natürliches Tumorstimulus. Durch die gesteigerte Antigenpräsentation wird die Tumorzelle vermehrt eliminiert und im Wachstum gestoppt. Normalerweise besitzen Tumoren keine

kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86, um sich vor dem Immunsystem zu verstecken und ungestört zu wachsen und zu metastasieren. Später jedoch wird dieser Mechanismus dadurch unterbunden, dass Tumornekrose und Zellverfall Zelldetritus freisetzen, der die Immunzellen zur Eradikation anlockt. Bis dahin ist der Tumor jedoch zu stark gewachsen und nicht mehr zu eliminieren, er kann lediglich im Wachstum gebremst werden. Dies ist eine Erklärung für die langsame Wachstumsrate in VS.

Zytotoxische T-Zellen können über einen FAS-FASL-rezeptorvermittelten Weg, oder einen Perforin-Granzyme-basierten Weg, Zielzellen eliminieren. In sporadischen Vestibularisschwannomen werden Tumorzellen vermehrt über den rezeptorvermittelten Weg eliminiert. Dies zeigt eine Überexpression der Todesrezeptoren FAS und FADD und der Caspase 8. Die Unterexpression von Perforinen und Granzymen bestätigt die Hypothese.

Um weitere Erkenntnisse über die Interaktion von VS und Immunzellen zu erhalten sind weitere Untersuchungen auch in Form von Validierungsmethoden nötig. Eine histologische Anwesenheit von chronischen Entzündungsprozessen und Immunzellen wurde bereits von anderen Studien nachgewiesen ist hier jedoch nicht explizit untersucht worden. Mit Hilfe der vorliegenden Erkenntnisse konnte jedoch ein Einblick in die bisher noch nicht erforschte Tumor-Immunzellinteraktion gewonnen werden, die neue Ansätze zur Genese liefert.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 MRT-Aufnahme eines zystischen Vestibularisschwannoms.
Quelle: s. Abb.
- Abb. 2 Klinische Manifestationen bei der Neurofibromatose Typ 2.
Quelle. s. Abb.
- Abb. 3 Makroskopische Lokalisation eines Vestibularisschwannoms.
Quelle: s. Abb.
- Abb. 4 Histologischer Schnitt mit Antoni Typ A und B Gewebe.
Quelle. s. Abb.
- Abb. 5 Retikuläre Struktur des Antoni Typ B Gewebes im histologischen Schnitt. Quelle: s. Abb.
- Abb. 6 Radiologische Einteilung der Tumorstadien in T1 – T4 anhand der Hannoverklassifikation. Quelle. s. Abb.
- Abb. 7 Beziehung des Vestibularisschwannoms zu den umliegenden Hirnnerven. Quelle: s. Abb.
- Abb. 8 BERA (Hirnstammaudiometrie). Quelle. s. Abb.
- Abb. 9 Häufigkeiten der verschiedenen Zugangswege von 1990 – 2001 an der Universitäts-HNO-Klinik Würzburg. Quelle. s. Abb.
- Abb. 10 Lagerung in Seitenlage (Parkbankposition). Quelle. s. Abb.
- Abb. 11 Retrosigmoidaler Zugang. Quelle. s. Abb.
- Abb. 12 Abbildung eines Neuromonitoring während einer VS-Operation.
Quelle. s. Abb.
- Abb. 13 MRT Beurteilung der radiochirurgischen Behandlung. Quelle. s. Abb.
- Abb. 14 Postoperative Fazialisfunktion 1 Jahr nach Operation. Quelle. s. Abb.
- Abb. 15 Die Isoformen der transkribierten mRNA des NF 2 Gens.
Quelle. s. Abb.
- Abb. 16 Domänen der ERM-Proteine.
- Abb. 17 Konformationszustand von Merlin abhängig vom Phosphorylierungsgrad.
- Abb. 18 Transmigration der Leukozyten. Quelle. s. Abb.
- Abb. 19 T Helferzellendifferenzierung. Quelle. s. Abb.

- Abb. 20 Die Rolle der Th Zelle in der Tumor-Mikroumgebung. Quelle. s. Abb.
- Abb. 21 RNA-Integritätsnummer (RIn) der Kontrollproben.
- Abb. 22 Einteilung der Tumorproben anhand des Hannover-Klassifikationssystems.
- Abb. 23 Verhältnis zwischen Frauen und Männern unter den Tumorproben.
- Abb. 24 Übersicht über den Anteil der akustischen Symptome unter den Tumorproben.
- Abb. 25 Anteil der Tumorpatienten mit Hypakusis.
- Abb. 26 Anteil der Tumorpatienten mit Tinnitus.
- Abb. 27 Anteil der Tumorpatienten mit Hörsturz.
- Abb. 28 Anteil der Tumorpatienten mit Anakusis.
- Abb. 29 Anteil der Tumorpatienten mit Fazialisparese.
- Abb. 30 Einteilung und Anteil der Fazialispathologien unter den Tumorpatienten.
- Abb. 31 Anteil der Trigeminiopathologien unter den Tumorpatienten.
- Abb. 32 Anteil der Vestibularispathologien unter den Tumorpatienten.
- Abb. 33 Das Verhältnis von Frauen zu Männern unter den Kontrollproben.
- Abb. 34 Übersicht zum Versuchsablauf des RNeasy Microarray Tissue Mini Kit der Firma Qiagen. Quelle: www.qiagen.com
- Abb. 35 Versuchsablauf des Affymetrix GeneChip 3'IVT Express Kit Labelling Assay. Quelle: Affymetrix, Santa Clara, CA
- Abb. 36 Technischer Arbeits- und Versuchsablauf der Studie.
- Abb. 37 Versuchsablauf der cDNA Microarray Analyse mit der HG U 219 Array Plate von Affymetrix. Quelle: Affymetrix, Santa Clara, CA
- Abb. 38 Anzahl und Expressionsgrad der deregulierten Gene.
- Abb. 39 Anzahl und Expressionsgrad der Canonical Pathways Moleküle, die den Threshold von 0,0001 erfüllt haben.
- Abb. 40 13 Canonical Pathways, die einen p-Wert von $\leq 0,0001$ aufweisen.
- Abb. 41 Legende der Canonical Pathways.
- Abb. 42 Signalweg „The Role of NFAT in Regulation of the Immune Response“. Quelle: www.ingenuity.com
- Abb. 43 Signalweg der Antigenpräsentation. Quelle. www.ingenuity.com

