

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

**Analyse der Chromosomenabschnitte 1p und 22q in
Meningeomen mittels Inter- und Metaphasen-
Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
an Zellen aus der Zellkultur**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von:
Patrick Andreas Schiebel
geb. am: 24.03.1979 in Pforzheim

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Abstract	3
2	Einleitung	4
2.1	Meningeome.....	4
2.1.1	Ätiologie.....	4
2.1.2	Lokalisation.....	5
2.1.3	Klinisches Erscheinungsbild	6
2.1.4	Therapie.....	6
2.1.5	Gradeinteilung nach WHO Klassifikation	7
2.1.5.1	WHO I.....	7
2.1.5.2	WHO II.....	7
2.1.5.3	WHO III	8
2.2	Molekular-zytogenetische Analyse von Tumoren	8
2.2.1	Entwicklungsgeschichte	8
2.2.1.1	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	9
2.2.2	Zytogenetische und molekularbiologische Charakteristik von Meningeomen.....	10
2.2.2.1	Chromosom 22	10
2.2.2.2	Hypodiploisierung	11
2.2.2.3	Chromosom 1	12
2.2.2.4	Chromosom 14	12
2.2.2.5	Chromosomen 9 und 10	13
2.2.2.6	Strukturelle Veränderungen	13
2.2.3	Weitere progressionsassoziierte Faktoren.....	13
2.3	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Untersuchungsmaterial.....	15
3.1.2	Patientendaten	15
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Zellkultur und Metaphasenpräparation von Meningeomen	17
3.2.1.1	Metaphasenpräparate von Meningeomen.....	17
3.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Meningeomzellen.....	19
3.2.2	G-Bänderung	19
3.2.3	Chromosomenpräparation von Lymphozyten.....	20

3.2.3.1	Blutkultur	20
3.2.3.2	Chromosomenpräparation	20
3.2.4	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	21
3.2.4.1	Vorbehandlung der Präparate	21
3.2.4.2	Hybridisierung	22
3.2.4.3	Stringenz-Waschung	24
3.2.4.4	DAPI Gegenfärbung und Eindeckung der Präparate	24
3.2.4.5	Versuchsprotokoll	25
3.2.4.6	Bildaufnahme	26
3.2.4.7	Auswertung	29
3.2.4.8	Festlegung der Grenzwerte	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Konventionelle Karyotypisierung mittels G-Bänderung	30
4.2	FISH an Lymphozytenpräparate	32
4.3	FISH an Meningeomen	35
4.3.1	Interphase FISH	35
4.3.1.1	Veränderungen von Chromosom 22	37
4.3.1.2	Vergleich der Ergebnisse bezüglich Chromosom 22	38
4.3.1.3	Veränderungen von Chromosom 1	41
4.3.1.4	Kombination der Aberrationen	42
4.3.1.5	Klonale Kombination der Aberrationen	42
4.3.2	Metaphase FISH	43
4.4	Vergleich der Ergebnisse von Interphase- FISH und konvention. Karyotypisierung ...	47
4.5	Vergleich der genetischen Ergebnisse mit histologischen und klinischen Parametern	50
4.5.1	Nachbeobachtungszeitraum und Auftreten von Rezidiven	50
4.5.2	Korrelation zwischen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und Rezidiv	50
4.5.3	Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 im Vergleich zum WHO-Grad	50
4.5.4	Korrelation zwischen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und Lokalisation ..	51
4.5.5	Verlust von 22q im Vergleich zu Rezidiv, WHO-Grad und Lokalisation	51
4.5.6	Statistische Auswertung der Korrelationen	51
5	Diskussion	53
5.1	Diskussion der Methodik	53
5.1.1	Konventionelle Karyotypisierung	53
5.1.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Zellen aus der Zellzucht	54
5.1.3	Metaphasen Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Meningeomen	57

5.1.4	Einfrieren und Auftauen von vitalen Meningeomzellen.....	58
5.2	Diskussion der Ergebnisse	58
5.2.1	Untersuchtes Tumorgewebe	58
5.2.2	Interpretation der FISH-Signale	59
5.2.2.1	Sonde 22qter.....	59
5.2.2.2	Sonde 1p36.....	59
5.2.2.3	DiGeorge Sonde 22q11.2 und 22qter.....	60
5.3	Genetische Veränderungen bei Meningeomen	60
5.3.1	Verluste des Chromosoms 22.....	61
5.3.2	Mechanismus des 22q Verlustes	63
5.3.3	Gewinne und Translokationen des Chromosoms 22.....	64
5.3.4	Verluste des Chromosoms 1.....	66
5.3.5	Vergleich der FISH- und Karyotypisierungs-Ergebnisse.....	71
5.3.6	Gemeinsames Auftreten genet. Aberrationen in einzelnen Tumoren und Zellklonen...	73
5.3.7	Genetische Veränderungen bei Rezidiven	74
5.3.8	Korrelationen zwischen Patienten und Tumorparametern	75
5.4	Ausblick	76
6	Anhang	77
6.1	Bezugsquellen/ Abkürzungen	77
6.2	Lösungen	78
6.3	Geräte und Software.....	78
6.4	Ergebnisse der Interphasen-FISH.....	79
6.4.1	Kombination der Sonden 1p36 und 22qter	79
6.4.1.1	Meningeome aus der Zellzucht	79
6.4.1.2	Lymphozyten.....	85
6.4.2	Kombination der Sonden 22q11.2 und 22qter	85
6.4.2.1	Meningeome aus der Zellzucht	85
6.4.2.2	Lymphozyten.....	86
7	Literaturverzeichnis.....	87
8	Dank	97
8.1	Publikationen im Rahmen der Promotion:	97
9	Lebenslauf	99

1 Zusammenfassung

Meningeome sind meist gutartige Tumore der Hirnhaut. Sie gehören mit einem Anteil von rund 20% zu den häufigsten intrakraniellen Neoplasien. Abhängig von ihrer anatomischen Lage können sie vollständig entfernt und der Patient damit geheilt werden. Ein Teil der Meningeome rezidiert jedoch auch nach vollständiger operativer Entfernung. Dieses Verhalten zeigt sich bei den seltenen anaplastischen Meningeomen sehr häufig, tritt aber auch bei benignen Subtypen auf.

Genetische Veränderungen solider Tumore wurden zuerst beim Meningeom entdeckt. Heute ist dieser Tumor genetisch sehr gut untersucht und viele genetische Veränderungen sind bekannt. Der Verlust eines Chromosoms 22 ist mit ungefähr 30% der häufigste zytogenetische Befund und nicht mit einem aggressiven Wachstumsverhalten assoziiert. Von den weiteren zytogenetischen Aberrationen ist vor allem der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) zu nennen, welcher mit einer klinischen Progression der Meningeome einhergeht. Diese und andere genetische Erkenntnisse gewinnen zunehmend an Bedeutung in der klinischen Praxis. Die genetischen Studien weichen aber in ihrem Ergebnis zum Teil erheblich voneinander ab. Dies scheint an den verschiedenen angewandten Methoden zu liegen. Die Methoden unterscheiden sich hinsichtlich des untersuchten Materials, als auch in ihrem Auflösungsvermögen, in ihrem Gesamtüberblick und in ihrer Sensitivität. Die konventionelle Karyotypisierung ist eine dieser Methoden. Sie bietet den besten Überblick über das Genom, besitzt aber eine eingeschränkte Sensitivität und hat zudem die in vitro Kultivierung und die Präparation von Metaphasen als Voraussetzung. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) bildet dagegen mit einer sehr hohen Auflösung sehr kleine Regionen ab.

Mit der hier durchgeführten FISH an 35 Meningeomen aus Zellkultur wurde nach Veränderungen gesucht, welche die Karyotypisierung nicht detektieren konnte. Im Brennpunkt waren der Verlust des langen Arms von Chromosom 22 und der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1. Die prognostische Bedeutung letzter genannter Veränderung konnte bestätigt werden. Zusätzlich lagen die Karyotypisierungsbefunde der untersuchten Meningeome vor. Im direkten Vergleich der Ergebnisse beider Methoden konnte eine eingeschränkte Sensitivität der Karyotypisierung bewiesen und der Einfluss von Zellkulturartefakten dargelegt werden. Insbesondere sind ein Selektionsnachteil und damit eine Unterrepräsentation von Zellen mit Deletion 1p in der Zellkultur sehr wahrscheinlich.

Die gewonnenen Erkenntnisse werden zur Verbesserung der Interpretation der Ergebnisse dieser Methoden beitragen und damit deren Aussagekraft verbessern.

Um mögliche kleine strukturellen Veränderungen zu entdecken, wurden zusätzlich 200 Metaphasen von 24 Meningeomen mit der FISH untersucht. In zwei Fällen zeigten sich Translokationen der Telomerregion des langen Arms von Chromosom 22 zu verschiedenen anderen Chromosomen. Dies könnte auf eine Telomer-Instabilität hinweisen, die der Auslöser der bekannten Monosomie 22 bei Meningeomen sein könnte.

1.1 Abstract

Analysis of the chromosomal sections 1p and 22q in meningiomas by using inter- and metaphase- fluorescent- in situ- hybridization at cells cultivated in cell culture

Meningiomas are tumors of the meninges, which are mainly of benign origin. With a proportion of approximate 20%, they are one of the most common tumors of intracranial neoplasms. Oblique to their anatomic localization, the patient can be cured with a total resection, although recurrence may occur in some of those cases. Recurrences are common in anaplastic meningiomas, but are also seen in benign meningiomas.

Genetic abnormalities of solid neoplasms were first described in meningiomas. Today this tumor is very well investigated and many genetic abnormalities are known. Loss of chromosome 22 occurs in about 30% of cases and is recognized as the most common chromosomal abnormality but it is not correlated with progression. Another chromosomal aberration is the deletion of the short arm of chromosome 1 (1p), which is associated with progression. These findings are becoming more important in clinical practice. Results of different genetic studies vary vastly in part. Different applied methods seem to be responsible. Methods vary in the manner of investigated material, resolution, complete overview and in their sensitivity. Conventional karyotyping offers the best overview, but has limited sensitivity and in vitro cell culture and preparation of metaphases are necessary. Fluorescent- in situ- hybridization (FISH) investigates small genetic regions with high resolution.

In this study with 35 meningiomas cultivated in cell culture small abnormalities were investigated by FISH, which can not be found by conventional karyotyping. Our special interest focused on the deletion of the long arm of chromosome 22 and the deletion of the short arm of chromosome 1. The prognostic importance of the loss of the short arm of chromosome 1 was approved. Results of karyotyping were available and a comparison of both methods was possible. A limited sensitivity and the influence of cell culture artefacts in karyotyping could be proved. Especially disadvantages in selection may lead to underrepresentation of cells with loss of 1p. The results of this study will help to improve the interpretation and significance of these methods.

To detect small structural abnormalities additionally 200 metaphases of 24 meningiomas were investigated by FISH. In two cases translocations of the telomer region of the long arm of chromosome 22 to other chromosomes could be detected. This could be a first evidence for telomere instability, which may cause the well know loss of one chromosome 22.

2 Einleitung

2.1 Meningeome

Aus der Hirnhaut, den Meningen, entstehende Tumore, bekamen 1922 von Harvey Cushing den heute noch gebräuchlichen medizinischen Terminus Meningeom. Sie sind in der Regel gutartige, langsam das Gehirn verdrängend wachsende Tumore. Sie entstammen aus der inneren Hirnhaut, der Arachnoidea, der Spinnwebhaut. Obwohl diese zarte, gefäßarme, bindegewebige, beidseits endothelbedeckte Gehirn- und Rückenmarkshaut im gesamten weniger als 5% der intrakraniellen und intraspinalen Gewebemasse ausmacht, entstehen aus ihr ca. 20% aller dort lokalisierten Tumore. Damit gehören Meningeome nach den Gliomen zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren. Die Inzidenz liegt bei ungefähr 6 pro 100.000 [Louis, 2000, Perry 2007].

Meningeome treten vor allem bei älteren Patienten auf und beschreiben einen Häufigkeitsgipfel um die 6. Lebensdekade. Es entstehen aber auch selten kindliche Meningeome, die häufig durch ein aggressives Verhalten gekennzeichnet sind. Mit einer bis zu vierfach höheren Inzidenz sind Frauen deutlich häufiger von Meningeomen betroffen. Mit erhöhter Malignität verschwindet diese Geschlechtsspezifität [Zang, 1982; Kepes, 1982; Antinheimo, 2000; Louis, 2000, Ketter, 2007; Perry, 2007].

2.1.1 Ätiologie

Der Entstehungsmechanismus der Meningeome ist bisher nicht genau bekannt. Die anfängliche Vermutung von Cushing, Traumen des Kopfes wären dafür verantwortlich, ist nach heutiger Sicht umstritten [Longstreth, 1993]. Auch die Rolle von Viren als Entstehungsfaktoren - es wurden Antigene von Simian Virus 40 in Meningeomzellkulturen gefunden [Weiss, 1975] - ist weiterhin unklar [Rachlin und Rosenblum, 1991]. Fest steht hingegen der Einfluss von ionisierender Strahlung. So konnte sowohl bei therapeutischer, als auch bei akzidentieller Bestrahlung, z. B. in Folge einer Atombombenexplosion, ein erhöhtes Auftreten von Meningeomen beobachtet werden [Shintani, 1999]. In Israel wurde eine erhöhte Anzahl von Meningeomen bei Patienten festgestellt, die in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts eine therapeutische Bestrahlung einer Tinea capitis erhalten hatten. Es fiel auf, dass die der Strahlenfolge zugeordneten Meningeome bei Patienten auftraten, welche die Bestrahlung in ihrer Kindheit erhalten hatten. Es scheint deshalb so, dass in der Kindheit die Meningiothelialzellen besonders sensibel für Strahlenschäden sind. Die Meningeome wurden typischerweise im früheren Strahlenfeld gefunden, das

Erkrankungsalter war im Durchschnitt geringer, es traten häufiger multifokale Meningeome auf und die Erkrankungswahrscheinlichkeit war rund zehnmal so hoch wie bei Patienten ohne solche Strahlenbelastung [Modan, 1974; Harrison; 1991; Rienstein, 2001; Sadetzki, 2002].

Auch Hormone werden als Entstehungsmechanismus diskutiert. Die Geschlechtsspezifität und das verstärkte Wachstum von Meningeomen in der Schwangerschaft stützen diese Vermutung [Michelsen, 1969]. Vor allem der Einfluss von Progesteron scheint wahrscheinlich. Es konnte in über der Hälfte aller gutartigen Meningeome eine erhöhte Progesteronrezeptor-Dichte festgestellt werden. Dieser Rezeptor kommt sonst nur in sehr geringem Maße in Arachnoidalzellen vor. Eine Erhöhung der Rezeptordichte war dabei umgekehrt korreliert mit erhöhter Proliferation und Malignität. In vitro konnte bei einigen Meningeomzelllinien eine Wachstumsförderung durch Progesteron und eine Hemmung durch Progesteronantagonisten festgestellt werden. In erhöhtem Maße vorkommendes Progesteron könnte so das Wachstum der Meningeomzellen fördern und so das erhöhte Auftreten von Meningeomen bei Frauen erklären [Caroll, 1993; Hsu, 1997].

Auf den Daten von Tumorregister basierend, entstand die Vermutung, es bestehe ein Zusammenhang von Meningeomen und Mamma Karzinomen [Schoenberg, 1975]. Dieser Zusammenhang konnte aber noch nicht weiter geklärt werden.

Weitere Risikofaktoren für das Auftreten von Meningeomen sind Erbkrankheiten. In erster Linie spielt hier die Neurofibromatose Typ II eine Rolle, auf die später genauer eingegangen wird. Auch bei weiteren Syndromen, wie dem Cowden Syndrom, dem Gorlins nevoid basal cell Syndrom, dem Li-Fraumeni, Turcots Gorden, von Hippel Lindau und anderen Syndromen konnten Meningeome festgestellt werden. Ob ein Zusammenhang dieser Erkrankungen mit den Meningeomen besteht, ist allerdings nicht geklärt und fraglich [Perry, 2004].

2.1.2 Lokalisation

Meningeome treten bevorzugt in der Falx Cerebri und der zerebralen Konvexität auf. Weniger häufig sind die Meningeome der Frontobasis, der Region der Keilbeinflügel, der basalen Zisternen, der Kleinhirnbrückenwinkel und noch seltener des Spinalkanals. Sehr selten treten auch intraventrikulär und in den Orbita Meningeome auf [Wiestler, 2003]. Hinsichtlich ihrer Lokalisation unterscheiden sich die Hirnhauttumore in ihrem Anteil an höhergradigen Tumoren. So ist der Anteil der aggressivsten Tumore in der Konvexität am höchsten und im Spinalkanal am niedrigsten [Ketter, 2008]. Auch die schon oben beschriebene Geschlechtsspezifität unterscheidet sich in den verschiedenen

Tumorlokalisationen. So sind die fast immer gutartigen Spinalen Meningeome bei Frauen rund neunmal häufiger als bei Männern [Kepes, 1982; Louis, 2000; Ketter, 2008].

2.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Auffällig werden Meningeome meist durch relativ unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen und Schwindel. Je nach Lage und Größe können auch Hirndrucksymptome, epileptische Anfälle, Hirnnervenausfälle, Halbseitenlähmung und organisches Psychosyndrom beobachtet werden. Besonders Tumore der Konvexität können beträchtliche Größen erreichen, bis sie genannte Symptome hervorrufen. Fehlt hingegen ein Ausweichraum und sind sensible Strukturen benachbart, wie etwa Hirnnerven, werden schon kleinste Meningeome symptomatisch. Daraufhin erfolgt die Untersuchung mit CT oder MRT. Im CT stellen sich die Meningeome meist homogen primär hyperdens dar. Daraufhin erfolgt die Sicherung der Diagnose durch CT oder MRT mit Kontrastmittelgabe. Handelt es sich um ein Meningeom, zeigt sich meist eine starke Kontrastmittelanreicherung. Ist der Tumor in der Nähe von Knochen lokalisiert, zeigt sich dort häufig eine Hyperossifikation. Eine Infiltration des Knochens ist hierbei nicht obligat. Das „meningial tail sign“ ist ein weiterer charakteristischer Befund und bezeichnet die Signalanhebung in der Hirnhaut über den eigentlichen Tumor hinaus. Wächst das Meningeom flächenhaft über die Dura mater, spricht man von einem Meningeom en plaque [Westphal, 2003].

2.1.4 Therapie

Therapiert wird durch die operative Resektion des Tumors. Die Dringlichkeit ist hierbei von der Größe, Lokalisation und Klinik abhängig. Im Falle von stark durchbluteten Tumoren kann auch eine vorherige selektive endovaskuläre Embolisation die darauf folgende Operation erleichtern [Neumeier-Probst, 1994]. Die Vollständigkeit der Resektion wird mit den Simpson Graden eingeteilt. Durch die Anatomie verständlich, gelingt die vollständige Resektion im Bereich der Konvexität regelmäßig. Dies gilt nicht, wenn sensible Strukturen, wie der Sinus mit betroffen sind. Schwieriger gestaltet sich die Resektion im Bereich der Schädelbasis [Westphal, 2003]. Dennoch können insbesondere die Meningeome der Konvexität trotz vollständiger Extirpation rezidivieren [Ketter, 2008].

Nur bei unvollständiger Resektion oder Inoperabilität und ggf. bei malignen Meningeomen kann zusätzlich der Tumor bestrahlt werden [Lunsford, 1994]. Experimentell wird in diesen Fällen auch antihormonell mit dem Progesteronantagonisten Mifepristone (RU486) behandelt [vergleiche: Sanson und Cornu, 2000]. Wie aber schon oben beschrieben, ist

gerade bei malignen Meningeomen die Progesteronrezeptoren-Dichte nicht erhöht und ein Therapieerfolg fraglich [Hsu, 1997].

2.1.5 Gradeinteilung nach WHO Klassifikation

Der resezierte Tumor wird nach der WHO Klassifikation eingeteilt. Diese unterscheidet 15 Varianten, die in drei Grade eingeteilt werden [Louis, 2000; Perry, 2007].

2.1.5.1 WHO I

Die häufigsten sind die meningothelialen, fibrös-fibroplastischen, transitionalen Meningeome, die zusammen mit den psammomatösen, angiomatösen, mikrozystischen, sekretorischen, lymphoplasmazellreichen und metaplastischen Meningeomen die WHO I Gruppe bilden. Die WHO I Meningeome stellen mit über 80% den überragenden Anteil aller Meningeome dar. Sie wachsen langsam, nicht infiltrativ, sondern das restliche Hirngewebe verdrängend. Die Grenzen des Gehirngewebes bleiben dabei in der Regel scharf erhalten. Histologisch sind sie durch gleichförmig geformte Kerne und niedrige Mitoseaktivität gekennzeichnet. Die Mitoseaktivität wird in Mitosen pro 10 mikroskopische Gesichtsfelder bei 40x-Vergrößerung angegeben und liegt bei den WHO I Meningeomen bei weniger als 4 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder. Typischerweise bilden sie zwiebelschalenartige, konzentrische Tumorzellformationen, die im Zentrum verkalken können und so die für Meningeome typischen Psammkörper bilden.

2.1.5.2 WHO II

Das atypische, klarzellige und das chordoide Meningeom bilden mit 5-8% Gesamtanteil die Gruppe der WHO II Meningeome. Sie rezidivieren auch nach vollständiger Resektion häufig und bedürfen deshalb regelmäßiger Kontrolluntersuchungen. Der häufigste WHO II Subtyp ist das atypische Meningeom. Es zeichnet sich in erster Linie durch eine erhöhte Mitoseaktivität aus, die bei mindestens 4 Mitosen pro 10 Gesichtsfeldern liegt. Alternativ wird die Diagnose gestellt, wenn drei der fünf folgenden Kriterien erfüllt sind:

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

2.1.5.3 WHO III

Zu der kleinen Gruppe der WHO III Meningeome mit einem Gesamtanteil von 2-3% gehören vor allem die anaplastischen Meningeome. Ebenfalls zu dieser Gruppe werden das papilläre und das rhabdoide Meningeom gezählt. Klinisch imponieren sie durch schnelles invasives Wachstum. Auch die Metastasierung z. B. in die Lunge wird beobachtet. Histologisch sind sie durch eine stark erhöhte Mitoserate mit 20 oder mehr Mitosen pro 10 Gesichtsfelder definiert. Auch histologisch hochmaligne Erscheinungsbilder, die Karzinomen, Sarkomen und Melanomen ähneln, werden zu den anaplastischen Meningeomen gezählt [Louis, 2000; Perry, 2007].

Innerhalb aller genannten Tumortypen können beträchtliche Unterschiede innerhalb verschiedener Tumorarealen bestehen, so dass die untersuchte Gewebeprobe nicht immer den ganzen Tumor repräsentiert. So kann es zu einer fehlerhaften Typisierung des Meningeoms kommen.

2.2 Molekular-zytogenetische Analyse von Tumoren

Mit der Zytogenetik steht heute eine weitere Untersuchungsmethode zur Verfügung, die Meningeome besser in ihrem Wachstumsverhalten zu beurteilen.

2.2.1 Entwicklungsgeschichte

Schon 1914 vermutete Boveri durch Beobachtungen von Mitosen in histologischen Tumorschnitten, dass aus einer einzelnen normalen Zelle durch Chromosomenveränderungen eine Tumorzelle entsteht. Mehr als vierzig Jahre später wurde die Grundlage für den Beweis seiner These geschaffen. Die Technik der Chromosomen-Präparation und die Bestimmung der menschlichen Chromosomenzahl war geboren und hiermit die Möglichkeit, Chromosomenanomalien nachzuweisen [Tjö und Levan, 1956]. Mit dieser Methode gelang es erstmals 1959 eine konstitutionelle und krankheits-assoziierte Aneuploidie, die Trisomie 21 beim Down-Syndrom zu entdecken [Lejeune, 1959]. Kurze Zeit später wurde die erste somatische Chromosomenanomalie bei einer Neoplasie das Philadelphia Chromosom beschrieben. Diese 1960 von Nowell und Hungerford entdeckte Veränderung bei der Chronisch-Myeloischen-Leukämie (CML), wurde später als eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 identifiziert [Rowley, 1973]. Diese Identifikation war erst möglich, nachdem die anfänglich nur durch Größe und Zentromer-Lagebestimmung der Chromosome durch die Chromosomenbänderungstechnik verfeinert wurde [Casperson, 1970]. Ähnlich verhielt es sich, als 1967 Zang die erste Chromosomenveränderung bei

einem soliden Tumor – die Monosomie 22 bei Meningeomen - beschrieb (siehe Abschnitt 2.2.2) [Zang, 1967]. Molekularbiologische Verfahren ergänzten in den nächsten Jahren die Untersuchung des Genoms. Mit diesen war es möglich, bis auf Genebene vorzudringen und den Zusammenhang zu proliferationsfördernden und kontrollierenden Proteinen festzustellen. Diese Gene können in drei Gruppen eingeteilt werden: Tumorsuppressorgene, Onkogene und Mutatorgene.

So konnte Knudson die von ihm 1971 vermuteten proliferationskontrollierenden Tumorsuppressorgene 1985 mit seiner Untersuchung von Retinoblastomen beweisen. Die Theorie, dass beide Allele mutiert oder deletiert sein müssen, konnte am Beispiel des Retinoblastom Gens (RB1) gezeigt werden. Besteht eine heterozygote konstitutionelle Mutation, besteht eine erbliche Tumordisposition. Ist auch das zweite RB1 Gen deletiert, entwickelt sich mangels Proliferationskontrolle ein Retinoblastom.

Ähnlich verhält es sich mit den Onkogenen, die durch Amplifikation, Translokation oder Punktmutation aus den entsprechenden physiologischen Protoonkogenen entstehen. Einen pathologischen Effekt hat hier meist schon die Schädigung eines Allels [Croce, 1985].

Mutatorgene bilden die dritte Gruppe der tumorgenese-fördernden Gene. Die physiologischen Korrelate dieser Gene sind bei der DNA Reparatur und Replikation beteiligt und führen bei Beschädigung zu einer erhöhten Gesamtmutationsrate, die oben genannte Tumorentstehung über Tumorsuppressorgene und Onkogene statistisch wahrscheinlich machen [Wagner, 1999].

2.2.1.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Eine der molekularbiologischen Verfahren, die mit zu den oben genannten Erkenntnissen beigetragen haben, ist die FISH- Untersuchung. Mit der Einführung der ISH (In situ Hybridisierung) Ende der sechziger Jahre, konnten komplementäre Basensequenzen in Form von DNA oder RNA Sonden auf die DNA des zu untersuchenden Zellkerns hybridisiert werden [Gall und Pradue, 1969; John, 1969]. Nachdem anfänglich nur große repetitive Sequenzen dargestellt werden konnten, wurde es später möglich, auch sehr kleine spezifische DNA Abschnitte mit Einzelkopie-Sonden zu untersuchen [Harper und Saunders, 1981]. Zuerst wurden radioaktive Marker zur Detektion eingesetzt. Die Weiterentwicklung führte zur Kopplung der Sonden mit Haptenen, wie Digoxigenin oder Biotin, die mit entsprechenden farbig markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Da die Farbmarkierungen der Antikörper Fluoreszenzfarbstoffe sind, wurde diese Technik Fluoreszenz in situ Hybridisierung genannt. Heute sind die meisten Sonden direkt mit Fluorochromen markiert. Wegen ihrer hohen Spezifität und Zuverlässigkeit wurde schon vor

vielen Jahren die FISH Untersuchung in die Routinediagnostik, z.B. in der Prä- und Postnataaldiagnostik aufgenommen. Mit ihr kann gezielt nach einzelnen kleinen und großen Aberrationen gesucht werden.

Die vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH) baut ebenfalls auf dem Prinzip der komplementären Hybridisierung auf [Kallioniemi, 1992]. Sie vergleicht Kontroll- und Tumor-DNA und erkennt Gewinne und Verluste von DNA Abschnitten.

Mitte der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden weitere direkt auf der FISH basierende molekulargenetische Techniken entwickelt. Dazu gehören die Spektralkaryotypisierung (SKY) [Schröck, 1996] und die Multiplex in situ Hybridisierung (M-FISH) [Speicher, 1996]. Bei diesen Methoden wird über ein chromosomen-spezifisches Probenset, das mit 5 verschiedenen Fluorochromen markiert ist, jedem Autosomen und Geschlechtschromosomen eine Farbkombination zugeordnet. Der schnelle Überblick über komplex veränderte Chromosomensätze ist der wesentliche Vorteil dieser Untersuchungstechniken.

2.2.2 Zytogenetische und molekularbiologische Charakteristik von Meningeomen

2.2.2.1 Chromosom 22

Wenige Jahre nach der Entdeckung des Philadelphia Chromosoms bei der CML konnten 1967 Zang und Singer die ersten genetischen Veränderungen in einem soliden Tumor entdecken. Ähnlich, wie beim Philadelphia Chromosom konnten mit der Entwicklung der Bänderungstechnik 1972 Zankl et al. das verloren gegangene Chromosom als das Chromosom 22 identifizieren. Weitere Untersuchungen, die den Verlust des Chromosoms 22 in Meningeomen bestätigten, folgten [Seizinger, 1987, Dumanski 1987]. Ungefähr ein Drittel aller Meningeome zeigt nach heutiger Studienlage eine Monosomie 22 [Ketter, 2007]. Es wurden verschiedene Gene für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht. Dabei scheint das auf dem Chromosom 22 lokalisierte Neurofibromatose Typ II codierende Gen [Roleau, 1987] das wesentliche Gen zu sein. Bei der Neurofibromatose Typ II, einer autosomal-dominant vererbten Phakomatose, die durch das Auftreten von typischen Cafe-au-lait-Flecken und multiplen weichen Neurofibromen der Haut gekennzeichnet ist, treten gehäuft Meningeome auf. Das Auftreten von multiplen Meningeomen ist sehr häufig in Verbindung mit der Neurofibromatose Typ II vergesellschaftet. Auch die sonst nur einseitig vorkommenden Akustikusneurinome - ein Tumor ebenfalls durch den Verlust eines Chromosoms 22 gekennzeichnet - treten bei der Neurofibromatose Typ II bilateral auf.

