

Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung der Promotor-Hypermethylierung von *TIMP3* und *p16INK4a* in
Meningeomen und vergleichende Analyse mit zytogenetischen Merkmalen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Christina Drieß

geboren am 27.01.1987 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	IV
Verschlüsselung der Tumorlokalisationen	VI
Zusammenfassung/Summary	VII
1. Einleitung	1
1.1 Meningeome	1
1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klassifikation und Grading von Meningeomen.....	2
1.1.2.1 WHO-Grad I: Benigne Meningeome.....	4
1.1.2.2 WHO-Grad II: Atypische Meningeome.....	4
1.1.2.3 WHO-Grad III: Anaplastische Meningeome.....	5
1.1.3 Operative Therapie.....	6
1.1.4 Chromosomale Veränderungen.....	6
1.1.4.1 Chromosom 22.....	6
1.1.4.2 Chromosom 1.....	8
1.1.4.3 Chromosom 9.....	10
1.1.4.4 Progressionsabhängige genetische Veränderungen.....	11
1.2 Epigenetik	12
1.2.1 Epigenetische Modifikationen.....	12
1.2.2 Theorie der Krebsentstehung und epigenetische Mechanismen.....	14
1.2.2.1 Epigenetische Mechanismen der Krebsentstehung.....	15
1.2.3 Hypermethylierungsstudien in Meningeomen.....	19
1.2.3.1 Hypermethylierung des <i>TIMP3</i> -Promotors.....	22
1.2.3.2 Hypermethylierung des <i>p16/INK4a</i> -Promotors.....	23
1.3 Fragestellung	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Substanzen, Puffer und Geräte.....	28
2.1.2 Patientenpopulation.....	29
2.1.2.1 Lokalisationsbestimmung.....	33
2.1.2.2 FISH-Analysen.....	35
2.2 Methodik	42

2.2.1 DNA-Gewinnung.....	42
2.2.1.1 Konventionelle DNA-Isolierung nach Müllenbach et al. (1989).....	42
2.2.1.2 DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA Mini Kit.....	42
2.2.1.3 DNA-Isolierung aus peripherem Vollblut.....	43
2.2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen.....	44
2.2.2 Prinzip der Bisulfitkonversion genomischer DNA.....	44
2.2.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.2.4 Methylierungs-Sensitive Polymerasekettenreaktion.....	47
2.2.4.1 Primerdesign.....	47
2.2.4.2 Durchführung der MS-PCR.....	50
2.2.5 Agarosegelelektrophorese.....	51
2.2.6. Statistische Methoden.....	52
3. Ergebnisse.....	53
3.1 Methylierungsstatus.....	56
3.1.1 Verteilung der WHO-Grade.....	56
3.1.2 Lokalisationsverteilung.....	57
3.1.3 Vergleich mit FISH-Analysen.....	57
3.2 Methylierungsanalysen des <i>TIMP3</i>-Promotors.....	59
3.2.1 Verteilung der WHO-Grade.....	60
3.2.2 Lokalisationsverteilung.....	61
3.2.3 Vergleich mit FISH-Analysen.....	61
3.3 Methylierungsanalysen des <i>p16INK4a</i>-Promotors.....	63
3.3.1 Verteilung der WHO-Grade.....	63
3.3.2 Lokalisationsverteilung.....	64
3.3.3 Vergleich mit FISH-Analysen.....	65
3.4 Epi- und Zytogenetische Veränderungen in der Meningeomprogression.....	67
3.4.1 WHO-Grade.....	68
3.4.2 Zytogenetische Veränderungen.....	68
3.4.3 Deletionen und Rezidivverhalten.....	68
3.4.4 Epigenetische Veränderungen.....	68
3.4.5. Betrachtung ausgewählter Fälle.....	69
4. Diskussion.....	70
4.1 Allgemeine Erkenntnisse.....	70
4.2 Methylierung allgemein.....	74
4.3 Hypermethylierung des <i>TIMP3</i>-Promotors.....	76

4.4 Hypermethylierung des <i>p16INK4a</i>-Promotors	80
4.5 Progression zyto- und epigenetischer Veränderungen	83
4.6 Ausblick	86
4.6.1 Epigenetische Veränderungen als Progressionsmarker.....	86
4.6.2 Neue Therapieansätze durch die epigenetische Forschung.....	86
4.6.3 Epigenetische Klassifizierung von Meningeomen.....	87
4.6.4 Weitere Forschungsansätze auf Basis der vorliegenden Arbeit.....	88
5. Literaturverzeichnis	90
6. Abbildungsverzeichnis	101
7. Publikationen und Vorträge	102
8. Danksagung	103
9. Curriculum Vitae	104
10. Tabellenanhang	105

Verzeichnis der Abkürzungen

<i>ADAM23</i>	A-disintegrin-and-metalloproteinase-domain-23-Gen
<i>ALPL</i>	Alkalische Phosphatase
<i>APC</i>	Adenomatous-polyposis-coli-Gen
<i>APM</i>	abgeleitet von: Affected by Papillomavirus-DNA integration in ME180 cells
<i>ATG</i>	Adenosin-Thymin-Guanosin (= Startsequenz für die Transkription)
<i>bp</i>	Basenpaare
<i>BRCA1</i>	BReast CAncer 1-Gen
<i>CACNA1</i>	Voltage-dependent-calcium-channel-alpha-1-Gen
<i>CASP8</i>	kodiert für Caspase 8
<i>CCT</i>	Cranial Computertomographie
<i>CDH1</i>	Cadherin 1 (kodierend für E-Cadherin)-Gen
<i>CDK</i>	Cyclin-dependent-kinase
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Genlokus <i>p16INK4</i> und <i>p14ARF</i>)
<i>CDKN2B</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (Genlokus <i>p15INK4</i>)
<i>CDKN2C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (Genlokus <i>p18INK4</i>)
<i>CpG</i>	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
<i>DAL-1</i>	Differentially-Expressed-in-Adenocarcinoma-of-the-Lung
<i>DAPK1</i>	Death-associate-protein-kinase-1-Gen
<i>DCC</i>	Deleted-in-colorectal-cancer-gene
<i>DLC1</i>	Deleted-in-Liver-Cancer-1-Gen
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>DNS/DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure / Desoxyribonukleinacid
<i>DNMT</i>	DNA-Methyltransferase
<i>dNTP</i>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraacetat
<i>ESR1</i>	Estrogen-Receptor-1-Gen
<i>EtOH</i>	Ethanol
<i>EZM</i>	Extrazellulärmatrix
<i>GFAP</i>	Glial fibrillary acidic protein = Saures Gliafaserprotein
<i>GLUT 1</i>	Glucose-Transporter-Protein
<i>GPS</i>	Genetischer Progressions-Score
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase-P-1-Gen
<i>hMLH-1</i>	Human-mutL-homolog-1-gene
<i>HOXA</i>	regulative Gene, deren Produkte als Transkriptionsfaktoren die Genaktivität anderer, funktionell zusammenhängender Gene während der Individualentwicklung steuern (Homöogene)
<i>HPF</i>	High powered fields
<i>HSG</i>	Hintere Schädelgrube
<i>IGF2BP1</i>	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1
<i>kDa</i>	KiloDalton
<i>Lfd. Nr.</i>	Laufende Nummer
<i>LOH</i>	Loss of heterozygotie
<i>Lok.</i>	Lokalisation
<i>M</i>	Molar
<i>MDAH</i>	Mothers-against-decapentaplegic-gene
<i>MDM2</i>	Murine-double-minute-gene
<i>MEN1</i>	Multiple-Endocrine-Neoplasie-Typ-1-Gen, kodierend für Menin

