

Aus der Neurochirurgischen-Klinik,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. W.-I. Steudel)

**Die Bedeutung spezifischer chromosomaler
Veränderungen auf das Rezidivverhalten von
Meningeomen mithilfe der
Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von:

In-Si Kim

geb. am: 11.04.1981 in Duisburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abstract	8
1. Einführung	9
1.1 Tumorgenese	9
1.2 Meningeome	11
1.2.1 Epidemiologie	11
1.2.2 WHO-Einteilung	12
1.2.3 Lokalisation	14
1.2.4 Klinische Erscheinung	14
1.2.5 Diagnostik	15
1.2.6 Therapie	15
1.3 Molekularzytogenetische Analyse von Meningeomen	17
1.3.1 Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden	17
1.3.2 Zytogenetische und molekularbiologische Charakteristika von Meningeomen	18
1.3.2.1 Monosomie 22 und das Neurofibromatose-Gen (NF-Gen)	19
1.3.2.2 Chromosom 1 und die Alkalische Phosphatase (AP)	21
1.3.2.3 Chromosom 14	23
1.3.2.4 Chromosom 18	24
1.3.2.5 Chromosom 10	24
1.3.2.6 Chromosome 7, 9 und 17	24
1.3.2.7 Sonstige Chromosomenaberrationen und Hyperdiploidie	25
1.4 Tumorprogression	26
1.4.1 Genetische Faktoren	26
1.4.2 Radiatio induzierte Meningeome (RIM)	28
1.4.3 Hormoneller Einfluss	28
1.4.3.1 Steroidhormone	28
1.4.3.2 Nicht-steroidale Hormone	29
1.4.4 Telomerase	29

1.5 Rezidivverhalten und GPS (genetic progression score).....	30
1.6 Fragestellung.....	31
2. Material und Methoden.....	33
2.1 Material.....	33
2.1.1 Tumoren.....	33
2.1.2 Vergleichsmaterial.....	36
2.2 Methoden.....	37
2.2.1 Zellkultur und Herstellung von Präparaten (Präparation von Metaphasenchromosomen)	37
3.2.1.1 Anlegen einer Blutkultur und Lymphozytenpräparation	37
2.2.2 Anfertigen von Gewebeschnitten	38
2.2.2.1 Silanisieren der Objektträger	38
2.2.2.2 Herstellung der Kryostatschnitte.....	38
2.2.2.3 Fixierung der Gewebeschnitte	39
2.2.3 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)	39
2.2.3.1 DNA-Markierung.....	41
2.2.3.2 Dot-Blot (Timmons & Dunbar, 1990).....	43
2.2.3.3 FISH an Chromosomen 7 und 10.....	45
2.2.3.4 FISH an 14q32 und 18q21.....	48
2.2.3.5 DAPI-Gegenfärbung	50
2.2.3.6 Bildaufnahme.....	50
2.2.3.7 Auswertung.....	52
3. Ergebnisse	54
3.1 Histopathologische Parameter und Lokalisation	54
3.2 FISH-Untersuchung an Lymphozytenpräparaten	54
3.3 FISH-Untersuchung am Meningeomrezidiv	56
3.3.1 Numerische Veränderung von Chromosomen 7 und 10.....	56
3.3.2 Numerische Veränderung von 14q32 und 18q21	60
3.3.3 Vergleich zwischen Verlusten von Sondenkombinationen 7/10 und 14q32/18q21.....	61
3.3.4 Vergleich zwischen Ergebnissen der FISH-Analyse von Chromosomen 7 und 10 mit den histopathologischen Parametern	63
3.3.4.1 WHO-Grad	63
3.3.4.2 Lokalisation	63

3.4 FISH-Untersuchung am Primärtumor	63
3.4.1 Numerische Veränderung von Chromosomen 7 und 10.....	63
3.3.2 Numerische Veränderung von 14q32 und 18q21	64
3.3.3 Vergleich zwischen Verlusten von Sondenkombinationen 7/10 und 14q32/18q21 ..	65
3.5 Vergleich zwischen genetischen Aberrationen von Meningeomrezidiven und Primärtumoren	65
3.6 Vergleich zwischen FISH-Analyse von Chromosomen 7 und 10 und konventioneller Karyotypisierung am Meningeomrezidiv	68
3.7 Erstellen des GPS	70
3.7.1 Darstellung der GPS-Tabelle	70
3.7.2 GPS in Korrelation mit WHO-Grad und Lokalisation	72
4. Diskussion	73
4.1 Diskussion der Methodik.....	73
4.1.1 Konventionelle Karyotypisierung	73
4.1.2 Interphase-FISH am Meningeom	74
4.2. Diskussion der Ergebnisse	76
4.2.1 Bewertung der klinischen Daten	76
4.2.1.1 WHO-Grad Einteilung	76
4.2.1.2 Geschlechtsverteilung	77
4.2.1.3 Lokalisation	78
4.2.2 Bewertung der FISH-Signale	79
4.2.3 Untersuchungen von Chromosomen 7 und 10	81
4.2.3.1 Verluste von Chromosomen 7 und 10 in der FISH-Analyse.....	81
4.2.3.2 Untersuchungen der konventionellen Karyotypisierung	83
4.2.4 Untersuchungen von Chromosomen 14 und 18	83
4.2.4.1 Verluste von 14q32 und 18q21 in der FISH-Analyse.....	84
4.2.5 Die genetischen Veränderungen im Vergleich zwischen Primärtumor und Rezidiv	85
4.3 Zytogenetische Aspekte der Meningeome	86
4.3.1 Der primäre Verlust eines Chromosoms 22	86
4.3.2 Der sekundäre Verlust eines kurzen Armes eines Chromosom 1	88
4.4 Chromosomale Aberrationen bei Tumorprogression und Meningeomrezidiven	90
4.4.1 Tumorprogression.....	90
4.4.2 Meningeomrezidive	91
4.5 GPS und onkogenetisches Baumdiagramm.....	95
4.6 Ausblick.....	96

5.Literaturverzeichnis	98
6. Anhang	121
6.1 Herstellernachweis	121
6.2 Geräte und Software.....	122
6.3 FISH-Ergebnisse	123
6.4 Danksagung	145
6.5 Lebenslauf	146

Abkürzungsverzeichnis

ALPL	liver/bone/kidney Alkalische Phosphatase
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CCD	charge-coupled device
CCT	Craniale Computertomographie
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2B
CGH	komparative Genomhybridisierung
cm	Zentimeter
CT	Kernspintomographie
Cy3	Cyanin 3
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DAL-1	Allantoinase-Gen
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	epitheliales Membranantigen
et al.	Et alii
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
g	Gramm
GPS	genetic progression score
h	Stunde
HSG	hintere Schädelgrube
HCl	Chlorwasserstoff
IGF-II	Insulin-like growth factor II
IGH	Immunglobulin-heavy chain
Ki-67	Kiel-67, Antigen
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LOH	Loss of Heterozygosity

M	Molar
m	männlich
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue-1
Mbp	Megabasenpaare
Merlin	Moesin-ezrin-radixin-like-protein
MIB1	„made in Borstel“-1, Antikörper
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NaNO ₂	Natriumnitrit
NF2	Neurofibromatose Typ II-Gen
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OP	Operation
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenis
q	langer Arm eines Chromosoms
RB1	Retinoblastom 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SKY	spektrale Karyotypisierung
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
ter	terminal
TP53	Tumorsuppressorgen, kodierend für p53
u.a.	unter anderem
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Meningeome sind meist langsam wachsende Tumoren, die ihren Ursprung in den Hirnhäuten des Gehirns und Rückenmarks haben. Sie sind üblicherweise benigne, dennoch zeichnen sich einige Tumoren durch Malignisierung und Rezidivbildung aus. Aus zytogenetischer Sicht ist das Meningeom der am besten untersuchte solide Tumor. Der typische Karyotyp ist die Monosomie des Chromosoms 22.

In dieser Dissertationsarbeit wurden 54 Meningeomrezidive und 12 Primärtumoren, von denen 10 mit Rezidivbildung einhergingen und zwei bis zum Zeitpunkt dieser Untersuchung keine Rezidive zeigten, mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Die numerischen Abnormalitäten der Chromosomen 7, 10, 14 und 18 wurden in Kryostatschnitt-Präparaten ermittelt.

Bei den Untersuchungen zeigten die meisten Meningeomrezidive und Primärtumoren komplexe zytogenetische Aberrationen. Mit der Sondenkombination von Chromosomen 7/10 konnten 49 Tumoren von den 54 Meningeomrezidiven und 11 von 12 Primärtumoren hybridisiert werden. Ein Verlust von Chromosom 10 zeigte sich bei den Meningeomrezidiven in 48 Fällen, bei den Primärtumoren in acht Fällen. Der Verlust von Chromosom 7 wurde in 19 Meningeomrezidiven und vier Primärtumoren beobachtet.

Mit der Sondenkombination 14q32/18q21 wurden sechs Meningeomrezidive und 11 Primärtumoren untersucht. In allen Fällen konnten Verluste von Chromosomen 14 und 18 nachgewiesen werden.

Anhand des genetic progression score (GPS), welcher von Ketter et al. vorgeschlagen wird, konnten alle untersuchten Rezidive der GPS-Gruppe 2 eingeordnet werden. Dies weist darauf hin, dass chromosomale Aberrationen im Meningeom streng mit einem höheren Risiko zur Rezidivierung korrelieren.

Daraus geht hervor, dass Abnormalitäten auf Chromosomen 10, 14 und 18 im Meningeom potentielle Prognoseindikatoren der Tumorprogression darstellen.

Abstract

Meningiomas are mostly slow growing tumors that originate from the meningeal coverings of the brain and spinal cord. They are usually benign, but nevertheless some of them have a marked tendency to recur. From the cytogenetically point of view, meningiomas are the best-studied solid tumors. The typical karyotype is described as the monosomy of chromosome 22. In this study the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique was used in 54 recurrent meningiomas and 12 primary tumors. The recurrence occurred in 10 of the 12 primary tumors, during the study remained 2 cases without relapse of the tumor. The numerical abnormalities of the chromosomes 7, 10, 14, and 18 were determined in cryo-sectioned tissue.

Most recurrent meningiomas and primary tumors showed complex cytogenetic aberrations in the investigation at hand. Among the 54 recurrent meningiomas studied for chromosomes 7 and 10 status, 49 were assessable. 11 of the 12 primary tumors were informative. The loss of chromosome 10 was located in 48 recurrent meningiomas and 8 primary tumors. Chromosome 7 losses were observed in 19 recurrent meningiomas and 4 primary tumors.

Six cases of recurrent meningiomas and 11 primary tumors were analyzed using DNA probes localized to 14q32 and 18q21. In all cases losses of chromosomes 14 and 18 were found.

Using the GPS (genetic progression score) by Ketter et al. all recurrent meningiomas regarding to this study were categorized into GPS Group 2. This shows that the chromosomal aberrations are strongly correlated with higher risk of tumor recurrence.

In summary, the results of this study show that the abnormalities of chromosomes 10, 14, and 18 are potentially prognostic indicators for meningioma progression.

1. Einführung

1.1 Tumorgenese

Statistiken der zehnten Revision der ICD (International statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) stellen Tumorerkrankungen nach den Herz-/Kreislauf-erkrankungen als zweithäufigste Todesursache der Bevölkerung dar. Einem Bericht der WHO (World Health Organisation) aus dem Jahre 2008 zufolge könnten sich die durch Tumoren verursachten Todesfälle in den nächsten 20 Jahren sogar verdoppeln. So betrachtet ist „Krebs“ eine äußerst häufige Erkrankung. Die Entstehung eines Tumors auf zellulärer Ebene eines Organismus ist jedoch ein extrem seltenes Ereignis. Im Organismus treten spontane Mutationen mit einer Häufigkeit von 10^{-6} pro Gen und Zellteilung auf (Alberts et al., 2004). Um eine Zelle zur malignen Entartung zu bringen müssen im Durchschnitt sechs bis sieben aufeinanderfolgende Mutationen erfolgen. Die Tumorgenese folgt also einem Mehrstufenprozess: Zur Entstehung eines Tumors müssen mehrere Faktoren permanent auftreten und von Zelle zu Zelle fortschreitend kumulieren.

In Zellkulturen lässt sich das Verhalten von Tumorzellen gut beobachten: Während normale Zellen in der Kulturschale nur so lange wachsen bis sie deren Fläche als Einzelschicht bedecken und danach an Zellteilungskapazität verlieren, wachsen Tumorzellen in Klumpen aus mehreren Zellschichten oder Zellhaufen und schreiten in ihrer Zellteilung unbegrenzt fort. Diese Tatsache wird der Aktivierung der Telomerase-Expression zugeschrieben, deren Vorkommen auf die Keimbahnzellen und embryonalen Stammzellen begrenzt ist. Die Telomerase in den übrigen Zellen des menschlichen Organismus ist normalerweise reprimiert und wird erst bei der malignen Transformation aktiviert. Somit fördert sie das unbegrenzte Wachstum des malignen Klons.

Alle genetischen Veränderungen in Tumorzellen repräsentieren die genetische Instabilität, die sich folgendermaßen zuordnen lässt:

- Änderung der DNA-Sequenz (Mutation)
- Strukturveränderung von Chromosomen, insbesondere Translokationen
- Aneuploidie
- Gen-Amplifikation

Gene, die an der Tumorgenese beteiligt sind, werden in zwei große Kategorien eingeteilt: Tumorsuppressorgene und Onkogene.

Tumorsuppressorgene kodieren Regulatorproteine, die die Zellteilung unterbrechen und somit eine maligne Entartung verhindern. Diese tumorsupprimierende Wirkung ist gestoppt bei Funktionsverlust beider Allele. Mutationen, Deletionen, Genkonversionen, Chromosomenverlust durch Fehlverteilung können Ursache für den Funktionsverlust sein. Ein charakteristisches Kennzeichen vieler Tumorsuppressorgene ist der Verlust von Heterozygotie (LOH) in den Tumorzellen. Die Grundlage für den Gedanken, dass Tumorsuppressorgene existieren, lieferte die Untersuchung am kindlichen Retinoblastom (Knudson, 1971). Ein weiteres Tumorsuppressorgen ist das p53. Es ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert und wirkt in gewissermaßen als ein Genomwächterprotein, indem es bei unaufgehobenen DNA-Schaden während des Zellzyklus sofort die Apoptose einleitet. Das mit Meningeomen oft assoziierte Neurofibromatose (NF)-Gen Typ 2 ist ebenfalls ein Tumorsuppressorgen.

Onkogene haben ihre ursprüngliche Funktionen als Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Signaltransduktionswege (Proto-Onkogene) bis sie durch Mutation oder Amplifikation ihre eigentliche Funktion verlieren. Im Gegensatz zu Tumorsuppressorgen führt bereits die Funktionsänderung eines Allels zum Onkogen. Die erhöhte Expression von Insulin ähnlichem Wachstumsfaktor IGF-1, epidermale Wachstumsfaktor EGF-2, oder Tumorstromafaktor TGF- γ etc. kann durch die Einwirkung von Onkogenen entstehen. Nach Verlust eines Allels umprogrammiert, kodieren Onkogene fortan Proteine, die zum Verlust der Wachstumskontrolle führen.

Dass ein Zusammenhang zwischen Tumorgenese und Mutation bestehen könnte, wurde bereits 1917 von Boveri diskutiert. Demnach resultiert ein Tumor aus der unkontrollierten Proliferation einer einzigen Zelle. Bauer stellte 1928 die Hypothese der somatischen Mutation als Ursache einer Tumorentstehung vor. Erst die Technik zur Chromosomenpräparation (Tjö & Levan, 1956), womit erstmals die exakte Bestimmung der Chromosomenzahl des Menschen gelang, ermöglichte den Nachweis von Anomalien der Chromosomen-Konstitution. Somit konnte zum ersten Mal im Jahr 1959 die ausschlaggebende Aneuploidie beim Down-Syndrom, die Trisomie 21, nachgewiesen werden (Lejeune, 1959). Nur ein Jahr später wurde die erste Chromosomenanomalie im neoplastischen Gewebe bestimmt: Eine Deletion des Chromosoms 22 bei der chronisch-myeloischen Leukämie (Nowell & Hungerford, 1960). Später wurde diese Entdeckung als eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (Philadelphischromosom) identifiziert (Rowley, 1973). An den Chromosomenbruchstellen

befinden sich demnach zwei Gene, die durch Translokation miteinander fusionieren und zu einem proliferationsaktivierenden Genprodukt führen (Heisterkamp et al., 1983; Groffen et al., 1984). Die im soliden Tumor erstmals nachgewiesene Chromosomenaberration ist die im Jahr 1967 von Zang beim Meningeom beobachtete Monosomie 22.

1.2 Meningeome

Meningeome haben ihren Ursprung in den arachnoidalen Deckzellen der Dura (Cushing & Eisenhardt, 1938). Somit unterscheiden sie sich von den hirneigenen Tumoren, die ihren Ursprung in den Zellen des Hirnparenchyms entnehmen. Bei den Meningeomen handelt es sich im Allgemeinen um langsam wachsende intrakranielle oder intraspinale Tumoren, die das angrenzende Hirngewebe verdrängen. Nur ca. 3% der Meningeome weisen ein infiltratives Wachstum in das Hirn-Parenchym auf (Louis et al., 2007). Makroskopisch zeigt sich ein derber, grauer und Verkalkungen aufweisender Tumor. Da der Tumor unterhalb der Dura mater, zwischen und in den weichen Hirnhäuten liegt, dient das innere Durablatt als Tumorkapsel, falls sich das Meningeom in das Hirngewebe wölbt. Grenzt der Tumor dagegen an den Schädelknochen, kann dies zu Infiltration in das Knochengewebe führen (meningeales Osteom). Daraus kann eine reaktive Hyperostose des Schädelknochens mit Spikulabildung resultieren. Im Bereich des Os sphenoidale sind typischerweise sog. *Meningeom en plaque*, diffus flächenförmig wachsende Tumoren, möglich. Immunhistochemisch exprimieren alle Meningeome Vimentin und Desmoplakin, wobei viele neuroektodermale Tumoren Vimentin-positiv sind und das Vimentin somit zur Differentialdiagnose kaum hilfreich ist. Auch das „epithelial membrane antigen“ (EMA) kann zur Diagnostik herangezogen werden, allerdings ist es ebenfalls an anderen Karzinomen nachweisbar (Schnitt & Vogel, 1986).

1.2.1 Epidemiologie

Die Meningeome gehören nach den Gliomen mit 13-26% zu den zweithäufigsten primären intrakraniellen Tumoren (Louis et al., 2007). Die jährliche Inzidenz beträgt etwa 6 pro 100.000 (DeAngelis, 2001); das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter und erreicht das Maximum in der 6. Lebensdekade. Frauen erkranken zwei- bis dreimal häufiger an einem Meningeom als Männer, wobei allerdings die malignen Meningeome bei Männern und Kindern häufiger vorzufinden sind (Jääskeläinen et al., 1986; Matsuno et al., 1996).

1.2.2 WHO-Einteilung

Die WHO-Klassifizierung der Entitäten der Hirntumoren erfolgt nach den morphologischen und immunhistochemischen Merkmalen. Gemäß der WHO werden die Meningeome ihren histopathologischen Befunden zufolge in Grad I-III unterteilt (Louis et al., 2007). Die Gradeinteilung richtet sich nach der Malignität, d.h. die Tendenz zum aggressivem Wachstum und Neigung zur Rezidivbildung sind eher von einem Meningeom des Grades II oder III zu erwarten. Die Subtypen der Meningeome nach WHO-Klassifikation sind in Tabelle 1.1 aufgelistet.

Tabelle 1.1: WHO-Klassifikation der Meningeome (Louis et al., 2007)

Meningeom	WHO-Grad
<i>Meningeome mit niedrigem Risiko für aggressives Wachstum und Rezidivbildung</i>	
Meningotheliales Meningeom	WHO-Grad I
Fibröses Meningeom	WHO-Grad I
Transitionales Meningeom	WHO-Grad I
Psammomatöses Meningeom	WHO-Grad I
Angiomatöses Meningeom	WHO-Grad I
Mikrozytisches Meningeom	WHO-Grad I
Sekretorisches Meningeom	WHO-Grad I
Lymphoplasmazellreiches Meningeom	WHO-Grad I
Metaplastisches Meningeom	WHO-Grad I
<i>Meningeome mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für aggressives Wachstum und/oder Rezidivbildung</i>	
Atypisches Meningeom	WHO-Grad II
Klarzelliges Meningeom	WHO-Grad II
Choroides Meningeom	WHO-Grad II
Rhabdoides Meningeom	WHO-Grad III
Papilläres Meningeom	WHO-Grad III
Anaplastisches Meningeom	WHO-Grad III

Den WHO-Grad I Meningeomen gehören etwa 90% der Tumore an. Sie zeichnen sich durch ihr benignes langsames Wachstum aus (Whittle et al., 2004). Die Grenze des Hirngewebes bleibt in der Regel scharf erhalten. Mit Abstand am häufigsten finden sich meningotheliale, transitionelle sowie fibröse Typen. Histologisch zeigt sich eine niedrige Mitoseaktivität. Sie ist definiert als Anzahl der Mitosen pro 10 mikroskopischen Gesichtsfeldern (HPF) bei 40facher Vergrößerung. Dicht angeordnete ovale Zellkerne, deren Zellgrenzen schlecht zu definieren sind, mit zytoplasmatischen Invaginationen sind charakteristisch für das Meningeom. Eine konzentrische Wirbelbildung um eine zentrale Kapillare oder ausgeprägtes perizelluläres Kollagen und Retikulin sind möglich. Ein weiteres Charakteristikum sind die Psammomkörper: zwiebelschalenartige Zellformationen mit konzentrischen Verkalkungen.

Die Grad II Meningeome sind in 5-7% der Fälle vorzufinden. Sie zeichnen sich durch eine erhöhte mitotische Aktivität (mindestens vier Mitosen pro zehn Gesichtsfelder von $0,16\text{mm}^2$) aus und neigen häufiger zum Rezidiv. Die Zellen zeigen ein unstrukturiertes Wachstum mit einer erhöhten Kern-Plasma-Relation. Der häufigste Subtyp ist das atypische Meningeom. Eine alternative Diagnose eines atypischen Meningeoms kann gestellt werden, wenn mindestens drei der fünf folgenden Kriterien erfüllt sind:

- ein ununterbrochenes, strukturloses, oder rasenartiges Wachstum
- eine kleinzellige Tumorzellpopulation mit pathologisch erhöhter Kern-Plasma Relation
- spontane Tumorgewebsnekrosen
- eine erhöhte Zelldichte
- prominente Nukleolen

Die Grad III Meningeome machen etwa 1-3% der Meningeome aus und sind durch eine hohe Mitoserate (mindestens 20 Mitosen pro zehn Gesichtsfelder von $0,16\text{mm}^2$) mit Kernpolymorphismen gekennzeichnet. Der Tumor wächst infiltrierend in das Hirnparenchym und weist Tumornekrosen auf. Überaus präsent ist an dieser Stelle das anaplastische Meningeom. Das klinische Bild zeigt ein schnelles invasives Wachstum und weist sehr selten systematische Metastasenbildungen (z.B. in Lunge) auf. Den anaplastischen Meningeomen wird eine durchschnittliche Überlebenszeit von zwei Jahren zugesprochen (Perry et al., 1999).

1.2.3 Lokalisation

Meningeome befinden sich intrakraniell, intraorbital oder spinal. Zu 90% sind sie supratentoriell anzufinden. Am häufigsten liegen Meningeome im Bereich der Konvexität, parasagittal an der Falx (parasagital), am Keilbeinflügel, in den basalen Zisternen oder dem Kleinhirnbrückenwinkel (Wiestler & Reifenberger, 2003). Sehr selten treten intraventrikuläre Meningeome und solche in der Orbita auf (Wiestler, 2003). Ebenfalls selten finden sich Meningeome im Spinalkanal, wobei diese bei Frauen fünf- bis neunmal häufiger auftreten können (Kepes et al., 1982; Louis et al., 2000; Ketter et al., 2001).

1.2.4 Klinische Erscheinung

Meningeome weisen keine krankheitsspezifischen Symptome auf und können sogar für eine längere Zeit asymptomatisch verlaufen. Mit 25-40% gelten Krampfanfälle als die häufigsten klinischen Merkmale (Chozik et al., 1996; Lieu & Howng, 2000). Durchaus kann sich das Meningeom durch Kompression, Irritation oder durch die Invasion der benachbarten Hirnregion klinisch manifestieren. Die Symptome werden durch Lokalisation und Größe des Tumors bestimmt. So manifestiert sich ein parasagittales Meningeom im mittleren Sinusdrittel durch motorische Funktionsstörungen, an den unteren Extremitäten beginnenden Paresen und herdförmigen Anfällen. Bei einem Konvexitätsmeningeom kommt es je nach komprimierter Hirnregion zu Sprachstörungen, fokalen Anfällen oder Paresen. Visusstörungen können bei Olfaktoriusmeningeomen oder Meningeomen des Tuberculum sellae auftreten. Die Keilbeinflügelmeningeome können je nach Lokalisierung die Arteria carotis interna, Nervus opticus oder Nervus oculomotorius umwachsen und so zu einer Visusverschlechterung führen sowie dem klinischen Bild eines Konvexitätsmeningeoms entsprechen. Nackenhinterkopfschmerz mit Gangstörungen und Schwindel können ein Hinweis eines Meningeoms des kraniozervikalen Übergangs sein.

Die Symptome können nicht nur mit dem Tumor, sondern auch mit einem perifokalen Ödem assoziiert sein. Die erhöhte Expression des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) führt zur verstärkten Vaskularisierung und exzessiv gesteigerten Gefäßpermeabilität, die ein Ödem als Folge hat (Goldman et al., 1997). Insbesondere bei Tumoren kleinen Umfangs kann das peritumoröse Ödem verantwortlich für die klinischen Symptome sein (Jagadha & Deck, 1987;

Cornu et al., 1990; Mahmood et al., 1993; Nakano et al., 2002). Ein Stauungsödem durch Komprimierung des Liquorabflusssystemes kann ebenfalls durch Hirndrucksteigerung neurologische Symptome hervorrufen.

1.2.5 Diagnostik

Mit einer Spezifität bis zu 96% lässt sich ein intrakranielles Meningeom anhand der Computertomographie (CT) bzw. Magnetresonanztomographie (MRT) nachweisen. Am Anfang der Untersuchung steht zumeist die CT mit und ohne Kontrastmittel. Als sensibelste Methode ein Meningeom darzustellen gilt die MRT.

Im CT (ohne Kontrastmittel) findet sich zu 70% ein hyperdenser Tumor der teilweise Verkalkungen aufweisen kann. Außerdem sind Hyperostosen möglich. Typisch ist ein rundförmiger homogener stark kontrastmittelauffiner Tumor. Im MRT zeigt das Meningeom ebenfalls eine starke Kontrastmittelanreicherung an und ist isointens in T₁- und T₂-Wichtung. Charakteristisch ist der Duraschweif, der deutlich verdickte Anheftungsbereich des Tumors an der Dura. In über 50% der Fälle ist ein perifokales Ödem nachweisbar, dessen Umfang zu anderen intrakraniellen Tumoren geringer ist. Wird ein Tumor im Bereich der Keilbeinflügel sowie in der Falx vermutet, kann zusätzlich eine Angiographie indiziert sein. Außerdem bietet die MR-Angiographie detaillierte Informationen über die tumorversorgenden Gefäße. Besteht ein Mammakarzinom in der Vorgeschichte, so ist eine Szintigraphie hilfreich, um eine Metastase vom Meningeom zu differenzieren.

1.2.6 Therapie

Die Exstirpation gilt primär als die Therapie der Wahl (Black et al., 1993), soweit keine Risikofaktoren aus internistischer- bzw. anästhesiologischer Sicht bestehen. Angestrebt wird eine Totalresektion (Giombini et al., 1984; Mirimanoff et al., 1985), die sich aber abhängig von der Lokalisation und Größe als schwierig gestalten kann. Die Radikalität der Meningeomresektion ist ein wesentlicher Faktor in Hinblick auf eine Rezidivkrankung. Anhand von Simpson (1957) konnte eine Einteilung erstellt werden, die es ermöglicht das postoperative Rezidivrisiko in Verbindung zur Operationsradikalität einzuschätzen. Die Gradeinteilung und Rezidivhäufigkeit nach Resektion sind in Tabelle 1.2 aufgelistet.

Tabelle 1.2: Simpson-Grad Einteilung

Grad	Beschreibung	Rezidive	Kontrollen
I	Makroskopisch komplette Entfernung mit Exzision der Duramatrix und infiltrierten Knochens. Duraplastik erforderlich	9%	jährlich
II	Makroskopisch komplette Entfernung, Koagulation der Duramatrix an der Ansatzstelle	16%	½-jährlich
III	Makroskopisch komplette Entfernung, ohne Resektion oder Koagulation der Duramatrix oder der extraduralen Infiltrationen	39%	¼-½ jährlich
IV	Partielle Resektion, Resttumor wird belassen		
V	Entlastungsdrainage mit/ohne Biopsie		

Asymptomatisch kleine Meningeome, oft als Zufallsbefund diagnostiziert, bedürfen nicht zwingend einer operativen Behandlung. Hier ist eine konservative und abwartende Haltung gerechtfertigt. Der Verlauf wird neuroradiologisch zunächst halbjährlich, dann jährlich kontrolliert.

Präoperativ werden in einzelnen Fällen die tumorversorgenden Gefäße mittels Embolisation unterbrochen um den intraoperativen Blutverlust zu minimieren (Nelson et al., 1994). Obwohl der Resttumor für die Rezidiventstehung ein wesentliches Risiko darstellt (Mirimanoff et al., 1985), ist es oftmals nicht möglich im Bereich der hinteren Schädelgrube und des Sinus cavernosus eine Totalresektion durchzuführen. Im Vergleich dazu kann durch die anatomisch günstige Lage ein Meningeom der Konvexität regelmäßig vollständig entfernt werden. Nach einer Resektion kommt es bei WHO-Grad I Meningeomen in 7-10% der Fälle zu einem Rezidiv. Die progressionsfreie Zeit betrifft bei den benignen Meningeomen 7,5 Jahre, bei den atypischen 2,4 und bei den anaplastischen 3,5 Jahre (Haltia et al., 1986; Maier et al., 1992). Außer einer Operation kommen Strahlentherapien oder sehr selten Chemotherapien zum Einsatz. Die Indikation einer Strahlentherapie ist allerdings nur bei Inoperabilität, unvollständiger Resektion des Tumors und ggf. bei malignen Meningeomen gegeben

(Lunsford, 1994), denn paradoxerweise besteht bei Bestrahlung die Gefahr einer Tumorinduktion (siehe Kapitel 1.4.1). Ob eine antihormonelle Therapie wie das Mifepristone (Progesteronrezeptorantagonist) erfolgreich ist, kann aufgrund der ungenügenden Datenlage nicht endgültig beantwortet werden.

1.3 Molekularzytogenetische Analyse von Meningeomen

1.3.1 Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden

Die zentrale Methode der molekularen Zytogenetik stellt die in situ-Hybridisierung dar. Bei dieser Untersuchungstechnik werden markierte RNA- oder DNA-Sonden direkt im biologischen Material (in situ) mit einer komplementären Basensequenz hybridisiert, welche dann über verschiedene Mechanismen detektiert werden können (John, 1969; Gall & Pardue, 1969). Anfangs wurden radioaktive Marker verwendet, die – im Vergleich zu den weiter entwickelten Verfahren – die Nachteile einer geringeren Auflösung der Signale und einer hohen Autoradiographiedauer der zu verwendenden Radionukleotide haben. Hinzu kommt die Gefahr der Radioaktivität. Anstatt radioaktive Marker einzusetzen wurden Techniken entwickelt, mit deren Hilfe die Sonden-DNA mit Haptenen gekoppelt werden, die dann mit den entsprechenden Antikörpern, an denen ein Fluorochrom gekoppelt ist, visualisiert werden. Mit der Einführung von fluoreszierenden Reportergruppen, die entweder direkt (Baumann et al., 1980; Wiegant et al., 1991) oder indirekt (Pinkel et al., 1986) markiert werden, gelang es eine höhere Empfindlichkeit und bessere Auflösung der Hybridisierungssignale zu erzeugen. Bei der FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) wird eine bekannte DNA (Zielsequenz) im Präparat detektiert. In der molekularen Genetik stellt die FISH ein wichtiges Markierungsverfahren dar. Nicht nur gesamte Chromosome, sondern auch auf ihnen lokalisierte Gene können in ihrer Anzahl und Lage untersucht werden.

Eine weitere Untersuchungstechnik ist die 1992 von Kallioniemi et al. entwickelte vergleichende genomische Hybridisierung (CGH). Mit Hilfe der CGH können numerische Aberrationen im Genom einer Zellpopulation (z.B. in einer Tumorprobe) bestimmt werden. Diese Methode dient dem Nachweis von Gewinn und Verlust des Genommaterials. Das Prinzip beruht auf der gleichzeitigen Hybridisierung von unterschiedlich markierter Tumor- und Kontroll-DNA .

Die Technik der Chromosomeneinfärbung (chromosome painting) macht es möglich, vom ganzen Chromosom fluoreszierende Signale zu erhalten. Dabei ist das Hybridisierungssignal die Summe der Signale verschiedener Loci, die sich über das gesamte Chromosom verteilen. Bei der M-FISH (Multiplex-FISH) wird das gesamte Chromosom mit Sonden, die gleichzeitig mit mehreren Farbstoffen in verschiedenen Mengenverhältnissen markiert sind, eingefärbt. Diese M-FISH dient als Grundlage der spektralen Karotypisierung (SKY), womit eine Art molekulare Karotypisierung ermöglicht wird (Lichter, 1997). Die Mischfarben können nicht unter dem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop analysiert werden, sondern bedürfen einer automatischen digitalen Bildanalyse. Mit Hilfe einer CCD(charge coupled device)-Kamera werden für jeden einzelnen Fluoreszenzfarbstoff digitale Bilder aufgenommen. Die einzelnen Bilder werden zur Analyse zu einem ganzen Bild zusammengesetzt, wobei jedes Chromosom eine Falschfarbe erhält. Somit können die 24 Chromosome des Menschen gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Diese Techniken ermöglichen einen schnellen Überblick über komplex veränderte Chromosomensätze und finden besonders bei de novo Untersuchungen am Tumormaterial Verwendung.

1.3.2 Zytogenetische und molekularbiologische Charakteristika von Meningeomen

Meningeome gehören zu den zytogenetisch am besten studierten soliden Tumoren. Charakteristisch und am häufigsten beobachtet beim Meningeom ist die Monosomie 22 (Zang & Singer, 1967), die als einzeln auftretende Anomalie nicht mit einer Meningeomprogression assoziiert ist. Die Progression vom Grad I bis zum Grad III Meningeom wird durch verschiedene chromosomale Begebenheiten charakterisiert:

- 1) ein partieller oder kompletter Verlust eines kurzen Arms von einem Chromosom 1
- 2) sekundäre Verluste von acht weiteren Chromosomen in einem typischem Muster klonaler Evolution
- 3) die Deletion von 9p21 (pathognomonisch für anaplastische Meningeome)

Insbesondere ist die Deletion von 1p mit einem aggressiven biologischen Verhalten assoziiert (Zang & Singer, 1967; Bello et al., 1994; Henn et al., 1995; Kolles et al., 1995; Simon et al., 1995; Niedermayer et al., 1997; Weber et al., 1997; Ketter et al., 2001). Abbildung 1.1 zeigt eine typische Chromosomenkonstellation eines malignen Meningeoms.

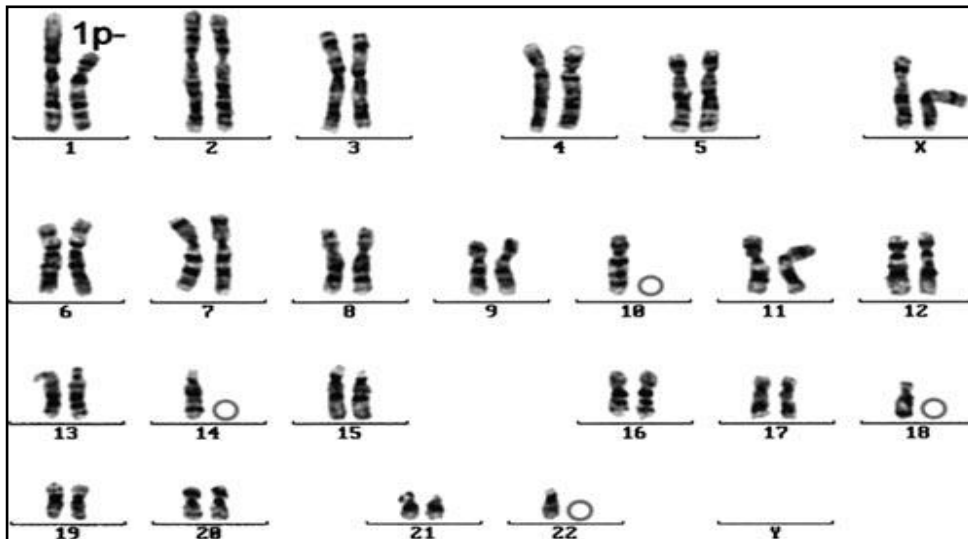


Abbildung 1.1: Das Karyogramm zeigt die typischen Chromosomenverluste beim Grad III Meningeom. Unschwer zu erkennen sind die Monosomie 22 und Verlust von 1p. (nach Zang: Meningeoma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93:207-220, 2001)

1.3.2.1 Monosomie 22 und das Neurofibromatose-Gen (NF-Gen)

Die am häufigsten beobachtete chromosomale Aberration ist die Monosomie 22. Im Jahr 1967 von Zang entdeckt, ist Monosomie 22 die erste Entdeckung chromosomaler Veränderungen in soliden Tumoren. Etwa 50% aller Meningeome zeigen einen heterozygoten Verlust des Chromosom 22 (Ketter et al., 2001).

In enger Verbindung mit dem Verlust eines Chromosoms 22 steht die Neurofibromatose Typ2 von Recklinghausen. Diese Erkrankung wird autosomal dominant vererbt und geht typischerweise mit bilateralen Vestibularis-Schwannomen (Akustikusneurinomen) oder multiplen Meningeomen einher.

