

# **Identifizierung von Tumormarkern im Vestibularisschwannom**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Clara Helene Klause

Erstbetreuer: Prof. Dr. med. Christian Strauss

Zweitbetreuer: Prof. Dr. med. Christian Scheller

Gutachter: Prof. Rüdiger Horstkorte, Halle (Saale)  
PD Maria Breun, Würzburg

Datum der Verteidigung: 10.12.2025

## Referat

Das Vestibularisschwannom (VS) stellt den häufigsten gutartigen Tumor des Kleinhirnbrückenwinkels dar. Das individuelle Wachstumsverhalten des VS, dessen molekulare Ursachen weitgehend unbekannt sind, ist therapieentscheidend. Während sich Patienten mit einem kleinen, stagnierendem VS regelmäßigen Magnetresonanztomographie (MRT)-Kontrolluntersuchungen unterziehen (*Wait and Scan*), werden große oder progrediente VS bestrahlt, radiochirurgisch behandelt oder mikrochirurgisch entfernt. Aufgrund der Unvorhersehbarkeit des Wachstumsverhaltens fällt es oft schwer, den richtigen Zeitpunkt für eine Behandlung festzulegen.

Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, mögliche Einflussfaktor auf die Volumenzunahme des VS zu identifizieren. Untersucht wurde zum einen der Einfluss von Proliferations-, Entzündungs- und Makrophagenmarkern in einer Kohorte von 173 Patienten mit unterschiedlich großen VS und zum anderen der Einfluss von Tumorstammzellmarkern bei 165 betroffenen Patienten.

Die unterschiedlichen Marker wurden quantitativ mittels PCR in der RNA, die aus den Tumorproben gewonnen wurde, bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit dem aus präoperativen MRT-Bildern bestimmten Tumolvolumen und der Wachstumsrate der VS korreliert. Zusätzlich erfolgte eine immunhistochemische Analyse der Proliferations-, Entzündungs- und Makrophagenmarker, sowie eine Analyse ausgewählter Tumorstammzellmarker mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und copy number variation (CNV) - Analyse.

In den Korrelationsanalysen zeigte sich eine signifikant negative Korrelation des Tumolvolumens mit den Proliferationsmarkern COX2 und Ki-67. Signifikant positiv korrelierten dagegen die Makrophagenmarker CD68 und CD163 mit dem Tumolvolumen. Diese Ergebnisse ließen sich mittels Immunhistochemie bestätigen. Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression der Makrophagenmarker in schnell-wachsenden VS nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Tumorstammzellmarker konnten fünf signifikant positiv und drei negativ korrelierende Marker identifiziert werden. Mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie wurden in verschiedenen VS Primärkulturen Tumorstammzellmarker detektiert. Zusätzlich erfolgte ein histologischer Nachweis von zwei Tumorstammzellmarkern in den Tumorproben.

Die Ergebnisse weisen auf einen geringen Einfluss der Proliferation der Schwannomzellen selbst hin. Zu einer Größenzunahme führt der Einfluss von Makrophagen, speziell von Tumor-assoziierten Makrophagen. Zudem scheinen auch Tumorstammzellen an einem Wachstum von VS beteiligt zu sein. Die Identifizierung möglicher Einflussfaktoren bietet die Chance einer gezielten pharmakologischen Therapie zur Vermeidung der VS-Proliferation.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung und Zielstellung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Das sporadische Vestibularisschwannom.....	1
1.1.1. Pathologie .....	1
1.1.2. Diagnostik.....	2
1.1.3. Therapiemöglichkeiten.....	4
1.1.4. Molekulare Pathogenese und Histopathologie .....	5
1.2. Das Neurofibromatose Typ 2-assoziierte Vestibularisschwannom.....	7
1.3. Einflussfaktoren auf die Tumorzunahme .....	8
1.4. Gewinnung von VS-Primärkulturen .....	12
1.5. Zielstellung .....	13
<b>2. Diskussion .....</b>	<b>14</b>
2.1. Einfluss von Makrophagen auf die Progression des Vestibularisschwannoms .....	14
2.2. Einfluss von Tumorstammzellen auf die Progression des Vestibularisschwannoms.....	18
2.3. Zusammenfassung und Ausblick.....	22
<b>3. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Thesen .....</b>	<b>30</b>
<b>Publikationsteil .....</b>	<b>31</b>
<i>Publikation 1: Vestibular Schwannoma Volume and Tumor Growth Correlates with Macrophage Marker Expression .....</i>	<i>32</i>
<i>Publikation 2: Establishment of vestibular schwannoma primary cell cultures obtained from cavitron ultrasonic surgical aspirator tissue material .....</i>	<i>51</i>
<b>Erklärung .....</b>	<b>VIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAO-HNS	American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery
ADAM9	Disintegrin And Metalloproteinase Domain-Containing Protein 9
ALPK2	Alpha Kinase 2
ARID1A	AT-rich interaction domain 1A
ARID1B	AT-rich interaction domain 1B
CAST	Calpastatin
CD	cluster of differentiation
CNV	Copy number variation
COX	Cyclooxygenase
CUSA	Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator
CXCR4	Chemokine receptor-4
DDR1	Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
IHC	Immunhistochemie
Ki-67	Kiel-67
LZTR1	leucine zipper like transcription regulator 1
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
miRNA	micro-ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NF	Neurofibromatose
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
OCT4	octamer-binding protein 4
PDGFR	Platelet-derived growth factor
RNAseq	RNA sequencing



SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TAB3	TGF-Beta Activated Kinase 1 Binding Protein 3
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TSC1	Tuberous Sclerosis 1 Protein
TSC2	Tuberous Sclerosis 2 Protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VS	Vestibularisschwannom

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Verdeutlichung der anatomischen Lage des Vestibularisschwannoms im Kleinhirnbrückenwinkel.....	1
<b>Abbildung 2:</b> Kontrastmittel-gestützte MRT-Aufnahmen von Vestibularisschwannomen der vier Koos Grade.....	3
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung der TPM von Ki-67, CD68 und CD163 in zehn Tumorproben und den zehn entsprechenden Proben von Vestibularnerven.....	15
<b>Abbildung 4:</b> Beitrag der Tumorstammzellmarker zur Entstehung von Tumorzellen.....	19
<b>Abbildung 5:</b> Zusammenfassende Darstellung möglicher Einflussfaktoren auf die Volumenzunahme von VS.....	23

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Koos Klassifikation der Vestibularisschwannome.....	2
<b>Tabelle 2:</b> Hörklassifikation nach AAO-HNS zur Beurteilung der Hörfunktion von Patienten mit Vestibularisschwannomen.....	3
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht über mögliche Einflussfaktoren auf die Proliferation von VS.....	10

# 1. Einleitung und Zielstellung

## 1.1. Das sporadische Vestibularisschwannom

### 1.1.1. Pathologie

Das Vestibularisschwannom (VS), veraltet als Akustikusneurinom bezeichnet, ist mit 8% einer der häufigsten intrakraniellen Tumore. Dabei handelt es sich um einen gutartigen Tumor, der von den Schwannzellen ausgeht, die den vestibulären Anteil des *Nervus vestibulocochlearis* umgeben [1]. Im Erwachsenenalter stellt das VS mit ca. 80% den häufigsten Tumor im Kleinhirnbrückenwinkel dar [2]. Das VS tritt mit einer Inzidenz von ca. 0,2 bis 1,7 VS pro 100.000 Einwohner auf, wobei die Inzidenz aufgrund des Fortschritts/der Verbesserung radiologischer Aufnahmen über die letzten Jahre deutlich gestiegen ist [3]. Es liegt in beiden Geschlechtern eine gleichmäßige Verteilung der Entwicklung des VS vor, wobei ab dem 50. Lebensjahr die Häufigkeit zu nimmt [3,4]. Am häufigsten tritt es einseitig in Form eines sporadischen VS auf [2].

Das VS kann sich durch unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome manifestieren, welche sich durch die anatomische Lage im Kleinhirnbrückenwinkel erklären lassen [3] (Abbildung 1).

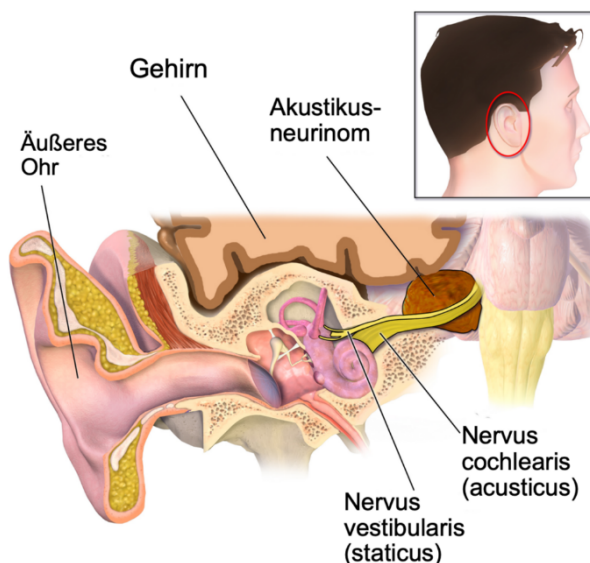


Abbildung 1: Verdeutlichung der anatomischen Lage des Vestibularisschwannoms im Kleinhirnbrückenwinkel (<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ee/Akustikusneurinom-de.png>, Abruf: 19.07.2024)

Aufgrund einer Beteiligung des *Nervus cochlearis* kommt es bei der Mehrheit der Patienten zu einer einseitigen Hörminderung bis hin zu einem Hörverlust [5]. 83% der betroffenen Patienten berichten zudem über einen einseitigen Tinnitus und häufig werden zusätzlich Gangunsicherheiten verspürt [2]. Weitere, das Gleichgewichtssystem-betreffende, Symptome

wie Drehschwindel sind eher selten, da es durch das langsame Wachstum zu einer kompensatorischen Übernahme der Nervenfunktion des kontralateralen Vestibularorgans kommt [3]. Dennoch gibt es voluminöse VS, die zu einer stärkeren Symptomatik führen. Dabei kommt es zur Verdrängung der umliegenden Hirnnerven, wie des *Nervus trigeminus* oder des *Nervus facialis*. Dies kann zu Dys- und Hypästhesien im Versorgungsgebiet des *Nervus trigeminus* führen und eine periphere Fazialisparese, sowie Geschmacksstörungen auslösen. Besonders VS großen Volumens können zusätzlich zur Verdrängung des Hirnstamms oder des Kleinhirns führen und Hirndrucksymptomatik hervorrufen. Dies äußert sich durch einen Hydrozephalus mit Übelkeit und Kopfschmerzen, Intentionstremor, schwere Gangstörungen, Dysdiadochokinese oder Ausfallerscheinungen der kaudalen Hirnnerven [3].

### 1.1.2. Diagnostik

Die Grundlage der Diagnostik eines VS ist eine ausführliche Anamnese des Patienten, um typische Symptome zu erfragen. Zusätzlich sollte eine körperliche und neurologische Untersuchung erfolgen [3]. Bei Verdacht eines VS stellt die Aufnahme eines kontrastmittel-gestützten T1-gewichteten MRT-Bildes den Goldstandard in der Diagnostik dar [2]. International hat sich die bildmorphologische Einteilung in vier Grade, die sogenannten Koos Grade, etabliert [6,7]. Diese geben Auskunft über die Größe und Ausdehnung des VS (Tabelle 1, Abbildung 2).

Im MRT zeigen sich VS kleinen Volumens hauptsächlich als kontrastmittel-aufnehmende, rund ovale Struktur mit einem konvexen Rand (Abbildung 2a). Extrameatale VS zeigen eine kontrastmittel-aufnehmende, kugelförmige Form mit einer trichterförmigen Komponente (Abbildung 2b-d). Typisch für größere VS ist in einer Gadolinium gewichteten Aufnahme ein inhomogener Kontrast, der kennzeichnend für nekrotische oder zystische Anteile im VS ist (Abbildung 2d) [8].

*Tabelle 1: Koos Klassifikation der Vestibularisschwannome*

Koos Grad	Beschreibung	Tumorgroße
1	Ausschließlich intrameatal liegender Tumor	< 10mm
2	Hauptsächlich intrameatal liegender Tumor, der Richtung Kleinhirnbrückenwinkel wächst, kein Kontakt zum Hirnstamm	<20mm
3	Im Kleinhirnbrückenwinkel liegender Tumor mit Kontakt zum Hirnstamm, jedoch ohne Verdrängung	<30mm
4	Tumor mit Verdrängung des Hirnstamms und umliegender Hirnnerven	>30mm

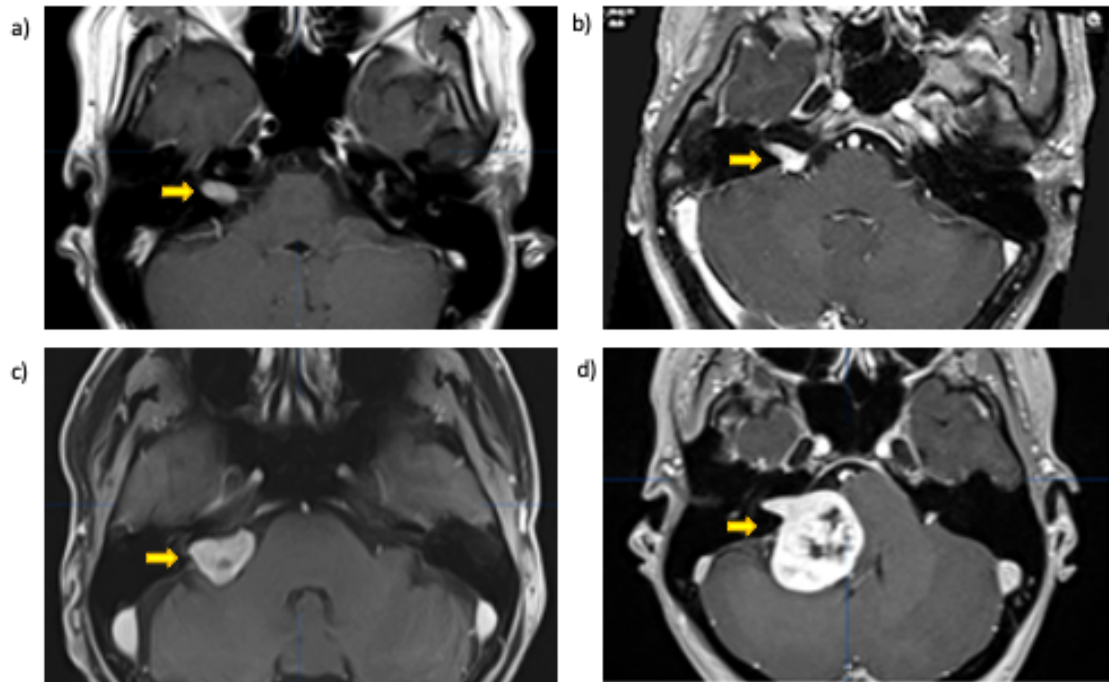


Abbildung 2: Kontrastmittel-gestützte MRT-Aufnahmen von Vestibularisschwannomen der vier Koos Grade. Die gelben Pfeile weisen auf das Vestibularisschwannom. A) Koos 1-2, b) Koos 2, c) Koos 3, d) Koos 4

Zusätzlich zur Untersuchung mittels MRT kann die Hörminderung des Patienten mit Hilfe verschiedener audiometrischer Testungen untersucht werden. Wichtig sind die Durchführung einer Tonaudiometrie und einer Sprachaudiometrie. Es sind keine typischen Veränderungen in der Tonaudiometrie detektierbar, dennoch kann eine kontinuierlich abfallende Schallempfindungsschwelle für das Vorliegen eines VS sprechen [3]. Es existieren verschiedene Hörklassifikationen, die zur Beurteilung der Hörfunktion betroffener Patienten etabliert sind. Dabei entscheidend sind der Mittelwert der Reintonhörschwellen (pure tone average) bei unterschiedlichen Frequenzen und die Sprachdiskrimination [9]. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete Hörklassifikation nach der American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery (AAO-HNS) beinhaltet 4 Hörklassen [9] (Tabelle 2). Ergänzt wurde diese Klassifikation um die Hörklasse DS bei präoperativ tauben Patienten.

Tabelle 2: Hörklassifikation nach AAO-HNS zur Beurteilung der Hörfunktion von Patienten mit Vestibularisschwannomen

Klasse	Pure tone average (0,5; 1; 2; 3kHz) (dB)	Sprachdiskrimination (%)
A	≤ 30	≥ 70
B	> 30 und ≤ 50	≥ 50
C	> 50	≥ 50
D	Alle Schwellen	< 50

Als zusätzliche diagnostische Maßnahme können frühe akustisch evozierte Potenziale gemessen werden, um bei einer Hörstörung zwischen einer cochleären und retrocochleären Störung zu differenzieren. Typisch für Patienten mit einem VS können eine abnorme Wellenform, das Fehlen oder die schlechte Reproduzierbarkeit von Wellen Zeichen für eine retrocochleäre Störung sein [3].

Wichtig ist die abschließende zusammenhängende Betrachtung der erhobenen Befunde, um die Verdachtsdiagnose eines VS stellen zu können.

### 1.1.3. Therapiemöglichkeiten

Die Therapie des VS unterscheidet sich je nach Größe des Befundes und muss individuell mit dem Patienten besprochen werden.

Kleine asymptomatische VS können mittels „Wait and Scan“ behandelt werden. Dabei handelt es sich um eine passive Vorgehensweise, bei der das VS regelmäßig mittels MRT-Untersuchungen und audiometrischen Testungen überwacht wird. Essentiell für diese Vorgehensweise ist eine gute Compliance des Patienten, da dieser regelmäßig zu den Folgeuntersuchungen erscheinen muss. Ziel ist es, durch die regelmäßige Untersuchung, Informationen über das Wachstumsverhalten des VS zu erlangen, um den möglicherweise nötigen Zeitpunkt einer chirurgischen Therapie festlegen zu können. Aus Mangel an einem verlässlichen prädiktiven Faktor, der das Wachstum des VS anzeigen könnte, stellt die regelmäßige MRT-Untersuchung die einzige Möglichkeit zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens des VS dar [2]. Die Angaben zur Wahrscheinlichkeit der Tumorzunahme variieren stark und geben eine Wahrscheinlichkeit von 12,3% bis 76,3% an [10]. Im Durchschnitt kommt es bei ca. 50% der VS in den folgenden 5 Jahren zu einem Wachstum [11]. Sollte eine Tumorzunahme des VS festgestellt werden oder der Befund bereits initial sehr groß sein, sollte eine aktive Behandlung des VS erfolgen.

Die Entscheidung für eine mikrochirurgische Entfernung des VS sollte im Hinblick auf das Tumorzunahmenvolumen, die Lage und die aktuelle Symptomatik des Patienten getroffen werden. Besonders Koos 4 VS sollten direkt operativ entfernt werden. Die Entscheidung für den Zugangsweg der Operation muss je nach Ausmaß und Lage des Befundes getroffen werden, wobei der suboccipital retrosigmoidale oder der translabyrinthäre Zugangsweg favorisiert werden [2]. Ziel ist die totale Entfernung des VS, da Residuen eine erhöhte Rezidivrate mit sich bringen [12]. Für die Planung der Operation ist der Erhalt der Hörfunktion und die Schonung des

*Nervus facialis* des Patienten ein wichtiger Einflussfaktor. Günstig für den Hörerhalt sind ein kleiner Befund und eine gute präoperative Hörfunktion. Zusätzlich können ein intraoperatives Neuromonitoring und eine Überwachung der Nervenfunktion zu einem besseren postoperativen Outcome beitragen [2]. Mögliche Komplikationen bestehen in einem postoperativen Hörverlust, einer Fazialisparese oder der Entstehung einer Liquorfistel. Schwerwiegende Komplikationen, wie Blutungen oder Infarkte, sind sehr selten [1].

Eine Alternative zur mikrochirurgischen Entfernung des VS stellt die Radiochirurgie bzw. die Radiotherapie dar. Diese kann stereotaktisch einmalig bei kleinen bis mittleren VS erfolgen und beruht auf einer hoch dosierten präzisen Bestrahlung des Tumors. Eine bekannte stereotaktische Radiotherapie ist das CyberKnife, welches mit 11 bis 14 Gy arbeitet. Es bietet insbesondere für kleinere Befunde eine gute, weniger invasive Möglichkeit der Behandlung und zeigt ähnliche Ergebnisse beim Erhalt der Hörfunktion wie eine mikrochirurgische Operation [13]. Bei größeren Tumoren kann die Bestrahlung hypofraktioniert in mehreren Schritten erfolgen [2]. Dabei wird das VS täglich mit 1,8 bis 2 Gy fünfmal die Woche bestrahlt. Fraktionierte Radiotherapie kann bei großen VS als Primärtherapie angewandt werden. Besonders wichtig für die Lebensqualität des Patienten ist hier der Erhalt der intrakraniellen Nervenfunktionen [14].

Bis zum aktuellen Zeitpunkt gibt es in der Behandlung von sporadischen VS keine systemische medikamentöse Therapie. Verschiedene pathogenetische Mechanismen wurden bereits mit dem Ziel einer pharmakologischen Behandlung untersucht. Nichtsdestotrotz gibt es keine Level I Studie zu einem möglichen Medikament [2]. Untersucht wurde die Therapie mit dem mTOR complex 1 Inhibitor Everolimus, der jedoch nicht zu einem verminderten Wachstum des VS führte [15]. Eine Behandlung mit dem irreversiblen Cyclooxygenase (COX) -1 und -2 Hemmer Aspirin zeigte ebenfalls keinen Effekt auf das Tumolvolumen [1].

Eine individuelle Therapieentscheidung sollte unter Einbezug des Befundes und des Patientenwillens getroffen werden, um dem Patienten ein möglichst symptomarmes Leben zu ermöglichen.

#### 1.1.4. Molekulare Pathogenese und Histopathologie

Die molekulare Pathogenese der sporadischen VS wurde im Verlauf der letzten Jahre genauer untersucht. Die sporadischen VS entstehen mit 77% am häufigsten durch eine Mutation des Neurofibromatose Typ 2 Gens (*NF2*), welches das Tumorsuppressorprotein Moesin-ezrin-radixin like (Merlin) codiert und sich auf dem Chromosom 22 befindet. Das VS kann durch eine mutationsbedingte Veränderung des *NF2* Gens, beispielsweise durch eine Deletion oder



Insertion von *NF2*, oder durch eine Methylierung des *NF2*-Promotors entstehen [16]. Dadurch kommt es zum Funktionsverlust von Merlin. Dabei handelt es sich um ein Protein des Zytoskeletts, welches essentiell für die Verknüpfung des Aktin-Zytoskeletts mit der Plasmamembran ist. Des Weiteren wirkt Merlin tumorsuppressiv, da es die Zellproliferation durch Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen hemmt [17]. Durch den Verlust dieser tumorsuppressiven Funktion kommt es zur Aktivierung tumoraler Signalwege, die zu einer vermehrten Zellproliferation führen [16].

Eine weitere häufige Ursache der Entstehung von VS liegt in einer Mutation von AT-rich interaction domain 1A (*ARID1A*) oder AT-rich interaction domain 1B (*ARID1B*) [18]. Dabei handelt es sich um Gene, die für einen Teil des SWitch/Sucose Non-Fermentable (*SWI/SNF*) - Komplexes codieren und so die Chromatinstruktur verändern können. Dadurch ist es ihnen möglich, die Transkription zu regulieren [19]. Eine Mutation dieser Gene ist bereits in malignen Tumoren, wie im Mammakarzinom bekannt [20]. Das eine Rezeptortyrosinkinase-codierende Gen Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1 (*DDR1*) ist ebenfalls aus der Entstehung anderer Tumore bekannt und spielt in der Entstehung von VS eine Rolle [18,21]. Eine Mutation der beiden Tumorsuppressorgene Tuberous Sclerosis 1 Protein (*TSC1*) und Tuberous Sclerosis 1 Protein (*TSC2*), die an der Regulation des Zellwachstum und der Proteinsynthese beteiligt sind, konnte in einigen Fällen als Ursache der VS-Entstehung nachgewiesen werden [18,22]. Weitere pathogenetische Ursachen können in einer Mutation von Calpastatin (*CAST*), Alpha Kinase 2 (*ALPK2*), leucine zipper like transcription regulator 1 (*LZTR1*) und TGF-Beta Activated Kinase 1 Binding Protein 3 (*TAB3*) liegen. Diese stellen allerdings nur selten die Ursache für die Entstehung von VS dar [18].

Im histologischen Bild stellen sich die Zellen des VS als mittelgroß und spindelartig geformt dar. Die Tumorzellen sind häufig fischzugartig angeordnet und zeigen wechselnde Abschnitte von palisadenförmig kernreichen und kernarmen Arealen. Diese wechselnden Bereiche sind typisch für das VS und werden als Verocay-Körperchen bezeichnet. Die eher zellichten Areale des VS entsprechen dem Antoni-Typ A, während zellarme Bereiche, die von lipidreichen Schwannzellen durchsetzt sind, für einen Antoni-Typ B sprechen. Im konventionellen VS liegen beide Areale ausgeglichen vor. Zusätzlich fallen im histologischen Schnitt dickwandige Gefäße mit teils frischen oder älteren Blutungen auf [16].