Die Bedeutung des Neurofibromatose II Genes konnte in weiteren Studien bestätigt und sein Genort auf der Bande 22q12.2 auf dem Chromosom 22 lokalisiert werden. Sein Genprodukt Merlin (Moesin-Ezrin-Radixin-like Protein) konnte als Struktur Protein, welches das Zytoskelett mit Proteinen der zytoplasmatischen Membran verbindet, identifiziert werden [Gusella, 1999]. In vitro konnte eine Wachstumshemmung von Meningeomzellen durch Merlin nachgewiesen werden [Ikeda, 1999]. Auch fand man in einigen Studien bei einem Teil der Meningeome das Fehlen von Merlin in der Zelle [Hitotsumatsu, 1997; Evans, 2001]. Wiederum bei einem Teil dieser Fälle fehlte aber die NF II Mutation [Louis, 1995; Gutman, 1997]. Als Erklärungsversuch wurde ein vermehrter Abbau von Merlin durch das proteolytische Enzym Calpain vermutet [Kimura, 1998]. Interessanterweise wird die Mutation oder Deletion von NF II besonders häufig (mehr als 70%) bei höhergradigen Meningeomen beobachtet, bei den WHO I Meningeomen findet man diese jedoch nur in 25% der Fälle [Wellenreuther, 1995]. Insbesondere bei den WHO I Meningeomen mit alleiniger Monosomie 22, ist in den meisten Fällen nur ein heterozygoter Verlust von NF II nachzuweisen. Dies würde nach der Double-Hit Theorie von Knudson das NF II Gen als Tumorsuppressorgen ausschließen. Um eine Tumorentstehung durch die Monosomie 22 dennoch erklären zu können, wird von einigen Autoren ein zweites Tumorsuppressorgen MNX distal des NF II Lokus, also zwischen 22q12.2 und 22qter vermutet [Zang, 2001]. Dieses Gen konnte aber bis heute nicht entdeckt werden. Stattdessen konnte in Untersuchungen von Gutmann et al. (2000) und Perry et al. (2000) bei einem großen Anteil von niedriggradigen Meningeomen der Verlust von DAL-1 (differently-expressed-in-adenocarcinoma of the lung) als frühes Ereignis identifiziert werden. Dal 1 ist ein dem NF II strukturell und funktionell verwandtes Protein, welches auf Chromosom 18 (18p11.3) lokalisiert ist. Merlin als auch DAL 1 binden an Spectrin- β 2, ein Protein, welches wiederum selbst an Aktin bindet [Scoles, 1998]. In der Untersuchung von Perry (2000) zeigten 92% der untersuchten Meningeome einen Verlust des NF II oder DAL-1 Gens. Bei 58% war dieser Verlust kombiniert. Eine Tumorentstehung über den Verlust mehrerer ähnlicher Tumorsuppressorgene, wie z.B. NF II, DAL-1 und/oder MNX im Sinne einer kombinierten Haploinsuffizienz könnte eine Erklärung sein [Zang, 2001].

2.2.2.2 Hypodiploisierung

Neben den Veränderungen auf Chromosom 22 konnten weitere Aberrationen und Deletionen festgestellt werden. Im Gegensatz zu anderen Tumoren handelt es sich hierbei meist um Hypodiploisierungen [Zang, 2001; Ketter, 2001]. Neben der besonders bei niedriggradigen Meningeomen typischen Monosomie 22 gehen in der Hälfte dieser Fälle weitere

Chromosomen verloren. Die einzelnen beteiligten Chromosomen unterscheiden sich nach Studie, zu den häufigsten gehören jedoch Chromosom 14, 18, 19, seltener 6 und 10, sowie X und Y. Ein weiteres Ereignis ist der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 [Rey, 1988; Bello, 1994; Henn und Urbschat, 1998; Cerda-Nicolas, 2000, Ketter, 2001; Zang, 2001; Sayagues, 2002]. Auch in Nativpräparaten konnten diese Verluste bestätigt werden [Weber, 1997]. Zugewinne sind hingegen vor allem in Metaphasepräparaten selten [Zang, 2001; Ketter, 2001]. Allerdings konnte in den letzten Jahren in einigen Studien der Gewinn des langen Arms von Chromosom 1 gezeigt werden [Müller, 1999; Weber, 1997] und interessanterweise auch ein Zugewinn von Teilen des Chromosoms 22 [Maillo, 2001; Prowald, 2004; Pfisterer, 2004].

2.2.2.3 Chromosom 1

Als die zweithäufigste chromosomale Veränderung neben der Monosomie 22 gilt der schon oben erwähnte Verlust eines kurzen Arms von Chromosom 1 (1p). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Ereignis gehäuft bei höhergradigen Meningeomen auftritt [Müller, 1999; Weber, 1997; Bello, 1994] und mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit [Steudel, 1996; Kolles, 1995] sowie generell mit einer schlechten Prognose verbunden ist [Zang, 2001; Ketter, 2001]. Der Anteil der WHO III Meningeome, bei denen ein Verlust von 1p festgestellt werden konnte, lag bei der CGH Untersuchung von Weber (1997) bei 79% und bei den FISH Untersuchungen von Ishino (1998) bei 85,7% und bei Müller (1999) und Pfisterer (2004) bei 100%. Bei den WHO I Meningeomen sind es in denselben Untersuchungen hingegen nur 26 bis 35%. Der 2-[18F] fluoro-2 deoxy D-Glukose (FDG) uptake konnte mit der Positronenemissionstomographie einen erhöhten Stoffwechsel in Meningeomen mit 1p Verlust nachweisen [Henn, 1995]. Bezogen auf den Verlust von 1p, wird das entscheidende Tumorsuppressorgen in der Umgebung von 1p34-pter vermutet [Boström, 1997]. Ebenfalls in dieser Region, zwischen 1p36.1-p34 liegt das für die alkalische Phosphatase ALPL kodierende Gen. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von 1p36 und dem Verlust der Aktivität von ALPL im Gewebeschnitt festgestellt werden [Müller, 1999]. Der Verlust von ALPL im Gewebeschnitt wird auch zur histologischen Qualifizierung herangezogen und gilt ebenfalls als Progressionsmarker.

2.2.2.4 Chromosom 14

Als zweite progressionsassoziierte Aberration wird von vielen Autoren die dritthäufigste Aberration in Meningeomen, der Verlust von Chromosom 14, genannt [Tse, 1997; Cai, 2001; Maillo, 2003; Ketter, 2007]. Bei Männern ist der Verlust des Chromosoms 14 die

zweithäufigste Veränderung [Menon, 1997; Ketter, 2007]. Der Verlust von Chromosom 14 wird in vielen atypischen und anaplastischen Meningeomen gefunden. Er ist häufig mit dem oben beschriebenen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 vergesellschaftet und es gibt deshalb die Vermutung, dass diese Progressionsassoziation auf den Verlust von 1p beruht im Sinne eines Bias by confounding [Ketter, 2007]. Zudem konnte bisher kein mögliches Tumorsuppressorgen auf Chromosom 14 ausfindig gemacht werden. Ebenfalls fehlt eine einheitlich deletierte DNA Region [Lamszus, 2004].

2.2.2.5 Chromosomen 9 und 10

Weitere progressionsassoziierte oder vor allem in höhergradigen Meningeomen vorkommende genetische Veränderungen sind Aberrationen der Chromosomen 9 [Weber, 1997; Perry, 2004] und 10 [Rempel, 1993; Mihaila, 2003]. Diese Ereignisse sind aber relativ selten und haben deshalb bisher einzeln betrachtet wenig prognostische Bedeutung beigetragen bekommen. Eine Ausnahme bildet der Verlust von 9p21 bei anaplastischen Meningeomen, der mit einer schlechten Prognose korreliert ist [Perry 2007].

2.2.2.6 Strukturelle Veränderungen

Strukturelle chromosomale Veränderungen sind bei Meningeomen relativ selten [Zang, 2001]. Tritt dieses Ereignis dennoch auf, sind meist die Chromosomen 1, 11, 19 und 22 beteiligt [Mitelman Datenbank; Cerda-Nicolas, 2000; Lopez-Gines, 2001; Rey, 1988].

2.2.3 Weitere progressionsassoziierte Faktoren

Neben der Histologie und der Genetik gibt es eine Reihe weiterer progressionsassoziiierter Faktoren:

Die schon zu Beginn angesprochenen, durch Bestrahlung induzierten Meningeome, zeigen gehäuftes aggressives Verhalten [Sanson und Cornu, 2000].

Besonders bei atypischen und anaplastischen Meningeomen ist die für unbegrenzte Zellteilung nötige und häufig in Krebszellen reaktivierte Telomerase deutlich in ihrer Aktivität gesteigert [Langford, 1997].

VEGF-A (vascular-endothelial growth factor-A) gilt als Faktor für Angiogenese und die häufig beobachtete Ödembildung um Meningeome [Goldman, 1997; Provias, 1997]. Eine Korrelation von VEGF-A und Progression wird von einigen Autoren angenommen [Yamasaki, 2000; Lamszus, 2000].

Neben den schon oben erwähnten Progesteronrezeptoren sind in vielen Meningeomen die Somatostatin-, Dopamin-, Androgen-, Prolaktin- und Wachstumshormonrezeptoren erhöht

[Caroll, 1996; Dutour, 1998; Friend, 1999; Sanson und Cornu, 2000; Konstantinidou, 2003]. In vitro und kleine in vivo Studien haben gezeigt, dass der Wachstumshormon-Rezeptorantagonist Pegvisomant, das Somatostatinalogon Octreotid und der Dopamin D2 Rezeptorantagonist Bromocriptin einen antiproliferativen Effekt haben [vergleiche: Sanson und Cornu, 2000; Ragel, 2003]. Aussagekräftige klinische Studien fehlen aber bisher.

2.3 Fragestellung

Es ist bekannt, dass der Verlust von Chromosom 22 und der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 die beiden häufigsten genetischen Veränderungen von Meningeomen sind. Dennoch ist insbesondere der Mechanismus, der bei genetisch unauffälligen Meningeomen zur Tumorentstehung führt, weitgehend unklar. Die Rolle kleiner numerischer und struktureller Veränderungen sollte deshalb geklärt werden.

Hierzu wurde eine Zwei-Farben FISH mit Sonden für die Chromosomen 1 und 22 durchgeführt. Die Sonde für Chromosom 1 bindet in der Region 1p36. In dieser werden die für Progression verantwortlichen Gene vermutet. Zur Untersuchung von Chromosom 22 wurde die telomerständige 22qter Sonde benutzt. Das mögliche Vorhandensein von kleinen distalen Deletionen sollte hiermit untersucht werden.

Mit Hilfe der angewandten Chromosomenpräparation und anschließend durchgeführten Metaphase FISH sollte der Frage nach möglichen Translokation und Mikroveränderungen nachgegangen werden.

Die Ergebnisse wurden anschließend mit den bereits bestehenden Daten der mittels Karyotypisierung durchgeführten Chromosomenanalyse verglichen. Dies diente zum einen der Validierung beider Techniken und zum anderen sollten Gründe für die geringere Anzahl von Aberrationen in der konventionellen Karyotypisierung im Vergleich zu Untersuchungen an Nativmaterial gefunden werden [Zang, 2001]. Die spezielle Frage dabei war, ob die geringere Anzahl an Aberrationen durch Zellkulturartefakte oder durch das begrenzte Auflösungsvermögen der Karyotypisierung zustande kommt. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang von genetischen Eigenschaften zu Histologie, Rezidiv, Alter, Lokalisation und Geschlecht überprüft.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Die für diese Arbeit zu untersuchenden Meningeome entstammen 25 Frauen und 10 Männern, welche in der Zeit von 2001 bis 2005 in der Neurochirurgischen Universitätsklinik des Saarlandes an einem Meningeom operiert wurden. 34 der Meningeome wurden von der Neurochirurgie Homburg bereitgestellt und einer von der Neurochirurgie Bremen (Fall Nr. T6201). Bei 9 Meningeomen handelt es sich um Rezidive, bei welchen der Primärtumor entfernt wurde und z. T. histologisch und genetisch untersucht wurde. Die Proben wurden von dem jeweiligen Operateur während der Operation ausgewählt und noch im Op-Saal in dafür bereitgestellte Gefäße gegeben, die mit Transportmedium gefüllt waren. Zur weiteren Bearbeitung wurden diese in die Zellkultur der Humangenetik Homburg überführt.

Andere repräsentative Tumoranteile wurden in die Neuropathologie Homburg gebracht (mit Ausnahme von Fall T6201, der von der für die Neurochirurgie Bremen zuständigen Neuropathologie begutachtet wurde). Dort wurde die Diagnose Meningeom gestellt und der Tumor weiter histologisch klassifiziert.

3.1.2 Patientendaten

Die Patientendaten entstammen der neurochirurgischen Krankenakte und die Tumorlokalisation dem Operationsprotokoll. Die Nachbeobachtung der Patienten erfolgte in der Ambulanz der Neurochirurgischen Klinik Homburg im Rahmen der Routinekontrolluntersuchungen und beim Auftreten von neurologischen Symptomen. Als Rezidiv wurde das Neuaufreten von Tumoren im CT oder MRT nach vorheriger vollständiger Tumorextirpation (Simpson Grad 1 und 2) bezeichnet. Für den Simpson Grad 2 war neben dem Operationsbericht die postoperative Bildgebung ausschlaggebend. Patientenalter, Geschlecht, Tumorlokalisation und WHO Grad sind in Tabelle 1, der Nachbeobachtungszeitraum und das Auftreten von Meningeomrezidiven sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 1:**Patientendaten, Lokalisation und WHO Grad der untersuchten Meningeome**

	Nummer	Alter	Geschlecht	Lokalisation	WHO Grad
1	T5603	65	w	Parasagital	3
2	T5676r	61	w	Tentorium	3
3	T5726r	35	w	Hintere Schädelgrube	2
4	T5737r	46	m	Parasagital	3
5	T5750r	60	w	Os spenoidale	1
6	T5830	69	w	Konvexität	2
7	T5884r	57	m	Konvexität	1
8	T5902r	34	w	Spinal	2
9	T5952	69	w	Tentorium	3
10	T6022	85	w	Konvexität	3
11	T6112	44	w	Parasagital	1
12	T6119	42	w	Falx	1
13	T6125	71	w	Spinal	1
14	T6132	46	w	Falx	2
15	T6133	68	w	Tentorium	1
16	T6137	67	w	Konvexität	2
17	T6138	56	m	Konvexität	1
18	T6153	49	m	Parasagital	1
19	T6176r	52	w	Parasagital	3
20	T6184	74	m	Tentorium	1
21	T6192r	80	w	Konvexität	2
22	T6198r	57	w	Tentorium	2
23	T6199	76	w	Hintere Schädelgrube	1
24	T6201	38	w	Konvexität	3
25	T6204	56	w	Konvexität	1
26	T6218	76	m	Os spenoidale	1
27	T6235	72	w	Konvexität	2
28	T6245	74	w	Tentorium	1
29	T6249	46	m	Spinal	1
30	T6263	69	m	Os spenoidale	2
31	T6265	70	m	Konvexität	1
32	T6268	39	w	Konvexität	3
33	T6277	49	w	Konvexität	2
34	T6284	60	w	Olfactoriusrinne	2
35	T6325r	59	m	Parasagital	2

r: Meningeom ist ein Rezidiv

m: männlich

w: weiblich

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur und Metaphasenpräparation von Meningeomen

3.2.1.1 Metaphasenpräparate von Meningeomen

Das Tumorgewebe wird unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank mit einer Schere in kleine Stückchen geschnitten. Diese werden mit 1ml Nährmedium suspendiert und mit einer Pipette in eine 50ml Zellkulturflasche gegeben. Dabei ist zu beachten, dass die Stücke auf dem Flaschenboden aufliegen und gleichzeitig von genügend Nährmedium umgeben sind. In einem Brutschrank wird bei 37°C in wasserdampfgesättigter mit 5% CO₂ begaster Atmosphäre die Kultur inkubiert. Haben sich die Zellen an den Flaschenboden angeheftet - dies ist meist nach 24h in ausreichender Weise geschehen - wird vorsichtig ein Mediumwechsel durchgeführt. Nun ist ein höherer Füllstand des Mediums möglich und es werden deshalb 5ml Medium hinzu gegeben. Das Wachstum wird in den nächsten Tagen mit einem Auflichtmikroskop beobachtet und 2- 3-mal pro Woche wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Ein Umschlagen des im Medium enthaltenen Farbindikators lässt auf den Verbrauch der Nährstoffe schließen.

Ist ein dichter Zellrasen entstanden und zeigen sich ausreichend viele Mitosen - diese stellen sich als kugelförmige, leicht bewegbare Zellen dar - können diese abgeerntet werden. Meist ist dies nach 10 bis 14 Tagen der Fall.

Eine Stunde vor der Ernte werden 2- 3 Tropfen Colcemid dem Nährmedium zugegeben. Dadurch wird die Ausbildung des Spindelapparates verhindert und die Mitosen verbleiben in der Metaphase. Zum Zeitpunkt des Aberntens ist so eine größere Anzahl an Mitosen vorhanden. Das Abernten beginnt mit dem Entfernen des Mediums und der Zugabe von Trypsin, welches drei Minuten bei 37°C auf die Zellen einwirkt. Die Flasche wird anschließend leicht beklopft und die Mitosen und ein Teil der restlichen Zellen lösen sich und können abgesaugt werden. Diese Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugieren (1000 RPM, 8min) wird das Trypsin von den Zellen getrennt und verworfen. Die verbliebenen Zellen werden mit 0,52%iger Kalium-Chlorid Lösung (KCl) einer Hypotoniebehandlung ausgesetzt. Die Dauer der Einwirkzeit ist dabei von der Umgebungstemperatur, der Luftfeuchte und des Luftdrucks abhängig. Tabelle 2 gibt Anhaltswerte für eine optimale Hypotoniebehandlung.

Die Hypotonie dient der maximalen Dehnung der Zellmembran, welches eine wichtige Vorbedingung für die weiteren Schritte ist.

Die Hypotonie wird durch erneutes Zentrifugieren abgebrochen und das KCl verworfen. Die Zellen werden vorsichtig mit einer Methanol-Eisessig-Mischung im Verhältnis 3:1 durchmischt und mindestens eine halbe Stunde bei -20°C gelagert.

Die Methanol-Eisessig-Mischung fällt Proteine aus und konserviert damit die Zellmembran. Ein Platzen vor dem Auftropfen wird so verhindert und damit auch artifiziellen DNA-Verlusten entgegengewirkt.

Erneutes Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren mit neuer Methanol-Eisessig-Mischung folgt, bis ein weißes Zellpellet entstanden ist. Dann wird der Überstand so weit entfernt, dass eine zellreiche Auftropf-Suspension verbleibt. Nach erfolgter vorsichtiger Resuspendierung werden aus 10 cm Höhe ein bis drei Tropfen nebeneinander auf den OT (Objektträger) getropft. Die OTs wurden zuvor gespült, getrocknet und dann in -20°C kaltem 50%igem Ethanol gelagert. Um das Trocknen der Tropfen auf den OTs zu verlangsamen, werden die OTs auf einen feuchten Lappen gelegt, wodurch Verdunstungskälte und erhöhte Luftfeuchtigkeit in seiner Umgebung entstehen. Durch eine längere Einwirkzeit der hygroskopischen Essigsäure optimiert dies das Spreiten und Quellen der Chromosomen. Nach etwa einer Minute werden die Präparate auf eine 80°C heiße Heizplatte gelegt und so die Zellen auf dem OT fixiert.

Tabelle 2: Dauer der Hypotoniezeit bei der Präparation der Metaphasen von Meningeomen in Abhängigkeit der relativen Luftfeuchte bei 23° C

Relative Luftfeuchte	Einwirkzeit der 0,52% KaliumChlorid Lösung
25 %	145 Sekunden
30 %	130 Sekunden
35 %	115 Sekunden
40 %	85 Sekunden
45 %	70 Sekunden
50 %	65 Sekunden
55 %	50 Sekunden

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Meningeomzellen

Die Meningeomzellen aus oben beschriebener Zellzucht können zur Lagerung und späterer erneuter Anzucht eingefroren werden. Dazu wird das Medium abpipettiert und mit 2ml Trypsin die Zellen von der Kulturflasche gelöst. Nach erfolgtem Abzentrifugieren, werden die Zellen in 0,9ml Nährmedium gelöst und mit 0,1ml 10%igen DMSO (Dimethylsulfoxid), welches als Frostschutzmittel fungiert, schnell resuspendiert. Danach müssen die Zellen sofort eingefroren werden, da das DMSO zytotoxisch ist. Eingefroren wird in flüssigem Stickstoff, in welchem die Proben auch bis zum Auftauen gelagert werden. Kurze Zeit können die Proben auch bei -70°C zwischengelagert werden.

Zum Auftauen werden die eingefrorenen Zellsuspensionen in einem Wasserbad (37°C) erwärmt und nach verschwinden der Eiskristalle sofort mit der fünffachen Menge an Nährmedium vermischt. Die Zellen werden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Auch dies soll die Kontaktzeit des giftigen DMSO minimieren. Danach wird das Zellpellet mit 5ml neuem Nährmedium suspendiert und wie oben beschrieben im Brutschrank inkubiert.

Bei allen beschriebenen Vorgängen muss steril gearbeitet werden. In dieser Untersuchung wurden folgende zehn Meningeome nach erfolgtem Einfrieren wieder aufgetaut und erfolgreich angezüchtet: T5603, T5676, T5726, T5737, T5750, T5830, T5884, T5902, T5952 und T6022.

3.2.2 G-Bänderung

Die fertigen Metaphasepräparate werden nach 45 Sekunden langer Proteolyse in einer Trypsin Lösung zweimal in einer NaCl Lösung gewaschen und für 5 Minuten in einer 5%igen Giemsa-Lösung gefärbt. Danach wird überschüssiger Farbstoff durch zweimaliges Eintauchen in Aqua dest. Bäder abgewaschen und mit einem Deckglas (DG) versehen.

Das typische Bänderungsmuster der Chromosomen entsteht durch eine erhöhte Affinität des Giemsa-Farbstoffes an die meist nicht kondensierten G-C (Guanosin- Zytosin Basenpaaren) reichen DNA-Abschnitte gegenüber der geringeren Anfärbbarkeit der meist kondensierten A-T (Adenosin- Thymidin) reichen DNA-Abschnitte.

Die Metaphasen der fertigen G-Bänderungs-Präparate werden mit dem Ikaros-System von MetaSystem abfotografiert und nach den Richtlinien des „International System for Cytogenetic Nomenclature“ (ISCN, 1995) beschrieben.

3.2.3 Chromosomenpräparation von Lymphozyten

Um die Zuverlässigkeit der eingesetzten FISH-Untersuchung zu überprüfen, werden aus Lymphozyten angefertigte Metaphase-Präparate als Kontrolle verwendet.

3.2.3.1 Blutkultur

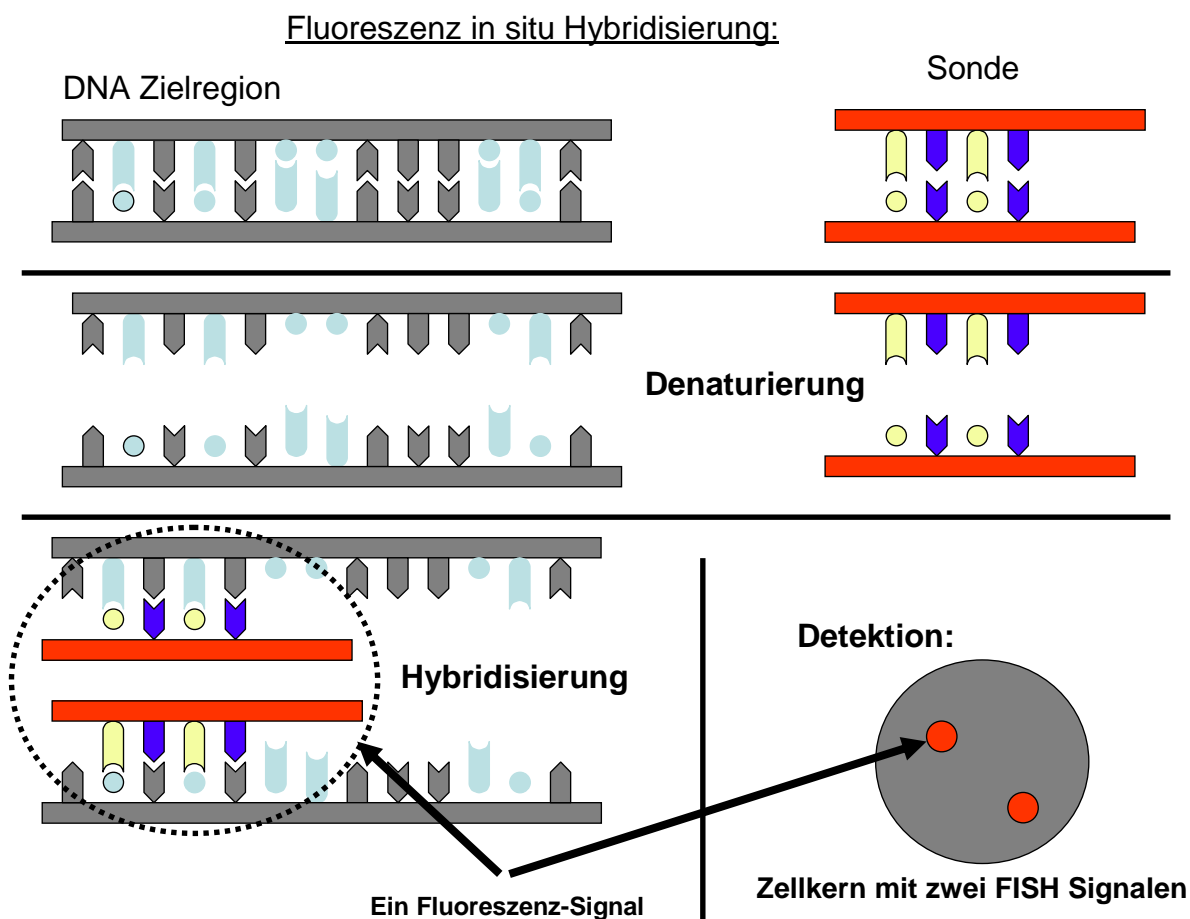
Unter sterilen Bedingungen wird eine heparinisierte Blutprobe von einem gesunden Probanden gewonnen. 0,8ml dieses Blutes werden mit 8ml Nährmedium (RPMI, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin) und 0,2ml Phytohämagglutinin in eine Kulturflasche pipettiert und durch leichtes Umschwenken vermischt. Diese Vollblutkultur wird bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten und wasserdampfgesättigten Brutschrank 70 Stunden inkubiert.

3.2.3.2 Chromosomenpräparation

Nach der 70 stündigen Inkubation werden 2 Tropfen Colcemid der Blutkultur zugesetzt und weitere 2 Stunden inkubiert. Der Ansatz wird in Zentrifugenröhrchen (unsteril) zentrifugiert (8 min bei 1000 RPM), der Überstand verworfen und das Sediment mit 37°C vorgewärmter 0,52%iger KCl- Lösung (0,0375M) einer 6 - 8 minütigen Hypotoniebehandlung ausgesetzt. Diese wird mit Zentrifugieren unterbrochen und erneut der Überstand verworfen. Das verbliebene Sediment wird vorsichtig mit einer frisch angesetzten Methanol-Eisessig-Mischung (3:1) resuspendiert und für mindestens eine Stunde bei -20°C gelagert. Anschließend wird letztgenannter Vorgang 3 – 4 mal wiederholt und das Sediment auf diese Weise gewaschen, bis es weißlich erscheint. Wieder wird der Überstand nach Zentrifugieren entfernt und das vorliegende Pellet mit wenigen Tropfen der Methanol-Eisessig-Mischung resuspendiert. Aus ungefähr 20 cm Höhe werden 1-3 Tropfen nebeneinander auf einen OT getropft. Die OTs wurden zuvor gespült, getrocknet und dann in -20°C kaltem 50%igem Ethanol gelagert. Um das Trocknen der Tropfen auf den OTs zu verlangsamen, werden die OTs auf einen feuchten Lappen gelegt, wodurch Verdunstungskälte und erhöhte Luftfeuchtigkeit in seiner Umgebung entstehen. Diese Maßnahme optimiert durch eine längere Einwirkzeit der hygroskopischen Essigsäure das Spreiten und Quellen der Chromosomen. Nach etwa einer Minute werden die Präparate auf einer 60°C heißen Heizplatte fixiert.

3.2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Abbildung 3-1: Prinzip der Fluoreszenz in situ Hybridisierung



In dieser Arbeit wurden direkt markierte Einzelkopie-Sonden eingesetzt, die über die Firma QBiogen käuflich erworben wurden. Die im Einzelnen für die FISH nötigen Schritte beinhalten die Vorbehandlung des zu untersuchenden Präparats, die Denaturierung und Hybridisierung von Ziel- und Sonden- DNA, das Abwaschen von unspezifischen Signalen (Stringenzwaschung) und das Eindecken des Präparates.

Einen Überblick bietet die Abbildung 3-1.

3.2.4.1 Vorbehandlung der Präparate

Die Metaphasepräparate werden zwei Minuten in 2xSSC (pH=7) vorbehandelt, um mögliche Staubpartikel zu entfernen und das Zellgewebe anzufeuchten. Danach werden 100µl RNase auf die Zellen pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und 20 min in einer feuchten

Kammer (bei 37° C) inkubiert. Dies dient der Zerstörung von RNA, die ähnliche Sequenzen wie die Ziel-DNA haben könnte. Das Deckglas wird abgeschlagen und der OT dreimal je 5 min in 2xSSC (pH=7) gespült. Anschließend folgt die Verdauung von Gewebeproteinen durch die Behandlung mit einer 37°C erwärmten Pepsin-Lösung. Das Pepsin darf erst wenige Sekunden vor dem Verdauen, nach kurz zuvor erfolgtem Auftauen, in die Pepsinlösung pipettiert werden. Dieser Vorgang dient der so genannten Permeabilisierung. Darunter versteht man das für das Eindringen der Sonden in die Zielregion wichtige Zerstören von Proteinen, die um die Nukleinsäuren gebunden sind. Die Einwirkzeit des Pepsins ist dabei von entscheidender Bedeutung. Ist sie zu kurz, können die Sonden nicht eindringen; ist sie zu lang, geht DNA verloren. Anhand des Aussehens der Zellkerne, vor und nach Pepsinbehandlung, im Phasenkontrastmikroskop kann die nötige Zeit abgeschätzt werden. Sie lag bei 2,5 - 4 Minuten für die Meningeom- und 2,5 Minuten für die Lymphozytenpräparate.

Um Nukleinsäureverluste zu verringern, folgt eine Fixierung der Präparate durch 5minütige Behandlung mit PBS, 10minütige Behandlung mit PFA/PBS und nochmals 5minütiger Behandlung mit PBS. Danach werden die Präparate mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und eine halbe Stunde getrocknet.

3.2.4.2 Hybridisierung

Durch die Denaturierung wird die doppelsträngige Ziel- und Sonden-DNA in Einzelstrang-DNA aufgeschmolzen. Bei komplementären Basen können sich nun Ziel- und Sonden-DNA paaren. Dies wird Hybridisierung genannt. Hybrid bedeutet soviel, wie „aus Kreuzung entstanden“. Das Besondere dieser Reaktion ist ihre direkte Durchführbarkeit bei normalen Zellen und bei Gewebe ohne vorherige DNA-Extraktion. Ob die Hybridisierung streng nach exakter Basenpaarung erfolgt, ist von weiteren Faktoren abhängig. Lassen die Bedingungen nur exakte Basenpaarungen zu, wird von hoher Stringenz gesprochen. Hoch stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen haben neben dem Vorteil von geringen Fehlbindungen den Nachteil von geringer Sondenbindungsfähigkeit mit einer daraus resultierenden Signalschwäche. Im Gegensatz hierzu werden bei nieder stringenten Bedingungen meist immer genügend Sonden gebunden, diese aber nicht immer spezifisch. Die Salzkonzentration ist einer dieser Faktoren. Einwertige Kationen, wie z.B. das Natrium-Ion erhöhen die Stabilität der DNA-Doppelstränge. Nicht exakt gebundene Sonden werden z.B. bei einer Natrium-reichen Waschlösung nicht abgewaschen. Gegensätzlich zur Salzkonzentration verhält es sich mit der Temperatur. Bei erhöhter Temperatur werden die Doppelstränge destabilisiert und ungenaue Bindungen verhindert. Einen ähnlichen Effekt hat

die Formamidkonzentration. Bei erhöhter Konzentration ist die Doppelstrang destabilisierende Wirkung von Formamid erhöht. Zusammengefasst sorgen niedrigere einwertige Kationenkonzentration bei hoher Temperatur und Formamidkonzentration für hohe Stringenz, also exakter Basenpaarung.