- Abb. 44 Leukozytenmigrations-Signalweg. Quelle. www.ingenuity.com
- Abb. 45 Die Rolle des Pattern Recognition Receptors (PRR) bei der Erkennung von Bakterien und Viren. Quelle: www.ingenuity.com
- Abb. 46 CD 28 Signalweg in T Helferzellen. Quelle: www.ingenuity.com
- Abb. 47 Zytotoxische T-Lymphozyten-medierte Apoptose von Zielzellen. Quelle: www.ingenuity.com
- Abb. 48 IPA Überblick über die Biologischen Funktionen und ihre Unterteilung in einzelne Kategorien. Quelle: www.ingenuity.com
- Abb. 49 B7-H1/PD-1 Interaktion zwischen Vestibularisschwannom- und Immunzellen in der Tumor-Mikroumgebung. Quelle: s. Abb.
- Abb. 50 Calcium-Calcineurin-NFAT Signalweg in der Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung. Quelle: s. Abb.
- Abb. 51 TLR Signalweg am Beispiel des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4). Quelle: s. Abb.
- Abb. 52 Auswirkung der hochregulierten Kostimulation auf die Tumorzelle.
- Abb. 53 Zytotoxische T-Zelle-medierte Apoptose.

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Kriterien zur Diagnose der Neurofibromatose Typ 2 nach Manchester. Quelle: s. Tab.
- Tab. 2 Einteilung der Tumorstadien mittels Hannover-Klassifikation nach Samii et al. 1997
- Tab. 3 Klassifikationssystem nach Kanzaki et al. 2003. Quelle: s. Tab.
- Tab. 4 Gardner & Robertson Klassifikation. Quelle: s. Tab.
- Tab. 5 Klassifikation der Fazialisfunktion nach House & Brackmann. Quelle: s.Tab.
- Tab. 6 Zusätzliche Diagnostik.
- Tab. 7 Therapieempfehlung unter Standardbedingungen.
- Tab. 8 Alter und Postmortem-Intervall (PMI) der Kontrollproben.
- Tab. 9 Verwendete Softwarepakete.

- Tab. 10 Die 13 Top signifikante (p -Wert $\leq 0,0001$) Canonical Pathways, die den Threhold von $\leq 0,0001$ erfüllten.
- Tab. 11 Übersicht zu den Netzwerken mit einem IPA generierten p -Wert von $\leq 0,05$. Quelle: www.ingenuity.com
- Tab. 12 Top 10 überexprimierte Gene. Quelle: modifiziert nach www.ingenuity.com
- Tab. 13 Top 10 unterexprimierte Gene. Quelle: modifiziert nach www.ingenuity.com
- Tab. 14 cDNA Microarray Studien in der Vestibularisschwannomforschung.
- Tab. 15 Vergleichsstudien zwischen Sporadischen Vestibularisschwannomen (SVS) vs. Kontrollgewebe.

Literaturverzeichnis

1. B. A. Neff, D. B. Welling, E. Akhmametyeva, L. S. Chang, The molecular biology of vestibular schwannomas: dissecting the pathogenic process at the molecular level. *Otol Neurotol* **27**, 197-208 (Feb, 2006).
2. J. D. Swartz, Lesions of the cerebellopontine angle and internal auditory canal: diagnosis and differential diagnosis. *Seminars in ultrasound, CT, and MR* **25**, 332-352 (Aug, 2004).
3. P. Sweeney, S. Yajnik, W. Hartsell, G. Bovis, J. Venkatesan, Stereotactic radiotherapy for vestibular schwannoma. *Otolaryngol Clin North Am* **42**, 655-663 (Aug, 2009).
4. B. Lumenta, B. Wowra, A. L. Grosu, R. Goldbrunner, in *Manual Hirntumore und Spinale Tumoren*, Neurinome, J. C. Tonn, F. W. Kreth, R. Goldbrunner, B. Meyer, Eds. (Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag, Gernming/München, 2007), pp. 137-145.
5. G. T. Nager, Acoustic neurinomas. Pathology and differential diagnosis. *Arch Otolaryngol* **89**, 252-279 (Feb, 1969).
6. M. Tolnay, F. Heppner, O. D. Wiestler, in *Pathologie*, Peripheres Nervensystem, W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, H. Moch, Eds. (Urban&Fischer Verlag, München, 2008), pp. 339.
7. G. Feichter, P. Dalquen, in *Zytopathologie*, Stütz- und Weichteilgewebe, W. Remmele, Ed. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2000), pp. 418-419.
8. M. Samii, V. M. Gerganov, in *Neuro-oncology. The Essentials*, Vestibular schwannomas, M. Bernstein, M. S. Berger, Eds. (Thieme, New York, 2008), pp. 353-358.
9. A. Jacob *et al.*, Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation in human vestibular schwannoma. *Otol Neurotol* **29**, 58-68 (Jan, 2008).
10. D. B. Welling, J. M. Lasak, E. Akhmametyeva, B. Ghaheri, L. S. Chang, cDNA microarray analysis of vestibular schwannomas. *Otol Neurotol* **23**, 736-748 (Sep, 2002).
11. R. L. Martuza, R. Eldridge, Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *N Engl J Med* **318**, 684-688 (Mar 17, 1988).
12. V. Kasantikul, M. G. Netsky, M. E. Glasscock, 3rd, J. W. Hays, Acoustic neurilemmoma. Clinicoanatomical study of 103 patients. *Journal of neurosurgery* **52**, 28-35 (Jan, 1980).
13. S. Kameyama *et al.*, The long-term growth rate of residual acoustic neurinomas. *Acta neurochirurgica* **129**, 127-130 (1994).
14. C. Matthies, M. Samii, Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): clinical presentation. *Neurosurgery* **40**, 1-9; discussion 9-10 (Jan, 1997).
15. J. R. Newton, M. Shakeel, S. Flatman, C. Beattie, B. Ram, Magnetic resonance imaging screening in acoustic neuroma. *Am J Otolaryngol* **31**, 217-220 (Jul-Aug, 2010).
16. K. Schwager, [Acoustic neuroma (vestibular schwannoma) therapy from an oto-rhino-laryngological perspective]. *Hno* **59**, 22, 24-30 (Jan, 2011).