<i>MGMT</i>	Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase-Gen
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MS-PCR	Methylierungs-Sensitive-PCR
<i>MTS1</i>	Multiple Tumor Supressor 1 = <i>p16Ink4</i>
<i>MTS2</i>	Multiple Tumor Supressor 2 = <i>p15INK4</i>
NaCl	Natriumchlorid
<i>NDRG2</i>	N-myc-downregulated-gene 2
<i>NF2</i>	Neurofibromatosegen 2, kodierend für Neurofibromin 2/Schwannomin
NTC	No-Template Control
OP-Nr.	Operationsnummer
Präs.	Präsentation des Tumors (Primärmeningeome oder Rezidiv)
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
<i>PENK</i>	Genprodukt: Proenkephalin-A
PET	Positronenemissionstomographie
Prim.	Primärmeningeom
pH	Pondus Hydrogenii
<i>p14ARF</i>	ARF = alternativ reading frame; Genlokus <i>CDKN2A</i>
<i>p15INK4b</i>	<i>INK4</i> = inhibitor of cyclin dependent kinase 4; Genlokus <i>CDKN2B</i>
<i>p16INK4a</i>	<i>INK4</i> = inhibitor of cyclin dependent kinase 4; Genlokus <i>CDKN2A</i>
<i>p18INK4c</i>	<i>INK4</i> = inhibitor of cyclin dependent kinase 4; Genlokus <i>CDKN2C</i>
<i>RARb</i>	Retinoic-acid-receptor-beta-Gen
<i>RASSF1A</i>	Ras-association-domain-containing-protein-1-A-gene
<i>RB1</i>	Retinoblastom-Gene (Synonym: pRb; RB), kodierend für das Retinoblastom-Protein
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T _m	Schmelztemperatur
<i>TIMP</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase
<i>THBS1</i>	Thrombospondin-1-Gen
<i>TP53</i>	Tumor-protein-53-Gen (Synonym: p53)
<i>TP73</i>	Tumor-protein-73-Gen (Synonym: p73)
TSG	Tumorsupressorgen
Tub. sellae	Tuberculum sellae
<i>UPK3A</i>	Uroplakin 3A
<i>uPa</i>	Urokinase-plasminogen-activator-gene
vgl.	Vergleiche
<i>VHL</i>	Von-Hippel-Lindau-Gen
v/v	Volume to volume
WHO	World Health Organisation
WHO nd	WHO nicht bekannt
ZNS	Zentrales Nervensystem
5mC	5-Methyldeoxycytidin
1p	Kurzer Arm von Chromosom 1
22q	Langer Arm von Chromosom 22
9p	Kurzer Arm von Chromosom 9

Verschlüsselung der Tumorlokalisationen

1	Konvexität
2	Parasagittale Region
3	Tuberculum sellae
4	Olfaktoriusrinne
5	Keilbeinflügel
6	Tentorium
7	Spinalkanal
8	Hintere Schädelgrube
9	Falx
10	Intraventrikulär
11	Petroclival

Zusammenfassung

Meningeome sind von der Arachnoidea ausgehende Tumoren mit meist benignen Eigenschaften. In ungefähr fünf Prozent der Fälle zeigen sie jedoch ein klinisch aggressives Verhalten mit erhöhtem Rezidivrisiko. Diese Tumoren frühzeitig zu erkennen ist derzeit noch nicht sicher möglich, es gibt jedoch zytogenetische Veränderungen, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Malignität einhergehen. Als solche gelten vor allem die Deletionen der kurzen Arme von Chromosom 1 und 9. Um Wachstumsverhalten und Rezidivrisiko künftig besser vorhersagen zu können, versucht man epigenetische Modifikationen als zusätzliche Prognosemarker zu identifizieren. Insbesondere die Hypermethylierung der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen wird hierbei als ein bedeutender Mechanismus vermutet.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer Promotor-Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)*, auf Chromosom 22) und *p16* (auf Chromosom 9) auf die Meningeomprogression und ihr Zusammenhang mit zytogenetischen Veränderungen untersucht werden. Hierzu wurden 67 Meningeomproben mittels Methylierungssensitiver-Polymerase-Kettenreaktion auf eine Hypermethylierung der Promotoren von *TIMP3* und *p16* untersucht. Aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe war der Methylierungsstatus von weiteren 59 Fällen bekannt, sodass insgesamt 126 Meningeome in die Auswertung einbezogen werden konnten. Für 116 Fälle war zusätzlich der chromosomale Status der Regionen 22q und 1p36 und für 117 Fälle der von 9p21 bekannt.

Eine Promotor-Hypermethylierung von mindestens einem beider Tumorsuppressorgene wurde in 32 Prozent der Meningeome (40/126) gefunden, wobei Hypermethylierungen bei *p16* häufiger auftraten (20%) als bei *TIMP3* (15%). Eine gleichzeitige Hypermethylierung beider Promotoren lag nur in zwei Prozent (3/126) der Meningeome vor und scheint somit die Ausnahme zu sein.

Im Vergleich zur weiblichen Population kamen bei Männern gehäuft Tumoren mit einer Promotor-Hypermethylierung von *p16*, mit Deletionen von 1p36 und 9p21 sowie hohen WHO-Graden vor. Dies bestätigt die bestehende Vermutung, dass vor allem in Meningeomen männlicher Patienten verschiedene, oft mit Malignität assoziierte Modifikationen akkumulieren.

Abhängig von der Meningeomlokalisierung traten Promotor-Hypermethylierungen unterschiedlich häufig auf. Am häufigsten (24%) war eine Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors an der Schädelbasis. Sie trat dort hauptsächlich bei benignen und zytogenetisch unauffälligen Meningeomen auf, während an der Konvexität eher zytogenetisch aberrante und höhergradige Meningeome

betroffen waren. Eine Hypermethylierung des *p16*-Promotors fand sich vor allem an der Konvexität.

Zwischen einer Promotor-Hypermethylierung und Deletionen von 22q und 1p konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Dagegen traten der Verlust von 9p21 und Promotor-Hypermethylierungen von *TIMP3* und *p16* tendenziell gehäuft gemeinsam auf. Dies legt einen Zusammenhang der Promotor-Hypermethylierung beider Gene mit Malignität und Progression in Meningeomen nahe. Hierfür spricht auch, dass der *p16*-Promotor in anaplastischen Meningeomen (25%) häufiger methyliert war als in benignen (20%) und atypischen (19%) Meningeomen. Eine Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors lag in je 17 Prozent der WHO-Grad-II- und -III-Tumoren und 13 Prozent der WHO-Grad-I-Tumoren vor. Bei Rezidiven (24%) trat sie doppelt so häufig auf wie bei Primärmeningeomen (12%).

Bei 14 Patienten mit Rezidiven konnte die Entwicklung zyto- und epigenetischer Merkmale während der Meningeomprogression untersucht werden. Die Analyse dieser Gruppe deutet erstmals darauf hin, dass eine Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors als früher Hinweis auf ein erhöhtes Rezidivrisiko von benignen, zytogenetisch unauffälligen Meningeomen dienen könnte.