Eine weitere Rolle spielt die Länge der Nukleinsäuren. Lange Sequenzen werden durch eine höhere Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten und sind dementsprechend schlechter zu denaturieren. Ebenfalls sind Guanosin-Cytosin-reiche DNA-Regionen mit ihren drei im Vergleich zu den zwei Wasserstoffbrückenbindungen der Adenosin-Thymidin Bindungen schwieriger aufzuschmelzen.

Folgende thermodynamische Gleichung mit den oben genannten Faktoren gilt bei 50% Denaturierung von DNA:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,61 \log (\text{mol Na/l}) + 0,41 (\%G/C) - (\% \text{Formamid})$$

Hochrepetitive Sequenzen können ebenfalls für unspezifische Bindungen verantwortlich sein. Verschiedene Zusätze, wie z.B. COT-DNA blocken diese Sequenzen ab und können so dieses Problem verhindern.

Für die hier durchgeführten Experimente wurden käuflich erworbene Sondenlösungen benutzt, die bereits Formamid und SSC enthielten. Die Mischungskonzentration der Sonden 1p36 und 22qter (QBioGen) wurde nach empirischer Testung von mir festgelegt. Die Sonden Kombination 22q11.2 / 22qter (DiGeorge DGCR2 („N25“, CLTD) region probe, Dual-Colour direct labeled von QBioGene) wurde als fertige Mischung geliefert.

3.2.4.2.1 Vorgehen bei der Sondenkombination 1p36 und 22qter:

Entsprechend ihren festgelegten Anteilen wurden 1p36 und 22qter Sonde in ein braunes „Epi“ pipettiert und durch Schütteln gemischt. Dabei ist zu beachten, dass sich die Sonden auf dem Boden der Aufbewahrungsgefäße befinden können und immer ein vorheriges Mischen erfolgen muss, um nicht nur sondenfreie Lösung zu pipettieren. Zum anderen ist es wichtig, dass die Sonden weitestgehend vor Licht geschützt werden, um ein Ausbleichen zu verhindern. Dies gilt auch für das Präparat, nachdem die Sonden aufgetragen sind. Nach Pipettieren der Sonden auf die Objektträger und Versiegelung mit Deckglas und FixoGum - ein gummiartiges Abdichtmittel - werden sowohl Ziel-, als auch Sonden-DNA auf einer 75°C heißen Heizplatte denaturiert. Anschließend wird das Präparat 24h in einer dunklen, feuchten Kammer bei 37°C hybridisiert.

3.2.4.2.2 Vorgehen bei der Sondenkombination 22q11.2 /und 22qter (DiGeorge DGCR2)

Bei dieser Sondenkombination wird im Gegensatz zu oben beschriebener gemeinsamer Denaturierung eine getrennte Denaturierung durchgeführt. Dazu wird auf das Präparat 100µl 70%iges Formamid / 2xSSC (pH = 7) pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und die Präparat-DNA 2 min lang auf einer 70°C heißen Heizplatte denaturiert. Anschließend wird das Deckglas entfernt und das Präparat in einer -20°C kalten aufsteigenden Ethanolreihe (je 2 min) dehydriert (70, 80, 96%iges Ethanol) und 30 min lang getrocknet.

Die Sondenlösung (pro Probe etwa 2,5 µl) wird in ein braunes „Epi“ pipettiert und für 5 Minuten in einem 96°C heißen Wasserbad denaturiert und anschließend für 2 - 3 Sekunden abzentrifugiert. Die Sonde muss innerhalb von 15 min auf das fertig getrocknete denaturierte Präparat aufgetragen werden und mit Deckglas und FixoGum versiegelt werden. Anschließend wird das Präparat 24h in einer dunklen, feuchten Kammer bei 37°C hybridisiert.

3.2.4.3 Stringenz-Waschung

Die Stringenz-Waschung dient der Entfernung von unspezifisch gebundenen Signalen. Diese erfolgt nach der 24stündigen Hybridisierung. Bei unseren Versuchen wurde dazu FixoGum und Deckglas entfernt und der Objektträger in 65°C warmem 0,1%igem SDS/ 0,5xSSC 5 min lang gewaschen und 5 min in 1xPBS gegeben. Nach erfolgter Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe, wurden die Präparate 30 min lang Luft getrocknet.

3.2.4.4 DAPI Gegenfärbung und Eindeckung der Präparate

Die Präparate werden mit DAPI-Antifade (4,6 Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt, eingedeckt und mit Deckglas versehen. Überschüssige DAPI-Lösung wird durch zusammenpressen von Objektträger und Deckglas zur Seite hin entfernt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA bindet - bevorzugt an Adenosin-Thymidin reiche Sequenzen. Es entsteht eine den Q-Banden (diese färben ebenfalls in den AT Regionen stärker an) ähnliche Anfärbung der Chromosomen. Mit dieser Färbung ist eine begrenzte Zuordnung der Chromosomen möglich und zum anderen wird die Leuchtkraft der FISH-Signale verstärkt und kontrastiert.

3.2.4.5 Versuchsprotokoll

Folgendes Versuchsprotokoll wurde für diese Arbeit angewendet.

1.Tag:

2min: OT (Metaphasepräparat auf Objektträger) in 2xSSC (pH=7) (RT=Raumtemperatur)
RNA-Verdau:
20min: 100µl RNase auf OT mit DG (54x32mm) abgedeckt (37°C) in feuchter Kammer
3x5min: 2xSSC (pH=7) (RT)
Permeabilisierung:
2,5-4min: in 0,05% Pepsin in 0,01 M HCl (37°C)
5min: 1xPBS (pH=7) (RT)
10min: 4%PFA/1xPBS (pH=7) (RT)
5min: 1xPBS (pH=7) (RT)
Entwässerung:
3x5min: aufsteigende Ethanolreihe (70, 80, 96% Ethanol) (RT)
Trocknen:
30min: (RT)
<i>Cave: Sonden immer vor Licht schützen</i>
Denaturierung:
<i>Gemeinsame Denaturierung der Sondenkombination Ip36 und 22qter:</i>
1 µl Sonde (22q, QBiogene) + 5 µl (1p36, QBiogene) auf OT mit DG (Ø=12mm) abgedeckt und FixoGum versiegelt
5min: auf Heizplatte (75°C)
<i>Getrennte Denaturierung der Sondenkombination 22q11.2 /und 22qter:</i>
100 µl 70% Formamid / 2xSSC (pH = 7) auf OT, mit DG abdecken und 2 min lang auf Heizplatte (70°C) denaturieren. DG entfernen und in -20°C kalter aufsteigender Ethanolreihe (je 2min) dehydrieren (70, 80, 96% Ethanol) und 30 min lang trocknen.
2,5 µl Sonde (DiGeorge region probe) in braunem „Epi“ bei 96°C in Wasserbad denaturieren, 2-3 s abzentrifugieren und auf OT auftragen, mit DG (Ø=12mm) abdecken und mit FixoGum versiegeln.
Hybridisierung:
24h: in feuchter Kammer (37°C)

2.Tag:

Stringenzwaschung: 5min: 0,1%SDS/ 0,5xSSC (65°C) 5min: 1xPBS (pH=7) (RT)
Entwässerung: 3x5min: aufsteigende Ethanolreihe (70, 80, 96% Ethanol) (RT)
Trocknen: 30min: (RT)
DAPI/ Eindecken: 20 µl DAPI Antifade auftragen und mit DG (54x32mm) abdecken und anpressen Eingedeckter OT: <i>Kühl und dunkel lagern</i>

3.2.4.6 Bildaufnahme

Die Auswertung der Versuche erfolgte an einem Olympus AX 70 Auflichtmikroskop. Eine schematische Darstellung dieses Gerätes ist in Abbildung 3-2 zu sehen. Bei dieser Art von Mikroskop wird Licht einer bestimmten Wellenlänge von oben auf das zu untersuchende Präparat geleitet. Um eine große Auswahl an Wellenlängen zur Verfügung zu haben, wird eine Lichtquelle mit einem breiten Spektrum nutzbarer Wellenlängen zwischen 360nm und 700nm verwendet. Diese Eigenschaft besitzen sowohl Quecksilber-Dampfleuchten als auch Xenon-Leuchten. Das hier verwendete Mikroskop ist mit einer HBO 100 Quecksilber-Dampfleuchte ausgestattet. Mit entsprechenden Eingangsbandfiltern (Anregungsfilter) wird die Wellenlänge der Anregungslichtquelle herausgefiltert und über einen Spiegel auf das Präparat geleitet. Dieser Spiegel hat die besondere Eigenschaft, kurzwelliges Licht zu reflektieren und für langwelliges Licht durchlässig zu sein. Diese Art von Spiegel wird dichromatischer Teilerspiegel genannt.

Für die Energie von Licht gilt folgende Gleichung:

Energie = Lichtgeschwindigkeit / Wellenlänge

Nur ein Teil der Energie des Anregungslichtes wird benötigt, um die Elektronen des Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau zu bringen. Für die Quantenphysik gilt:

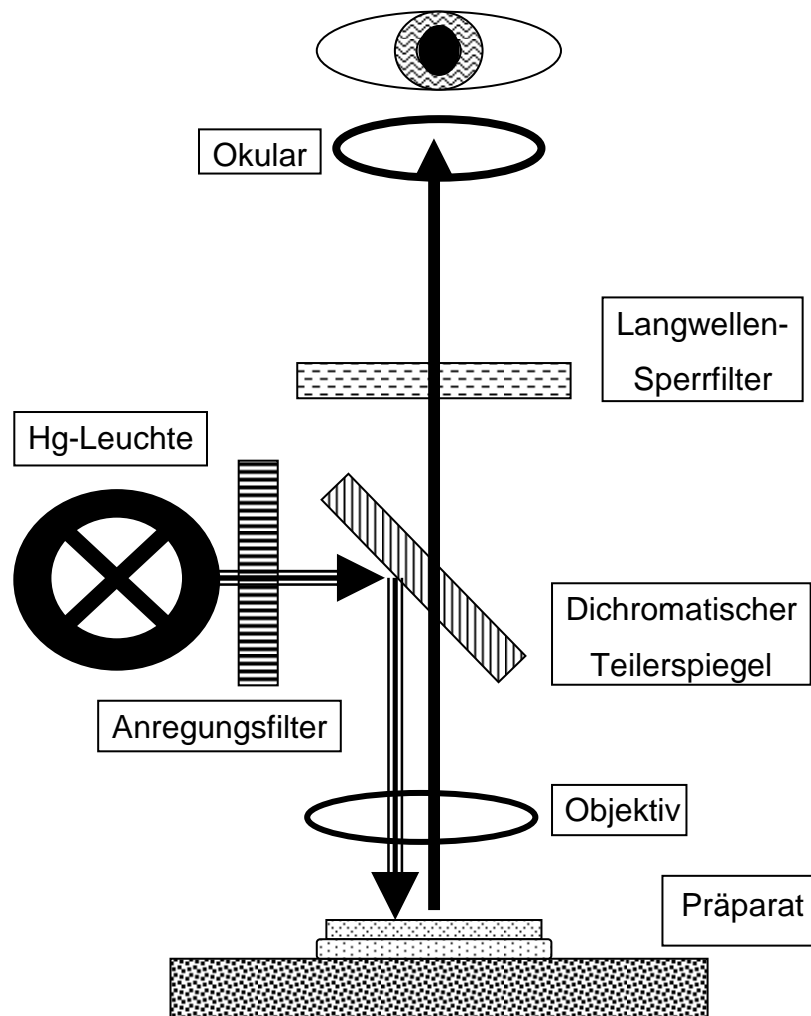
Wellenlänge = Lichtgeschwindigkeit * Plancksche Konstante / Energie

Daraus folgt, dass das Emissionslicht der Fluorochrome eine größere Wellenlänge im Vergleich zu dem Anregungslicht hat.

Oben beschriebener Dichromatischer Teilerspiegel ist für eben dieses langwelligere Emissionslicht durchlässig, so dass dieses durch das Okular ins Auge des Betrachters gelangen kann. Alternativ kann dieses Licht auch auf eine Digitalkamera zur Anfertigung von Aufnahmen umgelenkt werden. Bei dem verwendeten Mikroskop war eine CCD Kamera (Kamera mit gekühltem ladungsgekoppeltem Bildsensor) des Herstellers Photometrics (Tucson, Arizona) installiert. Mit dieser wurde jeweils das Emissionslicht eines Fluoreszenzfarbstoffes in Schwarz-Weiß aufgenommen und diesem über die verwendete Software (ISIS 3 der Firma Meta Systems, Altlußheim) eine Falschfarbe zugeteilt.

Bei der hier durchgeführten FISH wurden deshalb jeweils drei Aufnahmen hintereinander durchgeführt. Aufnahmen des grünen (Fluorescein bei 1p36 Sonde; bzw. dGreen bei 22qter der DiGeorge-Sonde) und des roten Fluorochroms (22qter Sonde; bzw. Rhodamin bei 22q11.2 der DiGeorge-Sonde) und der DAPI-Färbung folgten nacheinander. Über die Bearbeitung des Aufnahmesignals mit der genannten Software war eine Optimierung der aufgenommenen Bilder möglich.

Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des verwendeten Fluoreszenzmikroskop



Charakteristika der Fluoreszenzfilter des AX 70 (Olympus; Hamburg)

Filter	NU (DAPI)	MWIBA (FITC)	MWIG (Rhodamin; Cy3)
Anregungsfilter	360-370nm	460-490nm	520-550nm
Emmissionsfilter	470nm	515-550nm	570nm
Strahlenteiler Transmission	400nm	505nm	550nm

FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; DAPI = 4, 6-diamino-2-phenylindol

3.2.4.7 Auswertung

Die Auswertung der Interphase-FISH erfolgte nach den Kriterien nach Hopman et al. (1988). Dazu wurden mindestens 200 Zellkerne nach folgenden Kriterien ausgezählt. Nur ganze, also scharf begrenzte und nicht überlappende Kerne wurden gewertet. Nur helle, punktförmige und denen der Kontroll-Hybridisierung ähnelnden Signale wurden in die Auswertung einbezogen. Beim Mikroskopieren ist zu beachten, dass die Signale sich in unterschiedlichen Ebenen zum Objektiv befinden können und deshalb der Raum, in dem die Kerne verteilt sind (Bereich zwischen Deckglas und Objektträger), durchfokussiert werden muss, um keine Signale zu übersehen.

3.2.4.8 Festlegung der Grenzwerte

Bei den Kontrollpräparaten aus Blutlymphozyten zeigte der weitaus größte Teil der ausgewerteten Kerne für jede der eingesetzten Sonden die erwarteten zwei Signale. Um diesen Erwartungswert ergab sich aber eine Streuung, die z. B. auf Fehlhybridisierungen oder somatische Chromosomenpaarung zurückzuführen ist. Es wurde angenommen, dass diese Fehlerquellen auch bei den Meningeomzellen aus Zellkultur eine Streuung der gleichen Größenordnung um den tatsächlichen Wert der Zählergebnisse verursachen. Um zu entscheiden, ob die untersuchten Tumoren signifikante Aberrationen aufweisen, wurde die zu erwartende Streuung in die Auswertung mit einbezogen.

Für jede Sonde getrennt wurde der Anteil jeder Signal-Konstellation berechnet. Aus den Ergebnissen der einzelnen Kontrollen wurde ein Mittelwert und eine Standardabweichung mit Hilfe von Software (Microsoft Excel) gebildet (Gleichungen s.u.). Als Grenze wurde der Mittelwert plus zweifache Standardabweichung festgesetzt. Falls diese Grenze kleiner als vier Prozent war, wurde Sie zur Sicherheit auf diese hoch gesetzt. Die errechneten Grenzwerte für die Ereignisse der einzelnen Sonden wurden auf jeweils einzelne Klone angewendet, um nochmals ein erhöhtes Signifikanz-Niveau zu erreichen. Ein Ereignis wurde als signifikant gewertet, wenn der Anteil der Zellen mit dieser Signalkombination höher als der festgelegte Grenzwert war. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und die daraus resultierenden Grenzwerte sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n X_i \qquad s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

\bar{X} = Mittelwert

n = Gesamtzahl der Proben

s = Standardabweichung

4 Ergebnisse

4.1 Konventionelle Karyotypisierung mittels G-Bänderung

Tabelle 3a:

Patientendaten, WHO Grad und Karyotyp der untersuchten Meningeome

Fall-Nummer	Alter	Geschlecht	WHO	Karyotyp
T5603	65	w	3	46,XX [14]
T5676	61	w	3	72-81[4n], XX, cx, del(1)(p21)*2, ?t(2;8)(p13;p21)*2,-22*2 [cp15]
T5726	35	w	2	45,XX,-22 [9]
T5737	46	m	3	42,XY, del(1)(p21),-6, -14, -18, -22 [10]
T5750	60	w	1	46,XX [15]
T5830	69	w	2	43,X, -X, -14, -22
T5884	57	m	1	40,XY,-1,-1,der(1)t(1;1)(p36;q21), -10,-14,-16,-18,-22 [cp13]
T5902	34	w	2	46,XX [cp12]
T5952	69	w	3	46,XX [9]
T6022	85	w	3	40,XX,del(1)(p21),der(4)(p),-6,-10,-14,-15,-21,-22 [cp16]
T6112	44	w	1	46,XX [cp7]
T6119	42	w	1	45,XX,-22 [15]
T6125	71	w	1	45;XX, -22 [cp16]
T6132	46	w	2	44,XX, -18, -22 [cp7]; 44,XX, -20,-22 [cp3]; 43,XX, -18,-20,-22 [cp2]
T6133	68	w	1	45,XX,-22 [15]
T6137	67	w	2	58,XX, +3,+4,+5,+9,+12,+13,+14,+15,+17,+18,+20,+21 [cp12]
T6138	56	m	1	46,XY [cp13]
T6153	49	m	1	47,XY,+17,+20,-22 [cp12]
T6176	52	w	3	46,XX [cp 2]; 39-47,XX,?del(1)(p12) [cp2]
T6184	74	m	1	46,XY [cp12]
T6192	80	w	2	46,XX [cp17]
T6198	57	w	2	45,XX,-22 [cp12]
T6199	76	w	1	43,X,-X,-14,-22 [cp5]; 83-90,cx [cp3]
T6201	38	w	3	46,XX [cp15]
T6204	56	w	1	45,XX,-22 [cp13]
T6218	76	m	1	46,XY [cp12]
T6235	72	w	2	46,XX [cp6]
T6245	74	w	1	*
T6249	46	m	1	46,XY [cp9], 45,XY,-22 [cp8]
T6263	69	m	2	46,XY [cp8]
T6265	70	m	1	46,XY [cp11]
T6268	39	w	3	43,XX,del(1)(p21),t(9;10)(q21;q26),-10,-14,-22 [cp16]
T6277	49	w	2	43,XY,-1,-4,+t(1;4)(p21;q12),-5,-16,-19,der(22)(p11),+mar [cp24]
T6284	60	w	2	46,XX,?inv(2)(p21q21) [cp14]; 46,XX [cp4]
T6325	59	m	2	42,XY, del(1)(p32),-6, -10, -18, -22 [cp7]

*: Karyotyp ist nicht bekannt

m = männlich

w = weiblich

Die Ergebnisse der konventionellen Karyotypisierung mittels G-Bänderung der in dieser Arbeit untersuchten Meningeome zeigt Tabelle 3a. Ein Fall (T6245) konnte nicht karyotypisiert werden, da zu wenige Metaphasen und diese mit zu schlechter Qualität präpariert werden konnten. Von den anderen 34 Meningeomen liegen die Karyotypen vor. 13 der 34 Tumore zeigen einen normalen Karyotyp, 7 zeigen die typische alleinige Monosomie 22. Bei zwölf Meningeomen sind neben der Monosomie 22 weitere Chromosomenverluste vorhanden. Darunter sind 7 Fälle mit einem teilweisen oder kompletten Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1, 6 Fälle mit einer Monosomie 14, 4 davon mit dem Verlust von 1p kombiniert. Eine Monosomie von den Chromosomen 10 und 18 wird in jeweils 4 Meningeomen, sowie eine Monosomie 6 in 3 Meningeomen beobachtet. Veränderungen der Chromosomen 2, 4, 16 und X treten in jeweils 2 Tumoren auf. In jeweils einer Probe sind Veränderungen der Chromosomen 5, 8, 15, 19, 20 und 21 festzustellen. Ein Meningeom (T6137) zeigt einen hyperdiploiden Chromosomensatz.

Zusätzlich lagen bei zwei Rezidivtumoren die Karyotypisierungsergebnisse der vorherigen Meningeome vor. Diese sind in den Tabellen 3B und C aufgelistet. In beiden Fällen wurden die Rezidivtumore bösartiger und die genetischen Veränderungen häufiger. Interessanterweise waren 1p Verluste erst bei späteren Rezidiven zu finden. Andere seltenere Veränderungen, wie die Verluste der Chromosomen 4, 6, 13, 18 und 19, waren dagegen schon vor einem 1p Verlust feststellbar. Sowohl Klone mit ähnlichen Aberrationen traten in den folgenden Tumoren auf, als auch völlig neue chromosomale Veränderungen, wie der Chromosom 18 Verlust bei dem Rezidiv von T6325 1999. In diesem Tumor zeigte sich andererseits der in den vorherigen Meningeomen detektierte Verlust von Chromosom 19 nicht mehr.

Tabelle 3B: T6176

OP- Jahr	WHO Grad	Karyotyp
1994	II	46,XX [8]; 46,XX, -13, +mar [2]
1996	II	Monosomie 1p36 mit der FISH detektiert
2001	III	39-43,XX, cx, del(1) (p12), -7, -10, -14, -15, -18, -19, -22, +1-3mar [cp8]
2004	III	46,XX [cp2]; 39, XX, ? del(1)(p12) [cp2]

Tabelle 3C: T6325

OP-Jahr	WHO Grad	Karyotyp
1986	I	46,XY[15]; 45,XY,-22 [2]; 45-47, XY, cx [cp5]; 44,XY,-22, cx [1]
1992	II	45,XY,-22 [2]; 44,XY,-22,-19 [10]
1995	II	44,XY,-19,-22 [6]
1999	II	46,XY [9]; 44,X,-Y,-22[1]; 43,XY,-4,-6,-18 [1]
2005	II	42,XY, del(1)(p32),-6, -10, -18, -22 [cp7]

4.2 FISH an Lymphozytenpräparate

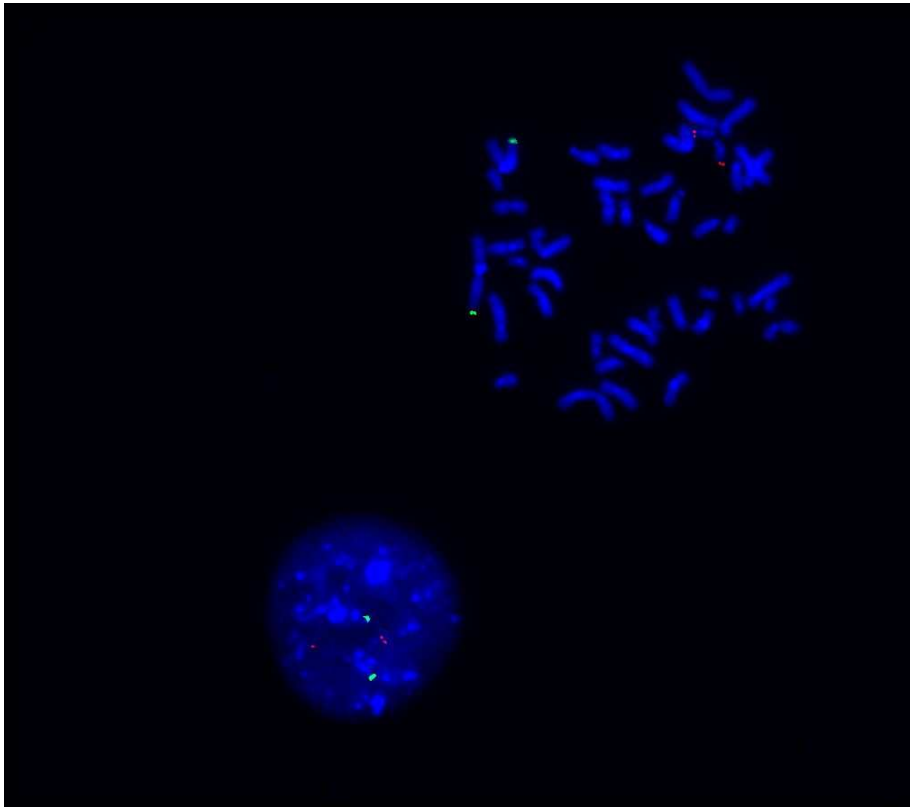


Abbildung 4-1: FISH an Lymphozytenpräparat: Oben Metaphase: korrekte Sonden Bindung an den kurzen Arm von Chromosom 1 (grünes Signal) und an den langen Arm von Chromosom 22 (rotes Signal); unten Interphasezellkern: jeweils zwei Signale für jeweils zwei Chromosomen 1 und 22

Die FISH-Untersuchung der Lymphozyten Metaphasen Präparate dienen zur Kontrolle der spezifischen Bindung der FISH-Sonden. An den Chromosomen eines gesunden Probanden lässt sich direkt erkennen, ob die Sonde in der erwarteten Chromosomenregion bindet und ob

eventuell unspezifische Signalbindungen auftreten. Die 30 untersuchten Metaphasen zeigten alle eine korrekte Lage der Sonden ohne jegliche Fehlbindung (siehe Abbildung 4-1). Die Signale der Metaphasen-FISH können deshalb als sehr sensitiv und spezifisch betrachtet werden.

Um die Interphase-FISH korrekt auswerten zu können, müssen außerdem die Signale in den Interphasenkernen der Lymphozyten ausgezählt werden. Dies geschieht, wie auch die anschließende Untersuchung der Tumorinterphasekerne, nach den Kriterien von Hopman et al. (1988). Dies soll die Gefahr von Artefakten durch Schmutz, Splitsignale und sonstigen fehlerhaften Interpretation minimieren. Aus den jeweils mindestens 200 ausgezählten Kernen wurden die in Tabelle 4 ersichtlichen Vertrauensbereiche festgelegt.

Für die Sondenkombination 1p36 mit 22qter ergaben sich folgende Grenzwerte:

Gewinne von 1p36, 22qter oder Verluste von 1p36 werden ab je 4% als signifikant gewertet. Für den Verlust von 22qter liegt der Wert bei 5,7%.

Für die Sondenkombination 22q11.2 und 22qter ergaben sich folgende Grenzwerte:

Da auch im Kontrollgewebe durch das Auftreten von Splitsignalen eine Auszählung zum Teil sehr schwierig war und nur ein Lymphozyten- Kontrollpräparat zur Verfügung stand, wurden die Grenzwerte für Gewinne und Verluste von 22q11.2 und 22qter in dieser Sondenkombination auf je 10% hochgesetzt.