17. D. B. Welling, Clinical manifestations of mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in vestibular schwannomas (acoustic neuromas). *Laryngoscope* **108**, 178-189 (Feb, 1998).
18. U. Schick, A. Unterberg, [Acoustic neuroma (vestibular schwannoma). Treatment from a neurosurgical perspective]. *Hno* **59**, 16, 18-21 (Jan, 2011).
19. S. Wandong *et al.*, Cystic acoustic neuroma. *J Clin Neurosci* **12**, 253-255 (Apr, 2005).
20. K. K. Koeller, in *Radiologic-Pathologic Correlations from Head to Toe*, Neoplasm of the Posterior Fossa, N. C. Gourtsoyiannis, P. R. Ros, Eds. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005), pp. 69-85.
21. D. G. Evans *et al.*, A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med* **84**, 603-618 (Aug, 1992).
22. D. M. Parry *et al.*, Neurofibromatosis 2 (NF2): clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *American journal of medical genetics* **52**, 450-461 (Oct 1, 1994).
23. E. T. Tali *et al.*, Cystic acoustic schwannomas: MR characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* **14**, 1241-1247 (Sep-Oct, 1993).
24. S. Charabi, L. Klinken, M. Tos, J. Thomsen, Histopathology and growth pattern of cystic acoustic neuromas. *Laryngoscope* **104**, 1348-1352 (Nov, 1994).
25. S. Kameyama, R. Tanaka, T. Kawaguchi, M. Fukuda, K. Oyanagi, Cystic acoustic neurinomas: studies of 14 cases. *Acta neurochirurgica* **138**, 695-699 (1996).
26. S. Charabi *et al.*, Cystic vestibular schwannoma--clinical and experimental studies. *Acta Otolaryngol Suppl* **543**, 11-13 (2000).
27. C. J. Wallace, T. C. Fong, R. N. Auer, Cystic intracranial schwannoma. *Canadian Association of Radiologists journal = Journal l'Association canadienne des radiologistes* **44**, 453-459 (Dec, 1993).
28. S. Charabi, M. Mantoni, M. Tos, J. Thomsen, Cystic vestibular schwannomas: neuroimaging and growth rate. *J Laryngol Otol* **108**, 375-379 (May, 1994).
29. D. G. Evans, Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis* **4**, 16 (2009).
30. D. G. Evans *et al.*, Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: higher incidence than previously thought. *Otol Neurotol* **26**, 93-97 (Jan, 2005).
31. A. R. Asthagiri *et al.*, Neurofibromatosis type 2. *Lancet* **373**, 1974-1986 (Jun 6, 2009).
32. M. J. Smith *et al.*, Vestibular schwannomas occur in schwannomatosis and should not be considered an exclusion criterion for clinical diagnosis. *American journal of medical genetics. Part A*, (Nov 21, 2011).
33. M. Amano *et al.*, Intraoperative continuous monitoring of evoked facial nerve electromyograms in acoustic neuroma surgery. *Acta Neurochir (Wien)* **153**, 1059-1067; discussion 1067 (May, 2011).