Die verschiedenen Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Promotor-Hypermethylierung in Meningeomen einen wichtigen und vielschichtigen Pathomechanismus darstellt, dessen Komplexität jedoch noch nicht ausreichend verstanden ist. Die weitere Erforschung insbesondere von Mustern aus epi- und zytogenetischen Veränderungen auf Grundlage der hier gewonnenen Erkenntnisse könnte sich als Schlüssel zu einem besseren Verständnis der Entstehung und Progression von Meningeomen und eventuell weiteren Tumoren erweisen.

Summary

Meningiomas are tumors originating from the arachnoid with mostly benign characteristics. In five percent however they are clinically aggressive with an increased risk of recurrence. It is currently not possible to reliably identify these tumors in their early stages. But there are cytogenetic mutations associated with an increased malignancy probability, as for instance deletions on the short arms of chromosomes 1 and 9. Attempts are made to identify epigenetic mutations as additional prognostic markers in order to predict growth behavior and risk of recurrence earlier and more reliably. Particularly hypermethylation of the promoter region in tumor suppressor genes is supposed to be an important mechanism.

The aim of this study was to investigate how promoter hypermethylation of the tumor suppressor genes *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)*, on chromosome 22) and *p16* (on chromosome 9) influences the progression of meningiomas and how it is associated with cytogenetic mutations. For this purpose, we analyzed 67 samples of meningiomas for hypermethylation of the *TIMP3* and *p16* promoters, using methylation-specific polymerase chain reaction. The methylation status of 59 additional cases was available from previous studies conducted by our working group, allowing to include a total number of 126 meningiomas in the analysis. Additionally, the chromosomal status was available in 116 cases for regions 22q and 1p36 and in 117 cases for region 9p21.

Promoter hypermethylation of at least one tumor suppressor gene was found in 32 percent of meningiomas (40/126), with a higher occurrence in *p16* (20%) than in *TIMP3* (15%). A concurrent hypermethylation of both promoters occurred in only two percent (3/126) of meningiomas and thus seems to be the exception.

Compared to the female population, tumors with promoter hypermethylation of *p16*, deletions of 1p36 and 9p21 as well as high WHO grades were found more frequently in male patients. This confirms the presumption that particularly meningiomas in male patients accumulate several mutations that are often associated with malignancy.

Frequency of promoter hypermethylation varied with localization of the meningiomas. Hypermethylation of the *TIMP3* promoter was most frequent at the skull base (24%). There, it occurred mainly in benign and cytogenetically inconspicuous meningiomas. At the convexity, hypermethylation was more likely in meningiomas with cytogenetic aberrations and higher WHO grades. Hypermethylation of the *p16* promoter was found primarily at the convexity.

No association was found between promoter hypermethylation and deletions of 22q and 1p36. However, deletions of 9p12 and promoter hypermethylation of *TIMP3* and *p16* tended to occur often at the same time, suggesting an association between promoter hypermethylation of both genes with malignancy and progression of meningiomas. This conclusion is supported by the fact that hypermethylation of the *p16* promoter is more frequent in anaplastic meningiomas (25%) than in benign (20%) and atypical (19%) meningiomas. Hypermethylation of the *TIMP3* promoter was found in 17 percent of both WHO II and III tumors and 13 percent of WHO I tumors. In recurrent meningiomas it occurred twice as often as in primary meningiomas (24% vs. 12%).

We were able to analyze the development of cytogenetic and epigenetic characteristics during progression of meningiomas in 14 patients with recurrences. The analysis of this group suggests for the first time that hypermethylation of the *TIMP3* promoter could be a potential early marker for an increased risk of recurrence in benign, cytogenetically inconspicuous meningiomas.

The various results of this study point out that promoter hypermethylation in meningiomas is an important and complex pathomechanism, which is, however, not yet sufficiently understood. On the basis of our data, further investigation especially of patterns of epigenetic and cytogenetic alterations could turn out to be the key to a better understanding of development and progression in meningiomas and possibly other tumors.

1. Einleitung

1.1 Meningeome

Meningeome sind langsam wachsende, aus Arachnoidalzellen entstandene, überwiegend benigne Tumoren des zentralen Nervensystems [Riede UN 2004; Greenberg MS 2006]. Sie zählen im Allgemeinen zu den extrazerebralen Tumoren und zeigen normalerweise ein verdrängendes, nicht in das Hirngewebe infiltrierendes Wachstum. Die seltenen intrazerebralen Meningeome treten meist im Ventrikelsystem auf. Am häufigsten sind Meningeome an der Konvexität lokalisiert [Greenberg MS 2006; Ketter R 2008].

Etwa 39 Prozent der Meningeome sind symptomlos und werden oft nur zufällig durch Computer- und Magnetresonanztomographie entdeckt [Greenberg MS 2006]. Klinisch auffällige Meningeome zeigen Symptome, die durch Verdrängung und Kompression von Hirnparenchym und Hirnnerven bedingt sind, wie etwa fokale neurologische Ausfälle oder Epilepsie [Bradač GB 1990].

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Meningeome machen etwa 20 bis 30 Prozent aller primären Hirntumoren aus [Riemenschneider MJ et al. 2006, Lekan-Deprez RH et al. 1995]. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt bei Patienten mit benignen Meningeomen über 80 Prozent, bei Patienten mit atypischen und anaplastischen Meningeomen dagegen unter 60 Prozent [Marosi C et al. 2008]. Bezüglich der Inzidenz gibt es starke Schwankungen. Es werden ohne Berücksichtigung autoptischer Fälle zwischen 1,6 und 13 Fälle pro 100 000 Einwohnern angegeben [Greenberg MS 2006; Mawrin C & Perry A 2010]. Der Altersgipfel für das Auftreten von Meningeomen liegt bei Frauen in der siebten, bei Männern in der sechsten Lebensdekade, wobei Frauen 1,5- bis dreimal häufiger an Meningeomen erkranken als Männer [Riemenschneider MJ et al. 2006; Ketter R 2008]. Spinale Meningeome treten sogar zehnmal häufiger bei Frauen auf [Riemenschneider MJ et al. 2006]. Interessanterweise zeigen maligne im Unterschied zu benignen Meningeomen eine nahezu gleiche Inzidenz für Männer und Frauen [Lekan-Deprez RH 1995; Wilson CB 1994].

Die Ätiologie von Meningeomen ist noch weitgehend unbekannt, es gilt jedoch als sicher, dass eine frühere (ionisierende) Bestrahlung des Schädels mit dem gehäuftem Auftreten von Meningeomen einhergeht [Wilson CB 1994; Harrison MJ et al. 1991].

1.1.2 Klassifikation und Grading von Meningeomen

Bei Meningeomen handelt es sich meist um runde und breitbasig mit der Dura mater verbundene Neoplasien. Sie komprimieren und verdrängen in ihrem Wachstum das angrenzende Hirngewebe, zumindest die benignen Meningeome lassen sich jedoch meist scharf vom Hirnparenchym abgrenzen. Nach Exstirpation der Tumoren findet man deshalb oft eine muldenförmige Impression im angrenzenden Parenchym.