## 1.2. Das Neurofibromatose Typ 2-assoziierte Vestibularisschwannom

4 bis 6 % der VS kommen beidseitig vor und sind mit einem Auftreten erblich bedingter Neurofibromatose (NF) Typ 2 assoziiert [2]. Dabei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit Manifestationen im zentralen Nervensystem, den Augen und an der Haut. Beidseitige VS stellen hier den häufigsten neurologischen Befund dar, wobei auch Tumore wie Meningeome, Ependymome oder Astrozytome auftreten können. Typische weitere Symptome betreffen das Auge, wie ein Katarakt, oder subkutane Tumore [23,24].

In der Behandlung des NF2-assoziierten VS ist zum aktuellen Zeitpunkt eine medikamentöse Behandlung zugelassen. Dabei handelt es sich um den monoklonalen Antikörper Bevacizumab. Dieser bindet an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), ein essentieller Faktor in der Angiogenese von Tumoren, wie zum Beispiel im Darm- oder Lungenkarzinom [25]. Bevacizumab hat in der Behandlung von NF2 assoziierten VS eine Zulassung, da es nachweislich die Wachstumsrate und das Risiko einer Progression verringern kann [25]. In der Therapie des sporadischen VS erfolgte dagegen bisher keine Zulassung des Antikörpers, obwohl eine Studie ein mögliches Ansprechen sporadischer VS auf die Behandlung zeigen konnte [26]. Die sonstige Therapie NF2 assoziierter VS unterscheidet sich nicht von der sporadischer VS.

Der häufigste Pathomechanismus, der zur Entstehung NF2 assoziierter VS führt, ist der Verlust beider Allele des *NF2* Gens. Dies führt bei den betroffenen Patienten zur Entstehung bilateraler VS [27].

### 1.3. Einflussfaktoren auf die Tumorumfangzunahme

Das Tumorumfang und die Wachstumsrate stellen in der Behandlung des VS therapieentscheidende Kriterien dar. Besonders wichtig ist es für den Patienten, den richtigen Zeitpunkt einer Therapie festzulegen und eine zu frühe interventionelle Behandlung des VS zu vermeiden. Der Erhalt der Hörfunktion stellt einen wichtigen Faktor in der VS-Therapie dar, da ein Hörverlust mit einer Einschränkung der Lebensqualität betroffener Patienten einhergeht.

Daher hat in den letzten Jahren das Interesse zugenommen, mögliche Einflussfaktoren auf die Tumorumfangzunahme zu identifizieren. Angaben zur Häufigkeit des Wachstums von VS variieren je nach Studie stark und zeigen die Wichtigkeit einer individuellen Behandlung betroffener Patienten deutlich. Angegeben wurde ein Wachstum des VS in 12,3 % bis 76,3 % je nach Nachbeobachtungszeit. Im Durchschnitt zeigte circa ein Drittel der VS innerhalb von zwölf Monaten eine Größenzunahme. Ab einer Beobachtungszeit von 48 Monaten stieg diese Tendenz auf 38% an. Nach 60 Monaten war ungefähr jedes zweite VS progredient [10]. Diese Zahlen weisen auf die Problematik hin, dass sich das Wachstum eines VS für den einzelnen Patienten nicht voraussagen lässt. In der Vergangenheit wurden bereits einige mögliche Einflussfaktoren auf die Tumorumfangzunahme untersucht.

Der klinische Parameter des Alters zum Zeitpunkt der Diagnose scheint für die Progression des VS keinen signifikanten Einfluss zu haben, da weder besonders junge noch besonders alte Betroffene ein vermehrtes Wachstum zeigten. Ähnlich verhält es sich mit dem Geschlecht des Betroffenen. Nicht nur die Inzidenz, sondern ebenso die Progression des VS ist in beiden Geschlechtern ungefähr gleich verteilt [10,28].

Das Auftreten bestimmter klinischer Symptome eignet sich als prädiktiver Faktor für die Tumorumfangzunahme ebenso wenig. Weder ein Auftreten von Hörverlust, Schwindel, Tinnitus oder Gangunsicherheit ist ein sicheres Zeichen dafür, dass das VS des Betroffenen in kürzerer Zeit wächst als bei anderen Patienten [10].

Bildmorphologisch lassen sich verschiedene mögliche Einflussfaktoren überprüfen. Die initiale Tumorgröße des VS spielt für die Wahrscheinlichkeit einer Wachstumszunahme keine Rolle. Ob ein Wachstum innerhalb des ersten Jahres zu einem vermehrten Wachstum in den Folgejahren führt, ist umstritten. Ursache hierfür ist die Verzerrung der Studienlage durch die aus unbekannten Gründen nicht durchgeführte interventionelle Behandlung der progredienten VS. Ebenfalls lassen sich die Tumorlokation und die Seite des Befundes mittels MRT untersuchen.

Jedoch wurde keine signifikante Tumorzunahme bei einem bestimmten Lagetypen nachgewiesen [10,29].

Aus Mangel klinischer Parameter, die prädiktiv für eine Tumorzunahme des VS sind, wurden in den letzten Jahren zunehmend molekulare Ursachen untersucht, die einen Einfluss haben könnten.

Bisher untersucht wurden Proteine, die am Stoffwechselweg von Merlin beteiligt sind, inflammatorische Prozesse, kanzerogene mikro-RNA (miRNA) und Proteine, sowie der Einfluss von Immunzellen [30]. Einen Einfluss auf die Funktion von Merlin und die damit verbundene tumorsuppressive Wirkung haben verschiedene Rezeptortyrosinkinasen wie der human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu), der Platelet-derived growth factor (PDGFR) oder Proteine, die am Ras-Signalweg beteiligt sind [30]. Nachgewiesen werden konnte, dass eine Überexpression von PDGFR und HER2/neu zu einem vermehrten Wachstum des VS führen [31,32].

Es gibt Hinweise, dass entzündliche Prozesse ebenfalls das Wachstum von VS fördern. Der Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) reguliert das Zellwachstum, Apoptose und Entzündungsprozesse [33]. Im VS wurde eine negative Korrelation zwischen Merlin und dem NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg nachgewiesen. Bei der Expression von Merlin kommt es zur Blockade der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, während es beim Verlust von Merlin zu einer verstärkten Aktivierung kommt. Dadurch können das Wachstum und die Proliferation im VS gesteigert werden [30]. Das Prostaglandinsynthese-steuernde Enzym COX2 könnte ebenfalls einen möglichen Einfluss auf die Tumorzunahme im VS haben. Nachgewiesen wurde eine erhöhte COX2-Expression in größeren VS [34]. Ein Einfluss von Acetylsalicylsäure auf das Wachstum der VS konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [34].

Der Einfluss von miRNAs auf die Tumorentwicklung wurde bereits in anderen Tumorentitäten bestätigt. Es handelt sich dabei um kleine nicht-codierende RNAs, die die Genexpression durch posttranskriptionelle Bindung an die Boten-RNA regulieren [34]. Im VS konnte eine Korrelation zwischen einer schnelleren Wachstumsrate und einer veränderten Regulation von miRNAs nachgewiesen werden. In schneller wachsenden VS kam es zu einer Hochregulation von beispielsweise miR-29abc und miR-19 und zu einer verminderten Regulation von miR-744 und let-7b [35]. Einige tumorassoziierte Proteine wurden ebenfalls mit einem schnelleren Wachstum von VS assoziiert. So konnte z.B. das Disintegrin und das Metalloproteinase-Domäne enthaltende Protein 9 (ADAM9) in schneller wachsenden VS identifiziert werden. ADAM9 steht dabei im Verdacht, die Tumorprogression und -invasion zu fördern [30].

Ein in den letzten Jahren zunehmend untersuchter Einflussfaktor auf die Progression von VS stellt der Einfluss von Immunzellen dar. In einer großen Studie zeigte sich eine positive Korrelation zwischen einem größeren Tumervolumen und einer höheren Expression von *CD3*, *CD8*, *CD68* und *CD163*, was für ein Vorhandensein von Lymphozyten und Makrophagen in größeren VS spricht [36]. Besonders Makrophagen wurden bereits in verschiedenen Vorarbeiten untersucht. Es zeigten sich erhöhte Expressionen des Makrophagenmarkers *CD68* in größeren VS [37]. Bei diesen Makrophagen handelte es sich vor allem um M2-Makrophagen, die über eine vermehrte Expression von *CD163* nachgewiesen werden konnten [38].

Einen weiteren möglichen Einflussfaktor auf die VS-Volumenzunahme stellen Tumorstammzellen (TSZ) dar. TSZ sind bereits aus verschiedenen malignen Tumoren bekannt und fördern das Tumorwachstum durch die eigene Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung. In benignen Tumoren wurde ein Einfluss von TSZ bisher jedoch kaum untersucht [39]. Auch im VS gibt es bisher nur wenig Untersuchungen zum Einfluss von TSZ auf die Proliferation. Einzelne TSZ-Marker, wie das octamer-binding protein 4 (*OCT4*, *POU5F1*) oder der chemokine receptor-4 (*CXCR4*) konnten jedoch bei erhöhter Expression mit einem schlechteren Outcome des betroffenen Patienten assoziiert werden [39].

Trotz vielfältiger Bestrebungen zur Untersuchung der Pathophysiologie des Tumorwachstums und zur Identifikation möglicher Einflussfaktoren konnten kaum Ergebnisse erzielt werden. Weitere Untersuchungen von möglichen Ursachen der VS-Progression sind daher essentiell für die Behandlung.

*Tabelle 3: Übersicht über mögliche Einflussfaktoren auf die Proliferation von VS*

<b>Einflussfaktor</b>	<b>Auswirkungen auf die Proliferation</b>	<b>Referenz</b>
Alter des Patienten	Keine nachgewiesene Auswirkung	10, 27
Geschlecht	Keine nachgewiesene Auswirkung	27
Auftreten klinischer Symptome	Keine nachgewiesene Auswirkung	10
Bildmorphologische Hinweise	Keine nachgewiesene Auswirkung	10, 28
HER2/neu	Vermehrte Proliferation bei Überexpression	29-31
PDGFR	Vermehrte Proliferation bei Überexpression	29-31
NF-κB	Bei Merlinverlust vermehrte Aktivierung des NF-κB Signalwegs	29, 32
COX2	Vermehrte Expression in großen VS	33

miRNAs	Hochregulation einzelner miRNAs in schneller wachsenden VS	34, 35
Tumorassoziierte Proteine (ADAM9)	Nachweis in schneller wachsenden VS	29
Lymphozyten	Nachweis von Lymphozyten, speziell von zytotoxischen Lymphozyten in größeren VS	36
Makrophagen	Nachweis von Makrophagen, speziell von M2-Makrophagen in größeren VS	37, 38
Tumorstammzellen	Erhöhte Expression einzelner Tumorstammzellmarker im VS	39

#### 1.4. Gewinnung von VS-Primärkulturen

Zur Durchführung einiger Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit war die Gewinnung von Primärkulturen aus den Tumorproben der Patienten direkt nach der operativen Entfernung des VS nötig. Es erfolgte daher die Etablierung einer neuen Methodik zur schonenden Aufarbeitung der Zellen aus dem Material, welches intraoperativ mittels Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator (CUSA) gesammelt wurde. Diese Vorgehensweise ermöglichte im Vergleich zu existierenden Methoden auch die Gewinnung von genügend Zellen für eine Primärkultur aus relativ wenig Material [40]. Dadurch ist es möglich, den Einfluss auf die Proliferation der Zellen vergleichend in VS unterschiedlicher Größen zu untersuchen. Zur Sicherstellung, dass es sich bei den gewonnenen Zellen tatsächlich um Schwannom-Zellen handelte, wurde mittels Immunfluoreszenz eine Charakterisierung der Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurden Verunreinigungen durch Fibroblasten ausgeschlossen. Diese neue Methodik ermöglichte damit die Untersuchung von Primärzellen von VS unterschiedlicher Größen und bildete die Grundlage für die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit [41].

## 1.5. Zielstellung

Die Symptomkontrolle von Patienten mit einem VS stellt eine der großen Herausforderungen in der Behandlung dar. Da es aktuell keine medikamentösen Therapien aus Mangel möglicher pharmakologischer Angriffspunkte gibt, werden die meisten VS chirurgisch oder radiochirurgisch behandelt. Den richtigen Therapiezeitpunkt für den individuellen Patienten festzulegen, kann jedoch schwierig sein, da die Wachstumsrate der VS sehr individuell ist. Aufgrund dessen ist die Gefahr einer Höreinschränkung durch eine zu späte Operation oder durch mögliche Folgen nach der Operation hoch.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, mögliche Einflussfaktoren auf die Tumorumfangzunahme des VS zu identifizieren. Besonderer Fokus liegt dabei zum einen auf der quantitativen Untersuchung inflammatorischer und proliferativer Marker wie COX2 und VEGF und auf der quantitativen Untersuchung von Immunzellmarkern, im Speziellen von Makrophagenmarkern im VS. Zum anderen wird im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein möglicher Einfluss von Tumorstammzellen auf die Proliferation des VS analysiert. Durch die quantitative Untersuchung verschiedener Tumorstammzellmarker in unterschiedlich großen VS kann ein direkter Rückschluss auf die Bedeutung von Tumorstammzellen im VS gezogen werden. Korreliert werden die Expressionsdaten der unterschiedlichen Marker mit den Tumorumfängen der eingeschlossenen VS und der Wachstumsrate ausgewählter VS. Dadurch ist eine direkte Aussage über den Einfluss der Expression der Marker in unterschiedlich großen VS möglich.

Eine mögliche Identifikation von Einflussfaktoren auf die Tumorumfangzunahme könnte dem Patienten eine bessere Wachstumsvoraussage seines VS ermöglichen. Zusätzlich wird eine Möglichkeit geschaffen, neue pharmakologische Angriffspunkte zur Therapie des VS zu bestimmen. Dies eröffnet betroffenen Patienten eine Alternative zur chirurgischen Behandlung des VS. Für sie könnte dies eine eklatante Verbesserung der Lebensqualität bedeuten.



## 2. Diskussion

### 2.1. Einfluss von Makrophagen auf die Progression des Vestibularisschwannoms

Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifikation von möglichen Einflussfaktoren auf die Progression des VS. Dazu wurden zum einen Tumorproben und Proben der zugehörigen Nerven genutzt und zum anderen die aus dem CUSA-Filter gewonnenen Primärkulturen. Mithilfe der neu etablierten Methodik konnten die Primärzellen von VS unterschiedlichen Volumens mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie genauer untersucht werden. Die Charakterisierung der Primärkulturen ermöglichte den Ausschluss einer Verfälschung durch eine Verunreinigung mit Fibroblasten [41]. Es erfolgte zunächst eine Analyse verschiedener Proliferations- und Makrophagenmarker im VS. Diese wurden in einer Kohorte von 173 Patienten quantitativ ermittelt und mit dem präoperativen Tumorzvolumen (n=151) und der Wachstumsrate (n=74) korreliert. Zusätzlich wurden die Marker auf Proteinebene mittels Immunhistochemie (IHC) detektiert.

In Vorarbeiten einer anderen Arbeitsgruppe zeigte sich ein möglicher Einfluss des Proliferationsmarkers COX2 auf die Progression des VS. Behling et al. detektierten eine positive Korrelation zwischen der COX2-Expression und einer größeren Tumorausdehnung mittels IHC in 1048 VS, jedoch keinen Zusammenhang mit einer erhöhten Wachstumsrate [34]. Der Proliferations- und Inflammationsmarker COX2, der eine entzündliche Tumormikroumwelt fördert, wurde bereits in verschiedenen malignen Tumoren, wie dem Colon- oder Mammakarzinom, mit einer vermehrten Tumorphiliferation assoziiert [42,43]. Da es sich beim VS jedoch um einen gutartigen Tumor handelt, könnten sich die Ursachen der Proliferation zu denen in malignen Tumoren unterscheiden. Dies wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt, in denen sich gegenteilige Effekte von COX2 auf die VS-Progression zeigten. Es wurden verminderte COX2-Expressionen in größeren und schnell-wachsenden VS, sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen. Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten zeigten die Ergebnisse einen geringen Einfluss von COX2, und somit eine eher untergeordnete Rolle entzündlicher Prozesse auf die Tumorzvolumenzunahme. Dies spricht dafür, dass andere Einflussfaktoren einen größeren Stellenwert auf die Größenprogredienz des VS haben.

Ähnlich verhält es sich mit dem Mitosemarker Ki-67 (Ki-67). Dieser, typischerweise in der Tumordiagnostik bestimmte Proliferationsmarker, zeigte in einigen Voruntersuchungen eine positive Korrelation mit dem Tumorzvolumen des VS [44,45]. Es ist jedoch bekannt, dass die Ki-67-Expression in den insgesamt eher langsam wachsenden VS relativ gering ist, was auf einen geringen Stellenwert der Proliferation der Schwannomzellen selbst hinweist [34]. Dies

bestätigen die Ergebnisse im Rahmen dieser Doktorarbeit, in denen eine verminderte *Ki-67*-Expression in großen und schnell-wachsenden VS nachgewiesen wurde. Zusätzlich zeigte sich in der IHC eine geringere *Ki-67*-Expression in VS mit kleinem Volumen. Ein Wachstum der Schwannomzellen selbst spielt somit eine untergeordnete Rolle. Anders verhält es sich beim Einfluss der Proliferation der Schwannomzellen bei Entstehung des VS. Bei der vergleichenden Untersuchung der RNA Reads von *Ki-67* von zehn unterschiedlichen VS und den zugehörigen Nerven (*Nervus vestibularis*) sah man einen signifikanten Unterschied in der Menge der Transcripts Per Kilobase Million (TPM). Es ist erkennbar, dass die Menge der Reads in den VS in neun der zehn VS höher war als in den entsprechenden Nerven (Abbildung 3). Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Proliferation der Schwannomzellen einen Einfluss während der Entstehung des VS hat. Eine Aussage zum Einfluss auf die spätere Proliferation ist jedoch nicht möglich.

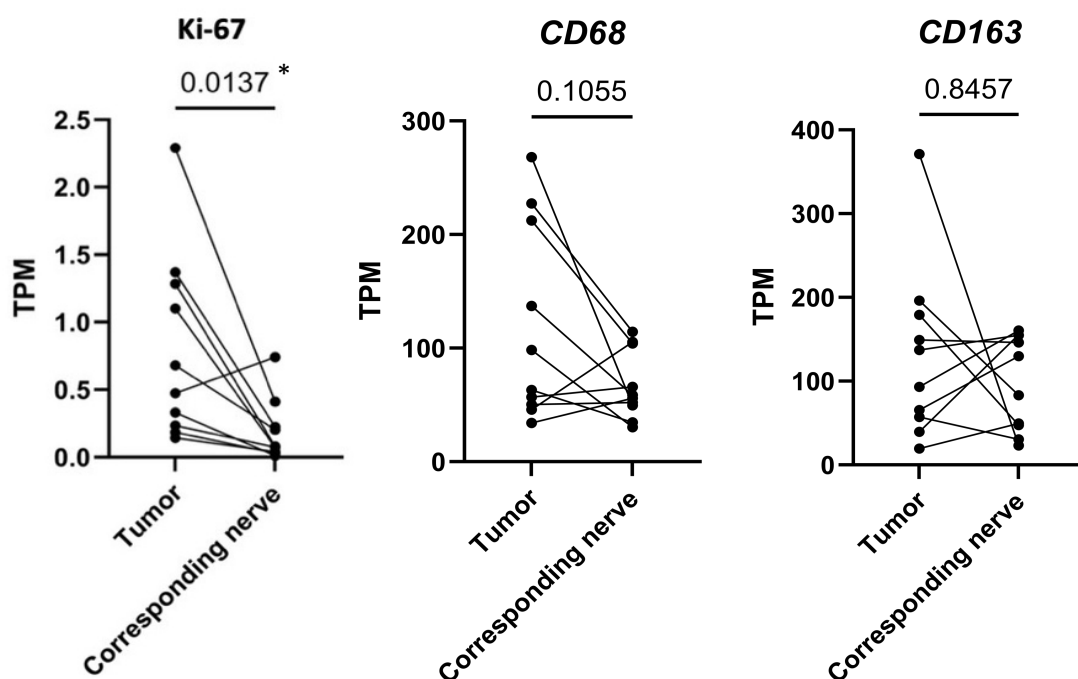


Abbildung 3: Darstellung der TPM von *Ki-67*, *CD68* und *CD163* in zehn Tumorproben und den zehn entsprechenden Proben von Vestibularnerven. Die TPM des Tumors sind durch eine Linie mit den TPM des entsprechenden Nervs desselben Patienten verbunden. Die mRNA in den Tumoren wurde mit der mRNA in den Nerven mittels eines Wilcoxon Matched-Paired Signed Rank Test verglichen. Das Sternchen zeigte statistisch signifikante Ergebnisse an ( $p \leq 0,05$ ).

Der Faktor VEGF stellt einen Schlüsselfaktor in der Angiogenese-Förderung von malignen Tumoren, wie dem Lungenkarzinom, dar [46]. Im benignen VS wurde jedoch kein Einfluss der VEGF-Expression auf die Progression nachgewiesen [47]. Dies ließ sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, in der sich eine negative Korrelation der VEGF-Expression mit dem

Tumorzellen zeigte. Dadurch wird die Hypothese gestützt, dass die Proliferation von VS nicht durch ein Wachstum der Schwannomzellen selbst initiiert wird, da diese auf eine Versorgung durch Blutgefäße angewiesen sind. Somit scheinen weder entzündliche Prozesse, noch die Proliferation der Schwannomzellen ein Wachstum zu begünstigen.

Ein möglicher Einfluss von Immunzellen auf die Progression des VS wurde in den letzten Jahren vermehrt untersucht. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Einfluss von Makrophagen. Diese myeloiden Zellen, die zum angeborenen Immunsystem gehören, liegen in zwei Polarisationen vor. Während M1-Makrophagen vor allem an inflammatorischen, nicht-onkogenen Prozessen beteiligt sind, haben M2-Makrophagen anti-inflammatorische, protoonkogene Eigenschaften [48]. CD68 und CD163 sind zwei wichtige Makrophagenmarker. Das transmembranäre Glykoprotein CD68 befindet sich auf der Oberfläche aller Makrophagen und der endozytische Rezeptor CD163 vor allem auf der Oberfläche von M2-Makrophagen [49,50]. Damit ist CD163 ein geeigneter Marker für Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs), da diese den M2-Makrophagen ähneln und bei der Entwicklung verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen wurden [51]. Im Mammakarzinom beispielsweise stellen TAMs eine Hauptkomponente der Tumorumwelt dar, ebenso wie sie im Kolonkarzinom zu einem vermehrten Wachstum beitragen [52,53].

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Doktorarbeit zeigten eine erhöhte Expression von *CD68* und *CD163* in größeren und schnell-wachsenden VS. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf den Einfluss von Makrophagen, speziell von M2-Makrophagen, auf die Tumorzellzunahme. Unterstützt wird diese Annahme durch eine vergleichende Analyse von schnell-wachsenden VS mit einer Wachstumsrate von über 1 cm<sup>3</sup> pro Jahr und langsam-wachsenden VS mit einer Wachstumsrate von unter 0,1 cm<sup>3</sup> pro Jahr. Es zeigte sich eine signifikant höhere *CD68*-Expression in den 17 schnell-wachsenden VS im Vergleich zu den 16 langsam-wachsenden VS. Ergebnisse mit gleicher Tendenz, wenn auch nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ), zeigte die vergleichende Analyse von *CD163*. Die Expression in den schnell-wachsenden VS war deutlich höher als die in den langsam-wachsenden VS, was darauf hinweist, dass insbesondere M2-Makrophagen in größeren VS eine Rolle spielen. Eine Analyse auf Proteinebene mittels IHC bestätigte die Ergebnisse, da eine deutlich höhere Expression von *CD68* und *CD163* in größeren und schnell-wachsenden Tumoren nachgewiesen werden konnte. TAMs scheinen somit nicht ausschließlich in malignen Tumoren zu einem vermehrten Wachstum zu führen, sondern ebenfalls im gutartigen VS. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass TAMs durch eine Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen zu einem vermehrten Wachstum von Tumoren beitragen, was einen möglichen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellt [54]. Im Gegensatz dazu scheinen

TAMs bei der Entstehung von VS eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Bei der vergleichenden Analyse der RNA Reads von *CD68* und *CD163* in zehn VS und den zugehörigen Nerven zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Menge der TPM. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TAMs während der Entstehung des VS keinen Einfluss haben, sondern erst zu einem vermehrten Wachstum in VS beitragen (Abbildung 3).