Es folgte der Nachweis von Mutationen im Tumorsuppressorgen NF2 auf dem langen Arm des Chromosoms 22, die bei 30-60% aller Meningeomen nachweisbar sind (Ruttledge et al., 1994; De Vitis et al., 1996; Harada et al., 1996; Lekanne Deprez et al., 1994; Merel et al., 1995; Papi et al., 2000). Das NF2-Gen befindet sich auf dem Genlocus 22q12.2 und hat seine Funktion in der Verbindung von Membran und Cytoskelett. Untersuchungen zeigten, dass bei 30-60% der sporadisch auftretenden Meningeomen und bei 35-50% der Schwannomen Mutationen im NF2-Gen vorliegen (Ruttledge et al., 1994; Lekanne Deprez et al., 1994; Merel et al., 1995). Bei der Häufigkeit des Auftretens einer NF2-Mutation konnte kein auffälliger Unterschied bezüglich des WHO Grades festgestellt werden, so dass die NF2-

Mutation einen initiierenderen Faktor für die Meningeome darstellen kann (Wellenreuther et al., 1996). Allerdings konnte eine signifikant höhere Mutationsrate des NF2-Gens bei den transitionellen (83%), anaplastischen (75%), fibroblastischen (70%) sowie atypischen (60%) Meningeomen im Vergleich zu den meningothehialen Meningeomen (25%) festgestellt werden (Wellenreuther et al., 1995). Bei den sekretorischen Meningeomen waren keine Frequenzen von NF2-Mutationen zu erkennen (Hartmann et al., 2006). Im Hinblick auf die Lokalisation waren bei Tumoren der Konvexität höhere Verlustraten des langen Arms vom Chromosom 22 als in der Schädelbasis zu erkennen (Kros et al., 2001). Bei 60% der Meningeome konnte analog zur NF2-Mutation eine verringerte Expression des Proteins Merlin (Moesin-Ezrin-Radixin-like Protein, auch Schwannomin) nachgewiesen werden (Wellenreuther et al., 1997; Lee et al., 1997), bei den fibrösen und transitionalen Subtypen konnte die Expression sogar fehlen (Hitotsmatsu et al., 1997). Wiederum konnte nachgewiesen werden, dass auch ohne NF2-Mutation eine Inhibition des Merlins möglich ist (Louis et al., 1995; Gutmann et al., 1997). Eine Untersuchung zeigte, dass bei einem intakten NF2-Gen ein normaler Karyotyp und keine genetischen oder epigenetischen Aberrationen vorlagen und somit die Rolle von Tumorsuppressorgenen für die Tumorgenese in den Vordergrund rückte (van Tilborg et al., 2006).

Das NF2-Gen kodiert das Protein Merlin, dass einer Reihe von Strukturproteinen (Protein 4.1 Superfamily) angehört und vermutlich eine Kontrollfunktion bei der Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion (Lallemand et al., 2003) übernimmt. Es interagiert an der Innenseite der Zytoplasmamembran mit Aktin, Beta II-Spectrin und mit mindestens fünf weiteren, bisher unbekannt Proteinen (Scoles et al., 1998).

DAL-1 (differently-expressed-in-adenocarcinoma of the lung, auch 4.1B genannt) gehört ebenfalls den Protein 4.1 Tumorsuppressorgenen an und ist lokalisiert auf 18p11.3. Aktuellen Studien zufolge hat es seine Funktion als Tumorsuppressorgen in der Aktivierung des Rac1 abhängigen c-Jun-NH(2)-kinase (JNK) Pathways (Gerber et al., 2006). Besonders beim Fehlen einer LOH (Loss of heterozygosity) des NF2-Locus bei sporadisch auftretenden Meningeomen mit Verlust des DAL-1 Locus wird auf eine Funktion als Tumorsuppressorgen spekuliert (Nunes et al., 2005). Bei einem Großteil der niedrigmalignen Meningeomen konnte der Verlust von DAL-1 als Frühereignis beobachtet werden (Gutmann et al., 2000; Perry et al., 2000). In einer Studie von Perry (2000) zeigten 92% der untersuchten Meningeome einen Verlust des NF2- oder des DAL-Gens; bei 58% der Fälle lag eine Kombination vor.

Weitere Studien weisen darauf hin, dass die Inaktivierung eines oder mehrerer Proteinen der 4.1 Superfamilie inklusive Merlin, DAL-1/4.1B sowie 4.1R mit der Initiierung der Meningeome in engem Zusammenhang steht (Perry et al., 2004).

Allerdings waren in 40-50% der Fälle keine Monosomie 22 oder eine Mutation des NF2-Gens nachweisbar (Samoto et al., 1995; Wellenreuther et al., 1995) und in 30-50% der Fälle ohne chromosomale Aberrationen.

1.3.2.2 Chromosom 1 und die Alkalische Phosphatase (AP)

Nach den Anomalien des Chromosoms 22 sind die Deletionen am kurzen Arm des Chromosom 1 die am zweithäufigsten auftretenden, zytogenetisch untersuchten Alterationen des Meningeoms (Bello et al., 1994). Untersuchungen mit den FISH-Techniken konnten in 70% der atypischen und in 100% der anaplastischen Meningeome eine Monosomie 1p nachweisen, was auf eine Korrelation zwischen dem Verlust von 1p und der Tumorprogression hinweist (Henn et al., 1995, Steudel et al., 1996, Müller et al., 1999, Zang, 2001). Auch im Zusammenhang mit Rezidiven war ein Verlust von 1p in 30% der Meningeomrezidiven nachweisbar. Nur 4,3% der Rezidive waren ohne 1p Verlust (Ketter et al., 2001). Schon 1982 wurde beobachtet, dass geringer differenzierte Meningeome histochemisch einen Expressionsverlust an Alkalische Phosphatase innerhalb der Tumorzellen aufweisen (Zang, 1982).

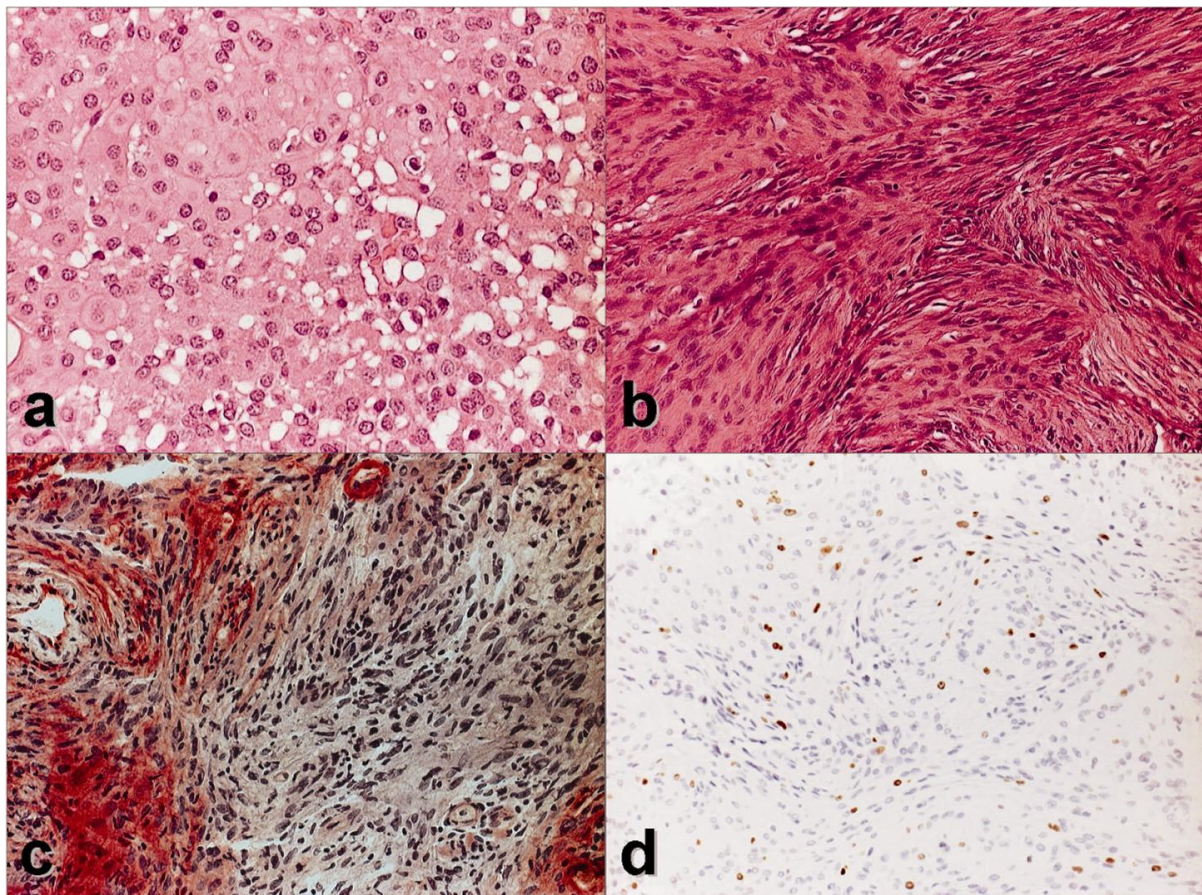


Abbildung 1.2: Histochemische Expressionsmuster der ALPL in Meningeomen. (a) Positive Enzymaktivität in meningeothelialen Tumorzellen. Kryostatschnitt eines meningeothelialen Meningeoms, 10fache Vergrößerung. (b) ALPL Detektion des gleichen Tumors in Ausstrichpräparaten, 40fache Vergrößerung. (c) Atypisches Meningeom mit partiellem Verlust der ALPL Aktivität. (d) Meningeom mit komplettem Verlust der ALPL Aktivität. Nur die Endothelien der Blutgefäße zeigen als interne Qualitätskontrolle eine positive Enzymaktivität, 10fache Vergrößerung

Die Alkalische Phosphatase, die auf 1p Lokalisiert ist, zeigte eine Reduktion ihrer Aktivität bei einem Verlust von 1p36 (Müller et al., 1999, Ketter et al., 2001, Zang, 2001); eine Korrelation zwischen dem Funktionsverlust der Alkalischen Phosphatase bei höhergradigen Meningeomen ist möglich. In 79-100% der WHO-Grad III Meningeome wird der Funktionsverlust eines Isoenzym des AP, das ALPL (siehe unten), nachgewiesen (Ishino et al., 1998; Müller et al., 1999; Pfisterer et al., 2004). Der histopathologische Nachweis der ALPL-Expression an Meningeomen dient dazu, benigne Meningeome von atypischen und anaplastischen Meningeomen abzugrenzen (Abbildung 1.2).

Die Alkalische Phosphatase ist ein membrangebundenes Enzym und dient der Dephosphorylierung verschiedener Moleküle bei einem pH-Optimum von 7-8. Die AP kommt unter anderem in Leber, Knochen, Dünndarmschleimhaut, Plazenta und

Gallenwegsepithel vor. In der Labormedizin wird die AP-Konzentration im Serum bestimmt, um Krankheiten im Bereich der Gallenwege, Leber und Knochen zu diagnostizieren. Im menschlichen Organismus finden sich vier Isoenzyme: das liver/bone/kidney type (ALPL), das intestinal type (ALPI), das placental type (ALPP1) sowie das placental like type (ALPP2) Isoenzym. Das ALPL, auch unspezifische Alkalische Phosphatase genannt, wird in den meisten Geweben exprimiert und hat sein kodierendes Gen auf Chromosom 1p36.1-34 (Greenberg et al., 1990). Auch in arachnoidalen Zellen wird ALPL stark exprimiert (Landow et al., 1942). Im Gegensatz dazu konnte in Meningeomen ein Mangel an ALPL-Aktivität nachgewiesen werden (Niedermayer et al., 1997). Ebenfalls wurde beobachtet, dass der Aktivitätsverlust des ALPL stark mit dem Verlust von 1p korreliert (Niedermayer et al., 1997). Anhand dessen wird der Alkalischen Phosphatase eine Funktion als Tumorsuppressorgen zugewiesen (Lindblom et al., 1994; Boström et al., 1997; Niedermayer et al., 1997; Ishino et al., 1998; Lamszus et al., 1999).

1.3.2.3 Chromosom 14

Nach den Verlusten von Chromosomen 22 und 1p wird als dritthäufigste Aberration in einem Meningeom der Verlust eines Chromosoms 14 angegeben (Zang, 2001). Bei benignen Meningeomen, die trotz Totalresektion wiederholt Rezidive aufwiesen, wurde häufig eine Deletion von 14q beobachtet (Cai et al., 2001). In molekularbiologischen Untersuchungen konnten Verluste vom langen Arm des Chromosom 14 in 30% der Grad I, 40-57% der Grad II und 55-100% der Grad III Meningeome identifiziert werden (Simon et al., 1995; Weber et al., 1997; Leone et al., 1999; Cai et al., 2001; Tse et al., 1997; Menon et al., 1997). Maillo et al. (2003) sind der Ansicht, dass die Aberration des Chromosom 14 einen unabhängigen, prognostischen Parameter darstellt. In Kombination mit Patientenalter und histopathologischem Grad des Tumors kann dies zu einer Hervorhebung derjenigen Patienten mit erhöhtem Risiko einer Rezidiverscheinung bewirken. Auch wurde ein Zusammenhang zwischen Koexistenz von Monosomie 14 und Deletion 1p36 in früh auftretenden Grad I Meningeomrezidiven beschrieben (Maillo et al., 2007). Bislang konnte noch kein Suppressorgen auf Chromosom 14 festgestellt werden (Lamszus, 2004). Ebenfalls ist noch nicht klar, ob sich eine definierbare, kritische Region auf dem Chromosom befindet, die beim Auftreten eines Meningeoms regelmäßig verloren geht.

1.3.2.4 Chromosom 18

Chromosomenuntersuchungen aus Meningeom-Zellkulturen ergaben Deletionen der Region 18q21-qter (Büschges et al., 2001). Der Verlust vom langen Arm des Chromosom 18 konnte in 14% der benignen, 40% der atypischen und 50% der anaplastischen Meningeome identifiziert werden (Weber et al., 1997). Als Kandidaten-Tumorsuppressorgen wird ein Protein aus der 4.1 Superfamilie, das DAL-1, diskutiert (Zang, 2001). Dies gehört derselben Gruppe wie das bereits erwähnte Merlin an, dessen kodierendes Gen auf 18p11.3 sitzt (Gutmann et al., 2000, Lamszus, 2004). Der Verlust von DAL-1 ist in 30-70% der Meningeome nachweisbar (Perry, 2000; Gutmann et al, 2000).

1.3.2.5 Chromosom 10

Vor allem bei höhergradigen Meningeomen liegt eine Deletion des Chromosoms 10 vor (Rempel, 1993; Mihaila, 2003). Eine Verbindung zwischen LOH am Chromosom 10 und der Tumorprogression beim malignen Meningeom ist bekannt (Rempel et al., 1993). Mehreren Studien zufolge ist ein Verlust von 10q in 5-10% bei Grad I, 29-40% in Grad II und 40-58% in Grad III Meningeomen nachweisbar (Simon et al., 1995; Weber et al, 1997; Peters et al., 1998; von Deimling et al., 2000). Auf die Frage, ob ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10 lokalisiert ist, wurde von Peter et al., Bostrom et al., und Joachim et al. das PTEN-Gen (10q23.3) untersucht, jedoch wurden keine homozygoten Verluste gefunden. In einer anderen Studie wurde das DMBT-1-Gen (10q26.11-26.12) analysiert: Dabei wurde ebenfalls kein homozygoter Verlust – weder beim atypischen, noch beim malignen Meningeom – festgestellt (von Deimling et al., 2000). Da die allelischen Verluste ein sehr komplexes Muster aufweisen, ist es bisher noch nicht gelungen eine konstant deletierende Region zu definieren.

1.3.2.6 Chromosome 7, 9 und 17

Der Verlust von 7p wird bei Radiatio induzierten Meningeomen (RIM) häufig gesehen, der beim sporadischen Meningeom eine Rarität darstellt (Henn et al., 2003). Bislang konnte kein spezifisches Tumorsuppressorgen, das mit der Entwicklung eines Meningeoms assoziiert ist, auf Chromosom 7 erfasst werden. Dennoch sind die im Meningeomwachstum verwickelten zwei Wachstumsfaktoren EGFR (epidermal growth factor receptor) und IGF (insulin-like growth factor-II)-2 auf Chromosom 7 lokalisiert (Bigner et al., 1987; Westphal et al., 1989).

Der Verlust von Chromosom 9 wird hauptsächlich beim malignen Meningeom vorgefunden (Weber et al., 1997, Louis et al., 2007). Insbesondere der kurze Arm von Chromosom 9 hat an Bedeutung gewonnen, da die Tumorsuppressorgene CDKN2A, CDKN2B und p14^{raf} auf 9p21 lokalisiert sind. Das p14 wirkt dem Mdm2 vermittelten Abbau des entscheidenden Tumorsuppressorgens TP53 entgegen. Die Genprodukte p15 und p16, sind an der Zellzykluskontrolle beteiligt und nehmen an der Phosphorylierung von Protein RB1 und der Transkriptionskontrolle teil. Der Verlust von 9p ist in 38% der Grad III, 18% der Grad II und nur 5% der Grad I Meningeome nachweisbar (Boström et al., 2001). In verschiedenen Untersuchungen konnte ermittelt werden, dass die Signalwege des RB-Protein und TP53 in vielen Grad III Meningeomen gestört sind (Lamszus 2004). Die Deletion von CDKN2A ist in einer Studie von Perry et al. (2002) mit einer bedeutend kürzeren Überlebenszeit korreliert.

Auf Chromosom 17 ist ein Tumorsuppressorgen lokalisiert, das bei Tumorerkrankungen eines der am häufigsten mutierten Gene darstellt: das TP53. Dieses Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert. Bei Astrozytomen ist das Gen in seiner mutierten Form geradezu spezifisch. TP53-Mutationen tauchen bei Meningeomen entweder gar nicht oder nur sporadisch auf (Ohgaki et al., 1993; Wang et al., 1995; Boström et al., 2001; Joachim et al., 2001). Es konnten noch keine Gene identifiziert werden, die für die Tumorprogression relevant sind, jedoch als Protoonkogene eine Rolle spielen könnten (Büschges et al., 2002).

1.3.2.7 Sonstige Chromosomenaberrationen und Hyperdiploidie

Weitere Aberrationen, die bei einem Meningeom auftreten können, sind Verluste von 6q, Chromosomen 19 und 20 oder der Geschlechtschromosomen sowie die Gewinne/Amplifikationen von 1q, 9q, 12q, 15q, 17q oder 20q (Al Saadi et al., 1987; Katsuyama et al., 1986; Wellenreuther et al., 1995; Lamszus et al., 1999; Cai et al., 2001; Boström et al., 2001).

Die zytogenetischen Alterationen können auch die Chromosomenanzahl betreffen. Bei 60% der Meningeome wurde eine Hypodiploidie festgestellt; 33% waren diploid und 2,5% zeigten eine hyperdiploide Formation auf (Mark, 1977). Laut Ketter et al. (2007b) bilden hyperdiploide Konstitutionen beim Meningeom eine kleine, aber klinisch relevante Entität. Generell zeigen Meningeom-Patienten mit hyperdiploidem Chromosomensatz eine schlechte Prognose mit erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit (Ketter et al., 2007b).

1.4 Tumorprogression

1.4.1 Genetische Faktoren

Die spezifischen Veränderungen, die mit der malignen Progression der Meningeome in Zusammenhang stehen, sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Das Verständnis der zytogenetischen Veränderungen ist im Hinblick auf die Vorhersage von Rezidiven und maligner Progression von Bedeutung. Während benigne Meningeome außer der Monosomie 22 geringe strukturelle Veränderungen aufweisen, finden sich im Laufe der Tumorprogression weitaus komplexere Karyotypen an. Besonders der Verlust von 9p21 stellt ein Ereignis dar, dass spezifisch mit anaplastischen Meningeomen assoziiert ist.

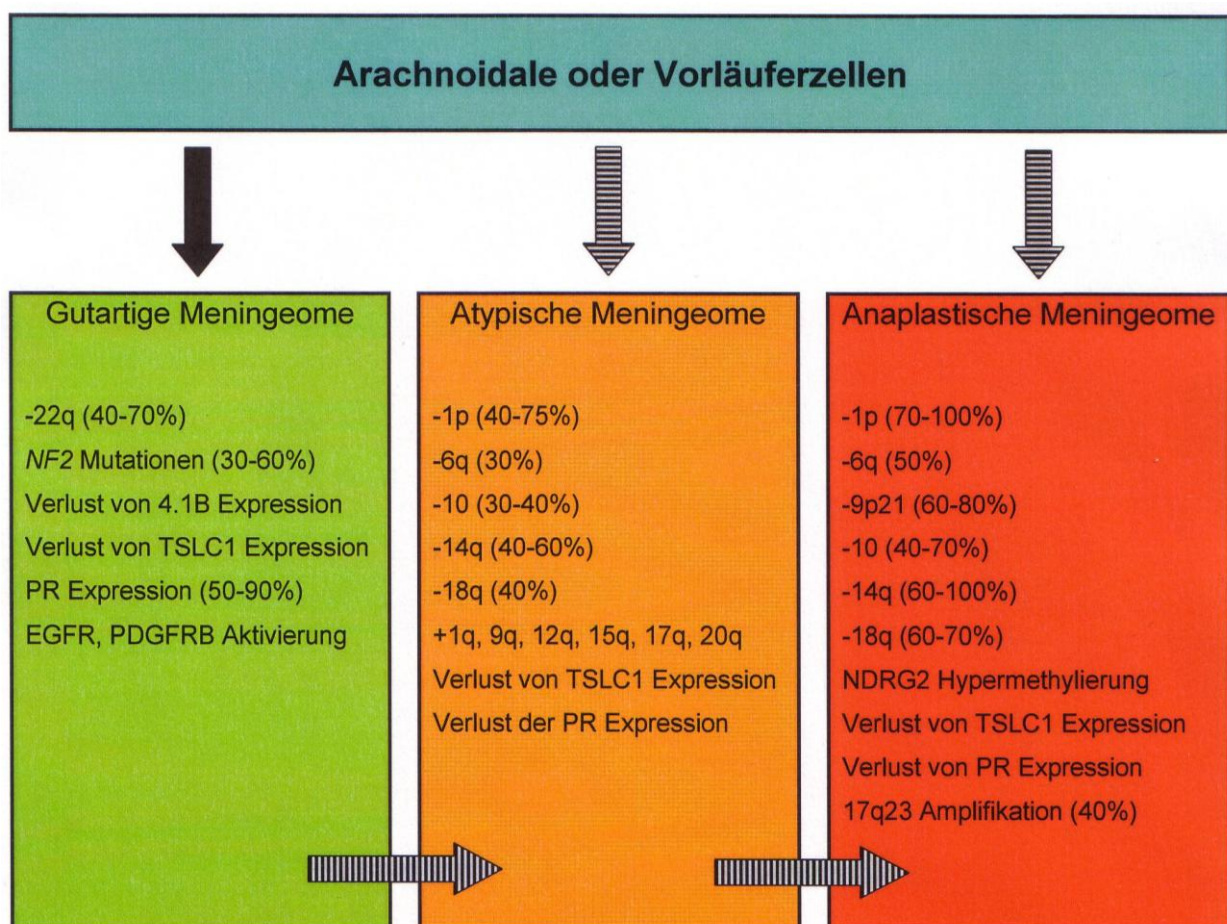


Abbildung 1.3: Genetisches Modell der Tumorgenese beim Meningeom und deren maligne Progression. (nach Perry A, Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A: Meningiomas. In Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK: WHO Classification of tumours of the central nervous system. WHO Classification of tumours of the central nervous system. IARC, Lyon, 2007)

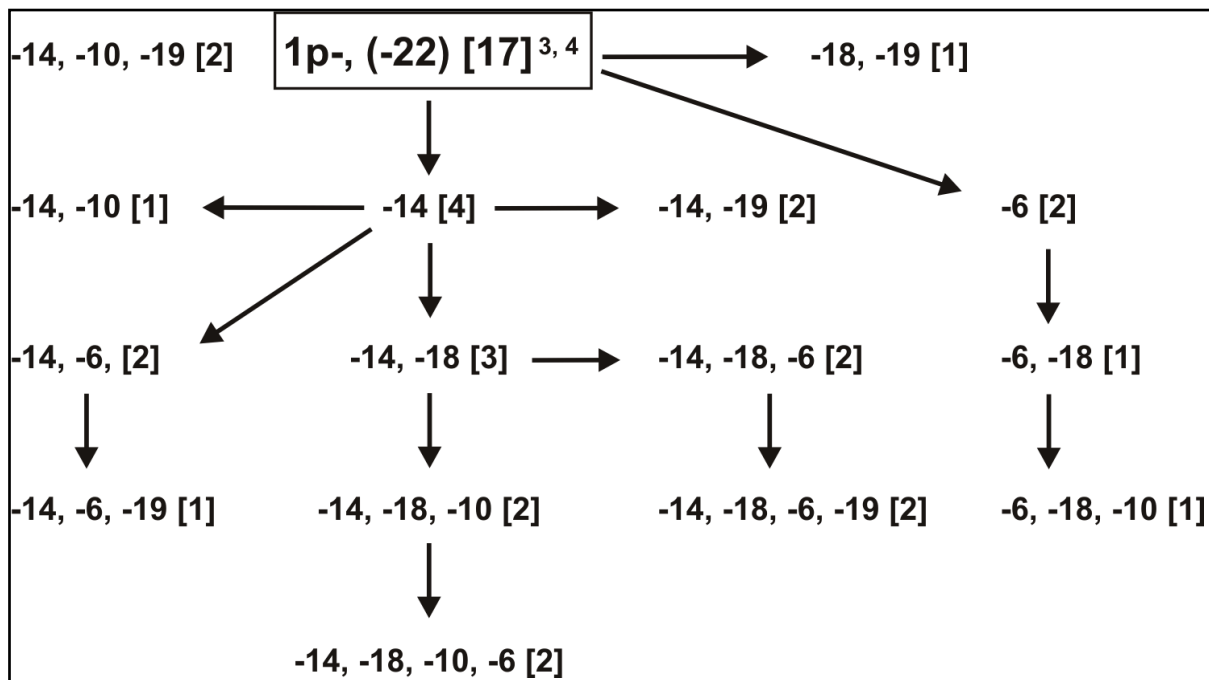


Abbildung 1.4: Genetisches Modell zur Progression und Rezidivierung beim Meningeom. Dargestellt wird die klonale Evolution in 26 Meningeomen mit Verlust eines kurzen Armes eines Chromosom 1. (nach Zang KD: Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet.* 93(3-4):207-20, 2001)

Zang et al. konnten 2001 erstmals die genetischen Veränderungen der Meningeome in einem Modell zusammenstellen (Abbildung 1.4).

Ein komplex aberranter Karyotyp, der mit einer malignen Progression einhergeht, weist bei männlichen Patienten eine höhere Inzidenz auf (Jääskeläinen et al., 1986b). So z.B. wurden bei männlichen Patienten zytogenetisch deutlich mehr Verluste aufgewiesen als ein lediglicher Verlust von 1p (Ketter et al., 2007a). Komplexe Karyotypen korrelieren mit einem aggressiven Wachstumsverhalten der Meningeome (Singer & Zang, 1970; Zang, 1982; Bello et al., 1994; Henn et al., 1995; Steudel et al., 1996; Perry et al., 1997; Müller et al., 1999; Perry et al., 1999; Louis et al., 2000; Ketter et al., 2001; Zang, 2001; Perry et al., 2004; Sayagués et al., 2004; Ketter et al., 2007a,b).

Wie sich das Meningeom in seinem Wachstum verhält hängt außer den genetischen Veränderungen von weiteren progressionsassoziierten Faktoren ab. So führen zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Hormone und deren Rezeptoren dazu, unter pathophysiologischen Bedingungen das Tumorwachstum zu beschleunigen.

1.4.2 Radiatio induzierte Meningeome (RIM)

Die Bestrahlung des Gehirns ist ein gut untersuchter Risikofaktor für eine Meningeomentstehung (Sanson & Cornu, 2000; Lamszus, 2004). Diese zeigt sich häufiger bei Grad II/ Grad III Tumoren, tritt multipel auf und weist eine höhere Proliferationsaktivität (Louis, 2000) auf. Paradoxerweise ist die Radiatio die derzeit einzig bewährte adjuvante Therapiemethode, die sich bei rezidivierenden, aggressiv wachsenden oder unvollständig entfernten Meningeomen bewährt hat (Perry et al, 2004). Genetische Studien haben gezeigt, dass das NF-Gen beim RIM seltener auftritt als beim sporadischen Meningeom (Shoshan et al., 2000; Joachim et al., 2001). Stattdessen häufen sich komplex strukturelle und numerische Chromosomen-Abnormität (Shoshan et al., 2000; Zattara-Cannoni et al., 2001). Verluste von 1p (Zattara-Cannoni et al., 2001) und insbesondere der Verlust von 7p (Rajcan-Separovic et al., 2003), das sonst beim Meningeom eher selten vertreten ist (Henn et al., 2003), sind beim RIM bekannt.

1.4.3 Hormoneller Einfluss

1.4.3.1 Steroidhormone

Frauen erkranken mehr als zweimal so häufig an einem Meningeom wie Männer (Louis et al., 2000; Sanson & Cornu, 2000). Die Tatsachen, dass sich das Tumorwachstum während der Schwangerschaft und Lutealphase des Menstruationszyklusses beschleunigt und die Meningeomentstehung bei Brustkrebspatienten etwas häufiger vorkommt, lässt auf eine Beteiligung eines Sexualhormons beim Tumorwachstum schließen (Lamszus, 2004). Um der Hypothese nachzugehen wurden mit Hilfe verschiedener Methoden unter anderem Östrogenrezeptoren, Progesteronrezeptoren und Androgenrezeptoren untersucht (Sanson & Cornu 2000).

Der Progesteronrezeptor entpuppte sich dabei als relevant, der in 80% bei Frauen und nur 40% bei Männern exprimiert wird (Carroll et al., 1993; Hsu et al., 1997). Im Vergleich zum Meningeom ist die Progesteronrezeptor-Expression in gesunden Meningen sehr niedrig, was charakteristisch für den Tumorstatus sein könnte (Carroll et al., 1993; Verhage et al., 1995). Beim Meningeomrezidiv zeigte sich sogar eine höhere Konzentration des Progesteronrezeptors als im Initialtumor (Schrell et al., 1996). Allerdings belegten Hsu et al. (1997), dass die Exprimierung bei benignen Meningeomen höher ist als bei anaplastischen. Außerdem

wurde in derselben Studie ein umgekehrtes Verhältnis zwischen Progesteronrezeptor-Expression und mitotischem Index des Meningeoms beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass die Expression des Progesteronrezeptors beim Wachstum benigner Meningeome involviert sein könnte, jedoch bei höhergradigen Meningeomen andere komplexe Faktoren verantwortlich sind (Sanson & Cornu, 2000).

1.4.3.2 Nicht-steroidale Hormone

Im Meningeom werden außer den Steroidhormonen andere Hormone exprimiert, unter anderem Somatostatin, Dopaminrezeptoren und Wachstumsfaktoren (Lamszus, 2004).

Meningeome exprimieren im Gegensatz zum gesunden Gewebe eine große Menge an Somatostatinrezeptoren. So kann eine Octreotid(ein Ligand am Somatostatinrezeptor)-Szintigraphie zur Diagnostik eines Meningeoms von Bedeutung sein (Barth et al., 1996). Ob Somatostatin eine Rolle im Tumorstadium übernimmt, bleibt jedoch fraglich (Sanson & Cornu, 2000), denn einer in vitro proliferationsstimulierenden Wirkung stehen Untersuchungen mit antiproliferativem Effekt gegenüber (Kunert-Radek et al., 1987; Koper et al., 1992).

Ob Dopamin und sein Rezeptor bei der Progression des Meningeoms mitwirken, wird in verschiedenen Studien diskutiert (Sanson & Cornu, 2000). In einer Untersuchung von Adams (1990) konnte mit Bromocriptin, einem Dopamin D2 Agonisten, eine Minderung des Zellwachstums erzielt werden. Jedoch gibt es noch unzureichende Daten um die Relevanz des Dopaminrezeptors zu bestimmen (Sanson & Cornu, 2000).

Die erhöhte Konzentration an VEGF (vascular endothelial growth factor) und seinem Rezeptor ist eng assoziiert mit der Meningeom-Vaskularisierung, dem peritumoralem Ödem und aggressivem Verhalten (Yoshioka et al., 1999; Yamasaki et al., 2000).

1.4.4 Telomerase

Die Dysregulation des Zellzyklusses geht mit einem unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen und Akkumulationen genetischer Veränderungen einher. Die Telomerase verlängert bei jeder Zellteilung die repetitiven DNA Sequenzen und kann somit die Chromosomenstabilität aufrecht erhalten. Dabei verliert das Enzym mit jeder Zellteilung ca.

100 Nukleotide. Im gesunden menschlichen Organismus sind aktive Telomerasen in embryonalen Stammzellen oder Keimzellen vorzufinden. Auch bei Neoplasien ist eine Reaktivierung dieser reversen Transkriptase nachweisbar. Beim Meningeom ist eine Telomeraseaktivität in 3-21% der Grad I, 58-92% der Grad II und geradezu 100% der Grad III Meningeome nachweisbar (Langford et al., 1997; Simon et al., 2000; Falchetti et al., 2002).

1.5 Rezidivverhalten und GPS (genetic progression score)

In der Literatur sind Fälle beschrieben, die nach 33 Jahren progressionsfreier Zeit ein Rezidiv entwickelten (Borovich & Doron, 1986). Auffällig hierbei war die Erscheinung in unmittelbarer Nähe zum Primärtumor. Um auszuschließen, dass verstreute kleine Herde an der Dura (Tendenz zum multizentrischen Wachstum; Simpson, 1957) ein Rezidiv simulieren können, sollte eine großzügige weite Duraresektion nach Borowich erfolgen. Außer des multizentrischen Wachstums erschwert die lange Latenzphase bis zum Rezidiv die Diagnose eines Meningeomrezidivs. Wie in Tabelle 1.1 beschrieben, ist das rezidierende Wachstum eines Meningeoms abhängig von der Vollständigkeit der Tumorresektion (Zülch, 1979; Mirimanoff et al., 1985). In ca. 13% der Fälle bei vollständiger und 85% bei unvollständiger Entfernung des Meningeoms ist mit einem Rezidiv zu rechnen. Jääskeläinen (1986a) zufolge stellen Koagulationen an der Dura-Ansatzstelle, Infiltration des Knochens und weiche Konsistenz des Tumorgewebes ein beachtliches Risiko dar.

Dass Rezidive in bestimmten Lokalisationen bevorzugt auftreten, ist bekannt. So ist der Anteil der Rezidive der Konvexität am höchsten, was auch der bevorzugten Lokalisation der höhergradigen Tumore entspricht (Zankl & Zang, 1980; Ketter et al., 2008). Bei malignen Formen sowie den multiplen Meningeomen erhöht sich die Rezidivhäufigkeit.

Nach der Einteilung der WHO-Klassifikation zeigen Grad III Meningeome ein verkürztes Intervall bis zum Rezidiv. Allerdings ist das bei Grad II und Grad I Meningeomen nicht der Fall (Ketter et al., 2007a). Bei den atypischen- und anaplastischen Meningeomen steigt die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit zu jeweils 29-40% und 50-78%. Die progressionsfreie Zeit betrifft bei den benignen Meningeomen 7,5 Jahre, bei den atypischen 2,4 und bei den anaplastischen 3,5 Jahre (Haltia et al., 1986; Maier et al., 1992).

Das Muster der chromosomalen Instabilität und die Tatsache, dass anhand des WHO-Grades eine nur bedingte Vorhersage eines Rezidivverhaltens gelingt, brachte 2007 eine mathematische Vorhergehensweise, den GPS (genetic progression score), hervor (Ketter et al.). Es basiert auf einem onkogenetischen Baum-Diagramm (Beerenwinkel et al., 2005), dem wiederum das von Desper et al. (1999) vorgestellte onkogenetische Baum-Diagramm als Vorlage diente. Der GPS wurde anhand der zytogenetischen Entwicklung in Bezug auf die Akkumulation chromosomaler Veränderungen von 661 Meningeom-Patienten entwickelt. Es schätzt den genetischen Status eines Tumors als Progression in den korrespondierenden Tumorzellen in dem Modell ein. In anderen Worten: Jeder Tumor wird repräsentiert durch die genetischen Veränderungen, die in ihm stattgefunden haben.

Die entscheidenden zwei Ereignisse im onkogenetischen Baum-Diagramm sind der Verlust von einem Chromosom 22 und anschließender Verlust von 1p. Diese Schritte entsprechen einem GPS von jeweils 1,88 und 6,39 (Ketter et al., 2007a). Auf diese GPS-Werte bezogen werden drei Gruppen gebildet:

- GPS-Gruppe 0: $0 \leq \text{GPS} < 1,88$
- GPS-Gruppe 1: $1,88 \leq \text{GPS} < 6,39$
- GPS-Gruppe 2: $6,39 < \text{GPS}$

Während in Gruppe 0 die Monosomie 22 kein typisches Merkmal darstellt, sind in Gruppe 1 Verluste von Chromosom 22 charakteristisch. Die GPS-Gruppe 2 geht sowohl mit einer Monosomie 22 als auch mit einer 1p Deletion einher und ist assoziiert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an Rezidivbildung.

Ein hoher GPS korreliert mit einer frühen Rezidivierung, die Lokalisation, WHO-Grad und das Rezidivverhalten mit einbezogen. Anhand des GPS kann der mögliche Rezidivierungszeitraum präziser eingeschätzt werden als die herkömmlichen Prognosemarker, die lediglich auf einzelnen Chromosomenaberrationen beruhen (Ketter et al., 2007a).

1.6 Fragestellung

Bekannt ist, dass die Monosomie des Chromosoms 22 und ein Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 die zytogenetischen Charakteristika beim Meningeom sind. Diese Deletionen kommen bevorzugt bei höhergradigen Meningeomen vor (Müller et al., 1999) und korrelieren mit einem höheren Rezidivrisiko (Steudel, 1996) und schlechteren Prognosen (Ketter et al., 2001) als niedergradige Meningeome.