Die Einteilung von Meningeomen erfolgt nach den Kriterien der WHO in drei Grade. Diese Klassifikation ist abhängig von histologischem Subtyp, Proliferationsindex und Infiltration des Hirnparenchyms, siehe Tabelle 1 [Kleihues P et al. 2002, Mawrin C & Perry A 2010]. Wachsen Meningeome das Hirngewebe infiltrierend, ist dies häufig ein Zeichen für Malignität und ein erhöhtes Rezidivrisiko. Eine Infiltration des Schädelknochens mit angrenzender reaktiver Hyperostose findet man bei Meningeomen aller WHO-Grade [Ketter R 2008; Bradač GB et al. 1990].

Tabelle 1 nach Mawrin & Perry 2010: Grading-Kriterien für Meningeome.

Benigne Meningeome (WHO Grad I)

- Jegliche dominierende Histologie außer klarzellig, choroid, papillär oder rhabdoid
- Abwesenheit von Atypie, Hirninvansion und anaplastischen Meningeomzellen

Atypische Meningeome (WHO Grad II) (eines von zwei Hauptkriterien)

- Mitotischer Index > 4 Mitosen/10 High powered fields (HPF)¹
- Mindestens 3 der folgenden 5 Parameter:
 - Blattarchitektur (zweidimensionale Blätter mit Wirbel- und Bündelverlust)
 - Kleine Zellformationen (Zellbündel/Zellnester aus lymphozytenähnlichen Zellen mit hohem Nukleus-/Zytoplasma-Anteil)
 - Hyperzellularität
 - Makronukleoli
 - Spontane Nekrosen (z.B. nicht durch Embolisation oder Radiatio induziert)

¹ HPF (high power field): Beim Mikroskopieren mit insgesamt 400-facher Vergrößerung sichtbarer Ausschnitt eines Präparats.

Hirninfiltration bei atypischen Meningeomen

- Zungenähnliche Ausläufer des Meningeoms in das angrenzende Hirnparenchym
- Von GFAP-positivem Parenchym umgebene Insel mit Meningeomzellen

Anaplastische (maligne) Meningeome (WHO Grad III) (eines der beiden Kriterien)

- Mitotischer Index ≥ 20 Mitosen/10 HPF
- Eindeutige Anaplasie (sarkom-, karzinom- oder melanomähnliche Histologie)

Die Ursprungszellen von Meningeomen sind Zellen des äußeren Blattes der Arachnoidea und der Arachnoidalvilli, welche für die Drainage des Liquors in die duralen Sinus und Venen zuständig sind. Sie besitzen sowohl epitheliale als auch mesodermale Eigenschaften. Hieraus resultiert ein breit gefächertes histopathologisches Erscheinungsbild [Riede UN et al. 2004; Mawrin C & Perry A 2010]. Die WHO unterscheidet insgesamt 16 verschiedene histopathologische Varianten, wobei alleine das benigne Meningeom in neun histologische Subtypen eingeteilt wird, siehe Tabelle 2 [Mawrin C & A 2010].

Tabelle 2 nach Riemenschneider MJ et al. 2006: *Histologische Subtypen nach WHO-Grad*

<u>Niedriges Risiko für Rezidivbildung und aggressives Wachstum</u>	
<ul style="list-style-type: none"> - Meningotheliales Meningeom - Fibröses (fibroblastisches) Meningeom - Transitionales (gemischtes) Meningeom - Psammomatöses Meningeom - Angiomatöses Meningeom - Mikrozytisches Meningeom - Sekretorisches Meningeom - Lymphoplasmazellreiches Meningeom - Metaplastisches Meningeom 	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; background-color: #f0f0f0;">WHO GRAD I</div> </div>
<u>Erhöhte Wahrscheinlichkeit für Rezidivbildung und / oder aggressives Wachstum</u>	
<ul style="list-style-type: none"> - Atypisches Meningeom - Klarzelliges Meningeom - Choroides Meningeom 	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; background-color: #f0f0f0;">WHO GRAD II</div> </div>
<ul style="list-style-type: none"> - Rhabdoides Meningeom - Papilläres Meningeom - Anaplastisches Meningeom - Meningiome jedes Typs und Grads mit einem hohen Proliferations-Index und/oder Hirninfiltration 	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; background-color: #f0f0f0;">WHO GRAD III</div> </div>

1.1.2.1 WHO Grad I: Benigne Meningeome

Der Großteil (etwa 80%) aller Meningeome gehört zur Gruppe der benignen WHO-Grad-I-Tumoren und besitzt eine Rezidivwahrscheinlichkeit von etwa sieben bis 20 Prozent. In manchen Fällen ist es allerdings schwierig, das klinische Verhalten mittels alleiniger WHO-Grad-Bestimmung vorherzusagen [Mawrin C & Perry A 2010; Kim YJ et al. 2008].

Definitionsgemäß weisen benigne Meningeome weder eine Infiltration von Hirngewebe, noch andere Kriterien für atypische oder anaplastische Meningeome auf. Jedoch können auch diese trotz scheinbar kompletter chirurgischer Resektion rezidivieren. Von den in Tabelle 2 aufgelisteten histologischen Varianten des benignen Meningeoms stellen meningotheliale, fibromatöse und transitionale Meningeome die häufigsten Formen dar [Mawrin C & Perry A 2010]. Abbildung 1 zeigt exemplarisch histologische Aufnahmen von benignen Subtypen.

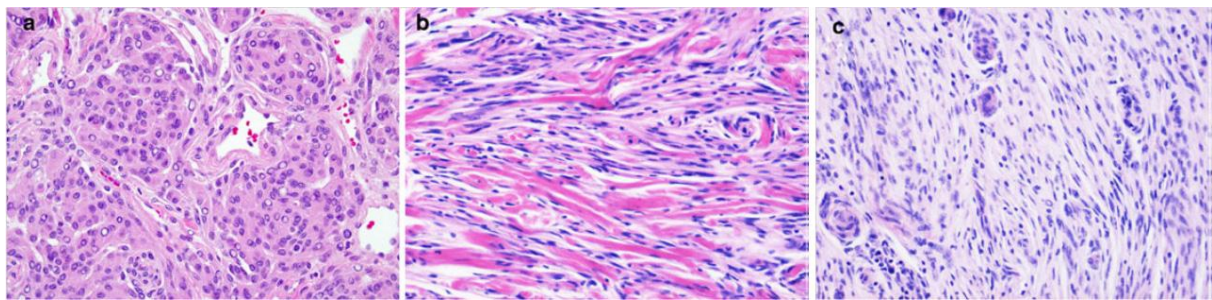
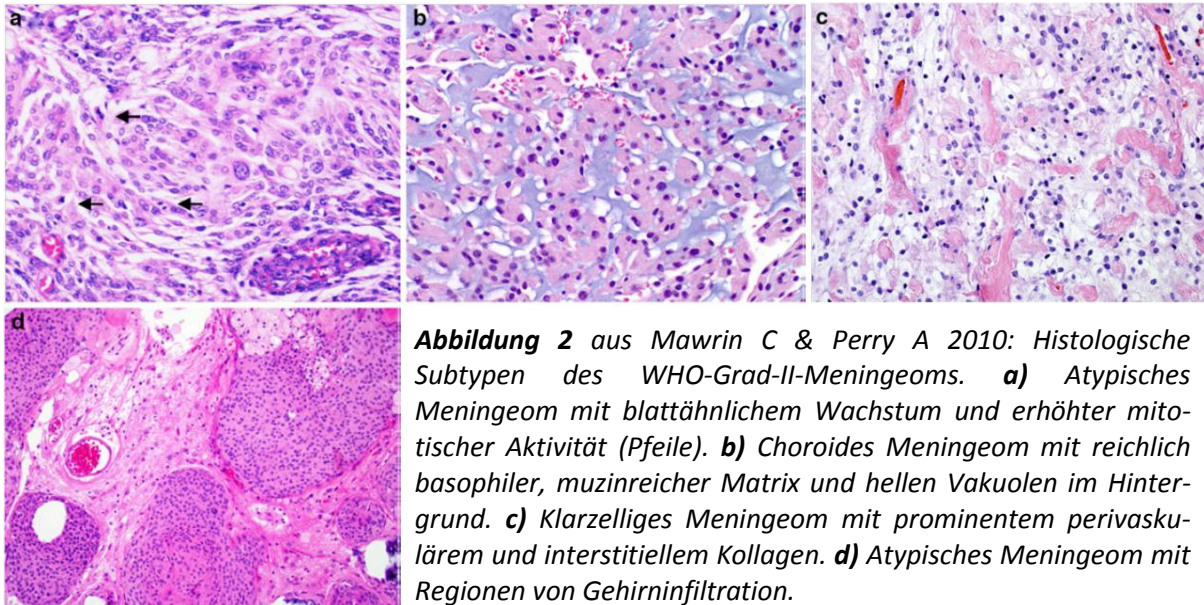