34. L. Lassaletta *et al.*, DNA methylation of multiple genes in vestibular schwannoma: Relationship with clinical and radiological findings. *Otol Neurotol* **27**, 1180-1185 (Dec, 2006).
35. O. D. Wiestler, G. Reifenberger, in *Neuroonkologie, Tumoren der peripheren Nerven*, U. Schlegel, M. Weller, M. Westphal, Eds. (Thieme, Stuttgart, 2003), pp. 47-50.
36. R. A. Sobel, Vestibular (acoustic) schwannomas: histologic features in neurofibromatosis 2 and in unilateral cases. *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 106-113 (Mar, 1993).
37. M. L. Rossi *et al.*, Mononuclear cell infiltrate, HLA-Dr expression and proliferation in 37 acoustic schwannomas. *Histol Histopathol* **5**, 427-432 (Oct, 1990).
38. L. A. Harker, J. Nysather, A. Katz, Immunologic detection of acoustic neuroma: preliminary report. *Laryngoscope* **88**, 802-807 (May, 1978).
39. M. Samii, C. Matthies, Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): hearing function in 1000 tumor resections. *Neurosurgery* **40**, 248-260; discussion 260-242 (Feb, 1997).
40. J. Kanzaki *et al.*, New and modified reporting systems from the consensus meeting on systems for reporting results in vestibular schwannoma. *Otol Neurotol* **24**, 642-648; discussion 648-649 (Jul, 2003).
41. A. A. Cohen-Gadol, N. W. Wetjen, L. M. Quast, M. J. Ebersold, Retrosigmoid Approach to Vestibular Schwannomas. *Operative Techniques in Neurosurgery* **4**, 19-23 (2001).
42. E. Myrseth, P. H. Pedersen, P. Moller, M. Lund-Johansen, Treatment of vestibular schwannomas. Why, when and how? *Acta Neurochir (Wien)* **149**, 647-660; discussion 660 (2007).
43. J. W. House, D. E. Brackmann, Facial nerve grading system. *Otolaryngol Head Neck Surg* **93**, 146-147 (Apr, 1985).
44. Z. Komazec, S. Lemajic, L. Vlaski, [Audiologic diagnostics of vestibular schwannoma]. *Med Pregl* **57**, 81-85 (Jan-Feb, 2004).
45. M. S. Greenberg, in *Handbook of Neurosurgery, Tumor*, M. S. Greenberg, Ed. (Thieme, New York, 2010), pp. 620-633.
46. H. Behrbohm, O. Kaschke, T. Nawka, in *Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Ohr*. (Thieme, Stuttgart, 2009), pp. 3-68.
47. B. M. Hölper, F. Soldner, R. Behr, in *Kompendium Neurochirurgie, Hirntumore*, B. M. Hölper, Ed. (ProInn-Verlag, Rosenheim, 2007), pp. 145-152.
48. G. Gardner, J. H. Robertson, Hearing preservation in unilateral acoustic neuroma surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **97**, 55-66 (Jan-Feb, 1988).
49. E. Hofmann, L. Chone, [Imaging of acoustic neuroma (vestibular schwannoma). Breakthrough or dilemma?]. *Hno* **59**, 9-15 (Jan, 2011).
50. K. Thamburaj, V. V. Radhakrishnan, B. Thomas, S. Nair, G. Menon, Intratumoral microhemorrhages on T2*-weighted gradient-echo imaging helps differentiate vestibular schwannoma from meningioma. *AJNR Am J Neuroradiol* **29**, 552-557 (Mar, 2008).
51. M. Bennett, D. S. Haynes, Surgical approaches and complications in the removal of vestibular schwannomas. 2007. *Neurosurgery clinics of North America* **19**, 331-343, vii (Apr, 2008).

52. G. T. Sakamoto, N. Blevins, I. C. Gibbs, Cyberknife radiotherapy for vestibular schwannoma. *Otolaryngol Clin North Am* **42**, 665-675 (Aug, 2009).
53. P. V. Theodosopoulos, M. L. Pensak, Contemporary management of acoustic neuromas. *The Laryngoscope* **121**, 1133-1137 (Jun, 2011).
54. A. Minovi *et al.*, [Functional results, cognitive and effective quality of life disturbances after trans-temporal resection of acoustic neuroma]. *Laryngorhinootologie* **84**, 915-920 (Dec, 2005).
55. B. A. Neff, J. Ting, S. L. Dickinson, D. B. Welling, Facial nerve monitoring parameters as a predictor of postoperative facial nerve outcomes after vestibular schwannoma resection. *Otol Neurotol* **26**, 728-732 (Jul, 2005).
56. S. G. Harner, J. R. Daube, M. J. Ebersold, C. W. Beatty, Improved preservation of facial nerve function with use of electrical monitoring during removal of acoustic neuromas. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* **62**, 92-102 (Feb, 1987).
57. D. A. Jellinek, L. C. Tan, L. Symon, The impact of continuous electrophysiological monitoring on preservation of the facial nerve during acoustic tumour surgery. *British journal of neurosurgery* **5**, 19-24 (1991).
58. R. G. Ojemann, Retrosigmoid approach to acoustic neuroma (vestibular schwannoma). *Neurosurgery* **48**, 553-558 (Mar, 2001).
59. A. D. Legatt, Mechanisms of intraoperative brainstem auditory evoked potential changes. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* **19**, 396-408 (Oct, 2002).
60. C. M. Harper *et al.*, Effect of BAEP monitoring on hearing preservation during acoustic neuroma resection. *Neurology* **42**, 1551-1553 (Aug, 1992).
61. P. H. Roche, T. Ribeiro, H. D. Fournier, J. M. Thomassin, Vestibular schwannomas: complications of microsurgery. *Prog Neurol Surg* **21**, 214-221 (2008).
62. M. E. Glasscock, 3rd, J. W. Hays, L. B. Minor, D. S. Haynes, V. N. Carrasco, Preservation of hearing in surgery for acoustic neuromas. *J Neurosurg* **78**, 864-870 (Jun, 1993).
63. A. Y. Wong, M. G. Irwin, Large venous air embolism in the sitting position despite monitoring with transoesophageal echocardiography. *Anaesthesia* **60**, 811-813 (Aug, 2005).
64. F. Unger, K. Dominikus, K. Haselsberger, [Stereotactic radiosurgery and fractionated stereotactic radiotherapy of acoustic neuromas]. *Hno* **59**, 31-37 (Jan, 2011).
65. L. Leksell, The stereotaxic method and radiosurgery of the brain. *Acta Chir Scand* **102**, 316-319 (Dec 13, 1951).
66. J. R. Adler, Jr. *et al.*, The Cyberknife: a frameless robotic system for radiosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg* **69**, 124-128 (1997).
67. G. H. Barnett *et al.*, Stereotactic radiosurgery--an organized neurosurgery-sanctioned definition. *Journal of neurosurgery* **106**, 1-5 (Jan, 2007).
68. R. A. Battista, Gamma knife radiosurgery for vestibular schwannoma. *Otolaryngol Clin North Am* **42**, 635-654 (Aug, 2009).