Tabelle 4: Vertrauensbereiche in Prozent

A) Für Sondenkombination 22qter und 1p36:

Ein 22qter Signal:

Mittelwert	2,15
Standardabweichung	1,75
Mittelwert + 2x Standardabweichung	5,63
Festgesetzter Vertrauensbereich	5,7

Drei oder mehr 22qter Signale:

Mittelwert	0,94
Standardabweichung	0,71
Mittelwert + 2x Standardabweichung	2,35
Festgesetzter Vertrauensbereich	4,0

Ein 1p36 Signal:

Mittelwert	1,85
Standardabweichung	0,11
Mittelwert + 2x Standardabweichung	2,06
Festgesetzter Vertrauensbereich	4,0

Drei oder mehr 1p36 Signale:

Mittelwert	0,24
Standardabweichung	0,34
Mittelwert + 2x Standardabweichung	0,92
Festgesetzter Vertrauensbereich	4,0

B) Für DiGeorge Sondenkombination 22q11.2 und 22qter:

	Kontrollpräparat	Festgesetzter Vertrauensbereich
Ein 22q11.2 Signal	2,9	10
Drei oder mehr 22q11.2 Signale	2,4	10
Ein 22qter Signal	3,9	10
Drei oder mehr 22qter Signale	3,9	10

4.3 FISH an Meningeomen

4.3.1 Interphase FISH

Die Interphase-FISH wurde bei 35 Meningeomen von 35 verschiedenen Patienten durchgeführt. Bis auf einen Fall waren alle Meningeome mit konventioneller Karyotypisierung voruntersucht. 25 Patienten waren weiblichen und 10 männlichen Geschlechts. Histologisch wurden 15 dem WHO I, 12 dem WHO II und acht dem WHO III Grad zugeordnet. Nach den Kriterien von Hopman et al. (1988) wurden jeweils mindestens 200 Kerne ausgezählt. Die Signalkonstellationen sind in Tabelle 5 gedeutet und die Ergebnisse in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Beurteilung der beobachteten Signalkonstellationen

Anzahl der Signale für die Sonde 1p36	Anzahl der Signale für die Sonde 22qter	Beurteilung der Signalkonstellation
2	2	Unauffällige disome Zelle
2	1	Deletion von 22qter evtl. Monosomie 22
4	2	Deletion von 22qter evtl. bis zu Monosomie 22 bei tetraploider Zelle oder Zelle kurz vor Teilung
1	2	Deletion von 1p36 evtl. bis zu Monosomie 1
2	4	Deletion von 1p36 evtl. bis zu Monosomie 1 bei tetraploider Zelle oder Zelle kurz vor Teilung
1	1	Deletion von 1p36 und 22qter
2	3	Gewinn von 22qter oder bis zu evtl. Trisomie 22
4	4	Tetraploide Zelle oder Zelle kurz vor Teilung

Tabelle 6: FISH Ergebnisse der Sondenkombination 22qter und 1p36 in Prozent

Fall-Nummer	Alter	G.	WHO	1p-	1p-&22q-	22q-	22q+	Tetraploid	Nachb.-Zeit	Rezidiv nach
T5750r	60	w	1	1	0,5	12,7	0	0,5	75M.	51M.
T5884r	57	m	1	4,7	0,4	4,3	0,4	3,8	3M.	
T6112	44	w	1	1	0	4,3	0	1	19M.	
T6218	76	m	1	0,9	0	2,3	0	0,5	15M.	
T6138	56	m	1	1,4	0	8,6	0	3,6	37M.	
T6265	70	m	1	2	0	2,4	0	4	41M.	
T6184	74	m	1	0	0	0,5	0	0	0M.	
T6119	42	w	1	0	1,2	57,5	0,4	0	37M.	
T6133	68	w	1	0,5	0,9	49,1	0	0	48M.	
T6249	46	m	1	0,5	1,5	10,9	1,5	1,5	0M.	
T6204	56	w	1	0	0,5	27	0	27	44M.	
T6125	71	w	1	0	3,7	83,6	0	0	19M.	
T6199	76	w	1	2,3	0,5	33,3	0	0	8M.	
T6153	49	m	1	0	1,4	78,3	0	0	47M.	
T6245	74	w	1	0,9	1,3	2,2	0	9,9	30M.	
T6235	72	w	2	1,3	0	40,7	0	0	31M.	
T6192r	80	w	2	1,2	2,1	1,7	0,8	0	12M.	
T5902r	34	w	2	0,9	0,9	1,3	1,3	22,7	68M.	
T6284	60	w	2	2,6	0	3,1	0,4	8,8	37M.	
T6198r	57	w	2	0,4	0,4	86	0	86	0M.	
T5726r	35	w	2	0,4	2,2	45,4	0,9	2,6	77M.	
T6277	49	w	2	8,3	71,3	2,3	0	0	33M.	33M.
T6132	46	w	2	2,1	0	18,8	0	0	48M.	
T5830	69	w	2	0	0,5	9	0,5	5,2	0M.	
T6137	67	w	2	0	0	1,7	0	1,3	0M.	
T6325r	59	m	2	0,4	31,6	23,2	0	1,1	25M.	
T6263	69	m	2	0	0	14,8	0	1,4	39M.	
T5952	69	w	3	0,4	3,5	7	0,4	1,7	4M.	4M.
T5603	65	w	3	0	0,4	5,5	1,3	7,7	8M.	8M.
T6176r	52	w	3	1	23,9	2,9	0	1	74M.	12M.
T6022	85	w	3	14,5	67,1	4,4	0	0	0M.	
T6268	39	w	3	9,7	70,9	2,6	0	0	37M.	14M.
T5737r	46	m	3	1,3	0,8	12,1	1,3	3,3	73M.	53M.
T5676r	61	w	3	0	0	5,3	8,4	11,9	0M.	
T6201	38	w	3	1,3	0	2,7	0	0,9	0M.	

r: Tumor ist ein Rezidiv;

G. Geschlecht

1p-: Klon mit alleiniger Deletion von 1p36;

1p-&22q-: Klon mit kombinierter Deletion von 1p36 und 22qter;

22q-: Klon mit alleiniger Deletion 22qter;

22q+: Klon mit alleinigem Gewinn von 22qter;

Nachb.-Zeit: Nachbeobachtungszeit der Patienten nach Tumorextirpation

Rezidiv nach: untersuchter Tumor ist nach Extirpation nach angegebener Zeit rezidiert;

m: männlich;

w: weiblich;

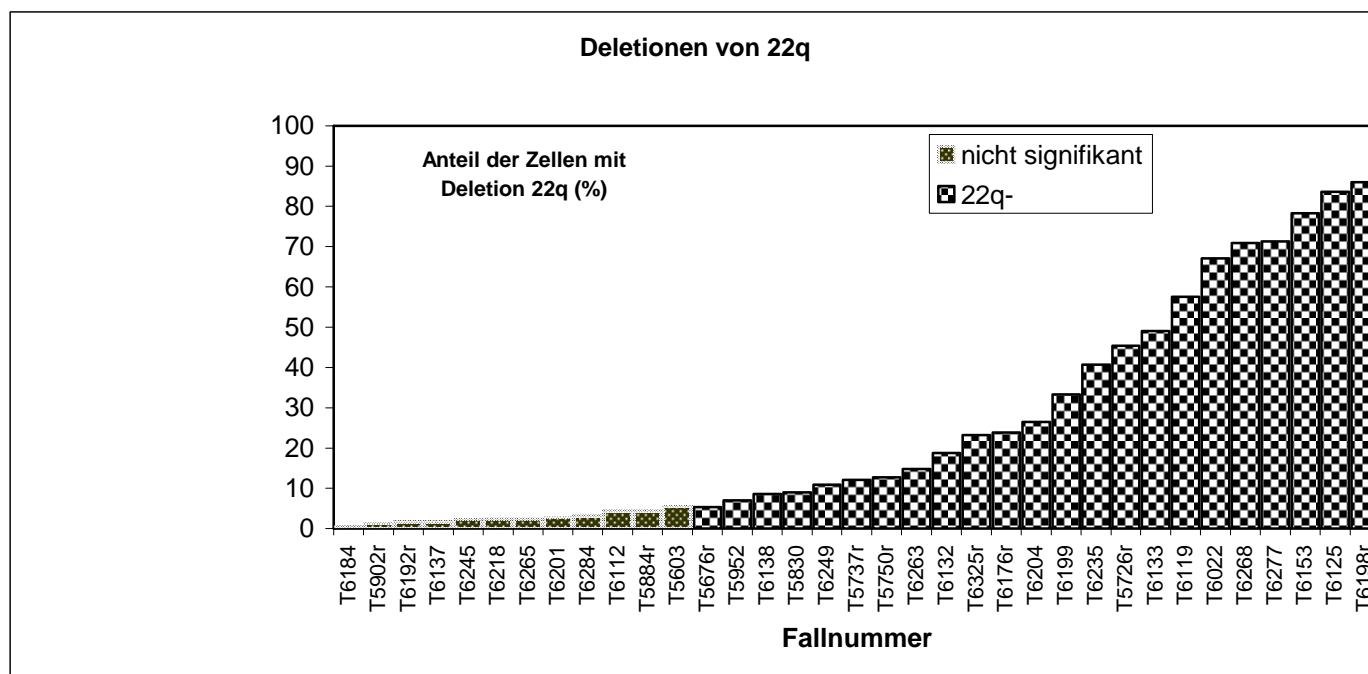
M.: Monate;

unterstrichene Zahlen: Deletionen bei Tetraploidie.

4.3.1.1 Veränderungen von Chromosom 22

Der teilweise oder komplette Verlust von Chromosom 22 war die häufigste in dieser Untersuchung gefundene Aberration. 24 der 35 Meningeome (69%) zeigten diesen Befund. Der Anteil der Zellen mit Verlust eines Signals für Chromosom 22 variierte zwischen 5,3% (T5676) und 86% (T6125). Tabelle 7 gibt genaue Auskunft über den Anteil der 22q deletierten Zellen je Fall. In Abbildung 4-4 ist eine alleinige Monosomie 22 in Metaphase zu sehen. In Abbildung 4-5 und 4-6 sind Verluste von 22q mit und ohne 1p36 Verluste zu sehen.

Tabelle 7: Deletionen von 22qter



Eine Deletion war durch das Erscheinen von einem roten Signal der Sonde 22qter gekennzeichnet (siehe Abbildung 4-4). In drei Fällen (T5676, T6198, T6201) wurde aufgrund der Signalkonstellation von 4 Signalen für 1p36 und 2 Signalen für 22qter ebenfalls von einer Deletion 22q bei einer eventuell vorliegenden Tetraploidisierung ausgegangen. Das noch nicht beschriebene Phänomen eines doppelten 1p Gewinns ließ diese Deutung zu. Der Fall T6198 zeigte bei rund 5% aller Zellen sogar 8 Signale für 1p36 und 4 Signale für 22qter (Abbildung 4-11). Von einer Tetraploidisierung ist in diesem Fall sicher auszugehen.

Fast alle Fälle zeigten auch Klone mit jeweils vier Signalen für 22qter und 1p36. Dieses Ereignis wurde als Zelle kurz vor der Teilung, nach erfolgter Duplikation des Erbgutes

gedeutet. In einigen wenigen Fällen war aber die Anzahl der Zellen mit diesem Ereignis so groß, dass eine Tetraploidisierung denkbar wäre. Die Anteile waren folgendermaßen T5603: 7,7%, T5676: 11,9%, T5830: 5,2%, T5902: 22,7%, T6245: 9,9%, T6284: 8,8%. Mit der eingesetzten Sondenkombination konnte aber die Tetraploidisierung nicht bewiesen werden. Fall T5676 zeigte bei 8,4% aller Zellen 3 Signale für 22qter und 2 Signale für 1p36 (Abbildung 4-7). Diese Signalkombination lässt zwei Deutungen zu. Entweder handelt es sich um einen einfachen Zugewinn von 22q oder um eine Tetraploidisierung mit zweifacher Deletion von 1p und einfachem Verlust von 22q. Da kein anderer Klon auf die Deletion von 1p hindeutete, dürfte es sich hierbei um einen Gewinn von 22q handeln. In diesem Tumor war ein zweiter Klon detektierbar, der vier 1p36-Signale und zwei 22qter-Signale zeigte. Hier ist von einer Tetraploidisierung mit doppeltem 22q Verlust auszugehen.

4.3.1.2 Vergleich der Ergebnisse bezüglich Chromosom 22

Acht Fälle wurden sowohl mit der 1p36 und 22qter Sondenkombination als auch mit der 22q11.2 und 22qter Sondenkombination untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8:

Untersuchung von Chromosom 22 mit zwei verschiedenen Sondenkombinationen

Fall- Nummer	Deletion von 22qter (Sondenkombination 1p36+22qter)	Deletion von 22q11.2 und 22qter (DiGeorge Sondenkombination)
T6119	58%	51%
T6125	84%	80%
T6132	19%	1%
T6133	49%	20%
T6153	78%	62%
T6176	24%	35%
T6184	1%	2%
T6192	4%	16%

Bei der Sondenkombination 22q11.2 und 22qter traten Deletionen nur gemeinsam auf.

Der Vergleich der Ergebnisse beider Sondenkombinationen zeigt in sechs der acht Fälle eine Übereinstimmung. Bei diesen Fällen ist auch der Prozentanteil der Zellen mit einer Deletion 22q meistens sehr ähnlich. Bei Fall T6132 konnte kein Verlust von 22q mit der DiGeorge Sonde detektiert werden, obwohl die andere Sondenkombination und die konventionelle

Karyotypisierung eine Deletion detektierte. Bei Meningeom T6192 verhält es sich umgekehrt, dort konnte mit der DiGeorge Sonde eine Deletion detektiert werden, die aber nicht mit der anderen Sondenkombination oder der Karyotypisierung festgestellt werden konnte. Dieser Klon mit Verlust von 22q ist mit 16% der kleinste, der von der DiGeorge-Sonde festgestellte wurde. In den Abbildungen 4-2 und 4-3 sind zwei mit der DiGeorge-Sonde markierte Metaphasen zu sehen.

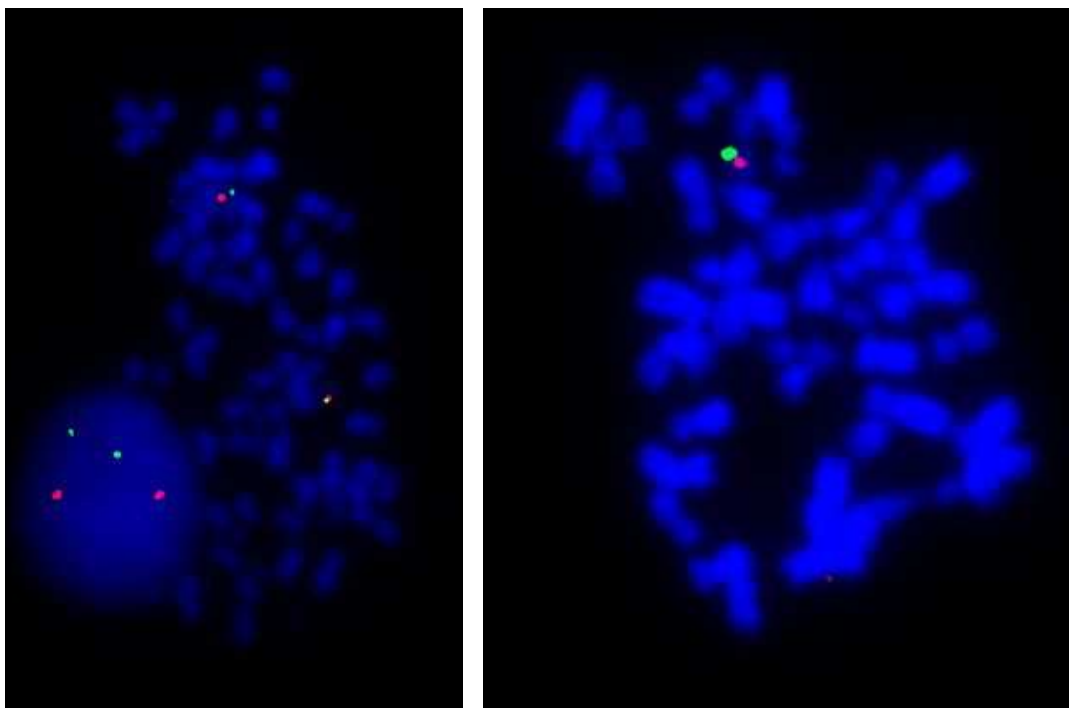


Abbildung 4-2 und 4-3:

Meningeom T6133: DiGeorge-Sonde: rotes Signal 22q11.2; grünes Signal 22qter

Links unauffälliger Befund an Interphase und Metaphase Zellkern: jeweils zwei Signale für beide Sonden

Rechts Monosomie 22: nur ein Signal beider Sonden

In beiden Metaphasen ist die korrekte Lage der DiGeorge-Sonde am Chromosom 22 zu erkennen. Die grüne 22qter Telomersonde distal am langen Arm und die 22q11.2 dicht daneben weiter proximal.

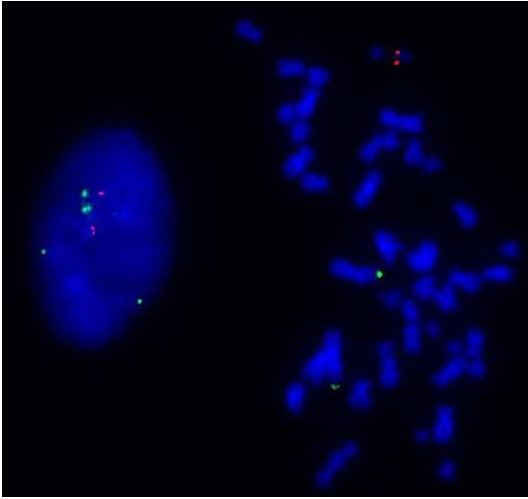


Abbildung 4-4:

Meningeom T6133: 1p36 und 22qter Sonde:

Grün: 1p36; Rot: 22qter

Links: Deletion 22q bei Signalverdopplung
kurz vor Zellteilung

Rechts: Metaphase mit Deletion von 22q

Abbildung 4-5: T6022

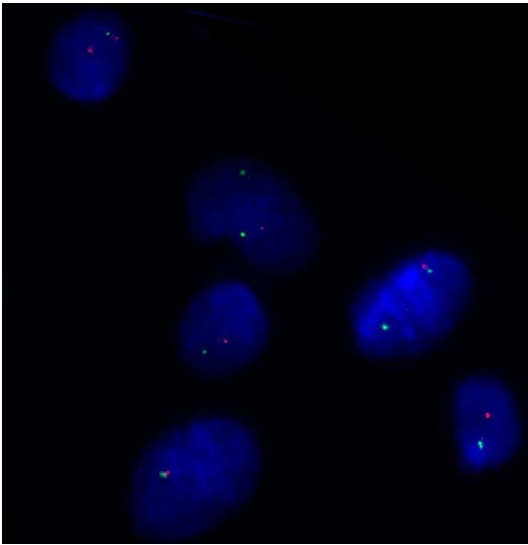


Abbildung 4-6: T6325

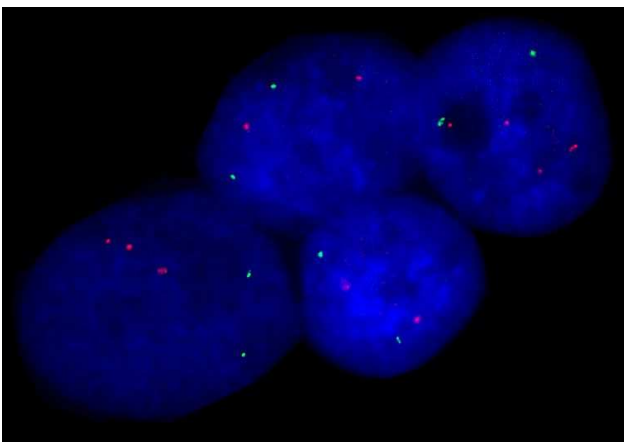
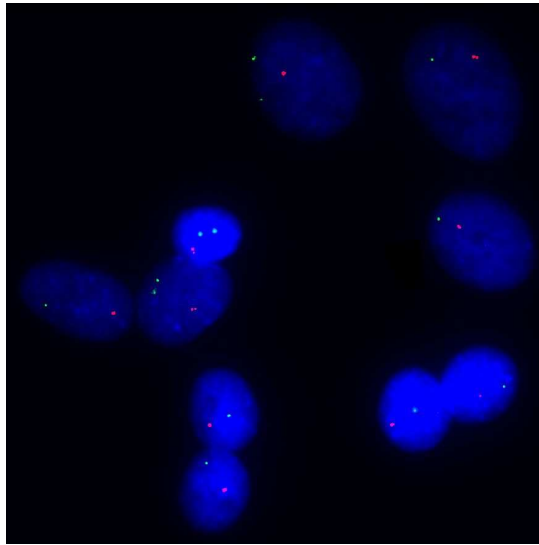


Abbildung 4-7: T5676

Links unten und rechts
oben:

Zwei 1p36 Signale
(grün),

drei 22qter Signale (rot)

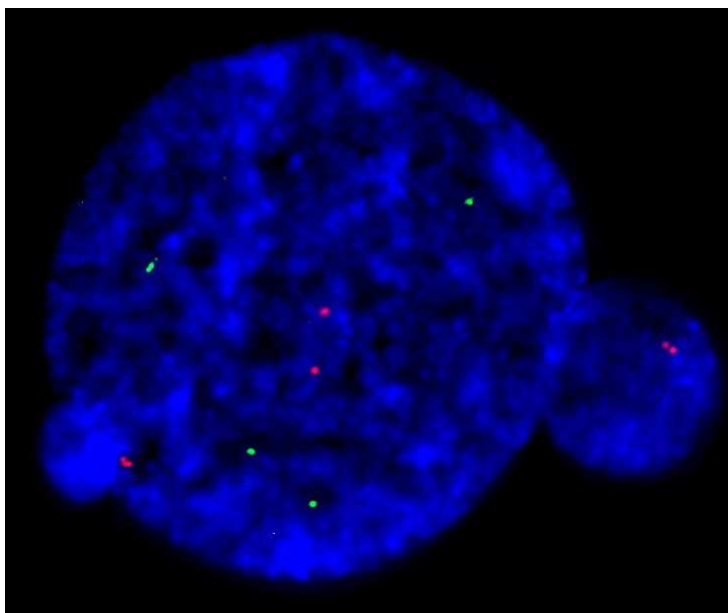


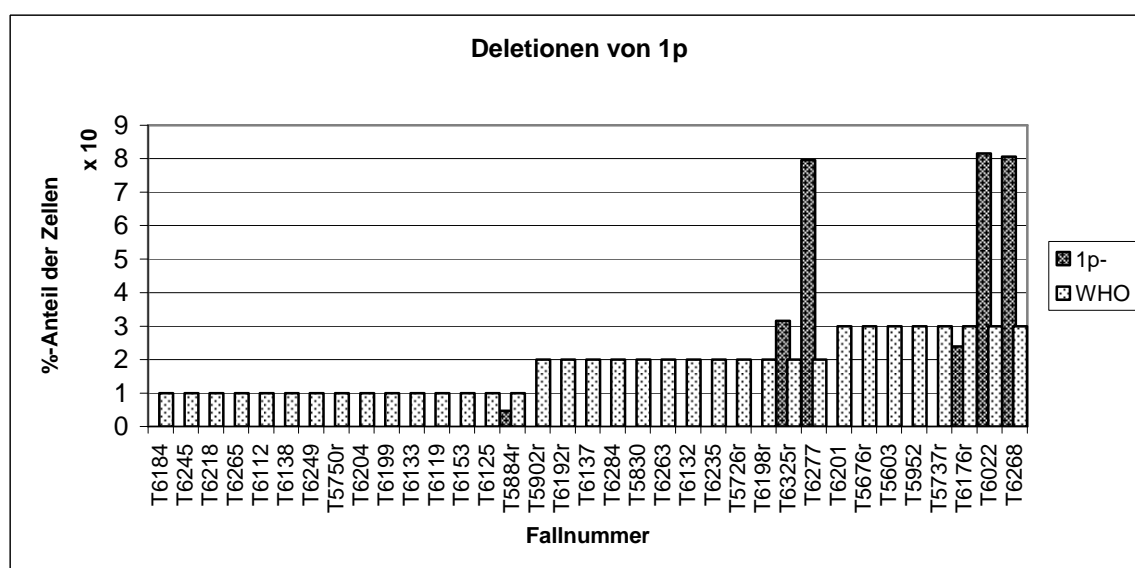
Abbildung 4-8:

T5676

Zellkern mit vier 1p36 Signalen (grün) und zwei 22qter Signalen (rot) im Kern und zwei abgeschnürte Vesikel mit jeweils einem 22qter Signal (rot)

4.3.1.3 Veränderungen von Chromosom 1

Tabelle 8: Anteil der Zellen mit Deletionen 1p36:



In 6 der 35 (17%) untersuchten Fälle war ein Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 festzustellen (siehe Tabelle 8). Dabei variierte der Anteil der Zellen mit 1p36 Signal-Verlust zwischen 4,7% (T5884) und 81,6% (T6022). Genauso, wie bei den Veränderungen von Chromosom 22 beschrieben, konnte die angewendete Sondenkombination bei Tetraploidie und erfolgter doppelter Deletion von 1p und 22qter, eben diese Deletionen nicht detektieren. Wie aber später im Abschnitt über den Vergleich von FISH und Karyotypisierung beschrieben, war dies bei Meningeom T5676 der Fall.

Ein Zugewinn von je zwei 1p36 Signalen wurde bei acht Fällen festgestellt. Dieser war aber immer mit einem Zugewinn von zwei 22qter Signalen kombiniert. Wie schon im Abschnitt über die Veränderungen von Chromosom 22 erklärt, dürfte es sich hierbei um Zellen kurz vor der Teilung handeln. Falls der Anteil dieser Zellen sehr groß war, ist auch an Tetraploidie zu denken. Ein alleiniger Zugewinn von 1p36 Material konnte somit in der FISH bei keinem Meningeom entdeckt werden.

4.3.1.4 Kombination der Aberrationen

Die häufigste in dieser Untersuchung festgestellte Aberration war der Verlust von 22q (24/35: 69%). Die meisten Zellen mit Deletion von 22q waren hinsichtlich des Chromosoms 1 unauffällig. Der Verlust von 1p war dagegen fast ausschließlich mit der Deletion von 22qter verbunden. Eine Ausnahme machte nur Fall T5884, bei welchem der Klon für 22q-leicht unter der Vertrauensgrenze lag (4,3%). In der Karyotypisierung zeigte sich aber auch hier eine Deletion von 22q. Auch Fall T5676 mit dem beobachteten Zugewinn von 22qter Material zeigte viele Zellen mit Verlust von 22q.

4.3.1.5 Klonale Kombination der Aberrationen

Nur sieben Fälle zeigten einen Klon, welcher unauffällig war. Bei 20 Meningeomen konnten zwei Klone unterschieden werden. Bis auf eins dieser Meningeome bestanden alle aus einem unauffälligen und einem auffälligen Klon. Bei 14 war dieser auffällige Klon durch eine Deletion von 22q, bei drei durch eine Tetraploidie, und bei jeweils einem durch eine Deletion von 1p (T5884) und einer kombinierten Deletion von 22q und 1p (T6176) charakterisiert. Bei sieben Meningeomen konnten drei verschiedene Klone unterschieden werden. Vier davon beinhalteten einen Klon mit kombinierter Deletion 1p und 22qter und einem unauffälligen Klon. Der dritte Klon war in drei Fällen durch eine alleinige Deletion 1p (T6022, T6268, T6277) und in einem Fall durch eine alleinige Deletion 22q (T6325) charakterisiert. Nur bei Fall T5676 waren vier Klone unterscheidbar. Einer davon war unauffällig, einer tetraploid, ein weiterer zeigte eine kombinierte Deletion von 1p und 22q und der vierte wies einen Zugewinn an 22q auf.

4.3.2 Metaphase FISH

Es wurden insgesamt 200 Metaphasen mit den Sonden 1p36 und 22qter untersucht, die von 24 der 35 mit Interphase FISH untersuchten Meningeome stammen. Für die Auswertung standen in 7 Fällen 10-31 Metaphasen, in 9 Fällen 5-9 Metaphasen und in 8 Fällen 1-4 Metaphasen pro Meningeom zur Verfügung (siehe auch Tabelle 9). 22 der 24 Fälle zeigten ausschließlich Signalkonstellationen, die signifikanten Klonen der FISH-Untersuchung entsprachen. Die Metaphasen zeigten folgende Varianten: einen normalen Chromosomensatz, eine Monosomie 22 (Abbildung 4-9), eine zusätzliche Deletion von Chromosom 1 (Abbildung 4-5 und 4-10) und eine Tetraploidisierung mit zweifacher Deletion von Chromosom 22 (Abbildung 4-11). Translokationen, Duplikationen oder kleine Deletionen der untersuchten DNA Regionen konnten nicht festgestellt werden.

In zwei Meningeomen (T5750 und T6249) zeigten sich neben den aufgrund der Interphase-FISH und Karyotypisierungs-Ergebnissen (siehe Abbildung 4-19, 4-20) zu erwartenden normalen Metaphasen auch auffällige Chromosomenbefunde.

Die FISH Sonden detektierten in einer Metaphase von Meningeom T5750 extrachromosomal gelegene DNA der Region 22qter. (Abbildung 4-12). In dieser Metaphase sind außerdem zwei regulär detektierte Chromosomen 22 zu erkennen. Es muss hier von einem Gewinn der Region 22qter ausgegangen werden. In einer weiteren Metaphase ist eine Fusion von Chromosom 22 mit einem akrozentischen Chromosom 13 oder 15, welche der D-Gruppe zuzuordnen sind, zu beobachten. (Abbildung 4-13).

In einer weiteren Metaphase liegen zwei Doppelsignale (typisches Signal-Bild bei vielen Chromosomen: jeweils ein Signal an den vom Zentromer zusammengehaltenen zwei DNA Strängen) hintereinander an dem langen Arm von einem Chromosom 22 (Abbildung 4-14). Dies deutet auf eine DNA Duplikation in dieser Region hin oder auf eine Fusion von zwei Chromosomen 22 an den Telomeren ihres langen Armes mit anschließender Deletion von einem der beiden Chromosomen.

Metaphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung:

Abbildung 4-9: T6022

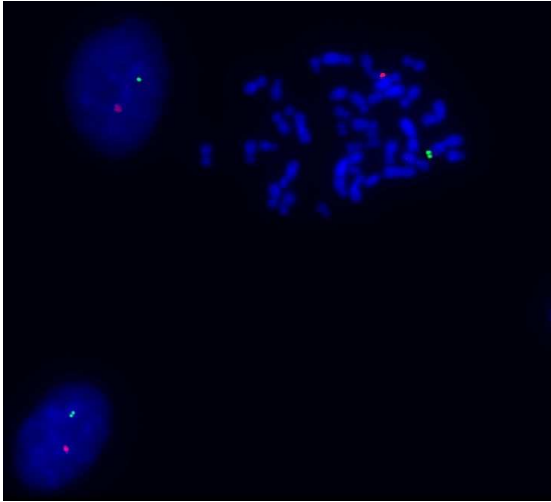


Abbildung 4-10: T6268

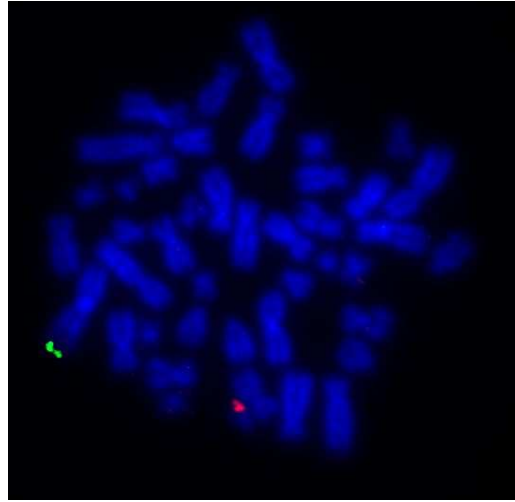


Abbildung 4-11: T6198

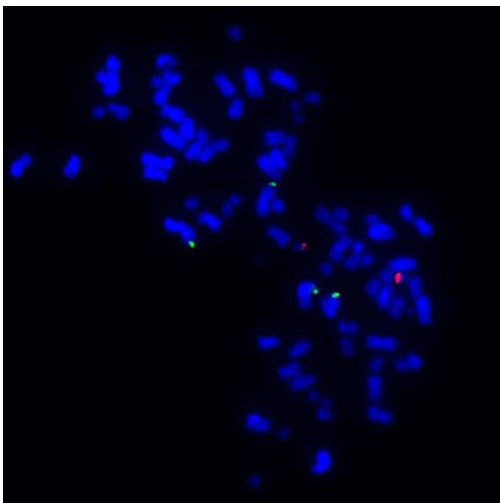


Abbildung 4-12: T5750

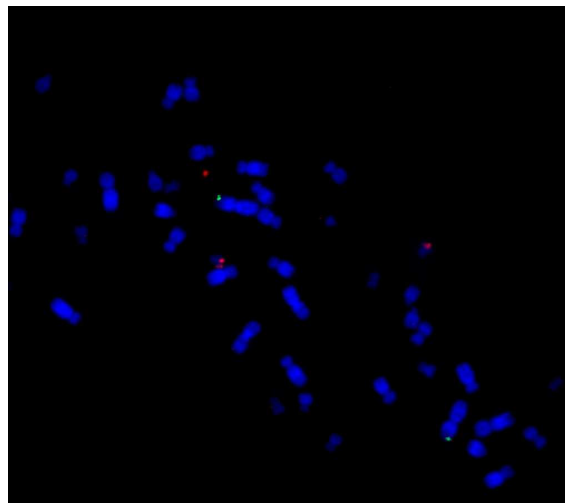
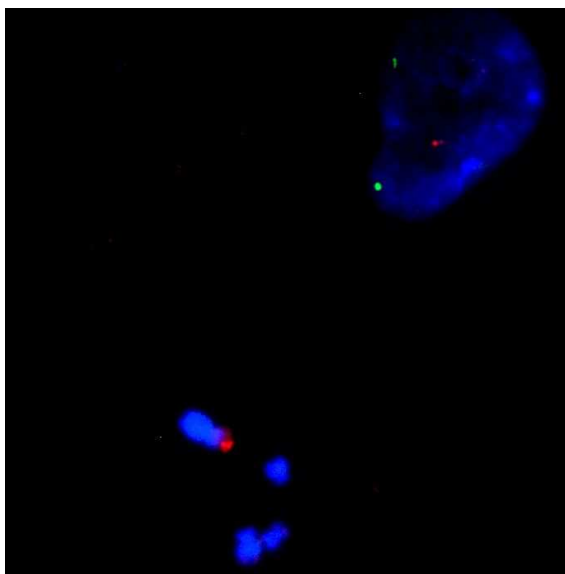
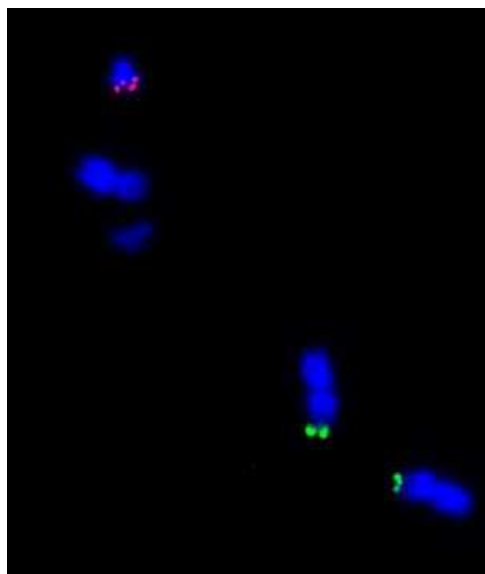
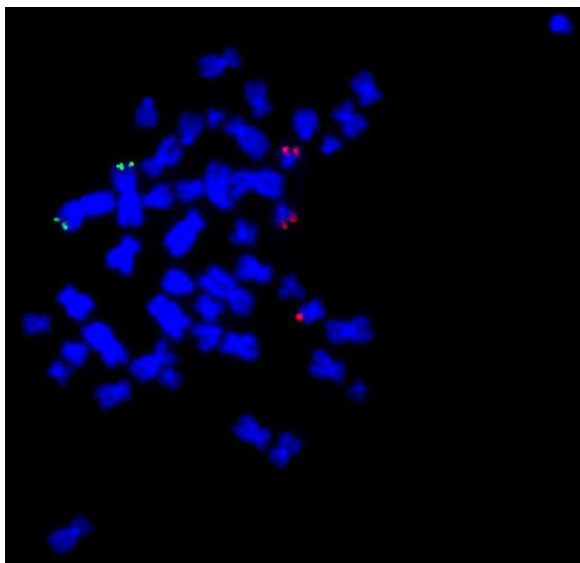
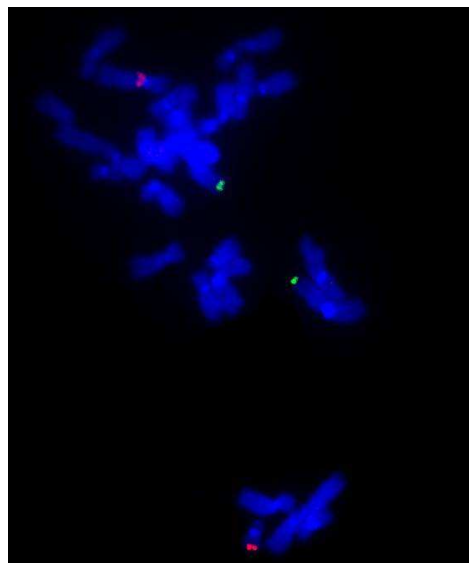


Abbildung 4-13: T5750**Abbildung 4-14: T5750****Abbildung 4-15: T6249****Abbildung 4-16: T6249**

Die Chromosomenpräparate von Fall T6249 zeigen in zwei Metaphasen Translokationen von 22qter Material auf andere Chromosomen. In einem Fall sind zwei unauffällige Chromosomen 22 und ein drittes 22qter Signal auf einem Chromosom, das der F-Gruppe zugeordnet werden konnte, zu erkennen. Es handelt sich hierbei entweder um Chromosom 19 oder 20 (Abbildung 4-15). Die andere Metaphase zeigt nur ein normales Chromosom 22 mit 22qter Signal und ein anderes Chromosom mit 22qter Signalbindung am langen Arm in der Nähe des Zentromers (Abbildung 4-16). Es ist entweder von einer Translokation von

22qter Material in einen Abschnitt eines Chromosoms der B-Gruppe - entweder Chromosom 4 oder 5 - auszugehen oder von der Entstehung eines Markerchromosoms durch komplexe Translokation. Die Chromosomen 1 waren in beiden Metaphasen ohne Veränderungen vorhanden.

Tabelle 9:

Anzahl der mit FISH untersuchten Metaphasen von 24 Meningeomen:

lfd. Nr.	Fall-Nummer	Anzahl Metaphasen	lfd. Nr.	Fall-Nummer	Anzahl Metaphasen
1	T 5603	5	13	T 6137	6
2	T 5676	4	14	T 6184	6
3	T 5737	10	15	T 6192	4
4	T 5750	31	16	T 6198	9
5	T 5830	1	17	T 6199	2
6	T 5884	16	18	T 6201	5
7	T 5952	2	19	T 6263	3
8	T 6022	9	20	T 6268	16
9	T 6119	1	21	T 6277	20
10	T 6125	7	22	T 6249	16
11	T 6132	2	23	T 6284	7
12	T 6133	9	24	T 6325	10

4.4 Vergleich der Ergebnisse von Interphase- FISH und konventioneller Karyotypisierung

34 der 35 mit der FISH untersuchten Meningeome waren zytogenetisch mittels konventioneller Karyotypisierung voruntersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Bei den 17 Fällen, die mit Hilfe der G-Bänderung eine Deletion des Chromosoms 22 zeigten, konnte dies in 16 Fällen mit der Interphase FISH bestätigt werden. Der nicht bestätigte Fall (T5884) wies zwar einen Klon mit Deletion 22q auf, mit einem Anteil von 4,3% (Vertrauensbereich: 5,3%) war dieser aber etwas zu klein, um als signifikant gelten zu können.

Die konventionelle Karyotypisierung konnte in 7 Fällen eine teilweise Deletion des kurzen Arms des Chromosoms 1 detektieren. In fünf dieser Fälle stimmte dies mit der FISH überein (T5603, T5884, T6022, T6268, T6325). In einem Fall (T5676) war allerdings der ermittelte Karyotyp ein tetraploider Chromosomensatz mit doppelter Deletion von Chromosom 22 und doppelter Deletion von einem Teil von 1p. Dies bedeutet, dass in der FISH bei der verwendeten Sondenkombination die Signalkombination zwei Signale für 1p36 und 2 Signale für 22qter wäre. 68,6 % der Zellen dieses Tumors zeigten diese Signalkombination. Eine „normale“ Zelle zeigt aber die gleiche Kombination an. Deswegen konnte von der FISH Untersuchung diese Deletion nicht identifiziert werden. Der Fall T5737, der nach der zytogenetischen Voruntersuchung eine für eine Deletion von 1p typische Signalkombination erwarten ließ, zeigte diese nur in 2,3% der Zellen und war dadurch weit unter der von uns festgesetzten Vertrauensgrenze von 4,5%.

Umgekehrt detektierte die FISH Untersuchung in sechs Fällen eine Deletion von 22q, die mit der G-Bänderung nicht zu entdecken war (in der Tabelle sind diese Fälle fettgedruckt). Fünf dieser Fälle zeigten in der konventionellen Karyotypisierung einen unauffälligen Chromosomensatz (T5750 (siehe Abbildung 4-20), T5952, T6138, T6235, T6263). Bei dem sechsten Fall (T6176) konnten in der Karyotypisierung nur zwei schlecht identifizierbare unvollständige Metaphasen untersucht werden und Veränderung von den Chromosomen 22 deshalb nicht detektiert werden.

Bezüglich Chromosoms 1, konnte die FISH eine Deletion von 1p bei einem Fall (T6277) identifizieren, der nach der G-Bänderung allein eine Translokation zwischen Chromosom 1 und 4 zeigte (t(1; 4)(p21, q12)). Das entsprechende Karyogramm ist in Abbildung 4-17 dargestellt.

Abbildung 4-17: T6277

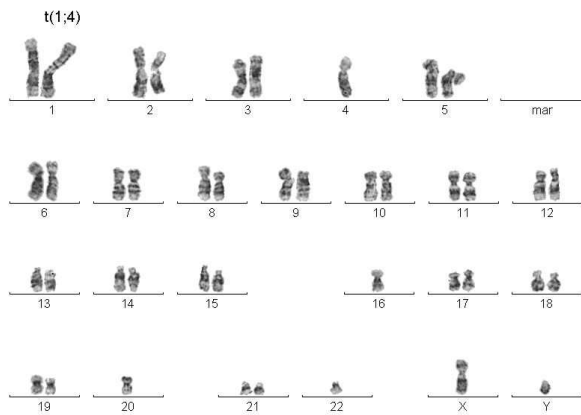


Abbildung 4-18: T6022

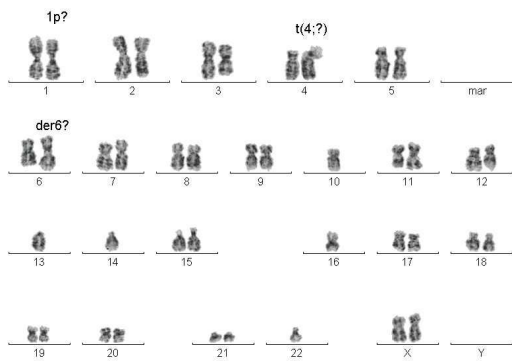


Abbildung 4-19: T6249

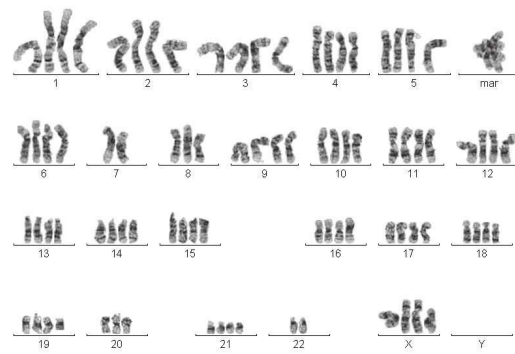


Abbildung 4-20: T5750

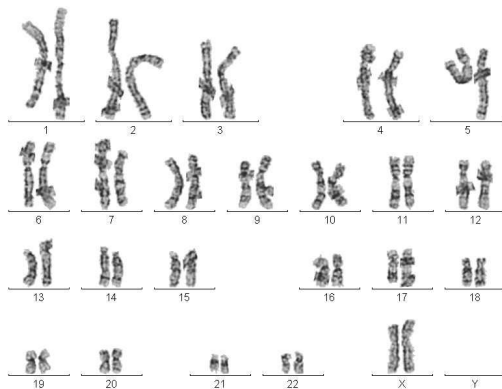


Abbildung 4-21: T5884

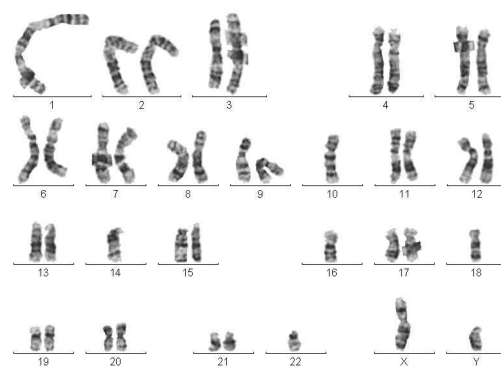


Tabelle 10: Vergleich der Ergebnisse von Interphase-FISH und Karyotypisierung

Nummer	Alter	WHO	Karyotyp	Z. G.	1p-	1p-&22q-	22q-
T6184	74	1	46,XY [cp12]	0	0	0	0,5
T5902r	34	2	46,XX [cp12]	0	0,9	0,9	1,3
T6192r	80	2	46,XX [cp17]	0	1,2	2,1	1,7
T6218	76	1	46,XY [cp12]	0	0,9	0	2,3
T6265	70	1	46,XY [cp11]	0	2	0	2,4
T6201	38	3	46,XX [cp15]	0	1,3	0	2,7
T6284	60	2	46,XX,?inv(2)(p21q21) [cp14]; 46,XX [cp4]	0	2,6	0	3,1
T6112	44	1	46,XX [cp7]	0	1	0	4,3
T5603	65	3	46,XX [14]	0	0	0,4	5,5
T5952	69	3	46,XX [9]	0	0,4	3,5	7
T6138	56	1	46,XY [cp13]	0	1,4	0	8,6
T5750r	60	1	46,XX [15]	0	1	0,5	12,7
T6263	69	2	46,XY [cp8]	0	0	0	14,8
T6235	72	2	46,XX [cp6]	0	1,3	0	40,7
T6249	46	1	46,XY [cp9], 45,XY,-22 [cp8]	1	0,5	1,5	10,9
T6204	56	1	45,XX,-22 [cp 13]	1	0	0,5	<u>26,5</u>
T5726r	35	2	45,XX,-22 [9]	1	0,4	2,2	45,4
T6133	68	1	45,XX,-22 [15]	1	0,5	0,9	49,1
T6119	42	1	45,XX,-22 [15]	1	0	1,2	57,5
T6125	71	1	45;XX, -22 [cp16]	1	0	3,7	83,6
T6198r	57	2	45,XX,-22 [cp12]	1	0,4	0,4	<u>86</u>
T6277	49	2	43,XY,-1,-4,+t(1;4)(p21;q12),-5,-16,-19,der(22)(p11),+mar [cp24]	2	8,3	71,3	2,3
T5830	69	2	43,X,-X,-14,-22	2	0	0,5	9
T6132	46	2	44,XX,-18,-22 [cp7]; 44,XX,-20,-22 [cp3]; 43,XX,-18,-20,-22[cp2]	2	2,1	0	18,8
T6199	76	1	43,X,-X,-14,-22 [cp5]; 83-90,cx [cp3]	2	2,3	0,5	33,3
T6153	49	1	47,XY,+17,+20,-22 [cp12]	2	0	1,4	78,3
T6268	39	3	43,XX,del(1)(p21),t(9;10)(q21;q26),-10,-14,-22 [cp16]	3	9,7	70,9	2,6
T6176r	52	3	46,XX [cp 2]; 39-47,XX,?del(1)(p12) [cp2]	3	1	23,9	2,9
T5884r	57	1	40,XY,-1,-1,der(1) t(1;1) (p36;q21), -10,-14,-16,-18,-22 [cp13]	3	4,7	0,4	4,3
T6022	85	3	40,XX,del(1)(p21),der(4)(p,-6,-10,-14,-15,-21,-22 [cp16]	3	14,5	67,1	4,4
T5676r	61	3	72-81[4n], XX, cx, del(1) (p21)*2, ?t(2;8) (p13;p21)*2,-22*2 [cp15]	3	0	0	<u>5,3</u>
T5737r	46	3	42,XY, del(1)(p21),-6,-14,-18,-22 [10]	3	1,3	0,8	12,1
T6325r	59	2	42,XY, del(1)(p32),-6,-10,-18,-22 [cp7]	3	0,4	31,6	23,2
T6137	67	2	58,XX,+3,+4,+5,+9,+12,+13,+14,+15,+17,+18,+20,+21 [cp12]	4	0	0	1,7
T6245	74	1	*	*	0,9	1,3	2,2

r: Tumor ist ein Rezidiv;

Z. G.: Zytogenetische Gruppe;

1p-: Klon mit alleiniger Deletion von 1p36;

1p-&22q-: Klon mit kombinierter Deletion von 1p36 und 22qter;

22q-: Klon mit alleiniger Deletion 22qter;

unterstrichene Zahlen: Deletionen bei Tetraploidie.

4.5 Vergleich der genetischen Ergebnisse mit histologischen und klinischen Parametern

4.5.1 Nachbeobachtungszeitraum und Auftreten von Rezidiven

Der durchschnittliche Nachbeobachtungszeitraum der untersuchten Meningeome betrug 28,3 Monate und variierte zwischen 0 Monaten (8 Fälle) und 77 Monaten. Innerhalb dieser Zeit rezidierten sieben Meningeome. Die durchschnittliche Zeitdauer bis zum Rezidiv betrug 25 Monate und variierte zwischen 4 und 53 Monaten (siehe Tabelle 6).

4.5.2 Korrelation zwischen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und Rezidiv

Fünf der acht Meningeome (62,5%) mit detektiertem Verlust von 1p waren Rezidivtumore. Damit hatten 50% der Rezidivtumore einen 1p Verlust. Von den 25 nicht Rezidiven zeigten nur 3 (12%) einen Verlust von 1p. Damit waren 1p Verluste bei Rezidiven mehr als viermal so häufig.

Fünf der acht Meningeome (62,5%) mit detektiertem Verlust von 1p rezidierten nach Tumorextirpation. Bei insgesamt 7 rezidivierenden Meningeomen in unserem Nachbeobachtungszeitraum nach Operation (siehe Tabelle 6) hatten somit 71,4% einen 1p Verlust. 2 weitere Meningeome mit 1p Verlust wurden nicht weiter beobachtet, somit zeigte nur Tumor T6325 einen 1p Verlust ohne innerhalb dessen Nachbeobachtungszeitraum von 25 Monaten zu rezidivieren. Es kann deshalb von einer starken Korrelation zwischen 1p Verlust und Rezidivneigung ausgegangen werden.

4.5.3 Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 im Vergleich zum WHO-Grad

3% der WHO I, 17% der WHO II und 38% der WHO III Meningeome zeigten in der FISH einen Verlust von 1p. In der Karyotypisierung sind es folgende Zahlen: 3% bei WHO I; 13% bei WHO II und 63% bei WHO III Meningeomen. Es ist hier eine starke Korrelation zwischen dem Verlust von 1p und höheren WHO Graden anzunehmen. Die stärkste Korrelation bietet die Kombination beider Untersuchungsergebnisse: 3% der WHO I, 17% der WHO II und 63% der WHO III klassifizierten Fälle zeigen dort den Verlust von 1p.

4.5.4 Korrelation zwischen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und Lokalisation

Vier der Meningeome mit Deletion 1p waren Konvexitätsmeningeome, drei waren Parasagittalemeningeome und ein Tumor auf dem Tentorium lokalisiert. Alle drei Regionen können der Gehirnoberfläche zugeordnet werden. Die sechs Meningeome dieser Untersuchung, die in der Schädelbasis (4 Fälle) oder dem Spinalkanal (2 Fälle) lokalisiert waren, zeigten keinen Verlust von 1p. Dies deutet daraufhin, dass Verluste des kurzen Arms von Chromosom 1 vor allem in der Großhirn-Konvexität auftreten.

4.5.5 Verlust des langen Arms von Chromosom 22 im Vergleich zu Rezidiv, WHO-Grad und Lokalisation

67% der WHO I und II sowie 75% der WHO III Meningeome zeigten einen Verlust von 22q. Angesichts der relativ kleinen Fallzahl scheint dieser Unterschied nicht signifikant. Auch hinsichtlich der Rezidive und der Lokalisation konnte keine Korrelation beobachtet werden. Es fiel auf, dass bei den fünf Deletionen von 22q, die mit der normalen Karyotypisierung nicht gefunden wurden, zwei Meningeome nach vollständiger Extirpation rezidierten. Dieser von der Karyotypisierung unentdeckte, aber mit der FISH identifizierte Verlust von 22q könnte ein Marker für falsch negative Ergebnisse in der Karyotypisierung sein.

4.5.6 Statistische Auswertung der Korrelationen

Die in dieser Arbeit untersuchten Meningeome entstammen einem sehr großen Tumorkollektiv (661 Meningeome), welches bereits im Detail statistisch bezüglich Rezidivrate, Lokalisation und genetischer Veränderung (Karyotypisierung) durch das Max Planck Institut für Informatik in Saarbrücken (Dr. Jörg Rahnenführer) untersucht wurde [Ketter, 2007]. Eine erneute statistische Auswertung der hier untersuchten, deutlich kleineren Teilmenge (35 Meningeomen) erschien deshalb nicht sinnvoll. Es werden daher im Folgenden die statistischen Ergebnisse des oben genannten übergeordneten Kollektivs angegeben [siehe Ketter, 2007]:

Der durchschnittliche Nachbeobachtungszeitraum betrug 40,3 Monate. Bei 53 der 661 Meningeome (8%) zeigte sich ein Rezidiv.

33,3% (15/45) aller Meningeome mit 1p Verlust und 6% (38/616) ohne 1p Verlust rezidierten. Das Auftreten eines Rezidivs war beim Verlust von 1p signifikant häufiger ($p < 10^{-5}$).

Der 1p Verlust bei WHO III Meningeomen war hoch signifikant ($p < 10^{-10}$). 57% (8/14) aller WHO III und 3% (14/465) aller WHO I Meningeome zeigten einen 1p Verlust.

Es bestand eine hoch signifikante Korrelation zwischen der Lokalisation der Meningeome und dem Verlust von 1p ($p < 10^{-8}$). 2% (1/42) der Spinalen-, 4% (11/278) der Schädelbasis- und 12% (30/251) der Konvexitäts- Meningeome zeigten einen 1p Verlust.

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Verlust des langen Arms von Chromosom 22 und der Rezidivwahrscheinlichkeit ($p < 0,66$) nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Konventionelle Karyotypisierung

Die konventionelle Karyotypisierung mit Hilfe der G-Bänderung bietet einen guten Überblick über das gesamte Genom. Bei der hier durchgeführten Untersuchung können mit einer Auflösung von ungefähr 400 bphg (Banden pro haploides Genom) Deletionen, Gewinne und Translokationen bis zu einer Größe von 10 Mbp (Millionenbasenpaare) im gesamten Erbgut erkannt werden. Mit dieser Technik bzw. der Vorgängertechnik wurden einst die ersten Chromosomenanomalien entdeckt und identifiziert, auch die häufigste Chromosomenveränderung von Meningeomen, die Monosomie 22 [Zang, 1967].

Voraussetzung für diese Technik ist jedoch, dass der Tumor zunächst *in vitro* anwachsen muss, um ausreichend viele teilungsfähige Zellen in der Metaphase abfangen zu können. Hierbei ergeben sich zwei erhebliche Nachteile. Zum einen können nur vitale Tumorzellen untersucht werden, dies kann aber in einigen Fällen operationstechnisch oder durch eine zu lange Zeitspanne von Tumorextirpation bis zur Anzucht, unmöglich sein.

Der zweite Nachteil ergibt sich aus den *in vitro* Anzuchtbedingungen, die nicht den Wachstumsbedingungen des Tumors *in vivo* entsprechen. Selektion von bestimmten Zellklonen, auch von nicht Tumorgewebe, kann die Folge sein. Dabei kann der unter den künstlichen Bedingungen herrschende Selektionsdruck, sowohl zur Unterdrückung, als auch zum bevorzugten Wachstum gewisser Klone führen. Handelt es sich nicht um Tumorgewebe, kann dies zum Teil durch das andersartige Aussehen und Wachstumsverhalten dieser Zellen in der Zellkultur erkannt werden. Gerade bei Meningeomen werden aber häufig die im Tumorpräparat mit auftretenden Fibroblasten angezüchtet, die *in vitro* von vielen Meningeomzellarten nicht unterschieden werden können. Dieses Phänomen haben wir unter anderem in Zellkultur beim Prostata-Carcinom nachgewiesen [Ketter, 1996]. Mark et al. konnten schon 1974 eine Zunahme an unauffälligen Karyotypen nach längerer Anzuchtzeit feststellen. Kurze Anzuchtzeiten bei möglichst idealen Bedingungen sollen das Überwachsen der Tumorzellen von Fibroblasten verhindern und die Selektion von einzelnen Zellklonen verringern. Diese Problematik kann aber dennoch nicht ausgeschlossen werden, da der Tumor eine gewisse Zeit bei künstlichen Bedingungen wachsen muss.

Wächst ein Tumor unter in vitro Bedingungen, teilt sich aber nicht bzw. teilt sich nicht zum Untersuchungszeitpunkt, gehen diese Zellen auch nicht in den Befund ein.

Neben den obligaten Problemen der Anzucht hat die G-Bänderungsanalyse ein begrenztes Auflösungsvermögen, das wie oben beschrieben, bei etwa 10 Mbp liegt. Kleinere Aberrationen können nicht entdeckt werden.

5.1.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Zellen aus der Zellzucht

Die FISH Technik kann bei bestimmter Fragestellung die G-Bänderung ersetzen und bietet dabei im Vergleich zur klassischen Zytogenetik eine Reihe von Vorteilen. So ist eine Anzucht des zu untersuchenden Materials bei der FISH nicht nötig und das Ergebnis deswegen schneller verfügbar. Es können weit mehr Zellen als in der konventionellen Karyotypisierung untersucht werden. Die FISH kann auch am Gewebeschnitt durchgeführt werden und so Genetik, Histologie und Molekularbiologie direkt miteinander verglichen werden.

Bisher wurden häufig die Metaphasenzytogenetik und Untersuchungen an Nativmaterial, wie z.B. FISH an Ausstrichen oder Gewebeschnitten, miteinander verglichen. Es ist bekannt, dass mit der konventionellen Karyotypisierung in Meningeomen weniger Aberrationen zu finden sind als mit Untersuchungen an Nativmaterial [Zang, 2001]. Deshalb sollte mit der hier durchgeführten FISH, die ebenfalls an Zellzucht Präparaten durchgeführt wurde, unter anderem geklärt werden, ob die beschriebenen Probleme der Zellzucht zu der Differenz dieser Untersuchungsdaten führen oder andere methodische Probleme der konventionellen Karyotypisierung dafür verantwortlich sind. Die vermutete Problematik wurde hierbei besonders in folgenden Aspekten gesucht.

Mögliche genetisch veränderte Zellklone, die mit der G-Bänderung nicht erfasst wurden, können mit der sensitiveren FISH nachgewiesen werden. Zwei Gründe können hierbei unterschieden werden:

Zellklone, die aufgrund ihrer geringen Teilungshäufigkeit in vitro überhaupt keine Metaphasen bilden oder zum Zeitpunkt des Aberntens der Mitosen eben selbst keine Mitosen gebildet haben, können von der Metaphasenzytogenetik nicht untersucht werden. In der Praxis zeigen sich nach ungefähr ein bis zwei Wochen Anzucht Mitosen. Dabei ist es denkbar, dass ein Zellklon nach einer Woche Mitosen bildet, ein anderer nach zwei Wochen und ein dritter permanent Mitosen ausbildet. Je nach Aberntezeitpunkt verändert sich hier der Befund. Die Interphase-FISH ist vom Auftreten von Metaphasen unabhängig und spendet Daten auch über oben genannte Zellen.

Der zweite Grund, dass gewisse Zellen nicht in die Untersuchung der Bänderungsanalyse eingehen, kann deren zu geringe Klonegröße sein. Soweit es möglich ist, werden bei der konventionellen Karyotypisierung 15 Zellen (Metaphasen) untersucht, z. T. können aber auch nur deutlich weniger Metaphasen untersucht werden. In der Interphase FISH sind es hingegen mindestens 200 Zellen und das Aufspüren kleiner Klone damit leichter möglich.

Geht man davon aus, dass die wirklichen Tumorzellen angezüchtet wurden, besteht aber dennoch die Möglichkeit, dass wegen des relativ geringen Auflösungsvermögens der G-Bänderungsanalyse von 10 Mbp kleine Aberrationen in unauffälligen, aber auch in auffälligen Chromosomendarstellungen nicht entdeckt werden. Diese kleinen Aberrationen können aber, soweit sie im Bereich der verwendeten FISH-Sonden liegen, von diesen aufgespürt werden. Die FISH-Sonden dieser Untersuchung haben eine Größe von rund 200 Kbp (Tausendbasenpaare). Sind die Veränderungen allerdings noch kleiner, können auch mit der FISH diese nicht dargestellt werden.

Neben den beschriebenen Vorteilen der FISH ergeben sich auch einige Nachteile. Es liegt auf der Hand, dass letztlich nur sehr kleine Regionen untersucht werden können. Wenn ganze oder zumindest große Teile von Chromosomen verloren gehen oder hinzugewonnen werden, kann bei entsprechender Sondenwahl eine Aussage über den Karyotyp gemacht werden. Wichtige Details (Wo liegen die Bruchpunkte? Handelt es sich nur um kleine Aberrationen?) können nur geklärt werden, wenn die Sonden in den entsprechenden Grenzregionen eingesetzt werden. Da es aber davon unüberschaubar viele gibt, kann nur ein vermutetes Ereignis exakt mit der FISH nachgewiesen werden. Alle anderen Aberrationen können in ihrem Ausmaß nur abgeschätzt werden.

Ein anderer Nachteil der FISH ist die mögliche Fehlinterpretation von Ergebnissen.

Werden bei der Hybridisierung und beim anschließenden Waschen zu niedrig stringente Bedingungen gewählt, können Sonden fehl binden und so fälschlicherweise Gewinne festgestellt werden. Umgekehrt kann z. B. durch zu lange Verdauzeiten bei der Vorbereitung der Präparate DNA verloren gehen und so Verluste detektiert werden, die keine im eigentlichen Sinne sind. Das gleiche gilt für fehlende Signale in Folge von mangelhaften Hybridisierungen [Hopman, 1988]. Eine dritte Möglichkeit der Fehlinterpretation bilden Splitsignale. Dies sind Signale, die sich im Zellkern nicht als klar abgegrenzter Punkt darstellen, sondern z. B. aus zwei kleinen nebeneinander liegenden Punkten bestehen, aber einem Signalpunkt entsprechen. Um dennoch korrekte Ergebnisse mit der FISH zu erzielen, werden Kontrollhybridisierungen angefertigt, ausgezählt und nach deren Ergebnissen Vertrauensgrenzen festgelegt. In dieser Untersuchung wurden Lymphozytenpräparate als Kontrolle angewendet. Diese Zellen entsprechen zwar nicht direkt der Hirnhaut, die

Morphologie der Zellen unterscheidet sich aber nicht so sehr von denen der Meningeom Metaphasenpräparate, da beide ähnliche Präparationsschritte hinter sich haben. Zum anderen kann an den Metaphasen der Lymphozyten die korrekte Bindung der Sonden überprüft werden.

Bei den Lymphozytenpräparaten zeigten die Sonden für Chromosom 22 und für Chromosom 1 nicht immer jeweils zwei Signale, wie es die Genetik vermuten lässt. So wurden vereinzelt bei der Sondenkombination 1p36 und 22qter Verluste der Signale beobachtet. Bei der Sonde 22qter lag dieser Anteil zwischen 0,9 und 3,4 %, bei der Sonde 1p36 zwischen 1,3 und 1,9%. Dies könnte an einer zu langen Verdauzeit liegen, durch die DNA verloren gegangen ist. Eine zu geringe Verdauzeit könnte dagegen in Einzelfällen dazu führen, dass nicht genügend Sonde an die Ziel-DNA vordringen konnte. Zu hoch stringente Bedingungen können auch nicht ausgeschlossen werden, obwohl in den 30 untersuchten Metaphasen alle Signale korrekt hybridisiert waren. Nur in jeweils ein bis zwei Kernen pro Fall (also zwischen 0,5 und 1%) konnten mehr als zwei Signale detektiert werden. Eine Fehlinterpretation könnten hier die oben beschriebenen Splitsignale zulassen. Die Werte sprechen aber letztendlich für ein sehr gutes Hybridisierungsniveau mit sehr spezifischer Signalbindung.