Verschiedene Voruntersuchungen stützen diesen Einfluss von Makrophagen auf das Tumorwachstum von VS. De Vries et al. detektierten eine vermehrte *CD68*-Expression in großen, schnell-wachsenden VS [37]. Zusätzlich zeigte eine Untersuchung von 923 VS mittels IHC eine erhöhte Expression von *CD68* und *CD163* in VS mit großem Volumen, was für einen Einfluss von M2-Makrophagen auf die Größenzunahme der VS spricht. Eine Korrelation mit einer erhöhten Wachstumsrate konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [36].

Zur zusätzlichen Auswertung des Einflusses von Makrophagen auf die VS-Proliferation, erfolgte eine Analyse des Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) und des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF). *M-CSF* fördert durch die Polarisationsinduktion von Makrophagen hin zu TAMs den Erhalt dieser und zeigte in den Expressionsanalysen eine stark positive Korrelation mit *CD163* [55]. In einer Voruntersuchung wurde eine vermehrte *M-CSF*-Expression in schnell-wachsenden VS nachgewiesen [56]. Dies unterstützt die Hypothese, dass TAMs an der Proliferation des VS beteiligt sein könnten. GM-CSF lockt Makrophagen an und erhöht die Polarisation von M1 zu M2 Makrophagen [55,57]. Die erhöhte Expression von *GM-CSF* in VS großen Volumens bestätigt somit ein vermehrtes Vorkommen von Makrophagen, speziell von TAMs.

## 2.2. Einfluss von Tumorstammzellen auf die Progression des Vestibularisschwannoms

Im Folgenden wird der Einfluss von Tumorstammzellen auf die Proliferation von VS näher beleuchtet. Tumorstammzellen spielen eine wichtige Rolle in einer Theorie zur Entwicklung von Tumoren. Es werden zwei verschiedene Entwicklungstheorien unterschieden. Das stochastische Tumormodell vermutet eine Ansammlung von Mutationen in somatischen Zellen als Ursache. Diese führen dazu, dass es zu einer Hyperproliferation und so zur Tumorentstehung kommt [58]. Im hierarchischen Tumormodell wird der Einfluss von Tumorstammzellen diskutiert. Hierbei soll es durch eine Mutation von Tumorzellen zur Entstehung einer Tumorstammzelle kommen. Diese soll die gleichen Fähigkeiten wie eine embryonale Stammzelle zur Selbsterneuerung und Differenzierung haben, wodurch es zur Tumorentstehung kommen kann [58]. Somit stehen Tumorstammzellen im Verdacht, zur Tumorphiliferation, -invasion und zum Überleben der Tumorzellen beizutragen [59].

In verschiedenen malignen Tumorentitäten wurde der Einfluss von Tumorstammzellen auf eine Progression bereits nachgewiesen. Im Mammakarzinom wurde eine Population von Tumorstammzellen in schneller wachsenden Tumoren detektiert [60]. Durch den Nachweis der Expression von Tumorstammzellmarkern im Colonkarzinom, die zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit und Pluripotenz beitragen, wird hier ein Einfluss von Tumorstammzellen diskutiert [61]. In benignen Tumoren ist die Datenlage zum Einfluss von Tumorstammzellen bisher eher gering, weswegen diese Doktorarbeit darauf abzielt, einen möglichen Einfluss von Tumorstammzellen im VS zu untersuchen.

Tumorstammzellen sind in ihrer Funktion von verschiedenen Tumorstammzellmarkern abhängig. Diese tragen zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit und Pluripotenz bei. Ein wichtiger Komplex zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz ist der Yamanaka Komplex, der aus *POU5F1* (OCT4), *SOX2*, *KLF4* und *MYC* besteht [62]. Zusätzlich haben auch die Tumorstammzellmarker *CXCR4*, *NANOG* und *SALL4* einen Einfluss auf die Erhaltung der Differenzierungsfähigkeit [63-65]. Die Selbsterneuerungsfähigkeit wird durch Tumorstammzellmarker wie *CD44*, *PTPRC* (CD45), *NESTIN* und *PROM1* (CD133) aufrechterhalten [66-69] (Abbildung 4).

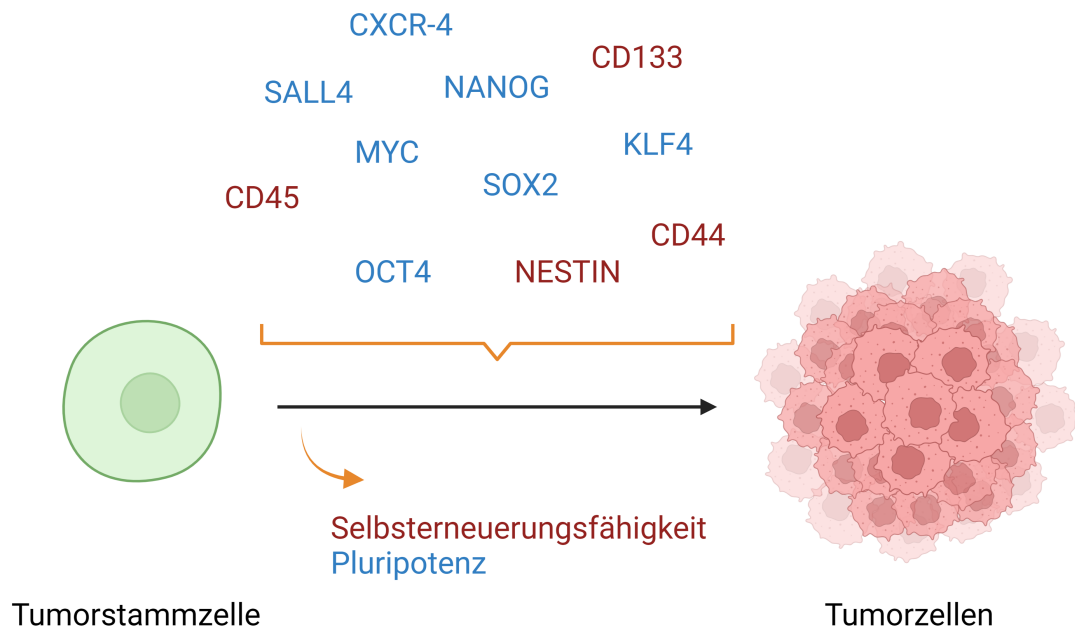


Abbildung 4: Beitrag der Tumorstammzellmarker zur Entstehung von Tumorzellen. Die blau hinterlegten Marker fördern den Erhalt der Pluripotenz der Tumorstammzelle und die rot hinterlegten Marker erhalten die Selbsterneuerungsfähigkeit der Tumorstammzelle. Durch den gemeinsamen Einfluss der Marker können sich die Tumorstammzellen in Tumorzellen differenzieren.

Zur Analyse des Einflusses von Tumorstammzellen im VS wurde die Expression von elf Tumorstammzellmarkern untersucht. Korreliert wurden die quantitativen Ergebnisse mit den Tumolvolumina von 165 eingeschlossenen VS. Zusätzlich erfolgte eine Analyse ausgewählter Tumorstammzellmarker mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz, Immunhistochemie, Copy number variation (CNV) Analyse und RNA-Sequencing (RNASeq) Analyse.

In der Korrelationsanalyse der mRNA-Daten konnten erstmalig starke positive Korrelationen der verschiedenen Tumorstammzellmarker untereinander im VS nachgewiesen werden. Dies könnte ein erster Hinweis auf einen möglichen Einfluss von Tumorstammzellen sein, da diese sich stark untereinander verstärken. Bei der Korrelation mit dem Tumolvolumen zeigten sich drei negativ-signifikante und fünf positiv-signifikante Beziehungen. Das Protoonkogen *MYC* zeigte eine verminderte Expression in VS mit großem Volumen und einen erhöhten Genverlust auf genomischem Level. Obwohl einige Vorergebnisse bei NF2-assoziierten VS eine Überexpression detektierten, weisen die Ergebnisse daraufhin, dass *MYC* zwar an der Entwicklung von VS beteiligt ist, es aber nicht zu einem verlängerten Wachstum und so einem größeren VS führt [70,71].

Die Expression des Pluripotenzfaktors *SOX2* ist in großen VS ebenfalls vermindert, was für einen geringen Einfluss von *SOX2* auf die Tumorzunahme in VS spricht. Trotz des Nachweises erhöhter *SOX2*-Expressionen in VS verglichen mit normalen peripheren Nerven in einer Vorstudie, ließ sich dieses Ergebnis durch die Daten nicht bestätigen [72]. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass andere Pluripotenzfaktoren, wie *NANOG* oder *POU5F1* (*OCT4*), die zum Yamanaka-Komplex gehören, möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Tumorzunahme haben [73].

Zu diesen Faktoren gehört *NANOG*. Mittels Immunfluoreszenz ausgewählter Primärkulturen konnten *NANOG*-positive Zellen im VS nachgewiesen werden und auch die Steigerung der positiven Zellen mit zunehmendem Tumorzunahme spricht für einen vermehrten Einfluss von *NANOG* in größeren VS. Der Chemokinrezeptor *CXCR4* scheint ebenfalls durch Erhaltung der Pluripotenz zur Progression von VS beizutragen, da die Expression in größeren VS höher war. Dies wird durch eine Voruntersuchung unterstützt, in der erhöhte *CXCR4*-Expressionen im VS im Vergleich zu gesunden Nerven nachgewiesen wurden [74].

Das Tumorsuppressorgen *KLF4* zeigte in VS mit großem Volumen eine geringere Expression als in VS mit kleinerem Volumen. Zusätzlich ließ sich ein Genverlust von *KLF4* in den untersuchten VS detektieren. In anderen Tumoren, wie im Lungenkarzinom, konnte eine negative Korrelation der *KLF4*-Expression mit dem Tumorstadium und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden [75,76]. Dies spricht für einen möglichen Einfluss von *KLF4* als Tumorsuppressorgen auf die Entstehung des VS.

Zum Erhalt der Selbsterneuerungsfähigkeit der Tumorstammzellen im VS wurde unter anderem *NESTIN* untersucht. Dieses Filamentprotein ist wichtig für die Differenzierung von Tumorstammzellen in Tumorzellen und könnte so bei einer Überexpression zu einer vermehrten Differenzierung in Schwannomzellen führen [69]. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt, die eine vermehrte *NES* (*NESTIN*)-Expression in größeren VS nachwies und in der Immunfluoreszenz mehr *NESTIN*-positive Zellen in größeren VS zeigten. Ebenfalls wichtig zum Erhalt der Selbsterneuerungsfähigkeit ist *CD133*, da es die Resistenz gegen Apoptose in Tumorstammzellen erhöht [66]. Die Analyse der Daten weist darauf hin, dass *PROM1* (*CD133*) durch diese Funktion einen möglichen Einfluss auf das Wachstum von VS haben könnte. Dies lässt sich anhand der signifikant positiven Korrelation zwischen dem Tumorzunahme und der *PROM1*- (*CD133*) Expression belegen. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse der RNASeq-Analyse eine geringere Expression in den VS im Vergleich zu den zugehörigen Nerven. Dieses Ergebnis könnte neue Erkenntnisse über den Ursprung des VS aus

dem *N. vestibulocochlearis* liefern. Frühere Ergebnisse zeigten eine Hochregulierung von *PROM1* (CD133) beim Verlust von *NF2*, dem häufigsten Genverlust, der zur Entwicklung eines VS führt [77]. Der Einfluss von *PROM1* (CD133) sollte in Zukunft genauer untersucht werden.

Mittels Durchflusszytometrie ausgewählter und aus dem CUSA-Filter gewonnener Primärkulturen, erfolgte die ergänzende Untersuchung der beiden Tumorstammzellmarker CD44 und CD45. Diese wiesen in der Korrelationsanalyse eine signifikant positive Korrelation mit dem Tumolvolumen auf. Eine Überexpression beider Marker wurde mit einem vermehrten Wachstum in anderen Tumoren assoziiert [78,79]. Sowohl die Korrelationsergebnisse, als auch eine zunehmende Zahl doppelt positiver Zellen bei größerem Tumolvolumen in der Durchflusszytometrie, sind ein Hinweis auf den Einfluss von CD44 und CD45 auf die Volumenzunahme im VS. Zusätzlich erfolgte ein immunhistochemischer Nachweis von CD44- und CD45-positiven Zellen in ausgewählten VS-Tumorproben.



### 2.3. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit verschiedene Einflussfaktoren auf die Tumorumfangzunahme im VS identifiziert werden. Das Wachstum von VS geht nicht von einer Proliferation der Tumorzellen allein aus und auch entzündliche Prozesse spielen eine eher untergeordnete Rolle. Eine Infiltration durch Makrophagen, speziell durch TAMs, konnte in großen, schnell-wachsenden VS nachgewiesen werden. Damit stellen TAMs einen Einflussfaktor auf die VS-Proliferation und so einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt dar. Durch die Identifikation eines solchen Angriffspunktes besteht die Möglichkeit, betroffenen Patienten eine nicht-invasive alternative Behandlungsmöglichkeit anzubieten.

Es werden bereits verschiedene medikamentöse Behandlungsstrategien, die sich gegen TAMs richten, untersucht. Vier hauptsächliche Behandlungsstrategien werden unterschieden: verminderte Anlockung von Makrophagen, Verminderung von TAMs, Reprogrammierung von TAMs und das Abzielen auf inhibitorische Moleküle, die sich auf TAMs befinden. Eine Vielzahl von klinischen Studien untersuchen Medikamente, die somit die Aktivität bzw. das Vorkommen von TAMs in Tumoren vermindern sollen [80]. Im VS stellen diese Untersuchungen eine Möglichkeit dar, durch eine Verminderung der Aktivität der TAMs, das Wachstum zu reduzieren und schwere Symptome betroffener Patienten zu verhindern.

Des Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Tumorstammzellen in der Pathogenese des VS eine Rolle spielen. Zum einen verstärken sich die Tumorstammzellmarker im VS gegenseitig, zum anderen zeigen fünf der Marker eine höhere Expression in größeren VS, was ein Hinweis auf deren Einfluss auf die Größenzunahme von VS ist. Zusätzlich weisen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz, der Durchflusszytometrie, der Immunhistochemie und der CNV-Analyse ein Vorhandensein von Tumorstammzellen im VS nach. Obwohl es sich beim VS um einen gutartigen Tumor handelt, der kein invasives Wachstum zeigt, spielen Tumorstammzellen eine Rolle in der Progression. Damit stellen sie einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt in der Behandlung des VS dar. Es werden bereits verschiedene Ansatzpunkte zur Behandlung von Tumorstammzellen untersucht. Studien zum direkten Angriff von Tumorstammzellmarkern, zur Blockade von tumorstammzell-spezifischen Signalwegen und zur Veränderung der Mikroumwelt von Tumorstammzellen werden durchgeführt [81]. Auf die personalisierte Therapie des VS könnten Studien übertragen werden, in denen die Oberflächenmarker CD44 oder CD133 attackiert werden. Zusätzlich gibt es Ansatzpunkte zur Reduktion der Funktion von NANOG, SOX2 und OCT4, beispielsweise im Mammakarzinom oder im Colonkarzinom [82]. Ein pharmakologischer Angriff der Tumorstammzellen im VS stellt somit einen möglichen

Ansatzpunkt dar, um zukünftig Patienten eine Alternative zur operativen Entfernung anbieten zu können. Insgesamt lässt sich somit feststellen, dass eine Volumenzunahme des VS nicht durch den Einfluss eines Faktors erklärbar ist, sondern multifaktoriell erfolgt (Abbildung 5).

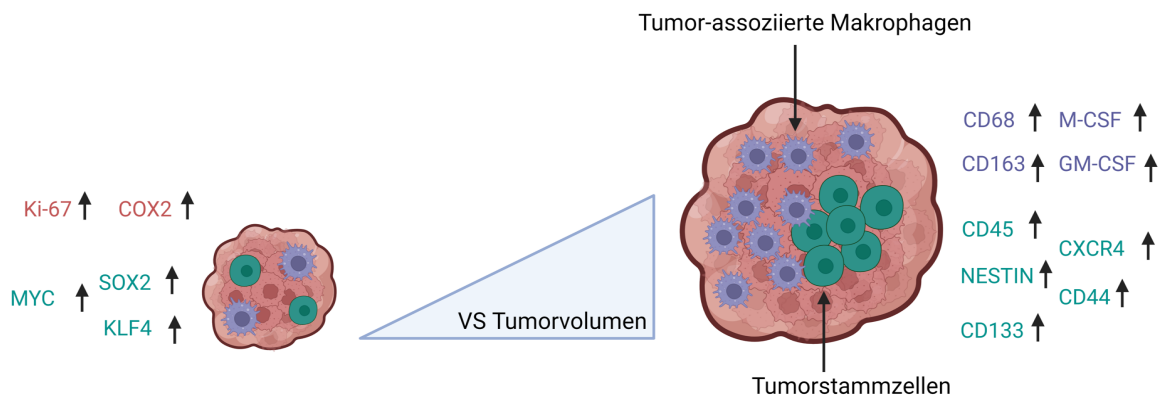


Abbildung 5: Zusammenfassende Darstellung möglicher Einflussfaktoren auf die Volumenzunahme von VS. Die Proliferation von VS wird durch die Invasion von Tumor-assoziierten Makrophagen gefördert, was durch eine erhöhte Expression von CD68 und CD163 deutlich wird. Zusätzlich scheinen auch Tumorstammzellen zu einer Größenprogredienz zu führen, was sich durch die vermehrte Expression von fünf Tumorstammzellmarkern in größeren VS zeigt.

Die im Rahmen der Doktorarbeit erhobenen Daten werden dadurch limitiert, dass ausschließlich Patienten mit mehreren MRT-Bildern zur Betrachtung der Wachstumsrate miteinbezogen werden konnten. Insbesondere initial kleinere VS wurden regelmäßig mittels MRT-Untersuchungen kontrolliert, weswegen nur wenige VS mit einem, bei Diagnose bestehendem, Koos Grad 3 oder 4 in die Analyse der Wachstumsraten miteinbezogen wurden. Eine zusätzliche Limitation stellt der explorative Charakter der Untersuchungen dar, der eine Korrektur für multiple Vergleiche der statistischen Ergebnisse ausschloss.

Nichts desto trotz identifizieren die Ergebnisse mögliche Einflussfaktoren auf die Tumolvolumenzunahme des VS. Durch den Einschluss der präoperativen Hörfunktion der Patienten lässt sich die klinische Wichtigkeit der Untersuchungen für das Outcome der Patienten zeigen. Mit steigendem Tumolvolumen und größerer Wachstumsrate verschlechterte sich die präoperative Hörfunktion der Patienten deutlich. Zusätzlich birgt auch die mikrochirurgische Entfernung des VS die Gefahr einer postoperativen Hörminderung oder eines Hörverlustes. Dies kann für den betroffenen Patienten eine deutliche Verschlechterung der Lebensqualität mit sich bringen. Durch die Identifizierung der möglichen Einflussfaktoren auf die Proliferation des VS besteht die Möglichkeit, medikamentöse Angriffspunkte genauer zu untersuchen. Durch einen gezielten pharmakologischen Angriff der TAMs und der Tumorstammzellen könnte es möglich sein, das Wachstum der VS zu verlangsamen. Dadurch wird zum einen die Gefahr einer Verschlechterung der Hörfunktion durch den Tumor selbst und zum anderen durch Vermeiden

einer Operation auch die Gefahr der postoperativen Hörschädigung vermindert. Die Untersuchung dieser gezielten pharmakologischen Angriffspunkte als mögliche medikamentöse Behandlungsoption sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Zusätzlich könnte die Möglichkeit bestehen, die TAMs und Tumorstammzellen als prädiktive Marker für das Wachstum der VS zu nutzen. Dazu sollte künftig eine Untersuchung der Marker im Liquor betroffener Patienten erfolgen, um so möglicherweise eine Aussage zum Wachstumsverhalten der VS treffen zu können.

Langfristig besteht durch diese Untersuchungen die Möglichkeit, betroffenen Patienten eine bessere Einschätzung bezüglich des Proliferationsverhaltens ihres VS zu geben und ihnen eine Alternative zu den bereits bestehenden Behandlungsmöglichkeiten anzubieten. Eine nicht invasive medikamentöse Behandlung des VS könnte zu einer deutlichen Steigerung der Lebensqualität betroffener Patienten führen.

### 3. Literaturverzeichnis

1. Gupta, V.K.; Thakker, A.; Gupta, K.K. Vestibular Schwannoma: What We Know and Where We are Heading. *Head Neck Pathol* **2020**, *14*, 1058-1066, doi:10.1007/s12105-020-01155-x.
2. Goldbrunner, R.; Weller, M.; Regis, J.; Lund-Johansen, M.; Stavrinou, P.; Reuss, D.; Evans, D.G.; Lefranc, F.; Sallabanda, K.; Falini, A.; et al. EANO guideline on the diagnosis and treatment of vestibular schwannoma. *Neuro Oncol* **2020**, *22*, 31-45, doi:10.1093/neuonc/noz153.
3. Hassepass, F.; Bulla, S.B.; Aschendorff, A.; Maier, W. [Vestibular schwannoma: Part I: epidemiology and diagnostics]. *HNO* **2012**, *60*, 837-844; quiz 845-836, doi:10.1007/s00106-012-2533-y.
4. Marinelli, J.P.; Nassiri, A.M.; Habermann, E.B.; Lohse, C.M.; Holton, S.J.; Carlson, M.L. Underreporting of Vestibular Schwannoma Incidence Within National Brain Tumor and Cancer Registries in the United States. *Otol Neurotol* **2021**, *42*, e758-e763, doi:10.1097/MAO.0000000000003049.
5. Matthies, C.; Samii, M. Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): clinical presentation. *Neurosurgery* **1997**, *40*, 1-9; discussion 9-10, doi:10.1097/00006123-199701000-00001.
6. Yildiz, E.; Dahm, V.; Matula, C.; Arnoldner, C. [Vestibular schwannoma: Diagnosis-Therapy-Aftercare]. *Wien Med Wochenschr* **2022**, *172*, 2-7, doi:10.1007/s10354-020-00800-y.
7. Koos, W.T.; Day, J.D.; Matula, C.; Levy, D.I. Neurotopographic considerations in the microsurgical treatment of small acoustic neurinomas. *J Neurosurg* **1998**, *88*, 506-512, doi:10.3171/jns.1998.88.3.0506.
8. Sriskandan, N.; Connor, S.E. The role of radiology in the diagnosis and management of vestibular schwannoma. *Clin Radiol* **2011**, *66*, 357-365, doi:10.1016/j.crad.2010.10.016.
9. Rahne, T.; Plontke, S.K.; Vordermark, D.; Strauss, C.; Scheller, C. [Hearing classification in patients with vestibular schwannoma using German-language test procedures]. *HNO* **2021**, *69*, 750-758, doi:10.1007/s00106-020-00948-4.
10. Paldor, I.; Chen, A.S.; Kaye, A.H. Growth rate of vestibular schwannoma. *J Clin Neurosci* **2016**, *32*, 1-8, doi:10.1016/j.jocn.2016.05.003.
11. Hunter, J.B.; Francis, D.O.; O'Connell, B.P.; Kabagambe, E.K.; Bennett, M.L.; Wanna, G.B.; Rivas, A.; Thompson, R.C.; Haynes, D.S. Single Institutional Experience With Observing 564 Vestibular Schwannomas: Factors Associated With Tumor Growth. *Otol Neurotol* **2016**, *37*, 1630-1636, doi:10.1097/MAO.0000000000001219.
12. Scheer, M.; Simmermacher, S.; Prell, J.; Leisz, S.; Scheller, C.; Mawrin, C.; Strauss, C.; Rampp, S. Recurrences and progression following microsurgery of vestibular schwannoma. *Front Surg* **2023**, *10*, 1216093, doi:10.3389/fsurg.2023.1216093.
13. Çakır, O.; Berkiten, G.; Tutar, B.; Yilmazer, A.B.; Kumral, T.L.; Saltürk, Z.; Uyar, Y. Effects of CyberKnife therapy for vestibular schwannoma on hearing: a retrospective study. *J Laryngol Otol* **2018**, *132*, 796-801, doi:10.1017/s0022215118001500.
14. Jian, B.J.; Kaur, G.; Sayegh, E.T.; Bloch, O.; Parsa, A.T.; Barani, I.J. Fractionated radiation therapy for vestibular schwannoma. *J Clin Neurosci* **2014**, *21*, 1083-1088, doi:10.1016/j.jocn.2013.11.005.
15. Karajannis, M.A.; Legault, G.; Hagiwara, M.; Giancotti, F.G.; Filatov, A.; Derman, A.; Hochman, T.; Goldberg, J.D.; Vega, E.; Wisoff, J.H.; et al. Phase II study of everolimus in children and adults with neurofibromatosis type 2 and progressive vestibular schwannomas. *Neuro Oncol* **2014**, *16*, 292-297, doi:10.1093/neuonc/not150.