69. J. A. Williams, Fractionated stereotactic radiotherapy for acoustic neuromas. *Acta neurochirurgica* **144**, 1249-1254; discussion 1254 (Dec, 2002).
70. B. E. Pollock *et al.*, Patient outcomes after vestibular schwannoma management: a prospective comparison of microsurgical resection and stereotactic radiosurgery. *Neurosurgery* **59**, 77-85; discussion 77-85 (Jul, 2006).
71. M. Karpinos *et al.*, Treatment of acoustic neuroma: stereotactic radiosurgery vs. microsurgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**, 1410-1421 (Dec 1, 2002).
72. D. E. Brackmann, L. J. Bartels, Rare tumors of the cerebellopontine angle. *Otolaryngology and head and neck surgery* **88**, 555-559 (Sep-Oct, 1980).
73. M. Tan *et al.*, Trends in the management of vestibular schwannomas at Johns Hopkins 1997-2007. *Laryngoscope* **120**, 144-149 (Jan, 2010).
74. K. Whitehouse, M. Foroughi, G. Shone, R. Hatfield, Vestibular schwannomas - when should conservative management be reconsidered? *British journal of neurosurgery* **24**, 185-190 (Apr, 2010).
75. K. Schwager, G. Baier, J. Helms, R. Hagen, [Results in otosurgically treated patients with acoustic neuroma. Part 2: Hearing results after middle fossa approach]. *Laryngorhinootologie* **87**, 629-633 (Sep, 2008).
76. K. Kameda, T. Shono, K. Hashiguchi, F. Yoshida, T. Sasaki, Effect of tumor removal on tinnitus in patients with vestibular schwannoma. *J Neurosurg* **112**, 152-157 (Jan, 2010).
77. D. Tufarelli *et al.*, Balance impairment after acoustic neuroma surgery. *Otol Neurotol* **28**, 814-821 (Sep, 2007).
78. J. M. Ryzenman, M. L. Pensak, J. M. Tew, Jr., Headache: a quality of life analysis in a cohort of 1,657 patients undergoing acoustic neuroma surgery, results from the acoustic neuroma association. *Laryngoscope* **115**, 703-711 (Apr, 2005).
79. M. E. Sughrue, I. Yang, M. J. Rutkowski, D. Aranda, A. T. Parsa, Preservation of facial nerve function after resection of vestibular schwannoma. *British journal of neurosurgery* **24**, 666-671 (Dec, 2010).
80. P. Sampath, M. J. Holliday, H. Brem, J. K. Niparko, D. M. Long, Facial nerve injury in acoustic neuroma (vestibular schwannoma) surgery: etiology and prevention. *J Neurosurg* **87**, 60-66 (Jul, 1997).
81. A. K. Lalwani, F. Y. Butt, R. K. Jackler, L. H. Pitts, C. D. Yingling, Facial nerve outcome after acoustic neuroma surgery: a study from the era of cranial nerve monitoring. *Otolaryngol Head Neck Surg* **111**, 561-570 (Nov, 1994).
82. J. E. Fenton, R. Y. Chin, A. Shirazi, P. A. Fagan, Prediction of postoperative facial nerve function in acoustic neuroma surgery. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **24**, 483-486 (Dec, 1999).
83. S. Charabi, M. Tos, S. E. Bargesen, J. Thomsen, Cystic acoustic neuromas. Results of translabyrinthine surgery. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **120**, 1333-1338 (Dec, 1994).
84. G. H. Xiao, A. Beeser, J. Chernoff, J. R. Testa, p21-activated kinase links Rac/Cdc42 signaling to merlin. *J Biol Chem* **277**, 883-886 (Jan 11, 2002).