Im Fall der DiGeorge Sonde gab es eine etwas größere Anzahl an Zellen, die fälschlicherweise zu viele oder zu wenige Signale zeigten. Ein großes Problem hierbei war das sehr häufige Auftreten von Splitsignalen. So können zu viel gezählte Signale auf das Nichterkennen von Splitsignalen sowie fehlende Signale auf die Fehlinterpretation von zwei unabhängigen Signalen als ein zusammengehörendes Splitsignal zurückzuführen sein. Des Weiteren fällt auf, dass der Verlust von Signalen bei der Sonde für 22qter mit 3,9% etwas häufiger war, als bei der Sonde für 22q11.2 mit 2,9%. Dies könnte an der schwächeren Signalintensität des grünen Farbstoffs der 22qter Sonde in der DiGeorge Sondenmischung liegen. In seltenen Fällen könnte ein Signal durch das DAPI Hintergrundsignal übersehen worden sein.

Das Hybridisierungsniveau kann aber auch hier noch als gut bezeichnet werden.

Mit den verwendeten Vertrauensgrenzen, die unter 3.2.4.8 beschrieben sind, kann davon ausgegangen werden, dass die entdeckten Aberrationen in Zellklonen der Realität entsprechen und besonders bei der 1p36 und 22qter Sondenkombination nur Klone übersehen worden sein könnten, die eine Größe unterhalb der Vertrauensgrenze aufweisen.

5.1.3 Metaphasen Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Meningeomen

Um insbesondere die Erforschung der Regionen 1p36 und 22qter noch weiter zu vertiefen, wurde die Interphase FISH im Großteil der Fälle mit der Metaphasen FISH ergänzt. Die Metaphasen FISH wird relativ selten eingesetzt, da sie, wie die G-Bänderungsanalyse, das Anzüchten der Tumorzellen und die Präparation von Metaphasen voraussetzt. Außerdem bietet sie, bezogen auf das ganze Genom, ein weitaus schlechteres Auflösungsvermögen als die konventionelle Karyotypisierung. Dies liegt zum einen an dem schlechteren Auflösungsvermögen der DAPI-Bänderung und zum anderen an der Verschlechterung der Chromosomenqualität durch die für die FISH benötigten Reagenzien. Besonders das Pepsin bei der Permeabilisierung und das Formamid bei der Denaturierung und der Hybridisierung setzen den präparierten Chromosomen zu.

Dennoch bietet die Metaphasen FISH einmalige Untersuchungsmöglichkeiten. Mit ihr können nicht nur numerische, sondern auch strukturelle Veränderungen der untersuchten DNA Regionen festgestellt werden. Translokationen von kleinen DNA Abschnitten, die mit der G-Bänderung nicht erkennbar sind, können genauso wie kleine Deletionen oder Gewinne sichtbar gemacht werden. Keine andere Untersuchung kann im Bereich der eingesetzten Sonden mit gleichem Auflösungsvermögen (bis zu 200 Kbp) Translokationen darstellen. Zwar ist es auch möglich, mit SKY oder M-FISH kleine Translokationen festzustellen, das Auflösungsvermögen liegt aber hier bei ungefähr 2 Mbp [Schröck, 1996]. Außerdem können damit Duplikationen, Deletionen, Inversionen [Uhrig, 1997] sowie Translokationen innerhalb eines Chromosoms gar nicht dargestellt werden. Zudem werden auch für SKY und M-FISH Metaphasenpräparate benötigt und der Aufwand ist noch größer als für die Metaphasen FISH. Ein Überblick über das gesamte Genom, besonders in Bezug auf Translokationen, gibt aber auch diesen Untersuchungsmethoden ihr Einsatzgebiet.

Wie bei der Interphasen FISH wird eine Kontrolle benötigt, um sicher zu gehen, dass nur spezifisch gebundene Signale ausgewertet werden. Dazu wurden in dieser Arbeit die schon oben erwähnten Lymphozytenpräparate herangezogen. In ungefähr 30 Metaphasen konnte in jedem Fall die korrekte Hybridisierung der Sonden festgestellt werden. Unspezifische Bindungen konnten in keinem Fall festgestellt werden. Deshalb wurde in dieser Untersuchung das Auffinden von Sonden-typischen Signalen immer als das Auffinden der gesuchten komplementären Basensequenz gewertet.

5.1.4 Einfrieren und Auftauen von vitalen Meningeomzellen

Bei zehn der hier untersuchten Meningeome wurden für die Herstellung der Interphasen und Metaphasen FISH die benötigten Präparate aus eingefrorenen Zellen verwendet. Die Zellen waren zuvor für die konventionelle Karyotypisierung angezüchtet worden und für spätere Untersuchungen eingefroren worden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, auch zu späteren Zeitpunkten noch frische Metaphasenpräparate anzufertigen. Durch das Einfrieren und Auftauen verlängert sich aber die Anzuchtzeit um einige Tage und die oben beschriebene Gefahr der Zellzuchtartefakte vergrößert sich dementsprechend. Auch das für dieses Verfahren benötigte Frostschutzmittel für die Zellen könnte Artefakte auslösen. In der Einfrier- und Auftau-Praxis der humangenetischen Tumorzellkultivierung in Homburg konnten aber bisher keine größeren Artefakte in diesen Zellen im Vergleich zu denselben vor dem Einfrieren festgestellt werden. Fehlen dort bei der genetischen Untersuchung von Tumoren noch Metaphasen für den Befund, werden eingefrorene Zellen wieder aufgetaut, angezüchtet und Metaphasen präpariert. Die dabei gewonnenen Ergebnisse befinden sich im Einklang mit den Ergebnissen der zuvor nicht eingefrorenen Zellen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Untersuchtetes Tumorgewebe

In dieser Arbeit wurden sowohl Tumorproben untersucht, die unselektiert aus laufenden Fällen der genetischen Tumorzellzucht in Homburg entnommen wurden als auch Proben, die speziell ausgewählt wurden. Bei den selektierten Fällen sollten zum einen WHO II, III und/oder rezidivierende Meningeome mit unauffälligem zytogenetischen Befund nach unentdeckten genetischen Veränderungen untersucht werden; zum anderen sollten bei Meningeomen mit 1p Verlusten speziell die Regionen 1p36 und 22qter numerisch und strukturell begutachtet werden. Deshalb ist der Anteil von WHO II, III und Rezidiv Meningeomen höher als in der Literatur angegeben. Der Anteil der Meningeome, nach WHO Grad sortiert, lag bei dieser Untersuchung bei 43% für WHO I, bei 34% für WHO II und bei 23% für WHO III. In der Literatur wird der Anteil der WHO I Meningeome mit 80- 90%, für WHO II mit 5-15% und für WHO III mit 1-3% angegeben [Perry, 1997; Louis, 2000]. Der Anteil an Rezidivtumoren ist mit rund 29% deutlich höher als die sonst beschriebenen ca.10% [Mirimanoff, 1985; Ketter, 2001]. Auch das Auftreten von Rezidiven nach vollständiger Meningeom Resektion der hier untersuchten Fälle ist mit 20% (7/35) trotz des relativ kurzen Nachbeobachtungszeitraums von 28,3 Monaten relativ hoch. Dagegen ist in dieser Arbeit der 60%ige Anteil an auffälligen Meningeomen in der konventionellen

Karyotypisierung mit den Werten anderer unselektierter Untersuchungen an Metaphasen vergleichbar [Ketter, 2001].

5.2.2 Interpretation der FISH-Signale

Da eine FISH Untersuchung, insbesondere wenn nur eine Sonde pro Chromosom benutzt wird, nicht immer eindeutig ist, wird im folgenden Abschnitt die Deutung der Signalkombinationen diskutiert.

5.2.2.1 Sonde 22qter

In dieser Untersuchung wurden in 21 Fällen nur ein Signal für die Region 22qter gefunden. Diese Fälle wurden als einfache Deletion von 22qter interpretiert. In drei Fällen wurde die Signalkonstellation 4 Signale für 1p36 und 2 Signale für 22qter gefunden. Da ein doppelter Zugewinn von 1p bisher nur in Zusammenhang von Tetraploidisierungen beschrieben wurde [Mitelman, 2007], kann ein alleiniger doppelter Gewinn an 1p36 Signalen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Wegen des relativen Verlusts von 22q Material werden diese Fälle mit zu den Deletionen von 22qter gezählt. Die Zahl der 35 untersuchten Meningeome mit Deletion von 22qter beträgt demnach 24.

Die Signalkonstellation von Fall T5676 zeigt drei Signale für 22qter und 2 Signale für 1p36. Da in diesem Fall kein Klon auftrat, der auf eine Deletion von 1p36 hindeuten könnte, wurde dieses Ereignis als ein einfacher Gewinn von 22qter mit unauffälligen Signalen für 1p gewertet. FISH Untersuchungen, die das relativ seltene Ereignis von 22q Gewinnen beschreiben, unterstützen diese Annahme [Pfisterer, 2004; Prowald, 2004].

Ob es sich bei den Deletionen von 22qter um komplette Verluste des Chromosoms 22 handelte oder nur um Deletionen des langen Armes oder gar Mikrodeletionen, konnte mit der Interphase FISH allein nicht erklärt werden. Gleiches gilt für den entdeckten Gewinn von 22qter Material.

5.2.2.2 Sonde 1p36

Fünf Fälle zeigten Klone mit je einem Signal für 1p36. Diese Fälle wurden alle, unabhängig von der Signalkonstellation der 22qter Sonde, als Deletion 1p36 gedeutet. In einem Fall (T5884) wurden vier Signale für 22qter und 2 Signale für 1p36 detektiert. Hier wurde ein 1p36 Verlust bei einer Zelle kurz vor der Teilung angenommen. Da aber so gut wie keine Klone mit nur einem Signal für 1p36 gefunden wurden, schien eine Deletion von 1p36 mit anschließender Tetraploidisierung als noch wahrscheinlicher. Die konventionelle Karyotypisierung bestätigte die Deletion von 1p. Eine Tetraploidisierung konnte dort nicht

gefunden werden. Insofern ist es wahrscheinlich, dass viele Zellen durch die Colcemidbehandlung kurz vor der Teilung fixiert wurden und sich deshalb der Anschein einer Tetraploidisierung bot. Auch bei der Erkennung von 1p36 Verlusten konnte aus den Interphase FISH Ergebnissen nicht geschlossen werden, in wie weit noch mehr Material von Chromosom 1 deletiert war.

Auch eine mögliche Tetraploidisierung einer Zelle mit gemeinsamer Deletion von 22q und 1p kann mit dieser Interphase FISH Untersuchung nicht erkannt werden. Dieses Ereignis scheint aber nach den Ergebnissen der konventionellen Karyotypisierung zumindest bei einem Fall (T5676) in dieser Arbeit aufgetreten zu sein.

5.2.2.3 DiGeorge Sonde 22q11.2 und 22qter

Sechs der acht mit der DiGeorge Sonde untersuchten Tumore zeigten einen Verlust beider in der Sondenkombination enthaltenen Sonden. In allen diesen Fällen wurde deshalb ein kompletter Verlust des langen Arms von Chromosom 22 distal von 22q11.2 angenommen. Ob das Chromosom proximal von 22q11.2 ebenfalls deletiert war, kann auch hier nicht mit den vorliegenden FISH Daten geklärt werden.

5.3 Genetische Veränderungen bei Meningeomen

Meningeome gehören zu den am besten genetisch untersuchten soliden Tumoren. Schon 1967 wurde die später als Monosomie 22 identifizierte, häufigste und für Meningeome charakteristische chromosomale Veränderung entdeckt [Zang und Singer, 1967; Zankl, 1972]. Rund die Hälfte aller Meningeome zeigen diese Veränderung [Dumanski, 1987; Lekanne-Deprez, 1995; Ketter, 2001; Zang, 2001]. Daneben gibt es weitere Aberrationen, die fast ausschließlich in Kombination mit einer Deletion von 22q einhergehen [Zang, 2001]. Als die häufigste gilt hierbei der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 [Rey, 1988; Bello, 1994; Henn und Urbschat, 1998; Cerda-Nicolas, 2000, Ketter, 2001; Zang, 2001; Sayagues, 2002]. Dieses Ereignis wird zudem mit einer erhöhten Progression und schlechter Prognose verbunden [Müller, 1999; Weber, 1997; Bello, 1994; Steudel, 1996; Zang, 2001; Ketter, 2001; Ketter, 2007]. Da noch viele Fragen in Bezug auf diese beiden Veränderungen offen sind, wurde diese Arbeit durchgeführt. Besonderes Interesse wurde dabei auf zytogenetisch unauffällige, aber zum Teil dennoch progressive Tumore gelegt. Die Tatsache, dass in Metaphasen Untersuchungen grundsätzlich weniger Aberrationen gefunden werden als bei Untersuchungen an Nativmaterial, war dabei ein wichtiger Aspekt [Weber, 1997; Zang, 2001]. Im folgenden Teil werden die Ergebnisse für die einzelnen untersuchten Chromosomen dargestellt.

5.3.1 Verluste des Chromosoms 22

Verluste des Chromosoms 22 werden bei vielen Tumoren festgestellt. In der Datenbank von Mitelman (2007) sind die meisten davon aufgezählt. Dazu gehören Leukämien, Lymphome, Ependymome, Adenocarcinome der Mamma, der Lunge, der Ovarien, des Colons, Astrozytome, Neuroblastome, Oligodendrogliome, Ewing und andere Sarkome, Mesotheliome, Teratome, Akustikusneurinome und insbesondere Meningeome [Zang, 1967]. Das häufige Auftreten und die damit vermutete und zum Teil bewiesene Relevanz für die Tumorentstehung machen diese Aberration zu einem interessanten Untersuchungsobjekt.

Bei Meningeomen wird bei 40 bis 60% aller Fälle ein kompletter oder teilweiser Verlust des Chromosoms 22 festgestellt [Zankl und Zang, 1980; Weber, 1997; Ketter, 2001; Zang, 2001]. Bei FISH-Untersuchungen liegen die Werte in ähnlichen Bereichen. Maillo et al. (2003) konnte bei 55% der WHO I, bei 40% der WHO II, bei 33% der WHO III und bei 53% aller Meningeome eine Deletion von 22q11.2 beobachten. Bei Sayagues (2004) waren es rund 51% bei WHO I, 29% bei WHO II + III und 49% bei allen Meningeomen mit Deletion von 22q11.2. Zattara- Cannoni et al. (1998) berichteten in 19% der WHO I Fälle und in 47% von WHO II Fällen von einer Deletion 22. Pfisterer et al. fanden folgende Anteile: 19% bei WHO I, 46% bei WHO II und 20% bei WHO III mit Sonden zwischen 22q11.2 und 22q12.3.

Bei 69% (24/35) der hier mit FISH untersuchten Meningeome wurde eine Deletion 22qter festgestellt. Bei den WHO I und II Tumoren waren es jeweils 67% und bei den WHO III Tumoren waren es 75%. Diese Werte sind etwas höher als die der FISH Untersuchungen von Maillo (2003), Sayagues (2004), Zattara- Cannoni (1998) und Pfisterer (2004). Der etwas höhere Anteil an Deletionen von 22q in dieser Untersuchung könnte zwei Gründe haben:

Zum einen war der Anteil an höhergradigen und aggressiven Tumoren in dieser Untersuchung höher als normalerweise. Zattara- Cannoni et al. (1998) konnte in höhergradigen Tumoren häufiger die Deletion 22q entdecken. Auch Pfisterer et al. (2004) konnte dies in seiner Untersuchung bestätigen und auf den Befund von Rezidiven ausweiten. Die Daten dieser Arbeit zeigen ebenfalls einen erhöhten Anteil an Deletionen 22q bei höhergradigen Meningeomen. Dies stimmt auch mit Metaphasen Untersuchungen überein, die eine erhöhte Hypodiploidie bei höhergradigen Meningeomen festgestellt hat [Zang, 2001; Ketter, 2001]; dabei wurde fast immer gleichzeitig eine Monosomie 22 festgestellt [Mark, 1977; Zang, 1982; Weber, 1997]. Untersuchungen des NF II Gens, welches auf 22q12.2 lokalisiert ist, deuten in die gleiche Richtung. In diesen Untersuchungen wurde nur

das NF II Gen betrachtet und der Rest des Chromosoms 22 außer Acht gelassen. Dennoch fällt auf, dass Wellenreuther et al. (1995) Deletionen oder Mutationen von NF II nur bei 25% der WHO I, aber bei mehr als 70% der WHO II und III Meningeome feststellen konnte. Unter der Annahme, dass zumindest ein großer Teil der Deletionen von NF II durch Verluste des langen Arms von Chromosom 22 herrühren, stimmen die Ergebnisse von letzt genannter Studie mit den eigenen überein.

Davon unabhängig ist das alleinige Auftreten einer Monosomie 22 ohne prognostische Bedeutung [Zankl, 1980; Zang, 2001; Ketter, 2001; Ketter, 2007]. In Betracht des häufigen Auftretens von Monosomien bei höhergradigen Meningeomen erscheint dies merkwürdig. Aber 80% aller Meningeome sind gutartig und rund die Hälfte von ihnen zeigen eine Monosomie 22. Damit wird ersichtlich, dass diesem Marker allein keine erhöhte Progression zugeschrieben werden kann. Zudem gibt es Studien, die keinen erhöhten Anteil an Monosomie 22 bei höheren WHO Graden zeigen. Dazu gehören die FISH Untersuchungen von Maillo et al. (2003) und Sayagues et al. (2004). Diese Studien können den höheren Anteil an Deletionen von 22qter in dieser Arbeit nicht erklären.

Ein anderer Grund für den hier relativ häufig gefundenen Verlust von 22qter könnten die unterschiedlichen verwendeten Sonden mit ihren spezifischen Bindungsregionen sein. Die hier benützte 22qter Sonde liegt distal auf dem langen Arm von Chromosom 22, die Sonden der anderen FISH Untersuchungen weiter proximal. Da sowohl das Chromosom 22 vollständig verloren geht, als auch nur Teile des langen Arms deletiert sind, wäre eine Deletion beginnend am distalen Ende von 22qter mit fortschreitendem Abrechen von DNA Regionen denkbar. Solche weit distalen Deletionen konnten in einer Untersuchung gezeigt werden [Hansson, 2007]. Um dies zu überprüfen, wurde bei acht der hier untersuchten Meningeome eine FISH Untersuchung mit der Sondenkombination 22q11.2 und 22qter durchgeführt. Diese sonst für die Diagnose des DiGeorge Syndroms verwendete Sondenkombination zeigt Veränderungen im „mittleren“ Bereich, sowie im distalen Bereich des langen Arms von Chromosom 22. In diesen Fällen waren diese beiden Regionen aber immer gemeinsam oder gar nicht deletiert. Es zeigte sich also kein alleiniger weit distaler Verlust, sondern nur der bekannte teilweise oder ganze Verlust von Chromosom 22. Weit distale Verluste oder Mutationen in einer geringeren Anzahl von Fällen scheinen dennoch wahrscheinlich. Denn bis heute wirft die Tatsache, dass, wie oben beschrieben, nur für einen kleinen Teil der niedriggradigen Meningeome eine vollständige Deletion oder Mutation des NF II Gens festgestellt werden konnte, Fragen auf [Wellenreuther, 1995]. Das Zwei-Stufen Modell für Tumorsuppressorgene von Knudson verlangt die vollständige Deletion oder Mutation beider NF II Genloci [Knudson, 1973]. Als Lösung wurde von vielen

Wissenschaftlern ein zweites Tumorsuppressorgen auf Chromosom 22 gefordert [Collins, 1990; Lekanne Deprez, 1995; Zang, 2001]. Dieses zweite Meningeomgen könnte dann im Sinne einer kombinierten Haploinsuffizienz die Tumorentstehung erklären [Zang, 2001]. Eben dieses zweite Meningeomgen wird distal von 22q12.2 vermutet [Collins, 1990; Dumanski, 1990]. Die Anzahl der Fälle mit Deletion 22qter, die in dieser Untersuchung häufiger gefunden wurden als in anderen FISH Untersuchungen, könnten Deletionen eines weit distal gelegenen zweiten Meningeomgens anzeigen. Und tatsächlich, betrachtet man Untersuchungen, die eine relativ hohe Auflösung des gesamten Chromosoms 22 bieten, erhöht sich der Anteil der Zellen mit Deletion 22q und nähert sich den Ergebnissen dieser Arbeit an. So waren bei der CGH Studie von Weber et al. (1997) 53% der WHO I Meningeome, 57% der WHO II Meningeome und 42% der WHO III Meningeome auf dem langen Arm von Chromosom 22 deletiert. Dabei muss zusätzlich bedacht werden, dass die CGH Methode erst Veränderungen feststellen kann, wenn bei etwa 30-40% aller Zellen Veränderungen vorhanden sind. Die hier gefundenen Zellklone mit Verlust von 22qter hatten aber häufig einen kleineren Gesamtanteil als 30%. So variierte der Anteil der Zellen pro Fall mit einer Deletion von 22qter zwischen 84% (T6125) und 7% (T5952), entsprechend der festgesetzten Vertrauensgrenze. Bei 11 von 23 Fällen (48%) war der Anteil der Zellen mit -22q kleiner als 30%. Kleine Klone, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnten, können in CGH Studien übersehen werden. Die bei der Studie von Weber et al. (1997) mit durchgeführte LOH (Loss of Heterozygosity) Untersuchung zeigt auch kleine Veränderungen von DNA Regionen an. Dabei fiel auf, dass besonders bei WHO II und III Meningeomen Veränderungen festzustellen waren, die nicht mit der CGH gefunden werden konnten. Die Anzahl der Veränderungen von Chromosom 22, die entweder mit CGH und/oder LOH festgestellt werden konnte, lag bei 71% bei den WHO II und bei 68% bei den WHO III Meningeomen [Weber, 1997]. In Anbetracht solch hoher Zahlen, erscheinen die Daten dieser Untersuchung realistisch und könnten daraufhin deuten, dass Veränderungen von 22q häufiger sind als oft beobachtet wird.

5.3.2 Mechanismus des 22q Verlustes

Bisher ist der Mechanismus, der zum Verlust von Chromosomen führt, weitgehend ungeklärt. Es gibt Theorien über genetische Instabilität, die bei der Tumorprogression eine Rolle spielen könnte [Nowell, 1960]. Sawyer et al. (2000) sahen in der Instabilität von Telomeren und Zentromeren einen Grund für Aberrationen bei Meningeomen. Aber auch deren Arbeit klärt nicht, wie Chromosomenabschnitte aus dem Kern entfernt werden. In dieser Arbeit konnte bei einem Zellkern eine erstaunliche Entdeckung gemacht werden

(Abbildung 4-8: T5676). Dieser Zellkern von Meningeom T5676 zeigt zwei kleine vom Kern abgeschnürte Vesikel, die jeweils die Signale der 22qter-Sonde in sich tragen. Diese 22qter Signale sind dabei so typisch, dass es sich nur um korrekt gebundene Sonden handeln kann. Im Zellkern sind zwei weitere Signale der 22qter Sonde und vier Signale der 1p36 Sonde zu erkennen. Betrachtet man die Gesamtkonstellation, hat man den Eindruck, dass eine tetraploide Zelle an zwei verschiedenen Stellen gleichzeitig 22q Material aus dem Zellkern ausschleust. In dieser Tumorprobe konnten mit der Interphase-FISH tetraploide Zellen sowohl ohne, als auch mit doppelter Deletion von 22qter entdeckt werden. Dies deutet daraufhin, dass dieses Abschnüren von Vesikeln das Prinzip des Verlustes von 22q Material darstellen könnte. Da beide abgeschnürten Vesikel sehr gleichmäßig aussehen, stellt sich die Frage, ob der Verlust von 22q Material ein zufälliges Ereignis ist, welches zur Tumorentstehung beiträgt oder ob es sich hierbei um einen geordneten Prozess einer Zelle handelt. Ein noch nicht bekannter Auslöser (z.B. ein Virus) könnte zu diesem fehlerhaften Prozess führen. Es könnte sich aber auch um eine geordnete Reaktion der Zelle auf eine erfolgte Schädigung handeln. Dafür würde sprechen, dass der Verlust von 22q zum einen ohne Einfluss auf die Tumoraggressivität ist und zum anderen keine zwingende Bedingung für die Meningeomentstehung darstellt; denn rund die Hälfte aller Meningeome haben einen normalen Chromosomensatz [Zang, 2001; Ketter, 2001]. Auch wenn man von der gängigen Annahme ausgeht, dass der Verlust von 22q zur Meningeomentstehung beiträgt, stellt sich die Frage, welcher Mechanismus zu diesem scheinbar klar geordneten Ausschleusen führt. Die Untersuchung dieses Mechanismus könnte vielleicht sogar neue Ansätze für die Beurteilung von Tumorzellen und deren Behandlung bieten.

5.3.3 Gewinne und Translokationen des Chromosoms 22

Im Gegensatz zu Verlusten des Chromosoms 22 wurde erst in relativ wenigen Meningeomen ein Gewinn von Teilen des langen Arms von Chromosom 22 gefunden. Die meisten Studien, die einen Gewinn zeigen konnten, sind FISH Studien. In einer weiteren FISH Studie mit Sonden zwischen 22q11.2 konnten Maillo et al. (2003) ihre Entdeckung bestätigen. In dieser Studie zeigten 3% der WHO I, 40% der WHO II und 66% der WHO III Meningeome Gewinne von 22q. Pfisterer et al. (2004) konnte mit Sonden zwischen 22q11.2 und 22q12.3 eine Trisomie 22 in 10% der WHO I, in 23% der WHO II und in 80% der WHO III Tumoren entdecken. Die Studien von Maillo et al. (2001, 2003) und Pfisterer et al. (2004) konnten eine starke Korrelation zwischen dem Gewinn von 22q Material und erhöhter Aggressivität feststellen und sahen in dieser Aberration einen neuen unabhängigen Marker für aggressive Meningeome. Auch Prowald et al. (2005) konnten in drei von 16

Meningeomen einen Gewinn von 22q feststellen. Diese drei Tumore waren mit dem WHO I Grad klassifiziert. In zwei Fällen konnte mit den Sonden 22q12.1 und 22qter ein Gewinn entdeckt werden. In einem Fall zeigte nur die 22qter Sonde einen Gewinn. In der ergänzend durchgeführten Metaphasen FISH zeigte sich, dass das zusätzliche 22q Material auf andere Chromosomen transloziert war. Der Gewinn von 22q dieser drei Tumore wurde aber im Gegensatz zu den anderen oben genannten Studien im Kontext eines frühen Ereignisses bei der Meningeomentstehung diskutiert. Auch in einer CGH Studie konnte in einem von 130 Meningeomen ein Gewinn von 22q festgestellt werden [Weber, 1997]. Dieses war ein atypisches Meningeom.

Mit der Interphase FISH wurde auch in dieser Arbeit ein Meningeom mit einem Gewinn von 22qter Material entdeckt. Dieses war ein rezidiertes WHO III Meningeom. Dieser Befund stützt die Annahmen von Maillo et al. und Pfisterer et al., dass mit einem Gewinn von 22q eine erhöhte Progression verbunden ist.

Mit der Metaphasen-FISH wurde in zwei weiteren Fällen ein Zugewinn von 22qter Material identifiziert. Ein Fall (T6249, WHO I) zeigte neben zwei unauffälligen Chromosomen 22 ein drittes 22qter Signal auf einem Chromosom, das der F-Gruppe zugeordnet werden konnte. Es handelt sich hierbei entweder um Chromosom 19 oder 20. In diesem Fall zeigte sich eine weitere Auffälligkeit. Es könnte sich hierbei entweder um eine Translokation von 22qter Material auf ein Chromosom der B-Gruppe, entweder Chromosom 4 oder 5 handeln oder um ein komplex zusammen gewürfeltes Chromosom. Hier war zusätzlich aber nur ein unauffälliges Chromosom 22 zu entdecken. Bei Fall T5750, einem rezidierten WHO I Meningeom, zeigte sich neben zwei unauffälligen Chromosomen 22 extrachromosomal gelegenes 22qter Material. In einer anderen Metaphase war ein Chromosom 22 mit auf beiden Armen duplizierten 22qter Material zu entdecken. Bei einer dritten Metaphase zeigte sich eine Fusion von Chromosom 22 mit einem akrozentischen Chromosom 13 oder 15, welche der D-Gruppe zuzuordnen sind. In beiden beschriebenen Fällen zeigten aber jeweils nur eine Metaphase einen absoluten Gewinn von 22qter Material und in der Interphasen FISH war dieser Gewinn überhaupt nicht festzustellen, bzw. zeigten beide Fälle in rund 10% der Zellen sogar eine Deletion von 22qter. Da die Bindungsspezifität der 22qter Sonde sehr gut war und auch sonst in diesen Fällen keine unspezifischen Signale auftraten, können mit hoher Wahrscheinlichkeit falsch positive SONDENSIGNALE ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass mit der sensitiven Interphase FISH dieser Gewinn nicht entdeckt wurde, könnte mit der Fehlinterpretation von Signalen zusammenhängen. Drei Signale könnten als ein unauffälliges und die anderen beiden Signale, als ein Splitsignal gewertet werden. In Zusammenhang mit der Seltenheit dieses Ereignisses erscheint dies möglich. Zudem ähneln

die gemachten Beobachtungen denen von Prowald et al. (2005). Dass solche Ereignisse bisher kaum beschrieben wurden, könnte daraufhin deuten, dass es sich um genetische Sonderfälle handelt. Da sowohl bei den hier beschriebenen, als auch bei den von Prowald et al. beschriebenen Fällen vor allem die Telomer Sonde 22qter involviert war, könnte auf eine Telomer Instabilität hindeuten. Sawyer et al. (2000) sehen sowohl in der Instabilität von Telomeren, als auch von Zentromeren einen Grund für die Entstehung der Aberrationen bei Meningeomen. In genannter Studie wird ein Meningeom beschrieben, das gehäuft Telomerfusionen von Chromosom 22 und anderen Chromosomen eingeht. Ein Teil der involvierten Chromosomen 22 sind dabei unauffällig, andere teilweise und weitere fast völlig deletiert. Sawyer et al. (2000) deuten diesen Befund als primäre Telomerfusion mit anschließender Deletion von Chromosom 22. Ähnliche Befunde von Chromosom 1 werden in gleicher Weise gedeutet. Auch in dieser Arbeit war ein Meningeom (T5884), welches in der Karyotypisierung vereinzelt Metaphasen mit Telomerfusion der beiden Chromosomen 1 zeigte (Abbildung 4-21). Sawyer et al. halten es für wahrscheinlich, dass der von ihnen beschriebene Mechanismus für einen Teil der Chromosomenverluste bei Meningeomen verantwortlich ist.