Desweiteren sind besonders bei Meningeomen höheren Grades die Chromosomenverluste 14 und 18 bekannt. Die für das Glioblastom typischen Deletionen von Chromosom 7 und 10 sind ebenfalls in geringerer Häufigkeit beim Meningeom anzutreffen. Diese Verluste korrelieren mit einem höheren Malignitätsgrad. Insbesondere wird Chromosom 14 in einigen Studien als prognostischer Marker dargestellt.

Mit Hilfe der FISH-Methode sollen im Folgenden Meningeomrezidive und Primärtumore auf Deletionen von Chromosomen 7 und 10 analysiert werden. Ebenfalls sollen Primärtumoren und eine Subpopulation aus Meningeomrezidiven auf Chromosomenaberrationen von 14 und 18 untersucht werden.

Die mit der FISH-Technik untersuchten Chromosomenaberrationen der Meningeomrezidive sollen mit dem GPS verglichen werden, um eine Korrelation zwischen hohen GPS-Werten und der Tumormalignität nachzuweisen.

Die Gegenüberstellung von Chromosomenaberrationen der Meningeomrezidive und deren Primärtumoren könnte die Frage klären, ob es sich bei der Tumorprogression in eine maligne Form mit Rezidivbildung um einen schrittweisen Prozess handelt oder ob sich komplexe genetische Veränderungen bereits im Frühstadium des Meningeoms entwickeln (Al-Mefty et al., 2004). Somit könnte unabhängig vom WHO-Grad anhand des GPS eine präzise Aussage über das Rezidiv-Potential der Meningeome gestellt werden, wobei gleichzeitig gezeigt würde, dass der GPS einen unabhängigen Progressionsprädiktor darstellt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumoren

Ziel dieser Arbeit ist es, Meningeomrezidive und Initialtumoren auf Chromosomenaberrationen zu untersuchen. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. R. Ketter, Leiter der Tumorbank der Abteilung für Neurochirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes, konnten die experimentellen Untersuchungen am Tumorgewebe stattfinden. Die Tumorbank umfasst ein Kollektiv aus sorgfältig dokumentiertem Resektionsmaterial des Nervensystems. Dazu wird eine Gewebeprobe vom operierten Tumormaterial entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. So kann verhindert werden, dass sich im Tumorgewebe Eiskristalle bilden und somit in seiner Morphologie beeinträchtigt wird. Die Gewebeproben werden unter Führung einer Dokumentenliste bei -80°C gelagert. Die Diagnosestellung und histopathologischen Untersuchungen der Gewebeproben werden unter der Leitung von Prof. Dr. W. Feiden in der Neuropathologie der Universitätsklinik des Saarlandes durchgeführt.

Das Patientenkollektiv im Rahmen dieser Arbeit reicht von einer Zeitspanne von 1997 bis 2007. Insgesamt wurden 66 Meningeome (12 Primärtumoren und 54 Meningeomrezidive) zur FISH-Analyse eingesetzt, darunter sind vier Patienten die wegen Rezidive mehrmals in dieser Arbeit vertreten sind. In Zusammenarbeit mit Diplombiologin Fr. Pöhler, konnte eine Tabelle erstellt werden, in dem der WHO-Grad, Alter und Geschlecht, sowie Lokalisation und Anzahl des Rezidivs zu erkennen sind (Tabelle 2.1). Zum Schutz der Patientendaten wurden jeder Gewebeprobe Op-Nummern und sog. Tumornummern zugeteilt. Ausschließlich mit diesen Kennzeichnungen soll in dieser Arbeit desweiteren erläutert werden. Vier Patienten sind aufgrund wiederholten Rezidivbildungen mehrmals in dieser Tabelle eingetragen. Die Fälle sind mit hochgestellten Buchstaben markiert. Hinsichtlich der Lokalisation und WHO-Grad blieben die darauffolgenden Rezidive unverändert. Bei Errechnung des Durchschnittsalters wurde der Zeitpunkt des erstmals aufgetretenen Rezidivs gewählt.

Tabelle 2.1: Patientendaten und Tumorparameter der untersuchten Meningeomrezidive.

Op- Nummer	T-Nummer	Geschlecht/ Alter	WHO-Grad	Rezidiv	Lokalisation
82/97	4719	w/70	I	2.Rezidiv	Spinal
99/97	4720	m/38	III	2. Rezidiv	Olfaktorius
395/97	4782	w/69	I	1. Rezidiv	Spinal
709/97	4782	m/49	III	4. Rezidiv	Spinal
1755/97	4870	m/38	III	1.Rezidiv	Keilbeinflügel
1857/97	4883	w/42	III	1. Rezidiv	?
115/98	4926	m/61	II	1.Rezidiv	Keilbeinflügel
192/98	4938	w/75	II	1.Rezidiv	Konvexität
625/98	4982	m/70	III	1.Rezidiv	Parasagital
790/98	4999	w/68	II	1.Rezidiv	Konvexität
1013/98	5021	m/70	II	1.Rezidiv	Konvexität
1284/98	5050	m/59	II	1.Rezidiv	Parasagital
1612/98	5607	m/62	III	5.Rezidiv	Olfaktorius
588/99	5168	w/68	II	1.Rezidiv	hintere Schädelgrube
1320/99	5227	m/64	II	1.Rezidiv	Parasagital
1851/99	5282	m/54	I	1.Rezidiv	Keilbeinflügel
2004/00	5504	w/64	III	1.Rezidiv	Konvexität
618/01 ^a	5568	w/32	II	1.Rezidiv	Spinal
655/01	5571	w/28	II	1.Rezidiv	Tentorium
687/01	5576	m/39	II	1.Rezidiv	Konvexität
1342/01	5633	w/61	III	1.Rezidiv	Tentorium
1648/01	5660	w/54	II	2.Rezidiv	Spinal
1936/01	5694	w/71	I	2.Rezidiv	Keilbeinflügel
32/02	5726 I-V	w/35	II	2.Rezidiv	hintere Schädelgrube
51/02	5730	w/63	I	1Rezidiv	Konvexität
67/02	5733	w/69	II	2.Rezidiv	Parasagital
77/02	5737	m/46	III	1.Rezidiv	Parasagital
570/02	5788	w/74	II	1.Rezidiv	Olfaktorius
1240/02 ^b	5849	w/59	II	2.Rezidiv	Tentorium

1421/02	5864	m/69	II	1.Rezidiv	Falx
1640/02	5884	m/57	I	3.Rezidiv	Konvexität
1765/02	5894	m/64	I	1.Rezidiv	Konvexität
1916/02 ^c	5910	m/56	II	3.Rezidiv	Olfaktorius
798/03	6000	w/70	III	1.Rezidiv	Tentorium
1248/03 ^c	6037	m/57	II	4.Rezidiv	Olfaktorius
169/04	6098	w/64	III	5.Rezidiv	Konvexität
906/04 ^a	6155	w/35	II	3.Rezidiv	Spinal
1027/04	6170	w/44	I	3.Rezidiv	Tuberculum sellae
1092/04 ^d	6176	w/52	III	2.Rezidiv	Parasagittal
1237/04	6192	w/80	II	1.Rezidiv	Konvexität
1653/04	6209	m/63	II	1.Rezidiv	Keilbeinflügel
1671/04 ^b	6210	w/61	II	3.Rezidiv	Tentorium
1767/04	6215	w/63	I	1.Rezidiv	Konvexität
91/05	6248	w/40	I	1.Rezidiv	hintere Schädelgrube
168/05 ^c	6256	m/58	II	5.Rezidiv	Olfaktorius
1440/05 ^b	6339	w/62	II	4.Rezidiv	Tentorium
1575/05	6351	w/19	II	1.Rezidiv	Olfaktorius
141/06	6402	w/65	I	1.Rezidiv	Keilbeinflügel
297/06	6416	w/81	II	1.Rezidiv	Keilbeinflügel
1168/06 ^b	6471	w/63	II	5.Rezidiv	Tentorium
1599/06 ^d	6493	w/55	III	3.Rezidiv	Parasagittal
295/07	6522	m/66	I	1.Rezidiv	Tentorium
961/07	6553	m/71	II	1.Rezidiv	Konvexität
1014/07	6555	w/57	II	1.Rezidiv	Konvexität

Zusätzlich sind in dieser Tabelle einige Patienten vertreten, deren Initialtumoren (Primärtumoren) ebenfalls an dem Uniklinikum des Saarlandes in der Neurochirurgie reseziert worden sind. 12 Fälle an Primärtumoren wurden aus der Tumorbank der Neurochirurgie entnommen und in diese Dissertationsarbeit miteinbezogen. Tabelle 2.2 zeigt die zusätzlich untersuchten Primärtumoren und die daraufgefolgten Rezidive aus Tabelle 2.1.

Tabelle 2.2 : Op- Nummern der zusätzlich untersuchten Primärtumore

Primärtumor	Rezidiv, aus Tabelle 2.1
1407/97	1014/07
1534/97	1767/04
587/99	570/02
1072/99	32/02
379/01	1342/01
43/02	1575/05
232/02	798/03
828/02	91/05
244/05	295/07
T5340	655/01
1800/97	/
687/01	/

2.1.2 Vergleichsmaterial

Die Sonden, die für die FISH zum Einsatz kamen, mussten auf ihre Spezifität und Sondenqualität überprüft werden. Dazu wurden Versuche an Metaphasechromosomen und Interphasekernen von gesunden humanen Blutlymphozyten durchgeführt. Die Präparation der Lymphozyten wird in Kapitel 2.2.1 näher besprochen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Herstellung von Präparaten (Präparation von Metaphasenchromosomen)

Für das sterile Vorgehen diente eine Werkbank (LaminAir HB244K, Heraeus), die hauptsächlich der Zellkulturarbeiten gewidmet ist. Um die Spezifität der DNA-Sonden zu kontrollieren, wurden Blutlymphozyten präpariert. Hierzu werden gesunde männliche Probanden um eine Blutentnahme gebeten. Steril entnommenes venöse Blut wurde heparinisiert und möglichst schnell zu einer Kurzzeitkultur angesetzt.

2.2.1.1 Anlegen einer Blutkultur und Lymphozytenpräparation

Das heparinisierte Vollblut wurde zu 0,8ml in 8ml PB Max pipettiert und für 69 Stunden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5%igem CO₂ in einen Brutschrank inkubiert. Die Kulturen wurden mehrmals am Tag durch leichtes Umschwenken resuspendiert.

Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde der Blutkultur 0,001% Colcemid hinzugefügt und für weitere zwei Stunden inkubiert. Das Colcemid ist ein synthetisch hergestelltes Spindelgift, das die Chromosomen kondensiert und somit für das Auge sichtbar macht.

Die nächsten Schritte dienen dazu, Leukozytenpellet zu gewinnen und die Zellen zu fixieren. Als Vorbereitung galt es das Kaliumchlorid (KCl) auf 37°C aufzuwärmen und Fixanslösung bei -20°C kalt zustellen.

Die Blutkultur wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000rpm 8min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet resuspendiert und mit 2ml 0,52% (0,0375M) KCl einer Hypotoniebehandlung unterzogen. Diese macht es möglich gezielt Lymphozyten zu isolieren, denn die Granulozyten und die kernlosen Erythrozyten platzen durch den Effekt der Osmose komplett. Die Wirkung wird verstärkt indem das Kaliumchlorid auf 37°C erwärmt wird. Abhängig von Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur variierte die Hypotoniezeit zwischen 8-9 Minuten.

Durch Zentrifugieren wurde dieser Vorgang unterbrochen und der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet wurde resuspendiert und mit einer Fixanslösung (Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1) aufgefüllt. Die Chromosomen konnten nach 60 Minuten Inkubation bei -20°C auf die Objektträger getropft werden.

Beim Tropfen der Lymphozyten auf den Objektträger galt es, die Luftfeuchtigkeit bei 42% konstant zu halten. Um die Lymphozyten beim Tropfen zum Platzen zu bringen war es erforderlich, eine möglichst große Distanz zwischen Objektträger und Pipette herzustellen. Nach einer Trockenstellung von 3 bis 4 Tagen bei Raumtemperatur waren die Objektträger für die Versuche gerichtet.

2.2.2 Anfertigen von Gewebeschnitten

2.2.2.1 Silanisieren der Objektträger

Die Kryoschnitte werden auf Glasobjektträgern aufgezogen. Es besteht die Gefahr, dass die Schnitte während der FISH-Hybridisierung abschwimmen könnten. Deshalb wurden die Objektträger vorerst einer Haftbeschichtung unterzogen.

Durchführung

Es wurden saubere fettfreie Objektträger für 10min in 10% Tri-ethoxy-silyl-propylaminlösung (Merck; 20ml in 180ml 100% Aceton) gegeben. Nach Ablauf der Zeit folgte der Spülgang mit je 3mal Aceton und Aquadest, der Silan sollte auf den Objektträgern keine Schlieren hinterlassen. Anschließend wurden die Objektträger trocken geschüttelt und bei 50°C über Nacht in einen Trockenschrank gestellt.

2.2.2.2 Herstellung der Kryostatschnitte

Im Prinzip gleicht die Herstellung der Tumorpräparate die der Schnellschnittdiagnostik in der Pathologie. Eine schockgefrorene Schnittscheibe wird mit einem Gefriermikrotom geschnitten und auf einen Glasobjektträger gezogen. Das Schneiden erfolgt in einem Kryostat, bestehend aus einer Kältekammer, in der sich das Mikrotom befindet. Das Kryostat macht man sich zu nutze, damit die Gewebeproben während der Verarbeitung nicht auftauen und somit in ihrer Morphologie beeinträchtigt werden.

Durchführung

Die größte Aufmerksamkeit galt dem, den Prozess des Auftauens des Tumormaterials möglichst zu vermeiden. Deshalb musste zunächst vergewissert werden, ob das Kryostat auf die gewünschte Temperatur (-25°C) eingestellt ist. Das Patientenmaterial wurde ausschließlich in flüssigem Stickstoff transportiert und kaum der Raumtemperatur ausgesetzt.

Der Tumor wurde mit Einbettmedium (Tissue Freezing, Leica) auf einen Objekthalter fixiert und direkt in die Kryokammer gesetzt. Erst nachdem durch die Kammertemperatur (-25°C) das Einbettmedium vollständig immobilisiert war, konnte der Schneidevorgang beginnen. Es wurden jeweils Schnitte von 3µm, 6µm und 10µm Dicke angefertigt und auf die vorbehandelten Glasobjektträger aufgezogen. Dabei wurde berücksichtigt, dass nach jedem Gewebeschnitt ein Leerschnitt folgte, der verworfen wurde. Über die bearbeiteten Tumoren wurde nach verschiedenen Kategorien Protokoll geführt, so z.B. :

- Größe
- Homogenität
- morphologische Besonderheiten
- Anzahl angefertigter Schnitte

2.2.2.3 Fixierung der Gewebeschnitte

Anschließend mussten die aufgezogenen Tumorschnitte an die Objektträger fixiert werden. Die Objektträger wurden im gefrorenen Zustand für 10min in eine eiskalte 4% PFA/PBS Lösung gestellt. Danach wurden sie in PBS-Puffer je 5min zweimal wiederholt eingetaucht und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Das Trocknen erfolgte staubfrei bei Raumtemperatur über Nacht. Die so hergestellten Gewebsschnitte wurden fortan bei -80°C gelagert.

2.2.3 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Die in situ-Hybridisierung besteht aus 4 Komponenten: Denaturierung der Sonden- und Ziel-DNA, Blockierung repetitiver Sequenzen, Hybridisierung und Stringenzwaschung. Das Prinzip der FISH ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

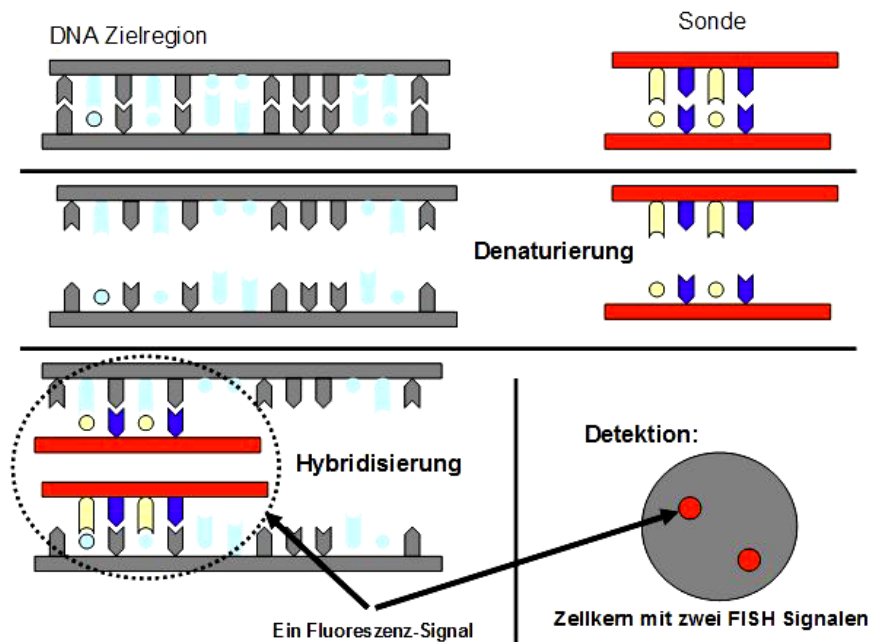


Abbildung 2.1: Das Prinzip der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung. Mit freundlicher Genehmigung von Patrick Schiebel (ehem. AG Neuroonkologie)

Die FISH ist eine molekularzytogenetische Technik, die es ermöglicht spezifische Nukleinsäuren wie RNA oder DNA in fixierten Zellen, subzellulären Komponenten oder Gewebepräparate nachzuweisen. Eine künstlich hergestellte Sonde wird anhand komplementärer Baasenpaarung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure hybridisiert, größtenteils an Gewebeschnitten, isolierten Zellkernen oder Chromosomen aus Metaphasezellen. Die Sonden bestehen meist aus DNA, da diese mehr Stabilität als RNA-Sonden aufweist und somit die Praxis erleichtert sowie leichter zu amplifizieren ist.

Bei der Hybridisierung erfolgt die Detektion der zu untersuchenden DNA oder RNA über sequenzspezifische Anlagerung von komplementären Nukleinsäure-Sonden. Die US-amerikanischen Biologen Mary Lou Pardue und Joe Gall führten Ende der 1960 in situ-Hybridisierungen durch und fanden heraus, dass sowohl reine Hybride wie DNA-DNA, als auch gemischte Hybride aus DNA-RNA möglich sind. Zuerst muss die DNA, die als Doppelstrang vorliegt, getrennt werden. Dies erfolgt durch Hitzezufuhr, die über den Schmelzpunkt der DNA-Doppelhelices liegt. Lässt man die Temperatur langsam wieder fallen führt dies zu einer Renaturierung, die Nukleinsäurestränge werden komplementär neu gebunden. Die Detektion kann sich je nach Art der nachzuweisenden Targetsequenz einer

indirekten oder direkten Methodik bedienen. Wenn die Zielregion der Hybridisierung genügend groß ist, wird eine direkt markierte Sonde eingesetzt. Diese weist eine hohe Spezifität auf. Bei der indirekten Methode sind die Signale besser auffindbar.

Mit Hilfe der FISH können Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden, die Auflösung ist wesentlich besser als bei der konventionellen Zytogenetik.

2.2.3.1 DNA-Markierung

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden für die Chromosomen 7 und 10 beruhen auf dem Prinzip der indirekten Markierung: Man nutzt spezifische Wechselwirkungen zwischen einem modifizierten Nukleotid und der Detektionseinheit, an der die signalgebende Reportergruppe gekoppelt ist. An Uridin werden über einen Spacer, der aus Kohlenstoffatomen besteht, das Biotin bzw. Digoxigenin gebunden.

Angewandt wurde das Biotinsystem mit seinem Bindeprotein Streptavidin und das Digoxigeninsystem mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper.

Das Biotin-System

Biotin, auch bekannt als Vitamin H ist ein wasserlösliches Vitamin, zusammengesetzt aus Harnstoff und einem substituierten Thiophanring. Es ist als Coenzym an vielen Carboxylierungsreaktionen beteiligt, so z.B für die Acetyl-CoA-Carboxylase (Fettsäurebiosynthese) und Pyruvat-Carboxylase (Citratzyklus). Avidin, das im Eiklar vorkommt, kann spezifisch an Biotin binden und kann durch übermäßigen Verzehr von rohem Eiweiß zu Biotinmangelerscheinungen führen. Außer Avidin kann aus *Streptomyces avidinii*-Bakterien das Streptavidin gewonnen werden, das ebenfalls mit Biotin durch vier hochaffine Bindungsstellen binden kann. Verwendet wurde das Biotin-Streptavidin-Bindungssystem. Zur Detektion wird dem Streptavidin eine fluoreszierende Reportergruppe angekoppelt, die Durchführung wird in Abschnitt 2.2.3.3 erläutert.

Das Digoxigenin-System

Digoxigenin wird aus den Blättern von *Digitalis lanata* oder *Digitalis purpurea* gewonnen. Das System basiert auf der Interaktion zwischen Digoxigenin und dem Anti-Digoxigenin-Antikörper. Da Digoxigenin ausschließlich in den oben genannten Pflanzen vorkommt sind die Antikörper hochspezifisch und erkennen DNA in Subpikogrammmengen. Die DIG-spezifischen Antikörper werden von sekundären Antikörpern, die den Fc-Teil erkennen detektiert. An diesen sekundären Antikörpern sind die Reportergruppen gekoppelt.

Zur Markierung der DNA wurde die Technik der Nick-Translation (Rigby, 1977) angewandt. Sie erlaubt es, relativ einfach die Länge der DNA-Fragmente einzustellen. Sind die Fragmente zu lang, können sie an der Oberfläche des Chromosoms hängen bleiben. Geraten sie hingegen zu kurz, kann eine unspezifische Bindung an die Ziel-DNA erfolgen. Für die in situ-Hybridisierung hat sich eine Länge von 200 bis 500bp als effektiv erwiesen (Moench et al., 1985).

Für die Durchführung der DNA-Markierung kommen zwei Enzyme zum Einsatz, die DNase I und DNA-Polymerase I. Die DNase I zerlegt die DNA in Einzelstrangbrüche (Nicks). Die DNA-Polymerase I besitzt sowohl Polymeraseaktivität als auch 5'→3'- und 3'→5'-Exonukleaseaktivität und dient ursprünglich als „Reparaturenzym“ im Organismus. Gleichzeitig werden in 5'→3'Richtung einzelne Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) entfernt und neu eingebaut. Gibt man hier die modifizierten Nucleotide Biotin-16-dUTP und Digoxigenin-11-dUTP hinzu, können diese in den Strang mit eingefügt werden. So konnten die DNA für das Chromosom 7 mit Biotin und Chromosom 10 mit Digoxigenin markiert werden.

Für die Herstellung des Ansatzes standen jeweils ein Biotin-Nick-Translations-Mix (BIO-Nick) und ein Digoxin-Nick-Translations-Mix (DIG-Nick) zur Verfügung.

Durchführung

Als Reaktionsansatz wurden 5µl Chromosom 7-DNA und 4µl Chromosom 10-DNA jeweils mit 4µl Biotin-Nick bzw. DIG-Nick zusammenpipettiert und mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) auf 20µl aufgefüllt. Es folgt eine Inkubation im Wasserbad bei 15°C für 90min. Je 2µl 3M Natriumacetat und 50µl Ethanol (96%) wurden hinzupipettiert und bei -20°C für 2 Stunden wurde die DNA zum Ausfällen gebracht. Um DNA-Pellet zu gewinnen wurden beide

Röhrchen anschließend bei 4°C für 30min zentrifugiert. So konnte der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet werden. Nachdem weitere 50µl Aqua dest. für Chromosom 7-DNA und 40µl für Chromosom 10-DNA hinzugegeben, lagerte man die Sonden-DNAs bei -20°C.

2.2.3.2 Dot-Blot (Timmons & Dunbar, 1990)

1975 wurde von Edwin Southern das Blotten von DNA eingeführt. Das Dot-Blotting ist eine Methode um die Effizienz der Markierungsreaktion zu überprüfen. Als Detektionseinheit wird das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) mit den Substraten 5-Brom-4-chlor-3-indolphosphat (BCIP) und Nitrotetrazoliumblau (NBT) mit der markierten DNA in Reaktion gebracht. Es entsteht eine Farbreaktion die kolorimetrisch ausgemessen wird. Den Namen erhält die Technik wegen der punktförmigen Auftragung der DNA auf eine Nitrozellulosemembran.

Es wird eine Verdünnungsreihe der Sonden-DNA hergestellt und auf die Membran gebracht. Um unspezifische Bindungen auf der Membranoberfläche zu vermeiden bedeckt man sie mit Milchproteinen als Blocking-Reagenz. Verschieden konjugierte Alkalische Phosphatase (mit Streptavidin für den Biotinnachweis und mit Antidigoxygenin für den Digoxigeninnachweis) wird mit der Membran in Verbindung gebracht, um spezifische Bindungen mit den markierten Nukleotiden zu erzeugen. Nach Entfernung der Alkalischen Phosphatase kann nun mit BCIP und NBT eine Farbreaktion ausgelöst und gewertet werden. Abbildung 2.2 zeigt die Darstellung der chemischen Reaktion.

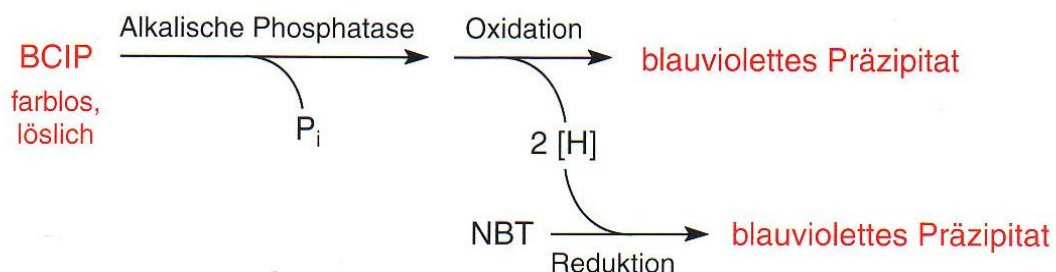


Abbildung 2.2: Farbreaktion der Dot-Blot Detektion

Diese gekoppelte Redoxreaktion führt zu tief blauvioletten Präzipitaten. Die Farbreaktion ist proportional zur Konzentration an markierter Substanz und somit kolorimetrisch ausmessbar.

Durchführung

Mit einer Eppendorf-Pipette wurden sechs Aliquots von 9µl einer 6xSSC Lösung auf einen Parafinstreifen gebracht. Auf das erste Aliquot kam 1µl der Sonden-DNA hinzu und wurde resuspendiert. Aus diesem Tropfen wurde wiederum 1µl entnommen und in das zweite Aliquot pipettiert. Diese Schritte wiederholten sich bis zum sechsten Aliquot.

Aus den sechs Tropfen wurden je 2µl entnommen und in abnehmender Konzentration auf eine Nitrozellulosemembran gebracht.

Tabelle 2.3: Verdünnungsreihe der Sonden-DNA für Chromosomen 7 und 10

Verdünnungsstufe (1:10)	Konzentration	Menge an DNA auf Membran
1	200ng/µl	400ng
2	20ng/µl	40ng
3	2ng/µl	4ng
4	200pg/µl	400pg
5	20pg/µl	40pg
6	2pg/µl	4pg

Nach dem Trocknen wurde die Membran mit 1,2J UV-Licht bestrahlt (Cross-Link).

In der Zwischenzeit konnte eine 1%ige Milchpulverlösung als Blocking-Reagenz angefertigt werden, in der anschließend die Nitrozellulosemembran 30min vollständig bedeckt leicht geschüttelt wurde. Es folgten zwei Waschschrte mit TN-Puffer und eine 30 minütige Inkubation in 3ml Puffer mit je 3µl Streptavidin-AP und Anti-DIG-AP. Die Membran wurde abermals zweimal mit TN-Puffer gespült und 10min in einem Dot-Puffer geschwenkt.

Für die Farbreaktion galt es zum eigenen Schutz mit Handschuhen zu arbeiten und wegen der stark lichtempfindlichen Substanzen die Inkubationen in der Dunkelkammer zu gestalten.

In 5,7ml Dot-Puffer wurden 33µl NBT und 25µl BCIP pipettiert, darin gelagert wurde die Membran mindestens 30 min geschwenkt. Die Reaktion konnte mit 70% Ethanol gestoppt werden. Die Dots sollten bei einer optimalen Markierung bis zu einer DNA-Menge von 1-10pg sichtbar sein, d.h. in diesem Fall auf allen sechs Punkten.

2.2.3.3 FISH an Chromosomen 7 und 10

Vorbehandlung

Die Vorbehandlung dient dazu, die Kernmembran für die Sonden-DNA „aufzuräumen“ und zugänglicher zu machen. Mit Hilfe der RNase wird RNA entfernt, die im Aufbau ihrer Sequenz die der Ziel-DNA ähneln könnte. Um die Kernmembran in ihrer Permeabilität zu erhöhen, kommen die Proteasen Pepsin oder Proteinase K zum Einsatz. Pepsin hat ein pH-Optimum von 2,0 und wurde zur Vorbehandlung der Lymphozyten (Vergleichsmaterial) verwendet. Für die Untersuchungen an Meningeomrezidiven bzw. an ihren Primärtumoren wurde wegen der höheren Aggressivität die Proteinase K bevorzugt. Die Verdauzeit mit den Enzymen hatte großen Einfluss auf die folgenden Versuchsschritte, denn eine zu lange Einwirkzeit verursachte wegen der überschüssigen Proteinspaltung die Zerstörung der Membran und somit den Verlust an DNA. Die folgende Durchführung beschreibt die Vorbehandlung am Tumorgewebe, beim Vergleichsmaterial wurde statt Proteinase K das Pepsin angewandt. Folgende Lösungen wurden speziell für diesen Schritt angesetzt:

RNase: RNase-Stammlösung 1:100 in 2xSSC

Proteinase K-Stammlösung:

- 20mg Proteinase K (Merck)
- 50µl Tris-Base, pH 7,6
- 100µl EDTA, pH 8
- 850µl Aqua dest.

Nach 2h Inkubation bei 37°C wurden Aliquots von 100µl abgefüllt und bei -20°C gelagert

Reaktionspuffer für Proteinase K- Verdau (100ml) :

- 5ml Tris-Base, pH 7,6
- 10ml EDTA, pH 8
- 85ml Aqua dest.
- 100µl Proteinase K

Durchführung

Die Objektträger wurden kurz in 2xSSC bei Raumtemperatur getaucht. In einer feuchten Kammer wurde dem Gewebe 100µl einer RNase hinzu pipettiert und bei 37°C für 20min inkubiert. Nach dem RNase-Verdau wurden die Objektträger je 5min in 2xSSC dreimal in Folge gewaschen und anschließend im Wasserbad bei 55°C für 1min mit dem Proteinase K-Reaktionspuffer behandelt. Danach folgte ein Waschgang mit PBS-Puffer bei Raumtemperatur um dann das Gewebe im eiskalten 4% PFA/PBS nachzufixieren. Das Fixans wurde mit PBS-Puffer und Aqua dest. je 5 min bei Raumtemperatur abgespült. Die Objektträger wurden darauf für 10min in 2xSSC im 70°C Wasserbad gestellt. Dieser Vorgang dient der besseren Disaggregation des Tumorgewebes. Zuletzt folgte eine Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70- 80- 99%, Ethanol) und das Trocknen bei Raumtemperatur.

Hybridisierung

Die Hybridisierung macht sich die komplementäre Bindung der Basenpaare der DNA zu nutze. Adenin (A) und Thymin (T) sind mit zwei, Guanin (G) und Cytosin (C) mit drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. 1961 haben J. Marmur und P. Doty herausgefunden, dass die DNA in ihre Einzelstränge zerlegt werden kann indem man sie über ihren Schmelzpunkt hinaus erhitzt (Denaturierung). Die Einzelstränge fügten sich durch die komplementären Basenpaare wieder zusammen, wenn die Temperatur langsam abnimmt.

Der Schmelzpunkt T_m bestimmt die die Stabilität des Hybridkomplexes. Er ist definiert als die Temperatur, bei dem 50% der Hybride dissoziieren.

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \log (\text{mol Na/l}) + 0,41 (\%G+C) - (\% \text{Formamid})$$

Die Schmelztemperatur hängt ab von der Konzentration der einwertigen Kationen (Na^+ im SSC) im Puffer und Formamid, Stranglänge für die Sonden-DNA und Anteil an CG-Paaren.

Die Stringenz bestimmt die spezifische Wasserstoffbrückenbildung zwischen den komplementären Basenpaaren. Je höher die Stringenz, desto geringer die Wahrscheinlichkeit, dass sich Basenfehlpaarungen bilden. Sie wird beeinflusst durch Ionenstärke, Konzentration an Formamid und Temperatur. Das positive Na^+ und negativ geladene Phosphat an Helix dienen zum Erhalt der Stabilität, während das Formamid die Bildung der Wasserstoffbrücken verhindert und somit den DNA-Doppelstrang destabilisiert. Eine hohe Temperatur lässt nur exakte Basenpaarbindungen übrig, je niedriger die Temperatur, desto höher steigt der Anteil

an instabilen Hybridkomplexen mit ungepaarten Basen. Die Denaturierung erfolgt oberhalb von T_m , erhitzt man die Ziel DNA im Tumorgewebe bei 95-100°C könnte die Morphologie der Präparate verändert werden. Das Formamid erniedrigt die Schmelztemperatur. Da der Anteil an CG und Stranglänge der Sonden festliegen, bleiben die Konzentration an Formamid und SSC als variable Parameter.

In der Sondenkombination für Chromosomen 7 und 10 wurde nach Testung für diese Arbeit die Formamidkonzentration bei 60% festgelegt.

Ein Hybridisierungsmix wurde angesetzt, bestehend aus 60% Formamid und 20ng markierter Sonden-DNA.

Ansatz eines Hybridisierungsmix für 10 μ l :

- 6 μ l Formamid,deionisiert
- 1 μ l 20xSSC
- 1,5 μ l Chromosom 7- DNA
- 1,5 μ l Chromosom 10- DNA

Durchführung

Auf die luftgetrockneten Objektträger wurden je 10 μ l Hyb-Mix aufgetragen und mit einem Deckgläschen (20x20mm) abgedeckt. Mit Fixogum wurden die Ränder des Deckgläschens luftdicht verschlossen. Nachdem das Fixogum getrocknet war, wurde die Denaturierung für 10min bei 80°C auf einer Heizplatte durchgeführt. Die Hybridisierung fand in einer feuchten Kammer statt, bei 37°C für zwei Nächte.

Stringenzwaschung und Detektion

Bei der indirekten Makierung ist noch der Prozess der Fluoreszenzkopplung benötigt. Die wie in Abschnitt 3.2.3.1 in die Sonden-DNA eingebauten Haptene Biotin und Digoxigenin werden mit ihren Affinitätsgruppen inkubiert, an denen die Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind (Genauerer zum Biotin- und Digoxigeninsystem, siehe Abschnitt 2.2.3.1). Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und Anti-DIG-Cy3 (Carbocyanin 3). Zur Verstärkung der Signale wurden sekundäre Antikörper mit fluoreszierenden Gruppen eingesetzt. Der Vorteil daran ist, dass mehrere sekundären- an einen primären Antikörper binden und somit zur Verstärkung des Signals führen können. Vor den Detektionsschritten

wurden unspezifische Bindungsloci mit BSA (Bovine serum albumin) blockiert. Die Stringenzwaschung mit Triton X-100 dient zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Signale. Der Detektionsprozess wurde in der Dunkelkammer ausgeführt um das Ausbleichen der Signale zu verhindern.

Durchführung

Mit einer Pinzette wurde das Fixogum entfernt und ließ das Deckgläschen in einer Küvette mit 2xSSC abschwimmen. In einem Wasserbad mit 42°C Temperatur wurden die Objektträger für 10min wiederholt in 2xSSC gestellt, anschließend für dreimal 10min in 57% Formamid/2xSSC bei 42°C. Die Objektträger wurden für 10 min in 4xSSC bei Raumtemperatur gestellt. Es folgte ein Blockierungsvorgang mit je 100µl 5% BSA/4xSSC für 30min bei Raumtemperatur. Danach wurde den Präparaten zur Detektion 100µl Streptavidin-FITC hinzugegeben und für 45min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit dreimal 10min in 4xSSC/Triton X-100 bei 42°C. Danach wurden die Präparate nochmals mit je 100µl 5% BSA/4xSSC für 30min bei Raumtemperatur geblockt. Die nächste Detektion erfolgte mit BIO-anti-Streptavidin und anti-DIG-Cy3 für 45 min im Brutschrank bei 37°C. Ein zweiter Waschvorgang bei 42°C mit dreimal 10min in 4xSSC folgte. Nachdem die Präparate abermals mit 5% BSA bei Raumtemperatur einem Blockierungsvorgang unterzogen worden waren, folgte eine Detektion mit Streptavidin-FITC und Goat-anti-mouse-Cy3 bei 37°C im Brutschrank. Zuletzt wurden die die Präparate dreimal 10min in 4xSSC/Triton X-100 bei 42°C gewaschen. Zuletzt wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-80-99%, Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet.

2.2.3.4 FISH an 14q32 und 18q21

Die direkt markierten Sonden wurden über Abbott Molecular käuflich erworben und entsprachen den Regionen 14q32 (Spectrum GreenTM) und 18q21 (Spectrum OrangeTM).

Vorbehandlung

Die Tumor- und Lymphozytenpräparate wurden kurz in 2xSSC bei Raumtemperatur eingestellt und anschließend mit 100µl RNase A (1: 100 in 2xSSC) für 20 min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert. Nach dem Verdau wurde die RNase bei

Raumtemperatur für jeweils 5min dreimal mit 2xSSC von den Präparaten abgewaschen. Die Lymphozytenpräparate wurden 1min und 30sec mit 50µl 10% Pepsin in 100ml Aqua dest. und 0,01N HCL bei 37 °C verdaut, während die Gewebsschnitte 1-3 min mit 100µl Proteinase K in 85ml Aqua dest, 5ml Tri-Base-Puffer und 10ml EDTA-Puffer bei 55 °C verdaut wurden. Es folgte ein Waschschrift in 1xPBS, anschließend wurden die Gewebeschnitte und Lymphozytenpräparate in 4% PFA/PBS (auf Eis gestellt) für 10min fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS konnten die Lymphozytenpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70- 80- 99%, Ethanol) dehydriert werden. Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit Aqua dest. gespült und bei 70 °C für 5min in 2xSSC inkubiert. Anschließend wurde sie dehydriert und für mindestens eine Stunde staubfrei getrocknet.