16. Brodhun, M.; Stahn, V.; Harder, A. [Pathogenesis and molecular pathology of vestibular schwannoma]. *HNO* **2017**, *65*, 362-372, doi:10.1007/s00106-016-0201-3.
17. de Vries, M.; van der Mey, A.G.; Hogendoorn, P.C. Tumor Biology of Vestibular Schwannoma: A Review of Experimental Data on the Determinants of Tumor Genesis and Growth Characteristics. *Otol Neurotol* **2015**, *36*, 1128-1136, doi:10.1097/MAO.0000000000000788.
18. Agnihotri, S.; Jalali, S.; Wilson, M.R.; Danesh, A.; Li, M.; Klironomos, G.; Krieger, J.R.; Mansouri, A.; Khan, O.; Mamatjan, Y.; et al. The genomic landscape of schwannoma. *Nat Genet* **2016**, *48*, 1339-1348, doi:10.1038/ng.3688.
19. Ogiwara, H.; Takahashi, K.; Sasaki, M.; Kuroda, T.; Yoshida, H.; Watanabe, R.; Maruyama, A.; Makinoshima, H.; Chiwaki, F.; Sasaki, H.; et al. Targeting the Vulnerability of Glutathione Metabolism in ARID1A-Deficient Cancers. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 177-190.e178, doi:10.1016/j.ccell.2018.12.009.
20. Xu, G.; Chhangawala, S.; Cocco, E.; Razavi, P.; Cai, Y.; Otto, J.E.; Ferrando, L.; Selenica, P.; Ladewig, E.; Chan, C.; et al. ARID1A determines luminal identity and therapeutic response in estrogen-receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* **2020**, *52*, 198-207, doi:10.1038/s41588-019-0554-0.
21. Ambrogio, C.; Gómez-López, G.; Falcone, M.; Vidal, A.; Nadal, E.; Crosetto, N.; Blasco, R.B.; Fernández-Marcos, P.J.; Sánchez-Céspedes, M.; Ren, X.; et al. Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma. *Nat Med* **2016**, *22*, 270-277, doi:10.1038/nm.4041.
22. Han, J.M.; Sahin, M. TSC1/TSC2 signaling in the CNS. *FEBS Lett* **2011**, *585*, 973-980, doi:10.1016/j.febslet.2011.02.001.
23. Arden-Holmes, S.; Fisher, G.; North, K. Neurofibromatosis Type 2. *J Child Neurol* **2017**, *32*, 9-22, doi:10.1177/0883073816666736.
24. Asthagiri, A.R.; Parry, D.M.; Butman, J.A.; Kim, H.J.; Tsilou, E.T.; Zhuang, Z.; Lonser, R.R. Neurofibromatosis type 2. *Lancet* **2009**, *373*, 1974-1986, doi:10.1016/S0140-6736(09)60259-2.
25. Killeen, D.E.; Klesse, L.; Tolisano, A.M.; Hunter, J.B.; Kutz, J.W. Long-Term Effects of Bevacizumab on Vestibular Schwannoma Volume in Neurofibromatosis Type 2 Patients. *J Neurol Surg B Skull Base* **2019**, *80*, 540-546, doi:10.1055/s-0038-1676628.
26. Karajannis, M.A.; Hagiwara, M.; Schreyer, M.; Haque, S. Sustained imaging response and hearing preservation with low-dose bevacizumab in sporadic vestibular schwannoma. *Neuro Oncol* **2019**, *21*, 822-824, doi:10.1093/neuonc/noz051.
27. Bachir, S.; Shah, S.; Shapiro, S.; Koehler, A.; Mahammedi, A.; Samy, R.N.; Zuccarello, M.; Schorry, E.; Sengupta, S. Neurofibromatosis Type 2 (NF2) and the Implications for Vestibular Schwannoma and Meningioma Pathogenesis. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22020690.
28. Agrawal, Y.; Clark, J.H.; Limb, C.J.; Niparko, J.K.; Francis, H.W. Predictors of vestibular schwannoma growth and clinical implications. *Otol Neurotol* **2010**, *31*, 807-812, doi:10.1097/MAO.0b013e3181de46ae.
29. Sethi, M.; Borsetto, D.; Bance, M.; Cho, Y.; Gair, J.; Gamazo, N.; Joannides, A.; Jefferies, S.; Mannion, R.; Macfarlane, R.; et al. Determinants of Vestibular Schwannoma Growth. *Otol Neurotol* **2021**, *42*, 746-754, doi:10.1097/MAO.0000000000003043.
30. Zhang, Y.; Long, J.; Ren, J.; Huang, X.; Zhong, P.; Wang, B. Potential Molecular Biomarkers of Vestibular Schwannoma Growth: Progress and Prospects. *Front Oncol* **2021**, *11*, 731441, doi:10.3389/fonc.2021.731441.
31. Mukherjee, J.; Kamnasaran, D.; Balasubramaniam, A.; Radovanovic, I.; Zadeh, G.; Kiehl, T.R.; Guha, A. Human schwannomas express activated platelet-derived growth factor receptors and c-kit and are growth inhibited by Gleevec (Imatinib Mesylate). *Cancer Res* **2009**, *69*, 5099-5107, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4475.

32. Doherty, J.K.; Ongkeko, W.; Crawley, B.; Andalibi, A.; Ryan, A.F. ErbB and Nrg: potential molecular targets for vestibular schwannoma pharmacotherapy. *Otol Neurotol* **2008**, *29*, 50-57, doi:10.1097/mao.0b013e31815d4429.
33. Hoesel, B.; Schmid, J.A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* **2013**, *12*, 86, doi:10.1186/1476-4598-12-86.
34. Behling, F.; Ries, V.; Skardelly, M.; Gepfner-Tuma, I.; Schuhmann, M.; Ebner, F.H.; Tabatabai, G.; Bornemann, A.; Schittenhelm, J.; Tatagiba, M. COX2 expression is associated with proliferation and tumor extension in vestibular schwannoma but is not influenced by acetylsalicylic acid intake. *Acta Neuropathol Commun* **2019**, *7*, 105, doi:10.1186/s40478-019-0760-0.
35. Sass, H.C.R.; Hansen, M.; Borup, R.; Nielsen, F.C.; Cayé-Thomasen, P. Tumor miRNA expression profile is related to vestibular schwannoma growth rate. *Acta Neurochir (Wien)* **2020**, *162*, 1187-1195, doi:10.1007/s00701-020-04238-4.
36. Gonçalves, V.M.; Suhm, E.M.; Ries, V.; Skardelly, M.; Tabatabai, G.; Tatagiba, M.; Schittenhelm, J.; Behling, F. Macrophage and Lymphocyte Infiltration Is Associated with Volumetric Tumor Size but Not with Volumetric Growth in the Tübingen Schwannoma Cohort. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13030466.
37. de Vries, M.; Hogendoorn, P.C.; Briare-de Bruyn, I.; Malessy, M.J.; van der Mey, A.G. Intratumoral hemorrhage, vessel density, and the inflammatory reaction contribute to volume increase of sporadic vestibular schwannomas. *Virchows Arch* **2012**, *460*, 629-636, doi:10.1007/s00428-012-1236-9.
38. de Vries, M.; Briare-de Bruijn, I.; Malessy, M.J.; de Bruijne, S.F.; van der Mey, A.G.; Hogendoorn, P.C. Tumor-associated macrophages are related to volumetric growth of vestibular schwannomas. *Otol Neurotol* **2013**, *34*, 347-352, doi:10.1097/MAO.0b013e31827c9fbf.
39. Cutfield, S.W.; Wickremesekera, A.C.; Mantamadiotis, T.; Kaye, A.H.; Tan, S.T.; Stylli, S.S.; Itineang, T. Tumour stem cells in schwannoma: A review. *J Clin Neurosci* **2019**, *62*, 21-26, doi:10.1016/j.jocn.2018.12.022.
40. Calderón-Martínez, D.; Garavito, Z.; Spinel, C.; Hurtado, H. Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C). *J Neurosci Methods* **2002**, *114*, 1-8, doi:10.1016/s0165-0270(01)00493-9.
41. Leisz, S.; Klause, C.H.; Becker, A.L.; Scheer, M.; Simmermacher, S.; Strauss, C.; Scheller, C. Establishment of vestibular schwannoma primary cell cultures obtained from cavitron ultrasonic surgical aspirator tissue material. *J Neurosci Methods* **2023**, *397*, 109955, doi:10.1016/j.jneumeth.2023.109955.
42. Karpisheh, V.; Nikkhoo, A.; Hojjat-Farsangi, M.; Namdar, A.; Azizi, G.; Ghalamfarsa, G.; Sabz, G.; Yousefi, M.; Yousefi, B.; Jadidi-Niaragh, F. Prostaglandin E2 as a potent therapeutic target for treatment of colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2019**, *144*, 106338, doi:10.1016/j.prostaglandins.2019.106338.
43. Kim, H.S.; Moon, H.G.; Han, W.; Yom, C.K.; Kim, W.H.; Kim, J.H.; Noh, D.Y. COX2 overexpression is a prognostic marker for Stage III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2012**, *132*, 51-59, doi:10.1007/s10549-011-1521-3.
44. Yokoyama, M.; Matsuda, M.; Nakasu, S.; Nakajima, M.; Handa, J. Clinical significance of Ki-67 staining index in acoustic neurinoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **1996**, *36*, 698-702; discussion 702-693, doi:10.2176/nmc.36.698.
45. Cafer, S.; Bayramoglu, I.; Uzum, N.; Yilmaz, M.; Memis, L.; Uygur, K. Expression and clinical significance of Ki-67, oestrogen and progesterone receptors in acoustic neuroma. *J Laryngol Otol* **2008**, *122*, 125-127, doi:10.1017/S0022215107000229.
46. Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **2005**, *69 Suppl 3*, 4-10, doi:10.1159/000088478.

47. Brieger, J.; Bedavanija, A.; Lehr, H.A.; Maurer, J.; Mann, W.J. Expression of angiogenic growth factors in acoustic neurinoma. *Acta Otolaryngol* **2003**, *123*, 1040-1045, doi:10.1080/00016480310005101.
48. Boutilier, A.J.; ElSawa, S.F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22136995.
49. Skytthe, M.K.; Graversen, J.H.; Moestrup, S.K. Targeting of CD163. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21155497.
50. Chistiakov, D.A.; Killingsworth, M.C.; Myasoedova, V.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* **2017**, *97*, 4-13, doi:10.1038/labinvest.2016.116.
51. Pan, Y.; Yu, Y.; Wang, X.; Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol* **2020**, *11*, 583084, doi:10.3389/fimmu.2020.583084.
52. Wang, H.; Tian, T.; Zhang, J. Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Colorectal Cancer (CRC): From Mechanism to Therapy and Prognosis. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22168470.
53. Munir, M.T.; Kay, M.K.; Kang, M.H.; Rahman, M.M.; Al-Harrasi, A.; Choudhury, M.; Moustaid-Moussa, N.; Hussain, F.; Rahman, S.M. Tumor-Associated Macrophages as Multifaceted Regulators of Breast Tumor Growth. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22126526.
54. Chen, Y.; Song, Y.; Du, W.; Gong, L.; Chang, H.; Zou, Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci* **2019**, *26*, 78, doi:10.1186/s12929-019-0568-z.
55. Ushach, I.; Zlotnik, A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* **2016**, *100*, 481-489, doi:10.1189/jlb.3RU0316-144R.
56. de Vries, W.M.; Briaire-de Bruijn, I.H.; van Benthem, P.P.G.; van der Mey, A.G.L.; Hogendoorn, P.C.W. M-CSF and IL-34 expression as indicators for growth in sporadic vestibular schwannoma. *Virchows Arch* **2019**, *474*, 375-381, doi:10.1007/s00428-018-2503-1.
57. Kumar, A.; Taghi Khani, A.; Sanchez Ortiz, A.; Swaminathan, S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **2022**, *13*, 901277, doi:10.3389/fimmu.2022.901277.
58. Quail, D.F.; Taylor, M.J.; Postovit, L.M. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Curr Stem Cell Res Ther* **2012**, *7*, 197-216, doi:10.2174/157488812799859838.
59. Jordan, C.T.; Guzman, M.L.; Noble, M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* **2006**, *355*, 1253-1261, doi:10.1056/NEJMra061808.
60. Butti, R.; Gunasekaran, V.P.; Kumar, T.V.S.; Banerjee, P.; Kundu, G.C. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* **2019**, *107*, 38-52, doi:10.1016/j.biocel.2018.12.001.
61. Walcher, L.; Kistenmacher, A.K.; Suo, H.; Kitte, R.; Dluczek, S.; Strauß, A.; Blaudszun, A.R.; Yevsa, T.; Fricke, S.; Kossatz-Boehlert, U. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1280, doi:10.3389/fimmu.2020.01280.
62. Liu, X.; Huang, J.; Chen, T.; Wang, Y.; Xin, S.; Li, J.; Pei, G.; Kang, J. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res* **2008**, *18*, 1177-1189, doi:10.1038/cr.2008.309.
63. Kawaguchi, N.; Zhang, T.T.; Nakanishi, T. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8020185.
64. Grubelnik, G.; Boštjančič, E.; Pavlič, A.; Kos, M.; Zidar, N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **2020**, *245*, 456-464, doi:10.1177/1535370220905560.

65. Zhang, X.; Yuan, X.; Zhu, W.; Qian, H.; Xu, W. SALL4: an emerging cancer biomarker and target. *Cancer Lett* **2015**, *357*, 55-62, doi:10.1016/j.canlet.2014.11.037.
66. Glumac, P.M.; LeBeau, A.M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med* **2018**, *7*, 18, doi:10.1186/s40169-018-0198-1.
67. Rheinländer, A.; Schraven, B.; Bommhardt, U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett* **2018**, *196*, 22-32, doi:10.1016/j.imlet.2018.01.009.
68. Naor, D.; Nedvetzki, S.; Golan, I.; Melnik, L.; Faitelson, Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2002**, *39*, 527-579, doi:10.1080/10408360290795574.
69. Neradil, J.; Veselska, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci* **2015**, *106*, 803-811, doi:10.1111/cas.12691.
70. Kim, M.; Kim, S.; Lee, S.H.; Kim, W.; Sohn, M.J.; Kim, H.S.; Kim, J.; Jho, E.H. Merlin inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by blocking LRP6 phosphorylation. *Cell Death Differ* **2016**, *23*, 1638-1647, doi:10.1038/cdd.2016.54.
71. Zhou, L.; Ercolano, E.; Ammoun, S.; Schmid, M.C.; Barczyk, M.A.; Hanemann, C.O. Merlin-deficient human tumors show loss of contact inhibition and activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling linked to the PDGFR/Src and Rac/PAK pathways. *Neoplasia* **2011**, *13*, 1101-1112, doi:10.1593/neo.111060.
72. Shivane, A.; Parkinson, D.B.; Ammoun, S.; Hanemann, C.O. Expression of c-Jun and Sox-2 in human schwannomas and traumatic neuromas. *Histopathology* **2013**, *62*, 651-656, doi:10.1111/his.12062.
73. Chen, X.; Xu, H.; Yuan, P.; Fang, F.; Huss, M.; Vega, V.B.; Wong, E.; Orlov, Y.L.; Zhang, W.; Jiang, J.; et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* **2008**, *133*, 1106-1117, doi:10.1016/j.cell.2008.04.043.
74. Breun, M.; Schwerdtfeger, A.; Martellotta, D.D.; Kessler, A.F.; Perez, J.M.; Monoranu, C.M.; Ernestus, R.I.; Matthies, C.; Löhr, M.; Hagemann, C. CXCR4: A new player in vestibular schwannoma pathogenesis. *Oncotarget* **2018**, *9*, 9940-9950, doi:10.18632/oncotarget.24119.
75. Patel, N.V.; Ghaleb, A.M.; Nandan, M.O.; Yang, V.W. Expression of the tumor suppressor Krüppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2010**, *19*, 2631-2638, doi:10.1158/1055-9965.epi-10-0677.
76. Ghaleb, A.M.; Yang, V.W. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene* **2017**, *611*, 27-37, doi:10.1016/j.gene.2017.02.025.
77. Yi, D.; Kuo, S.Z.; Zheng, H.; Abhold, E.L.; Brown, C.M.; Doherty, J.K.; Wang-Rodriguez, J.; Harris, J.P.; Ongkeko, W.M. Activation of PDGFR and EGFR promotes the acquisition of a stem cell-like phenotype in schwannomas. *Otol Neurotol* **2012**, *33*, 1640-1647, doi:10.1097/MAO.0b013e31826a540d.
78. Hassn Mesrati, M.; Syafruddin, S.E.; Mohtar, M.A.; Syahir, A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11121850.
79. Park, S.Y.; Kim, J.Y.; Jang, G.B.; Choi, J.H.; Kim, J.H.; Lee, C.J.; Lee, S.; Baek, J.H.; Park, K.K.; Kim, J.M.; et al. Aberrant activation of the CD45-Wnt signaling axis promotes stemness and therapy resistance in colorectal cancer cells. *Theranostics* **2021**, *11*, 8755-8770, doi:10.7150/thno.63446.
80. Petty, A.J.; Owen, D.H.; Yang, Y.; Huang, X. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13215318.
81. Eun, K.; Ham, S.W.; Kim, H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep* **2017**, *50*, 117-125, doi:10.5483/bmbrep.2017.50.3.222.
82. Lim, J.R.; Mouawad, J.; Gorton, O.K.; Bubbs, W.A.; Kwan, A.H. Cancer stem cell characteristics and their potential as therapeutic targets. *Med Oncol* **2021**, *38*, 76, doi:10.1007/s12032-021-01524-8.



## 4. Thesen

1. Eine Größenzunahme des Vestibularisschwannoms basiert nicht ausschließlich auf Proliferation der Schwannomzellen.
2. Tumor-assoziierte Makrophagenmarker korrelieren mit Größenzunahme und Wachstumsrate des Vestibularisschwannoms.
3. Die COX2-Expression korreliert nicht mit der Größenzunahme oder der Wachstumsrate des Vestibularisschwannoms.
4. Eine bisher nicht bekannte Population von stammzell-ähnlichen Tumorzellen wurde in Vestibularisschwannomen aller Koos Grade nachgewiesen.
5. Die Größe der Vestibularisschwannome korreliert mit der Expression von einigen Tumorstammzellmarkern.
6. Die neu etablierte Methodik zur schonenden Gewinnung von Primärkulturen, auch von sehr kleinen Vestibularisschwannomen, ermöglicht zusätzliche Untersuchungen des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Tumorumfangzunahme.

### **Publikation 1: Vestibular Schwannoma Volume and Tumor Growth Correlates with Macrophage Marker Expression**

Literaturangabe: Leisz S, Klause CH, Vital Dos Santos T, Haenel P, Scheer M, Simmermacher S, Mawrin C, Strauss C, Scheller C, Rampp S. Vestibular Schwannoma Volume and Tumor Growth Correlates with Macrophage Marker Expression. Cancers (Basel). 2022 Sep 12;14(18):4429. doi: 10.3390/cancers14184429. PMID: 36139588; PMCID: PMC9496830.

***Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons (CC BY) Lizenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) veröffentlicht wurde.***

Beitrag der Doktorandin zur Publikation: Clara Klause hat das Paper in Zusammenarbeit mit Sandra Leisz konzipiert, geschrieben und überarbeitet. Sie hat folgende praktische Tätigkeiten ausgeführt: Tumorummetrie, RNA-Isolation und Umschreibung in cDNA, quantitative PCR, Zellkultur. Zudem wertete Clara Klause die Daten mit aus und half bei der Visualisierung.

### **Publikation 2: Establishment of vestibular schwannoma primary cell cultures obtained from cavitron ultrasonic surgical aspirator tissue material**

Literaturangabe: Leisz S, Klause CH, Becker AL, Scheer M, Simmermacher S, Strauss C, Scheller C. Establishment of vestibular schwannoma primary cell cultures obtained from cavitron ultrasonic surgical aspirator tissue material. J Neurosci Methods. 2023 Sep 1;397:109955. doi: 10.1016/j.jneumeth.2023.109955. Epub 2023 Aug 21. PMID: 37611876.

***Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons (CC BY) Lizenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) veröffentlicht wurde.***

Beitrag der Doktorandin zur Publikation: Clara Klause wirkte an der formalen Analyse, der Datenerhebung, dem Schreiben und der Überarbeitung dieses Manuskriptes mit. Sie übernahm folgende praktische Tätigkeiten: Zellkultur, Tumorummetrie, Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie. Sie war zudem an der Auswertung und Visualisierung der Daten beteiligt.



Article

# Vestibular Schwannoma Volume and Tumor Growth Correlates with Macrophage Marker Expression

Sandra Leisz <sup>1,\*</sup>, Clara Helene Klause <sup>1,†</sup>, Tania Vital Dos Santos <sup>1</sup>, Pia Haenel <sup>1</sup>, Maximilian Scheer <sup>1</sup>, Sebastian Simmermacher <sup>1</sup>, Christian Mawrin <sup>2</sup>, Christian Strauss <sup>1</sup>, Christian Scheller <sup>1,†</sup> and Stefan Rapp <sup>1,3,‡</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurosurgery, Medical Faculty, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Ernst-Grube-Str. 40, 06120 Halle (Saale), Germany

<sup>2</sup> Department of Neuropathology, Otto von Guericke University Magdeburg, Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg, Germany

<sup>3</sup> Department of Neurosurgery, University Hospital Erlangen, Schwabachanlage 6, 91054 Erlangen, Germany

\* Correspondence: [sandra.leisz@uk-halle.de](mailto:sandra.leisz@uk-halle.de); Tel.: +49-(0)-345-557-7014

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Leisz, S.; Klause, C.H.; Vital Dos Santos, T.; Haenel, P.; Scheer, M.; Simmermacher, S.; Mawrin, C.; Strauss, C.; Scheller, C.; Rapp, S. Vestibular Schwannoma Volume and Tumor Growth Correlates with Macrophage Marker Expression. *Cancers* **2022**, *14*, 4429. <https://doi.org/10.3390/cancers14184429>

Academic Editors: Yasin Temel and Dirk Kunst

Received: 16 August 2022

Accepted: 8 September 2022

Published: 12 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** The variable growth behavior of vestibular schwannomas (VS) makes therapy decisions very difficult. These benign tumors, which originate from the eighth cranial nerve, partly show a very slow growth rate over many years. Nevertheless, VS can lead to severe symptoms such as hearing loss and dizziness within a short time due to their increase in size. Despite numerous preliminary studies, no apparent influencing factor on size progression could be found so far. In our study, we consider the influence of growth factors and macrophage markers on the volume and growth rate of VS. While growth factors show no effect on tumor growth, higher expression of macrophage markers indicates an infiltration of macrophages. They may thus enhance the growth of VS and therefore represent a potential therapeutic target.

**Abstract:** Vestibular schwannoma is the most common benign tumor of the cerebellopontine angle and originates from Schwann cells surrounding the vestibulocochlear nerve. Since the size of the VS varies widely, affected patients suffer from symptoms of varying severity. It is often difficult to determine the optimal time for therapy, due to the unpredictability of the growth rate. Despite many investigations on influencing factors, no mechanism responsible for the increase in the growth rate of certain VS has been identified so far. Therefore, the present study investigates the influence of the seven markers: Ki-67, cyclooxygenase 2 (COX2), vascular endothelial growth factor (VEGF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), CD163, and CD68 on tumor progression and tumor size in a cohort of 173 VS. The markers were determined by quantitative PCR and correlated with tumor volume and VS growth rate. The analysis showed a significantly negative correlation of the Ki-67, COX2, and VEGF on tumor volume. Moreover, with a higher volume of VS, the expression of the macrophage markers CD68, CD163, and GM-CSF increased significantly. Our results suggest that the increase in VS size is not primarily due to Schwann cell growth but to an infiltration of macrophages. This may have an impact on non-invasive therapy to preserve the hearing function of affected patients.

**Keywords:** vestibular schwannoma; tumor growth; tumor volume; macrophage infiltration; CD68; CD163; TAM

## 1. Introduction

VS are benign tumors originating from Schwann cells surrounding the eighth cranial nerve. Limited research has been carried out on the development and progression of this tumor. Most VS are associated with a loss of function mutation or promoter methylation of

the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene [1,2]. Six percent of all cranial tumors are VS and comprise 80% of the tumors in the cerebellopontine angle. Within the last few years, the incidence of VS has increased due to better diagnostic methods such as contrast MRI [3]. Patients with VS do often have unilateral hearing loss. Additional symptoms are tinnitus, vertigo, trigeminal complaints, and facial nerve affection due to the proximity of the tumor to cranial nerves [4–6].

The size and growth of VS vary widely. Some VS grow very expansive but not invasive within a few months; others stagnate in growth for several years. While large and small symptomatic tumors are usually treated surgically or irradiated, the growth of smaller asymptomatic tumors is monitored regularly by MRI (wait and scan) [7]. Currently, there is no approved pharmacological therapy for the treatment of VS. Paldor et al. reported that neither sex nor patient age has an impact on VS growth rate. The molecular determinants of progressive or stagnant VS are currently unknown. This makes the prediction of progression and an appropriate point in time for intervention difficult [8]. Since surgical removal carries the risk of postoperative hearing loss, facial nerve palsy, and headache [9], more accurate growth prediction could avoid unnecessary surgical removal, thus reducing the risk of nerve injury. This could lead to longer maintenance of hearing function and thus significantly improve the quality of life of affected patients.