Solch ein Mechanismus könnte in Verbindung mit chromosomalen Fehlverteilungen während der Zellteilung die in dieser Arbeit entdeckten Gewinne und Translokationen erklären. Insbesondere das Chromosom 22 mit auf beiden langen Armen duplizierten 22qter Material bei Fall T5750 könnte nach erfolgter Telomerfusion zweier Chromosomen 22 und anschließender stückweiser Deletion eines der beiden Chromosomen der vorletzte Schritt zur Monosomie 22 sein. Da die Befunde, die zu dieser Theorie geführt haben, rar sind, bleibt diese Theorie rein spekulativ. Das Vorhandensein von Translokation von 22q Material konnte hingegen in einigen Studien sicher gezeigt werden [Sawyer, 2000; Zang, 2001].

Allerdings ist es verwunderlich, warum im Gegensatz zu den Untersuchungen von Maillo et al. und Pfisterer et al. bisher kaum andere Gruppen die von ihnen so häufig bei höhergradigen Meningeomen beschriebenen Gewinne von 22q ebenfalls entdeckt haben. Die Möglichkeit, dass andere Forschungsgruppen einen scheinbar so häufigen Gewinn von 22q in FISH Untersuchungen immer als Splitsignale fehl gedeutet haben, scheint wohl eher unwahrscheinlich. Vielleicht tragen weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage bei.

5.3.4 Verluste des Chromosoms 1

Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 wird für viele verschiedene Neoplasien beschrieben. In der genetischen Datenbank von Mitelman (2007) finden sich unter anderen Adenocarcinome der Brust, der Leber, der Lunge, der Niere, der Ovarien, der Schilddrüse,

Astrozytome, Leukämien, Lymphome, Melanome, Neuroblastome, Oligodendrogliome, Osteosarkome, Teratome, Meningeome und viele mehr. Einen Überblick bietet hierzu auch Weith et al. (1996) und Schwab et al. (1996).

Bei Meningeomen gilt der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) als die zweithäufigste genetische Veränderung nach der Monosomie 22 [Mark, 1977; Rey, 1988; Bello, 1994; Henn und Urbschat, 1998; Cerda-Nicolas, 2000; Ketter, 2001; Ketter, 2007; Zang, 2001; Sayagues, 2002]. Anders als bei der Monosomie 22 wird eine starke Korrelation zwischen der Deletion von 1p und erhöhter Tumoraggressivität festgestellt. Im Einzelnen konnte das häufige Auftreten von 1p Verlusten mit höhergradigen Meningeomen [Bello, 1994; Weber, 1997; Müller, 1999] und mit erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit [Bello, 1994; Kolles, 1995; Zang, 2001] korreliert werden. Auch konnte diese Aberration mit einer generell schlechten Prognose verbunden werden [Zang, 2001; Ketter, 2001; Ketter, 2007].

Bisher ist nicht bekannt, welches deletierte Gen bei dem Verlust von 1p die entscheidende Rolle spielt. Boström et al. (1997) konnten bei allen von ihnen entdeckten 1p Deletionen einen gemeinsamen Verlust distal von 1p34 feststellen und fanden, wie Simon et al. (1995) keinen Anhalt für Mikrodeletionen. Im Gegensatz hierzu konnten Bello et al. (1994) interstitielle Deletionen feststellen. Dennoch wird insbesondere die Region um 1p36 als die entscheidende bei der Progression von Meningeomen gehalten. Das in dieser Region (1p36.1-p34) gelegene ALPL kodierende Gen wird von vielen als das entscheidende Tumorsuppressorgen gehandelt. Unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe sprechen allerdings eher gegen diese Vermutung. Davon unabhängig konnte ein inverser Zusammenhang der ALPL Aktivität mit dem Verlust von 1p und schlechter Prognose hergestellt werden. Die ALPL Aktivität wird deswegen auch quasi als billiger 1p-Verlust-Indikator zur histologischen Qualifizierung verwendet [Henn, 1995; Niedermayer, 1997; Bouvier, 2005]. Auch wenn ALPL nicht das entscheidende Gen ist, so deutet alles auf die Region 1p36 hin. Auch in vielen der oben genannten Neoplasien, dazu gehören Leberzellkarzinome [Kuroki, 1995], Melanome [Dracopoli, 1989], Oligodendrogliome [Reifenberger, 1995] und Schilddrüsenadenome [Cryns, 1995] wurden gemeinsame Verlustzonen gefunden, die alle die Region 1p36 beinhalten. Dies unterstreicht die Bedeutung dieser Region und es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die meisten FISH Untersuchungen an Meningeomen mit einer 1p36 Sonde durchgeführt werden. Die genannten Entdeckungen waren auch für diese Arbeit der entscheidende Grund, eine 1p36 Sonde für die FISH zu benützen und damit Meningeome hinsichtlich ihres möglichen aggressiven Potentials weiter zu untersuchen.

Die Befunde dieser Arbeit zeigen eine starke Verknüpfung zwischen der Deletion 1p und Tumoraggressivität. Drei der sechs hier gefundenen Meningeome mit Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 1 traten bei anaplastischen Meningeomen auf (T6022, T6176, T6268). Eines davon war ein besonders aggressives Rezidiv (T6176). Zwei weitere Fälle waren WHO II Meningeome (T6277, T6325). Eines dieser beiden Fälle war auch hier ein schon mehrfach wiederkehrendes Rezidiv (T6325). Das sechste Meningeom, das die gleiche Aberration zeigte, war zwar histologisch nur als ein WHO I Meningeom klassifiziert, war aber ebenfalls ein Rezidiv (T5884). Diese völlige Übereinstimmung zwischen dem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und hoher Aggressivität bestätigt die hohe Aussagekraft dieses Progressionsmarkers, der unabhängig von der WHO Einteilung ist, wie an den oben beschriebenen WHO I und II Meningeomen zu sehen ist.

17% aller hier untersuchten Fälle zeigten einen Verlust von 1p. Bei den WHO I Meningeomen waren es 3%, bei den WHO II 17% und bei den WHO III 38%.

Diese Ergebnisse sind weitestgehend im Bereich der Daten von Maillo et al. (2003) und Sayagues et al. (2004). Dort wurden bei 21% aller Fälle, bei 21% der WHO I, 0% der WHO II und 66% der WHO III Meningeome eine Deletion von 1p festgestellt [Maillo, 2003]; bzw. bei Sayagues et al. (2004) waren es insgesamt etwa 16% aller Meningeome. Speziell die Anteile der 1p deletierten WHO II und III Meningeome in der Arbeit von Maillo et al. (2003) als auch in den eigenen Daten, scheinen sehr niedrig, wenn sie mit den Daten vieler anderer Studien verglichen werden. So liegt der Anteil der WHO II Meningeome mit Deletion 1p bei den FISH Untersuchungen von Ishino et al. (1998) bei 60%, bei Müller et al. (1999) bei 70% und bei Pfisterer et al. (2004) bei 92%. Bei den WHO III Meningeomen sind es folgende Anteile: 86% bei Ishino et al. (1998) und 100% sowohl bei Müller et al. (1999), als auch bei Pfisterer et al. (2004). Espinosa et al. (2006) fand bei 61% der höhergradigen Meningeome den Verlust von 1p (WHO II+III). Auch CGH Untersuchungen liegen mit 76% bei WHO II und 79% bei WHO III Meningeomen in diesem Bereich [Weber, 1997].

Anders als bei den oben beschriebenen Deletionen von 22q dürfte die Lage der benützten FISH-Sonde hier keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens von Aberrationen sein. Denn die benützte Sonde war sowohl in dieser Arbeit als auch in allen anderen hier erwähnten FISH-Untersuchungen die 1p36 Telomersonde.

Die hier durchgeführte Arbeit unterscheidet sich aber in zwei wesentlichen Merkmalen von den oben genannten Studien.

Zum einen wurden einige aggressive Tumore zur Untersuchung ausgewählt, die in der konventionellen Karyotypisierung unauffällig waren. Dafür wurden unter den zwischen 2001 und 2005 in der Humangenetik in Homburg untersuchten Meningeomen speziell acht

aggressive Meningeome (WHO II, WHO III und Rezidive) mit normalem Karyotyp in diese FISH Studie miteinbezogen (T5603, T5750, T5902, T5952, T6192, T6201, T6235, T6263). Die Befunde dieser in der konventionellen Karyotypisierung unauffälligen Meningeome sollten überprüft werden. Die Idee dabei war, dass Mikrodeletionen von 1p36 übersehen worden sein könnten, nur Metaphasen von Normalgewebe untersucht wurden oder überhaupt keine Tumorzellen angezüchtet wurden. Geht man davon aus, dass diese Fälle tatsächlich keine Tumorzellen enthielten und berechnet den Anteil der 1p Deletionen in der vorliegenden Arbeit ohne diese Fälle, erhöht sich der Anteil der WHO II Meningeome von 17 auf 25% und der Anteil der WHO III Meningeome von 38 auf 60%. Diese Werte sind zwar immer noch niedrig, sie nähern sich aber den Werten oben genannter Studien an.

Das zweite Merkmal dieser Untersuchung, das diese Studie von oben genannten unterscheidet, ist die angewandte Methode. Hier wurde die FISH an Zellen aus der Tumorzellzucht angewendet. Die oben beschriebenen Zahlen stammen aber aus Untersuchungen an Nativmaterial, also entweder Ausstrichen oder Gewebeschnitten. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass durch Anzüchtung und mit Dauer der Anzüchtung Chromosomenaberrationen verschwinden [Ketter, 1996; Weber, 1997; Zang, 2001]. In der Studie von Müller et al. (1999) finden sich hierfür ebenfalls Anzeichen. Dort standen bei 15 mit der FISH untersuchten WHO II Meningeomen zusätzlich Daten der konventionellen Karyotypisierung zur Verfügung. Der Anteil der 1p deletierten Tumore war hierbei mit der FISH an Nativmaterial 80% und mit der Karyotypisierung 53%. Besonders fällt auch der geringe Anteil der 1p deletierten WHO I Meningeome in Metaphasen-Untersuchungen auf. Bei der Untersuchung von 198 Meningeomen von Ketter et al. (2001) sind es 2% für WHO I, 52% für WHO II, 100% für WHO III und 20% für alle WHO Grade zusammen. Dieser WHO I Anteil entspricht recht genau dem in dieser Studie gefundenen (3%). Der Anteil der WHO I Meningeome ist dagegen bei Ishino et al. (1998) 12%, bei Espinosa et al. (2006) 24%, bei Weber et al. (1997) 26%, bei Müller et al. (1999) 27% und bei Pfisterer et al. (2004) 36%. Für die 394 von Zank (2001) untersuchten Meningeome gibt es nur eine Angabe über alle WHO Grade, diese liegt bei 15%, verglichen mit den 20% bei Ketter et al. (2001) sind dies also noch weniger Verluste von 1p. Ein Verschwinden von Chromosomenveränderungen insbesondere der 1p Deletion durch das Anzüchten von Tumorzellen scheint deshalb sehr wahrscheinlich.

Nur fünf der acht (65%) untersuchten WHO III Meningeome dieser Studie zeigten in der vorher durchgeführten konventionellen Karyotypisierung einen Verlust von 1p. Die anderen drei WHO III Meningeome zeigten einen unauffälligen Karyotyp. Zwar treten gewisse Abweichungen immer auf, dennoch ist ein normaler Chromosomenbefund bei einem

bösartigen Tumor wie dem anaplastischen Meningeom nicht zu erwarten. Dies könnte neben dem Verschwinden von Aberrationen durch Anzuchtdauer durch eine zweite methodische Ursache begründet sein. Viele Meningeome zeigen eine starke Vaskularisierung mit hoher Blutungsneigung. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere Meningeome mit hoher Expression von VEGF-A (vascular-endothelial growth factor-A) diese Eigenschaft besitzen. Die Höhe der Expression von VEGF-A steigt bei höherem Tumorgrad [Yamasaki, 2000; Zang 2001]. Bei solchen stark vaskularisierten Tumoren ist oft eine sorgfältige Blutstillung mit unter anderem ausgiebiger Elektrokoagulation nötig. Die Anzucht des so vorbehandelten Gewebes - die Proben sind zum Teil über 100°C erhitzt worden- gestaltet sich aber sehr schwierig. Normale Zellen, z. B. Fibroblasten, scheinen diese Bedingungen besser als Tumorzellen zu überleben und dadurch könnten sie in Form von unauffälligen Metaphasen im Befund erscheinen. Bei einem der drei oben genannten WHO III Meningeome mit normalem Chromosomensatz kommt ein weiterer Störfaktor hinzu. Dieser Tumor (T6201) wurde in der Neurochirurgie in Bremen reseziert. Bei diesem ist schon allein durch die lange Transportzeit nach Homburg und die dabei herrschenden schlechten Bedingungen das nicht Anwachsen der Tumorzellen sehr gut vorstellbar.

Betrachtet man die FISH Ergebnisse der Meningeome mit 1p Verlust in der konventionellen Karyotypisierung, fällt auf, dass zwei dieser Fälle mit der FISH nicht detektierbar waren. Dies ist ungewöhnlich, da die FISH die höher auflösende Technik ist. Einer dieser Fälle (T5676) zeigte aber in der G-Bänderungsanalyse einen Tetraploiden Chromosomensatz mit zweifacher Deletion von 1p und zweifachem Verlust von 22q. Dies hat aber zur Folge, dass diese Zellen wie schon im Abschnitt über die Methodendiskussion erklärt, nicht von „normalen Zellen“ zu unterscheiden sind und deshalb das Nichtfeststellen der 1p Deletion in diesem Fall leicht verständlich ist. Bei dem anderen Meningeom mit in der FISH unentdecktem 1p Verlust muss folgendes bedacht werden. Dieser Tumor (T5737) wurde nach erfolgter Karyotypisierung eingefroren und drei Jahre später für die FISH wieder aufgetaut und erneut angezchtet. Schon allein dieses nochmalige Auftauen und Anzchten könnte die Anzuchtphase so verlängert haben, dass die Zellen mit 1p Verlusten weitgehend verdrängt wurden. Außerdem könnte das für das Einfrieren der Zellen verwendete „Frostschutzmittel“ ebenfalls zu einem Selektionsnachteil der Zellen mit 1p Verlusten geführt haben. Dennoch zeigen zwei ebenfalls in dieser Studie eingefrorene und wieder aufgetaute Tumore (T5884, T6022), dass dieses Verfahren nicht grundsätzlich zum Verschwinden aller Tumorzellen mit 1p- führen muss. Aber auch hier ist festzustellen, dass bei einem dieser beiden Fälle (T5884) nur ein relativ kleiner Anteil (4,7%) der Zellen einen 1p Verlust in der FISH zeigt. Es wäre denkbar, dass nach einigen Tagen weiterer Anzucht

auch dieser Tumor keine 1p Veränderungen mehr gezeigt hätte. Die beiden WHO III Meningeome, die direkt nach kurzer Anzuchtzeit präpariert und mit der FISH untersucht wurden, zeigten beide eine Deletion von 1p. Insofern wären die Ergebnisse von Müller et al. (1999) und Pfisterer et al. (2004) bestätigt, dass nahezu jedes WHO III Meningeom einen 1p Verlust hat.

Nachdem die gutartige und die bösartige Gruppe der Meningeome besprochen wurden, bleibt die interessante Mittelgruppe der atypischen Meningeome. Auch hier war die Anzahl der 1p deletierten Meningeome mit 17% relativ gering. Betrachtet man auch hier die Meningeome mit unauffälligem Chromosomensatz als Anzuchtartefakte, z. B. in Folge der Elektrokoagulation, erhöht sich der Anteil auf 29%. Dieser Wert ist aber dennoch, verglichen mit vielen der erwähnten Untersuchungen, recht klein. Andererseits fällt auf, dass in der Studie von Maillo et al. (2003) überhaupt keine 1p Verluste bei WHO II Meningeomen detektiert wurden. Zudem konnte Ketter et al. (2007) nur einen geringen Unterschied in der Rezidivwahrscheinlichkeit zwischen WHO I und II Meningeomen feststellen. Das verhältnismäßig seltene Auftreten des von der Histologie unabhängigen Markers 1p- bei den atypischen Meningeomen scheint daher plausibel.

Zusammenfassend hat man den Eindruck, dass 1p Verluste bei besonders aggressiven Tumoren weniger durch die Tumorzellzucht verschwinden. In dieser Untersuchung fällt auf, dass, obwohl die Deletion von 1p als sehr frühes Ereignis gilt, alle Fälle mit 1p- in der Karyotypisierung weitere Aberrationen zeigen. Dies könnte bedeuten, dass speziell in der Zellzucht die Zellen mit alleiniger Deletion von 1p einen Selektionsnachteil haben und deshalb nicht im Karyogramm erscheinen. Der 2-3%ige Anteil von 1p Deletionen in WHO I Meningeomen, der sowohl in dieser, als auch in der Studie von Ketter et al. (2001) gefunden wurde und im Vergleich zu den 12-36%, die bei Nativmaterial entdeckt wurden [Ishino, 1998; Müller, 1999; Pfisterer, 2004], sprechen für diese Vermutung. Da Zellen mit weiteren Aberrationen neben 1p- ein aggressiveres Verhalten haben dürften, könnte der 1p Verlust in angezüchteten Zellen ein spezifischerer Marker sein. Die mögliche höhere Spezifität von Zellzuchtmaterial könnte hierbei einen entscheidenden Vorteil haben, da es als Nebeneffekt die Wachstumseigenschaften der Zellen mit einbezieht. Der mögliche Preis könnte aber eine geringere Sensitivität sein. Weitere Studien, welche die Untersuchung von Nativmaterial und Anzuchtmaterial vergleichen, sind anzustreben.

5.3.5 Vergleich der FISH- und Karyotypisierungs-Ergebnisse

Die genetischen Untersuchungen an Meningeomen von Zang (2001) und Ketter et al. (2001) wiesen weniger Aberrationen auf als Untersuchungen, die z.B. mit der FISH direkt an

Nativmaterial durchgeführt wurden. Es ist bekannt, dass die konventionelle Karyotypisierung speziell ausgewählte DNA Abschnitte mit einem geringeren Auflösungsvermögen als die Methode FISH untersuchen kann. Dennoch ist fraglich, ob die mangelnde Auflösung für die geringere Anzahl an detektierten Aberrationen verantwortlich ist. Zellzuchtartefakte könnten eine weitaus größere Rolle spielen. Schon 1974 beobachtete Mark einen Anstieg genetisch unauffälliger Zellen mit der Dauer der Zellzucht. Das von ihm vermutete Überwachsen der Tumorzellen von normalen Gewebezellen wurde später von Zankl et al. (1979) widerlegt. Diese vermuteten, dass die künstlichen Wachstumsbedingungen für das Verschwinden der genetisch auffälligen Tumorzellen verantwortlich sind.

Auch in dieser Untersuchung an Meningeomen aus der Zellzucht konnte ein geringerer Anteil von 1p Veränderungen als in Studien an Nativmaterial festgestellt werden. Beim Vergleich beider hier angewendeten Methoden fiel auf, dass die hochauflösende FISH sogar weniger Deletion von 1p detektierte. Dies lag in einem Fall, wie oben beschrieben, an der angewendeten Sondenkombination (T5676). Im anderen Fall (T5737) scheint aber die längere Anzuchtdauer des FISH Präparats im Vergleich zum Präparat, welches für die Karyotypisierung verwendet wurde, für dieses unterschiedliche Ergebnis verantwortlich zu sein. Dies bestätigt die Vermutung von Zellzuchtartefakten. Außerdem schließt es zumindest bezüglich des kurzen Arms von Chromosom 1 das schlechtere Auflösungsvermögen der Karyotypisierung als Grund für das weniger häufige Auffinden von Aberrationen aus. Eine Ausnahme hiervon bildet der Fall T6277. In der Karyotypisierung war in diesem Fall nur eine Translokation von 1p auf Chromosom 4 ohne chromosomale Verluste zu erkennen. In der Interphase-FISH zeigten sich dagegen klare Verluste von 1p36. Bei solch einem Fall zeigt sich der Nutzen der hochauflösenden FISH. Auch bei Meningeom T6022 zeigten sich vereinzelt Metaphasen, bei welchen der 1p Verlust nicht sicher war (siehe Abbildung 4-18). Wären nur solche Metaphasen präpariert worden, wäre die Frage nach der Existenz des 1p Verlustes, leicht mit der FISH zu lösen gewesen.

Auch bezüglich Chromosom 22 offenbarte sich der Vorteil der FISH. Fünf in der Karyotypisierung unauffällige Meningeome zeigten mit der FISH Deletionen von 22q. Die Sensitivität der Karyotypisierung scheint hier deutlich niedriger als die der FISH. Anders als bei der Deletion von 1p traten 22q Verluste so häufig wie in Untersuchungen an Nativmaterial auf. Ein Selektionsnachteil scheint es deshalb für Zellen mit 1p Verlusten zu geben, nicht jedoch für Zellen mit Verlusten von 22q. Zellzuchtartefakte scheinen bezüglich Deletion 22q eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dennoch ist fraglich, warum die Karyotypisierung diese fünf Fälle nicht erkennen konnte. Mikrodeletionen sind denkbar,

scheinen aber zumindest nach den Daten der hier durchgeführten FISH mit der DiGeorge Sondenkombination nicht sehr häufig zu sein. Viel wahrscheinlicher ist, dass nicht alle Zellen einer Zellkultur als Metaphase in der Karyotypisierung erscheinen. Da Meningeome häufig nur wenig proliferieren, ist die Schwierigkeit, diese Zellen in Metaphase zu beobachten, leicht ersichtlich. Bilden Zellen in der Zellkultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten Metaphasen, könnte es passieren, dass nur bestimmte Zellen in der Karyotypisierung untersucht werden. Die FISH erfasst aber immer alle Zellen. Da zwei der fünf oben genannten Meningeome nach vollständiger Extirpation rezidierten, könnte dies daraufhin weisen, dass nicht die mangelnde Sensitivität genetischer Marker für das Übersehen dieser Aggressivität verantwortlich ist, sondern die mangelnde Sensitivität der Karyotypisierung. Meningeome, die in der konventionellen Karyotypisierung unauffällig waren, könnten mit der FISH auf ein falsch negatives Ergebnis hin überprüft werden. Die Untersuchung der Deletion 22q würde sich hierfür wegen ihrer Häufigkeit als Marker für chromosomale Veränderungen anbieten. Auch die Tatsache, dass so gut wie keine genetische Veränderungen ohne Deletion von 22q in Meningeomen auftreten, ist in diesem Zusammenhang von Vorteil.

5.3.6 Gemeinsames Auftreten von genetischen Aberrationen in einzelnen Tumoren und Zellklonen

Die Beobachtungen anderer Studien, dass bei Meningeomen Deletionen von Chromosomen fast ausschließlich in Kombination mit dem Verlust von 22q auftreten [Mark, 1977; Zang, 1982; Weber, 1997], konnte in dieser Untersuchung bestätigt werden. Der Verlust von 22q gilt unter anderem deshalb als sehr frühes Ereignis. Erstaunlich war in der hier durchgeführten Studie, dass auch einzelne Klone ohne 22q Verluste, 1p Deletionen präsentierten. Dies könnte daraufhin deuten, dass in manchen Fällen der Verlust von 1p ein noch früheres Ereignis ist. In dieser Arbeit konnte aber kein Meningeom mit alleiniger Deletion 1p entdeckt werden. Man könnte spekulieren, dass der Verlust von Chromosom 22 über die Zellmembran hinaus Einfluss auf die genetische Stabilität anderer Meningeomzellen hat. Dies scheint aber sehr unwahrscheinlich. Eine Fehlverteilung der Chromosomen in der Mitose scheint dagegen wahrscheinlicher. Eine Instabilität des Genoms könnte in den meisten Fällen zu einer Deletion 22 und in seltenen Fällen zur Deletion 1p führen. Die seltene Deletion 1p könnte dann einen Selektionsvorteil haben und so trotz seltenem Ereignis einen größeren Anteil der Tumorzellen stellen. Die beschriebene Fehlverteilung von der Region 1p würde aber Zellklone mit Zugewinnen von 1p vermuten lassen. Solche Klone wurden aber bisher nicht beobachtet. Andererseits könnte ein solcher Zugewinn von 1p mit

der Überexpression des auf 1p vermuteten Tumorsuppressorgens verbunden sein und so zum Sterben dieser Klone führen.

5.3.7 Genetische Veränderungen bei Rezidiven

Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 wurde häufig bei Rezidiven beobachtet und gilt umgekehrt auch als Risiko für ein Rezidiv [Steddel, 1996; Müller, 1999; Ketter, 2001; Zang, 2001]. In dieser Arbeit wurde dies bestätigt, denn die Hälfte aller Rezidivmeningeome zeigte einen Verlust von 1p. Drei dieser fünf Rezidive waren ein WHO III und jeweils eines ein WHO II bzw. ein WHO I Meningeom. Drei der anderen Meningeome zeigten eine alleinige Deletion von 22q und zwei waren genetisch völlig unauffällig. Dieses Phänomen, dass auch genetisch unauffällige oder nur durch einen Verlust von 22q charakterisierte Meningeome rezidivieren, wurde auch in der Studie von Ketter et al. (2001) beschrieben. Eine Überwucherung von Normalgewebe ist aber besonders bei den drei Fällen mit Deletion 22q sehr unwahrscheinlich. Ein Zellzuchtartefakt, durch einen Selektionsvorteil genetisch wenig veränderter Meningeome, wäre zwar denkbar, ist aber unwahrscheinlich. Auch Untersuchungen an Nativmaterial von Rezidiven zeigten bei vielen Rezidiven (32%) nur einen unauffälligen Chromosomensatz oder eine alleinige Monosomie 22 [Espinosa, 2006]. Genetische Veränderungen scheinen also keine zwingende Notwendigkeit für Rezidive zu sein. Dennoch ist das vermehrte Auftreten von Aberrationen in Rezidiven sicher. Dies bestätigen auch die Daten zweier Patienten, deren Meningeome mehrfach rezidivierten. Interessanterweise trat in diesen beiden Fällen (T6176, T6325) der Verlust von 1p erst in späteren Rezidiven auf. Wohingegen recht selten beobachtete Verluste, wie die der Chromosomen 4, 6, 13, 18 und 19 schon in früheren Rezidiven beobachtet werden konnten. Das bekannte Phänomen des erneuten Auftretens von Tumorklonen in späteren Rezidiven [Espinosa, 2006] konnte auch in diesen beiden Fällen beobachtet werden. Dennoch verschwanden auch einige Klone und neue kamen hinzu. Diese Fälle scheinen durch eine genetische Instabilität immer wieder neue aberrante Klone hervorzubringen, die sich nur teilweise in den Folge-Meningeomen zeigen. Dass Klone mit Dauer der Progression ein Chromosom nach dem anderen verlieren, scheint damit ausgeschlossen zu sein. Ein Merkmal, das chromosomale Veränderungen wahrscheinlich macht, scheint wohl eher in einem Pool von Zellen zu stecken. Diese Zellen mit dem Potential genetischer Instabilität scheinen immer wieder neue Klone zu produzieren, die sich im Falle von Selektionsvorteilen durchsetzen. Da es sich aber bei den beschriebenen Meningeomen wohl aber um sehr aggressive Einzelbeispiele handeln dürfte, ist eine Schlussfolgerung auf alle Meningeome fraglich.

5.3.8 Korrelationen zwischen Patienten und Tumorparametern

Das gehäufte Auftreten von Meningeomen bei Frauen [Louis, 2000; Ketter, 2001] konnte in dieser Untersuchung bestätigt werden. Frauen waren zweieinhalb Mal häufiger von Meningeomen betroffen. Die hier gefundenen Werte sind aber nicht repräsentativ, da ein Teil der Proben speziell ausgewählt wurden und diese somit nicht die Normalverteilung widerspiegeln. Korrelationen zwischen Alter und Geschlecht der Patienten und Tumorparametern konnte in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden. Der Unterschied zwischen diesen Parametern dürfte zu gering sein, als dass dieser bei den hier 35 untersuchten Fällen klar zu erkennen wäre. Dagegen war die bekannte Korrelation von Lokalisation und Tumoraggressivität [Kepes, 1982; Louis, 2000; Ketter, 2001] in dieser Arbeit klar zu erkennen. Alle WHO III Meningeome und alle Meningeome mit Deletion 1p waren in der Konvexität lokalisiert. Warum dies der Fall ist, konnte aber auch mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass die Meningen des Endhirns aus Neural-Stammzellen entstehen und die restlichen Meningen mesodermalen Ursprungs sind, könnte eine Erklärung sein. Catala (1998) konnte aber zumindest bezüglich der Morphologie der Meningen und der Meningeome keinen Unterschied hinsichtlich ihres verschiedenen Ursprungs feststellen. Eine Spekulation meinerseits wäre der Einfluss von ionisierender Strahlung. Wie in vielen Studien beschrieben, ist die Gefahr bei Bestrahlung in der Kindheit am größten, das Auftreten von Meningeomen bis zu zehnmal häufiger, das Erkrankungsalter geringer und die Meningeome im Strahlenfeld zu finden [Modan, 1974; Harrison; 1991; Rienstein, 2001; Sadetzki, 2002]. Wenn man die Anatomie betrachtet, fällt auf, dass die Meningen der Großhirn-Konvexität nur durch die Kopfhaut und den Schädelknochen vor Strahlung geschützt sind, dagegen die Schädelbasis zusätzlich durch den Hals von unten und dem Gehirngewebe von oben abgeschirmt ist. Der Spinalkanal ist in alle Richtungen durch viele Zentimeter Gewebe vor Strahlung geschützt. Zusätzlich ist eine erhöhte Strahlenexposition der Konvexitäts-Meningen zu verzeichnen. Diese Phase betrifft die beiden ersten Lebensjahre, in denen durch die noch nicht verschlossenen Fontanellen Strahlung besonders leicht auf die Meningen der Konvexität einwirken kann. Ob diese Faktoren tatsächlich existent sind und Jahrzehnte später zur erhöhten Aggressivität von Meningeomen der Konvexität führen können, ist fraglich.

5.4 Ausblick

In der hier vorliegenden Studie konnte die Bedeutung der genetischen Untersuchung von Meningeomen gezeigt werden. Diese schon seit einigen Jahren bestehende Erfahrung wirft aber hinsichtlich der angewendeten Methoden und der entdeckten Ergebnisse immer wieder kontroverse Fragen auf. Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis der Methode Zellzucht und Karyotypisierung bei und können so einen Teil dieser Fragen beantworten. Dies trägt zur weiteren Etablierung der genetischen Befunde von Meningeomen bei, auch wenn heute schon bekannt ist, dass durch die Kombination von Histologie und Genetik genauere Prognosen möglich sind. So ist die Vorhersagbarkeit von Rezidiven erhöht und damit die Nachsorge der betroffenen Patienten individuell nach deren Risiko planbar. Bei Ketter et al. (2001) ist ein entsprechendes Nachsorge-Schema dargestellt, welches die Ergebnisse der Genetik mit einbezieht.