85. I. Ahronowitz *et al.*, Mutational spectrum of the NF2 gene: a meta-analysis of 12 years of research and diagnostic laboratory findings. *Hum Mutat* **28**, 1-12 (Jan, 2007).
86. R. M. Irving *et al.*, Somatic NF2 gene mutations in familial and non-familial vestibular schwannoma. *Hum Mol Genet* **3**, 347-350 (Feb, 1994).
87. L. S. Sherman, D. H. Gutmann, Merlin: hanging tumor suppression on the Rac. *Trends Cell Biol* **11**, 442-444 (Nov, 2001).
88. P. Lepont *et al.*, Point mutation in the NF2 gene of HEI-193 human schwannoma cells results in the expression of a merlin isoform with attenuated growth suppressive activity. *Mutat Res* **637**, 142-151 (Jan 1, 2008).
89. J. L. Kissil, K. C. Johnson, M. S. Eckman, T. Jacks, Merlin phosphorylation by p21-activated kinase 2 and effects of phosphorylation on merlin localization. *J Biol Chem* **277**, 10394-10399 (Mar 22, 2002).
90. R. M. Irving *et al.*, A molecular, clinical, and immunohistochemical study of vestibular schwannoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* **116**, 426-430 (Apr, 1997).
91. D. B. Welling, M. D. Packer, L. S. Chang, Molecular studies of vestibular schwannomas: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **15**, 341-346 (Oct, 2007).
92. J. Lu, J. Zou, H. Wu, L. Cai, Compensative shuttling of merlin to phosphorylation on serine 518 in vestibular schwannoma. *Laryngoscope* **118**, 169-174 (Jan, 2008).
93. K. Ye, Phosphorylation of merlin regulates its stability and tumor suppressive activity. *Cell Adh Migr* **1**, 196-198 (Oct, 2007).
94. H. Jin, T. Sperka, P. Herrlich, H. Morrison, Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* **442**, 576-579 (Aug 3, 2006).
95. J. M. Lasak, D. B. Welling, E. M. Akhmametyeva, M. Salloum, L. S. Chang, Retinoblastoma-cyclin-dependent kinase pathway deregulation in vestibular schwannomas. *Laryngoscope* **112**, 1555-1561 (Sep, 2002).
96. T. H. Mogensen, Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* **22**, 240-273, Table of Contents (Apr, 2009).
97. M. Muccioli, L. Sprague, H. Nandigam, M. Pate, F. Benencia, Toll-like receptors as novel therapeutic targets for ovarian cancer. *ISRN oncology* **2012**, 642141 (2012).
98. A. Iwasaki, R. Medzhitov, Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-995 (Oct, 2004).
99. R. Lüllmann-Rauch, in *Taschenlehrbuch Histologie*, Blut und Blutbildung. (Thieme, Stuttgart, 2006), pp. 260-282.
100. J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann, Die Unterscheidung von Selbst und Fremd im Immunsystem, A. Bob, K. Bob, Eds. (Thieme, Stuttgart, 2008), pp. 692-735.
101. F. Horn *et al.*, in *Biochemie des Menschen*. , Das Immunsystem, F. Horn *et al.*, Eds. (Thieme, Stuttgart, 2005), pp. 577-603.
102. J. A. Punt, J. L. Roberts, K. P. Kearse, A. Singer, Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains

- one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains. *J Exp Med* **180**, 587-593 (Aug 1, 1994).
103. K. L. Knutson, M. L. Disis, Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 721-728 (Aug, 2005).
 104. J. P. Allison, A. A. Hurwitz, D. R. Leach, Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr Opin Immunol* **7**, 682-686 (Oct, 1995).
 105. G. Yang, K. E. Hellstrom, L. Chen, The role of B7-2 (CD86) in tumour immunity. *Expert opinion on investigational drugs* **6**, 677-684 (Jun, 1997).
 106. S. L. Constant, K. Bottomly, Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annual review of immunology* **15**, 297-322 (1997).
 107. F. Macian, NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**, 472-484 (Jun, 2005).
 108. T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, R. L. Coffman, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* **136**, 2348-2357 (Apr 1, 1986).
 109. F. Fallarino *et al.*, Th1 and Th2 cell clones to a poorly immunogenic tumor antigen initiate CD8+ T cell-dependent tumor eradication in vivo. *J Immunol* **165**, 5495-5501 (Nov 15, 2000).
 110. R. F. Wang, The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends in immunology* **22**, 269-276 (May, 2001).
 111. K. Hung *et al.*, The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine* **188**, 2357-2368 (Dec 21, 1998).
 112. M. Altomonte, E. Fonsatti, A. Visintin, M. Maio, Targeted therapy of solid malignancies via HLA class II antigens: a new biotherapeutic approach? *Oncogene* **22**, 6564-6569 (Sep 29, 2003).
 113. K. Trieb *et al.*, Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma. *Pathology, research and practice* **194**, 679-684 (1998).
 114. S. Chuvpilo *et al.*, Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* **16**, 881-895 (Jun, 2002).
 115. J. P. Viola, L. D. Carvalho, B. P. Fonseca, L. K. Teixeira, NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res* **38**, 335-344 (Mar, 2005).
 116. F. Macian, C. Lopez-Rodriguez, A. Rao, Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489 (Apr 30, 2001).
 117. H. Yoshida *et al.*, The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* **8**, 115-124 (Jan, 1998).
 118. A. Kiani, J. P. Viola, A. H. Lichtman, A. Rao, Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* **7**, 849-860 (Dec, 1997).

119. B. K. Robbs, A. L. Cruz, M. B. Werneck, G. P. Mognol, J. P. Viola, Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol* **28**, 7168-7181 (Dec, 2008).
120. K. M. Latinis *et al.*, Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J Immunol* **158**, 4602-4611 (May 15, 1997).
121. M. S. Caetano *et al.*, NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J* **16**, 1940-1942 (Dec, 2002).
122. M. Buchholz, V. Ellenrieder, An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell Cycle* **6**, 16-19 (Jan 1, 2007).
123. J. Rengarajan *et al.*, Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity* **12**, 293-300 (Mar, 2000).
124. J. Jain, P. G. McCaffrey, V. E. Valge-Archer, A. Rao, Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* **356**, 801-804 (Apr 30, 1992).
125. J. Jain, Z. Miner, A. Rao, Analysis of the preexisting and nuclear forms of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol* **151**, 837-848 (Jul 15, 1993).
126. F. Macian, C. Garcia-Rodriguez, A. Rao, Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J* **19**, 4783-4795 (Sep 1, 2000).
127. J. Rengarajan *et al.*, Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* **195**, 1003-1012 (Apr 15, 2002).
128. M. R. Hansen, F. H. Linthicum, Jr., Expression of neuregulin and activation of erbB receptors in vestibular schwannomas: possible autocrine loop stimulation. *Otol Neurotol* **25**, 155-159 (Mar, 2004).
129. J. K. Doherty, W. Ongkeko, B. Crawley, A. Andalibi, A. F. Ryan, ErbB and Nrg: potential molecular targets for vestibular schwannoma pharmacotherapy. *Otol Neurotol* **29**, 50-57 (Jan, 2008).
130. U. Fisch, [Surgical treatment of morbus Meniere (author's transl)]. *Arch Otorhinolaryngol* **212**, 385-391 (Sep 16, 1976).
131. B. A. Neff *et al.*, Cyclin D(1) and D(3) expression in vestibular schwannomas. *Laryngoscope* **116**, 423-426 (Mar, 2006).
132. P. Caye-Thomasen, R. Borup, S. E. Stangerup, J. Thomsen, F. C. Nielsen, Deregulated Genes in Sporadic Vestibular Schwannomas. *Otol Neurotol*, (Oct 7, 2009).
133. M. Lottrich *et al.*, Expression of transforming growth factor-beta receptor type 1 and type 2 in human sporadic vestibular Schwannoma. *Pathol Res Pract* **203**, 245-249 (2007).
134. M. Aarhus *et al.*, Global Gene Expression Profiling and Tissue Microarray Reveal Novel Candidate Genes and Down-Regulation of the Tumor Suppressor Gene CAV1 in Sporadic Vestibular Schwannomas. *Neurosurgery* **67**, 998-1019 (Oct, 2010).
135. L. Lassaletta, V. Martinez-Glez, M. Torres-Martin, J. A. Rey, J. Gavilan, cDNA microarray expression profile in vestibular schwannoma:

- correlation with clinical and radiological features. *Cancer Genet Cytogenet* **194**, 125-127 (Oct 15, 2009).
136. P. Gonzalez-Gomez *et al.*, CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. *Clin Cancer Res* **9**, 5601-5606 (Nov 15, 2003).
 137. V. S. Catts *et al.*, A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue. *Brain research. Molecular brain research* **138**, 164-177 (Aug 18, 2005).
 138. A. J. Barton, R. C. Pearson, A. Najlerahim, P. J. Harrison, Pre- and postmortem influences on brain RNA. *J Neurochem* **61**, 1-11 (Jul, 1993).
 139. A. D. Stan *et al.*, Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain research* **1123**, 1-11 (Dec 6, 2006).
 140. H. Tomita *et al.*, Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry* **55**, 346-352 (Feb 15, 2004).
 141. M. Heinrich, K. Matt, S. Lutz-Bonengel, U. Schmidt, Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med* **121**, 136-142 (Mar, 2007).
 142. A. E. Kingsbury *et al.*, Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Brain research. Molecular brain research* **28**, 311-318 (Feb, 1995).
 143. P. J. Harrison *et al.*, The relative importance of pre-mortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci Lett* **200**, 151-154 (Nov 24, 1995).
 144. A. W. Clark, P. M. Tran, I. M. Parhad, C. A. Krekoski, J. P. Julien, Neuronal gene expression in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Molecular brain research* **7**, 75-83 (Jan, 1990).
 145. G. Mengod, M. M. Vivanco, A. Christnacher, A. Probst, J. M. Palacios, Study of pro-opiomelanocortin mRNA expression in human postmortem pituitaries. *Brain research. Molecular brain research* **10**, 129-137 (May, 1991).
 146. A. Schroeder *et al.*, The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* **7**, 3 (2006).
 147. O. Mueller *et al.*, A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* **21**, 128-134 (Jan, 2000).
 148. S. Imbeaud *et al.*, Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic acids research* **33**, e56 (2005).
 149. R. C. Gentleman *et al.*, Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* **5**, R80 (2004).
 150. R. A. Irizarry *et al.*, Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264 (Apr, 2003).
 151. R. A. Irizarry *et al.*, Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**, e15 (Feb 15, 2003).

152. G. K. Smyth, J. Michaud, H. S. Scott, Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**, 2067-2075 (May 1, 2005).
153. Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B* **57**, 289-300 (1995).
154. M. A. Stalteri, A. P. Harrison, Interpretation of multiple probe sets mapping to the same gene in Affymetrix GeneChips. *BMC Bioinformatics* **8**, 13 (2007).
155. J. Harbig, R. Sprinkle, S. A. Enkemann, A sequence-based identification of the genes detected by probesets on the Affymetrix U133 plus 2.0 array. *Nucleic Acids Res* **33**, e31 (2005).
156. P. Selvaraj, N. Fifadara, S. Nagarajan, A. Cimino, G. Wang, Functional regulation of human neutrophil Fc gamma receptors. *Immunologic research* **29**, 219-230 (2004).
157. A. Sulica, P. Morel, D. Metes, R. B. Herberman, Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int Rev Immunol* **20**, 371-414 (Jun, 2001).
158. F. Jonsson, M. Daeron, Mast cells and company. *Front Immunol* **3**, 16 (2012).
159. L. Lassaletta *et al.*, Cyclin D1 expression and histopathologic features in vestibular schwannomas. *Otol Neurotol* **28**, 939-941 (Oct, 2007).
160. D. J. Archibald *et al.*, B7-H1 expression in vestibular schwannomas. *Otol Neurotol* **31**, 991-997 (Aug, 2010).
161. B. Clemenceau *et al.*, FcγRIIIa (CD16) induction on human T lymphocytes and CD16pos T-lymphocyte amplification. *J Immunother* **34**, 542-549 (Sep, 2011).
162. L. L. Lanier, T. J. Kipps, J. H. Phillips, Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *The Journal of experimental medicine* **162**, 2089-2106 (Dec 1, 1985).
163. S. Kanowitz-Klein, A. Saxon, Fc epsilon receptors on human cell lines and peripheral blood lymphocytes detected by binding of IgE immune complexes. *Journal of clinical immunology* **5**, 38-45 (Jan, 1985).
164. H. R. Rodewald, A. R. Arulanandam, S. Koyasu, E. L. Reinherz, The high affinity Fc epsilon receptor gamma subunit (Fc epsilon RI gamma) facilitates T cell receptor expression and antigen/major histocompatibility complex-driven signaling in the absence of CD3 zeta and CD3 eta. *J Biol Chem* **266**, 15974-15978 (Aug 25, 1991).
165. A. J. Korman *et al.*, Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. *Immunol Rev* **85**, 45-86 (Jul, 1985).
166. M. L. Rossi *et al.*, Mononuclear cell infiltrate and HLA-Dr expression in 28 pituitary adenomas. *Tumori* **76**, 543-547 (Dec 31, 1990).
167. M. L. Rossi *et al.*, Mononuclear cell infiltrate and HLA-DR expression in low grade astrocytomas. An immunohistological study of 23 cases. *Acta Neuropathol* **76**, 281-286 (1988).
168. E. Ioachim-Velogianni, N. E. Stavropoulos, E. Kitsiou, S. Stefanaki, N. J. Agnantis, HLA-DR antigen expression and lymphocyte subsets in