Abbildung 1 aus Mawrin C & Perry A 2010: Histologie der drei häufigsten benignen Meningeom-Subtypen. **a)** Meningotheliales Meningeom mit typischem Wirbelmuster. **b)** Fibroblastisches Meningeom mit reichlich Kollageneinlagerung. **c)** Transitionales Meningeom mit fibrösen und meningothelialen Anteilen.

1.1.2.2 WHO Grad II: Atypische Meningeome

Mit ca. 20 Prozent sind die atypischen Meningeome am zweithäufigsten [Perry A et al. 2002]. Sie zeichnen sich durch aggressiveres Wachstum und ein erhöhtes Rezidivrisiko von 29 bis 40 Prozent aus [Kim YJ et al. 2009; Ketter R 2008]. Abbildung 2 zeigt histologische Subtypen des WHO-Grad-II-Meningeoms.



1.1.2.3 WHO Grad III: Anaplastische Meningeome

Mit ein bis zwei Prozent stellen die anaplastischen Meningeome die kleinste Gruppe dar. Sie wachsen invasiv und destruktiv und besitzen die Fähigkeit zur Fernmetastasierung. Das Risiko für das Auftreten von Metastasen beträgt hier bis zu 19 Prozent, Lokalrezidive bilden sich sogar in 50 bis 78 Prozent der Fälle [Campbell BA et al. 2009; Kim YJ et al.2008]. Nach Diagnosestellung liegt das mediane Überleben von Patienten mit malignen Meningeomen bei weniger als zwei Jahren [Perry A et al. 2002]. In Abbildung 3 sind histologische Präparate des anaplastischen Meningeoms dargestellt.

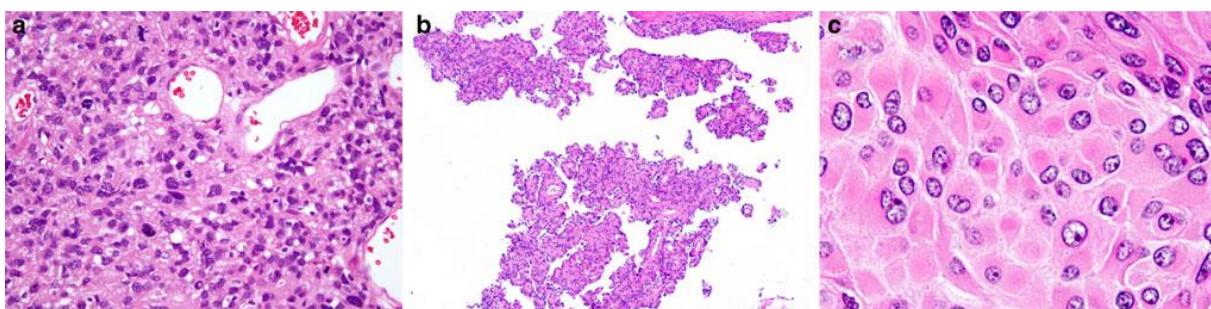


Abbildung 3 aus Mawrin C & Perry A 2010: WHO-Grad-III-Meningeome. **a)** Anaplastisches Meningeom mit sarkomartiger Erscheinung und erhöhtem mitotischen Index. **b)** Papilläres Meningeom. **c)** Rhabdoides Meningeom.

1.1.3 Operative Therapie

Der Goldstandard der Meningeomtherapie besteht in der chirurgischen Radikalresektion des Tumors. Die operative Mortalität liegt im Durchschnitt unter zwei Prozent und wird beeinflusst durch Lokalisation, Tumorgroße und Komorbidität des Patienten [Ketter R 2008]. Ziel der Operation ist die komplette Resektion des Tumors inklusive Duraansatz und betroffener Knochenanteile [Greenberg MS 2006, Bradač GB 1990]. Die Radikalität der Operation stellt den wichtigsten Faktor für die Prävention von Rezidiven dar. Lokalisation des Tumors sowie Infiltration von Gefäßen, Hirnnerven und venöser Sinus können das Ausmaß der Radikalität einschränken. Die Beurteilung der Radikalität erfolgt nach Simpson [Greenberg MS 2006; Simpson D 1957]:

Grad 1: Makroskopisch vollständige Entfernung mit Duraansatz und betroffenem Knochen.

Grad 2: Makroskopisch vollständige Entfernung und Koagulation des Duraansatzes.

Grad 3: Makroskopisch vollständige Entfernung, ohne Resektion oder Koagulation des Duraansatzes.

Grad 4: Unvollständige Entfernung mit verbleibendem Tumor in situ.

Grad 5: Dekompression mit oder ohne Biopsie.

1.1.4 Chromosomale Veränderungen

Meningeome gehören zu den auf zytogenetischer Ebene am besten untersuchten menschlichen Tumoren [Zang KD 2001]. Sie weisen charakteristische chromosomale Veränderungen auf, von denen die wichtigsten, für die vorliegende Arbeit relevanten, Veränderungen im Folgenden erläutert werden.

1.1.4.1 Chromosom 22

Bereits im Jahr 1967 fanden Zang und Singer in über der Hälfte der untersuchten Meningeome einen kompletten Verlust des Chromosoms 22. Dieser stellt die häufigste genetische Veränderung in Meningeomen dar [Zang H & Singer KD 1967]. Viele weitere Studien bestätigten diese Beobachtung, wobei mittels neuer Methoden vorrangig eine Deletion des langen Arms (22q) gefunden wurde [Dumanski JP et al. 1990; Meese E et al. 1987; Weber RG et al. 1997]. Da diese Aberration schon im frühen WHO-Stadium (Grad I) auftritt, geht man davon aus, dass sie ein initiales, für die Tumorgenese wichtiges Ereignis darstellt [Dumanski JP et al. 1987; Lindblom A et al. 1994]. Es konnte festgestellt werden, dass höhergradige Meningeome zusätzlich zu einem Verlust des Chromosoms 22 meist noch weitere Chromosomenveränderungen aufweisen [Doco-Fenzy M et al. 1993; Griffin CA et al. 1994; Lekanne-Deprez RH et al. 1995; Perry A et al. 1996]. Aus diesem Grund wird angenommen,

dass für die Progression zu den WHO Graden II und III zusätzlich weitere genetische Veränderungen notwendig sind [Lindblom A et al. 1994; Weber RG et al. 1997; Zankl H & Zang KD 1980, Zang KD 2001].