Hybridisierung

Das Hybridisierungspuffer war beim Kauf des Sonden-Mix beigegeben, in dem bereits die für die Sonden bestimmten Konzentration an Formamid enthalten war. Das Hybridisierungspuffer setzte sich aus 3,5µl Hybridisierungspuffer, 0,5µl Sondenmix und 1µl Aqua dest. zusammen, das entsprach einem Volumen von 5µl pro Objektträger. Dieser Mix wurde auf die Präparate aufpipettiert und mit einem Deckglas (Ø 12mm) abgedeckt. Mit Fixogum wurden die Ränder luftdicht verschlossen und in der Dunkelkammer getrocknet. Die weiteren Schritte wurden in der Dunkelkammer durchgeführt, um das Ausbleichen der Fluorochrome zu vermeiden. Die Präparate wurden bei 75 °C für 5min auf einer Heizplatte denaturiert und in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank ein bis zwei Tage hybridisiert.

Stringenzwaschung

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser mit einer Pinzette das Fixogum entfernt. Die Deckgläser ließ man in 1xPBS abschwimmen. Die Stringenzwaschung erfolgte in 0,5xSSC/0,1%SDS bei 65 °C, 5min für die Lymphozyten und 10 min für die Gewebeschnitte. Anschließend wurden die Objektträger 10 min in 1xPBS gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und für mindestens eine Stunde staubfrei getrocknet.

2.2.3.5 DAPI-Gegenfärbung

Um bei der Auswertung am Mikroskop die Metaphasechromosomen und Interphasekerne lokalisieren zu können wird die Gesamt-DNA mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. DAPI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich bevorzugt an AT-Sequenzen bindet. Dieser ruft eine GTG-Bänderung ähnliche Färbung hervor.

Durchführung

Auf die getrockneten Objektträger wurden je ca. 20µl DAPI-Antifade pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Das überschüssige DAPI-Antifade konnte durch leichtes Anpressen entfernt werden. Die Präparate waren für die Auswertungen gerichtet und wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.3.6 Bildaufnahme

Die Voraussetzung hierbei ist die Anwendung von Fluorochromen, die absorbiertes Licht in einer längeren Wellenlänge emittieren. Wird ein Fluorochrom mit Licht des Absorptionsbereichs einer Wellenlänge bestrahlt und dies durch einen Filter betrachtet, der für das emittierten Wellenlängenbereich durchlässig ist, sieht man den Farbstoff vor einem dunklen Hintergrund leuchten. Man kombiniert zwei oder mehrere Fluorochrome, die sich in ihrem Absorptions- und Emissionsmaximum unterscheiden um die Lokalisationen am Chromosom mikroskopisch nachweisen zu können. Dies ist möglich durch Umschalten von Filtersätzen, die spezifisch auf das entsprechende Fluorochrom ausgerichtet sind. Die Charakteristika der verwendeten Fluoreszenzfilter sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Die Auswertung und Bildaufnahme der Präparate erfolgte an einem Auflichtmikroskop (Olympus AX 70). Das Mikroskop ist ausgerüstet mit einer starken Lichtquelle (HBO-Quecksilberdampfampe), Anregungsfilter, Teilerspiegel (dichromatischer Spiegel) und einem Sperrfilter. Abbildung 2.3 zeigt eine vereinfachte Darstellung eines Fluoreszenzmikroskops.

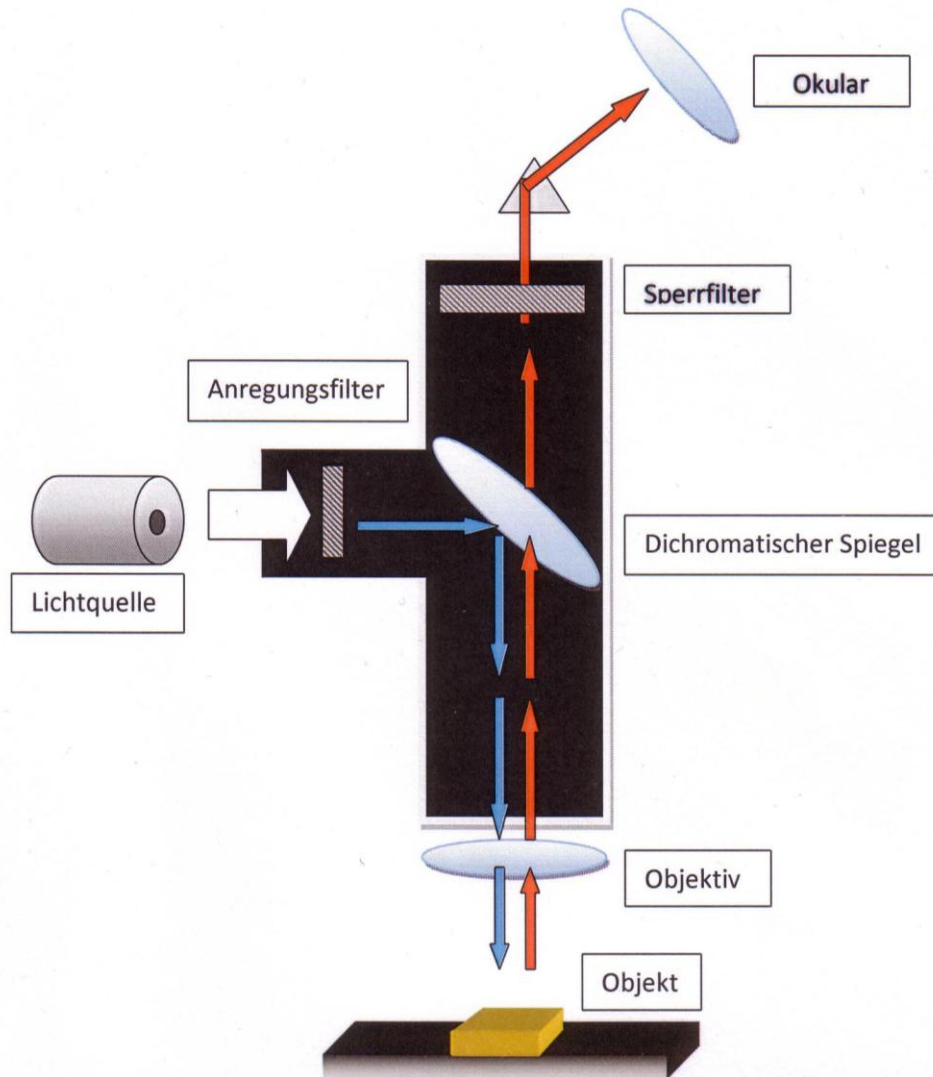


Abbildung 2.3: Darstellung eines Fluoreszenzmikroskops

Die Quecksilberdampfampe umfasst einen Wellenlängenbereich (360-700nm), der teils für das menschliche Auge (400-700nm) nicht sichtbar ist. Die Intensität der Signale eines fluoreszierenden Farbstoffs ist proportional dem Produkt von ϵ und QE.

$$\text{Intensität der Fluoreszenz} \sim \epsilon \times \text{QE}$$

Hier steht ϵ für den molaren Absorptionskoeffizienten, QE für das Verhältnis von emittierten und absorbierten Photonen (Quantenausbeute). Das Licht wird durch einen Anregungsfilter

geleitet, der für das jeweilige Fluorochrom die entsprechenden Wellenlängen ausliest und über einen Spiegel auf das Präparat geleitet. Der Spiegel besitzt eine kritische Wellenlänge: kurzwelliges Licht wird reflektiert und langwelligeres Licht kann den Spiegel passieren. Der Spiegel legt die kritische Wellenlänge so fest, dass sie zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des jeweiligen Fluorochroms liegt. Dieses Licht trifft dann auf einen Sperrfilter, der nur das Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge passieren lässt und so durch das Okular betrachtet werden kann. An dem Mikroskop war eine sec/ w-CCD-Kamera installiert mit der auch alternativ Bilder aufgenommen werden konnten. Unter Verwendung selektiver Filter wurde für jedes verwendete Fluorochrom ein schwarz-weiß-Foto aufgenommen. Mit Hilfe einer Software (ISIS 3 von Meta Systems, Altlußheim) konnte dieses Bild in Falschfarbendarstellung gespeichert werden.

Tabelle 2.4 : Fluoreszenzfilter des AX 70 (Olympus; Hamburg)

Filter	NU (DAPI) [nm]	MWIBA (FITC) [nm]	MWIG(Rhodamin; Cy3) [nm]
Anregungsfilter	360-370	460-490	520-550
Emissionsfilter	470	515-550	570
Strahlenteiler	400	505	550
Farbe	blau	grün	Rot

2.2.3.7 Auswertung

Bei der Auswertung wurde nach den Kriterien nach Hopman et al. (1988) verfahren. Diese besagt, dass überlappende Kerne nicht gewertet, sehr schwache Signale als Fehlhybridisierung interpretiert und ebenfalls nicht gezählt werden und das Signal als eins gezählt wird, wenn der Abstand die Signale um eine Signalbreite trennen. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt und um die Signale als solche zu erkennen dienten die Hybridisierungen am Lymphozytenpräparat. Man muss in Betracht ziehen, dass sich die Signale in unterschiedlichen Ebenen zu Objektiv befinden können. Aus diesem Grund wurde das Präparat in allen Ebenen durchfokussiert.

Zur Festlegung der Grenzwerte wurden die Ergebnisse der Kontrollgruppe vorerst ermittelt. Sogar bei der Kontrollgruppe, den Lymphozyten von gesunden Probanden, konnten selten 200 Kerne mit je 2 Signalen für eine DNA-Sonde gezählt werden. Dies ist zurückzuführen auf mögliche Fehlhybridisierungen, somatische Chromosomenpaarung oder Verlust von Chromosomenstrukturen während der Hybridisierung. Um diese möglichen Streuungen in die Auswertung zu integrieren und somit von signifikanten Aberrationen zu entscheiden, wurde der Mittelwert nach folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

\bar{x} = Mittelwert n = Gesamtzahl der Proben

Um ein Maß für die Streuung zu erfassen, wurde die Standardabweichung berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

s = Standardabweichung \bar{x} = Mittelwert n = Gesamtzahl der Proben

Um die Signifikanz der Aberrationen zu überprüfen wurden von den Mittelwerten jeder Klasse die zweifache Standardabweichung subtrahiert (Festlegung der Untergrenze) beziehungsweise addiert (Festlegung der Obergrenze). Somit konnte ein Intervall definiert werden, wonach ein Wert innerhalb des Intervalls das Ergebnis als signifikant, ein Wert außerhalb des Intervalls konnte keine statistisch relevante Aussage über eine Aberration geben. Lag eine Obergrenze im Wert kleiner als vier vor, wurde diese auf vier hochgesetzt. Bei den Tumorpräparaten musste ein möglicher Chromosom-Materialverlust durch Kernanschnitte und andere mögliche Artefakte wie z.B. Überlappen des Schnittgewebes während des Aufziehens auf den Glasobjektträger, berücksichtigt werden. Um solche Artefakte auszuschließen, wurde hier die obere Grenze auf 10 festgesetzt.

Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 3.1-2 veranschaulicht.

3. Ergebnisse

3.1 Histopathologische Parameter und Lokalisation

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden 66 Meningeome untersucht, darunter 54 Meningeomrezidive und 12 Primärtumoren. Was die Meningeomrezidive betrifft, sind 28 (59,6%) weibliche und 19 (40,4%) männliche Patienten vertreten. Wegen wiederholter Rezidiventstehung konnten vier Patienten mit mehreren Fällen untersucht werden, hinsichtlich des WHO-Grades und Lokalisation blieben diese in ihrer Progression unverändert und wurden somit außer den Geschlechts-Kategorien in dieser Arbeit als unabhängige Fälle betrachtet. Dem WHO Grad III entsprachen 24%, dem Grad II 54% und Grad I 22% der Meningeomrezidive. Während bei den niedriggradigen Meningeomrezidiven die Anzahl der weiblichen Patienten dominierte, zeigten sich die Grad III Meningeomrezidive geschlechtsunabhängig mit je 7 Fällen (je 13%). Das Durchschnittsalter der weiblichen Patienten betrug 58,5 Jahre, die männlichen Patienten waren im Durchschnitt 57,7 Jahre alt. Im Bereich der Konvexität waren 24% der Rezidive lokalisiert, gefolgt von Lokalisationen im Keilbeinflügel, Olfaktoriusrinne und parasagittal-Region mit jeweils 13%.

3.2 FISH-Untersuchung an Lymphozytenpräparaten

Die Spezifität und Qualität der FISH-Sonden wurde an Lymphozytenpräparaten untersucht. Dafür wird gesunden Probanden venöses Blut entnommen. So kann an den Chromosomen erkannt werden, ob die Sonden spezifisch an der Zielregion binden oder ob unspezifische Signalbindungen auftreten. Es wurden jeweils 200 Kerne ausgezählt und der prozentuale Anteil an Signalen, die mehr oder weniger als 2 Signale aufwiesen, ermittelt. Anschließend konnte die Standardabweichung errechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1-2 aufgelistet. Die Sondenkombination 14q32/18q21 wurde in Zusammenarbeit mit Diplom-Biologin Fr. Pöhler gemeinsam genutzt.

Tabelle 3.1 : Ergebnisse der statistischen Auswertung der Chromosom 7/10 Untersuchung am Lymphozytenpräparat.

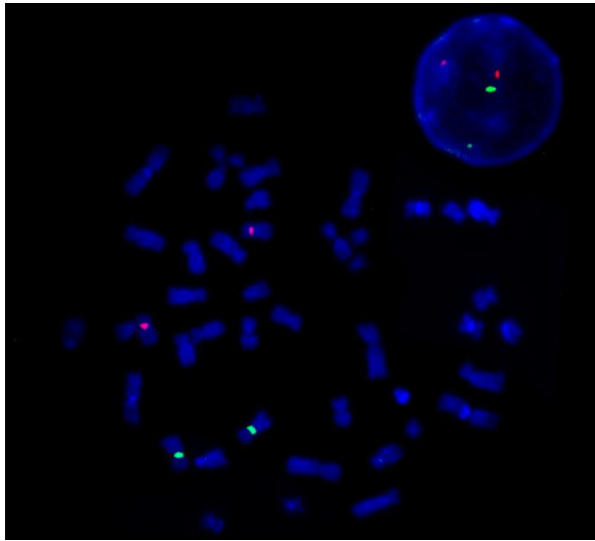
	1 Signal		3 Signale	
	Chromosom 7	Chromosom10	Chromosom 7	Chromosom10
Test 1	0	2	1,5	2
Test 2	0	0	1	1
Test 3	1,5	1,5	0	0
$\bar{x} \pm 2 \cdot SD$	$0,5 \pm 1,73$	$1,2 \pm 2,08$	$0,8 \pm 1,48$	1 ± 2

Tabelle 3.2: Ergebnisse der statistischen Auswertung von 14q32 und 18q21 Untersuchung am Lymphozytenpräparat.

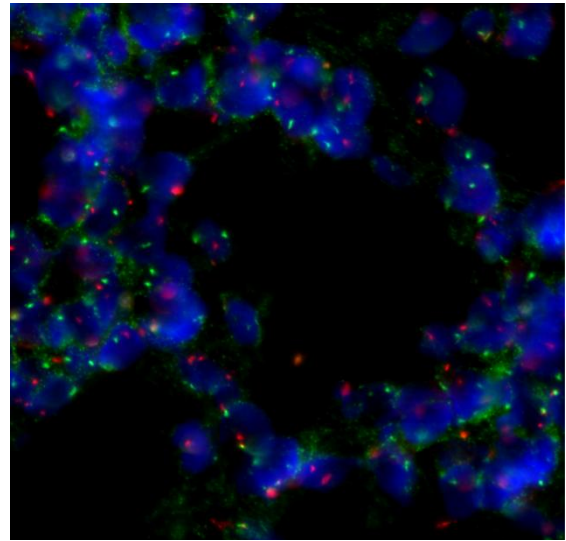
	1 Signal		3 Signale	
	14q32 (IGH)	18q21 (MALT)	14q32 (IGH)	18q21 (MALT)
Test 1	9	3,5	0,5	0
Test 2	2,5	1,5	2	0
Test 3	4	4	1,5	0
Test 4	0	2,5	1,5	2
$\bar{x} \pm 2 \cdot SD$	$3,9 \pm 7,58$	$2,9 \pm 2,22$	$1,4 \pm 1,26$	$0,5 \pm 2$

Die Sonden für die Sondenkombination 7/10 entsprechen Zentromersonden. Abbildung 3.1 (a) und (b) präsentieren die Signalqualität am Lymphozyten- und Tumorpräparat.

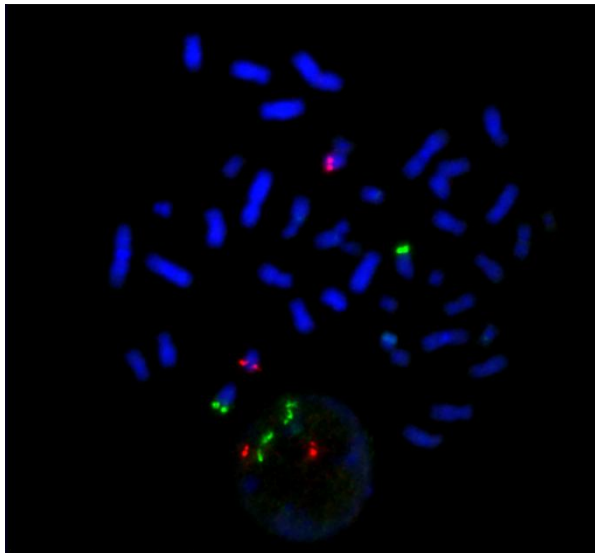
Die Sonden für die Untersuchung der Chromosome 14 und 18 binden spezifisch an einen Locus des Chromosoms. Diese entsprechen der Gene IGH auf 14q32 und MALT1 auf 18q21. Die Bindungsloci und Signalqualitäten können in Abbildung 3.1 (c) und (d) betrachtet werden.



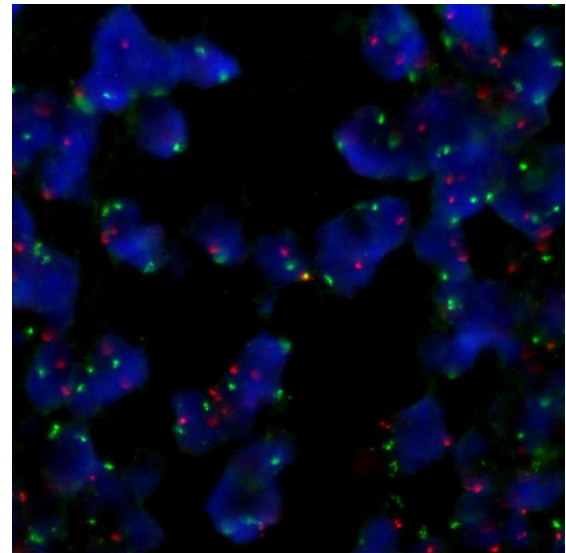
(a) Kontroll-Hybridisierung am Lymphozyt mit Sondenkombination 7 (grün)/10 (rot). 100fach vergrößert.



(b) Hybridisierung am Fall 192/98 mit Sondenkombination 7(grün)/10(rot). 60fach vergrößert.



(c) Kontroll-Hybridisierung am Lymphozyt mit Sondenkombination 14q32(grün)/18q21(rot). 100fach vergrößert.



(d) Hybridisierung am Fall 295/07 mit Sondenkombination 14q32(grün)/18q21(rot). 60fach vergrößert.

Abbildung 3.1: Darstellung der Hybridisierung an Lymphozyten und Tumorpräparaten.

3.3 FISH-Untersuchung am Meningeomrezidiv (n=54)

3.3.1 Numerische Veränderungen von Chromosomen 7 und 10

Es konnten 49 Meningeomrezidive mit der Sondenkombination von Chromosomen 7/10 analysiert werden. Fünf Tumorpräparate konnten aufgrund des hohen Anteils an Kollagenfasern nicht hybridisiert werden. Tabelle 3.3 präsentiert die prozentualen Verluste aus 200

ausgewerteten Zellkernen. Die Signifikanzgrenze der Verluste wurde auf 10 % festgelegt, der Zugewinn an Chromosomen lag demnach weit unterhalb der definierten Grenze. Um Dennoch wahrscheinliche Gewinne zu isolieren, wurde eine Signifikanzgrenze von 5% festgelegt.

Tabelle 3.3: Verluste der Sondenkombination Chromosom 7/10 am Meningeomrezidiv. In Klammern sind Gewinne markiert.

Fall-Nummer	Verlust [%] Chromosom 7	Verlust [%] Chromosom10	Fall- Nummer	Verlust [%] Chromosom 7	Verlust [%] Chromosom10
82/97	1,5	14	1240/02	17,5	22
99/97	6,5	12,5	1421/02	9	20,5
395/97	4	7,5	1640/02	5	22,5
709/97	2,5	16	1765/02	15	22
1857/97	2	45,5	1916/02	10	25
115/98	5,5	15	798/03	17,5	34,5
192/98	8	16	1248/03	12	17
625/98	11	36	169/04	4	32,5
790/98	6	20	906/04	11,5(20)	16,5(17,5)
1013/98	5(15)	36	1027/04	5,5	18
1284/98	12	22	1092/04	13,5	58,5
1612/98	1	17	1237/04	20,5	28,5
1320/99	17,5	63,5	1653/04	12	58,5
1851/99	5	16	1671/04	14,5	16,5
2004/00	5	21	91/05	8	21
618/01	8,5(7,5)	22(5,5)	168/05	2,5	22,5
655/01	14,5	26	1440/05	3	18,5
1342/01	4,5	24	141/06	4	25,5
1648/01	14,5	36	297/06	7,5	30,5
1936/01	19	25,5	1168/06	3	28,5

32/02	17	39,5	1599/06	2	49,5
51/02	7,5	17,5	295/07	4,5	26
67/02	10	30,5	961/07	14,5	33
77/02	16,5	41,5	1014/07	22,5	26,5
570/02	5	30,5			

Gewinne der Chromosomen waren in drei Fällen, 1013/98, 618/01 und 906/04 präsent. Am häufigsten beobachtet wurde der Verlust von Chromosom 10. Ein signifikanter Verlust mit einer Deletion 10 konnte in 48 (98%) Fälle nachgewiesen werden, hingegen lag ein Verlust von Chromosom 7 in 19 (38,7%) Fällen vor. Ein isolierter Verlust von Chromosom 10 trat in 29 (59,18%) Fällen ein, Chromosom 7 wies keinen signifikanten Verlust auf ohne gleichzeitigen Verlust an „zehner“-Material. 16 (32,7%) Fälle gingen mit signifikanten Verlusten beider Chromosomen einher. Setzt man eine zusätzliche Signifikanzgrenze von 40% um eine hoch aberrante Subgruppe zu isolieren, so sind sechs Fälle mit hohem Chromosom 10 Verlust auffällig. In Abschnitt 3.2.2.2 ist die Korrelation mit 14q32 und 18q21 erläutert. In Abbildung 3.2 sind die prozentualen Verluste in einem Diagramm veranschaulicht.

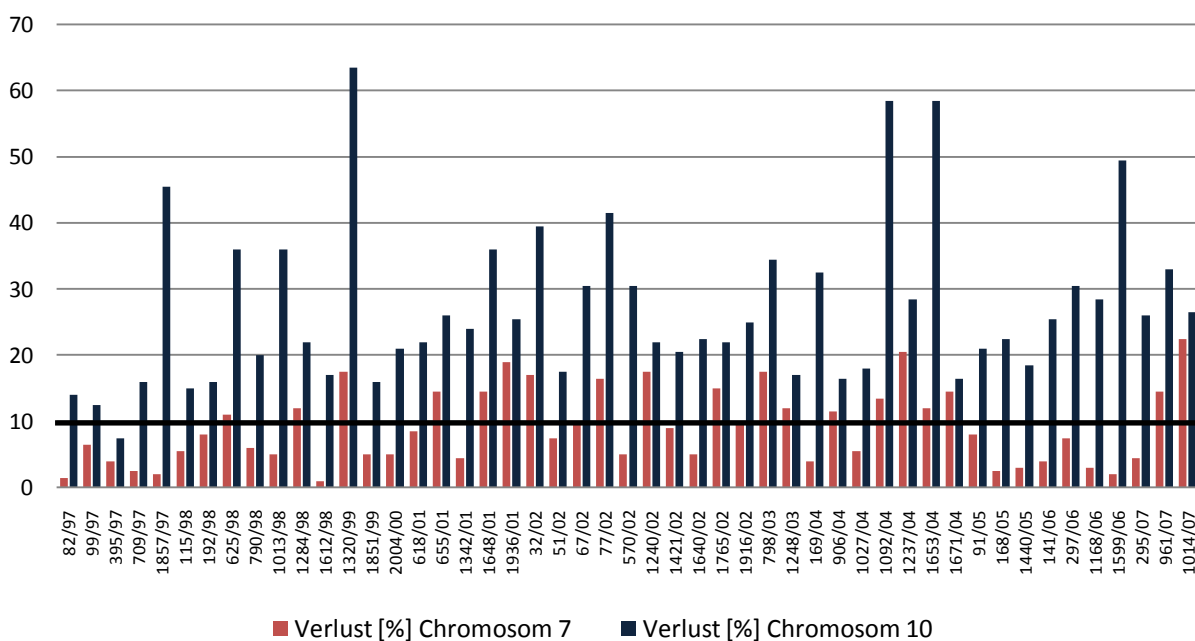
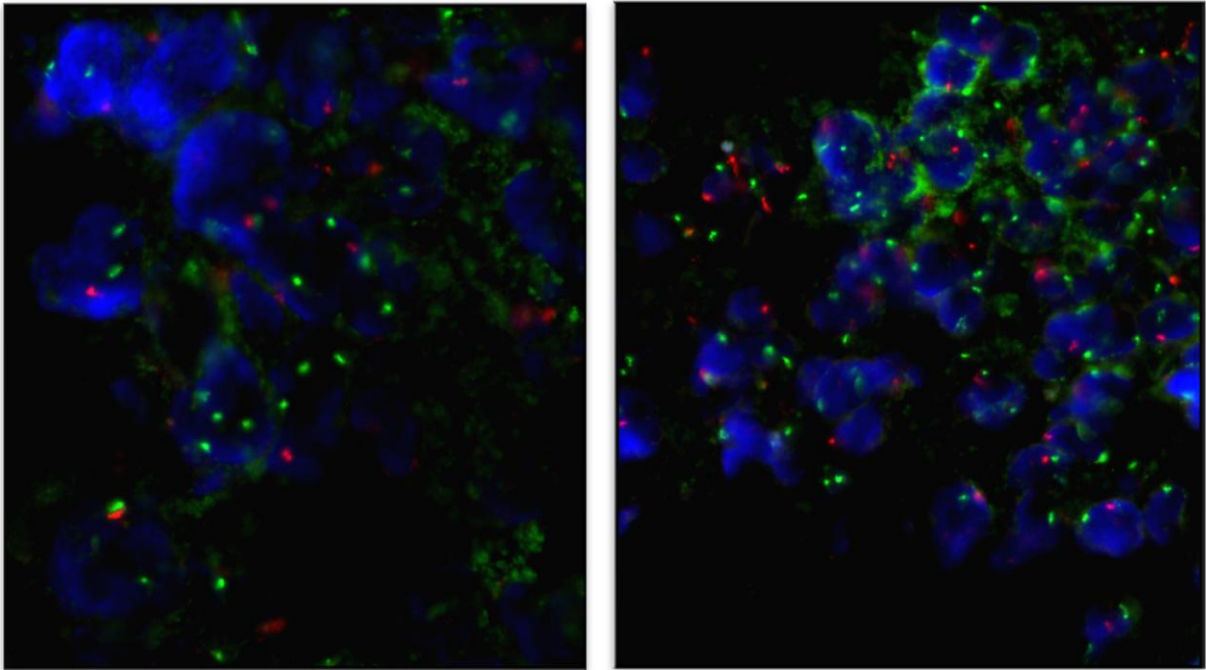


Abbildung 3.2: Darstellung der Chromosomenverluste 7/10 in einem Diagramm. Im Vergleich zum Chromosom 7 treten signifikante Verluste des Chromosoms 10 in deutlichem Ausmaß auf. Zur besseren Veranschaulichung ist die definierte Signifikanzgrenze von 10% schwarz markiert.



(a) Fall 1653/04 in 100facher Vergrößerung.

(b) Fall 1653/04 in 60facher Vergrößerung.

Abbildung 3.3: Hybridisierung am Tumorphäparat 1653/04 mit Sondenkombination 7(grün)/10(rot) mit DAPI-Gegenfärbung. Die Auswertung ergab einen hohen Verlust an Chromosom 10. In der Darstellung ist das Defizit an roten Signalen zu erkennen.

Der durchschnittliche Verlust an Chromosomenmaterial lag bei 9,15% für Chromosom 7 und 27,04% für Chromosom 10. In Abbildung 3.2 wird deutlich, dass ein isoliert signifikanter Verlust von Chromosom 7 nicht auftritt, jedoch bei einem signifikanten Verlust auch das Chromosom 10 mit betroffen ist. Dadurch, dass die Signalqualität der Chromosom 10-Sonde von höherer Qualität war und auch im bindegewebelastigen Präparaten stets eine konstante Hybridisierung zeigte, diente dies zur internen Kontrolle: Waren Signale für Chromosom 10 vorhanden konnte davon ausgegangen werden, dass die Signale im Zellkern adäquat hybridisiert waren.

Ein Beispiel für den Verlust an Chromosom 10 am untersuchten Tumormaterial kann in Abbildung 3.3 am Fall 1653/04 betrachtet werden. Die grünen Signale entsprechen dem Chromosom 7, die roten Signale dem Chromosom 10.

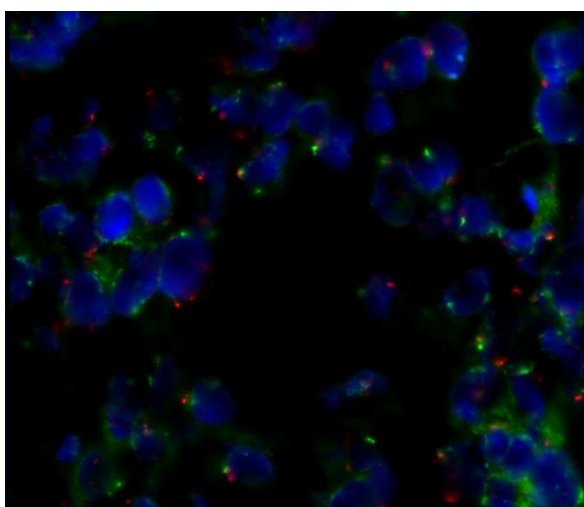
3.3.2 Numerische Veränderungen von 14q32 und 18q21

Sechs Meningeomrezidive wurden auf Sondenkombination 14/18 untersucht. Im Rahmen der Diplomarbeit von Fr. Pöhler konnten weitere Rezidive analysiert werden, die Ergebnisse (siehe Anhang) wurden für das Erstellen des GPS in Abschnitt 3.7 mit einbezogen. Im Durchschnitt lag der Verlust von 14q32 bei 43,33% und 40,26% von 18q21.

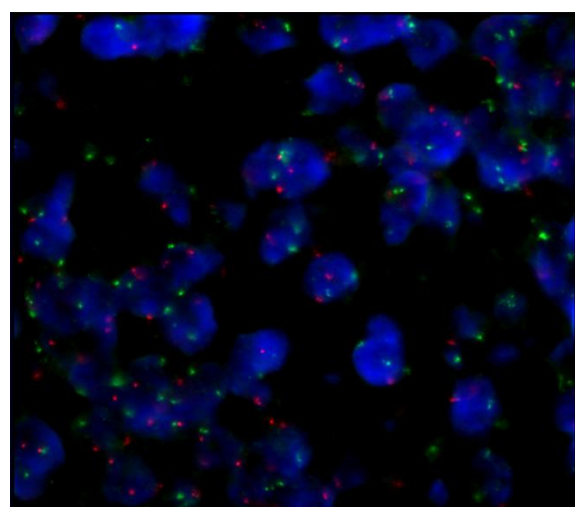
Tabelle 3.4: Verluste der Sondenkombination Chromosom 14/18 am Meningeomrezidiv

Fall-Nummer	Verlust [%]		Fall-Nummer	Verlust [%]	
	14q32	18q21		14q32	18q21
99/97	39	38	77/02	81,5	80
709/97	20	26	1248/03	15	69,5
1857/97	42	59,5	295/07	43	37,5

Alle Fälle zeigen signifikante, z.T. hoch aberrante Verluste. Auffällig ist Fall 77/02, in 200 ausgezählten Zellkernen gehen ca. 160 Kerne mit Verlusten an Chromosomen 14/18 einher. In Untersuchung am gleichen Tumorpräparat von Chromosomen 7/10 war ebenfalls ein hochsignifikanter Verlust eines Chromosoms 10 nachweisbar. So auch Fall 1857/97 mit hohem Verlust an Chromosomen 14/18, zeigte einen hochsignifikanten Verlust des Chromosom 10. (siehe Abbildung 3.2). Beispiele der Hybridisierungen sind in Abbildung 3.4 und 3.5 dargestellt.



(a) Fall 77/02 in 60facher Vergrößerung.



(b) Fall 1248/03 in 60facher Vergrößerung.

Abbildung 3.4: Hybridisierung mit der Sondenkombination 14q32(grün)/18q21(rot). In (a) sind in 60facher Vergrößerung kaum grüne und rote Signale erkennbar. Dieser Fall zeigte bei Chromosomenuntersuchungen 7/10 einen hochsignifikanten Verlust an Chromosom 10.

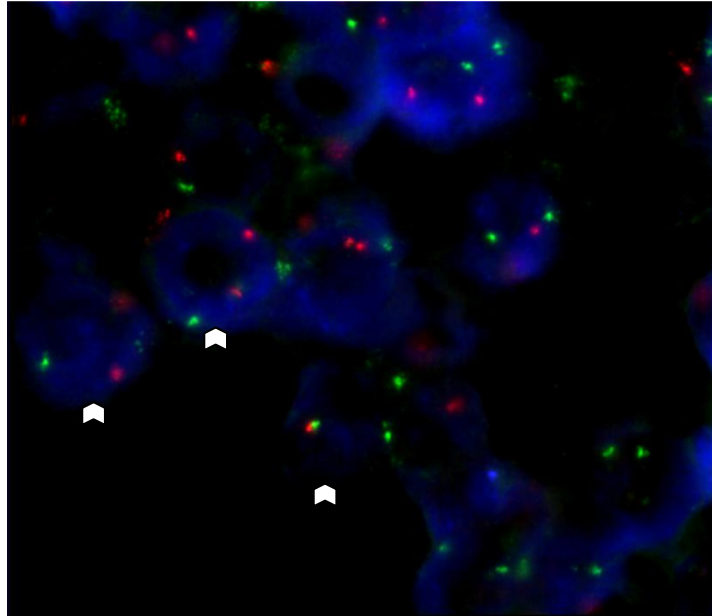


Abbildung 3.5: Hybridisierung am Fall 295/07 mit Sondenkombination 14q32 (grün)/18q21 (rot). Die Pfeile zeigen auf die Verluste an Signalen in den Zellkernen. Hier dargestellt von links nach rechts das Verhältnis vom grünen Signal zum roten Signal: 1:2, 1:2, 1:1. In 100facher Vergrößerung.

3.3.3 Vergleich zwischen Verlusten von Sondenkombinationen 7/10 und 14q32/18q21

In ihrer Diplomarbeit hatte Fr. Pöhler in 48 Meningeomrezidiven 27 Fälle mit Deletion 14q32 und 25 Fälle mit Verlust von 18q21 beschrieben (siehe Anhang). In Korrelation mit den Chromosomen 7/10 konnte folgendes ermittelt werden: In Abschnitt 3.2.2.1 wurden in 16 (32,65%) von 49 Fällen parallele Verluste von 7/10 erfasst. Diese traten auf in Zusammenhang mit

1. vier (25%) Fällen mit isoliertem hochsignifikanten 14q32 Verlust
2. zwei (12,5%) Fällen mit isoliertem hochsignifikanten 18q21 Verlust
3. sechs (37,5%) Fällen mit signifikanten kombinierten Verlusten von 14q32/18q21
4. vier (25%) Fällen mit signifikanten kombinierten Verlusten von 14q32/18q21

Die 28 Fälle mit isoliertem Chromosom 10 Verlust (siehe Abschnitt 3.2.2.1) korrelierten mit

1. vier (15,38%) Fällen mit isolierten hochsignifikanten Verlusten von 14q32
2. 13 (50%) signifikanten kombinierten Verlusten von 14q32/18q21
3. neun (34,61%) Fällen mit kombinierten hochsignifikanten Verlusten von 14q32/18q21

Zwei Fälle wurden nicht auf Sondenkombination 14q32/18q21 untersucht.

Ein Verhältnis zwischen parallelem Verlust von 14q32/18q21 und das Auftreten von Aberrationen der Chromosomen 7/10 scheint gegeben. Der isolierte Verlust von Chromosom 10 war unabhängig vom Auftreten einer 18q21 Deletion.

An einer Patientin, die wegen wiederholter Rezidivneigung in dieser Arbeit vertreten ist, konnte das Ausfallmuster während der Progression dargestellt werden. Es handelt sich um die Fälle 1240/02 (2.Rezidiv), 1671/04 (3.Rezidiv), 1440/05 (4.Rezidiv) und 1168/06 (5.Rezidiv). Der WHO-Einteilung zufolge entsprechen alle Tumore dem Grad II Meningeom und blieben unverändert in der Tentorium-Region lokalisiert. In Abbildung 3.6 ist zu erkennen, dass der Chromosom 10 Verlust mit fortschreitender Rezidivbildung vermehrt auftritt, während ein Rückgang von Chromosom 7 der Fall ist. In Abschnitt 3.4 wird dieses Thema detailliert aufgegriffen. 14q32 und 18q21 zeigten während der Progression signifikante Verluste, jedoch schwankte das Ausmaß unkontrolliert und somit ist eine Tendenz nicht zu erkennen.