In recent years, several factors have been investigated, which might influence the growth rate of VS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) correlated positively with tumor growth rate in a study of 27 patients [10].

CD68 and CD163 are two important macrophage markers. While CD68 as a transmembrane glycoprotein is present on the surface of all macrophages, the endocytic receptor CD163 was found mainly expressed on M2 macrophages, which have anti-inflammatory, proto-oncogenic effects [11,12]. M1 macrophages have inflammatory non-oncogenic effects [13]. De Vries et al. examined a correlation between macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and CD163. The expression of both factors was higher in fast-growing VS. [14]. In addition, the authors found a positive correlation between CD68 and tumor size [15]. No preliminary studies have yet been performed on VS on the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), which can have anti- or pro-tumorigenic effects depending on its expression and tumor immune microenvironment [16,17].

Other previous studies identified Ki-67, a protein only expressed by mitotic cells, and the enzyme cyclooxygenase 2 (COX2) as influencing factors. The VS tumor volume increased with a high expression of Ki-67 [18] as well as COX2 [19].

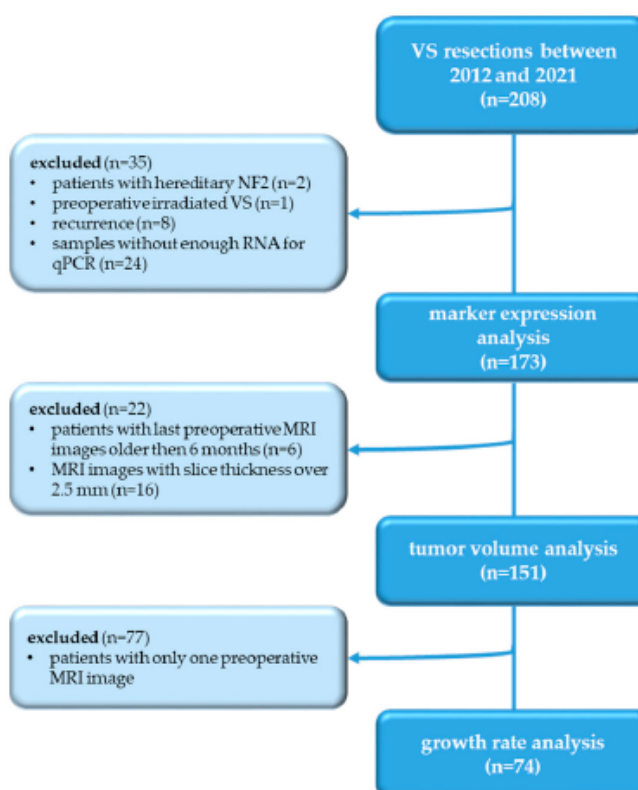
The previous studies mostly investigated only single factors on VS tumor size or growth rate using immunohistochemistry (IHC). The present work investigated the influence of the different factors VEGF, Ki-67, COX2, M-CSF, GM-CSF, CD68, and CD163 on tumor volume and growth as well as on clinical parameters, such as age and hearing, in a cohort of 173 patients using mRNA data and IHC.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

Between 2012 and 2021, 208 VS were treated by surgery in the authors' institution. A total of 35 patients with irradiated VS, recurrence, hereditary neurofibromatosis, and VS from which not enough RNA was isolated for qPCR were excluded. This resulted in a final number of 173 included patients. All participants had a single VS, were adult, had at least one preoperative MRI image, and received microsurgical treatment. Clinical data on age, sex, Koos grade, and hearing class were obtained from the patient's medical record [20]. The RNA of these 173 VS was used for marker expression analysis by qPCR. A total of 22 patients with MRI images older than 6 months before surgery and those with a slice thickness greater than 2.5 mm were excluded, resulting in 151 patients being part of tumor volume analysis. A total of 77 patients had only one preoperative MRI image and were therefore not suitable for growth rate analysis, which was performed in the remaining 74 patients with multiple preoperative MRI images (Figure 1). The ethics committee of the

Medical Faculty of Martin Luther University Halle-Wittenberg (approval number 2020-122) approved the study. Written informed consent was obtained from all patients.



**Figure 1.** Flow diagram of the study.

Preoperatively, each patient's hearing class was determined according to the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (AAO-HNS) hearing classification, extended by a "D surditas" (DS) category for complete deafness. In addition, preoperative MRI images were used to determine tumor volume by volumetry, and a sample (30–50 mg) was taken during surgical removal to quantify tumor markers.

## 2.2. Tumor Volumetry

One MRI series each with a slice thickness between 0.35 and 2.50 mm was used to analyze the preoperative tumor volume (cm<sup>3</sup>). Only images acquired no more than 6 months prior to surgery were used. Volumetry was performed using the software Brainlab Origin Server 1.1 iPlan Net, version 3.7.0.64 (Brainlab, Munich, Germany). After selecting suitable image sequences (T2-weighted or T1-weighted images, contrasted with gadolinium), the Smart Brush function was used to measure the volume. Growth rate was determined in participants with more than one preoperative MRI image. This involved volumetry of all preoperative images and subsequent calculation of the growth rate in cubic centimeters per year. The minimum interval between preoperative images was 6 months. Growth rate (cm<sup>3</sup> per year) was calculated in patients with multiple preoperative MRI images using the formula:

$$\frac{\text{tumor volume MRI 2} - \text{tumor volume MRI 1}}{(\Delta \text{ days MRI 1} - 2/365)}$$



### 2.3. RNA Isolation and Reverse Transcription

A 30–50 mg tumor sample obtained during surgery was used to isolate RNA. A 10-fold volume AllProtect (Qiagen, Hilden, Germany) solution was added to the sample immediately after surgery. The AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for isolation. Appropriate amount of buffer RLT supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol (1:100, Roth, Karlsruhe, Germany) was added and the sample was disrupted using TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) for 2 min at 50 Hz with stainless steel beads (5 mm, Qiagen, Hilden, Germany). After centrifugation (3 min, 10,000 rpm), supernatant was used for RNA isolation according to the manufacturer's instructions. Finally, the RNA was eluted in 30  $\mu$ L of RNase-free water. RNA measurement was performed with the Tecan M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) at wavelengths of 260, 280 and 310 nm. The reverse transcription was carried out according to the instructions of the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using oligo(dT)<sub>18</sub>-primers. The concentration of cDNA was adjusted to 20 ng/ $\mu$ L. The RNA was incubated for 10 min at 70 °C in the thermocycler PEQLAB primus 25 advanced (VWR, Avantor, Radnor, PA, USA). After addition of the master mix, transcription was performed for 60 min at 42 °C and the reaction was terminated by 5 min at 70 °C.

### 2.4. Quantitative Real-Time PCR

Quantitative real-time polymerase chain reactions (PCR) were performed for determination of the various tumor markers. An amount of 1  $\mu$ L of the cDNA obtained from the tumor sample at a concentration of 20 ng/ $\mu$ L was used. Two-step PCR was performed using 10  $\mu$ L of Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 0.5  $\mu$ L each of the corresponding forward and reverse primers (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, 100  $\mu$ mol) (Table 1) resulting in a total volume of 20  $\mu$ L in Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany). Marker expression was normalized to expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Analysis of the expression data and creation of the heat map was carried out using Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

**Table 1.** Primers used for real-time quantitative PCR.

Gene Name	Oligo Sequence 5' to 3' (Forward, Reverse)	Annealing Temperature (°C)	Product Length	Reference Sequence	Species
CD68	CGCAGCACAGTGGACATTCT GGATCAGGCCGATGATGAGAG	60	236	NM_001251.3	Homo sapiens
CD163	AAAAAGCCACAACAGGTCGC ATGGCCTCCTTTTCCATTCCA	60	322	NM_004244.5	
COX2	CCCTTCTGCCTGACACCTTT TTCTGTACTGCGGTGGAAC	60	203	NM_000963.3	
Ki-67	GATCGTCCAGTGGAAGAGTT ATGCCTCCTGCTCATGGATT	60	276	NM_002417.5	
M-CSF	CCAGAAGGAGGACCAGCAAG CCAAGGGAGAATCCGCTCTC	60	244	NM_000757.6	
GM-CSF	AGACACTGCTGCTGAGATGAAT AGGAAGTTTCCGGGGTTGG	60	197	NG_033024.1	
VEGFA	AACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGG ATCAGGGTACTCCTGGAAGATGTCC	60	205	NM_001171630.1	
GAPDH	TCGTGGAAGGACTCATGACC TTCCCGTTCAGCTCAGGGAT	60	172	NM_002046.7	

### 2.5. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was performed with specific antibodies against CD68, CD163, COX2, and Ki-67 (Table 2) as previously described in detail [21].

**Table 2.** Antibodies used for IHC.

Antibody	Source/Isotype	Dilution	Manufacturer
CD68	Mouse IgG	1:4000	Agilent, Santa Clara, CA, USA
CD163	Rabbit IgG	1:500	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
COX2	Rabbit IgG	1:400	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Ki-67	Mouse IgG	Ready to use	Agilent, Santa Clara, CA, USA

### 2.6. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed in subgroups according to available data: marker expression analysis in all 173 patients, tumor volume analysis in 151 patients, and growth rate analysis in 74 patients.

In a first exploratory analysis, correlations between markers as well as clinical variables were evaluated. A classification of the correlation coefficient was used for data interpretation [22]. Correlations in the subgroup with available growth rate data were calculated separately. As AAO-HNS hearing classes are ordinally scaled and the remaining parameters had non-normal distributions, Spearman's rank correlations were consistently used for all pairings. Due to the exploratory nature of this step, results were not corrected for multiple comparisons.

Significant correlations with tumor size or growth rates were further investigated using regression analysis. Significant markers or clinical variables then served as predictors whereas tumor size and growth rate separately served as responses. Due to skewed, non-normal distributions, parameters were log-transformed before inputting into the regression model.

To further illustrate the contrast between slow- and fast-growing VS, growth rates were divided into two groups:  $<0.1 \text{ cm}^3/\text{year}$  and  $>1 \text{ cm}^3/\text{year}$ . Cases with growth rates between these ranges were excluded from this analysis step. The two groups were compared using a non-parametric Wilcoxon signed-rank test. Results were not corrected for multiple comparisons. All analysis steps were calculated using R version 4.0.5 [23].

## 3. Results

### 3.1. Correlation Analysis of Markers Investigated and Tumor Volume

In a correlation analysis of investigated markers, tumor volume and clinical data of 173 patients were included. The cohort included 71 male and 102 female patients with a mean age of 51 years (Table 3). The overall mean tumor volume was  $3.3 \text{ cm}^3$  ( $0.1\text{--}37.0 \text{ cm}^3$ ) and the median tumor volume was  $1.2 \text{ cm}^3$ . The study included a few small VS (Koos 1,  $n = 11$ ). Most VS corresponded to Koos grade 2 ( $n = 63$ ) or Koos grade 3 ( $n = 61$ ). Displacing growing VS were detected in 38 patients (Koos 4). While the majority of participants had little or no limitation in their hearing function (AAO-HNS A, B), 59 patients suffered from advanced hearing loss (AAO-HNS C, D). In 10 of the 173 participants, complete hearing loss was detected preoperatively (AAO-HNS DS).

**Table 3.** Baseline data for correlation analysis of 173 patients with VS.

Variable	Total (n = 173)
Male	71
Female	102
Mean age (years)	51 (18–77)
Koos grade	
1	11
2	63
3	61
4	38
AAO-HNS <sup>1</sup> (hearing class)	
A	56
B	47
C	41
D	18
DS	10
Mean tumor volume (cm <sup>3</sup> )	3.3 (0.1–37.0)
Median tumor volume (cm <sup>3</sup> )	1.2

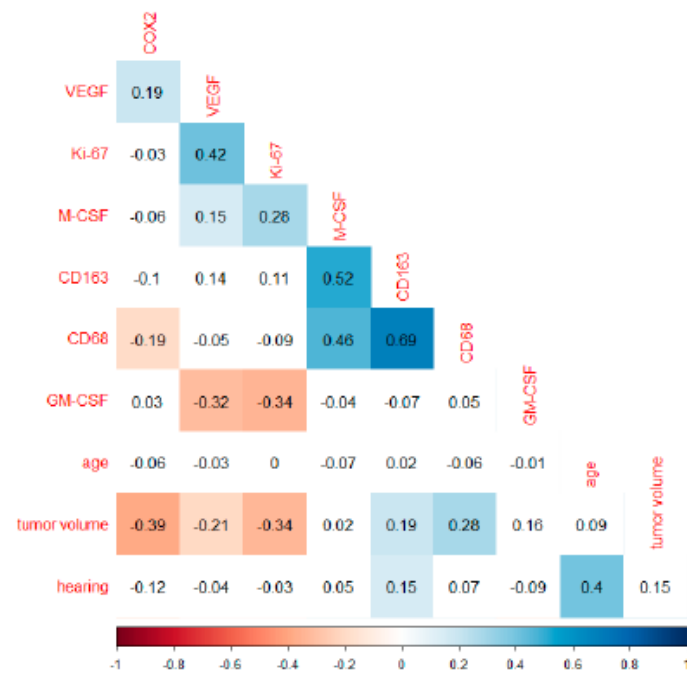
<sup>1</sup> AAO-HNS: American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.

For evaluation, clinical data were correlated with the quantitative determinations of the markers using qPCR. An overview of the mRNA marker expression is shown as a heat map (Figure S1). Correlation analysis of the markers COX2, VEGF, Ki-67, CD163, CD68, GM-CSF and M-CSF with age, tumor volume, and hearing class were performed using Spearman's rank correlation coefficient (Figure 2). The angiogenesis promoting factor VEGF correlated moderately positively with the growth factor Ki-67 ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.0001$ ) and weakly positively with COX2 ( $r = 0.19$ ,  $p = 0.01$ ), as well as with M-CSF ( $r = 0.15$ ,  $p = 0.048$ ) in VS. The macrophage differentiation factor M-CSF additionally correlated weakly positively with Ki-67 ( $r = 0.28$ ,  $p < 0.0001$ ) and moderately positively with the two macrophage antigens CD68 ( $r = 0.46$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD163 ( $r = 0.52$ ,  $p < 0.0001$ ). In VS, high expression of CD68 led to a strong increase in CD163 expression ( $r = 0.69$ ,  $p < 0.0001$ ). Only CD68 and COX2 correlated weakly negatively with each other ( $r = -0.19$ ,  $p = 0.01$ ). The analysis of GM-CSF expression showed significant negative correlations with VEGF ( $r = -0.32$ ,  $p < 0.0001$ ) and Ki-67 ( $r = -0.34$ ,  $p < 0.0001$ ). The higher the tumor volume of a VS, the lower the expression of COX2 ( $r = -0.39$ ,  $p < 0.0001$ ), VEGF ( $r = -0.21$ ,  $p = 0.009$ ), and Ki-67 ( $r = -0.34$ ,  $p < 0.0001$ ). With progressive expansion of the VS and thus increasing tumor volume, the expression of the macrophage markers CD68 ( $r = 0.28$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD163 ( $r = 0.19$ ,  $p = 0.02$ ) increased weakly. The correlation of the clinical parameters age and hearing class showed a moderate positive correlation ( $r = 0.4$ ,  $p < 0.0001$ ). In addition, hearing function correlated weakly positively with CD163 ( $r = 0.15$ ,  $p = 0.049$ ) (Figure 2). Further statistically significant correlations could not be identified. The Supplementary contains the correlation analysis, supplemented by the Koos classification (Figure S2).

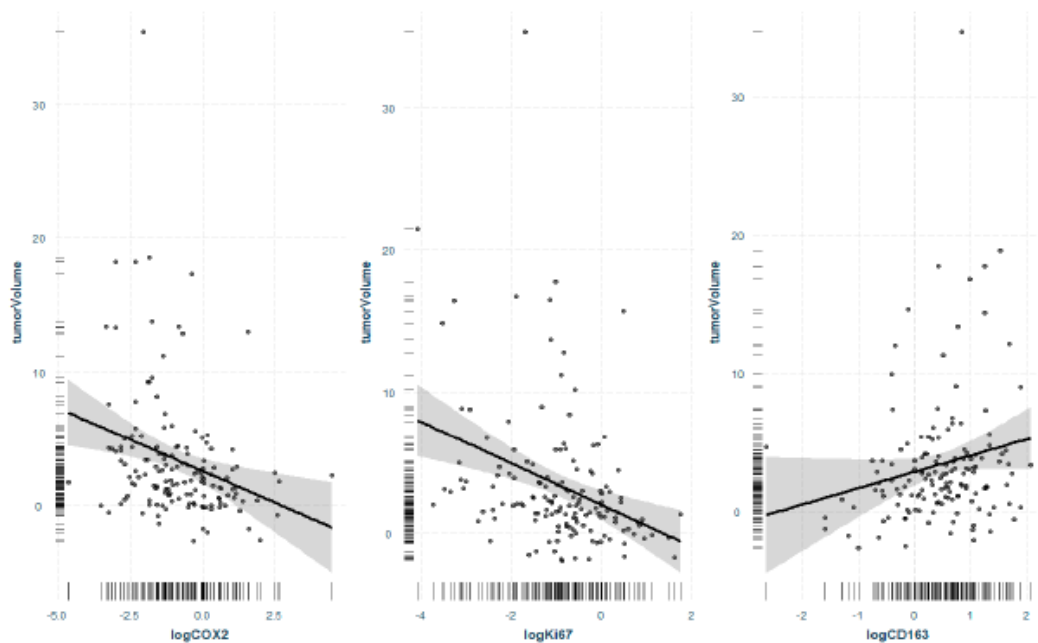
### 3.2. Regression Analysis of Significant Markers and Tumor Volume

For a more detailed examination of the correlations, regression analysis with the response variable tumor volume was performed. When examining the significant markers from the correlation analysis, three markers were identified that had a significant effect on tumor volume even without the influence of the other markers. COX2 ( $p = 0.003$ ) and Ki-67 ( $p = 0.0002$ ) showed a statistically significant negative association with tumor volume, as previously presented in the correlation analysis. CD163 expression increased in larger VS even without the involvement of the other tumor markers ( $p = 0.08$ ) (Figure 3).





**Figure 2.** Correlation analysis with Spearman's rank correlation coefficient. Plot of correlations includes markers investigated, age and hearing class in 173 patients, correlation analysis of markers investigated and tumor volume in 151 patients. The numbers shown correspond to the correlation value  $r$ , also reflected by the color shading. Non-significant correlations ( $p \geq 0.05$ ) are shown with a white background.



**Figure 3.** Regression analysis with response variable tumor volume and factors COX2, Ki67, and CD163. Only markers that were significant in correlation analysis and regression were considered. Data are log-transformed due to skewed non-normal distribution and correspondingly displayed on a logarithmic scale. Grey area shows 95% confidence interval, points show partial residuals, the rug lines on both axes show the distribution of the data.

### 3.3. Correlation Analysis of Markers Investigated and Tumor Growth Rate

For correlation analysis of VS growth rate, all patients with multiple preoperative MRI images were included. Thus, the analysis involved 74 patients, of whom 32 are male and 42 are female. The mean tumor volume was 2.44 cm<sup>3</sup> (0.1–18.8 cm<sup>3</sup>) and the median tumor volume was 0.8 cm<sup>3</sup>. The mean growth rate per year was 1.0 cm<sup>3</sup> (0.01–17.5 cm<sup>3</sup>) and the median growth rate was 0.3 cm<sup>3</sup> (Table 4).

**Table 4.** Baseline data for correlation analysis of 74 patients with VS with growth rate.

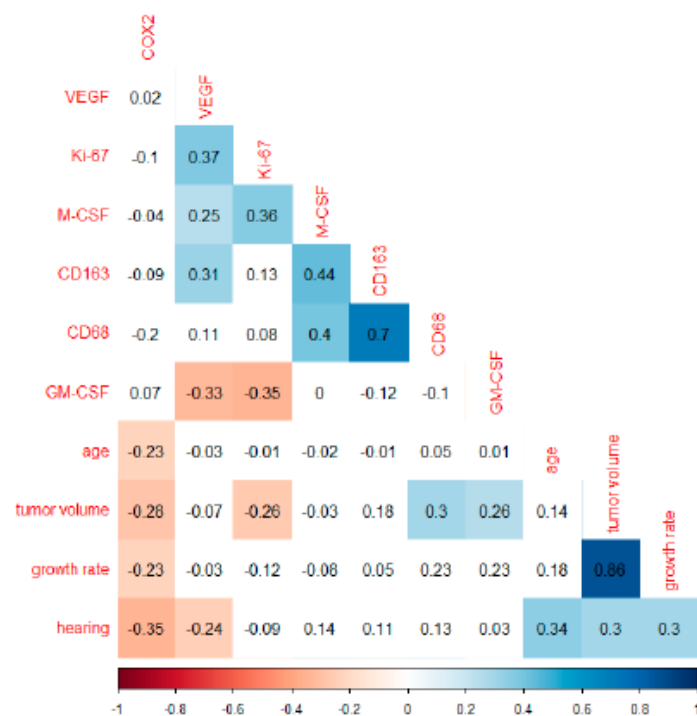
Variable	Total (n = 74)
Male	32
Female	42
Mean age (years)	53 (28–77)
Koos grade	
1	8
2	36
3	17
4	13
AAO-HNS <sup>1</sup> (hearing class)	
A	18
B	23
C	19
D	7
DS	6
Mean tumor volume (cm <sup>3</sup> )	2.44 (0.1–18.8)
Median tumor volume (cm <sup>3</sup> )	0.8
Mean growth rate (cm <sup>3</sup> /year)	1.0 (0.01–17.5)
Median growth rate (cm <sup>3</sup> /year)	0.3

<sup>1</sup> AAO-HNS: American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.

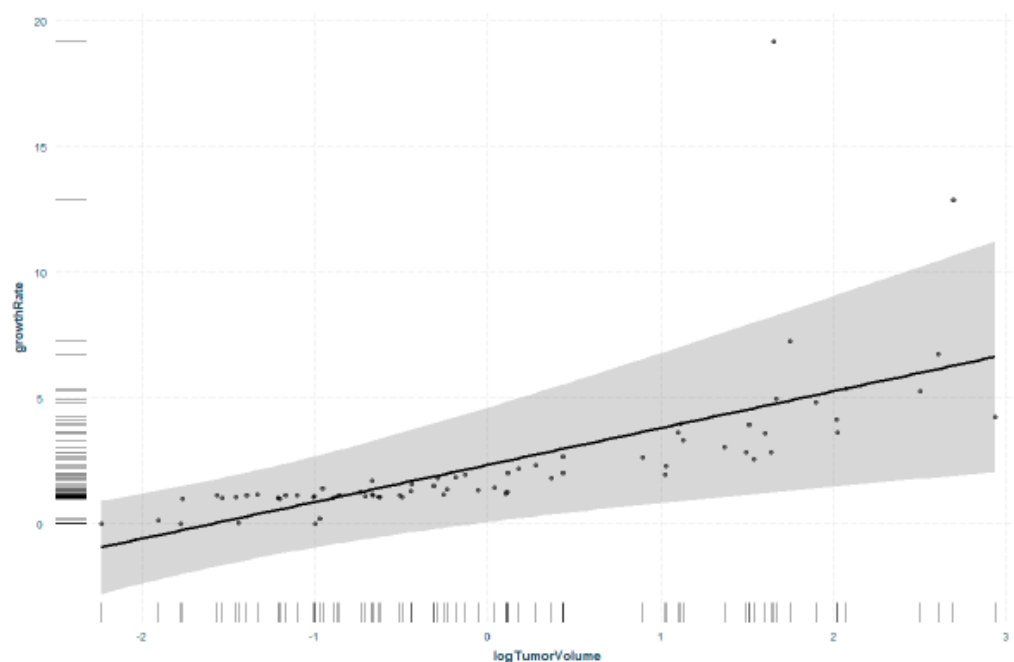
The correlation analysis of the growth rate including the markers was investigated with Spearman's rank correlation coefficient. The growth rate correlated very strongly with tumor volume ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.0001$ ) in VS. Furthermore, hearing class worsened weakly with a higher growth rate ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.008$ ). In addition to the correlation of hearing class with age ( $r = 0.34$ ,  $p = 0.002$ ) and growth rate, this analysis showed weak positive correlations with tumor volume ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.011$ ). Patients with VS with higher expression of the growth factors COX2 ( $r = -0.35$ ,  $p = 0.002$ ) and VEGF ( $r = -0.24$ ,  $p = 0.038$ ) had a lower hearing class. Patient age correlated weakly negatively with COX2 expression ( $r = -0.23$ ,  $p = 0.049$ ). COX2 also showed a correlation with growth rate ( $r = -0.23$ ,  $p = 0.049$ ). Although the correlation between CD68 and growth rate was not significant, a weak increase in CD68 expression in rapidly growing VS was detectable. Considering only the patients with growth rate, GM-CSF also correlated positively with tumor volume ( $r = 0.26$ ,  $p = 0.045$ ) (Figure 4). Furthermore, a correlation analysis including the Koos classification was performed (Figure S3).