Es wird vermutet, dass sogenannte Kandidatengene auf Chromosom 22 lokalisiert sind, die bei der Deletion verloren gehen und somit die Meningeomentstehung begünstigen. Das *NF2*-Gen (Neurofibromatose-2²-Gen) auf Chromosom 22 wurde als erstes Kandidatengen in Betracht gezogen [Rouleau GA et al. 1987 und 1993; Pulst SM et al. 1993]. Das Gen liegt in der Region 22q12.2 und kodiert für das Protein Schwannomin (auch Merlin oder Neurofibromin 2 genannt), welches das Zytoskelett an Membranproteinen verankert [Wellenreuther R et al. 1995; Twist EC 1994]. Sowohl bei sporadischen als auch bei *NF2*-assoziierten Meningeomen finden sich häufig Mutationen dieses Gens, welches als ein Tumorsuppressorgen (TSG) identifiziert werden konnte [Meese E et al 1987; Dumanski JP et al 1987 und 1990; Twist EC 1994; Ketter R et al. 2001]. *NF2*-Mutationen sind bei Meningeomen aller WHO-Grade gleichermaßen zu finden. Die Häufigkeit variiert aber in den verschiedenen histologischen Subtypen und Lokalisationen [Wellenreuther R et al. 2001; Boström J et al. 1997]. Man geht deswegen davon aus, dass die Inaktivierung des Gens eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von vielen, jedoch nicht allen Meningeomen spielt und kein Zusammenhang bezüglich *NF2*-Mutation und Progression maligner Meningeome besteht [Wellenreuther R et al. 2001]. Mögliche Inaktivierungsmechanismen von *NF2* sind Deletionen, eine mittels Calpain gesteigerte Proteolyse und veränderte Methylierungsmuster [Kimura Y et al. 1998; Lomas J et al. 2001; Wellenreuther R et al. 1995]. Epigenetische Studien zu *NF2* zeigten unterschiedlich häufig Hypermethylierungen des Gens (1 bis 26%) in Meningeomen, wobei diese nicht mit hohen WHO-Graden korrelierten [Hansson CM et al. 2007; Lomas J et al. 2005].

Ein weiteres Kandidatengen auf Chromosom 22 stellt das in dieser Arbeit untersuchte *TIMP3*-Gen dar, welches in der Region 22q12.1-13.2 lokalisiert ist [Bian J et al. 1996]. TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinase) sind Inhibitoren von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und spielen zusammen mit diesen eine wichtige Rolle in der extrazellulären Homöostase. MMPs sind zinkhaltige neutrale Proteasen, zu denen unter anderem auch Kollagenasen, Gelatinasen und Metalloelastasen gehören. Sie werden in verschiedenen Tumorarten vermehrt gebildet [Apte SS et al. 1995]. Während sich *TIMP1* und *2* in Körperflüssigkeiten befinden, wird das *TIMP3*-Protein sezerniert und anschließend an die Extrazellulärmatrix (EZM) gebunden [Bachmann KE et al. 1999]. *TIMP3* spielt eine Rolle bei der MMP-Inhibition, aber auch in der Zellzyklusregulation, Differenzierung und Alterung der Zelle. Es

²**Neurofibromatose Typ 2:** Autosomal-dominante Erbkrankheit, welche zur Entwicklung von Tumoren des ZNS, wie zum Beispiel bilateralen Vestibularschwannomen und multiplen Meningeomen, prädisponiert [Rouleau et al.1993].

besitzt die Fähigkeit Tumorwachstum, Angiogenese, Invasion und Metastasierung zu unterdrücken und gehört somit zur Familie der TSG [Bachmann KE et al. 1999; Bian J et al. 1996; Anand-Apte B et al. 1996]. Eine Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors wurde in verschiedenen Tumorarten, wie zum Beispiel dem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Blasenkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und ebenso in Meningeomen gefunden [Hoque MO et al. 2008; Smith E et al. 2008; Barski D et al. 2009; Bachmann KE et al. 1999]. Erkenntnisse, die zur Hypermethylierung von *TIMP3* in Meningeomen gewonnen werden konnten, werden in Kapitel 1.2.3.1 erläutert.

1.1.4.2 Chromosom 1

Die komplette oder partielle Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) tritt als zweithäufigste zytogenetische Veränderung in Meningeomen auf [Lindblom A et al. 1994; Weber RG et al. 1997]. Im Gegensatz zur Deletion von Chromosom 22, findet man Verluste von 1p vor allem in WHO-Grad-II- und WHO-Grad-III-, aber viel seltener in WHO-Grad-I-Meningeomen. Mit zunehmendem WHO-Grad zeigt sich also ein Ansteigen der 1p-Verluste [Bello MJ et al. 1994; Boström J et al. 1997; Lindblom A et al. 1994; Sayagués JM et al. 2004; Simon M et al. 1995]. Der Anteil der 1p-Deletionen in Meningeomen vom WHO-Grad III lag zwischen 70 [Ishino S et al. 1998; Murakami M et al. 2002; Simon M et al. 1995; Weber RG et al. 1997] und 100 Prozent [Boström J et al. 1997; Müller P et al. 1999; Ketter R et al. 2007; Pfisterer WK et al. 2004]. Bei WHO-Grad-II-Meningeomen schwanken die Angaben zwischen 40 und 87 Prozent [Simon M et al. 1995; Ishino S et al. 1998; Boström J et al. 1997; Müller P et al. 1999; Weber RG et al. 1997; Murakami M et al. 2002]. In Meningeomen des WHO-Grads I waren nur in 13 bis 27 Prozent der Fälle Deletionen von 1p feststellbar [Boström J et al. 1997; Müller P et al. 1999; Murakami M et al. 2002]. Dies spricht für eine wichtige Rolle des Verlustes von 1p in der Progression der Meningeome zu höheren und aggressiveren WHO-Graden [Bello MJ et al. 1994; Boström J et al. 1997; Henn W et al. 1995; Müller P et al. 1999; Niedermayer I et al. 1997a und 1997b; Simon M et al. 1995; Weber RG et al. 1997]. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 stellt einen wichtigen prognostischen Faktor für Meningeompatienten dar. Er führt zu einem höheren Rezidivrisiko bzw. einem kürzeren rezidivfreien Intervall (30 bis 60% Rezidivrate in Meningeomen mit 1p-Verlust) [Ketter R et al. 2001 und 2007; Steudel WI et al. 1996].

Man geht - wie beim Chromosom 22 - davon aus, dass auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 ein TSG zu finden ist. Die Lokalisation des Gens wurde auf die chromosomale Region 1p34-1pter eingegrenzt [Boström J et al. 1997; Ishino S et al. 1998; Lindblom A et al. 1994; Simon M et al. 1995].