- transitional cell carcinoma of the urinary bladder. An immunohistological study on frozen sections. *J Pathol* **174**, 183-189 (Nov, 1994).
169. C. M. Porter, N. A. Clipstone, Sustained NFAT signaling promotes a Th1-like pattern of gene expression in primary murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* **168**, 4936-4945 (May 15, 2002).
 170. M. R. Hodge *et al.*, Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* **4**, 397-405 (Apr, 1996).
 171. J. P. Viola, A. Kiani, P. T. Bozza, A. Rao, Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* **91**, 2223-2230 (Apr 1, 1998).
 172. S. Monticelli, A. Rao, NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. *Eur J Immunol* **32**, 2971-2978 (Oct, 2002).
 173. V. C. Kyttaris, Y. Wang, Y. T. Juang, A. Weinstein, G. C. Tsokos, Increased levels of NF-ATc2 differentially regulate CD154 and IL-2 genes in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **178**, 1960-1966 (Feb 1, 2007).
 174. I. Remy, S. W. Michnick, Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt. *Mol Cell Biol* **24**, 1493-1504 (Feb, 2004).
 175. A. M. Ranger *et al.*, Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* **8**, 125-134 (Jan, 1998).
 176. S. L. Peng, A. J. Gerth, A. M. Ranger, L. H. Glimcher, NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* **14**, 13-20 (Jan, 2001).
 177. A. Kiani *et al.*, Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood* **98**, 1480-1488 (Sep 1, 2001).
 178. S. Baumann *et al.*, An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells. *Oncogene* **22**, 1333-1339 (Mar 6, 2003).
 179. S. C. Kao *et al.*, Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* **323**, 651-654 (Jan 30, 2009).
 180. C. Laudanna, J. Y. Kim, G. Constantin, E. Butcher, Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews* **186**, 37-46 (Aug, 2002).
 181. V. A. Guazzone, P. Jacobo, B. Denduchis, L. Lustig, Expression of cell adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors involved in leukocyte traffic in rats undergoing autoimmune orchitis. *Reproduction*, (Feb 20, 2012).
 182. D. Nelson, R. Ganss, Tumor growth or regression: powered by inflammation. *J Leukoc Biol* **80**, 685-690 (Oct, 2006).
 183. B. Huang, J. Zhao, J. C. Unkeless, Z. H. Feng, H. Xiong, TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* **27**, 218-224 (Jan 7, 2008).
 184. M. Zhou *et al.*, Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1375-1385 (Sep, 2009).

185. J. Schultze, L. M. Nadler, J. G. Gribben, B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood reviews* **10**, 111-127 (Jun, 1996).
186. B. K. Martin, J. G. Frelinger, J. P. Ting, Combination gene therapy with CD86 and the MHC class II transactivator in the control of lung tumor growth. *J Immunol* **162**, 6663-6670 (Jun 1, 1999).
187. S. H. Lee *et al.*, In vivo rejection of tumor cells dependent on CD8 cells that kill independently of perforin and FasL. *Cancer Gene Ther* **11**, 237-248 (Mar, 2004).
188. W. Sun *et al.*, Induction of protective and therapeutic antitumour immunity using a novel tumour-associated antigen-specific DNA vaccine. *Immunology and cell biology* **84**, 440-447 (Oct, 2006).
189. K. Kajino, Y. Kajino, M. I. Greene, Fas- and perforin-independent mechanism of cytotoxic T lymphocyte. *Immunologic research* **17**, 89-93 (1998).

Danksagung

an Herrn Prof. Dr. med. Boris Krischek, für die sehr gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation. Außerdem für 2 herausragende Auslandsaufenthalte in Brüssel und Toronto, die mich beruflich und persönlich überaus weiter brachten.

an Herrn Dr. med. Constantin Roder, für die sehr gute Betreuung zu Anfangs meiner Arbeit in der Arbeitsgruppe.

an alle Patienten und Verstorbenen, die an der Studie teilgenommen haben. Sie haben das Fundament für diese Arbeit gelegt und sind maßgeblich an meiner Dissertation und den damit verbundenen Ergebnisse beteiligt.

an meine Freunde (herausragend Johannes, Janika, Gian, Jasmin, Eva und Tamara), die immer für mich da waren und mir mit Rat und Tat beiseite standen.

an meinen Bruder Christian, der immer, zu jeder Tag- und Nachtzeit, für mich da ist und mich in jeder Lebenslage unterstützt.

vor allem an meine Eltern, die mich immer gefördert, geliebt und unterstützt haben.