### 3.4. Regression Analysis of Tumor Volume and Tumor Growth Rate

The very strong correlation of tumor volume with the growth rate of VS could be demonstrated in the subsequently performed regression analysis. The response variable growth rate is significantly higher in large VS without the influence of other factors ( $p = 0.003$ ). The growth rate tended to increase with higher tumor volume (Figure 5).



**Figure 4.** Correlation analysis with Spearman's rank correlation coefficient in 74 patients with growth rate. Plot of correlations includes markers investigated, tumor volume, growth rate, age, and hearing class. The numbers shown correspond to the correlation value  $r$ , also reflected by the color shading. Non-significant correlations ( $p \geq 0.05$ ) are shown with a white background.

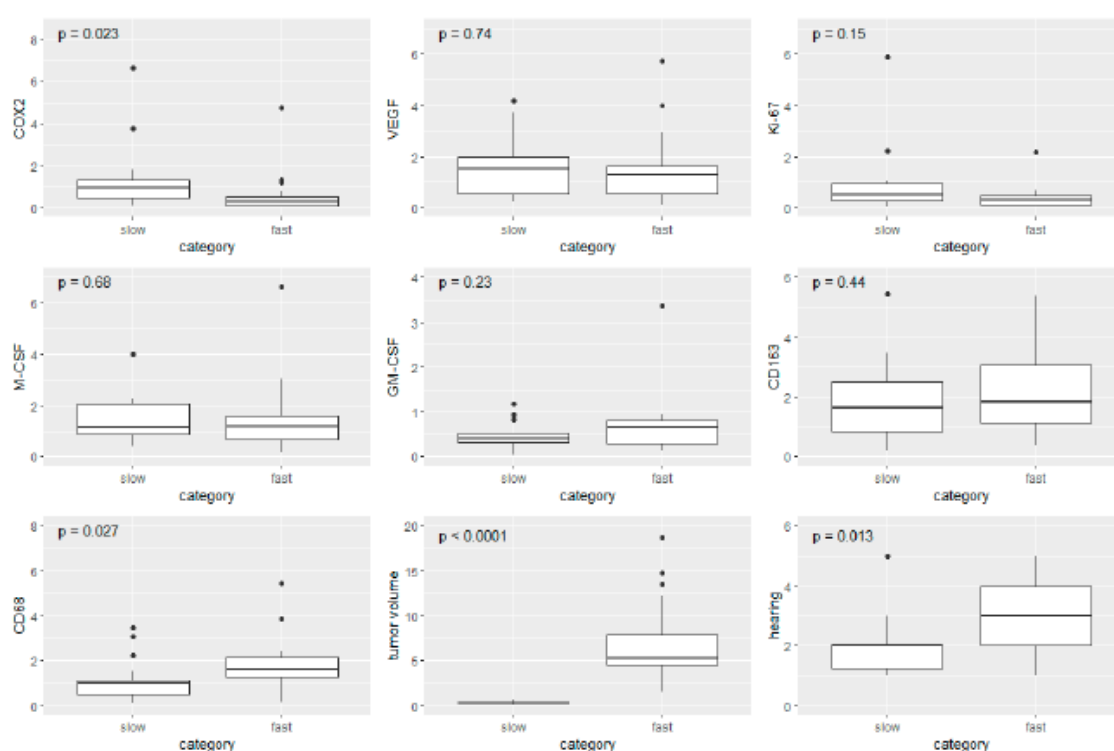


**Figure 5.** Regression analysis with response variable growth rate and factor tumor volume. Data are log-transformed due to skewed non-normal distribution and correspondingly displayed on a logarithmic scale. Grey area shows 95% confidence interval, points show partial residuals, the rug lines on both axes show the distribution of the data.

### 3.5. Boxplot Analysis in Fast- and Slow-Growing VS

To further illustrate the influence of VS growth rate, patients were divided into two groups. VS with a growth rate  $< 0.1 \text{ cm}^3$  per year correspond to slow-growing VS and those with a growth rate  $> 1 \text{ cm}^3$  per year correspond to fast-growing ones. The boxplot analysis included 16 patients with slow-growing VS with a mean age of 49 years and a mean tumor volume of  $0.3 \text{ cm}^3$ . The mean growth rate of slow-growing VS per year was  $0.05 \text{ cm}^3$ . The mean age of the 17 patients with fast-growing VS was 57 years. Fast-growing VS had a mean tumor volume of  $7.2 \text{ cm}^3$  and a mean growth rate of  $3.5 \text{ cm}^3$  per year (Table 5).

A comparison between slow- vs. fast-growing VS revealed five statistically significant differentially expressed markers. Slow-growing VS were presented with a significantly higher expression of COX2 than fast-growing VS ( $p = 0.023$ ). The median COX2 expression of slow-growing schwannomas was nearly four times as high as the ones of the fast-growing schwannomas (median slow-growing = 0.96; median fast-growing = 0.27) (Figure 6).



**Figure 6.** Boxplots of slow- and fast-growing VS. Looking at the seven markers investigated, as well as tumor volume and hearing class, the boxes represent the interquartile range and the crossbar marks the median value. Whiskers illustrate extreme values, excluding outliers, which are outside of 1.5 times the interquartile distances above/below the third/first quartile and depicted as points.

In contrast, the expression of the macrophage marker CD68 was significantly higher in VS with a growth rate  $> 1 \text{ cm}^3$  per year (median = 1.81) than in those with a growth rate  $< 0.1 \text{ cm}^3$  per year (median = 0.99) ( $p = 0.027$ ).

Furthermore, the comparison of fast- and slow-growing VS showed significant correlations when considering the clinical parameters of tumor volume and hearing class. While slow-growing VS showed a median tumor volume of  $0.3 \text{ cm}^3$ , fast-growing VS had a median tumor volume of  $5.3 \text{ cm}^3$  ( $p < 0.0001$ ). Patients with slow-growing VS had on average moderately impaired hearing function. The hearing performance of patients with fast-growing VS was one hearing class worse ( $p = 0.013$ ).

**Table 5.** Baseline data for boxplot analysis of 16 slow- and 17 fast-growing VS.

Variable	Slow-Growing VS (n = 16)	Fast-Growing VS (n = 17)
Male	6	9
Female	10	8
Mean age (years)	49 (28–70)	57 (31–77)
Koos grade		
1	4	0
2	12	0
3	0	7
4	0	10
AAO-HNS <sup>1</sup> (hearing class)		
A	5	1
B	8	6
C	2	4
D	0	2
DS	1	3
Mean tumor volume (cm <sup>3</sup> )	0.3 (0.1–0.6)	7.2 (1.5–18.8)
Mean growth rate (cm <sup>3</sup> /year)	0.05 (0.01–0.1)	3.5 (1.0–17.5)

<sup>1</sup> AAO-HNS: American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.

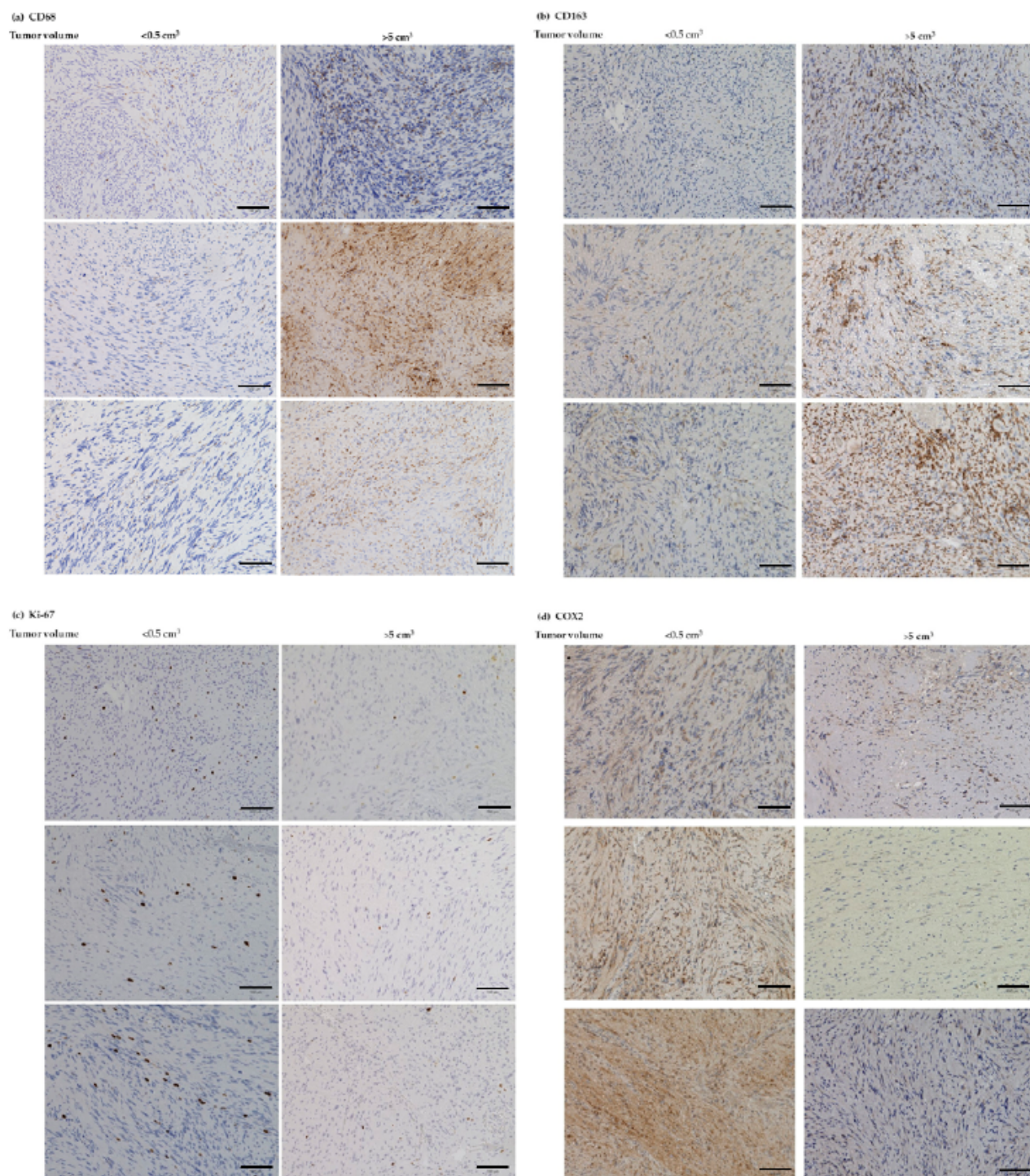
Although CD163 expression did not show a statistically significant correlation when comparing the two groups of fast- and slow-growth VS, its expression was higher in fast-growing VS than in slow-growing VS. The other markers determined in the study did not show any significant correlations between the two groups of fast- and slow-growing VS.

### 3.6. IHC Analyses of CD68, CD163, Ki-67, and COX2

For further consideration of our results on the mRNA level, an exemplary investigation of the significant markers at the protein level using IHC was performed. For this, we randomly selected three VS samples each with a tumor volume < 0.5 cm<sup>3</sup>, three VS each with a tumor volume > 5 cm<sup>3</sup>, three patients each with a fast-growing VS (>1 cm<sup>3</sup>/year) and three with a slow-growing VS (<0.1 cm<sup>3</sup>/year). We obtained overview images at 40× magnification (Figure S4) and images at 200× magnification of the four markers, which correlated significantly at mRNA level (Figure 7). The results show that the protein levels of both macrophage markers CD68 (Figure 7a) and CD163 (Figure 7b) are higher in the three larger VS than in the smaller VS. In contrast, a lower protein amount of Ki-67 (Figure 7c) and COX2 (Figure 7d) could be detected in the large VS by IHC.

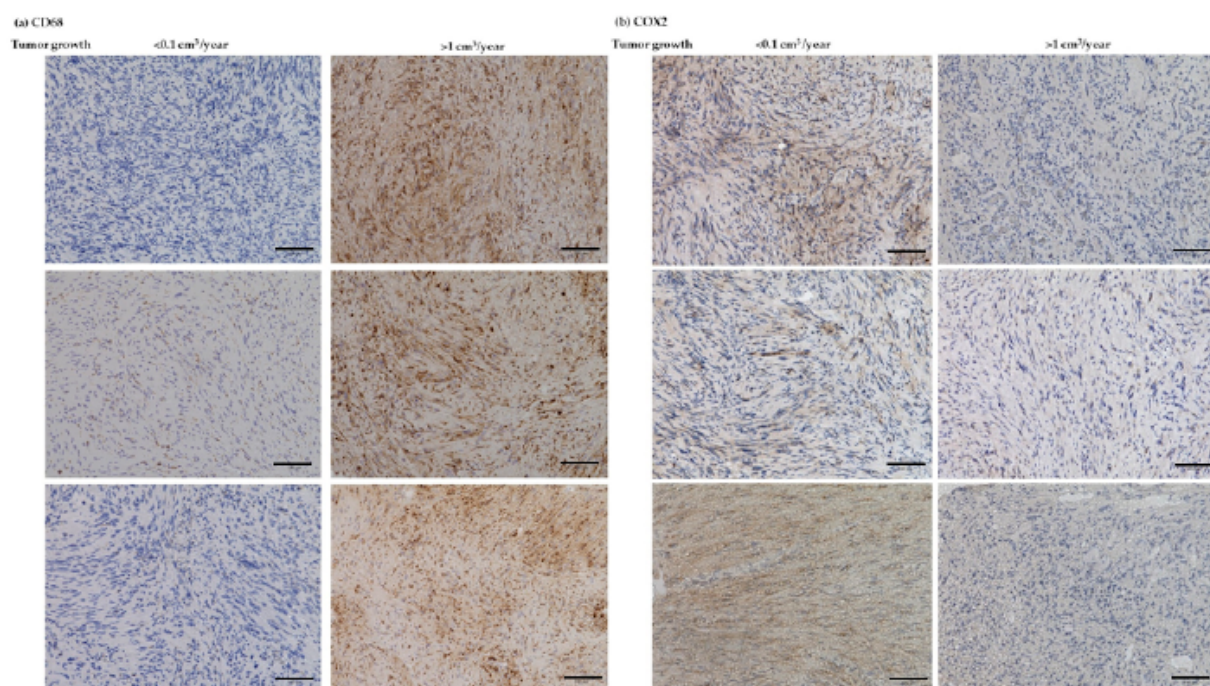
In addition, IHC analyses were performed on the two markers, which were detected to be significantly differentially expressed with regard to the different growth rates (boxplot analyses, Figure 6). Abundant CD68 expression was detected in the fast-growing VS. (Figure 8a). In addition, protein expression of COX2 was decreased in the fast-growing VS. (Figure 8b). Furthermore, overview images were captured at 40× magnification (Figure S5).





**Figure 7.** Exemplary IHC analyses of macrophage markers CD68 (a) and CD163 (b) as well as Ki-67 (c) and COX2 (d) in VS with tumor volume < 0.5 cm³ (left side) and >5 cm³ (right side). Bar = 100 µm.





**Figure 8.** Exemplary IHC analyses of macrophage marker CD68 (a) and COX2 (b) in VS with growth rate  $<0.1 \text{ cm}^3/\text{year}$  (left side) and  $>1 \text{ cm}^3/\text{year}$  (right side). Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Discussion

In recent years, there has been a surge of interest in identifying a possible factor influencing the growth of sporadic VS. Hong et al. suggested that one explanation for a higher growth rate is the increased expression of COX2 in rapidly growing VS. [24]. The authors examined COX2 expression in 15 sporadic VS by IHC and found significantly higher expression in fast-growing VS. In addition, a positive correlation between COX2 expression and tumor extension (Hannover classification) in 1048 VS was detected by IHC [19]. However, no increase in COX2 expression was found with an increasing volumetric growth rate [25]. Treatment with COX2 inhibitors did not affect COX2 expression and VS- growth [19]. In a retrospective study of 347 patients, regular MRI scans showed a difference in VS growth in patients taking the pan-COX inhibitor aspirin regularly versus patients not taking aspirin. Kandathil et al. therefore suggested a possible therapeutic role of COX2 inhibitors to prevent VS growth [26,27]. An in vitro study of VS primary cultures also demonstrated an inhibitory effect of aspirin on VS proliferation, which was not confirmed in healthy Schwann cells [28].

A correlation between increased COX2 expression and tumor progression is suspected in various malignant tumors [29]. In breast and colorectal cancer, such a correlation has been identified. [30,31]. However, VS is a benign tumor that may have different growth characteristics compared to malignant tumors. Our study showed an opposite effect on tumor volume. The expression of COX2 was decreased in both large VS and fast-growing VS. This result was also confirmed by regression analysis and exemplary IHC analysis. In contrast to previous studies, our results showed an opposite effect of the prostaglandin-producing enzyme COX2 on the progression of VS.

In many prior studies, cell mitosis was detected by the diagnostic cell proliferation marker Ki-67, which was associated with increased COX2 expression but showed no effect on greater tumor volume or higher growth rate [32,33]. Koutsimpelas et al. examined a positive correlation between proliferation index and tumor diameter in 182 sporadic VS [18]. In contrast to this, analysis of 747 VS showed increasing Ki-67 expression in smaller

tumors and VS with a higher growth rate [25]. In contrast to the previous study, our study showed lower expression of Ki-67 in large VS and in fast-growing VS. Abundant Ki-67 expression was also detected in the IHC sections of the smaller VS. Therefore, it is likely that the proliferation of Schwann cells does not play a prominent role in the growth of VS.

The angiogenesis-promoting factor VEGF represents a key factor in the angiogenesis of malignant tumors, such as lung carcinoma [34]. As a mediator of angiogenesis in tumors, it promotes new vessel growth to supply oxygen and nutrients [35]. Nevertheless, Brieger et al. found no evidence of VEGF influencing VS size progression [36]. Other studies showed that the growth rate correlated positively with VEGF expression, being significantly higher in VS than in healthy nerves [10,37]. In contrast to these studies, we showed that VEGF expression was decreased with increasing tumor volume. Although angiogenesis plays a crucial role in the progression of various tumors [35], this does not seem to apply to the VS. This supports our hypothesis that tumor growth is not exclusively due to the proliferation of Schwann cells, which are dependent on blood nutrient supply.

Studies increasingly show that the tumor microenvironment influences the progression of tumors [38]. An influence of this milieu was also discussed for VS. Hannan et al. assume an inflammatory process that promotes growth [39]. Analyzing 19 sporadic VS by positron emission tomography (PET) scan showed increased inflammatory activity in growing VS [40]. Although COX2 is a pro-inflammatory enzyme, the increase in inflammatory processes may have other causes. Therefore, immune cell infiltration and tumor microenvironment of VS need to be better elucidated to understand tumor development and to find suitable targets for drug therapy [40–42]. In particular, infiltration of macrophages has been the subject of numerous preliminary studies.

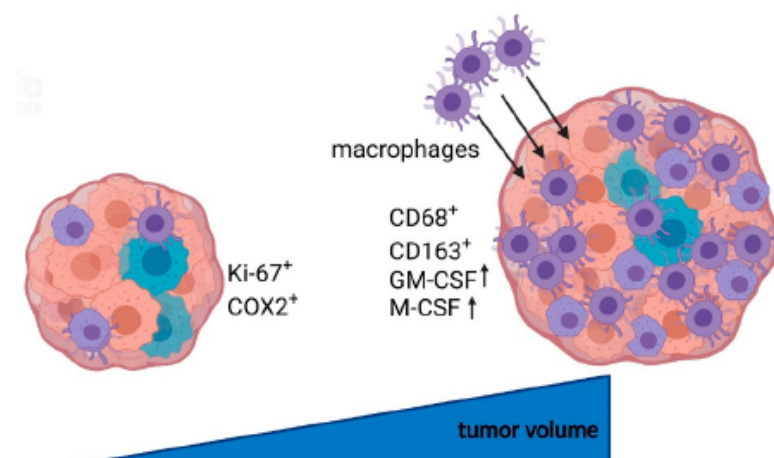
Two main phenotypes of polarized macrophages are characterized. Whereas M1 macrophages are mainly involved in inflammatory non-oncogenic processes, M2 macrophages have anti-inflammatory, proto-oncogenic functions [13]. Tumor-associated macrophages (TAMs), which play a role in the development of various tumor entities, are similar to M2 macrophages [43] and express the macrophage antigen CD163 [44]. De Vries et al. demonstrated higher expression of the macrophage marker CD68 in large, rapidly growing VS in 67 sporadic VS [15]. Perry et al. indicated the dominance of CD163 negative M1 macrophages in 46 large sporadic VS. The most likely explanation is the hypothesis that M1/M2 polarization in the VS is more complex, but the interaction of TAMs is crucial for progression [45]. Nonetheless, the importance of M2 macrophages has been already demonstrated in another study. An IHC study of 923 VS demonstrated higher expression of CD68 and CD163 in larger tumors, suggesting an influence of M2 macrophages in large vs., confirming our results [46,47]. However, in contrast to our study, no correlation with a higher growth rate could be demonstrated. In the included 173 VS, we detected increased macrophage marker expression in fast-growing VS. The expression of CD68, as well as CD163, was higher in larger VS, indicating infiltration of macrophages. This may reflect the increasing involvement of M2 macrophages in larger VS. In addition, regression analysis showed that CD163 was increasingly expressed in larger VS even without the influence of CD68.

De Vries et al. compared CD163 expression in 10 fast- and 10 slow-growing VS and demonstrated significantly higher involvement of M2 macrophages in fast-growing VS [46]. We also examined the differences between these two groups. The expression of CD68 was significantly higher in the 17 fast-growing VS than in the 16 slow-growing VS. This highlights the strong involvement of macrophages in growth progression. Although no significant difference in CD163 expression was detected in our study, the non-parametric Wilcoxon signed-rank test shown in the boxplots clearly indicates greater involvement of M2 macrophages in the rapidly growing VS. After including an inflammatory score combining the lymphocyte and macrophage expression, Goncalves et al. demonstrated a correlation between slower growth rate and a high inflammatory score [46,47]. This contradicts our results indicating infiltration of M2 macrophages in fast-growing VS, also shown in IHC analyses of fast-growing VS. Our results are corroborated by the fact that



TAMs are suspected to promote tumor growth by secreting growth factors, cytokines, and chemokines, such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and chemokine C-X-C motif ligand (CXCL) [48]. Future studies should investigate the expression of these factors in correlation with TAM involvement.

The macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), which promotes the maintenance of TAMs [49], was quantitatively investigated for the first time on a large cohort of VS in our study. De Vries et al. demonstrated higher M-CSF expression in fast-growing VS. [14]. Our study showed a strong correlation of M-CSF with CD163. This supports the hypothesis that M-CSF maintains the function of TAMs and is involved in the VS growth progression. While M-CSF is expressed during homeostatic conditions, GM-CSF expression can be increased during inflammatory processes [17]. Whether GM-CSF has pro- or anti-tumorigenic effects depends on its expression and tumor microenvironment. In glioblastoma, for example, increased expression of GM-CSF leads to tumor growth [50,51]. So far, no information on the influence of GM-CSF on VS volume increase is known. In addition to various other cells, tumor cells also produce GM-CSF and recruit macrophages [49]. This occurs through increased polarization of M1 to M2 macrophages by GM-CSF [16]. Thus, the detection of higher GM-CSF expression in larger VS could lead to increased macrophage, particularly TAM, recruitment, supporting our hypothesis that macrophage infiltration plays a role in VS volume increase (Figure 9).



**Figure 9.** Schematic overview of the putative influence of macrophages on tumor growth in vestibular schwannoma. Smaller tumors showed increased expression of Ki-67 and COX2, whereas large VS were characterized by increased macrophage marker expression (CD68, CD163) and macrophage-associated factors (GM-CSF, M-CSF). These results suggest that macrophages and macrophage-stimulating factors play a crucial role in VS size increase and may represent putative targets for therapeutic and diagnostic markers. Created with BioRender.com.

In addition to tumor marker analysis, we also examined one clinical aspect. The most common symptom of patients with sporadic VS is unilateral hearing loss [7]. Therefore, in our study, we examined the correlation of the investigated markers and tumor volume with hearing function. Patel et al. determined a dependence between worse hearing function and larger VS in 230 patients [52]. This is supported by our results. However, we additionally showed the negative influence of a higher growth rate on hearing function. One possible explanation could be that the cochlear nerve has more time to adapt to the conditions caused by volume increase in slow-growing VS rather than in fast-growing VS. With increasing VS volume, hearing function decreases significantly and severely limits the quality of life of affected patients. By demonstrating possible causes for a faster growth rate in our study, we provide the basis for a targeted therapy to reduce the growth rate and preserve hearing function for a longer period.