Das Phänomen rezidivierender Meningeome, die sowohl in der Histologie, als auch in der Genetik unauffällig sind, konnte mit dieser Studie nicht völlig geklärt werden. Dennoch sprechen die hier gewonnenen Erkenntnisse dafür, dass der Anteil dieser Tumore aufgrund falsch negativer genetischer Befunde zu hoch eingeschätzt wird. Ein Ziel sollte es deshalb sein, diese falsch negativen Ergebnisse zu minimieren. Da die Kombination zweier Methoden immer eine erhöhte Sicherheit bietet, könnte zum Beispiel die konventionelle Karyotypisierung mit ihrer herausragenden Eigenschaft, das komplette Erbgut zu überblicken, mit einer sensitiveren Methode wie der FISH ergänzt werden. In der Praxis könnte unter Meningeomen mit unauffälligen Karyotypen mit der FISH nach falsch negativen Befunden gesucht werden. Hierzu würde sich zum einen eine 22q Sonde anbieten, da die Deletion 22q, wie in dieser Arbeit gezeigt, am häufigsten ist und fast immer auch bei anderen Aberrationen mit auftritt. Als zweite Sonde wäre eine 1p36 Sonde interessant, da mit dieser auch eine Aussage über die Progression möglich wäre. Als Untersuchungsmaterial würden sich Ausstrichpräparate anbieten. Zellzuchtartefakte würden so vermieden und die FISH wäre so am schnellsten und am billigsten. Die Idee, nur mit der FISH nach Aberrationen zu suchen und somit Kosten zu sparen, dürfte drei Nachteile haben. Zum einen würde auch hier eine zweite Kontrolle fehlen und wieder die Gefahr falsch negativer Befunde bestehen. Zweitens müssten sehr viele Sondenkombinationen eingesetzt werden, um keine wichtigen Aberrationen zu übersehen und drittens wäre dies noch aufwändiger und teurer als die Karyotypisierung. Für die Zukunft bleibt die Aufgabe, mit der weiteren Erforschung der Tumorentstehung und der Tumorgenetik noch genauere Prognosen zu stellen und noch bessere Therapien zu entwickeln.

6 Anhang

6.1 Bezugsquellen / Abkürzungen

Colcemid	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
DAPI (Vectashield® with DAPI): 4',6-Diamidino-2-phenylindol	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: Klebstoff	Marabu, Tamm
EtOH: Ethanol S99%	SAV LP, Flintsbach
HCl: Salzsäure 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
Na ₂ HPO ₄ : di- Natriumhydrogen- phosphat- Dihydrat zur Analyse	Merck KgaA, Darmstadt
Pbmax: Zellkultur-Medium	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
RNase H (100 µg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
RPMI: Zellkulturmedium	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
SDS: Sodium Dodecyl Sulfat Dodecylsulfat Natriumsalz 10%	Merck KgaA, Darmstadt
Streptomycin	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe

Tris- HCl: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid zur Analyse

Merck KgaA, Darmstadt

Vectashield ®
Mounting Medium for Fluorescence
(mit DAPI und ohne DAPI)

Vector Laboratories, Burlingame, USA

6.2 Lösungen

Giemsa-Lösung

5ml Giemsa
95ml Sörensen Puffer

1xPBS-Puffer:
Blockierungs-Reagenz

150mM NaCl
8mM Na₂HPO₄
2mM KCl
2mM KH₂PO₄ (pH=7,0)

4% PFA/1xPBS

4g Paraformaldehyd in 100ml 1xPBS-Puffer
(bei 65°C lösen) (pH=7)

0,1% SDS/0,5xSSC

25ml 2xSSC
1ml 10% SDS
74ml Aqua dest. (pH=7)

2x SSC:
Saline-sodium citrate buffer

0,3M NaCl
0,03 M NaCitrat (pH=7,0)

6.3 Geräte und Software

Brutschrank begast

Heraeus, Hanau

CCD-Kamera CH 250 (Kamera)

Photometrics, Tucson, Arizona,

Fluoreszenzmikroskop AX 70

Olympus, Hamburg

Heizplatte 15801

Medax

Hellfeldmikroskop BX 61

Olympus, Hamburg

ISIS Software Version 3.1

Metasystems, Altlussheim

Wasserbäder 1803

GFL, Großburgwedel

Werkbank LaminAir

Heraeus, Hanau

Zytozentrifuge Rotanta/P

Hettich, Tuttlingen

6.4 Ergebnisse der Interphasen-FISH

6.4.1 Kombination der Sonden 1p36 und 22qter

6.4.1.1 Meningeome aus der Zellzucht

T5603 Ausgezählte Kerne: 235		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		1	13		
	2			194	1	
	3			3	3	
	4			2		18

T5676 Ausgezählte Kerne: 226		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			2		
	2			155	2	12
	3			19	5	1
	4			3		27

T5726 Ausgezählte Kerne: 227		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0			1		
	1		5	103		3
	2		1	104	1	1
	3			2		
	4					6

T5737 Ausgezählte Kerne: 239		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		2	29		
	2		3	182		7
	3			3		
	4			5		8

T5750 Ausgezählte Kerne: 205		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		1	26		
	2		2	175		
	3					
	4					1

T5830 Ausgezählte Kerne: 212		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		1	19		
	2			177		1
	3			1		
	4			1		11

T5884 Ausgezählte Kerne: 234		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		1	10		
	2			200	2	
	3			1		
	4			11		9

T5902 Ausgezählte Kerne: 229		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		2	3		
	2		2	151	1	2
	3			3	6	
	4			4	3	52

T5952 Ausgezählte Kerne: 230		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		8	8		
	2		1	205		
	3			1	1	
	4				2	4

T6022 Ausgezählte Kerne: 228		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		153	10		
	2		33	32		
	3					
	4					

T6112 Ausgezählte Kerne: 209		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			9		
	2		2	196		
	3					
	4					2

T6119 Ausgezählte Kerne: 254		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		3	146	1	
	2		1	102		
	3			1		
	4					

T6125 Ausgezählte Kerne: 214		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		8	179	1	2
	2			21	2	1
	3					
	4					

T6132 Ausgezählte Kerne: 240		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0			5		
	1			45		
	2		5	184	1	
	3					
	4					

T6133 Ausgezählte Kerne: 218		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		2	107	2	
	2		1	98	3	5
	3					
	4					

T6137 Ausgezählte Kerne: 230		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0			2		
	1			4		
	2			220		1
	3					
	4					3

T6138 Ausgezählte Kerne: 222		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			19		
	2		3	192		
	3					
	4					8

T6153 Ausgezählte Kerne: 217		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		3	170		
	2			44		
	3					
	4					

T6176 Ausgezählte Kerne: 209		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		50	6		
	2		2	136	4	7
	3					1
	4				1	2

T6184 Ausgezählte Kerne: 213		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0			2		
	1			1		
	2			210		
	3					
	4					

T6192 Ausgezählte Kerne: 241		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		5	4		
	2		3	227		
	3			2		
	4					

T6198 Ausgezählte Kerne: 235		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0									
	1		1	4	1					
	2		1	7		202				1
	3									
	4					4		3		11

T6199 Ausgezählte Kerne: 213		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		1	71		
	2		5	136		
	3					
	4					

T6201 Ausgezählte Kerne: 224		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			6		
	2		3	209	4	
	3					
	4					2

T6204 Ausgezählte Kerne: 200		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		1	39		4
	2			138		14
	3					
	4					4

T6218 Ausgezählte Kerne: 220		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			5		
	2		2	210		2
	3					
	4					1

T6235 Ausgezählte Kerne: 226		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			92		1
	2		3	128		2
	3					
	4					

T6245 Ausgezählte Kerne: 232		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		3	5		
	2		2	182	1	11
	3					
	4				5	23

T6249 Ausgezählte Kerne: 202		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		3	22		
	2		1	164	5	1
	3			3		
	4					3

T6263 Ausgezählte Kerne: 216		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			32		
	2			181		
	3					
	4					3

T6265 Ausgezählte Kerne: 252		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			6		
	2		5	230	1	
	3					
	4					10

T6268 Ausgezählte Kerne: 268		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		190	7		
	2		26	45		
	3					
	4					

T6277 Ausgezählte Kerne: 216		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0		1			
	1		154	5		
	2		18	38		
	3					
	4					

T6284 Ausgezählte Kerne: 228		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			7		
	2		6	194		
	3		1			
	4					20

T6325 Ausgezählte Kerne: 263		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1		83	61		2
	2		1	104	1	8
	3					
	4					3

6.4.1.2 Lymphozyten

Lymphozyten Präparat 1 Ausgezählte Kerne: 208		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			7		
	2		4	193	1	
	3			1		
	4			2		

Lymphozyten Präparat 2 Ausgezählte Kerne: 226		Anzahl der Signale (Sonde 1p36; grün)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; rot)	0					
	1			2		
	2		3	220		
	3		1			
	4					

6.4.2 Kombination der Sonden 22q11.2 und 22qter

6.4.2.1 Meningeome aus der Zellzucht

T6119 Ausgezählte Kerne: 211		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0		6	5		
	1	2	107	17		
	2	2	9	63		
	3					
	4					

T6125 Ausgezählte Kerne: 250		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0		3			
	1	3	201	11		
	2		7	25		
	3					
	4					

T6132 Ausgezählte Kerne: 210		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0					
	1		3			
	2		11	196		
	3					
	4					

T6133 Ausgezählte Kerne: 205		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0					
	1		41	2		
	2		8	149		
	3			5		
	4					

T6153 Ausgezählte Kerne: 297		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0		9			
	1		185	18		
	2	1	17	65		
	3			1	1	
	4					

T6176 Ausgezählte Kerne: 264		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0					
	1	1	92	6		
	2		6	152		
	3			2	5	
	4					

T6184 Ausgezählte Kerne: 202		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0					
	1			4		
	2		4	188	3	
	3			2	1	
	4					

T6192 Ausgezählte Kerne: 209		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0					
	1		33			
	2		1	175		
	3					
	4					

6.4.2.2 Lymphozyten

Lymphozyten Ausgezählte Kerne: 207		Anzahl der Signale (Sonde 22q11.2; rot)				
		0	1	2	3	4
Anzahl der Signale (Sonde 22qter; grün)	0	7		1		
	1		1	7		
	2		5	178		
	3			2	3	
	4			1	1	1

7 Literaturverzeichnis

1. Al Saadi A, Latimer F, Maderic M, Robbins T (1987) Cytogenetic studies of human brain tumors and their clinical significance. II. Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 26(1):127-41
2. Antinheimo J, Sankila R, Carpén O, Pukkala E, Sainio M, Jääskeläinen J (2000) Population- based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology* 54: 71-76
3. Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey (1994) Allelic loss of 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 9: 296–298
4. Boström J, Mühlbauer A, Reifenberger G (1997) 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
5. Bouvier C, Liprandi A, Colin C, Giorgi R, Quilichini B, Metellus P, Figarella-Branger D (2005) Lack of alkaline phosphatase activity predicts meningioma recurrence. *Am J Clin Pathol* 124: 252-258
6. Cai DX, Banerjee R, Scheithauer BW, Lohse CM, Kleinschmidt-Demasters BK, Perry A (2001) Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subsets of meningioma: Diagnostic and prognostic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 628-636
7. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM (1993) Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53: 1312-1316
8. Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Wilson EM, Black PM (1995) Androgen receptor expression in meningiomas. *J Neurosurg* 82: 453-460
9. Casperson T, Zech L, Johansson C (1970) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes *Exp Cell Res* 60: 315-319
10. Catala M (1998) Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebro-spinal fluid in man and other species. I. The ventricular system, meninges and choroid plexuses. *Arch Anat Cytol Path* 3: 153-169
11. Cerda-Nicolas M, López-Ginés C, Péres-Bacete M, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A (2000) Histopathological and cytogenetic findings in benign, atypical and anaplastic human meningiomas: a study of 60 tumors. *Clin Neuropathol* 19: 259-267
12. Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP (1990) The molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathol* 1:19-24
13. Croce CM, Klein G (1985) Chromosome translocations and human cancer. *Sci Am* 252: 54-60

14. Cushing H, Eisenhardt L (1938) Meningiomas: Their classification, Regional Behaviour, Life History, and Surgical End Results. Charles C. Thomas, Springfield
15. Cryns VL, Yi SM, Tahara H, Gaz RD, Arnold A (1995) Frequent loss of chromosome arm 1p DNA in parathyroid adenomas. *Genes Chromosom Cancer* 13: 9-17
16. De Monte F (1995) Current management of meningiomas. *Oncol* 9: 83-96
17. Dracopoli NC, Harnett P, Bale SJ, Stanger BZ, Tucker MA, Housman DE, Kefford RF (1989) Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4614-4618
18. Dutour A, Kumar U, Panetta R, Ouafik L, Fina F, Sasi R, Patel YC (1998) Expression of somatostatin receptor subtypes in human brain tumors. *Int J Cancer* 76: 620-627
19. Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP & Nordenskjöld M (1987) Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc natl Acad Sci, USA* 84: 9275-9279
20. Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjöld M, Collins VP (1990) Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 50: 5863-5867
21. Espinosa AB, Tabernero MD, Maillo A, Sayagues JM, Ciudad J, Merino M, Alguero MC, Lubombo AM, Sousa P, Santos-Briz A, Orfao A (2006) 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* 12(3): 772-780
22. Evans JJ, Jeun SS, Lee JH (2001) et al. Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningotheial meningiomas. *J Neurosurg* 94: 111-117
23. Friend KE, Radinsky R, Mc Cutcheon IE (1999) Growth hormone receptor expression and function in meningiomas: Effect of a specific receptor antagonist. *J Neurosurg* 91: 93-99
24. Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 378-383
25. Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB (1999) Merlin: The neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1423: M29-M36
26. Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A (1997) Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependimomas and schwannomas. *Neurology* 49: 267-270
27. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K, Jarbo C, Mathiesen T, Dumanski JP (2007) Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 8: 1-16

28. Harper ME, Saunders GF (1981) Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridisation. *Chromosoma* 83: 431-439
29. Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP (1991) Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg* 75: 564-574
30. Henn W, Cremerius U, Helde G, Lippitz B, Schröder JM., Gilsbach JM., Büll U, Zang KD (1995) Monosomy 1p is correlated with enhanced in vivo glucose metabolism in meningiomas. *Cancer Genet. Cytogenet* 79: 144-148
31. Henn W, Urbschat S (1998) Genetische Grundlagen der Entstehung von Hirntumoren. *Radiologie* 38: 898-903
32. Hitotsumatsu T, Iwaki T, Kitamoto T (1997) et al. expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 93: 225-232
33. Hopman AHN, Ramaekers FCS, Raap AK, Beck JLM, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP (1988) In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* 89: 307-316
34. Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1997) Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: Prognostic considerations. *J Neurosurg* 86: 113-120
35. Ikeda K, Sacki Y, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V, Chiocca EA (1999) Inhibition of NF2-negativ und NF2-positiv primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *J Neurosurg* 91: 85-92
36. ISCN. F. Mitelman (ed.). (1995) Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an international system for cytogenetic nomenclature. Basel, Karger
37. Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, Inazawa, J (1998) Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer* 83: 360-366
38. John H, Birnstein M, Jones K (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-587
39. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldmann F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis in solid tumors. *Science* 258, 818-821
40. Kepes JJ (1982) Meningiomas: Biology, Pathology, and Differential Diagnosis. New York: Masson Publishing
41. Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, König J, Zang KD, Steudel W-I (2001) Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 95(4):601-7

42. Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, Steudel W-I, Zang KD, Rahnenführer J (2007) Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. *Int. J. Cancer* 121(7):1473-1480
43. Ketter R, Rahnenführer J, Henn W, Kim YJ, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Urbschat S (2008) Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningiomas. *Neurosurgery* 62(1):61-70
44. Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashima T, Saido TC, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, Nakao M (1998) The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nature Med* 4: 915-922
45. Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press: Lyon
46. Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel WI, Zang KD, Feiden W (1995) Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings and cytogenetics. *Acta Neurochir. (Wien)* 137: 174-181
47. Knudson Jr AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc natl Acad Sci, USA* 68: 820-823
48. Knudson Jr AG (1973) Mutation an human cancer. *Cancer Res* 17: 317-352
49. Knudson AG (1985) Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45: 1437-1443
50. Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, Mahera H, Kotsiakis X, Hranioti S, Eftychiadis C, Patsouris E (2003) Hormone receptors in non-malignant meningiomas correlate with apoptosis, cell proliferation and recurrence-free survival. *Histopathology* 43: 280-290
51. Kuroki T, Fujiwara Y, Tsuchiya E, Nakamori S, Imaoka S, Kanematsu T, Nakamura Y (1995) Accumulation of genetic changes during development and progression of hepatocellular carcinoma: Loss of heterozygosity on chromosome arm 1p occurs at an early stage of hepatocarcinogenesis. *Genes Chromosom Cancer* 13: 163-167
52. Lamszus K, Lengler U, Schmidt NO, Stavrou D, Ergun S, Westphal M (2000) Vasculas endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter, basic fibroblast growth factor, and placenta growth factor in human meningiomas and their relation to angiogenesis and malignancy. *Neurosurgery* 46: 938-948
53. Lamszus K (2004) Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 275-286
54. Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC Jr, Wright WE, Shay JW (1997) Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum Pathol* 28: 416-420

55. Lantos PL, Vandenberg SR, Kleihues P (1996) Tumors of the Nervous System. Arnold, London
56. Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959) Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet* 1: 41-49
57. Lekanne-Deprez RH, Riegmann PH., van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ, Koper JW, Avezaat, CJJ, Maltby EL, Ironside JW, Battersby RD (1988) Cytogenetic studies in 50 meningiomas. *Cancer Genet. Cytogenet* 31: 199–210
58. Lekanne-Deprez RH, Riegmann PH, van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ, Koper JW, Avezaar CJJ, Mulder PGH, Zwarthoff EC, Hagemeyer A (1995) Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropathol exp Neurol* 54: 224-235
59. Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA (1986) Application of longterm collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet. Cytogenet* 23: 305–313
60. Longstreth WT Jr, Dennis LK, McGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD (1993) Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer* 72: 639-648
61. Lopez-Gines C, Cerdá-Nicolás M, Gil-Benso R, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A (2001) Loss of 1p in recurrent meningiomas: a comparative study in successive recurrences by cytogenetics and fluorescence in situ hybridisation. *Cancer Genet Cytogenet* 125: 119-124
62. Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ (2000) Meningiomas, in Kleihues P, Cavenee W (eds): *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. World health Organization Classification of Tumours: IARC Press; Lyon*
63. Louis DN, Ramesh V, Gusella JF (1995) Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumors. *Brain Pathol* 5: 163-172
64. Lunsford LD (1994) Contemporary management of meningiomas: radiation therapy as an adjuvant and radiosurgery as alternative to surgical removal? *J Neurosurg* 80: 187-190
65. Maillo A, Diaz P, Sayagues JM, Taberero MD, Ciudad J, Lopez A, Goncalves JM, Orfao A (2001) Gains of chromosome 22 by fluorescence in situ hybridisation in the context of an hyperdiploid karyotype are associated with aggressive clinical features in meningioma patients. *Cancer* 92: 377-385
66. Maillo A, Orfao A, Sayagues JM (2003) et al. 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
67. Mark J, Levan G, Mitelman F (1972) Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. *Hereditas* 71: 163–168.

68. Mark J (1974) The human meningioma: A benign tumor with specific chromosome characteristics. in: German, J. (ed.): Chromosomes and cancer. Wiley, New York
69. Mark J (1977) Chromosomal abnormalities and their specificity in human neoplasm: an assessment of recent observations by banding techniques. *Adv Cancer Res* 24: 165-222
70. Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW (1997) Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* 14: 611-616
71. Michelsen JJ, New PFJ (1969) Brain tumor an pregnancy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 32: 305-307
72. Mihaila D, Jankowski M, Gutierrez JA (2003) et al. Meningiomas: Loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. *Clin Cancer Res* 9: 4443-4451
73. Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL (1985) Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 62: 18-24
74. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (Eds.), (2006) Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
75. Modan B, Baidatz D, Mart H, Steinitz R, Levin SG (1974) Radiation-induced head and neck tumours. *Lancet* I: 277-279
76. Mulder PGH, Zwarthoff EC, Hagemeyer A (1995) Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54: 224-235
77. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel W-I, Zang KD, Steilen-Gimbel H (1999) Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res* 5: 3569-3577
78. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 20:613-6
79. Neumeier-Probst E, Zanella F, Westphal M (1994) Preoperative tumor embolization with fibrin glue: Indications and results. In: *Fibrin Sealing in Surgical and Nonsurgical fields.* 5: 32-40
80. Niedermayer I, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Zang KD (1997) 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

81. Nowell PC, Hungerford DA (1960) A minute chromosome in human chronic granulocyte leukemia. *Science* 132: 1497
82. Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW (1996) Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic implications *Cancer (Phila.)* 77: 2567–2573
83. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM (1997) Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol* 21: 1455-1465
84. Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, Swanson PE, Lohse CM, Newsham IF, Weaver A, Gutmann DH (2000) 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
85. Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G (2004) Molecular pathogenesis of meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology* 70: 183-202
86. Perry A, Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A (2007) Meningiomas. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK: WHO Classification of tumours of the central nervous system. IARC, Lyon
87. Peyrard M, Fransson I, Xie YG, Han F-Y, Rutledge MH., Swahn S, Collins JF, Dunham I., Collins VP, Dumanski JP (1994) Characterization of a new member of the human beta-adaptin gene family from chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum molec Genet* 3: 1393–1399
88. Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, Hendricks WP, Pueschel J, Coons SW, Scheck AC (2004) Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro-Oncology* 6: 290-299
89. Prowald A, Wemmert S, Biehl C, Storck S, Martin T, Henn W, Ketter R, Meese E, Zang KD, Steudel WI, Urbschat S. (2005) Interstitial loss and gain of sequences on chromosome 22 in meningiomas with normal karyotype. *Int J Oncol.* 26(2):385-93
90. Pulst SM, Rouleau GA, Marineau C, Fain P, Sieb JP (1993) Familial meningioma is not allelic to neurofibromatosis 2. *Neurology* 43: 2096-2098
91. Rachlin JR, Rosenblum ML (1991) Etiology and biology of meningiomas. in: Al Mefty, O (ed.): *Meningiomas*. Raven Press, New York
92. Ragel B, Jensen RL (2003) New approaches for the treatment of refractory meningiomas. *Cancer Control* 10: 148-158
93. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Collins VP (1995) Amplification at 12q13-14 in human malignant gliomas is frequently accompanied by loss of heterozygosity at loci proximal and distal to the amplification site. *Cancer Res* 55: 731-734
94. Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML (1993) Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 53: 2386-2392

95. Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Kusak E, Moreno S (1988) Chromosomal involvement secondary to -22 in human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 33: 275-290
96. Rienstein S, Loven D, Israeli O, Ram Z, Rappaport ZH, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A, Friedman E (2001) Comparative genomic hybridization analysis of radiation-associated and sporadic meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 131(2):135-40
97. Roleau GA, Wertelecki W, Haines JL, Hobbs WJ, Trofatter JA, Seizinger BR, Martuza RL; Superneau DW, Conneally PM, Gusella JF (1987) Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 329: 246-248
98. Rowley JD (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-291
99. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA (1994) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat. Genet.* 6, 180–184.
100. Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T, Nass D (2002) Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J Neurosurg.* 97(5):1078-82
101. Sanson M, Cornu P (2000) Biology of meningiomas. *Acta Neurochir, Wien* 142: 493-505
102. Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O (2000) A role for Telomeric and Centromeric Instability in the Progression of Chromosome Aberrations in Meningioma Patients. *Cancer* 88: 440-53
103. Sayagues JM, Taberner MD, Maillo A, Díaz P, Rasillo A, Bortoluci A, Gomez-Moreta J, Santos-Briz A, Morales F, Orfao A (2002) Incidence of numerical chromosome aberrations in meningioma tumors as revealed by fluorescence in situ hybridisation using 10 chromosome-specific probes. *Cytometry* 50: 153-159
104. Schönberg BS, Christine BW, Whisnant JP (1975) Nervous system neoplasms and primary malignancies of other sites. The unique association between meningiomas and breast cancer. *Neurology* 25: 705-712
105. Schröck E, Du MS, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497
106. Schwab M, Praml C, Amler LA (1996) Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosom Cancer* 16: 211-229
107. Scoles DR, Huynh DP, Chen MS, Burke SP, Gutmann DH, Pulst SM (1998) Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with beta II-spectrin. *Nat Genet* 18: 354-359

108. Seizinger BR, De la Monte S, Atkin L, Gusella JF, Martuza RL (1987) Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosom 22. *Proc natl Acad Sci , USA* 84: 5419-5423
109. Shintani T, Hayakawa N, Hoshi M (1999) High incidence of meningioma among Hiroshima atomic bomb survivors. *J Radiat Res* 40: 49-57
110. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM Jr, Menon AG (1995) Allelic losses on chromosomes 14, 10 and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression *Cancer Res.* 55: 4696–4670
111. Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22–39
112. Speicher MR, Gwyn BS, Ward DC (1996) Karyotyping human chrmosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-357
113. Steudel WI, Feld R, Henri W, Zang KD (1994) Correlation between cytogenetic and clinical findings in 215 human meningiomas. *Acta Neurochir Suppl.* 65:73-6.
114. Steudel WI, Feld R, Henn W, Zang KD (1996) Correlation between cytogenetic and clinical findings in 215 human meningiomas. *Acta Neurochir [Suppl]* 65: 73-76
115. Sutherland GR, Sima AA. (1992) Incidence and clinicopathologic features of meningioma. In: H. H. Schmidek (Hrsg.) *Meningiomas and their surgical management.* Saunders Company, Philadelphia
116. Tjio JH, Levan A (1956) The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6
117. Tse JY, Ng HK, Lau KM, Lo KW, Poon WS, Huang DP (1997) Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. *Hum Pathol* 28: 779-785
118. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN (1996) CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated *Cancer Res.* 56: 150–153
119. Uhrig S, Bolzer A, Cleve B, Speicher MR (1997) Einsatz von Vielfarben-FISH Techniken in der klinischen Diagnostik. *Med. Genetik* 9: 563-569
120. Wagener C (1999) *Molekulare Onkologie.* Thieme Verlag, Stuttgart, New York
121. Weber, RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter, P (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc natl Acad Sci, USA* 94: 14719– 14724
122. Weiss AF, Portmann R, Fischer H, Simon J, Zang KD (1975) Simian virus 40-related antigens in three human meningiomas with defined chromosome loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 609-613

123. Weith A, Brodeur GM, Bruns GAP, Matise TC, Mischke D, Nizetic D, Seldin MF, van Roy N, Vance J (1996) Report of the second international workshop on human chromosome 1 mapping 1995. *Cytogenetic Cell Genetic* 72: 113-154
124. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146, 827–832
125. Westphal M (2003) Tumoren der Meningen. In: Schlegel U, Weller M, Westphal M (eds) Referenz Reihe Neurologie, Neuroonkologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 241-253
126. Wiestler OD, Reifenberger G (2003) Pathologische Anatomie und WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In: Schlegel U, Weller M, Westphal M (eds) Referenz Reihe Neurologie, Neuroonkologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 36-41
127. Yamasaki F, Yoshioka H, Hama S, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2000) Recurrence of meningiomas: influence of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer* 89: 1102-1110
128. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature (Lond.)* 216: 84–85
129. Zang KD (1982) Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 6: 249–274
130. Zang KD (2001) Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet.* 93(3-4):207-20
131. Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. IV. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as No 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14: 167–168
132. Zankl H, Zang KD (1980) Correlation between clinical and cytogenetical data in 180 human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1: 351-356
133. Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Dufour H, Figarella D, Vollot F, Grisoli F, Vagner- Capodano AM (1998) Contribution of cytogenetics and FISH in the diagnosis of meningiomas. A study of 189 tumors. *Ann Genet* 41: 164-175
134. Zulch KJ (1979) International Histological Classification of Tumors (World Health Organization, Geneva), No. 21

8 Dank

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolf Ingo Steudel, Direktor der Neurochirurgie des Uniklinikums des Saarlandes für die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens und die Bereitstellung des für diese Arbeit unerlässlichen Tumormaterials.

Frau PD Dr. Steffi- Urbschat (AG Neuroonkologie) und Dr. Ralf Ketter für die interessante Aufgabenstellung, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, und die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussions- und Hilfsbereitschaft auch weit über diese Arbeit hinaus.

Herrn Prof. Dr. Meese für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Humangenetik Gebäude 60 des Uniklinikums des Saarlandes.

Fr. Dr. Silke Wemmert für das Einlernen in molekularbiologische Methoden, eine hilfsbereite und geduldige Betreuung und ihre stetige Unterstützung.

Den Diplomanden und der Doktoranden der Arbeitsgruppe Neuroonkologie, besonders Dipl. Biol. Mia Pöhl, Dipl. Biol. Elke Leipzig und Melanie Schmitt für das sehr angenehme Arbeitsklima und ihre immerwährende Hilfsbereitschaft.

Ulrike Lindemann, Institut für Humangenetik, für das Einarbeiten in die Zellkultur, für die Unterstützung bei dem Anfertigen der Präparate und der Vermittlung von wertvollem Wissen für den Laboralltag.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären, meinem Vater insbesondere noch für das Korrekturlesen. Sowie meiner Freundin Özlem Bürük, meinen Schwestern, Axel Sander und allen anderen Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8.1 Publikationen im Rahmen der Promotion:

Poster Publikation auf der DGNC Jahrestagung in Essen (2006):

Microdeletions and gains of 1p36 and 22qter in meningiomas detected by inter- and metaphase FISH enlarge predictive value of these markers

(Schiebel P₁, Ketter R₁, Prowald A₁, Wemmert S₁, Zang K₂, Feiden W₃, Urbschat S₁, Steudel W₁) Departments of Neurosurgery ₁, Human Genetics ₂ and Neuropathology ₃, Saarland University, D-66421 Homburg, Germany

9 Lebenslauf

Patrick Schiebel

Fliederweg 3, 69221 Dossenheim

*24.03.1979

Eltern:

Eugen Schiebel, Beruf: Dipl.- Ing. (FH) Nachrichtentechnik

† Sibylle Schiebel, geb. Wunderlich, Beruf: Drogistin

Werdegang

- | | |
|-----------|--|
| 1986-1990 | Grundschule Sonnenhofschule Pforzheim |
| 1990-1999 | Theodor-Heuss-Gymnasium Pforzheim |
| 1999-2000 | Grundwehrdienst in Pfullendorf und Calw |
| 2000 | Beginn des Medizinstudiums an der Universität des Saarlandes/ Homburg |
| 2002 | Ärztliche Vorprüfung |
| 2003 | Erstes Staatsexamen |
| | Beginn der Promotion in der Neurochirurgie Homburg,
Doktorvater: Prof. Dr. W.-I. Steudel |
| 2005 | Zweites Staatsexamen |
| | Abschluss des experimentellen Teils der Promotion |
| | Praktisches Jahr an der Uniklinik in Homburg |
| 2006 | Drittes Staatsexamen |
| 2007 | Assistenzarzt in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Heidelberg,
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. A. Unterberg |