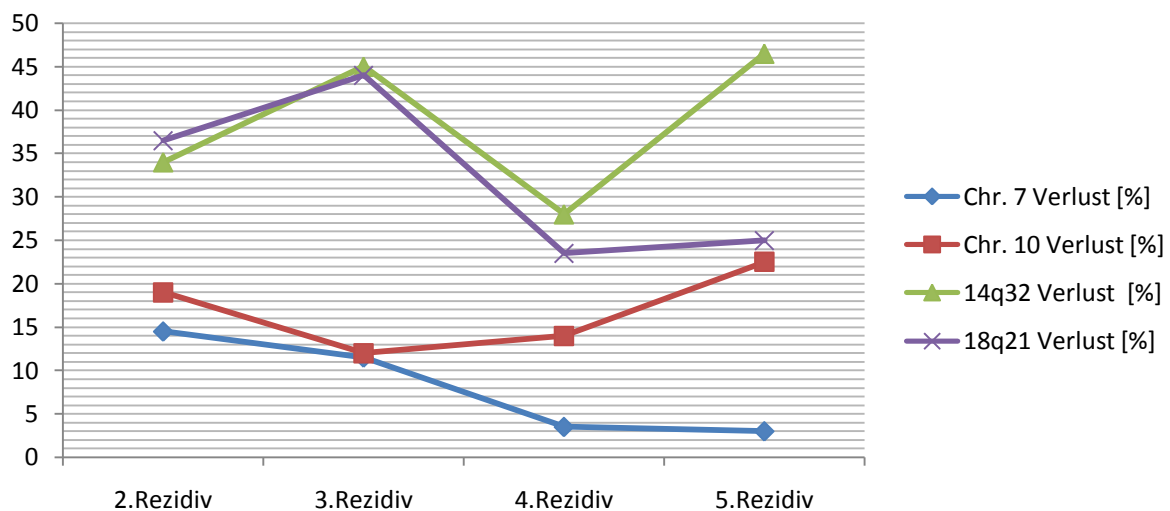


Abbildung 3.6: Darstellung der Chromosomenaberrationen einer Patientin mit wiederholter Rezidivneigung

3.3.4 Vergleich zwischen Ergebnissen der FISH-Analyse von Chromosomen 7 und 10 mit den histopathologischen Parametern

3.3.4.1 WHO-Grad

Ein isolierter Chromosom 10 Verlust lag in 28 von 49 Fällen vor (siehe Abschnitt 3.2.2.1), davon gehörten acht (28,57%) Fälle den Grad I, 13 (46,43%) Fälle den Grad II und sieben (25%) Fälle dem Grad III Tumoren an.

Lag ein paralleler Verlust von Chromosomen 7 und 10 vor (in 19 von 49 Fällen, siehe Abschnitt 3.2.2.1) waren davon zwei (10,53%) vom Grad I, 13 (68,42%) vom Grad II und vier (21,05%) vom Grad III Meningeom. Während bei benignen Meningeomen eher ein einzelner Verlust von Chromosom 10 zu erwarten ist, kommen bei höhergradigen Meningeomrezidiven häufiger zusätzliche Chromosom 7 Aberrationen hinzu.

3.3.4.2 Lokalisation

Ein isolierter Chromosom 10 Verlust war bei Tumoren in der Konvexität am häufigsten zu detektieren (7/28), es folgten Keilbeinflügel (5/28), Olfaktoriusrinne (5/18) und Tentorium (4/18).

Ein zusätzlicher Verlust von Chromosom 7 war am ehesten in der Parasagittal Region (5/19), Konvexität (4/19) und Tentorium (4/19) zu diagnostizieren.

Insgesamt korrelierte eine Chromosomenaberration mit einer Tumorlokalisierung an der Konvexität und Tentoriumregion.

3.4 FISH-Untersuchung am Primärtumor (n=12)

3.4.1 Numerische Veränderungen von Chromosomen 7 und 10

Es liegen Ergebnisse in 11 von zwölf Tumorpräparaten vor. Die Hybridisierung war in einem Fall nicht erfolgreich und konnte nicht ausgewertet werden. Verluste zeigten sich bei Chromosom 7 in vier (36,36%) Fällen, beim Chromosom 10 in acht (72,72%) Fällen.

Tabelle 3.5: Ergebnisse mit Sondenkombination Chromosom 7/10 an Primärtumoren

Fall- Nummer	Verlust [%] Chromosom 7	Verlust [%] Chromosom 10	Fall- Nummer	Verlust [%] Chromosom 7	Verlust [%] Chromosom 10
1407/97	4,5	6,5	687/01	18,5	24,5
1534/97	14,5	9,5	43/02	8	16,5
1800/97	7	14	232/02	6,5	13
587/99	11	11	828/02	6	17
1072/99	7,5	5	T5340	11,5	14,5
379/01	8,5	30			

Im Durchschnitt war ein Chromosom 7 Verlust in 9,41% der ausgewerteten 200 Zellkerne zu beobachten, die Deletion von Chromosom 10 verlief im Durchschnitt 14,68% (Methode zur Auswertung des Materials s. Abschnitt 2.2.3.7). Tabelle 3.5 präsentiert das Ausmaß an Verluste im jeweiligen Tumorpräparat.

3.4.2 Numerische Veränderungen von 14q32 und 18q21

Ebenfalls konnten 11 von 12 Primärtumoren hybridisiert und ausgewertet werden. In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse veranschaulicht. In allen Fällen war ein Verlust von 14q32 und 18q21 zu erkennen. Im Durchschnitt lagen diese bei jeweils 40,86- und 43,27% der ausgewerteten Zellkerne.

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Sondenkombination 14q32/18q21 an Primärtumoren

Fall-Nummer	Verlust [%] 14q32	Verlust [%] 18q21	Fall- Nummer	Verlust [%] 14q32	Verlust [%] 18q21
1407/97	42	36,5	687/01	42	46,5
1534/97	29,5	25	43/02	47,5	36,5
1800/97	51	56	232/02	55,5	58,5
587/99	34	38,5	244/05	46,5	53
1072/99	26,5	22,5	T5340	25	48
379/01	50	55			

3.4.3 Vergleich zwischen Verlusten von Sondenkombinationen 7/10 und 14q32/18q21

Zur besseren Analyse wurde ein Diagramm erstellt um einen Zusammenhang aus den zwei Untersuchungen zu ermitteln. Abbildung 3.7 zeigt 10 der untersuchten Primärtumore, die sowohl mit Chromosomen 7/10, als auch mit 14q32/18q21 analysiert worden sind.

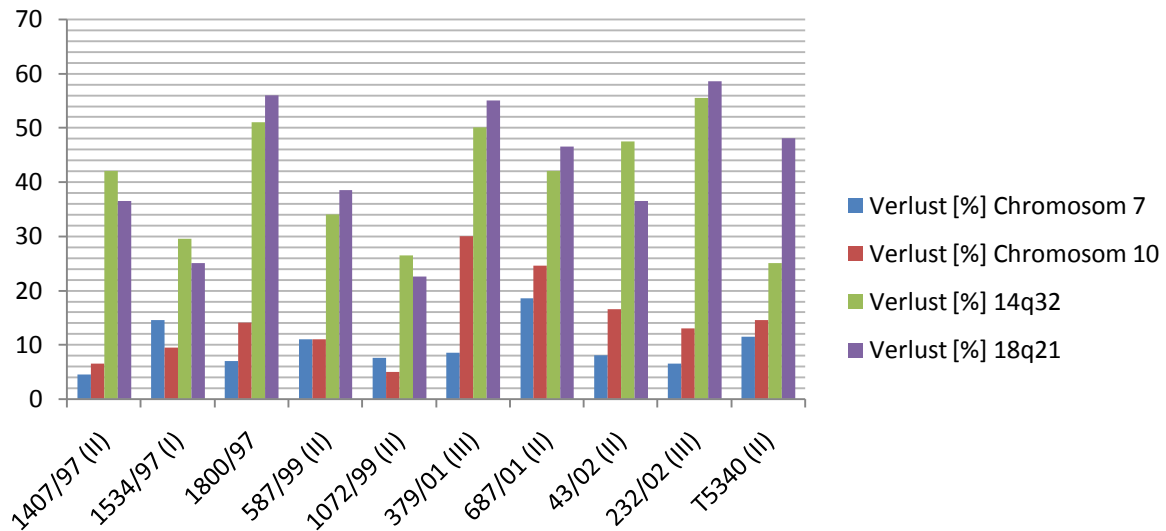


Abbildung 3.7: Darstellung der prozentualen Verluste der Primärtumore. Der WHO-Grad ist in Klammern eingetragen.

Wie bei den Meningeomrezidiven ist das Auftreten von Deletionen des Chromosoms 7 von geringerer Häufigkeit. Der Verlust von Chromosom 10 ist in 8 von 11 Fällen oberhalb der Signifikanzgrenze. Auch beim Primärtumor sind die Verluste von 14q32 und 18q21 von höherem Ausmaß. Ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Verlusten war nicht zu erkennen.

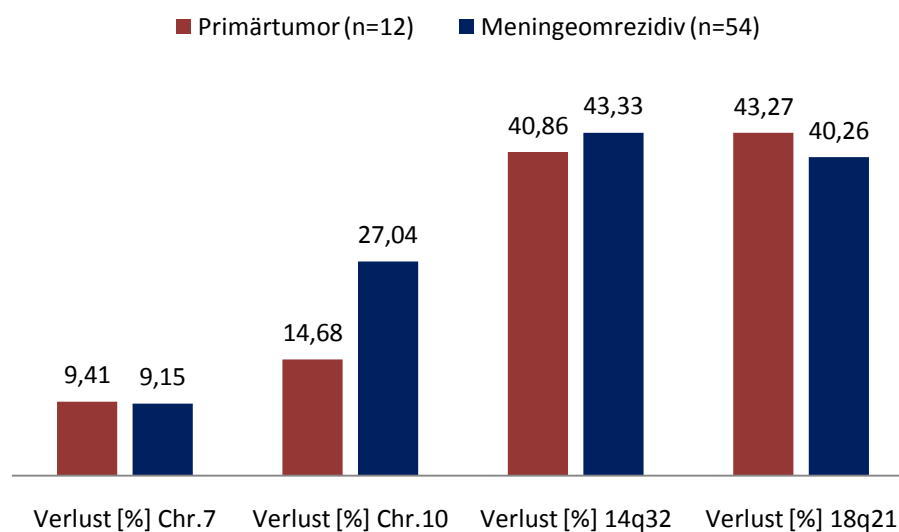
3.5 Vergleich zwischen genetischen Aberrationen von Meningeomrezidiven und Primärtumoren

Aus den FISH-Ergebnissen wurden Mittelwerte berechnet, die Werte sind in Tabelle 3.7 veranschaulicht. In den Werten der Sondenkombination 14q32 und 18q21 sind die Ergebnisse der Voruntersuchungen beinhaltet, diese können im Anhang betrachtet werden.

Tabelle 3.7: Mittelwerte der Chromosomenverluste aus je 200 ausgewerteten Zellkernen

	Verlust [%] Chr.7	Verlust [%] Chr.10	Verlust [%] 14q32	Verlust [%] 18q21
Primärtumor	9,41	14,68	40,86	43,27
Meningeomrezidiv	9,15	27,04	43,33	40,26

Da die Fallzahl an Primärtumoren im Vergleich zur untersuchten Rezidivpopulation sehr gering ist, ist ein adäquater Vergleich nicht möglich. Der Hintergedanke in diesem Abschnitt ist lediglich, eine Tendenz zu erkennen, die während der Tumorprogression auftreten kann. Deshalb ist es schwer zu schätzen, ob die geringen Differenzen der Chromosom 7, 14q32 und 18q21 tatsächlich Relevanz besitzen. Der steigende Verlust an Chromosom 10 Material jedoch, scheint ein Hinweis auf ein genetisches Ausfallmuster zu sein. Abbildung 3.8 veranschaulicht den Vergleich am Primärtumor und Meningeomrezidiv.

**Abbildung 3.8:** Mittelwerte aus Tab. 3.7 dargestellt im Säulendiagramm

Am Diagramm wird aufgeführt, dass die Veränderungen während der Tumorprogression, unabhängig vom WHO-Grad, vergleichsweise gering sind.

Die Primärtumoren, die sowohl für Sondenkombinationen 7/10 und 14q32/18q21 untersucht worden sind wurden den entsprechenden Rezidiven, die ebenfalls auf diese Chromosomen-

aberrationen analysiert wurden, gegenübergestellt um Veränderungen während der Tumorprogression festzustellen. Es konnten vier Paare ausgemacht werden und diese sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Deutlich wird, dass Chromosom 10 bei Rezidiverscheinungen signifikante Verluste zeigt, was beim Primärtumor nicht immer der Fall ist. 14q32 und 18q21 zeigen hohen Verlust an Material, der während der Progression im Ausmaß kaum Schwankungen aufweist.

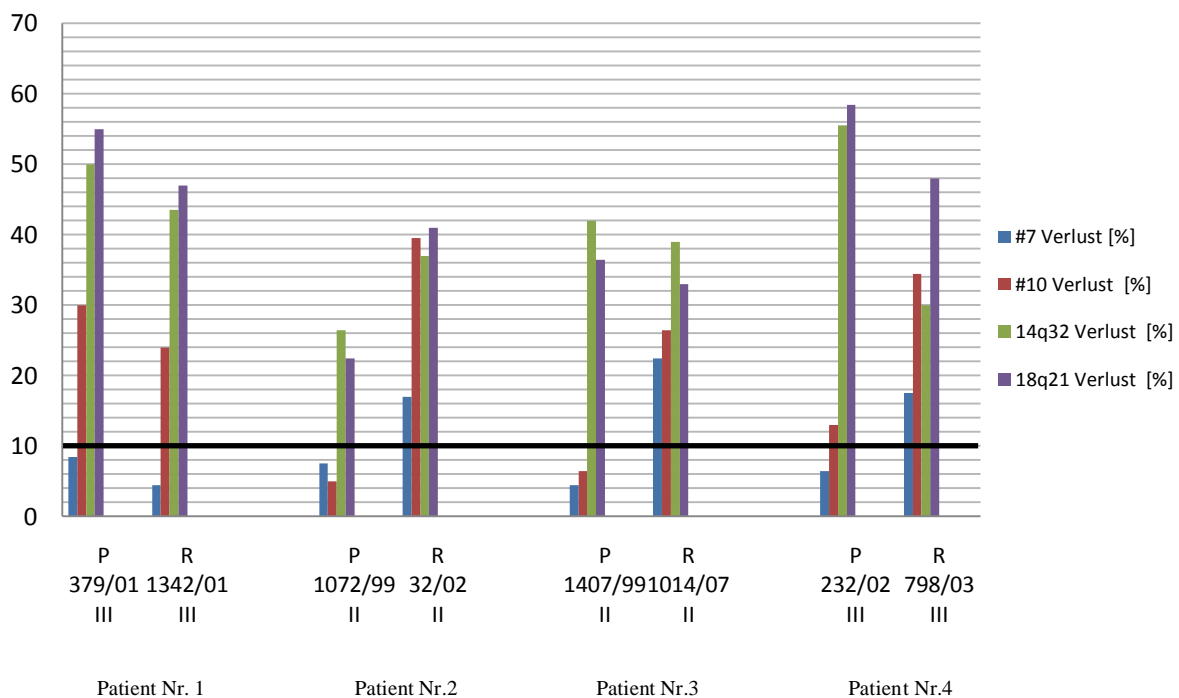


Abbildung 3.9: Chromosomale Verluste bei vier verschiedenen Patienten mit Rezidiverscheinung. Die Abkürzung „P“ steht für Primärtumor, „R“ für das darauffolgende Rezidiv. Die Signifikanzgrenze ist schwarz markiert.

Zusätzlich soll mit Tabelle 3.8 ein Überblick über Gewinn und Verlust der in Abbildung 3.9 dargestellten Fälle geschaffen werden. Da vier Patienten wegen wiederholt auftretenden Rezidiven in dieser Arbeit vertreten sind ergibt sich die Möglichkeit, den Verlauf der komplexen Veränderungen darzustellen. Es wird sichtbar, dass sowohl Primärtumore, als auch Rezidive ausnahmslos mit 14q32 und 18q21 Verlusten einhergehen. Bei Nr.1 und 4 - beide dem WHO-Grad III zugeordnet - sind bereits im Initialstadium Verluste von Chromosom 10 zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass der Verlust von Chromosom 10 mit dem Auftreten von malignen Meningeomen assoziiert ist. Gewinne der Chromosomen 7 und 10 sind nur in Grad II Meningeomen aufgetreten, die nicht zwingend auch im nachfolgenden Tumor weiter vorkommen.

Tabelle 3.8: Darstellung über Gewinn und Verlust an ausgesuchten Meningeompräparaten. Die Nummern enthalten Tumoren, die im individuellen Patienten aufgetreten sind. Nr. 1: 379/01(P), 1342/01(R), Nr. 2: 1072/99(P), 32/02(R), Nr. 3: 1407/97(P), 1014/07(R), Nr. 4: 232/03(P), 798/03(R), Nr. 5: 618/01(1.R), 906/04(3.R), Nr. 6: 1240/02(2.R), 1671/04(3.R), 1440/05(4.R), 1168/06(5.R), Nr. 7: 1916/02(3.R), 1248/03(4.R), 168/05(5.R), Nr. 8: 1092/04(2.R), 1599/06(3.R)

Pat Nr.	WHO	Primärtumor	1.Rezidiv	2.Rezidiv	3.Rezidiv	4.Rezidiv	5.Rezidiv
1	III	-10,-14,-18	-10,-14,-18				
2	II	-14,-18	-7,-10,-14,-18				
3	II	+7, +10, -14,-18	-7,-10,-14,-18				
4	III	-10,-14,-18	-7,-10,-14,-18				
5	II		+7,+10, -10, -14,-18		+7, -7, +10, -10, -14,-18		
6	II			-7,-10,-14,-18	-7,-10,-14,-18	-10,-14,-18	-10,-14,-18
7	II				-10,-14,-18	-7,-10,-14,-18	-10,-14,-18
8	III			-7,-10,-14,-18	-10,-14,-18		

3.6 Vergleich zwischen FISH-Analyse von Chromosomen 7 und 10 und konventioneller Karyotypisierung am Meningeomrezidiv

Die 33 Meningeomrezidive wurden mittels konventioneller Karyotypisierung voruntersucht. Die Daten der Karyotypisierung sind in Tabelle 3.9 aufgestellt, anbei sind die Anzahl der ausgezählten Zellkerne, die Verluste des jeweiligen Chromosoms aufwiesen, dargestellt.

Tabelle 3.9: Ergebnisse der konventionellen Karyotypisierung

Fall-Nummer	Karyotypen	Verlust in 200 Zellkernen von Chr.7/Chr.10
82/97	14*45,XX,-22 1*45,XX,-15,-22 1*90,XXXX,-22,-22 1*45,XX,der(3),der(14)?,-22	1,5/14
99/97	16*44-46,modal:44-46,XY,-1,t(1;2)(p11;q23),(del(1)(p32)),-(-8),-17,add(17)(q25),+1-5mar	6,5/12,5
395/97	14*46,XX,dic(22)? 2*45,idem,nonklonale Chromosomenverluste 2*45,XX,-22	4/7,5
115/98	6*46,XY 1*92,XXYY, tetraploide Zelle ohne chromosomale Auffälligkeiten 1*40,XY,-1,+del(1)(p13)x2,-6,+der(7),-10,-13,-14,+add(15p),-18,-21,-22	5,5/15

192/98	14*46,XX	8/16
625/98	7*46,XY 8*45,X,-Y 11*62-65,XXYY,+2,+2,+3,+5,+5,+8,+9,+11,+11, +add(12)(pter)x2,+17,+17,+19,+20,+20,+21,+21 (Gleicher Karyotyp in beiden Biopsien)	11/36
1013/98	15*43,X,-Y,der(11)t(11;17)(p15;q21)-14,-22	5/36
1284/98	17*46,XX 1*92,XXXX,tetraploide Mitose 1*73,cx; komplex aberrante Mitose; Artefakt aus der Zellkultur?	12/22
1612/98	1*41,X,-Y,?t(3;19)(q12;q13),-6,-10,-14,-20,-22,+mar	1/17
588/99	14*46,X,-Y,-12,-14,-19,-20,-22,+5mar[cp14] 2*46,XY	
1320/99	4*46,XY 4*45,X,-Y 3*6,XY,del(1)(p31),add(20)(p13) 2*44-45idem, nonklonale zusätzliche Aberrationen	17,5/63,5
2004/00	25*46,XX 3*47,XX+7 1*46,XX,+7,-12 1*47,XX,+18	5/21
687/01	15*46,XY	
1342/01	13 * 76-82 <4n>, cx, del(1) (p21), -22	4,5/24
1648/01	12 * 45,XX, -22	14,5/36
1936/01	12*43-45,XX,der(1)t(1;3) (?p12-13;q11), -3, inv(9) (h), -22	19/25,5
32/02	9 * 45, XX, -22	17/39,5
51/02	14 * 42,XX, del(1) (p11), -2,-13,-16,-22 [cp15]	7,5/17,5
67/02	15 * 43, XX, cx, -1,-7,+der(1) t(1;7) (p11;q11), -22,mar,ace [cp15]	10/30,5
77/02	10 * 42,XY, del(1)(p21),-6, -14, -18, -22	16,5/41,5
1240/02	9*45,XX,-G22 1*46,XX,-G22,+D 1*44,XX,-G22,-A 1*44,XX,-G22,-C 1*44,XX,-G22,-E 1*44,XX,-G22,-G21	17,5/22
1421/02		9/20,5
1640/02	13*40,XY,-1,-1,der(1)t(1;1)(p36;q21),-10,-14,-16,-18,-22 3*46,XY, offenbar mitangewachsenes Normalgewebe	5/22,5
1916/02	9*46,XY 1*idem,+20,offenbar in der Zellkultur entstandener Einzelbefund	10/25
798/03	46,XX, del(1)(p)	17,5/34,5
1248/03	15 * 46,XY	12/17
169/04	15*80-86,XX,cx<4n>,del(1)(p32),del(1)(q21)x2,del(6)(q15),-10,-11, -13,15,-18,-20,+3-6mar	4/32,5
906/04	9 * 46,XX	11,5/16,5
1027/04	16 * 46,XX,9ph	5,5/18

790/98	w	68	II	Konvexität	1	0	1	1	1	1	7,84
1013/98	m	70	II	Konvexität	1	0	1	1	1	1	7,84
1284/98	m	59	II	Parasagital	1	1	1	1	1	1	7,84
1612/98	m	62	III	Olfaktorius	1	0	1	1	1	1	7,84
1320/99	m	64	II	Parasagital	1	1	1	1	1	1	7,84
1851/99	m	54	I	Keilbeinflügel	1	0	1	1	1	1	7,84
1648/01	w	54	II	Spinal	1	1	1	1	1	1	7,84
379/01	w	61	III	Tentorium	1	0	1	1	1	1	7,84
687/01	m	39	II	Konvexität	1	1	1	1	1	1	7,84
32/02	w	35	II	HSG	1	1	1	1	1	1	7,84
51/02	w	63	I	Konvexität	1	0	1	1	1	1	7,84
67/02	w	69	II	Parasagital	1	1	1	1	1	1	7,84
77/02	m	46	III	Parasagital	1	1	1	1	1	1	7,84
1640/02	m	57	I	Konvexität	1	0	1	1	1	1	7,84
1240/02	w	59	II	Tentorium	1	1	1	1	1	1	7,84
1421/02	m	69	II	Falx	1	0	1	1	1	1	7,84
1765/02	m	64	I	Konvexität	1	1	1	1	1	1	7,84
169/04	w	64	III	Konvexität	1	0	1	1	1	1	7,84
1237/04	w	80	II	Konvexität	1	1	1	1	1	1	7,84
1653/04	m	63	II	Keilbeinflügel	1	1	1	1	1	1	7,84
1671/04	w	61	II	Tentorium	1	1	1	1	1	1	7,84
168/05	m	58	II	Olfaktorius	1	0	1	1	1	1	7,84
1440/05	w	62	II	Tentorium	1	0	1	1	1	1	7,84
297/06	w	81	II	Keilbeinflügel	1	0	1	1	1	1	7,84

Die Verluste wurden mit der von Ketter et al. erstellten GPS-Tabelle verglichen. Diese errechnet sich aus den 9 häufigsten Chromosomenverlusten (22, 1p, 14, Y, X, 18, 6, 19, 10). Die Kennzeichnungen in der Tabelle folgen dem binären System. Der Verlust eines Chromosoms wird als 1 markiert. Tumore ohne den entsprechenden Chromosomenverlust sind mit 0 gekennzeichnet. Die für den vollständigen Vergleich benötigten Veränderungen an den Chromosomen 6, 19, X und Y wurden ebenfalls als 0 angenommen und sind in dieser

Tabelle nicht enthalten. Alle Fälle entsprechen einen GPS höher als 7,31 und gehören somit der GPS-Gruppe 2 an (GPS-Gruppe 2: $6,39 < \text{GPS}$).

Es bestätigt sich, dass ein Wert über 6,39 mit einer Rezidivrscheinung einhergeht. Ebenso lässt sich schließen, dass komplexe Chromosomenaberrationen mit der Entstehung eines Meningeomrezidivs korrelieren.

3.7.2 GPS in Korrelation mit WHO-Grad und Lokalisation

Von den 29 Fällen entsprechen 5 Fälle dem WHO-Grad I (17,24%), 18 Fälle dem WHO-Grad II (62,07%) und sechs Fälle dem Grad III (20,69%), während 100% der GPS-Gruppe 2 angehören und somit laut Definition „rezidivgefährdet“ sind.

Die Konvexitätsmeningeom-Rezidive mit acht Fällen (27,59%) sind am häufigsten vertreten, gefolgt von fünf (17,24%) parasagittal liegenden, vier (13,79%) am Keilbeinflügel und drei (10,34%) an Olfaktoriusrinne lokalisierten Tumoren. Somit scheint ein Zusammenhang zwischen Lokalisation und GPS gegeben.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Konventionelle Karyotypisierung

Die konventionelle Zytogenetik untersucht genomische Abweichungen durch Bänderungsanalyse an Karyogrammen. Um ein Karyogramm erstellen zu können, muss von dem zu untersuchendem Gewebe eine Zellkultur angelegt werden. Gelingt das Anlegen der primären Zellkultur, wird das Wachstum der Zellen in der Metaphase unterbrochen um Metaphase-Chromosomen zu präparieren. Die Zytogenetik im klassischen Sinn kann also nur von Zellen erstellt werden, die in ihrer Zellteilung noch aktiv sind. Dies stellt eine kostspielige und Zeit aufwendige Methode dar, welche nur in speziell genetischen Labors vorhanden ist. In der Regel werden 15 Mitosen zur Auswertung gebraucht.

Ein bestehender Nachteil der konventionellen Karyotypisierung ist, dass die Qualität und Quantität der Methode vom Zellwachstum der zu züchtenden Tumorzellen abhängig ist. Eine nicht erfolgreiche Zellkultur ist vor allem zu erwarten bei stark koaguliertem Tumorgewebe oder Gewebematerial von geringer Größe. Im Durchschnitt müssen die angesetzten Zellkulturen mit Meningeommaterial 1-2 Wochen angezüchtet werden um Mitosen (wenn vorhanden) abernten zu können. Das Kolcemid, das beim Aberntevorgang der Mitosen eingesetzt wird, hat Einfluss auf das weitere Wachstum der Zellen. Es besteht die Möglichkeit, dass nach einer initialen Kolcemidbehandlung keine Mitosenbildung mehr sichtbar wird. Wenn ein Tumor zur entsprechenden Untersuchungszeit keine Mitosen aufweist, wird dieser entwertet und die Zellen können nicht mehr in den Befund eingehen. Durch längere Anzuchtdauer besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass sich Fibroblasten anstatt Meningeomzellen vermehren. Diese lassen sich *in vitro* von Meningeomzellen nur schwer unterscheiden (Ketter et al., 2001). Eine kurze Anzuchtdauer bei möglichst dem menschlichen Organismus ähnelnden Bedingungen, wie Konzentration von CO₂ von 5,0% und konstanter Temperatur von 37°C im Brutschrank dienen dazu, das Wachstum der Tumorzellen zu optimieren. Somit könnte verhindert werden, dass die Fibroblasten in ihrer Vermehrung das Wachstum der Meningeomzellen dominieren und den Tumorklon „überwachsen“. Ferner kann es dazu kommen, dass Zellen aus langwieriger Zucht häufiger ein unauffälliges Karyogramm aufweisen (Zang, 2001).

Der Einsatz der zytogenetischen Untersuchung zeigt sich effektiv, wenn über das ganze Genom ein Überblick geschaffen werden soll. Die Identifizierung der Chromosomen und die Abweichungen vom normalen Bandenmuster erkennen zu können erfordert jedoch ein erfahrenes, geschultes Auge. Die G-Bänderung bietet eine Auflösung von 10Mbp (Millionenbasenpaare), mit der sich Deletionen, Gewinne und Translokationen gut nachweisen lassen. Für spezifische Fragestellungen nach einem bestimmten Locus eines Chromosoms, reicht das Auflösungsvermögen der zytogenetischen Untersuchung nicht aus; kleinere Aberrationen können aufgespürt werden.

4.1.2 Interphase-FISH am Meningeom

Die in situ-Hybridisierung nutzt alternativ zur Karotypisierung die Hybridisierung von markierten DNA-Sonden an komplementären Zielsequenzen im Target (Tumorpräparat) um genomische Veränderungen nachzuweisen. Der große Vorteil gegenüber der konventionellen Karyotypisierung ist, dass die Zellen in der Interphase FISH-Analyse ihrem biologischen Ursprung näher sind als diese aus Zellkultur-Züchtung. Somit ist eine Verbindung zwischen Histomorphologie und genetischer Konstitution der Zelle aufgebaut (Fuller et al., 2002). Mit Hilfe der FISH können an Zellen im nativen Gewebe zuverlässig genetische Veränderungen nachgewiesen werden (Smith et al., 2000) und stellt zusätzlich eine molekularzytogenetische Technik dar, die bis zu 50-100kb auflösen kann. Die Anwendung der FISH-Technik bietet im Vergleich zur konventionellen Karyotypisierung weitere Vorteile. Da die FISH auch am Gewebeschnitt durchgeführt werden kann ist eine Zellkultivierung, die bis zu zwei Wochen andauert, nicht notwendig. Zusätzlich sind weitaus mehr Zellkerne auswertbar als in der klassischen Zytogenetik. In dieser Untersuchung wurden pro Präparat 200 Zellkerne ausgewertet, was die Wahrscheinlichkeit vervielfacht, einen auffälligen Zellklon zu entdecken. Durch den direkten Nachweis am Tumor werden genomische Veränderungen zuverlässig und schnell registriert.

Allerdings weist die FISH auch einige Nachteile auf. Zum einem kann nur eine klar definierte DNA-Sequenz im Präparat detektiert werden, denn die Sondenauswahl fällt je nach Fragestellung aus. Um einen Überblick über Veränderung am Genom zu erhalten ist die in situ-Hybridisierung also nicht Mittel der Wahl.

Die Fehlinterpretation der Sonden stellt ein weiteres Defizit der Methode dar. Im Idealfall ergeben sich klar abgrenzbare, punktförmige Signale. Nicht adäquat hybridisierte Signale, die in Form von Splitsignalen erscheinen, können nicht zur Auswertung verwendet werden. Splitsignale entsprechen einem einzelnen isolierten Signal, das sich jedoch in dicht nebeneinander liegenden Partikeln präsentiert. Wenn sich zwei Signale in unmittelbarer Nähe befinden, kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Splitsignal handeln könnte. Man orientierte sich in dem Fall nach den Kriterien von Hopman et al. (1988), in dem das Signal als eins gilt, wenn der Abstand zweier Signale geringer ist als eine Signalbreite.

Das Auftreten von Fehlerquellen während der Durchführung des Versuchs nach Protokoll kann nicht vermieden werden und stellt eine weitere Möglichkeit für Fehl-Hybridisierungen dar. Bei unzureichend stringenter Waschung können Sonden unspezifische Bindungen am Target eingehen und somit zu Sondenfehlbindungen führen. Dies macht sich bei der Auswertung bemerkbar durch eine Vielzahl falscher Signale und ist Ausgangspunkt falsch positiver Gewinne an Chromosomenmaterial.

Die Verdauzeit mit Proteinase K oder Behandlung mit Formamid stellt ein zusätzliches Kriterium für falsche Ergebnisse dar. Um das umliegende Bindegewebe von Tumorzellkernen zu entfernen sind bis zu 2min 30sec Verdauzeit erforderlich. Dabei kann in einigen Fällen nicht verhindert werden, dass das Enzym die DNA der Zellkerne angreift. Als Resultat kann es bei der Auswertung zu falsch positiven Verlusten kommen. Aus diesem Grund werden Zellkerne, die sich dicht am Schnitttrand des Präparates befinden nicht zur Auswertung hinzugezogen, da sie schon zuvor durch den Schnitt des Skalpell in ihrer Gewebekonstruktion aufgelockert und somit leichter angreifbar durch Substanzen sind.

Weiterhin ist der Umgang mit den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen zu beachten. Die fluoreszierenden Sonden laufen während der Versuche Gefahr auszubleichen. Um dies zu verhindern wird in möglichst lichtarmen Bedingungen gearbeitet und nach der Behandlung möglichst schnell unter dem Mikroskop ausgewertet.

Ebenfalls kann sich je nach Konstitution des Bindegewebes im Tumorpräparat eine adäquate Hybridisierung im Zellkern als schwierig gestalten. Das untersuchte Meningeommaterial zeigt sich je nach Fall sehr kollagenlastig und die Signal-DNA konnte nicht in die Zellkerne gelangen. In Extremfällen konnte auch nach mehrfach veränderten Versuchsprotokollen kein Ergebnis erzielt werden.

Für die Untersuchung in dieser Arbeit wurde das Tumormaterial in -80°C schockgefroren und zu Schnittpräparaten verarbeitet. Die Verwendung von Kryostat-Gewebeschnitten hat den Vorteil, dass die Schnittherstellung des Gewebes ohne längere Vorbehandlung erfolgen kann. Dies bewährt sich insbesondere dann, wenn eine schnelle histologische Diagnose zu stellen ist. Zudem kann verhindert werden, dass Substanzen im Tumorpräparat in Einbettlösungen (z.B. Paraffin) eingehen und ihre biologische Aktivität verlieren.

Während des Schneidvorgangs ist nicht auszuschließen, dass es zu Kernanschnitten und somit zum Verlust von Chromosomenmaterial kommen kann. Dies kann zu falsch positiven Ergebnissen in Hinblick auf Verluste, oder zu falsch negativen Ergebnissen im Falle von Amplifikationen führen. Für die FISH-Untersuchung wurden Gewebeschnitte von $6\mu\text{m}$ Dicke angefertigt, die nach Hopman et al. (1991) geringe Verluste genetischen Materials begünstigt.

Um trotz der Möglichkeiten von Fehl-Hybridisierungen und -Interpretationen korrekte Ergebnisse zu erreichen wurden Kontroll-Hybridisierungen an Lymphozyten von gesunden männlichen Probanden durchgeführt. Je nach Sonde konnte somit eine Vertrauensgrenze ermittelt werden, deren Grenze in allen Sondenklassen unter 8% lag. Um am Tumorgewebe realistische und repräsentative Befunde zu erhalten wurde eine Signifikanzgrenze von 10% definiert und somit Werte unterhalb dieser Grenze als nicht signifikant beurteilt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Bewertung der klinischen Daten

4.2.1.1 WHO-Grad Einteilung

Der WHO-Einteilung zufolge bilden die Grad I Meningeome mit 90% den Löwenanteil, gefolgt von Grad II Meningeomen die in 5-7% der Fälle auftreten. Die Grad III Meningeome machen etwa 1-3% der Meningeome aus. In dieser Dissertationsarbeit sind 22% der Meningeomrezidive den Grad I, 54% den Grad II und 24% den Grad III Meningeomen zugeordnet. Bei den zwölf untersuchten Primärtumoren waren, soweit Daten vorhanden, drei (27,27%) Grad I, sechs (54,54%) Grad II und zwei (18,18%) Grad III Meningeome präsent. Hinsichtlich der Gradeinteilung waren keine Progressionen vom jeweiligen Initialtumor zum Rezidiv erkennbar. Der hohe Anteil an Grad II und III Tumoren, der in dieser Untersuchung anwesenden Meningeomrezidiven, und insbesondere bei den Primärtumoren stimmt somit

überein, dass höhergradige Meningeome ein erhöhtes Risiko an Rezidiventstehungen beeinhalteten. Die WHO-Grad III Tumore sind charakterisiert durch hohe Mitoserate und zeichnen sich im klinischen Bild durch ein invasives schnelles Wachstum aus. Es ist bekannt, dass anaplastische Meningeome häufiger zu Rezidivbildungen neigen als die übrigen Meningeome (Sanson & Cornu, 2000; Louis et al., 2007).

In dieser Arbeit sind Meningeomrezidive mit benigner Einstufung vorhanden. Dies liegt im Einklang mit Untersuchungen, dass nicht selten Grad I Meningeome durch ihr aggressives und invasives biologisches Verhalten auftreten können (Kujas, 1993; Perry et al., 1999; Louis et al., 2000). Die Arbeitsgruppe Al-Mefty (2004) vertreten die Ansicht, dass komplexe genetische Veränderungen im Initialstadium das potentiell aggressive Wachstum eines ursprünglich benignen Meningeoms voraussagen können.

Die Einteilung der Meningeome nach ihrer Morphologie wird kontrovers diskutiert, zumal die biologischen Wachstumsverhältnisse nur unzureichend anhand histopathologischen Kriterien beschrieben werden können (Weber et al., 1997; Ketter et al., 2001; Zang, 2001).

Zülch (1979) postulierte, dass für die Rezidiventstehung wichtigstes Kriterium nicht die Histologie, sondern die Vollständigkeit der Resektion darstellt. Diese Ansicht wird unterstützt anhand der guten Prognosen, die nach einem radikalen operativen Eingriff beobachtet werden (Adegbite et al., 1983; Jellinger, 1988; Scheithauer, 1990; McLean et al., 1993; Rahnenführer et al., 2005).