Da das Gen der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase³ (*Alpl*) in dieser Region liegt (Genlokalisierung: 1p34-1p36.1) vermutete man, dass es als mögliches Kandidatengen bzw. das Enzym Alkalische Phosphatase als Markerenzym für den 1p-Verlust in Frage kommen könnte [Müller P et al. 1999; Zang KD 2001; Niedermayer I et al. 1997b; Smith M et al. 1988]. Niedermayer et al. und Müller et al. fanden eine Korrelation von ALPL-Expressionsverlust und der Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1. Dies galt vor allem für gering differenzierte Meningeome [Müller P et al. 1999; Niedermayer I et al. 1997b]. Eine Änderung der ALPL-Aktivität ging außerdem mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit einher [Bouvier C et al. 2005]. Es ist noch immer ungeklärt, ob das *Alpl*-Gen das gesuchte Kandidatengen ist, oder bloß zufällig in der Nachbarschaft von diesem liegt und keinen Einfluss auf die Progression hat. Ebenso unklar sind die Mechanismen der Inaktivierung. Man geht davon aus, dass ein Allel durch den kompletten Verlust von 1p und das zweite durch Deletion, Mutation oder epigenetische Veränderungen des TSG inaktiviert werden könnte. Laut Zang liegt die Ursache der Inaktivierung allerdings eher in einer regulatorischen Veränderung als in einer Mikrodeletion oder Mutation [Müller P et al. 1999; Zang KD 2001]. Gesichert ist die Eignung der ALPL-Expression als Screeningmethode für eine Deletion von 1p. Sie kann zudem bei der Unterscheidung zwischen den Meningeomgraden genutzt werden [Kim YJ et al. 2006 und 2008; Müller P et al. 1999; Niedermayer I et al. 1996 und 1997a].

Als Kandidatengene wurden auch *CDKN2C* (*p18INK4c*) und *p73* untersucht. Es konnten jedoch keine Hinweise auf eine Progressionsbeteiligung dieser Gene gefunden werden [Boström J et al. 2001; Cai DX et al. 2001; Santarius T et al. 2000].

Da eine 1p-Deletion mit einem erhöhten Glukosestoffwechsel korreliert, kommt auch das auf 1p lokalisierte Gen des Glucose-Transporter-Proteins 1 (*GLUT 1*) als TSG in Betracht. Ein erhöhter Glukosestoffwechsel kann mittels Positronenemissionstomographie (PET) festgestellt werden, womit diese als nicht-invasive präoperative Untersuchungsmethode zur Beurteilung der Aggressivität von Meningeomen genutzt werden könnte [Henn W et al. 1995].

³ **Alkalische Phosphatase** : Enzym, welches vor allem im alkalischen Milieu Proteine und Nukleotide unter anderem dephosphoryliert. Vier unterschiedliche Gene kodieren für 15 verschiedene Isoenzyme, wobei die hier erwähnte Alkalische Phosphatase der gewebsunspezifischen Alkalischen Phosphatase (ALPL) oder auch Leber/Knochen/Nieren- alkalischen Phosphatase entspricht, dessen Gen in der Region 1p34-1p36.1 liegt [Ketter R 2008; Müller P et al. 1999; Niedermayer I et al. 1997b].

1.1.4.3 Chromosom 9

Die Häufigkeit kompletter bzw. partieller Verluste (9p) von Chromosom 9 steigt mit zunehmendem WHO-Grad an [Riemenschneider MJ et al. 2006; Boström J et al. 2001; Perry A et al. 2002]. Bei Patienten mit anaplastischen Meningeomen ist die Deletion von 9p21 zudem mit Malignität und kürzeren Überlebenszeiten assoziiert [Perry A et al. 2002].

In der Region 9p21 befinden sich drei TSG, welche für die Progression zu malignen Meningeomformen entscheidend sein könnten: *p16INK4a* und *p14ARF (CDKN2A)* und *p15INK4b (CDKN2B)* [Pham MH et al. 2011; Riemenschneider MJ et al. 2006]. *CDKN2A* ist in vielen Tumoren auf genetischer und epigenetischer Ebene inaktiviert. Hierzu zählen unter anderem Brust-, Blasen-, Prostata- und Ösophaguskarzinome sowie Melanome [Ortega S et al. 2002; Cairns P et al. 1995]. *CDKN2A* kodiert für die TSG *p16INK4a* und *p14ARF*. Beide TSG besitzen jeweils einen eigenen, unabhängigen Promotor. Dadurch ist es möglich, die Promotoren getrennt auf Veränderungen zu untersuchen. Die TSG bestehen jeweils aus einem unterschiedlichen ersten Exon (1 α = *p16INK4a* und 1 β = *p14ARF*) und zwei weiteren, gemeinsamen, Exons [Ortega S et al. 2002; Strachan T & Read AP 2005; Ruas M & Peters G 1998].

Sowohl *p16INK4a* als auch *p14ARF* sind negative Zellzyklusregulatoren am G1/S-Phase-Kontrollpunkt. *p16INK4a* reguliert den Zellzyklus über das Retinoblastom-Protein (*pRb*) [Saffroy R et al. 2004; Serrano M et al. 1993; Ortega S et al. 2002; Jannagathan J et al. 2008]. *p16INK4a* bindet an die katalytische Untereinheit der Kinasen CDK4 und CDK6 und verhindert die Interaktion dieser mit D-Cyclinen [Li Y et al. 1994; Serrano M et al. 1993]. Die physiologische Funktion von CDK-D-Cyclin-Komplexen ist die schrittweise Phosphorylierung von *pRb* während der G1-Phase des Zellzyklus. *pRb* liegt zu Beginn von G1 unphosphoryliert vor. Es bindet bzw. inaktiviert über 80 Proteine, darunter auch Proteine der E2F-Familie, welche für das Fortschreiten des Zellzyklus erforderlich sind. Durch Phosphorylierung von *pRb* werden die Proteine freigelassen und aktiviert, wodurch die S-Phase eingeleitet werden kann [Ortega S et al. 2002]. *p16INK4a* verhindert die Phosphorylierung von *pRb*, die Proteine bleiben gebunden und der Eintritt in die S-Phase findet nicht statt [Saffroy R et al. 2004]. *p14ARF* inhibiert mittels *MDM2* den Abbau von *p53*. In der Folge findet eine vermehrte Bildung von *p21* statt, welches den CDK2/Cyclin-E-Komplex hemmt und somit den Eintritt in die S-Phase blockiert [Horn F et al. 2005; Strachan T & Read AP 2005]. Durch genetische oder epigenetische Veränderungen der zwei beschriebenen TSG kann es aufgrund der fehlenden Negativkontrolle im Zellzyklus zu einer ungehemmten Zellteilung und Begünstigung von maligner Zellentwicklung kommen [Simon M et al. 2001; Tse JY et al. 1998].

Eine gemeinsame Deletion von *p16INK4a*, *p14ARF* und *p15INK4b* wurde in 46 Prozent der anaplastischen, drei Prozent der atypischen und in keinem der benignen Meningeomen gefunden [Boström J et al. 2001]. Die homozygote Deletion von *CDKN2A* alleine kam in einem Viertel der Grad-III-Meningeome vor [Weber RG et al. 1997]. Diese zeigten auch einen vermehrten Expressionsverlust von *p16INK4A* und *p14ARF* [Korshunov A et al. 2003; Simon M et al. 2001]. Bei Patienten mit anaplastischen Meningeomen und gleichzeitiger *CDKN2A*-Deletion konnte eine verkürzte Überlebensdauer festgestellt werden [Perry A et al. 2004]. Es wird vermutet, dass Deletionen dieser drei Gene an der Entwicklung von malignen Meningeomformen beteiligt sein könnten [Boström J et al. 2001; Pham MH et al. 2011]. Neben Deletionen und Punktmutationen scheint auch die epigenetische Mutation durch Promotor-Hypermethylierung von *CDKN2A* als Inaktivierungsmechanismus eine Rolle zu spielen. In dieser Arbeit wurde speziell die Hypermethylierung des *p16INK4a*-Promotors in Meningeomen untersucht (siehe Kap 1.2.3.2).