In summary, our study suggests that the progression of VS is not promoted exclusively due to the proliferation of schwannoma cells. In fact, we show that schwannoma cell proliferation is higher in smaller VS. One possible explanation for the faster growth and larger volume is the infiltration of VS by macrophages, specifically by TAMs. However, it is also possible that increased expression of macrophage markers in large VS initiates a downstream signaling pathway, which could lead to an increase in tumor cells in the VS. In addition, TAMs could play a signaling role in this process. Thus, targeting TAMs offers a potential pharmacological target for the treatment of larger growing VS. There are already several targets and clinical trials for drug therapies focusing on the inhibition of TAM-secreted proteins, reprogramming to anti-tumoral macrophages and inhibition of TAM receptors such as Axl. Bemcentinib, an inhibitor of this receptor, is already the subject of clinical trials [13,53]. In the long term, the personalized pharmacological treatment of VS and thereby the prevention of growth progression should be the focus of further investigations.

### Limitations

Our study results are limited by the fact that only VS with MRI follow-up images could be included when considering the growth rate. This usually only concerns VS that are initially often rather mild and small at diagnosis, since larger VS are operated on promptly. Therefore, large VS are less represented in the growth rate analysis. Another limitation is the exploratory character of our study and the lack of correction for multiple comparisons in the statistical analysis of our results.

### 5. Conclusions

The expression of growth factors was higher in small, slow-growing VS. In contrast, the macrophage markers CD68 and CD163 showed higher expression in large, rapidly growing VS. Thus, the size progression of VS does not seem to originate from the growth of Schwann cells but from infiltration by macrophages. In particular, TAMs seem to play a major role in this process. Future studies should address the possibility of targeted pharmacological treatment of TAMs in VS.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14184429/s1>, Figure S1: Heat map of mRNA data from 151 vestibular schwannoma tumors; Figure S2: Correlation analysis with Spearman's rank correlation coefficient including Koos grade; Figure S3: Correlation analysis in 74 patients with growth rate and Koos grade; Figure S4: Overview images of IHC analyses of VS with different tumor volumes at 40× magnification; Figure S5: Overview images of the IHC analyses of slow- and fast-growing VS at 40× magnification.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.L., C.S. (Christian Strauss), C.S. (Christian Scheller) and S.R.; methodology, S.L.; software, S.R.; validation, S.L. and C.H.K.; formal analysis, S.L., C.H.K. and S.R.; investigation, S.L., C.H.K., T.V.D.S., P.H., M.S., S.S., C.M. and S.R.; resources, S.S., C.M., C.S. (Christian Strauss), C.S. (Christian Scheller) and S.R.; data curation, S.L., C.H.K. and S.R.; writing—original draft preparation, S.L., C.H.K. and S.R.; writing—review and editing, S.L., C.H.K., P.H., M.S., C.M., C.S. (Christian Strauss) and S.R.; visualization, S.L., C.H.K. and S.R.; supervision, S.L., C.S. (Christian Strauss) and C.S. (Christian Scheller); project administration, S.L.; funding acquisition, C.S. (Christian Strauss) and C.S. (Christian Scheller). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty, Martin Luther University Halle-Wittenberg (approval number 2020-122).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all patients involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.



**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We would like to thank Justine Werner and Desire Stiehlke for their excellent technical support as well as the OR staff for their very good cooperation. Special thanks are due to Paola Schildhauer for proofreading the manuscript. We acknowledge the financial support of the Open Access Publication Fund of the Martin Luther University Halle-Wittenberg.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Brodhun, M.; Stahn, V.; Harder, A. Pathogenesis and molecular pathology of vestibular schwannoma. *HNO* **2017**, *65*, 362–372. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Irving, R.M.; Moffat, D.A.; Hardy, D.G.; Barton, D.E.; Xuereb, J.H.; Maher, E.R. Somatic NF2 gene mutations in familial and non-familial vestibular schwannoma. *Hum. Mol. Genet.* **1994**, *3*, 347–350. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Hassepass, F.; Bulla, S.B.; Aschendorff, A.; Maier, W. Vestibular schwannoma: Part I: Epidemiology and diagnostics. *HNO* **2012**, *60*, 837–844. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Matthies, C.; Samii, M. Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): Clinical presentation. *Neurosurgery* **1997**, *40*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Stangerup, S.E.; Caye-Thomasen, P. Epidemiology and natural history of vestibular schwannomas. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* **2012**, *45*, 257–268. [\[CrossRef\]](#)
6. Zhou, L.; Hanemann, C.O. Merlin, a multi-suppressor from cell membrane to the nucleus. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 1403–1408. [\[CrossRef\]](#)
7. Goldbrunner, R.; Weller, M.; Regis, J.; Lund-Johansen, M.; Stavrinou, P.; Reuss, D.; Evans, D.G.; Lefranc, F.; Sallabanda, K.; Falini, A.; et al. EANO guideline on the diagnosis and treatment of vestibular schwannoma. *Neuro-Oncol.* **2020**, *22*, 31–45. [\[CrossRef\]](#)
8. Paldor, I.; Chen, A.S.; Kaye, A.H. Growth rate of vestibular schwannoma. *J. Clin. Neurosci.* **2016**, *32*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
9. Gupta, V.K.; Thakker, A.; Gupta, K.K. Vestibular Schwannoma: What We Know and Where We are Heading. *Head Neck Pathol.* **2020**, *14*, 1058–1066. [\[CrossRef\]](#)
10. Caye-Thomasen, P.; Werther, K.; Nalla, A.; Bøg-Hansen, T.C.; Nielsen, H.J.; Stangerup, S.E.; Thomsen, J. VEGF and VEGF receptor-1 concentration in vestibular schwannoma homogenates correlates to tumor growth rate. *Otol. Neurotol.* **2005**, *26*, 98–101. [\[CrossRef\]](#)
11. Skytthe, M.K.; Graversen, J.H.; Moestrup, S.K. Targeting of CD163+ Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Chistiakov, D.A.; Killingsworth, M.C.; Myasoedova, V.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab. Investig.* **2017**, *97*, 4–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Cassetta, L.; Pollard, J.W. Tumor-associated macrophages. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, R246–R248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. de Vries, W.M.; Briare-de Bruijn, I.H.; van Benthem, P.P.G.; van der Mey, A.G.L.; Hogendoorn, P.C.W. M-CSF and IL-34 expression as indicators for growth in sporadic vestibular schwannoma. *Virchows Arch.* **2019**, *474*, 375–381. [\[CrossRef\]](#)
15. de Vries, M.; Hogendoorn, P.C.; Briare-de Bruyn, I.; Malessy, M.J.; van der Mey, A.G. Intratumoral hemorrhage, vessel density, and the inflammatory reaction contribute to volume increase of sporadic vestibular schwannomas. *Virchows Arch.* **2012**, *460*, 629–636. [\[CrossRef\]](#)
16. Kumar, A.; Taghi Khani, A.; Sanchez Ortiz, A.; Swaminathan, S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 901277. [\[CrossRef\]](#)
17. Becher, B.; Tugues, S.; Greter, M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* **2016**, *45*, 963–973. [\[CrossRef\]](#)
18. Koutsimpelas, D.; Bjelopavlovic, M.; Yetis, R.; Frauenknecht, K.; Adryan, B.; Schmidtman, L.; Gouveris, H.; Fruth, K.; Heinrich, U.R.; Stauber, R.H.; et al. The VEGF/VEGF-R axis in sporadic vestibular schwannomas correlates with irradiation and disease recurrence. *ORL* **2012**, *74*, 330–338. [\[CrossRef\]](#)
19. Behling, F.; Ries, V.; Skardelly, M.; Gepfner-Tuma, I.; Schuhmann, M.; Ebner, F.H.; Tabatabai, G.; Bornemann, A.; Schittenhelm, J.; Tatagiba, M. COX2 expression is associated with proliferation and tumor extension in vestibular schwannoma but is not influenced by acetylsalicylic acid intake. *Acta. Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 105. [\[CrossRef\]](#)
20. Koos, W.T.; Day, J.D.; Matula, C.; Levy, D.I. Neurotopographic considerations in the microsurgical treatment of small acoustic neurinomas. *J. Neurosurg.* **1998**, *88*, 506–512. [\[CrossRef\]](#)
21. Pachow, D.; Andrae, N.; Kliese, N.; Angenstein, F.; Stork, O.; Wilisch-Neumann, A.; Kirches, E.; Mawrin, C. mTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1180–1189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Napitupulu, D.; Rahim, R.; Abdullah, D.; Setiawan, M.I.; Abdillah, L.A.; Ahmar, A.S.; Simarmata, J.; Hidayat, R.; Nurdianto, H.; Pranolo, A. Analysis of Student Satisfaction Toward Quality of Service Facility. *J. Phys. Conf. Ser.* **2018**, *954*, 012019. [\[CrossRef\]](#)
23. Team, R.C. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2013.

24. Hong, B.; Krusche, C.A.; Schwabe, K.; Friedrich, S.; Klein, R.; Krauss, J.K.; Nakamura, M. Cyclooxygenase-2 supports tumor proliferation in vestibular schwannomas. *Neurosurgery* **2011**, *68*, 1112–1117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Behling, F.; Suhm, E.; Ries, V.; Gonçalves, V.M.; Tabatabai, G.; Tatagiba, M.; Schittenhelm, J. COX2 expression is associated with preoperative tumor volume but not with volumetric tumor growth in vestibular schwannoma. *Neurol. Res. Pract.* **2021**, *3*, 11. [\[CrossRef\]](#)
26. Kandathil, C.K.; Cunnane, M.E.; McKenna, M.J.; Curtin, H.D.; Stankovic, K.M. Correlation Between Aspirin Intake and Reduced Growth of Human Vestibular Schwannoma: Volumetric Analysis. *Otol. Neurotol.* **2016**, *37*, 1428–1434. [\[CrossRef\]](#)
27. Kandathil, C.K.; Dilwali, S.; Wu, C.C.; Ibrahimov, M.; McKenna, M.J.; Lee, H.; Stankovic, K.M. Aspirin intake correlates with halted growth of sporadic vestibular schwannoma in vivo. *Otol. Neurotol.* **2014**, *35*, 353–357. [\[CrossRef\]](#)
28. Dilwali, S.; Kao, S.Y.; Fujita, T.; Landegger, L.D.; Stankovic, K.M. Nonsteroidal anti-inflammatory medications are cytostatic against human vestibular schwannomas. *Transl. Res.* **2015**, *166*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
29. Hashemi Goradel, N.; Najafi, M.; Salehi, E.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 5683–5699. [\[CrossRef\]](#)
30. Karpisheh, V.; Nikkhoo, A.; Hojjat-Farsangi, M.; Namdar, A.; Azizi, G.; Ghalamfarsa, G.; Sabz, G.; Yousefi, M.; Yousefi, B.; Jadidi-Niaragh, F. Prostaglandin E2 as a potent therapeutic target for treatment of colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2019**, *144*, 106338. [\[CrossRef\]](#)
31. Kim, H.S.; Moon, H.G.; Han, W.; Yom, C.K.; Kim, W.H.; Kim, J.H.; Noh, D.Y. COX2 overexpression is a prognostic marker for Stage III breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *132*, 51–59. [\[CrossRef\]](#)
32. Yokoyama, M.; Matsuda, M.; Nakasu, S.; Nakajima, M.; Handa, J. Clinical significance of Ki-67 staining index in acoustic neurinoma. *Neurol. Med. Chir.* **1996**, *36*, 698–702. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Cafer, S.; Bayramoglu, I.; Uzum, N.; Yilmaz, M.; Memis, L.; Uygur, K. Expression and clinical significance of Ki-67, oestrogen and progesterone receptors in acoustic neuroma. *J. Laryngol. Otol.* **2008**, *122*, 125–127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Frezzetti, D.; Gallo, M.; Maiello, M.R.; D'Alessio, A.; Esposito, C.; Chicchinelli, N.; Normanno, N.; De Luca, A. VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 959–966. [\[CrossRef\]](#)
35. Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **2005**, *69* (Suppl. 3), 4–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Brieger, J.; Bedavaniya, A.; Lehr, H.A.; Maurer, J.; Mann, W.J. Expression of angiogenic growth factors in acoustic neurinoma. *Acta Otolaryngol.* **2003**, *123*, 1040–1045. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Dilwali, S.; Roberts, D.; Stankovic, K.M. Interplay between VEGF-A and cMET signaling in human vestibular schwannomas and schwann cells. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, *16*, 170–175. [\[CrossRef\]](#)
38. Schulz, A.; Büttner, R.; Hagel, C.; Baader, S.L.; Kluwe, L.; Salamon, J.; Mautner, V.F.; Mindos, T.; Parkinson, D.B.; Gehlhausen, J.R.; et al. The importance of nerve microenvironment for schwannoma development. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 289–307. [\[CrossRef\]](#)
39. Hannan, C.J.; Lewis, D.; O'Leary, C.; Donofrio, C.A.; Evans, D.G.; Roncaroli, F.; Brough, D.; King, A.T.; Coope, D.; Pathmanaban, O.N. The inflammatory microenvironment in vestibular schwannoma. *Neuro-Oncol. Adv.* **2020**, *2*, vdaa023. [\[CrossRef\]](#)
40. Lewis, D.; Roncaroli, F.; Agushi, E.; Mosses, D.; Williams, R.; Li, K.L.; Zhu, X.; Hinz, R.; Atkinson, R.; Wadeson, A.; et al. Inflammation and vascular permeability correlate with growth in sporadic vestibular schwannoma. *Neuro-Oncol.* **2019**, *21*, 314–325. [\[CrossRef\]](#)
41. Shi, J.; Lu, D.; Gu, R.; Xu, Y.; Pan, R.; Bo, F.; Zhang, Y. Identification of key biomarkers and immune infiltration in sporadic vestibular schwannoma basing transcriptome-wide profiling. *World Neurosurg.* **2022**, *160*, e591–e600. [\[CrossRef\]](#)
42. Bi, W.L.; Gupta, S.; Mei, Y.; Abdulmohsen, S.A.; Giantini Larsen, A.; Unadkat, P.; Ramkissoon, S.; Abedalthagafi, M.; Dunn, I.F. Immunophenotype of Vestibular Schwannomas. *Otol. Neurotol.* **2020**, *41*, e1290–e1296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Pan, Y.; Yu, Y.; Wang, X.; Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 583084. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Chanmee, T.; Ontong, P.; Konno, K.; Itano, N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* **2014**, *6*, 1670–1690. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Perry, A.; Graffeo, C.S.; Carlstrom, L.P.; Raghunathan, A.; Driscoll, C.L.W.; Neff, B.A.; Carlson, M.L.; Parney, I.F.; Link, M.J.; Van Gompel, J.J. Predominance of M1 subtype among tumor-associated macrophages in phenotypically aggressive sporadic vestibular schwannoma. *J. Neurosurg.* **2019**, *133*, 1637–1645. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. de Vries, M.; Briaire-de Bruijn, I.; Malessy, M.J.; de Bruijne, S.F.; van der Mey, A.G.; Hogendoorn, P.C. Tumor-associated macrophages are related to volumetric growth of vestibular schwannomas. *Otol. Neurotol.* **2013**, *34*, 347–352. [\[CrossRef\]](#)
47. Gonçalves, V.M.; Suhm, E.M.; Ries, V.; Skardelly, M.; Tabatabai, G.; Tatagiba, M.; Schittenhelm, J.; Behling, F. Macrophage and Lymphocyte Infiltration Is Associated with Volumetric Tumor Size but Not with Volumetric Growth in the Tübingen Schwannoma Cohort. *Cancers* **2021**, *13*, 466. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Chen, Y.; Song, Y.; Du, W.; Gong, L.; Chang, H.; Zou, Z. Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* **2019**, *26*, 78. [\[CrossRef\]](#)
49. Ushach, I.; Zlotnik, A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 481–489. [\[CrossRef\]](#)

50. Hong, I.S. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp. Mol. Med.* **2016**, *48*, e242. [[CrossRef](#)]
51. Aliper, A.M.; Frieden-Korovkina, V.P.; Buzdin, A.; Roumiantsev, S.A.; Zhavoronkov, A. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 737–746. [[CrossRef](#)]
52. Patel, N.S.; Huang, A.E.; Dowling, E.M.; Lees, K.A.; Tombers, N.M.; Lohse, C.M.; Marinelli, J.P.; Van Gompel, J.J.; Neff, B.A.; Driscoll, C.L.W.; et al. The Influence of Vestibular Schwannoma Tumor Volume and Growth on Hearing Loss. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2020**, *162*, 530–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Myers, K.V.; Amend, S.R.; Pienta, K.J. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): Implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Publikation 2: Establishment of vestibular schwannoma primary cell cultures obtained from cavitron ultrasonic surgical aspirator tissue material

Journal of Neuroscience Methods 397 (2023) 109955



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jneumeth](http://www.elsevier.com/locate/jneumeth)



### Establishment of vestibular schwannoma primary cell cultures obtained from cavitron ultrasonic surgical aspirator tissue material

Sandra Leisz<sup>\*</sup>, Clara Helene Klause, Anna-Louisa Becker, Maximilian Scheer, Sebastian Simmermacher, Christian Strauss, Christian Scheller

Martin Luther University Halle-Wittenberg, Medical Faculty, Department of Neurosurgery, Ernst-Grube-Str. 40, 06120 Halle (Saale), Germany

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Vestibular schwannoma  
Cavitron ultrasonic surgical aspirator  
CUSA obtained tissue  
Primary cells

#### ABSTRACT

**Background:** Vestibular schwannoma (VS) is a benign tumor arising from the Schwann cells of the eighth cranial nerve. The complexity in treatment is associated with unpredictable progression of this tumor. Some of the VS do not alter for years, while others rapidly increase in size. The mechanisms behind size progression are not well studied. Furthermore, despite several studies, there is no pharmacological treatment available for sporadic VS. Therefore, in vitro models are essential tools to study the cellular and molecular processes of VS. In addition, patient-derived cell cultures are important for substance screening to investigate pharmacological approaches in vitro.

**New method:** This study presents a simple and fast method for culturing VS cells from patient tissue material obtained using a cavitron ultrasonic surgical aspirator (CUSA). In addition, the cells were characterized based on the expression of schwannoma markers, growth properties and screened for fibroblast contamination.

**Result:** We could show that CUSA obtained material is a suitable resource for isolation of VS primary cultures and enables real time analysis on living cells.

**Comparison with Existing Methods:** To date, only a few protocols are available for culturing VS cells from patient tissue material. A disadvantage of these methods is the relatively large amount of tissue needed to obtain the primary cells, which can be difficult, especially in small VS. By obtaining the cells from the CUSA, there is the possibility to establish a primary culture even with limited material.

**Conclusion:** This approach could be particularly useful for testing substances that represent candidates for drug therapy of vestibular schwannoma.

#### 1. Introduction

Vestibular schwannoma (VS) is the most common tumor of the cerebellopontine angle and occurs with a rising incidence of approximately 1:100,000 (Goldbrunner et al., 2020; Reznitsky et al., 2019; Stangerup and Caye-Thomasen, 2012). VS cause vertigo, tinnitus, hearing loss and facial paresthesia, due to the tumor localization in the cranial nerve region. The therapeutic options are limited to Wait and Scan, radiotherapy or microsurgical resection by craniotomy. To date, the development and progression of this benign tumor has not been well studied

(Goldbrunner et al., 2020). Therefore, it is necessary to establish cell culture models for testing treatment options and investigating tumor pathology. Existing culture models obtained from murine schwannoma tissue are limited in transfer to human schwannoma characteristics. In recent years, the cavitron ultrasonic surgical aspirator (CUSA) has been used for precise intracapsular VS resection. Based on the work of Richmond and Hawksley (1983), some previous studies showed that CUSA obtained tissue (COT) is vital and suitable for histopathology and cell culturing of medulloblastoma, meningioma and glioma tumor cells (Day et al., 2013; Malhotra et al., 1986; Oakes et al., 1990). For glioma tissue

**Abbreviations:** COT, CUSA obtained tissue; CUSA, cavitron ultrasonic surgical aspirator; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; f, female; FACS, fluorescence activated cell sorting; FITC, fluorescein-5-isothiocyanate; HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution; HSC, human Schwann cells; IF, immunofluorescence; IgG, immunoglobulin G; ln, logarithmus naturalis; m, male; MIB, Molecular Immunology Borstel; n.d., not detectable; NHDF, normal human dermal fibroblasts; OD, optical density; PBS, phosphate buffered saline; td, doubling time; VS, vestibular schwannoma; XTT, 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2 H-tetrazolium-5-carboxanilide.

<sup>\*</sup> Correspondence to: Martin Luther University Halle-Wittenberg, Department of Neurosurgery, Ernst-Grube-Str. 40, 06120 Halle, Germany.

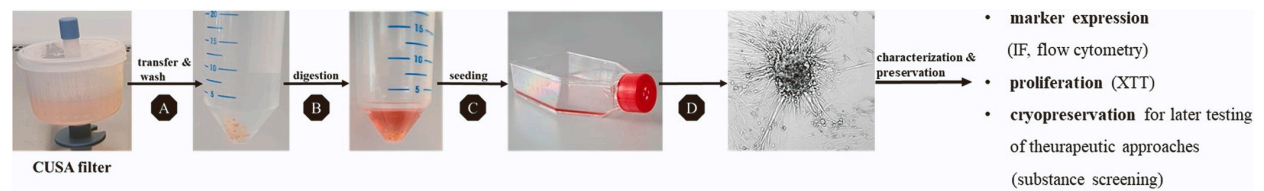
E-mail address: [Sandra.leisz@uk-halle.de](mailto:Sandra.leisz@uk-halle.de) (S. Leisz).

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.109955>

Received 8 June 2023; Received in revised form 3 August 2023; Accepted 19 August 2023

Available online 21 August 2023

0165-0270/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**Fig. 1.** Schematic workflow of VS cell isolation. CUSA obtained tissue was collected intraoperatively (A). After washing with PBS, tissue was digested with collagenase type I-S, hyaluronidase type I-S, trypsin and DNase (B) and seeded on precoated cell culture flasks. When the cells had reached at least 80% confluency, they were analyzed with S100 immunofluorescence staining and then cryopreserved for later testing of therapeutic approaches. IF, immunofluorescence; XTT, 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl) – 2 H-Tetrazolium-5-Carboxanilide; CUSA, cavitron ultrasonic surgical aspirator.

the usage of COT was shown to establish primary cultures, tumor spheroids and cancer stem cells (Beckner et al., 2007; Behnan et al., 2016; Jensen et al., 2013). In comparison to gliomas, VS are usually smaller and the tumor material is limited. Therefore, the aim of this study was to develop an effective method to culture primary VS cells from COT. In the last decades, some protocols for the isolation of primary human and murine Schwann cells from tissue samples have been established (Breun et al., 2020; Calderón-Martínez et al., 2002; Casella et al., 1996; Niapour et al., 2010; Weiss et al., 2018). Our method is based on a modified and simplified protocol by Dilwali et al. (2014). We characterized the CUSA obtained VS primary cells with immunofluorescence (IF) staining, viability and growth rate. Fibroblast contamination was analyzed. Because of limited tumor material, the COT opens up a new tissue resource for research accessibility of VS e.g., for drug screening, protein secretion and release of extracellular vesicles, which could contribute to a better understanding of tumor development.

## 2. Methods

### 2.1. Ethics statement

The collection of patient tissue was approved by the ethics committee of the Medical Faculty, Martin Luther University Halle-Wittenberg with process number 2020–122. Excluded were samples from patients under 18 years, with hereditary NF2-related Schwannomatosis, recurrences and preoperative irradiated tumors. After written informed consent was obtained from the patients, the samples were collected and analyzed pseudonymously. The patient data were taken from the medical record.

### 2.2. Tumor volume

The tumor volume was measured with Brainlab Origin Server 1.1 iPlan Net, version 3.7.0.64 (Brainlab AG, Munich, Germany) using thin-slice preoperative magnetic resonance images (T1- or T2-weighted). Images with a slice thickness under 2.5 mm were accepted.

### 2.3. Material collection

Sample material was obtained using the CUSA (CUSA Excel+, Integra Lifesciences, Tullamore, Ireland). The extracted material was collected via a disposable tissue collection filter (Medela Healthcare, Eching, Germany; hereafter named CUSA filter).

### 2.4. VS cell isolation and culturing

The protocol was modified from Dilwali et al. (2014). At first, 4 °C cold phosphate buffered saline without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) was added to the tissue collected by CUSA filter to prevent drying out. Then, the sample pieces were transferred with a sterile forceps into a 50 mL tube filled with 40 mL 4 °C cold PBS, spun down (10 min with 300 g at 4 °C) and washed again two times with 40 mL 4 °C cold PBS (Fig. 1A). Afterwards, the supernatant was

**Table 1**

Used antibodies and antibody dilutions for IF analysis.