4.2.1.2 Geschlechtsverteilung

Es ist bekannt, dass Frauen zwei- bis dreimal so häufig an einem Meningeom erkranken wie Männer (Simpson, 1957; Louis et al., 2000). Jedoch wird die Tendenz beobachtet, dass mit steigendem Malignitätsgrad die Differenz zwischen der Geschlechtsverteilung geringer wird (Ketter et al., 2007a). Folgendes konnte in dieser Untersuchung beobachtet werden: Von den 54 Meningeomrezidiven sind in 59,6% der Fälle weibliche und in 40,4% männliche Patienten vertreten, anders ist die Geschlechtsverteilung in Grad III Meningeomen. Sie betrifft je 13 %. Die Neigung, dass männliche Patienten öfter an einem hochgradigen Meningeom erkranken, wird deutlich. In einer Interphase-FISH-Studie von Taberner et al. (2007) wurde veröffentlicht, dass abhängig vom Geschlecht ausgeprägte Chromosomenveränderungen auftreten. Im Klon der Tumorstammzellen von männlichen Patienten wurden häufiger Chromosomenverluste (außer einer einzelnen Monosomie 22) beobachtet, während die

weiblichen Patienten dazu neigten eine isolierte Monosomie 22 sowie des öfteren Chromosomengewinne vorzuweisen. Die Untersuchungen ergaben bei männlichen Patienten eine größere Tumormasse, ein häufiges Auftreten in intrakraniellen Regionen und höhere Rate an Rezidiven mit regelmäßiger Deletion 1p. Dass bei Frauen Chromosomengewinne auftreten können, konnte in dieser Dissertationsarbeit weder an 14q32 noch an 18q21 nachgewiesen werden. Jedoch waren in den untersuchten Fällen, in denen Gewinne von Chromosom 7 und/oder Chromosom 10 vorhanden waren tatsächlich nur weibliche Patienten involviert. Eine Korrelation zwischen Geschlecht und unterschiedlichen Chromosomenalterationen wäre denkbar. In einer Studie an 661 Meningeomen wurde anhand konventioneller Karyotypisierung ein onkogenetisches Modell aufgestellt, dass abhängig vom Geschlecht die bevorzugten stufenweise auftretenden genetischen Veränderungen veranschaulicht (Ketter et al., 2007a).

4.2.1.3 Lokalisation

Um durch einen operativen Eingriff eine Meningeomerkrankung heilen, und somit auch die Rezidiventstehung vermeiden zu können, ist es von Bedeutung in welcher Lokalisation der Tumor auftritt (Simpson, 1957; Jääskeläinen, 1986; Ketter et al., 2007a). An Meningeomen, die im späteren Verlauf mit Rezidivbildungen auffielen, konnte eine ausgeprägte Chromosomenaberration und bevorzugtes Auftreten im Bereich der Konvexität dargestellt werden (Zang & Singer, 1967). Ketter et al. fanden 2008 heraus, dass Meningeome höheren Grades überwiegend in der Konvexität lokalisiert sind. Es wurde an 661 Meningeomen festgestellt, dass in der Region der Konvexität, mit einschließlicher Chromosomenaberrationen von 1p- und Verlust von Chromosom 14, die Rezidivrate mit 9,9% die höchste Rate an Chromosomenanomalien und Rezidivbildungen zeigten. In der Schädelbasisregion konnte das Auftreten von Chromosomenaberrationen deutlich seltener beobachtet werden (3% 1p Deletionen und 2,5% Chromosom 14 Verluste), die Rezidivrate betrug 7,0%. Meningeome im Spinalkanal deuteten auf keine Chromosomenverluste, die Häufigkeit von Rezidiven betrug 2%. In dieser Arbeit waren 24% der Rezidive in der Konvexität lokalisiert, gefolgt von den Regionen im Keilbeinflügel, Olfaktoriusrinne und parasagittal mit jeweils 13%. Im Spinalkanal waren sechs (11,11%) der Fälle lokalisiert, davon waren zwei dem WHO-Grad I, drei Fälle dem WHO-Grad II und ein Fall dem WHO-Grad III zugeordnet. Der Verlust von Chromosom 7 war in nur einem Fall, Verlust von Chromosom 10 in fünf Fällen vorzufinden, deren Verluste lagen meist nur knapp oberhalb der Signifikanzgrenze.

Sowie die Meningeome in der Lokalisation der Konvexität durch ihre anatomisch günstige Lage durch Totalresektion entfernt werden können, so ist diese Region auch der häufigste Auftrittsort an Meningeomen (Wiestler & Reifenberger, 2003) sowie deren Rezidive (Ketter et al., 2008). Die Ursache für die Rezidive an der Konvexität lässt sich dadurch erklären, dass diese einem anderen genetischen Typus entsprechen. Das Karyogramm der Meningeome der Schädelbasisregion zeigt häufiger einen normalen Karyotyp auf, hingegen werden signifikante Chromosomenveränderungen bei den Meningeomen aus der Konvexität festgestellt (Zang & Singer, 1967). In dieser Arbeit wurden kombinierte Verluste von Chromosom 7 und 10 in 19 von 49 Fällen beobachtet. Davon konnten 13 (68%) Fälle der Region der Konvexität zugeordnet werden, vier (21,05%) Fälle der Schädelbasisregion, die übrigen zwei (10,53%) Fälle waren in der Spinalregion lokalisiert. Regionen mit isoliertem Chromosom 10 Verlust verteilten sich von 29 Fällen auf in 15 Fällen (51,72%) in der Konvexitätsregion, zehn (34,48%) Fällen in der Schädelbasisregion und vier (13,79%) Fällen in der Spinalregion. An einem Tumorpräparat konnten weder Verluste von Chromosom 7, noch von 10 beobachtet werden. Dieses Rezidiv stammt aus der Spinalregion und stimmt den Untersuchungen von Ketter et al (2008) überein, dass Chromosomenaberrationen in der Spinalregion weniger häufig anzutreffen sind.

4.2.2 Bewertung der FISH-Signale

Durch die an den Lymphozyten durchgeführten Voruntersuchungen konnte in Erfahrung gebracht werden, wie die Signale im Zellkern in Erscheinung treten. Die FISH-Sonden, die für die Chromosomen 7 und 10 zum Einsatz kamen, erkennen spezifisch ein Heterochromatin, das zentromernah dicht unterhalb des Zentromers lokalisiert ist. Somit kann ein guter Überblick über Gewinn und Verlust eines Chromosoms im Zellkern erfasst werden. Die Verwendung von mehr als einer Sonde bietet den Vorteil, dass eine interne Kontrolle der Hybridisierung möglich ist. Wenn eine Sonde im Zellkern und ihrer benachbarten Region unabhängig von ihrer Anzahl der Signale klar zu erfassen ist, ist das Signal signifikant auswertbar. So können auch homozygote Verluste nachgewiesen werden, wenn die ihr gegenüberstehende Sonde in ihrer Hybridisierungs-Effizienz verlässlich ist. Besonders die Sonde für das Chromosom 10 zeigte sich in ihrer Sondenqualität sehr konstant. Anhand dieser internen Kontrolle im Zellkern konnte davon ausgegangen werden, dass die Signale im Zellkern adäquat hybridisiert waren, wenn entsprechende Signale des Chromosoms 10 zu

erkennen waren. Allerdings neigte diese sehr zu Splitsignalen. Dies gab sich zu erkennen, indem der ganze Zellkern im Cy3 Filter mit leuchtenden Partikeln übersät war. Diese Zellkerne waren nicht geeignet zur Auswertung und entsprechend musste ein anderes Areal auf dem Tumorpräparat fokussiert werden. Die Sonden wurden manuell indirekt markiert und hatten somit zum Vorteil, in ihrer Signalqualität je nach Bedarf verstärkt werden zu können.

Pfisterer et al. (2004) wiesen auf die regionale Heterogenität innerhalb des Tumors hin. In ihrer Studie an 77 Meningeomen (in Paraffin eingebettet) wurden jeweils 8 Areale definiert und mittels FISH untersucht. Sobald weniger als 7 Areale von Chromosomenverlusten betroffen waren, galt dieses Tumorpräparat als regional heterozygot. In Abhängigkeit des WHO-Grades konnte festgestellt werden, dass in Grad I Tumoren überwiegend regional heterozygote als homozygote Verluste auftraten, während mit aufsteigendem Grad die regional homozygoten Verluste den Hauptanteil übernahmen. Dass die Chromosomenveränderungen am Meningeom von Region zu Region unterschiedlich ausfallen können konnte in dieser Dissertationsarbeit während den Auswertungen gut beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, in jedem Meningeompräparat den Fokus auf verschiedene Areale zu richten, was sich in stark kollagenlastigen Fällen als schwierig gestalten konnte, eine adäquat hybridisierte Region aufzufinden. In den Fällen 77/02 und 2004/00 ergaben sich auffällig unterschiedliche Areale, die stark ausgeprägte Verluste von Chromosom 10 präsentierten. Die Intensität von homozygoten Verlusten war extrem auffallend. Beide Präparate sind dem WHO-Grad III zugeordnet und entsprachen jeweils dem ersten Rezidiv des/der Patienten/in. Diese Befunde stehen nicht im eigentlichen Sinne im Zusammenhang mit den Beobachtungen von Pfisterer et al. (2004), der die regionale Heterogenität der Meningeome verständlich zu machen versuchte. Es soll jedoch auf die Bedeutsamkeit der heterogenen Materialbeschaffung des Meningeoms aufmerksam machen, und darauf hinweisen die Fokussierung während der Auswertung nicht auf ein einzelnes Areal zu beschränken.

Die käuflich erworbene Sondenkombination für Chromosom 14 und 18 diente zur spezifischen Untersuchung von Chromosomenloci. Diese entsprechen dem Gen IGH auf 14q32 und MALT1 auf 18q21. Auch diese Sondenkombination lieferte konstante

Hybridisierungsergebnisse mit klar abgrenzbaren Signalen. Der große Vorteil der käuflich erworbenen Sonden war es, den langwierigen Prozess der Detektion und Stringenzwaschung zu umgehen, der bei den indirekt markierten Sonden umgangen werden konnte.

4.2.3 Untersuchungen von Chromosomen 7 und 10

4.2.3.1 Verluste von Chromosomen 7 und 10 in der FISH-Analyse

In einer Untersuchung von Henn et al. (2003) mittels Karyotypisierung an Meningeomen wurde bei 11 von 15 Fällen eine Monosomie 7p festgestellt. Durch das Auftreten in höhergradigen Meningeomen und dem assoziierten Auftreten mit Monosomie 1p wird spekuliert, ob es ein Bestandteil, wenn auch selten eintretend, für die Tumorprogression darstellen könnte (Henn et al., 2003). Ebenfalls in Zusammenhang mit Verlust von 1p wird der Verlust von 7p in Radio induzierten Meningeomen gesehen (Rajcan-Separovic et al., 2003).

In dieser Dissertationsarbeit war das Fehlen von Chromosom 7 in Relation zu den restlichen Chromosomenverlusten gering, wies jedoch im Auftreten eine konstante Frequenz auf: In den Untersuchungen zeigten sich 36,36% (4/11) der Primärtumoren und 38,7% (19/49) der Meningeomrezidiven mit einem Verlust von Chromosom 7. Diese geringe, jedoch konstante klonale Veränderung im Initialtumor könnte einen Anhaltspunkt darauf geben, dass es sich tatsächlich um einen Bestandteil bei Rezidivbildungen der Meningeome halten könnte.

Ein Gewinn von Chromosom 7 konnte in drei Fällen nachgewiesen werden. Der Fall 906/04 wies sowohl eine Trisomie/Tetrasomie von Chromosom 7, als auch von Chromosom 10 auf. Dieser Fall war das einzige Tumorpräparat, in dem signifikante Gewinne von Chromosom 10 gesichtet wurden. Das vorangehende Rezidiv 618/01 zeigte interessanterweise ebenfalls hohe Gewinne von Chromosomen 7 und 10 auf, wenn auch die Werte etwas geringer waren.

Die Befunde stehen in Hinblick auf Chromosom 7 in Kontrast zu den Untersuchungsergebnissen von Espinosa et al. (2006). Demzufolge wurde mittels multicolor iFISH an 25 Meningeomrezidiven ein diploider Chromosomensatz von Chromosom 7 in 15 (79%) Fällen, ein Gewinn in vier (21%) Fällen gefunden, jedoch konnte ein Verlust nicht nachgewiesen werden. Die übrigen Befunde ergaben im Vergleich zu nicht-rezidivierenden Meningeomen sowohl außer einer höheren Proportion an Verlusten von 1p36, 10q, 14q, 18q als auch Gewinne von 1q, Chromosom 7, 9 und 22. Spekulationen, ob es an der unterschiedlichen Auswahl der Analysetechnik liegt sind denkbar, denn Jahre zuvor konnte ebenfalls anhand der multicolor iFISH-Methode eine Trisomy 7 (ohne Chromosom 7 Verluste) an Meningeomen festgestellt werden (Sayaguéz et al., 2004). Andererseits konnte durch Untersuchungen an einer großen Anzahl an Meningeomen gezeigt werden, dass in Gegenwart

von Trisomien/Tetrasomien des Chromosoms 22 zugleich Gewinne an weiteren Chromosomen zum Vorschein kommen (Maillo et al, 2003). Bei den Fällen 1013/98 und 906/04 könnte es sich also um diese relativ selten auftretende hyperdiploide Chromosomenkonstellation handeln, die mit einer erhöhten Rezidiv-Wahrscheinlichkeit assoziiert ist (Ketter et al., 2007b). Die beiden Fälle weisen darauf hin, dass Gewinne von Chromosomen im Rahmen einer komplexen genetischen Aberration mit Rezidivbildungen assoziiert sind. Ungeachtet dessen bleibt weiterhin fraglich, ob das Auftreten von Amplifikationen von Chromosom 7 eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und Rezidiventstehung der Meningeome einnimmt.

Der Verlust von Chromosom 10 konnte in den Primärtumoren in 72,72% und in 98% der Fälle in Meningeomrezidiven nachgewiesen werden. Der Verlust von 10q wird in der Literatur mit 5-10% in Grad I, 29-40% in Grad II und 40-58% in Grad III Meningeomen angegeben. Dass Abnormitäten an Chromosom 10 in den Chromosomenaberrationen der Meningeome involviert ist, konnte von vielen Studien belegt werden (Rempel et al., 1993; Lopez-Gines et al., 1995; Simon et al., 1995; Simon et al., 1996; Weber et al., 1997; Lamszus et al., 1999; Ozaki et al., 1999; Sayagués et al., 2002). Rempel et al. (1993) wiesen auf die Korrelation von LOH an Chromosom 10 mit malignen Meningeomen hin.

Hingegen konnten nur in Fall 906/04 Gewinne von Chromosom 10 registriert werden. Dieser Fall entsprach in seiner histologischen Gradeinteilung dem Grad II Meningeom und war das dritte Rezidiv der Patientin. In der Mehrzahl waren ausgeprägte Verluste von Chromosom 10 in den Grad II und III Meningeomen vorzufinden. Dies lässt vermuten, dass der Verlust von Chromosom 10 mit Meningeomen höheren Grades assoziiert ist. In einer LOH-Studie von Mihaila et al (2003a) konnte eine Korrelation zwischen Allelverlust von Chromosom 10 und Tumorlokalisierung beobachtet werden. Demzufolge wird spekuliert, dass genetische Differenzen für die Erscheinungen der Tumore in unterschiedlichen Regionen verantwortlich sind. So z.B. war eine LOH von D10S89 assoziiert mit Tumoren, die ausschließlich in der Sphenoid-Region auftreten. Andererseits wurden bei Tumoren, ausschließlich in der posterior fossa Region lokalisiert, keine LOH von D10 S580, D10S 217, D10S179 registriert. Wenn diese Vermutungen bestätigt werden, könnten anhand LOH-Analysen an Chromosom 10 Prognosestellungen möglich werden, in welcher Lokalisation ein Hirntumor bei einem Patienten auftreten wird. Dies könnte neben den bildgebenden Verfahren zur Diagnosestellung des Hirntumors einen bedeutenden Fortschritt darstellen und Entscheidungen zur optimalen Therapiemethode effizienter gestalten.

4.2.3.2 Untersuchungen der konventionellen Karyotypisierung

Von 33 mittels konventioneller Karyotypisierung untersuchten Fällen konnten nur vier Fälle mit einem Verlust von Chromosom 10 und zwei Fälle mit einem Verlust von Chromosom 7 nachgewiesen werden. Dieser enorme Unterschied zu den Ergebnissen der FISH-Analyse kann nicht nur auf das geringe Auflösungsvermögen der konventionellen Karyotypisierung zurückgeführt werden. Es ist bekannt, dass in Untersuchungen an Metaphasechromosomen grundsätzlich weniger Aberrationen gefunden werden, als im Nativmaterial (Weber, 1997; Zang, 2001). Da in der Regel 15 Mitosen für einen Fall ausgewertet werden und davon meist nur eine deutlich geringere Anzahl an Metaphasen untersucht werden, ist die Wahrscheinlichkeit im Gegensatz zu den 200 ausgezählten Zellkernen in der FISH-Untersuchung gering, aberrante Klone aufzufinden. Es besteht die Möglichkeit, dass durch den großen Anteil an Bindegewebe des Meningeoms in der Zellzüchtung die Fibroblasten mit normalen Karyotyp die Meningeomzellen überwachsen haben. Da es sich im Gegensatz zur Karyotypisierung bei den in der FISH-Analyse eingesetzten Sonden um Zentromersonden handelt, die nah am Zentromer binden, müsste in der zytogenetischen Untersuchung diese Veränderung nicht zu übersehen sein. Fazit: Die klassische zytogenetische Untersuchungsmethode bietet einen guten Überblick im Bezug auf Chromosomenveränderungen, vorausgesetzt eine hohe Anzahl an Mitosen wird ausgewertet. Da die Züchtung an Tumorzellen das schwächste Glied der Kette darstellt, bleibt die FISH-Analyse im Bezug auf Fragestellung nach spezifischer Chromosomenaberration die Methode der Wahl.

4.2.4 Untersuchungen von Chromosomen 14 und 18

Die Verluste am langen Arm der Chromosomen 14 und 18 korrelieren mit einem aggressiven Wachstumsverhalten der Meningeome und stellen ein progression-assoziiertes Ereignis dar (Menon et al., 1997; Weber et al., 1997). Ebenfalls nach dem genetischen Stufenschema, das 2005 von Beerenwinkel et al. in einem onkogenetischen Baumdiagramm zusammengefasst worden ist, stellen Verluste von Chromosomen 14 und 18 neben den „Schrittmachern“ Monosomie 22 und 1p- weitere Ereignisse der Tumorprogression dar. Die Häufigkeit der Aberrationen am langen Arm des Chromosom 14 wird angegeben als 30% bei Grad I, 40-57% für Grad II und 55-100% für Grad II Meningeome (Simon et al., 1995; Menon et al., 1997; Tse et al., 1997; Weber et al., 1997; Leone et al., 1999; Cai et al., 2001). Der Verlust von Chromosom 18 wird in benignen Meningeomen kaum beobachtet, wobei dieser bei Grad II und Grad III Meningeomen in ca. 43% der Fälle vorliegt (Weber et al.,

1997). Der 100%ige Verlust von 18q21 im Befund der Dissertationsarbeit könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei den untersuchten Tumoren um Rezidive bzw. Initialtumoren handelt, die in ihrem Verlauf Rezidive aufwiesen. Dieses aggressive Wachstumsverhalten der untersuchten Fälle könnte mit Verlusten von 18q21 in Zusammenhang stehen.

4.2.4.1 Verluste von 14q32 und 18q21 in der FISH-Analyse

Nach einem Verlust von 22q steht in Zusammenhang mit Tumorprogression außer Deletion 1p der Verlust eines 14q als häufig darauffolgendes Ereignis (Lekanne et al., 1995; Schneider et al., 1995; Simon et al., 1995; Perry et al., 1996; Boström et al., 1997; Tse et al., 1997; Weber et al., 1997; Ishino et al., 1998; Leone et al., 1999; Lamszus et al., 1999; Louis et al., 2000; Sawyer et al., 2000). Das Auftreten von 14q Verluste trifft sich häufig an bei histologisch gutartig kategorisierten Meningeomen, die trotz großflächiger Totalresektion zum Rezidiv neigen (Cai et al., 2001). Eine FISH-Untersuchung von Cai et al. (2001) an 180 Meningeomen ergab, dass rezidivierende Meningeome eine signifikant höhere Rate an 14q Deletionen in sich bergen als im nicht-rezidivierendem Meningeom (17% vs 50%). Zusätzlich korreliert ein 14q Verlust beim anaplastischen Meningeom mit einer geringeren allgemeinen 3 Jahres-Überlebenszeit von 20,5%, im Vergleich zu 68,6% Überlebensaussicht, wenn keine 14q Deletion vorgefunden wurde.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit in Addition von Untersuchungen von Diplom Biologin Fr. Pöhler, ergaben in allen FISH-Analysen den Verlust von 14q32. Darunter befinden sich elf Grad I und 26 Grad II Meningeomrezidive von insgesamt 53 untersuchten Fällen. Ebenfalls in den Primärtumoren waren in 100% aller Fälle signifikante Verluste der Chromosomenloci nachweisbar. Da es sich im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eingesetzten FISH-Sonden um Locus-spezifische Sonden handeln, die das IGH-Gen auf Chromosom 14 detektieren, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Loci auf 14q im Verlauf der Progression in ihrer Konstellation Veränderungen aufweisen können. Fakt ist, dass Verluste auf Chromosom 14 mit dem aggressiven Wachstumsverhalten von Meningeomen korrelieren.

Die Erscheinung der Verluste von 18q21 konnte in Unabhängigkeit des WHO-Grades in 100% aller untersuchten Fällen beobachtet werden. Unterschiede zu 14q32 ergaben sich lediglich im Ausmaß der Verluste. Zusätzlich konnte in den Befunden eine Neigung beobachtet werden, indem im gleichen Tumormaterial der Verlust von Chromosom 10 in Korrelation zu 14q32, aber unabhängig vom Auftreten einer Deletion 18q21 zu bestehen schien. Eine unregelmäßige Intensität an Verlusten wurde an einem Fall mit vier nachfolgenden Rezidiven erläutert (s.

Seite 62), indem es zu mehr oder weniger ausgeprägten Verlusten kam. In Hinblick auf die ausnahmslos signifikanten Verluste beider Chromosomenloci kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese beiden Ereignisse einen relevanten Bestandteil der Ursache zur Rezidiverscheinungen der Meningeome darstellen könnten.

4.2.5 Die genetischen Veränderungen im Vergleich zwischen Primärtumor und Rezidiv

Espinosa et al. (2006) führten Untersuchungen durch, die am Meningeom einen direkten Vergleich an chromosomalen Veränderungen zwischen Primärtumor und seinem Rezidiv verschaffen sollten. Interessanterweise fanden sich in 74% der Fälle die komplexen genetischen Veränderungen die im Primärtumor entdeckt wurden, im Rezidiv wieder. In den übrigen Fällen wurde beobachtet, dass sich im Rezidiv zu den ursprünglichen Chromosomenaberrationen entweder neue Zellklone mit komplexeren Karyotyp hinzufügten, oder der Klon mit bedeutendster Präsenz verschwand. Die Befunde dieser Dissertationsarbeit ergaben die Tendenz, dass im Laufe der Rezidiverscheinung ein komplexerer Karyotyp auftrat. Bei allen Tumoren konnten Verluste von 14q32 und 18q21 beobachtet werden. In einem Fall, in Tabelle 3.8 (s. Seite 68) als Nr.3 angegeben, waren im Primärtumor zusätzlich Gewinne von Chromosomen 7 und 10 zu sehen. Im Verlauf zur Rezidivbildung konnte beobachtet werden, dass Nr. 2 und 3 zusätzlich an Chromosomen 7 und 10 verlierten. Zwei sonstige Fälle, Nr.1 und 4, beinhalteten bereits im Initialstadium neben Deletion 14q32 und 18q21 den Verlust von Chromosom 10. Beim folgenden Rezidiv kam zu dieser Konstellation in einem Fall der Verlust von Chromosom 7 hinzu, der andere Fall behielt das genetische Ausfallmuster des Primärtumors. Bei Nr. 2 und 3 handelt es sich um WHO-Grad II, bei Nr. 1 und 4 um WHO-Grad III Meningeome. Der früh auftretende Verlust von Chromosom 10 beim Primärtumor maligner Entität konnte beobachtet werden. Das könnte bedeuten, dass neben Chromosom 14 und 18, auch das Chromosom 10 beim Initialtumor ein Hinweis auf spätere Rezidivbildung geben kann. Ob es sich beim Verlust von Chromosom 7 um ein genetisches Ereignis handeln könnte, dass erst im späteren Verlauf des Rezidivs auftritt, bleibt fraglich. In Tabelle 3.8 sind Fälle von wiederholt erscheinenden Rezidiven aufgeführt, indem ein eher diskontinuierliches Auftreten vom Verlust dieses Chromosoms sichtbar wird. Beobachtungen, die mit Gewinnen von Chromosom 7 und 10 einhergehen, sind in diesen Untersuchungen bislang nur bei WHO-Grad II Meningeomen zu sehen. Da es sich um eine relativ geringe Anzahl an ausgesuchten

Meningeomrezidiven und Primärtumoren handelt, könnte eine weiterführende Analyse an einem größeren Tumorkollektiv zur Bestätigung der Chromosomengewinne beitragen.

In den Untersuchungen wurden Chromosom 22 und 1p nicht miteinbezogen; Beobachtungen, ob sich mit weiteren Rezidiven Veränderungen an diesen beiden Chromosomen bemerkbar machen, und ob diese Veränderungen mit bestimmten sekundären Chromosomenaberrationen assoziiert sind, sollten durchgeführt werden.

4.3 Zytogenetische Aspekte der Meningeome

4.3.1 Der primäre Verlust eines Chromosoms 22

Im Jahre 1972 (Zang, 1982) wurde erstmals eine Monosomie 22 in Meningeomen beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt wusste man weder von der Existenz von Onkogenen noch von Tumorsuppressorgenen. Die Zytogenetiker gingen damals davon aus, dass eine quantitative Imbalance ausreichen würde, eine Tumorentstehung zu bedingen, so wie es Boveri 1914 postuliert hatte. Da Meningeome generell langsam wachsende, gutartige Tumoren sind, ging man zunächst davon aus, dass mit der Monosomie 22 ein wichtiges Kontrollgen der Wachstumskontrolle verloren gegangen sei und diese „Haploinsuffizienz“ zu einem langsamen, aber unaufhaltsamen Wachstum der arachnoidalen Zellen führt (Singer & Zang, 1970).

Das Problem bei den Meningeomen war jedoch, dass das zweite Chromosom 22 intakt erschien. Eine Erklärung für dieses Phänomen lieferte Knudson im Jahre 1971. Er konnte mit Hilfe epidemiologischer Daten den „two-step“ Mechanismus beschreiben. Der erste Schritt bestand in einer Mutation und einer sich hieraus ergebenden Haploinsuffizienz des betreffenden Gens. In einem zweiten Schritt wurde dann das zweite korrespondierende Gen durch Methylierung ausgeschaltet.

Diese Theorie wird bis heute für das Meningeom angenommen, jedoch bislang nie bewiesen. In vielen Studien (Zang & Singer, 1967; Zankl & Zang, 1972; Zankl & Zang, 1980; Kepes, 1982; Zang, 1982; Dumanski et al., 1987; Dumanski et al., 1990; Bello et al., 1994; Wellenreuther et al., 1995; Niedermayer et al., 1997; Weber et al., 1997; Sulman et al., 1998; Al-Mefty et al., 2004) konnte, wie auch durch unsere eigenen Ergebnisse gezeigt werden, dass in einer signifikanten Anzahl von Meningeomen dem Verlust eines Chromosom 22, zusätzliche Verluste kompletter Chromosomen oder Chromosomenabschnitte folgen. Diese

zunehmende Hypodiploidisierung ist stark korreliert mit einer zunehmenden atypischen oder anaplastischen Morphologie der Tumore und einer zunehmenden Aggressivität (Bello et al., 1994; Ketter et al., 2001; Sayagués et al., 2004; Ketter et al., 2007). Diese Hypodiploidisierung steht im Gegensatz zu der sehr häufigen Hyperdiploidisierung der überwiegenden Zahl solider Tumoren (Mitelman, 2008).

Hypodiploidie ohne Verlust eines Chromosoms 22 ist ein sehr seltenes Ereignis. Dies könnte durch submikroskopische Deletionen oder Mutationen von einem oder mehreren Genen auf Chromosom 22 erklärt werden, wie dies auch als Erklärung für die Meningeome mit mikroskopisch unauffälligem Karyotyp diskutiert wird (Zang, 2001).

Die Korrelation der zunehmenden Aneuploidisierung, welche auf wenige Chromosomen beschränkt bleibt, konnte auch durch LOH Studien (Rempel et al., 1993; Lindblom et al., 1994; Schneider et al., 1995; Leone et al., 1999) und CGH Studien bestätigt werden (Weber et al., 1997). Zytogenetische Studien konnten zeigen (Zang, 2001), dass nicht nur die zunehmende Hypodiploidie auftritt, sondern es sich vielmehr primär um klonale Verluste der Chromosomen 14, 18 und 19 betreffend handelt, wobei auch sekundär die Chromosomen 6 und 10 betroffen sein können. Weitere Chromosomen-Verluste wurden nur selten beschrieben (Lekanne Deprez et al., 1995; Weber et al., 1997; Leone et al., 1999). Interessanterweise konnte Weber (1997) Gewinne von Chromosom 1 in jungen Patienten mit anaplastischen Meningeomen sowie Gewinne auf 9q, 12q, 15q, 17q und 20 nachweisen.

Die Suche nach Kandidatengenen auf Chromosom 14 ergab, dass das $\beta 1$ spectrin Gen in der sehr häufig auf Chromosom 14 deletierten Region lokalisiert ist (Simon et al., 1995). Dieses Protein ist jedoch nur in die Zytoplasma-Membran-Zytoskelett Interaktion von Erythroid Zellen eingebunden, wohingegen das $\beta 2$ spectrin Gen, welches für ein Protein mit gleicher Funktion in fast allen anderen Geweben kodiert, auf Chromosom 2p21 lokalisiert ist, einer Region, die in der Meningeomproliferation bislang keine Bedeutung inne hat. Interessanterweise interagiert $\beta 2$ spectrin mit Merlin und es fehlt in fast allen Schwannomen und auch in einigen Meningeomen (Scoles et al., 1998). Auf der Suche nach möglichen Tumorsuppressorgenen untersuchte Menon (1997) mit Hilfe der LOH atypische und anaplastische Meningeome, wie dies zuvor schon mit Hilfe der klassischen Zytogenetik geschehen war (Katsuyama et al., 1986; Al Saadi et al., 1987). Sie beschrieben eine distale Region auf Chromosom 14 zwischen 14q24.3 und 14q32.3 als Ort eines möglichen Tumorsuppressorgens. Diese Region beinhaltet das ELK-2 Gen. Diese generell als „proto

Onkogene“ bezeichneten Gene scheinen bei der Tumorbildung eine wichtige Rolle zu spielen. Ein großer Nachteil dieser Untersuchungen ist jedoch das Menon nur nach LOH auf Chromosom 14 suchte, und Veränderungen auf Chromosom 1p komplett ausließ, sodass seine Schlussfolgerungen auf einem unvollständigen Datensatz ruhen.

Die Arbeitsgruppe um Maillo (2003) konnten zeigen, dass genetische Aberrationen das Chromosom 14 oder 14q betreffend, häufiger in männlichen Meningeompatienten detektiert wurden als in Weiblichen. Sie sahen sich durch diese Befunde in von ihnen zuvor beschriebenen Beobachtungen (Sayagués et al., 2004) bestätigt, in denen sie unterschiedliche genetische Entwicklungsschritte für Meningeome in Abhängigkeit des Geschlechtes spekuliert hatten. Die Schlussfolgerung dieser Arbeitsgruppe, dass es sich bei der Deletion 14 oder 14q um einen unabhängigen prognostischen Faktor in der Meningeomentwicklung handelt, konnte in einer Studie von Ketter et al. an einem sehr großen Patientenkollektiv widerlegt werden (Ketter et al., 2007a).

Viele Kandidatengene auf Chromosom 18q konnten bezüglich der Meningeomprogression ausgeschlossen werden (Büschges et al., 2002). Allerdings werden Membran gebundene, zur 4.1 Proteinfamilie zählende Proteine wie das DAL-1 als Tumorsuppressorgen in Meningeomen diskutiert (Perry et al., 1999; Gutman et al., 2000). Dal-1 ist auf 18p11.3 lokalisiert. Gutmann (2000) fand bei seiner Untersuchung einen DAL-1 Verlust als ein frühes Ereignis in 30-70% der Meningeome, jedoch nicht in Schwannomen. In Bezug zu den zytogenetisch beschriebenen Verlusten von Chromosom 18, welcher auch in unseren vorliegenden Daten ein seltenes Ereignis darstellt, erscheint diese Verlustrate jedoch unerwartet hoch.

4.3.2 Der sekundäre Verlust eines kurzen Armes eines Chromosom 1

Der Verlust eines kurzen Armes eines Chromosom 1 [1p-] ist die häufigste progressionsassoziierte strukturelle Chromosomenaberration in Meningeomen (Singer & Zang, 1970; Zang, 1982; Bello et al., 1994; Henn et al. 1995; Steudel et al., 1996; Niedermayer et al., 1997; Perry et al., 1997; Müller et al., 1999; Perry et al., 1999; Louis et al., 2000; Ketter et al., 2001; Zang, 2001; Perry et al., 2004; Sayagués et al., 2004; Kim et al., 2006; Ketter et al., 2007a; Ketter et al., 2007b) und ist signifikant mit steigendem Rezidivrisiko korreliert (Sanson & Cornu, 2000; Ketter et al., 2001). Durch FISH Studien an Meningeomgewebeschnitten konnte die Deletion 1p in 70% der atypischen und allen anaplastischen Meningeomen detektiert

werden (Müller et al., 1999). Zytogenetische und LOH Studien zeigten gleichermaßen, dass es sich hierbei um komplette und partielle Verluste von Chromosom 1 handelt (Boström et al., 1997; Ishino et al., 1998; Sulman et al., 1998; Leuraud et al., 2000; Schuttle et al., 2001).

Es konnte bereits in vielen Studien ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von 1p und dem Tumorprogress bei Meningeomen nachgewiesen werden. FISH an Ausstrichpräparaten von Tumorbiopsien ergaben fehlende 1p Signale (D1Z1) in einigen gewöhnlichen Meningeomen (WHO-Grad I), als Hinweis auf die sehr frühe Entstehung und klonalen Vermehrung der Zellen mit 1p- im Laufe der Meningeomprogression (Müller et al., 1999). Alle bis heute zur Verfügung stehenden Daten deuten darauf hin, dass nicht die Stärke der Hypodiploidisierung, sondern der Verlust eines kurzen Armes eines Chromosom 1 den entscheidenden Schritt im Tumorprogress darstellt (Singer & Zang, 1970; Zang, 1982; Bello et al., 1994; Henn et al. 1995; Steudel et al., 1996; Niedermayer et al., 1997; Perry et al., 1997; Müller et al., 1999; Perry et al., 1999; Louis et al., 2000; Ketter et al., 2001; Zang, 2001; Perry et al., 2004; Sayagués et al., 2004; Kim et al., 2006; Ketter et al., 2007a; Ketter et al., 2007b). Dies steht im Einklang mit den Befunden, dass in anaplastischen Meningeomen die Deletion 1p in nahezu allen Fällen zu finden ist. Betrachtet man die kritische Bruchpunkt-Region auf 1p, so muss das kritische Gen sehr distal lokalisiert sein.

Vor über vier Jahrzehnten berichteten Friede (1956) und Osske und Jänisch (1967) über die unterschiedliche Expression der ALPL in Meningeomen (Niedermayer et al, 1997). Allerdings konnte keine klare Korrelation mit dem Tumorgrad oder einem Subtyp gefunden werden. ALPL ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (1p34-1p36.1) lokalisiert, welche sehr nahe der hypervariablen Region D1Z2. In einigen FISH Studien an Gewebeschnitten konnte eine Korrelation zwischen dem Verlust von 1p und einem Verlust der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden (Niedermayer et al, 1997; Müller et al., 1999; Zang, 2001; Kim et al., 2006).

Im Jahre 2004 stellten Al-Mefty et al. eine Studie vor, in der es ihnen gelungen war, bei 11 Patienten mit Meningeomenrezidiven den Primärtumor, sowie die Rezidivtumore zytogenetisch zu untersuchen. Sie konnten an diesem bislang einzigartigen Patientengut nachweisen, dass sich die entscheidenden zytogenetischen Veränderungen (1p- und -14) für die spätere Progression der Tumore bereits in den Primärtumoren nachweisen lies und sich diese Klone dann in den Rezidivtumoren ohne weitere Hypodiploidisierung fortsetzten (Al Mefty et al., 2004). Dies zeigt, dass sich die genetischen Marker schon bei histologisch noch unauffälligen Meningeomen nachweisen lassen und der Tumor im Laufe seiner Progression dann erst langsam seinen „Phänotyp“ dem ihm zugrunde liegende „Genotyp“ anpasst.

4.4 Chromosomale Aberrationen bei Tumorprogression und Meningeomrezidiven

4.4.1 Tumorprogression

Der Verlust von 1p stellt die häufigste Chromosomenaberration dar, die mit Progression des Meningeoms assoziiert ist (Weber et al., 1997; Bello et al., 2000; Sanson & Cornu, 2000; Zang, 2001). Das Kandidaten-Gen auf 1p36.12, das die ALPL exprimiert konnte beim höhergradigen Meningeom eine gute Korrelation zum Verlust von 1p herstellen (Niedermayer et al., 1997).

LOH-Studien konnten nachweisen, dass bei 27-50% der atypischen Meningeome der Verlust an Heterozygotie von 10q vorliegt (Rempel et al., 1993; Simon et al., 1995; Weber et al., 1997). Auf der Region 10q23.3 befindet sich ein Kandidaten-Gen, das PTEN-Gen (Li et al., 1997). In einer Studie von Lee et al. (2004) wurde beobachtet, dass zwei Mikrosatelliten-Loci, D10S520 und D10S1173, signifikant mit dem Auftreten von atypischen und anaplastischen Meningeomen korrelierten. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde an Meningeomrezidiven und Primärtumoren mit wenigen Ausnahmen signifikante Verluste von Chromosom 10 festgestellt. Das Fehlen eines Chromosoms 10 bzw. 10q scheint in der Tumorprogression und Rezidiverscheinung eine potentielle Rolle einzunehmen. Allerdings sind die Allelverluste von Chromosom 10 so komplex ausgestaltet, das bislang noch keine konstante Region definiert werden konnte (Lamszus et al., 2004).

Das Auftreten von 14q-Deletionen ist charakteristisch für die Tumorgenese des Meningeoms und ist assoziiert mit höheren Rezidivraten (Tse et al., 1998; Cai et al., 2001). Maillo et al. (2003) sind der Ansicht, dass Aberrationen an Chromosom 14 einen unabhängigen Prognosefaktor darstellen. In einer Untersuchung von Cai et al. (2001) wurde mittels FISH an 180 Meningeomen eine LOH-Studie durchgeführt. In jener Studie konnten Verluste von 14q in 31% der benignen, 57% der atypischen und 67% der anaplastischen Meningeomen festgestellt werden. In dieser Dissertationsarbeit waren alle untersuchten Meningeome mit einem Verlust von 14q32 assoziiert. Besonders bei Grad III Meningeomen konnte ein beachtlicher Verlust beobachtet werden und somit die Ansicht von Cai et al. (2001) und Tse et al. (1998) teilen, dass Rezidivbildungen mit Deletionen von Chromosom 14 korrelieren. Aus der Hinsicht, dass alle Tumorpräparate mit Aberrationen an Chromosom 14 einhergehen, kann eine signifikante Korrelation zwischen Rezidivrisiko und diesem Chromosomenverlust angenommen werden.

Dass genetische Alterationen im benignen Status der histologisch malignen Progression vorausgehen, konnte in einer Untersuchung an 11 Meningeomen gezeigt werden (Al-Mefty et al., 2004). Al-Mefty et al. vertreten in jener Untersuchung die Ansicht, dass die Tumorprogression von einem histologisch benignen Meningeom in einen höhergradigen Meningeom mit einer stufenweise erfolgenden genetischen Entwicklung assoziiert ist. So könnte durch molekularzytogenetische Untersuchungen an Initialtumoren eine Voraussage für die potentielle Malignität der Neoplasie gestellt werden, und könnte somit den Stellenwert der genetischen Evolution als Prognosekriterium erhöhen.

4.4.2 Meningeomrezidive

Die meisten Meningeome, die dem WHO-Grad I zugehören, werden in ihrem Wachstumsverhalten ihrer entsprechenden Histologie gerecht und können nicht nur durch operative Totalresektion geheilt werden, sondern gelten auch als risikofrei für eine Rezidiventstehung. Die Rezidivrate ist offenkundig bei anaplastischen Meningeomen höher als beim common-type Meningeom (Sanson & Cornu, 2000; Louis et al., 2007). Tatsächlich jedoch kann sich ein Grad I Meningeom mit einem großflächigen invasiven Tumorwachstum präsentieren (Kujas, 1993; Perry et al., 1999; Louis et al., 2000). Die Rezidiverscheinung nach einer kurativen Operation ist die bedeutendste Komplikation der Meningeome, der in etwa ein Viertel aller Patienten erliegen (Lamszus et al., 1999; Fewings et al., 2000; Ketter et al., 2001; Mihaila et al., 2003). Obwohl für die Entstehung von Rezidiven vorhersagekräftige Faktoren bekannt sind, bleibt dennoch der Großteil ihrer biologischen Verhaltensweisen ungeklärt (Espinosa et al., 2006).

Der gegenwärtige Standard für die Diagnosestellung und Prognoseschätzung des Meningeoms wird den klinischen und pathologischen Befunden zugesprochen. Vor allem die Vollständigkeit der initialen Tumorresektion ist eines der wichtigsten Faktoren, die einen Einfluss auf die Rezidivbildung ausüben können (Simpson 1957; Adegbite et al., 1983). Während einer chirurgischen Therapie besteht das Risiko, dass während des operativen Eingriffs durch „Tumor seeding“, Mikroinvasionen in die lymphatischen Gefäße, oder eine mikroskopisch inkomplette Resektion des Tumors ein Nachwachsen des Meningeoms induziert werden kann. Ebenfalls kann im Individuum durch genetische Disposition oder Umweltbeeinflussung ein weiteres Meningeom entstehen und somit ein Rezidiv vortäuschen. Zusätzlich gilt, dass Patientenalter <40, männliches Geschlecht und ungünstige Lokalisationen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit mit einem Rezidiv einhergehen, jedoch

erschwert das individuelle Wachstumsverhalten der Meningeome eine Vorhersage der Prognose (Marks et al., 1986; Perry et al., 1997; Perry et al., 1999; Louis et al., 2000). Im Falle einer inkompletten Resektion unterscheiden sich die Überlebenszeiten von atypischen und malignen Meningeom nicht signifikant voneinander (Palma et al., 1997). Jääskeläinen et al. (1986a) betrachteten die Resektion nach Simpson Grad I und II als „komplette Resektion“, um in einer späteren Studie herauszufinden, dass die Koagulation der Dura mater (Simpson Grad II) im Vergleich zur Exzision (Simpson Grad I) die Rezidivrate um das zweifache erhöht (Jääskeläinen et al., 1986b).

Die progressionsfreie Zeit der Tumore, die in dieser Arbeit vertreten sind, lag bei durchschnittlich 80,7 Monaten. Bei wiederholten Rezidiven verkürzte sich diese auf 31,6 Monate. Anscheinend verhält sich die progressionsfreie Zeit zur Rezidivanzahl umgekehrt proportional. In Korrelation mit dem WHO-Grad wird dem anaplastischen Meningeom eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit zugesprochen, nach kompletter Resektion ein Rezidiv zu entwickeln (Perry et al., 1999). Die atypischen Meningeome laufen in 40% der Fälle Gefahr, innerhalb der ersten fünf Jahre Rezidivbildungen aufzuweisen. In dieser Arbeit lag die progressionsfreie Zeit für die WHO-Grad III Meningeome zwischen 25,8 und 2,4 Monaten und bestätigt somit die schnelle Rezidiventwicklung und aggressive Natur dieser Tumorentität.

Obwohl die Monosomie 22 im Meningeom ein grundlegendes Ereignis darstellt, wurde sowohl bei Tumorprogression (Benedict et al., 1970; Zankl et al., 1971; Rey et al., 1988; Casartelli et al., 1989; Lopez-Ginés et al., 1989) als auch beim Rezidiv (Benedict et al., 1970; Mark, 1973; Al Saadi et al., 1987; Rey et al., 1988; Casartelli et al., 1989; Zankl & Zang, 1980; Strachan et al., 1989; Westphal et al., 1989) ein komplexerer Karyotyp als eine isolierte Monosomie 22 vorgefunden. Außer Frage steht jedoch, dass der Verlust von 22q signifikant assoziiert ist mit Rezidiverscheinungen (Pfisterer et al., 2004). In einer Zellkultur Studie von Lopez-Gines et al. (1995) an 10 Meningeomrezidiven konnte in nur einem Fall ein isolierter Verlust von Chromosom 22 nachgewiesen werden. Der Befund ergab eine überwiegende Hypodiploidie mit komplexem Karyotyp und strukturelle Umordnung der Chromosomen. Die Chromosomen, die im übrigen die häufigsten Verluste aufweisen sind 7, 9, 10, 14, 15, 18, 22 und Y. Diese Veränderungen gehen bekanntlicherweise einher mit erhöhtem aggressiven Verhalten (Mark, 1971; Al Saadi et al., 1987; Casartelli et al., 1989; Zankl & Zang, 1980; Meloni et al., 1991).

Spezifische Chromosomenanomalien wie Deletion 1p36, Monosomie 14, Gewinn von Chromosom 22 sowie ein komplexer Karyotyp sind assoziiert mit schlechtem outcome und gehen einher mit erhöhten Rezidivrisiken und verkürzter Rezidiv-freier Überlebenszeit (Lopez-Gines et al., 1995; Lamszus et al., 1999; Cerda-Nicolas et al., 2000; Maillo et al., 2000; Cai et al., 2001; Maillo et al., 2003; Al-Mefty et al., 2004; Taberero et al., 2005). Der Verlust eines Chromosom 1 gilt längst als Risikofaktor für eine Rezidiventstehung (Steudel et al., 1994; Müller et al., 1999; Ketter et al., 2001; Zang, 2001). Insbesondere das vermehrte Auftreten von Deletion 1p in Kombination mit zusätzlichen Chromosomenaberrationen (inkl. Chromosom 22) konnte beobachtet werden (Ketter et al., 2001). Die Kombination von Deletion 1p36 und Monosomie 14 in der Tumorstammzelle im histologisch benignen Meningeom ist assoziiert mit einer hohen Wahrscheinlichkeit, nach einer Resektion an einem Rezidiv zu erkranken (Maillo et al., 2007). Mihaila et al. (2003a,b) untersuchten an 208 Meningeomen 11 unterschiedliche Mikrosatellitenloci auf Chromosom 10. LOH auf D10S209 (10q26.12) und D10S169 (10q26.3) konnten jeweils mit kürzerer Überlebenszeit und/oder verkürzter Zeit bis zur Rezidivrisiko assoziiert werden. In dieser Dissertationsarbeit konnte an vier Patienten, die eine Serie an Rezidiven aufwiesen (siehe Tabelle 4.8) fortwährende Verluste von Chromosomen 10, 14 und 18 nachgewiesen werden. Diese drei Chromosomenaberrationen scheinen somit kontinuierliche Bestandteile eines genetischen Modells zu sein, dass sich in Rezidiven als komplexes Muster klonaler Veränderungen darstellt.

Dass genetische Alterationen im benignen Status der histologisch malignen Progression vorausgehen (Al-Mefty et al., 2004), konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da sich die Rezidive in ihrem wiederholten Auftreten histologisch nicht von ihrem Vorgänger unterscheiden. Jedoch Beobachtungen, dass Rezidivrisiken mit neuen chromosomalen Veränderungen einhergehen können, die anhand dieser neuen Klone den Karyotyp in seiner Komplexität erhöhen (Espinosa et al., 2006), gehen mit Befunden dieser Arbeit konform. In Tabelle 4.8 wurde veranschaulicht, dass sich während einer Rezidivbildung vom Primärtumor neue Chromosomenverluste addierten. Dies waren in dieser Arbeit die Chromosomen 7 und 10, da Verluste von 14q32 und 18q21 in allen Fällen gefunden wurden. Die untersuchten Primärtumoren zeigten ausnahmslos Deletionen von 14q32 und 18q21 die besonders beim WHO-Grad III Meningeomen mit hohem Ausmaß hervorstachen. Der Verlust von Chromosom 10 war in 72,72% der Fälle bei den Primärtumoren zu beobachten, was sich bei den Rezidiven mit 98% manifestierte. Die multicolor iFISH-Untersuchung von Espinosa et al. (2006) richtete den Fokus erstmals auf einen direkten Vergleich der genetischen Evidenz am

Primärtumor und Rezidiv im Individuum. In den meisten Fällen konnte beobachtet werden, dass exakt der identische Tumor Zellklon der im Primärtumor entdeckt wurde, ebenfalls im Rezidiv anzutreffen war. In den übrigen Fällen war ebenfalls eine Verbindung zum Initialtumor vorhanden mit dem Unterschied, dass entweder neue Chromosomenaberrationen zum Vorschein kamen, oder der bisherig repräsentativste Zellklon im Primärtumor verschwand.

Um das Risiko für eine Rezidiverscheinung abzuschätzen, werden außer den zytogenetischen Parametern auch immunhistochemische Marker zum Einsatz gebracht. Die Formation der peritumoralen Ödeme liefert einen Hinweis auf die vermehrte VEGF Expression (Zang, 2001). VEGF ist involviert in Vaskulogenese (Samoto et al., 1995; Ferrara et al., 1996a; Goldman et al., 1997; Provias et al., 1997), endothelialer Zellproliferation und -migration (Senger et al., 1983; Ferrara et al., 1989), vaskulärer Permeabilität (Goldman et al., 1997; Provias et al., 1997) und Stromadegeneration bis hin zur Aktivierung von proteolytischen Enzymen, die mitverantwortlich für Tumorinvasivität und -angiogenese sind (Ferrara et al., 1996 b). In einer Studie von Yamasaki et al. (2000) konnte demonstriert werden, dass eine hohe Expression von VEGF einen ausschlaggebenden Punkt für die Entstehung eines Meningeomrezidivs darstellt. Im Gegensatz zu VEGF negativen Meningeomen, die sich während der gesamten nachfolgenden Periode rezidivfrei verhielten, konnte an Meningeomen mit stark positiver VEGF Expression eine hohe Rate an Rezidivbildungen festgestellt werden. Umgekehrt sind alle Meningeomrezidive von einem peritumoralen Ödem umgeben, dass induziert worden ist durch die VEGF Sekretion (Goldman et al., 1997; Provias et al., 1997; Yoshioka et al., 1999). Weil VEGF zusätzlich in der Lage ist, Zellen (evtl. auch Tumorzellen) zu mobilisieren (Sanson & Cornu, 2000) und diese somit innerhalb des Gehirns streuen können, sind multiple Meningeome oder Rezidive abseits der initialen Läsion möglich. Das könnte der Theorie, das rezidivierende und multiple Meningeome monoklonalen Ursprungs sind, Unterstützung bieten (Zhu et al., 1999; von Deimling et al., 1999).

Andere Untersuchungen konzentrieren sich auf den Proliferationsmarker MIB-1/Ki-67, einem monoklonalem Antikörper der mit Nuklei, die sich in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklusses befinden Immunreaktionen eingehen kann. Der MIB-1 labeling index (MIB-1 LI) ergibt sich aus dem prozentualen Anteil an MIB-1 positiven Zellen in Relation zur Gesamtzahl an Tumorzellen (Takei et al., 2007). Diesem Marker wird eine gute Korrelation mit histologischer Einteilung (Amatya et al., 2001; Nakasu et al., 2001) und Rezidiventstehung (Perry et al., 1998; Nakasu et al., 2001) zugeschrieben. Ein Nachteil ist, dass sich

die Färbungsmethoden und Interpretation der Ergebnisse von Labor zu Labor allzu sehr unterscheiden (Perry et al., 2004). Die Festlegung des cut-offs für die rezidivierenden Meningeome variiert je nach Autor (Matsuno et al., 1996; Perry et al., 1998; Nakasu et al., 2001; Ho et al., 2002) und somit kann nicht eindeutig festgestellt werden, wann ein MIB-1 LI eine signifikante Aussage über das Rezidivverhalten des Meningeoms geben kann.

4.5 GPS und onkogenetisches Baumdiagramm

Das GPS (genetic progression score), das 2007 von Ketter et al. vorgeschlagen wurde, macht sich die Tatsache zu nutze, dass die Chromosomenaberrationen im Meningeom einem Stufenschema klonaler Evolution folgen. Ein hoher GPS konnte signifikant bei Glioblastompatienten sowohl mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert werden (Rahnenführer et al., 2005) als auch mit dem Zeitfenster bis zur Rezidiventstehung bei Meningeompatienten (Ketter et al., 2007a). Die Daten wurden von 661 Meningeompatienten entnommen und in einem onkogenetischen Baumdiagramm von Beerenwinkel et al. (2005) präsentiert. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Meningeome in ihrer Progression durch unvollständige Resektion beeinflusst werden, wurden in jener Studie ausschließlich Tumore angewendet, deren Exzision dem Simpson Grad I und II entsprachen. Je mehr genetische Veränderungen auftreten, desto höher ist der GPS. Die GPS-Gruppe 0 weist Meningeome mit einem normalen Karyotyp auf, ein Meningeom der GPS-Gruppe 1 beinhaltet den Verlust eines Chromosom 22. Bei der GPS-Gruppe 2 werden außer Monosomie 22 die Deletion von 1p mit/ohne weitere Chromosomenaberrationen gesichtet. Die Monosomie 22 und der zusätzliche Verlust von 1p bilden die Werte 1,88 und 6,39. Ein $\text{GPS} > 6,39$ korreliert mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und verkürztem Intervall bis zur Rezidiventstehung.

Basierend auf den gemeinsamen Ergebnissen aus dieser Doktorarbeit und Voruntersuchungen zeigte der GPS im Durchschnitt einen Wert von 7,84. Die Chromosomenanalyse beschränkte sich auf Chromosomen 22, 1p36, 14, 18, 10 und 7; bei Vervollständigung der zytogenetischen Untersuchungen könnte sich der reale Wert nochmals erhöhen. Da es sich bei den Fällen um Rezidive handelt, laufen die Ergebnisse der Untersuchung mit der Theorie, dass beim malignen Prozess ein komplexer Karyotyp mit vielen Chromosomenaberrationen auftritt, konform. Ebenso die Beobachtung, dass ein höherer GPS mit einer höheren

histologischen Gradeinteilung korreliert (Ketter et al., 2007a) und ein hoher WHO-Grad zwingend mit einem hohen GPS einhergeht, stimmte mit den Befunden überein: von 29 Fällen entsprachen fünf (17,24%) Fälle dem WHO-Grad I, 18 (62,07%) Fälle dem Grad II und sechs (20,69%) Fälle dem Grad III Meningeom.

Von den 29 Fällen erfüllen 100% eines GPSs über 7,31, dieser Wert steht weit über der definierten 6,39 Grenze, die mit erhöhter Rezidivrscheinung einhergeht. Für die Therapie des Meningeompatienten entscheidende Tatsache ist jedoch, dass sich diese komplexen Chromosomenaberrationen bereits im Initialstadium des Meningeoms aufweisen lassen und somit in die individuelle optimale Therapie eingeleitet werden können. In dieser Dissertationsarbeit sind bereits bei den Primärtumoren Chromosomenverluste nachgewiesen worden, die bekanntlicherweise mit einem aggressivem Wachstum einhergehen. Diese Chromosomenaberrationen konnten unabhängig vom WHO-Grad beobachtet werden und zeigten ein stufenweise auftretendes Muster. Sie liefern somit ein Argument dafür, dass für eine prognostische Aussage des Meningeoms die genetischen Veränderungen als ein Kriterium unabdingbar sind.

Aus den Befunden lässt sich schließen, dass das GPS ein weitgehend von morphologischer Klassifikation unabhängiger Prädiktor zur Rezidiventstehung darstellen könnte, das in Kombination mit Lokalisation und WHO-Grad eine noch detaillierte Aussage über das biologische Verhalten geben, und somit in der Therapieoption des Patienten von entscheidender Relevanz sein könnte.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte mit Hilfe von FISH-Analysen Chromosomenverluste an Meningeomen zur Kenntnis gebracht werden. Anhand dieser Methode wurde im Vergleich zur konventionellen Karyotypisierung mit geringem Zeitaufwand die Untersuchung am Nativpräparat möglich. Obgleich die FISH mit dem Nachteil der Fehlinterpretierung der Sonden-Signalen verbunden ist, bietet sie den großen Vorteil, bestimmte Loci auf einem Chromosom zu identifizieren. Der Verlust von Chromosom 7 und besonders des Chromosoms 10 deuten auf eine Korrelation mit Rezidivrisiko hin. Da bislang auf Chromosom 7 und 10 keine spezifischen Regionen ausgemacht werden konnten, die signifikant mit Progression oder Rezidivbildung assoziieren, wäre es sinnvoll Locus-Kartierungen der jeweiligen Chromosomen durchzuführen.

Neue Erkenntnisse, dass Tumorzellen von Tumorstammzellen abstammen und sich im späteren Verlauf differenzieren, scheinen eine weitere Möglichkeit zu sein, das Verhalten der Meningeome zu verstehen. Eine Investition in Tumorstammzellforschung an Primärtumoren und deren Rezidiven erscheint als aktuell angemessen.

Anhand des GPS konnten Korrelationen zwischen histologischer Gradeinteilung und Rezidiverscheinung beobachtet werden. Die untersuchten Chromosomenveränderungen betreffen die Chromosomen 7, 10, 14 und 18. Weitere zytogenetische Untersuchungen der Chromosomenverluste 6 und 19 sowie Verluste der Geschlechts-Chromosomen könnten am Meningeomrezidiv den GPS vervollständigen und mehr Aussagekraft verleihen. So könnte eine signifikante Aussage anhand der zytogenetischen Komplexität beim Initialtumor als Prognosefaktor für die Tumorprogression geschaffen werden.

Um die Hypothese zu bestätigen, dass bereits im Initialstadium anhand eines komplexen genetischen Ausfallsmusters die Prognose für Rezidiverscheinungen gestellt werden kann, erscheint es als sinnvoll, die FISH-Untersuchungen von Chromosomenveränderungen weiterzuführen. Eine fortführende Untersuchung der Chromosomen-Veränderungen vom Primärtumor bis zum Rezidiv könnte somit den Prognosewert der genetischen Untersuchung erhöhen. Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Untersuchungen der Chromosomen 7 und 10, teils 14q32 und 18q21 durchgeführt worden sind, sollten neben den repräsentativsten Chromosomen 22 und 1p, die „sekundären“ Chromosomen wie 6, 9, 19, X und Y untersucht werden, um einen Überblick über das biologische Fortschreiten der Meningeome zu gewinnen. Anhand Untersuchungen an Meningeomrezidiven konnte gezeigt werden, dass diese mit einer komplexen genetischen Veränderung einhergehen. Die Fortsetzung der genetischen Ursachenforschung der Meningeomentstehung und deren Verhalten zur malignen Progression bzw. Rezidiv könnten für den Patienten in Hinblick auf Prognose und Therapie von essentieller Bedeutung sein.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Adams EF, Schrell UM, Fahlbusch R, Thierauf P: Hormonal dependency of cerebral meningiomas. Part 2: in vitro effect of steroids, bromocriptine, and epidermal growth factor on growth of meningiomas. **J Neurosurg** 73:750-755, 1990.
- (2) Adegbite AB, Khan MI, Paine KW, Tan LK: The recurrence or intracranial meningiomas after surgical treatment. **J Neurosurg** 58(1):521-56, 1983.
- (3) Al-Mefty O, Kadri PA, Pravdenkova S, Sawyer JR, Stangeby C, Husain M: Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. **J Neurosurg** 101:210-218, 2004.
- (4) Al Saadi A, Latimer F, Maderic M, Robbins T: Cytogenetic studies of human brain tumors and their clinical significance. II. Meningioma. **Cancer Genet Cytogenet** 26:127-141, 1987.
- (5) Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K, Kurisu K, Nishisaka T, Fukuhara T, Inai K: Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21^{WAF1}, and p27^{KIP1} expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. **Human Pathol** 32:970-975, 2001.
- (6) Beerenwinkel N, Rahnenführer J, Däumer M, Hoffmann D, Kaiser R, Selbig J, Lengauer T: Learning multiple evolutionary pathways from cross-sectional data. **J Comput Biol** 12(6):584-98, 2005.
- (7) Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey A: Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. **Genes Chrom Cancer** 9:296-298, 1994.
- (8) Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Kusak ME, Sarasa JL, Rey A: High-resolution analysis of chromosome arm 1p alterations in meningioma. **Cancer Genet Cytogenet** 120:30-36, 2000.

- (9) Benedict WF, Porter IH, Brown CD, Florentin RA: Cytogenetic diagnosis of malignancy in recurrent meningioma. **Lancet** 1:971-973, 1970.
- (10) Biegel JA, Parmiter AH, Sutton LN, Rorke LB, Emanuel BS: Abnormalities of chromosome 22 in pediatric meningiomas. **Genes Chrom Cancer** 9:81-87, 1994.
- (11) Bigner SH, Mark J, Mahaley MS, Bigner DD: Patterns of the early, gross chromosomal changes in the malignant human gliomas. **Hereditas** 101(1):103-113, 1984.
- (12) Black PM: Meningiomas. **Neurosurgery**. 32(4):643-57, 1993. Review.
- (13) Borowich B, Doron Y, Braun J, Guilburd JN, Zaaroor M, Goldsher D, Lemberger A, Gruszkiewicz J, Feinsod M: Recurrence of intracranial meningiomas: the role played by regional multicentricity. Part 2. Clinical and radiological aspects. **J Neurosurg** 65:168-171, 1986.
- (14) Borowich B, Doron Y: Recurrence of intracranial meningiomas: the role played by regional multicentricity. **J Neurosurg** 64:58-63, 1986.
- (15) Boström J, Mühlbauer A, Reifenberger G: Deletion mapping of the short arm of chromosome 1 identifies a common region of deletion distal to D1S496 in human meningiomas. **Acta Neuropathol** 94:479-485, 1997.
- (16) Boström J, Meyer-Puttli B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G: Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16[INK4a]), p14(ARF), CDKN2B (p15[INK4b]), and CDKN2C (p18[INK4c]) in atypical and anaplastic meningiomas. **Am J Pathol** 159:661-669, 2001.
- (17) Büschges R, Boström J, Wolter, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G: Analysis of human meningiomas for aberrations of the MADH2, MADH4, APM-1, and DCC tumor suppressor genes on the long arm of chromosome 18. **Int J Cancer** 92: 551-554, 2001.

- (18) Büschges R, Ichimura K, Weber RG, Reifenberger G, Collins VP: Allelic gain and amplification on the long arm of chromosome 17 in anaplastic meningiomas. **Brain Pathol** 12(2):145-53, 2002.
- (19) Cai DX, Banerjee R, Scheithauer BW, Lohse CM, Kleinschmidt-Demasters BK, Perry A: Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subsets of meningioma: diagnostic and prognostic implications. **J Neuropathol Exp Neurol** 60:628-636, 2001.
- (20) Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM: Progesterone receptor expression in meningiomas. **Cancer Res** 53: 1312-1316, 1993.
- (21) Casalone R, Simi P, Granata P, Minelli E, Giudici A, Butti G, Solero CL: Correlation between cytogenetic and histopathological findings in 65 human meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 45:237-243, 1990.
- (22) Casartelli C, Rogatto SR, Neto JB: Karyotypic evolution of human meningiomas: Progression through malignancy. **Cancer Genet Cytogenet** 40:33-45, 1989.
- (23) Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C, Peydro-Olaya A et al.: Histological and cytogenetic patterns in benign, atypical, and malignant meningiomas. Does correlation with recurrence exist? **Int J Surg Pathol** 2:301-310, 1995.
- (24) Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C, Perez-Bacete M, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A: Histopathological and cytogenetic findings in benign, atypical and anaplastic human meningiomas: a study of 60 tumors. **J Neurooncol** 47:99-108, 2000.
- (25) Chen HJ, Liang CL, Lu K, Lin JW, Cho CL: Implication of telomerase activity and alterations of telomere length in the histologic characteristics of intracranial meningiomas. **Cancer** 89:2092-2098, 2000.
- (26) Chozick BS, Reinert SE, Greenblatt SH: Incidence of seizures after surgery for supratentorial meningiomas: a modern analysis. **J Neurosurg** 84(3):382-6, 1996.
- (27) Cushing H, Eisenhardt L: Meningiomas: Their classification, Regional Behaviour, Life History, and Surgical End Results. Charles C. Thomas, Springfield, 1938.

- (28) DeAngelis LM: Brain tumor. **N Engl J Med** 344:114-123, 2001.
- (29) Desper R, Jiang F, Kallioniemi OP, Moch H, Papadimitriou CH, Schäffer AA: Inferring tree models for oncogenesis from comparative genome hybridization data. **J Comput Biol** 6:37-51, 1999.
- (30) De Vitis LR, Tedde A, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Bono P, Grammatico B, Grammatico P, Radice P, Bigozzi U, Montali E, Papi L: Analysis of the neurofibromatosis type 2 gene in different human tumors of neuroectodermal origin. **Hum Genet** 97:638-641, 1996.
- (31) Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP & Nordenskjöld M: Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. **Proc natl Acad Sci, USA** 84: 9275-9279, 1987.
- (32) Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjöld M, Collins VP: Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. **Cancer Res** 50:5863-5867, 1990.
- (33) Espinosa AB, Taberner MD, Maíllo A, Sayagués JM, Ciudad J, Merino M, Alguero MC, Lubombo AM, Sousa P, Santos-Briz A, Orfao A: The cytogenetic relationship between primary and recurrent meningiomas points to the need for new treatment strategies in cases at high risk of relapse. **Clin Cancer Res** 1;12(3 Pt 1):772-780, 2006.
- (34) Falchetti ML, Larocca LM, Pallini R: Telomerase in brain tumors. **Childs Nerv Syst** 18:112-117, 2002.
- (35) Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature** 380:439-442, 1996a.
- (36) Ferrara N: Vascular endothelial growth factor. **Eur J Cancer** 32A:2413-2422, 1996b.
- (37) Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 161:851-858, 1989.

- (38) Fewings PE, Battersby RD, Timperley WR: Long-term follow up of progesterone receptor status in benign meningioma: a prognostic indicator of recurrence? **J Neurosurg** 92:401-405, 2000.
- (39) Fialkow PJ: Clonal origin of human tumors. **Annu Rev Med** 30:135-143, 1979.
- (40) Foulds L: Tumor progression. **Cancer Res** 17(5):355-6, 1957.
- (41) Friede R: Über Glykogen und alkalische Phosphatase in Hirntumoren und ihre biologische Bedeutung. **Virchows Arch** 328: 469-480, 1956.
- (42) Fuller CE, Wang H, Zhang W, Fuller GN, Perry A: High-throughput molecular profiling of high-grade astrocytomas: the utility of fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays (TMA-FISH). **J Neuropathol Exp Neurol** 61(12):1078-1084, 2002.
- (43) Gall JG, Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proc Natl Acad Sci, USA** 63: 378-383, 1969.
- (44) Gerber MA, Bahr SM, Gutmann DH: Protein 4.1B/differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1 functions as a growth suppressor in meningioma cells by activating Rac1-dependent c-Jun-NH(2)-kinase signaling. **Cancer Res** 15;66(10):5295-5303, 2006.
- (45) Giombini S, Solero CL, Lasio G, Morello G: Immediate and late outcome of operations for Parasagittal and falx meningiomas. Report of 342 cases. **Surg Neurol** 21:427-435, 1984a.
- (46) Giombini S, Solero CL, Morello G: Late outcome of operations for supratentorial convexity meningiomas. Report on 207 cases. **Surg Neurol** 22:588-594, 1984b.
- (47) Goldman CK, Bharara S, Palmer CA, Vitek J, Tsai JC, Weiss HL, Gillespie GY: Brain edema in meningiomas is associated with increased vascular endothelial growth factor expression. **Neurosurgery** 40:1269-1277, 1997.

- (48) Greenberg CR, Evans JA, McKendry-Smith S, Redekopp S, Haworth JC, Mulivor R, Chodirker BN: Infantile hypophosphatasia: localization within chromosome region 1p36.1-34 and prenatal diagnosis using linked DNA markers. **Am J Hum Genet** 46(2):286-92, 1990.
- (49) Greider CW: Telomerase activation. One step on the road to cancer? **Trends Genet** 15:109-112, 1999.
- (50) Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G: Philadelphia chromosome breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. **Cell** 36(1):93-9, 1984.
- (51) Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A: Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependimomas and schwannomas. **Neurology** 49: 267-270, 1997.
- (52) Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Newsham IF: Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. **Hum Mol Genet** 12;9(10):1495-1500, 2000.
- (53) Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, Maher ER: Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. **J Neurosurg** 84:847-851, 1996.
- (54) Hartmann C, Sieberns J, Gehlhaar C, Simon M, Paulus W, von Deimling A: NF2 mutations in secretory and other rare variants of meningiomas. **Brain Pathol** 16(1):15-9, 2006.
- (55) Heisterkamp N., Stephenson J.R., Groffen J., Hansen P.F., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G: Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. **Nature** 306:239-42, 1983.
- (56) Henn W, Cremerius U, Helde G, Lippitz B, Schröder JM, Gilsbach JM, Büll U, Zang KD: Monosomy 1p is correlated with enhanced in vivo glucose metabolism in meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 79:144-148, 1995.

- (57) Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Reichardt S, Freiler A, Zang KD: Monosomy 7p in meningiomas: a rare constituent of tumor progression. **Cancer Genet Cytogenet** 1;144(1):65-68, 2003.
- (58) Hitotsumatsu T, Iwaki T, Kitamoto T, Mizoguchi M, Suzuki SO, Hamada Y, Fukui M, Tateishi J: Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: An immunohistochemical study. **Acta Neuropathol** (Berl) 93: 225-232, 1997.
- (59) Ho DMT, Hsu CY, Ting LT, Chiang H: Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas: a proposal of diagnostic criteria for patients with atypical meningioma. **Cancer** 94:1538-1547, 2002.
- (60) Hopman AH, Ramaekers FC, Raap AK, Beck JL, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP: In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. **Histochemistry** 89(4):307-316, 1988.
- (61) Hopman AH, van Hooren E, van de Kaa CA, Vooijs PG, Ramaekers FC: Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. **Mod Pathol** 4(4):503-513, 1991.
- (62) Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET: Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. **J Neurosurg** 86:113-120, 1997.
- (63) ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (F Mitelman, ed)(S Karger, Basel 1995).
- (64) Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, Inazawa J: Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. **Cancer** 83:360-366, 1998.
- (65) Jääskeläinen J, Haltia M, Servo A: Atypical and anaplastic meningiomas: Radiology, surgery, radiotherapy and outcome. **Surg Neurol** 25:233-242, 1986a.

- (66) Jääskeläinen J: Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: Late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. **Surg Neurol** 26:461-469, 1986b.
- (67) Jagadha V, Deck JH: Massive cerebral edema associated with meningioma. **Can J Neurol Sci** 14(1):55-58, 1987.
- (68) Jellinger K: Histopathological features predicting recurrence of meningiomas after (sub)total resection. **Clin Neuropathol** 7:174, 1988.
- (69) Jiménez-Lara AM, Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Kusak ME, Pestana A: Cytogenetics of human meningiomas: an analysis of 125 cases. **Cancer Genet Cytogenet** 63:174, 1992.
- (70) John H, Birnstein M, Jones K: RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature** 223: 582-587, 1969.
- (71) Katsuyama J, Pepenhausen PR, Herz F, Gazivoda P, Hirano A, Koss LG: Chromosome abnormalities in meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 22:63-68, 1986.
- (72) Kepes JJ: Meningiomas: Biology, Pathology, and Differential Diagnosis. New York: Masson Publishing, 1982.
- (73) Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, König J, Zang KD, Steudel WI: Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. **J Neurosurg** 95:601-607, 2001.
- (74) Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, Steudel WI, Zang KD, Rahnenführer J: Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. **Int J Cancer** 1;121(7):1473-1480, 2007a.
- (75) Ketter R, Kim YJ, Storck S, Rahnenführer J, Romeike BF, Steudel WI, Zang KD, Henn W: Hyperdiploidy defines a distinct cytogenetic entity of meningiomas. **J Neurooncol** 83(2):213-221. , 2007b.

- (76) Ketter R, Rahnenführer J, Henn W, Kim YJ, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Urbschat S: Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningioma. **J Neurosurg** 62(1):61-9; discussion 69-70, 2008.
- (77) Kim YJ, Ketter R, Henn W, Zang KD, Steudel WI, Feiden W: Histopathologic indicators of recurrence in meningiomas: correlation with clinical and genetic parameters. **Virchows Arch** 449(5):529-538, 2006.
- (78) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: The new WHO classification of brain tumours. **Brain Pathol** 3:255-268, 1993.
- (79) Kleihues P, Cavenee WK (eds.): World Health Organization Classification Of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press: Lyon, 2000.
- (80) Knudson Jr AG: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc natl Acad Sci, USA** 68: 820-823, 1971.
- (81) Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel WI, Zang KD, Feiden W: Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. **Acta Neurochir (Wien)** 137(3-4):174-81, 1995.
- (82) Koper JW, Markstein R, Kohler C, Kwekkeboom DJ, Avezaat CJ, Lamberts SW, Reubi JC: Somatostatin inhibits the activity of adenylate cyclase in cultured human meningioma cells and stimulates their growth. **J Clin Endoc Metab** 74:543-547, 1992.
- (83) Kros J, de Greve K, van Tilborg A, Hop W, Pieterman H, Avezaat C, Lekanne Dit, Deprez R, Zwarthoff E: NF2 status of meningiomas is associated with tumor localization and histology. **J Pathol** 194:367-372, 2001.
- (84) Kujas M: Meningioma. **Curr Opin Neurol** 6:882-887, 1993.
- (85) Kunert-Radek J, Stepień H, Radek A, Pawlikowski M: Somatostatin suppression of meningioma cell proliferation in vitro. **Acta Neurol Scand** 75:434-436, 1987.

- (86) Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI: NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. **Genes** 17:1090-1100, 2003.
- (87) Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M: Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. **Cancer Genet Cytogenet** 110:103-110, 1999.
- (88) Lamszus K: Meningioma pathology, genetics, and biology. **J Neuropathol Exp Neurol** 63: 275-286, 2004.
- (89) Landow H, Kabat EA, Newman W: Distribution of alkaline phosphatase in normal and neoplastic tissues of the nervous system. **Arch Neurol** 48:518-30, 1942.
- (90) Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC Jr, Wright WE, Shay JW: Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. **Hum Pathol** 28:416-420, 1997.
- (91) Lantos P.L., VandenBerg S.R., Kleihues P: Tumours of the nervous system. In: Greenfield's Pathology, Graham D.I., Lantos P.L. (eds) 6th ed. Arnold: London. pp. 583-879, 1996.
- (92) Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, Golubić M: Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas. **Neurosurgery** 40(3):578-587, 1997.
- (93) Lee JYK, Finkelstein S, Hamilton RL, Rekha R, King Jr J, Omalu B: Loss of heterozygosity analysis of benign, atypical, and anaplastic meningiomas. **Neurosurgery** 55:1163-1173, 2004.
- (94) Lejeune J, Turpin R, Gautier M: Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. **Ann Genet** 1: 41-49, 1959.
- (95) Lekanne Deprez RH, Groen NA, Louz D, Hagemeyer, van Drunen E, Koper JW, Avezaat CJ, Bootsma D, van der Kwast TH, Zwarthoff EC : Constitutional DNA-level aberrations in chromosome 22 in a patient with multiple meningiomas. **Genes Chromosom Cancer** 9 :124-128, 1994.