Antibody	Species	Dilution	Manufacturer
S100A10	mouse monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology
Ki-67	rabbit monoclonal	1:400	
Anti-Mouse IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor 488 Conjugate	goat	1:1000	goat
Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor 488 Conjugate	goat	1:1000	

removed completely and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 medium (1:1, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine (Biochrom AG, Merck, Darmstadt, Germany), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 160 U/mL collagenase type I-S and 250 U/mL hyaluronidase type I-S (both enzymes Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was added to the tissue, that the sample was completely covered (0.5–2.0 mL), and incubated for approximately 14 h at 37 °C. Then, the digestion of tissue was stopped by diluting the enzyme mix through the addition of 10 mL supplemented DMEM/F12 (10 % FCS, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin). The sample was centrifuged down, the supernatant was discarded and the tissue pellet was incubated with 2.5 % trypsin and 250 µg/mL DNase diluted in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 5 min at 37 °C (Fig. 1B). Then, the cells were resuspended with 1000 µL-pipette by carefully pipetting up and down. The tissue digestion was stopped with 10 mL complete DMEM/F12, spun down and cell pellet was resuspended in 10 mL supplemented media. The cell suspension was seeded on poly-L-ornithine and poly-L-lysine (both Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) pre-coated 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> (Fig. 1C) under humidified atmosphere. The medium was renewed after 16–18 h and then every three to four days. Microscopic pictures and fluorescence images were made with Keyence BZ-800E microscope (Keyence, Neu-Isenburg, Germany, Fig. 1D). An overview of time-lapse schedule and total procedure time is shown in Supplementary Fig. 1.

### 2.5. Immunofluorescence staining

$5 \times 10^5$  VS cells were seeded in 3 mL complete DMEM/F12 per well on poly-L-ornithine and poly-L-lysine (0.01 %, EMD Millipore Corporation, Burlington, VT, USA) pre-coated cover slips (2-well Tissue Culture Chambers, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and incubated for 24 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in humidified atmosphere. At first, cells were washed with 1.5 mL per well HBSS (with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) containing 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, the slides were two times washed with HBSS and fixed with – 20 °C-cold

**Table 2**  
Patient data and corresponding primary cell characteristics.

Sample number	Patient characteristics					Cell characteristics		
	gender	diagnosis	Koos classification	tumor volume (cm <sup>3</sup> )	MIB (%)	doubling time (hours)	immunofluorescence S100 <sup>+</sup> -cells (%)	Ki-67 <sup>+</sup> -cells (%)
1	f	VS	4	8.972	2	67.2	100.0	10.4
2	m	VS	2	0.409	1	n.d.	98.5	0.0
3	f	VS	4	7.918	1–2	n.d.	66.6	9.3
4	f	VS	2	0.248	5	52.5	58.1	0.3
5	w	VS	3	1.825	1	n.d.	82.4	6.2
6	m	VS	4	6.694	< 5	62.0	96.0	12.5
7	m	VS	2	0.264	5	67.1	98.3	5.4
8	f	VS	4	2.431	4	64.2	95.7	7.7
9	m	VS	4	3.055	4	92.3	81.9	8.3
10	f	VS	1	0.305	0	n.d.	87.0	1.0
11	f	VS	3	0.913	3	114.5	95.0	10.6
12	f	VS	3	2.806	1	69.6	56.4	1.8
13	m	VS	4	2.649	4	112.8	71.0	7.9
14	f	VS	2	0.689	< 3	73.9	64.5	0.3
15	f	VS	4	5.288	3	105.6	68.0	0.0
16	m	VS	2	0.532	n.d.	45.3	89.7	0.8
17	m	VS	4	11.677	4	173.0	97.2	4.5

(n.d., not detectable; m, male; f, female; VS, vestibular schwannoma; MIB, Molecular Immunology Borstel; Koos classification according to [Koos et al. \(1998\)](#)).

methanol (Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) on ice for 10 min. Subsequently, cells were incubated with 1 mL per well blocking buffer containing PBS, 5 % normal goat serum (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) and 0.3 % Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 1 h. Then, the respective primary antibody ([Table 1](#)), diluted in 900  $\mu$ L PBS with 1 % bovine serum albumin (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and 0.3 % Triton X-100 (antibody diluting solution), was added to the cells for 16–18 h at 4 °C. Next day, cells were washed three times with 1 mL PBS followed by incubation with secondary antibody for 90 min at room temperature in the dark. After washing twice with PBS, the chamber was removed and the slide rinsed again with PBS. Then, the slides were covered with mounting medium containing DAPI (ImmunoSelect Antifading Mounting Medium DAPI, Dianova, Hamburg, Germany) and dried for 24 h. The imaging was done with Keyence BZ-800E microscope. Human Schwann cells (HSC) purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA), were used as a positive control for S100 staining. HSC were cultured with Schwann cell media (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) as recommended by manufacturer. The cover slips used for HSC were coated with poly-L-lysine solution (0.01 %, EMD Millipore Corporation, Burlington, VT, USA). Cells stained with DAPI, Ki-67 antibody and S100 antibody were counted using the IdentifyPrimaryObjects tool of the software CellProfiler (Version 4.2.4, Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, United States). The percentage of Ki-67- and S100-positive cells in the total cell count was calculated. The number of DAPI-positive cell nuclei was taken as the total cell count.

## 2.6. Proliferation assay

The doubling time was determined using the Cell Proliferation Kit II (XTT, Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's instructions. Briefly,  $5 \times 10^3$  cells per well were cultured in 200  $\mu$ L complete DMEM/F12 medium without phenol red in pentaplates in 96-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) and incubated for 96 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. Every 24 h the mitochondrial dehydrogenase activity was measured by conversion of the tetrazolium salt XTT to formazan after incubation of the cells with the XTT substrate mixture for four hours. The color change was determined at a wavelength of 490 nm using Tecan F200Pro plate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Representative growth curves are shown in [Supplementary Fig. 2](#). The cell doubling time was calculated during the exponential phase of cell growth ( $td = \frac{\ln(2)}{(\frac{d(\log_{10} N)}{dt})}$ ).

## 2.7. Flow cytometry

$1 \times 10^6$  were washed twice with 2 mL PBS supplemented with 1% FCS and 0.1% NaN<sub>3</sub> (flow cytometry buffer). Then, 10  $\mu$ L CD90-fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) direct conjugated mouse monoclonal antibody (FITC Anti-CD90 / Thy1 antibody; Abcam, Cambridge, UK) was added to the cells resuspended in 100  $\mu$ L flow cytometry buffer and incubated for 30 min in the dark. After washing cells twice with flow cytometry buffer, cell surface FITC signal was measured using BD LSRFortessa Cell Analyzer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Data analysis was done with BD FACSDiva Software (Becton Dickinson) and FCS Express Version 7 (De Novo Software, Pasadena, CA, USA). Normal human dermal fibroblasts (NHDF) served as positive control ([Kisselbach et al., 2009](#)) and A549 lung cancer cells as negative control ([Yan et al., 2013](#)), as previously described.

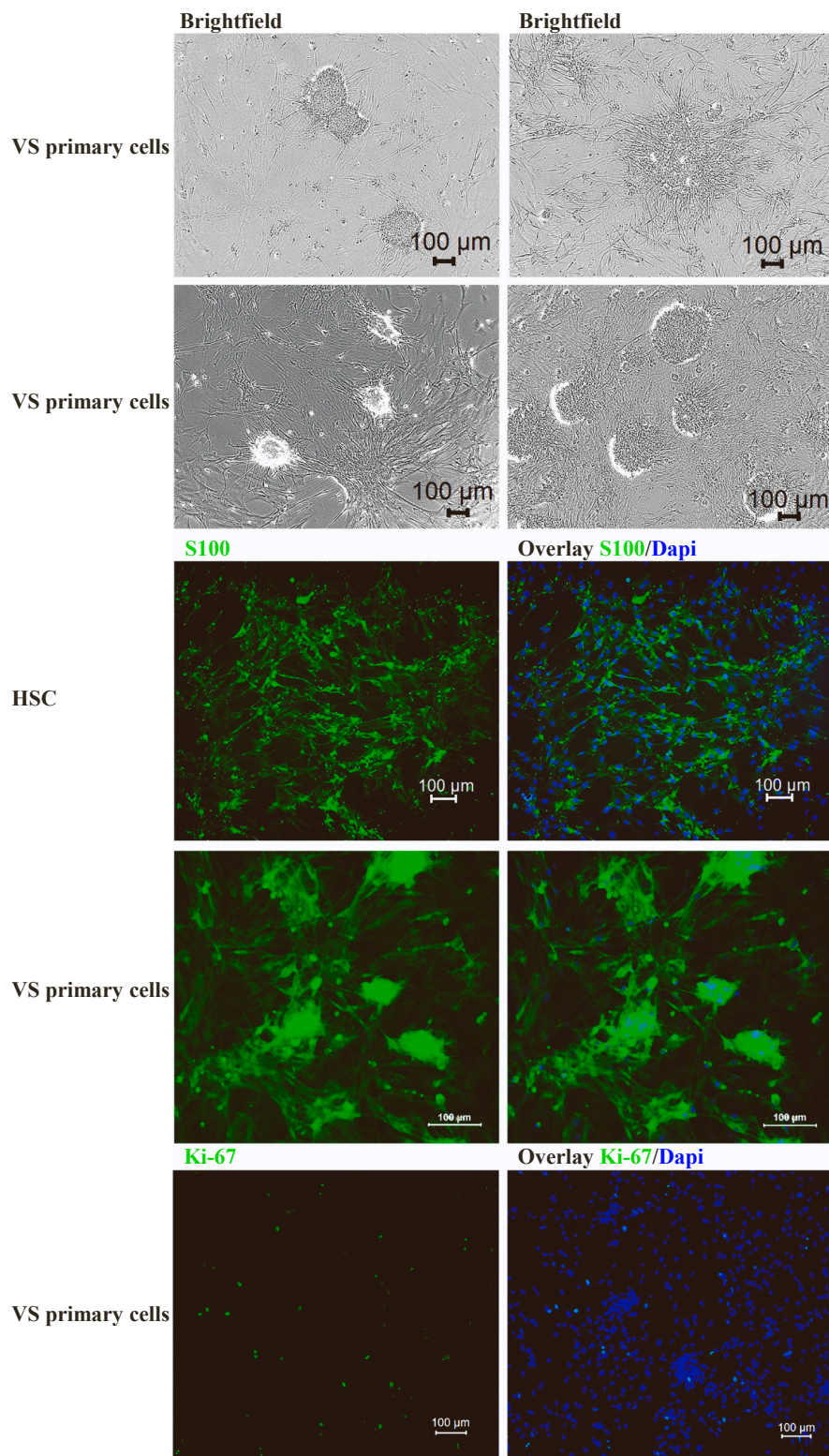
## 3. Results

Seventeen CUSA filter obtained cultures from VS of different volumes and Koos grades were prepared according to the method described above. Immunofluorescence staining for detection of Schwann cell marker S100 and proliferation marker Ki-67 was performed. All primary cultures were positive for S100 staining. Immunofluorescence of Ki-67 differed in the included primary cultures. Regardless of sex and Koos grade, the doubling time of schwannoma cells could be determined in 13 of the 17 primary cultures. The doubling time ranged between 45.3 and 173.0 h ([Table 2](#)).

Brightfield and immunofluorescence images were obtained to analyze the VS primary cells ([Fig. 2](#)). The typical clusters in which schwannoma cells grow are visible, and these clusters are known to originate from a single cluster of cells. For better visualization of the cell clusters, staining with S100 was performed using immunofluorescence. Both, HSC and VS primary cultures showed strong positive staining with S100 antibody. However, the normal human Schwann cells (HSC) showed no clusters but only two-dimensional cells, the arrangement in the VS primary culture differed. The cells showed a distinct three-dimensional clustering with spindle-shaped palisade-like cell clusters, which are characteristically found for schwannoma cells. An investigation of the growth marker Ki-67 detected only a few positive cells in the most VS primary cultures ([Table 1](#), [Fig. 2](#)) as expected.

To exclude fibroblast contamination, flow cytometric analysis of four primary cultures of different Koos grades was performed. The percentages of fibroblasts in the VS primary cultures are shown ([Table 3](#)). Only





**Fig. 2.** Exemplary brightfield images and immunofluorescence staining of S100 and Ki-67 in VS primary cultures from CUSA obtained tissue. In the microscopic images, typical schwannoma-derived cell clusters were visible. Comparative immunofluorescence of human Schwann cells and schwannoma cells in the VS primary culture using S100 showed spindle-shaped palisade-like cell clusters exclusively in the VS primary culture. Immunofluorescence staining with Ki-67 showed few positive cells in the VS primary culture.

**Table 3**  
Percentage of fibroblasts in VS primary cultures.

Sample number	Percentage of fibroblasts (%)
9	13.5
10	0.1
11	1.3
14	0.0

in the primary culture of a Koos 4 VS increased percentage (13.5 %) of fibroblasts were detected. There were no CD90-positive fibroblasts detectable in the analyzed smaller VS cultures.

#### 4. Discussion

So far, there are only few protocols to culture schwannoma cells (Dilwali et al., 2014; Landegger et al., 2017). Moreover, these cell cultures are primarily limited to NF2-associated schwannomatosis (Rosebaum et al., 1998). Xue et al. established a immortalized human schwannoma cell line, which was obtained from a 41-year-old sporadic vestibular schwannoma patient (Xue et al., 2021). However, there are no established immortalized human vestibular schwannoma cell cultures purchasable for substance testing or in vitro testing of therapeutic approaches. This is in contrast to the fact that no pharmacological treatment has yet been established that prevents the development or progression of benign VS. Considering the risks involved in removing the tumor, the potential for research into a drug target for the treatment of VS would be of major importance. Preliminary studies on the implementation of an isolation technique of VS primary cells are provided only by Dilwali et al. (2015a,b,c); (2013); (2015d), whose protocol we adapted partially. However, for small VS it could be difficult to gain enough tissue material with conventional tissue removal. Since the recovery of primary cells from tissue obtained by CUSA has already been tested and established for a long time in other tumor entities such as gliomas, our derivation of primary cells was performed from the CUSA filter (Day et al., 2013; Malhotra et al., 1986). Because vestibular schwannoma does not infiltrate the surrounding tissue compared to glioma cells, the risk of contamination with non-tumor cells is even lower. S100 is the most commonly used schwannoma cell marker (Liu et al., 2015). Therefore, we used likewise the staining of S100 to characterize our primary cultures. The strong positive staining of cell clusters suggests that the cultured cells are schwannoma cells as described from previous authors (Kisselbach et al., 2009). We were able to demonstrate that the described method is suitable for the cultivation of schwannoma cells after microsurgical VS removal using the COT. The analyzed cell cultures showed a high variance in doubling time and expression of the proliferation marker Ki-67. Quantification of fibroblasts by flow cytometry revealed a minor percentage of fibroblasts in the cultures. Nevertheless, the cultivation of fibroblasts should be excluded before using the cultures for experiments (Kisselbach et al., 2009). In addition, the purity and identity of the culture should be verified after multiple passaging and cryopreservation. A transformation of the culture over time or an overgrowth by more proliferating fibroblast-like cells cannot be excluded generally. Nor indeed can it be guaranteed that the genotype or phenotype of the cells will change as the number of passages increases. This has already been shown for a number of other cultures (Hughes et al., 2007; Kim et al., 2017; Mouriaux et al., 2016; Oh et al., 2013). Dilwali and co-authors demonstrated that schwannoma cells retained 80 % purity for the majority of 12 weeks (Dilwali et al., 2014), which is in line with our observations. However, the cultures from CUSA obtained VS tissue have two advantages i) The material is already disintegrated by the ultrasound ii) The material is not suitable for histological examination and is normally discarded. In our view, this is an option, especially for smaller VS when less material can be obtained for research purposes. To summarize, the VS primary cells obtained from CUSA filters are suitable for various analyses. In addition, it could offer

the opportunity to establish immortalized schwannoma cell lines from the primary cultures. In the long term, this method allows testing of pharmacological agents on the schwannoma cells to investigate a targeted drug therapy for VS.

#### 5. Conclusion

The postoperative processing of a CUSA filter allows the culturing of schwannoma cells. These primary cultures are suitable for more precise analyses of the schwannoma cells.

#### CRedit authorship contribution statement

**Sandra Leisz:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Clara Helene Klause:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Anna-Louisa Becker:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Maximilian Scheer:** Resources, Writing – review & editing. **Sebastian Simmermacher:** Writing – review & editing, Data curation. **Christian Strauss:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Funding acquisition. **Christian Scheller:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgments

We would like to thank the operating theater staff for their very good cooperation. We acknowledge the financial support of the Open Access Publication Fund of the Martin Luther University Halle-Wittenberg.

#### Disclosures

The authors report no conflict of interest concerning the materials or methods used in this study or the findings specified in this paper.

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jneumeth.2023.109955.

#### References

- Beckner, M.E., Jane, E.P., Jankowitz, B., Agostino, N.R., Walter, K.A., Hamilton, R.L., Pollack, I.F., 2007. Tumor cells from ultrasonic aspirations of glioblastomas migrate and form spheres with radial outgrowth. *Cancer Lett.* 255, 135–144.
- Behnan, J., Stangeland, B., Langella, T., Finocchiaro, G., Murrell, W., Brinckmann, J.E., 2016. Ultrasonic surgical aspirate is a reliable source for culturing glioblastoma stem cells. *Sci. Rep.* 6, 32788.
- Breun, M., Martellotta, D.D., Leberle, A., Nietzer, S., Baur, F., Ernestus, R.I., Matthies, C., Löhr, M., Hagemann, C., 2020. 3D in vitro test system for vestibular schwannoma. *J. Neurosci. Methods* 336, 108633.
- Calderón-Martínez, D., Garavito, Z., Spinel, C., Hurtado, H., 2002. Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C). *J. Neurosci. Methods* 114, 1–8.
- Casella, G.T., Bunge, R.P., Wood, P.M., 1996. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* 17, 327–338.
- Day, B.W., Stringer, B.W., Wilson, J., Jeffree, R.L., Jamieson, P.R., Ensby, K.S., Bruce, Z.C., Inglis, P., Allan, S., Winter, C., Tolleson, G., Campbell, S., Lucas, P., Findlay, W., Kadrian, D., Johnson, D., Robertson, T., Johns, T.G., Bartlett, P.F., Osborne, G.W., Boyd, A.W., 2013. Glioma surgical aspirate: a viable source of tumor tissue for experimental research. *Cancers* 5, 357–371.

- Dilwali, S., Lysaght, A., Roberts, D., Barker, F.G., McKenna, M.J., Stankovic, K.M., 2013. Sporadic vestibular schwannomas associated with good hearing secrete higher levels of fibroblast growth factor 2 than those associated with poor hearing irrespective of tumor size. *Otol. Neurotol.* 34, 748–754.
- Dilwali, S., Patel, P.B., Roberts, D.S., Basinsky, G.M., Harris, G.J., Emerick, K.S., Stankovic, K.M., 2014. Primary culture of human Schwann and schwannoma cells: improved and simplified protocol. *Hear Res.* 315, 25–33.
- Dilwali, S., Briët, M.C., Kao, S.Y., Fujita, T., Landegger, L.D., Platt, M.P., Stankovic, K.M., 2015a. Preclinical validation of anti-nuclear factor-kappa B therapy to inhibit human vestibular schwannoma growth. *Mol. Oncol.* 9, 1359–1370.
- Dilwali, S., Kao, S.Y., Fujita, T., Landegger, L.D., Stankovic, K.M., 2015b. Nonsteroidal anti-inflammatory medications are cytostatic against human vestibular schwannomas. *Transl. Res.* 166, 1–11.
- Dilwali, S., Landegger, L.D., Soares, V.Y., Deschler, D.G., Stankovic, K.M., 2015c. Secreted factors from human vestibular Schwannomas can cause cochlear damage. *Sci. Rep.* 5, 18599.
- Dilwali, S., Roberts, D., Stankovic, K.M., 2015d. Interplay between VEGF-A and cMET signaling in human vestibular schwannomas and schwann cells. *Cancer Biol. Ther.* 16, 170–175.
- Goldbrunner, R., Weller, M., Regis, J., Lund-Johansen, M., Stavrinou, P., Reuss, D., Evans, D.G., Lefranc, F., Sallabanda, K., Falini, A., Axon, P., Sterkers, O., Fariselli, L., Wick, W., Tonn, J.C., 2020. EANO guideline on the diagnosis and treatment of vestibular schwannoma. *Neuro Oncol.* 22, 31–45.
- Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., Gelber, C., 2007. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques* 43, 575. , 7–8, 81–2 passim.
- Jensen, S.S., Aaberg-Jessen, C., Andersen, C., Schröder, H.D., Kristensen, B.W., 2013. Glioma spheroids obtained via ultrasonic aspiration are viable and express stem cell markers: a new tissue resource for glioma research. *Neurosurgery* 73, 868–886 discussion 86.
- Kim, M., Rhee, J.K., Choi, H., Kwon, A., Kim, J., Lee, G.D., Jekarl, D.W., Lee, S., Kim, Y., Kim, T.M., 2017. Passage-dependent accumulation of somatic mutations in mesenchymal stromal cells during in vitro culture revealed by whole genome sequencing. *Sci. Rep.* 7, 14508.
- Kisselbach, L., Merges, M., Bossie, A., Boyd, A., 2009. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* 59, 31–44.
- Koos, W.T., Day, J.D., Matula, C., Levy, D.I., 1998. Neurotopographic considerations in the microsurgical treatment of small acoustic neurinomas. *J. Neurosurg.* 88, 506–512.
- Landegger, L.D., Sagers, J.E., Dilwali, S., Fujita, T., Sahin, M.I., Stankovic, K.M., 2017. A unified methodological framework for vestibular Schwannoma research. *J. Vis. Exp.*
- Liu, Z., Jin, Y.Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., Wu, W., Qi, Z., Shen, Z., 2015. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLOS One* 10, e0123278.
- Malhotra, V., Malik, R., Gondal, R., Beohar, P.C., Parkash, B., 1986. Evaluation of histological appearance of tissues removed by cavitron ultrasonic surgical aspirator (CUSA). *Acta Neurochir.* 81, 132–134.
- Mouriaux, F., Zaniolo, K., Bergeron, M.A., Weidmann, C., De La Fouchardière, A., Fournier, F., Droit, A., Morcos, M.W., Landreville, S., Guérin, S.L., 2016. Effects of long-term serial passaging on the characteristics and properties of cell lines derived from uveal melanoma primary tumors. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 5288–5301.
- Niapour, A., Karamali, F., Karbalaie, K., Kiani, A., Mardani, M., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., 2010. Novel method to obtain highly enriched cultures of adult rat Schwann cells. *Biotechnol. Lett.* 32, 781–786.
- Oakes, W.J., Friedman, H.S., Bigner, S.H., Bullock, N.H., Bigner, D.D., 1990. Successful laboratory growth and analysis of CUSA-obtained medulloblastoma samples. Technical note. *J. Neurosurg.* 72, 821–823.
- Oh, J.H., Kim, Y.J., Moon, S., Nam, H.Y., Jeon, J.P., Lee, J.H., Lee, J.Y., Cho, Y.S., 2013. Genotype instability during long-term subculture of lymphoblastoid cell lines. *J. Hum. Genet.* 58, 16–20.
- Reznitsky, M., Petersen, M.M.B.S., West, N., Stangerup, S.E., Cayé-Thomasen, P., 2019. Epidemiology Of vestibular Schwannomas - prospective 40-year data from an unselected national cohort. *Clin. Epidemiol.* 11, 981–986.
- Richmond, I.L., Hawksley, C.A., 1983. Evaluation of the histopathology of brain tumor tissue obtained by ultrasonic aspiration. *Neurosurgery* 13, 415–419.
- Rosenbaum, C., Kluwe, L., Mautner, V.F., Friedrich, R.E., Müller, H.W., Hanemann, C.O., 1998. Isolation and characterization of Schwann cells from neurofibromatosis type 2 patients. *Neurobiol. Dis.* 5, 55–64.
- Stangerup, S.E., Cayé-Thomasen, P., 2012. Epidemiology and natural history of vestibular schwannomas. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 45, 257–268.
- Weiss, T., Taschner-Mandl, S., Ambros, P.F., Ambros, I.M., 2018. Detailed protocols for the isolation, culture, enrichment and immunostaining of primary human Schwann cells. *Methods Mol. Biol.* 1739, 67–86.
- Xue, L., He, W., Wang, Z., Chen, H., Wu, H., 2021. Characterization of a newly established schwannoma cell line from a sporadic vestibular schwannoma patient. *Am. J. Transl. Res.* 13, 8787–8803.
- Yan, X., Luo, H., Zhou, X., Zhu, B., Wang, Y., Bian, X., 2013. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H460 cell lines. *Oncol. Rep.* 30, 2733–2740.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Strauss und Herrn Prof. Scheller für die Ermöglichung, finanzielle Unterstützung und die Anregung meines Projektes. Für die uneingeschränkte und hervorragende Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Leisz bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Zudem danke ich allen Kollegen im Labor und der Klinik der Neurochirurgie, die mir bei der Durchführung der Promotion geholfen haben. Bei dieser Gelegenheit muss ich Saskia Fritzsche, Paola Schildhauer und Anna-Louisa Becker meinen Dank aussprechen, die mich immer mit gutem Rat und produktiven Gesprächen auf meinem Weg begleitet haben.

Meiner Familie und dabei insbesondere meiner Mama und meinem Freund danke ich für die Ermöglichung meines Laborjahres und für die Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

## Erklärung

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

*Halle, den 27.02.2025*