- (96) Lekanne Deprez RH, Riegman PH, van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ, Koper JW, Avezaar CJJ, Mulder PGH, Zwarthoff EC, Hagemeyer A: Cytogenetic, molecular genetic and pathological analysis in 126 meningiomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 54:224-235, 1995.
- (97) Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Sarasa JL, Pestaña A, Rey JA: NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. **Oncogene** 18:2231-2239, 1999.
- (98) Leuraud P, Dezamis E, Aguirre-Cruz L, Taillibert S, Lejeune J, Robin E, Mokhtari K, Boch AL, Cornu P, Delattre JY, Sanson M: Prognostic value of allelic losses and telomerase activity in meningiomas. **J Neurosurg** 100:303-309, 2004.
- (99) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science** 275:1943-1947, 1997.
- (100) Lichter P: Multicolor FISHing: what's the catch? **Trends Genet** 13(12):475-9, 1997. Review.
- (101) Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP: Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. **Int J Cancer** 56:354-357, 1994.
- (102) Logan JA, Seizinger BR, Atkins L, Martuza RL: Loss of the Y chromosome in meningiomas: a molecular genetic approach. **Cancer Genet Cytogenet** 45:41-47, 1990.
- (103) Lopez-Ginés C, Piquer J, Cerda-Nicolas M, Barcia-Salorio JL, Barcia-Marino C: Meningiomas: karyotypes and histological patterns. **Clin Neuropathol** 8:130-133, 1989.
- (104) Lopez-Ginés C, Cerda-Nicolas M, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A: Cytogenetical findings of recurrent meningiomas. A study of 10 tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 85:113-117, 1995.

- (105) Louis DN, Ramesh V, Gusella JF: Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumors. **Brain Pathol** 5: 163-172, 1995.
- (106) Louis DN, Budka H, von Deimling A: Meningiomas, in Kleihues P, Cavenee WK (eds): Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1997, pp 134-141.
- (107) Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ: Meningiomas, in Kleihues P, Cavenee WK (eds): Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System: World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, IARC Press, 2000, pp176-184.
- (108) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK: WHO Classification of tumours of the central nervous system. **IARC, Lyon**, 2007.
- (109) Lunsford LD: Contemporary management of meningiomas: radiation therapy as an adjuvant and radiosurgery as alternative to surgical removal? **J Neurosurg** 80: 187-190, 1994.
- (110) Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H: Classic, atypical, and anaplastic meningioma: Three histopathological subtypes of clinical relevance. **J Neurosurg** 77:616-623, 1992.
- (111) Maillo A, Diaz P, Sayagués JM, Blanco A, Taberero MD, Ciudad J, Lopez A, Goncalves JM, Orfao A: Gains of chromosome 22 by fluorescence *in situ* hybridization in the context of an hyperdiploid karyotype are associated with aggressive clinical features in meningioma patients. **Cancer** 92:377-385, 2001.
- (112) Maillo A, Orfao A, Sayagués JM, Diaz P, Gomez-Moreta JA, Caballero M, Santamarta D, Santos-Briz A, Morales F, Taberero MD: New classification scheme for the prognostic stratification of meningioma on the basis of chromosome 14 abnormalities, patient age, and tumor histopathology. **J Clin Oncol** 21:3285-3295, 2003.
- (113) Maillo A, Orfao A, Espinosa AB, Sayagués JM, Merino M, Sousa P, Taberero ML, Taberero MD: Early recurrences in histologically benign/ grade I meningiomas are associated with large tumors and coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone. **Neuro Oncol** 9(4):438-446, 2007.

- (114) Mahmood A, Caccamo DV, Tomecek FJ, Malik GM: Atypical and malignant meningiomas: a clinicopathological review. **Neurosurgery** 33:955-963, 1993.
- (115) Maltby EL, Ironside JW, Battersby RDE: Cytogenetic studies in 50 meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 31:199-210, 1988.
- (116) Mark J: Origin of the ring chromosome in a human recurrent meningioma studied with G-band technique. **Acta Pathol Microbiol Scand** (Sec A) 81:588-590, 1973.
- (117) Mark J: Karyotype patterns in human meningiomas. A comparison between studies with G- and Q-banding techniques. **Hereditas** 75:213-220, 1973.
- (118) Mark J: Chromosomal abnormalities and their specificity in human neoplasm: an assessment of recent observations by banding techniques. **Adv Cancer Res** 24: 165-222, 1977.
- (119) Marks S, Whintwell H, Lye R: Recurrence of meningiomas after operation. **Surg Neurol** 25:436-440, 1986
- (120) Martuza RL: Genetics in neurooncology. **Clin Neurosurg** 31:417-440, 1983.
- (121) Matsuno A, Fujimaki T, Sasaki T, Nagashima T, Ide T, Asai A, Matsuura R, Utsunomiya H, Kirino T: Clinical and histopathological analysis of proliferative potentials of recurrent and non-recurrent meningiomas. **Acta Neuropathol** 91:504-510, 1996.
- (122) McLean CA, Jolley D, Cukier E, Giles G, Gonzales MF: Atypical and malignant meningiomas: importance of micronecrosis as a prognostic indicator. **Histopathology** 23:349-35, 1993
- (123) Meloni A, Morgan R, Bridge J, Erling MA, Lewin RJ, Sandberg AA: Cytogenetic findings in typical and atypical meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 51:35-39, 1991
- (124) Menon AG, Ruttler JL, Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW: Frequent loss of chromosome 14 in atypical and

- malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. **Oncogene** 14:611-616, 1997.
- (125) Merel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Moreau-Aubry A, Bijisma EK, Lazaro C, Moisan JP, Resche F, Nishisho I, Estivill X, Delattre JY, Poisson M, Theillet C, Hulsebos T, Delattre O, Thomas G: Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. **Genes Chrom Cancer** 13:211-216, 1995.
- (126) Mihaila D, Jankowski M, Gutiérrez JA, Rosenblum ML, Newsham IF, Böglér O, Rempel SA: Meningiomas: Loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. **Clin Cancer Res** 9:4443-4451, 2003a.
- (127) Mihaila D, Gutiérrez JA, Rosenblum ML, Newsham IF, Böglér O, Rempel SA: Meningiomas: Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in tumor progression and the delineation of four regions of chromosomal deletion in common with other cancers. **Clin Cancer Res** 9:4435-4442, 2003b.
- (128) Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL: Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. **J Neurosurg** 62:18-24, 1985.
- (129) Mitelman F.27.02.2008: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- (130) Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel W-I, Zang KD, Steilen-Gimbel H: Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. **Clin Cancer Res** 5:3569-3577, 1999.
- (131) Nakano T, Asano K, Miura H, Itoh S, Suzuki S: Meningiomas with brain edema. Radiological characteristics on MRI and review of the literature. **J Clin Imaging** 26:243-249, 2002.
- (132) Nakasu S, Li DH, Okabe H, Nakajima M, Matsuda M: Significance of MIB-1 staining indices in meningiomas: comparison of two counting methods. **Am J Surg Pathol** 25:472-478, 2001.

- (133) Nelson PK, Setton A, Choi IS, Ransohoff J, Berenstein A: Current status of interventional neuroradiology in the management of meningiomas. **Neurosurg Clin N Am** 5(2):235-259, 1994.
- (134) Niedermayer I, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Zang KD: Loss of alkaline phosphatase activity in meningiomas: a rapid histochemical technique indicating progression-associated deletion of a putative tumor suppressor gene on the distal part of the short arm of chromosome 1. **J Neuropathol Exp Neurol** 56:879-886, 1997.
- (135) Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocyte leukemia. **Science** 132: 1497, 1960.
- (136) Nowel PC: The clonal evolution of tumor cell populations. **Science** 194:23-28, 1976.
- (137) Nowell PC: Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res** 46:2203-2207, 1986.
- (138) Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M et al.: Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. **Mol Carcinog** 8:74-80, 1993.
- (139) Osske G, Jänisch W: Zur Histochemie der Meningeome. **Acta Neuropathol** 9: 290-297, 1967.
- (140) Ozaki S, Nishizaki T, Ito H, Sasaki K: Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. **J Neurooncol** 41:167-174, 1999.
- (141) Palma L, Celli P, Franco C, Cervoni L, Cantore G: Long-term prognosis for atypical and malignant meningiomas: A study of 71 surgical cases. **J Neurosurg** 86:793-800, 1997.
- (142) Papi L, De Vitis LR, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, Bigozzi U: Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. **Hum Genet** 95:347-351, 1995.

- (143) Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW: Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic implications. **Cancer** 77:2567-2573, 1996.
- (144) Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM: Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. **Am J Surg Pathol** 21(12):1455-65, 1997.
- (145) Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM: The prognostic significance of MIB-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. **Cancer** 82:2262-2269, 1998.
- (146) Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC: "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. **Cancer** 1: 85(9):2046-2056, 1999.
- (147) Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, Swanson PE, Lohse CM, Newsham IF, Weaver A, Gutmann DH: Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathological subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. **J Neuropath exp Neurol** 59: 872-879, 2000.
- (148) Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW: A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. **Brain Pathol** 12(2):183-90. 2002.
- (149) Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G: Molecular pathogenesis of meningiomas. **Journal of Neuro-Oncology** 70: 183-202, 2004.
- (150) Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B, Hayashi Y, Meyer-Puttlitz B, Duerr EM, Lenartz D, Marsh DJ, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A: Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. **Neuropathol Appl Neurobiol** 24:3-8, 1998.
- (151) Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, Hendricks WP, Pueschel J, Coons SW, Scheck AC: Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. **Neuro-Oncology** 6: 290-299, 2004.

- (152) Pfisterer WK, Coons SW, Aboul-Enein F, Hendricks WP, Scheck AC, Preul MC: Implicating chromosomal aberrations with meningioma growth and recurrence: results from FISH and MIB-I analysis of grades I and II meningioma tissue. **J Neurooncol** 87:43-50, 2008.
- (153) Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H: Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:151-7, 1986.
- (154) Provias J, Claffey K, delAguila L, Lau N, Feldkamp M, Guha A: Meningiomas: role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in angiogenesis and peritumoral edema. **Neurosurgery** 40:1016-1026, 1997.
- (155) Rahnenführer J, Beerenwinkel N, Schulz WA, Hartmann C, von Deimling A, Wullich B, Lengauer T: Estimating cancer survival and clinical outcome based on genetic tumor progression scores. **Bioinformatics** 15;21(10):2348-2346, 2005.
- (156) Rajcan-Separovic E, Maguire J, Loukianova T, Nisha M, Kalousek D: Loss of 1p and 7p in radiation-induced meningiomas identified by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 144:6-11, 2003
- (157) Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML: Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. **Cancer Res** 53:2386-2392, 1993.
- (158) Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Kusak E, Moreno S: Chromosomal involvement secondary to -22 in human meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 33:275-290, 1988.
- (159) Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Kusak ME, Sarasa JL, Pestana A: Abnormalities of chromosome 22 in human brain tumors determined by combined cytogenetic and molecular genetic approaches. **Cancer Genet Cytogenet** 66:1-10, 1993.
- (160) Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature** 243: 290-291, 1973.

- (161) Rowley JD: Chromosome abnormalities in leukemia. **Haematol Blood Transfus** 23:43-52, 1979.
- (162) Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA: Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. **Nat Genet** 6, 180–184, 1994.
- (163) Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M: Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. **Cancer Res** 55:1189-1193, 1995.
- (164) Sanson M, Cornu P: Biology of meningiomas. **Acta Neurochir, Wien** 142:493-505, 2000.
- (165) Sayagués JM, Taberner MD, Maíllo A, Diaz P, Rasillo A, Bortoluci A, Gomez-Moreta J, Santos-Briz A, Morales F, Orfao A: Incidence of numerical chromosome aberrations in meningioma tumors as revealed by fluorescence in situ hybridization (FISH) using 10 chromosome-specific probes. **Cytometry** 50:153-159, 2002.
- (166) Sayagués JM, Taberner MD, Maíllo A, Espinosa A, Rasillo A, Díaz P, Ciudad J, López A, Merino M, Gonçalves JM, Santos-Briz A, Morales F, Orfao A: Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? **J Mol Diagn** 6 (4):316-25, 2004.
- (167) Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O: A role for Telomeric and Centromeric Instability in the Progression of Chromosome Aberrations in Meningioma Patients. **Cancer** 88: 440-53, 2000.
- (168) Scheithauer BW: Tumors of the meninges: proposed modifications of the World Health Organisation classification. **Acta Neuropathol** 80:343-354, 1990.
- (169) Schneider BF, Shashi V, von Kap H, Golden WL: Loss of chromosomes 22 and 14 in the malignant progression of meningiomas: a comparative study of fluorescence in situ

- hybridization (FISH) and standard cytogenetic analysis. **Cancer Genet Cytogenet** 85:101-104, 1995.
- (170) Schuttle BC, Carpten JD, Forus A, Gregory SG, Horii A, White PS: Report of the sixth international workshop on human chromosome 1 mapping 2000. **Cytogenet Cell Genet** 92:23-48, 2001.
- (171) Schrell UMH, Nomikos P, Schrauzer Th, Anders M, Marschalek, Adams EF, Fahlbusch R: Hormonal dependency of cerebral meningiomas. **Acta Neurochir** [Suppl] (Wien), 1996.
- (172) Scoles DR, Huynh DP, Chen MS, Burke SP, Gutmann DH, Pulst SM: Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with beta II-spectrin. **Nat Genet** 18: 354-359, 1998.
- (173) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science** 219:983-985, 1983.
- (174) Shoshan Y, Chernova O, Juen SS, Somerville RP, Israel Z, Barnett GH, Cowell JK: Radiation-induced meningioma: a distinct molecular genetic pattern? **J Neuropathol Exp Neurol** 59:614-620, 2000.
- (175) Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. **Nature** 315:550-554, 1985.
- (176) Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM Jr, Menon AG: Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. **Cancer Res** 55:4696-4701, 1995.
- (177) Simon M, Kokkino AJ, Warnick RE, Tew JM Jr, von Deimling A, Menon AG: Role of genomic instability in meningioma progression. **Genes Chromosomes Cancer** 16:265-269, 1996.

- (178) Simon M, Park TW, Leuenroth S, Hans VH, Löning T, Schramm J: Telomerase activity and expression of the telomerase catalytic subunit hTERT in meningioma progression. **J Neurosurg** 92:832-840, 2000.
- (179) Simon M, Park TW, Köster G, Mahlberg R, Hackenbroch M, Löning T, Schramm J: Alterations of INK4a/INK4b gene expression and telomerase activation in meningioma progression. **J Neurooncol** 55:149-158, 2001.
- (180) Simon M, Boström JP, Hartmann C: Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. **Neurosurgery** 60(5):787-98; discussion 787-98, 2007. Review.
- (181) Simpson D: The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 20:22-39, 1957.
- (182) Smith JS, Jenkins RB: Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. **Front Biosci** 5:D213-231, 2000. Review.
- (183) Steudel WI, Feld R, Henn W, Zang KD: Correlation between cytogenetic and clinical findings in 215 human meningiomas. **Acta Neurochir [Suppl]** 65: 73-76, 1996.
- (184) Strachan R, Clarke C, Nurbhai M, Marks S: Will chromosome karyotyping of meningiomas aid prediction of tumour recurrence? **Br J Neurosurg** 3:583-590, 1989.
- (185) Sulman EP, Dumanski JP, White PS, Zhao H, Maris JM, Mathiesen T, Bruder C, Cnaan A, Brodeur GM: Identification of a consistent region of allelic loss on 1p32 in meningiomas: correlation with increased morbidity. **Cancer Res** 58: 3226-3230, 1998.
- (186) Taberner MD, Espinosa AB, Maillo A, Sayagues JM, Alguero Mdel C, Lumberras E, Diaz P, Goncalves JM, Onzain I, Merino M, Morales F, Orfao A: Characterization of chromosome 14 abnormalities by interphase *in situ* hybridization (iFISH) and comparative genomic hybridization (CGH) in 124 meningiomas: correlation with the clinical, histopathological and prognosis features of the disease. **Am J Clin Pathol** 123:744-751, 2005.

- (187) Taberero MD, Espinosa AB, Maillo A, Rebelo O, Fernandez-Vera J, Sayagues JM, Merino M, Diaz P, Sousa P, Orfao A: Patient gender is associated with distinct patterns of chromosomal abnormalities and sex chromosome linked gene expression profiles in meningiomas. **Oncologist** 12:1225-1236, 2007.
- (188) Taberero MD, Maillo A, Gill-Bellosta CJ, Castrillo A, Sousa P, Merino M, Orfao A: Gene expression profiles of meningiomas are associated with tumor cytogenetics and patient outcome. **Brain Pathol** 2008 Jul15. (Epub ahead of print)
- (189) Takei H, Bhattacharjee MB, Rivera A, Dancer Y, Powell SZ: New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors. **Arch Pathol Lab Med** 131(2):234-241, 2007.
- (190) Tjio JH, Levan A: The chromosome number of man. **Hereditas** 42: 1-6, 1956.
- (191) Tse JY, Ng HK, Lau KM, Lo KW, Poon WS, Huang DP: Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. **Hum Pathol** 28(7):779-85, 1997.
- (192) Tse JY, Ng HK, Lo KW, Chong EY, Lam PY, Ng EK, Poon WS, Huang DP: Analysis of cell cycle regulators: p16INK4A, pRb, and CDK4 in low- and high-grade meningiomas. **Human Pathol** 29:1200-1207, 1998.
- (193) Verhage A, Go KG, Visser GM, Blankenstein MA, Vaalburg W: The presence of progesterone receptors in arachnoid granulations and in the lining of arachnoid cysts: its relevance to expression of progesterone receptors in meningiomas. **Br J Neurosurg** 9:47-50, 1995.
- (194) van Tilborg AA, Morolli B, Giphart-Gassler M, de Vries A, van Geenen DA, Lurkin I, Kros JM, Zwarthoff EC: Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. **J Pathol** 208(4):564-573, 2006.
- (195) von Deimling A, Larson J, Wellenreuther R, Stangl AP, van Velthoven V, Warnick R, Tew J, Balko G, Menon AG: Clonal origin of recurrent meningiomas. **Brain Pathol** 9:645-650, 1999.

- (196) von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC, et al.: Comprehensive allelotype and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. **J Neuropathol Exp Neurol** 59:544-558, 2000.
- (197) Wang JL, Zhang ZJ, Hartman M et al.: Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polysamples. **Int J Cancer** 64:223-228, 1995.
- (198) Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P: Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: Toward a genetic model of meningioma progression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94:14719-14724, 1997.
- (199) Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A: Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. **Am J Pathol** 146, 827–832, 1995.
- (200) Wellenreuther R, Waha A, Vogel Y, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A: Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants. **Lab Invest** 77:601-606, 1997.
- (201) Westphal M, Hänsel M, Kuzmann R, Hölzel F, Herrmann HD: Spectrum of karyotypic aberrations in cultured human meningiomas. **Cytogenet Cell Genet** 52:45-49, 1989.
- (202) Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D: Meningiomas. **Lancet** 8;363(9420):1535-1543, 2004.
- (203) Wiestler OD, Reifenberger G: Pathologische Anatomie und WHO-Klassikation der Tumoren des Nervensystems. In: Schlegel U, Weller M, Westphal M (eds) Referenz Reihe Neurologie, Neuroonkologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 36-41, 2003.
- (204) Yamasaki F, Yoshioka H, Hama S, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K: Recurrence of meningiomas: influence of vascular endothelial growth factor expression. **Cancer** 89:1102-1110, 2000.

- (205) Yoshioka H, Hama S, Taniguchi E, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K: Peritumoral brain edema associated with meningioma: influence of vascular blood supply. **Cancer** 85:936-944, 1999.
- (206) Zang KD, Singer H: Chromosomal constitution of meningiomas. **Nature** 7;216(5110):84-85, 1967.
- (207) Zang KD: Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. **Cancer Genet Cytogenet** 6:249-274, 1982.
- (208) Zang KD: Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. **Cytogenet Cell Genet** 93(3-4):207-220, 2001.
- (209) Zankl H, Singer H, Zang KD: Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. II. Hyperdiploidy, a rare event in human meningiomas. **Hum Genet** 11:253-257, 1971.
- (210) Zankl H, Zang KD: Correlations between clinical and cytogenetical data in 180 human meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 1:351-356, 1980.
- (211) Zankl H, Zang KD: Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. **Humangenetik** 14:167-169, 1972.
- (212) Zattara-Cannoni H, Roll P, Figarella-Branger D, Lena G, Dufour H, Grisoli F, Vagner-Capodano AM: Cytogenetic study of six cases of radiation-induced meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet** 126:81-84, 2001.
- (213) Zhu JJ, Maruyama T, Jacoby LB, Hermann JG, Gusella JF, Black PM, Wu JK: Clonal analysis of a case of multiple meningiomas using multiple molecular genetic approaches: pathology case report. **Neurosurgery** 45:409-416, 1999.
- (214) Zülch KJ: International Histological Classifications of Tumors (**World Health Organization**, Geneva), No.21, 1979.

6. Anhang

6.1 Herstellernachweis

Aqua dest., reinst	B. Braun, Melsungen
Colcemid	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
DAPI (Vectashield® with DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DMSO	Dimethylsulfoxid, reinst Merck KgaA, Darmstadt
FA	Formamid zur Analyse Merck KgaA, Darmstadt
FCS	fetales Kälberserum GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Fixogum	Marabu, Tamm
EtOH	Ethanol S99% SAV LP, Flintsbach
HCl 25%, reinst	Merck KgaA, Darmstadt
KCl	Kaliumchlorid zur Analyse Merck KgaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat zur Analyse Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Magnesiumchlorid- Hexahydrat Merck KgaA, Darmstadt
NaCl	Natriumchlorid zur Analyse Merck KgaA, Darmstadt
Pbmax	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Pepsin (2500 U/mg)	Sigma, Taufkirchen
PFA	Paraformaldehyd zur Synthese Merck- Schuchardt, Hohenbrunn
Phytohämagglutinin	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Pepsin (250U/mg)	Serva, Heidelberg
RNase A	Sigma, Taufkirchen
IGH/MALT1 Dual Color Dual Fusion DNA Probe	Abbott/Vysis, Wiesbaden
1p36/22BCR/22qter	Kreatech, Amsterdam, NL
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz 10% Sodium Dodecyl Sulfat Merck KgaA, Darmstadt
Streptomycin	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Vectashield®	Mounting Medium for Fluorescence (mit DAPI und ohne DAPI) Vector Laboratories, Burlingame, USA
Tissue Freezing Medium	Jung, Leica, Wetzlar

Alle weiteren hier nicht genannten Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

6.2 Geräte und Software

Analysis Software Version 3.1 (AP-Färbung)	Metasystems, Altlussheim
Brutschrank, begast	Heraeus, Hanau
CCD-Kamera CH 250	Photometrics, Arizona, USA
Fluoreszenzmikroskop AX 70	Olympus, Hamburg
ISIS Software Version 3.1 (FISH)	Metasystems, Altlussheim
Kamera Colourview 12	Olympus, Hamburg
Kryomikrotom CM 3050S	Leica, Wetzlar
Mikroskop BX 61	Olympus, Hamburg
Sterilbank Laminair	Heraeus, Hanau
Waagen H110 und L2200S	Satorius, Göttingen
Wasserbäder	GFL, Groÿburgwedel
Zentrifuge Rotina 46	Hettich, Tuttlingen
Programmable Thermal Controller, PTC-100	MJ Research, Hessisch Oldendorf
Vortex, VF2	Janke&Kunkel, IKA Labortechnik Staufen i.Br.
Tischzentrifuge	Labnet International Inc., Woodbridge, USA
Heizplatten	Medax, Nagel GmbH Kiel
Schüttelgerät, Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach

6.3 FISH-Ergebnisse

Menigeomrezidive

Lymphozytentest		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1					
	2		4	191	2	
	3			1	2	
	4					

Lymphozytentest		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1					
	2			198		
	3				2	
	4					

Lymphozytentest		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		1	2		
	2		2	195		
	3					
	4					

82/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1			3		
	2	1	26	162	2	
	3		1	4	1	
	4					

99/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		4	9		
	2	6	14	163		
	3		1	2	1	
	4					

395/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1			7	1	
	2	2	13	173	1	
	3			2	1	
	4					

709/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1			3		
	2	7	25	163		
	3					
	4					

1857/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		1	3		
	2	17	69	105		
	3		4	1		
	4					

115/98		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1			10		
	2	5	24	151	4	
	3		1	2	2	
	4					

192/98		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1		1	13		
	2	10	21	149	1	1
	3			1	1	
	4					

625/98		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		5	5		
	1	1		11		1
	2	10	55	106	2	10
	3			2		
	4		1	1		
	5			1		

790/98		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1	2	2	8		
	2	4	30	139	3	
	3		1	8	1	
	4		1		1	

1013/98		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		7	3		
	2	10	41	109		
	3	1	12	14		1
	4	1				
	5				1	

1284/98		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			4		
	1		8	12		
	2	16	20	140		
	3					
	4					

1612/98		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		1	1		
	2	4	28	161	1	1
	3		1	1		
	4			1		

1320/99		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		3	1		
	1	6	17	8		
	2	14	86	63		
	3					
	4		1	1		

1851/99		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1		3	6		
	2	3	26	154	3	2
	3				1	
	4					1

2004/00		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1		3	5		
	2	3	36	146	1	
	3			3		
	4					1

618/01		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			4		
	1		5	8		
	2	10	28	126	1	3
	3		1			
	4			7	2	5

655/01		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1	2	4	21		
	2	12	34	123	2	
	3					
	4					

1342/01		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		1	3		
	1			5		
	2	17	27	128		
	3			4		
	4		3	12		

1648/01		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		1	3		
	1	3	9	12		1
	2	12	47	110		1
	3				1	
	4					

1936/01		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		3	10		
	1		10	15		
	2	6	32	124		
	3					
	4					

32/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		2	6		
	1	4	8	14		
	2	20	45	98	1	
	3					
	4			2		

51/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1	1	4	9		
	2	7	23	145	2	
	3			3		
	4			4		
	5				1	

67/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			7		
	1	2	4	7		
	2	21	34	125		
	3					
	4					

77/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		5	5		
	1	3	10	10		
	2	24	41	95	3	2
	3					
	4				1	1

570/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1	2	2	5		
	2	17	40	131		
	3			2		
	4					

1240/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		1	5		
	1		11	18		
	2	6	26	126	3	1
	3				1	
	4			1	1	

1421/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1	1	4	12		
	2	7	29	144		
	3				1	
	4				1	

1640/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			3		
	1	6	3	8		
	2	3	30	144		
	3				1	
	4				1	

1765/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1	3	10	17		
	2	10	21	138		
	3					
	4			1		

1926/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		4			
	1		8	8		
	2	7	31	135	1	
	3			1	1	1
	4			3		

798/03		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		2	4		
	1	4	12	13		
	2	13	36	106		1
	3		1	5	1	1
	4		1			

1248/03		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1	1	8	14		
	2	5	20	147		
	3				2	
	4					2

169/04		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1		1	6		
	2	13	51	122	4	
	3			1	1	
	4					

906/04		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0	2		2		
	1		7	12		
	2	5	14	109	4	5
	3		3	7	6	4
	4		2	2	2	14

1027/04		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1		3	6		
	2	6	27	155	1	
	3					
	4					

1092/04		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromsom 7; grün	0		1	2		
	1	2	15	7		
	2	19	77	71		
	3		1		1	
	4		2	2		

1237/04		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1	3	13	22	1	
	2	8	33	116	1	
	3			1		
	4					

1653/04		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		1	6		
	1		3	14		
	2	5	30	130	1	5
	3		1			1
	4				2	2

1671/04		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		3	3			
	1	1	4	17	1		
	2	8	17	141	2		
	3					1	
	4				1		
	5						1

91/05		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1	3	3	8		
	2	12	24	138	2	1
	3			1		
	4			2		4

168/05		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		1	3	1	
	2	4	40	149	1	
	3			1		
	4					

1440/05		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1		1	4		
	2	9	27	155	3	
	3					
	4					

141/06		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1	1		7		
	2	6	44	138	2	
	3					1
	4				1	

297/06		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			3		
	1	2	3	7		
	2	13	41	120	1	1
	3	1				
	4		1	1		6

1168/06		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1	2	1	3		
	2	10	44	136	2	
	3			2		
	4					

1599/06		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		2	1	1	
	2	11	86	90	1	
	3			5		
	4			3		

295/07		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0					
	1		4	5		
	2	15	33	136	3	
	3			2		
	4					2

961/07		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		2	4		
	1		10	13		
	2	12	42	116	1	
	3					
	4					

1014/07		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		5	9		
	1		16	14	1	
	2	8	24	121		
	3					
	4					2

Lymphozytentest		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0			1		
	1		4	14		
	2		3	177		
	3			1		
	4					

Lymphozytentest		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0					
	1			9		
	2		2	188		
	3			1		
	4					

99/97		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		1	6		
	1	4	27	40		
	2	4	40	76		
	3					2
	4					

709/97		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		3	2		
	1		12	23		
	2	1	36	123		
	3					
	4					

1857/97		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		12	5		
	1	19	31	17		
	2	15	41	56		
	3			2		
	4	1		1		

77/02		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0			6		
	1	9	127	21		
	2	2	22	13		
	3					
	4					

1248/03		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		6	2		
	1	2	15	5		
	2	26	87	51		
	3	2	1			1
	4			1		
	5					1

295/07		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		9	8		
	1	6	26	36	1	
	2	3	31	75	1	1
	3			1	1	
	4			1		

Lymphozytentest		Anzahl der Signale 22qter; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale 1p36; grün	0					
	1		4	5		
	2	1	6	183	1	
	3					
	4					

Primärtumoren

1407/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1		2	6		
	2	2	9	159	3	
	3			1	3	1
	4			1	1	11

1534/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot					
		0	1	2	3	4	5
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			4			
	1	1	5	19			
	2	2	11	150	2	1	
	3						
	4					4	1

1800/97		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		3	3		
	1	1	2	5		
	2	3	19	162	1	
	3			1		
	4					

587/99		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0	2	1	5		
	1	1	3	10		
	2	3	10	151	2	
	3			3		1
	4			1	2	5

1072/99		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		1	5		
	1		4	5		
	2	2	3	172	1	
	3			1	1	1
	4					4

379/01		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			1		
	1	1	5	10		
	2	11	41	122		
	3		1	2		
	4		1	3		1
	5			1		

687/01		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		2	7		
	1		7	20	1	
	2	7	33	117	1	4
	3					
	4					1

43/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		1	1		
	1	1	2	11		
	2	5	24	152	1	
	3				1	
	4					1

232/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0		1	1		
	1	1	3	7		
	2	3	18	162	1	
	3				1	1
	4			1		

828/02		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			2		
	1	1	4	5		
	2	5	24	152	3	1
	3			2		
	4			1		

T5340		Anzahl der Signale Chromosom 10; rot				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale Chromosom 7; grün	0			5		
	1	1	7	10		
	2	6	14	150		
	3			2	1	1
	4	1			1	1

1407/99		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		6	9		
	1	8	25	36		
	2	12	21	78		
	3	1			2	1
	4			1		

1534/97		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		6	7		
	1	3	21	22		
	2	2	18	116	3	1
	3			1		
	4					

1800/97		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		15	15		
	1	15	31	26		
	2	17	32	46		
	3	1		1		
	4		1			

587/99		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		8	4		
	1	4	21	31		
	2	14	30	85	2	
	3				1	
	4					

1072/99		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		3	6		
	1	4	8	32		
	2	8	22	114		
	3				1	
	4					2

43/02		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		9	9		
	1	15	23	39		
	2	4	22	79		
	3					
	4					

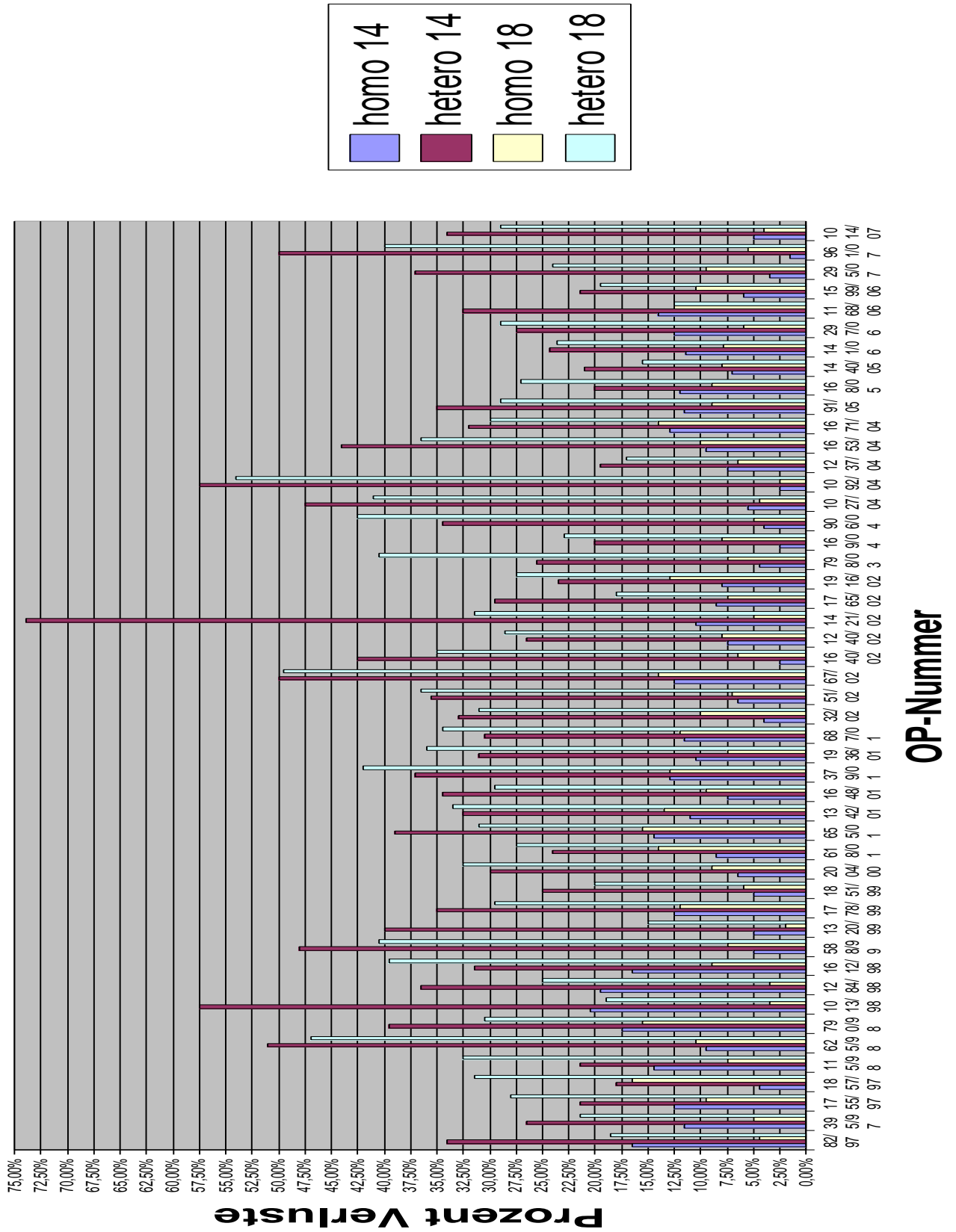
232/02		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		27	8		
	1	11	32	33		
	2	15	32	38	1	
	3				1	
	4			1	1	

244/05		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		6	6		
	1	16	26	39		
	2	6	42	56	1	1
	3					
	4					1

T5340		Anzahl der Signale MALT1 Spectrum Orange				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale IGH Spectrum Green	0		4	4		
	1	3	16	23		
	2	8	39	98	1	
	3				1	
	4					3

1800/97		Anzahl der Signale 22qter; rot				
		0	1	2	3	4
Ausgezählte Kerne: 116						
Anzahl der Signale 1p36; grün	0		12	6		
	1	27	40	8		1
	2	6	10	5		
	3				1	
	4					

Ergebnisse der FISH-Voruntersuchungen von Frau Dipl. Biologin Pöhler



6.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Wolf Ingo Steudel, Direktor der Neurochirurgie des Uniklinikums für die Überlassung von Tumormaterial und für die Bereitstellung der Patientenakten. Auch möchte ich mich bedanken für die Überlassung einer wissenschaftlichen Arbeit, die interdisziplinär die Zytogenetik und Neurochirurgie behandelt.

Frau PD Dr. Steffi Urbschat (AG Neuroonkologie) für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und Fr. Dr. Silke Wemmert – meinem „roten Faden“ – für die Betreuung im Labor. Die Handhabung der zytogenetischen Techniken wäre ohne ihre Geduld und Hilfsbereitschaft kaum möglich gewesen.

Ein großes Dankeschön an meinen Betreuer Herrn PD Dr. Ralf Ketter, dessen Ratschläge bei der Ausführung dieser Arbeit immer einen Schritt weitergeholfen haben. Danke auch für das Lob, die Kritik und Ermutigung, und das Ganze in einem Satz.

Ulrike Lindemann, Institut für Humangenetik, für ihre unermüdliche Betreuung in Sachen Zellkultur und Karyotypisierung. Ihr aufgeschlossenes und lebensfrohes Gemüt hat so manchen Laboralltag zu etwas besonderem gemacht.

Frau Dipl.-Biologin Elke Leipzig für die Einarbeitung der FISH-Methode und Frau Dipl.-Biologin Frau Mia Pöhler für die großartige Zusammenarbeit am gemeinsamen Thema. Danke für das unvergleichliche Arbeitsklima.

Mein Dank gebührt auch den Mitarbeitern der Klinik für die Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im Gebäude 6 für die Bereitstellung der technischen Gerätschaften.

Zuletzt danke ich aus ganzem Herzen meiner Familie in Korea, die mich stets moralisch unterstützt hat.

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	In-Si Kim
Geburtsdatum	11.04.1981
Geburtsort	Duisburg
Anschrift	Untere Allee 15, 66424 Homburg/Saar
Tel.	01797460713
e-mail	insija@yahoo.de

Schulbildung

In Deutschland

1987-1988	Grundschule Neuessen
1988-1991	Grundschule an der Berliner Straße
1991	Gymnasium B.M.V-Schule Essen

In Korea

1992-1994	Munheung Grundschule in Kwangju
1994-1997	Yongbong Middle School in Kwangju
1997-2000	Sungil High School in Kwangju
17.11.1999	Schulabschlussprüfung

Studium

In Korea

2000-2002	Germanistik an der Chonnam National University
-----------	--

In Deutschland

SS02	Deutsche Sprach- u. Literaturwissenschaft an der Universität des Saarlandes
10.07.03	Feststellungsprüfung am Studienkolleg an der Universität des Saarlandes
Seit WS03/04	Studienfach Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
März 2006	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