1.1.4.4 Progressionsabhängige genetische Veränderungen

In den meisten Meningeomen scheint der Verlust von Chromosom 22 das initiale Ereignis in der Entwicklung zu sein. Es folgen die Verluste (und seltener auch Gewinne) weiterer Chromosomen, wobei der wichtigste Schritt zur Progression wohl der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 ist. Mit zunehmendem WHO-Grad zeigen Meningeome komplexere Karyotypen und eine höhere Hypodiploidie. Die Hyperdiploidie spielt wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle [Lekanne-Deprez RH et al. 1995; Ketter R et al. 2001 und 2007; Al Saadi A et al. 1987; Perry A et al. 1996; Henn W et al. 1995; Niedermayer I et al. 1997a; Boström J et al. 1997; Leone PE et al. 1999; Lamszus K et al. 1999].

Ketter et al. entwickelten 2007 ein onkogenetisches Baummodell zur genetischen Entwicklung von Meningeomen, deren Progression sowie der Rezidiventstehung. Basierend auf diesem Modell leiteten sie einen „Genetischen Progressions Score“ (GPS) ab, wobei ein hoher GPS-Wert mit frühen Rezidiven einhergeht [Ketter R et al. 2007, Ketter R 2008].

1.2 Epigenetik

Der erstmals in den frühen 1940ern von Conrad Waddington verwendete Begriff „Epigenetik“ entstand als Verbindung der Wörter „Epigenese“ und „Genetik“. Nach Waddington ist die Epigenetik ein „Zweig der Biologie, der die ursächlichen Interaktionen zwischen Genen und ihren Produkten erforscht, die den Phänotyp entstehen lassen.“ Mittlerweile wurde die Definition eingegrenzt: Unter Epigenetik versteht man heute die „Studie der Veränderungen von Genfunktionen, die mitotisch und/oder meiotisch vererbbar sind und keine Änderung der DNA-Sequenz mit sich bringen“ [Dupont C et al. 2009]. Die moderne Epigenetik befasst sich also mit der „Variation und Vererbung von Genexpressionszuständen“ [Horsthemke B 2005] und beinhaltet im Wesentlichen Histonmodifikationen⁴ und die Methylierung von DNA-Basen, welche die Chromatinstruktur⁵ und somit auch die transkriptionelle Aktivität von Genen beeinflussen [Gioia J 2009].

In menschlichen Zellen gibt es zwei Zustände des Chromatins: locker gepacktes, transkriptionell aktives Euchromatin und dicht gepacktes, transkriptionell inaktives Heterochromatin. Etwa sieben Prozent des menschlichen Genoms liegt als konstitutionelles Heterochromatin vor, welches permanent kondensiert und transkriptionell nicht zugänglich ist. Es enthält nur sehr wenige Gene, besteht häufig aus repetitiven DNA-Abschnitten und befindet sich vor allem an den Nukleus-Organisationsregionen, dem Zentromer und den Telomeren. Als fakultatives Heterochromatin bezeichnet man ursprüngliches Euchromatin, welches durch epigenetische Modifikationen eine heterochromatische Struktur angenommen hat. Diese transkriptionelle Inaktivierung wird auch als „gene silencing“ bezeichnet und stellt einen wichtigen Mechanismus in der Epigenetik dar. Mehr als 60 Prozent des Säuger-genoms liegen aufgrund von „gene silencing“ permanent transkriptionell inaktiv vor. Hierzu zählt auch das inaktivierte X-Chromosom der Frau [Lein S & Reuter G 2005].

1.2.1 Epigenetische Modifikationen

Den wichtigsten epigenetischen Mechanismus in humanen Zellen stellt die Methylierung des fünften C-Atoms von Cytosinbasen durch DNA-Methyltransferasen dar, wodurch 5-Methylcytosin entsteht (Abbildung 4). Als Methylgruppendonator dient S-Adenosylmethionin (SAM). Im Jahr 1925 wurde das

⁴ **Histon** (griech. *Istos* = Webebaum, Gewebe): basischen Proteine, an die die negativ geladene DNA bindet [Horn F et al. 2005].

⁵ **Chromatin**: DNA plus assoziierte Histone.

5-Methyldeoxycytidin (5mC) durch Johnson und Coghill in Tuberkel-DNA entdeckt, 1948 von Hotchkiss in DNA in Kalbsthymuszellen [Doerfler W 2005]. 5-Methylcytosin spielt eine wichtige Rolle bei der langfristigen Abschaltung von Genen und der Bildung von transkriptionssuppressivem Heterochromatin [Dörfler W 2005, Meissner A 2009]. In Säugerzellen sind nur methylierte Cytosine bekannt, auf die eine Guanosinbase folgt (CpG-Dinukleotide). Diese CpG-Dinukleotide sind im menschlichen Genom weit verteilt und machen nur ein Prozent aller Genom-Basen aus. Die meisten dieser

CpGs sind in nicht-kodierenden Abschnitten der DNA zu finden, die übrigen befinden sich in Gruppen vor kodierenden Sequenzen und werden als CpG-Inseln bezeichnet. CpG-Inseln ermöglichen durch ihre typischerweise unmethylierte Form eine Transkription der auf sie folgenden Gensequenzen [Gioia J 2009].

Durch den Epigenotyp wird die Aufrechterhaltung bestimmter Genaktivitätszustände über mehrere Mitosen hinweg - auch „cellular memory“ genannt - kontrolliert. Dieses „cellular memory“ ist zwar potentiell reversibel, kann aber auch somatisch vererbt werden [Horsthemke B 2005]. Bei den DNA-Methyltransferasen unterscheidet man *de-novo*-Methyltransferasen (DNMT3A und DNMT3B), die für die Methylierung während der Embryogenese zuständig sind und die *maintenance*-Methyltransferase (DNMT1), die für die Methylierung der hemimethylierten DNA nach der Mitose verantwortlich ist [Gioia J 2009]. Die *maintenance*-Methylierung dient dabei der Aufrechterhaltung des Epigenotyps und somit dem Erhalt des „cellular memory“ [Lein S & Reuter G 2005].

Die Cytosin-Methylierung in Promotoren, die zur An- oder Abschaltung von Genen führt, und die Erkenntnis, dass in jedem Genomabschnitt und jeder Zellart spezifische Methylierungsprofile des Genoms vorherrschen können, ist für das Verständnis folgender Vorgänge von großer Bedeutung:

- Regelfunktionen während der Entwicklung und Inaktivierung eines der X-Chromosome [Meissner A 2009].
- „genetic imprinting“, bei dem zum Erhalt der monoallelen Genexpression entweder das maternale oder das paternale Allel auf den homologen Chromosomen ausgeschaltet wird [Meissner A 2009].
- Erklärungsmodelle für die Entstehung von Tumorerkrankungen [Doerfler W 2005].
- Erklärung der Pathogenese genetischer Erkrankungen, wie zum Beispiel des Beckwith-Wiedemann-Syndroms, des Prader-Willi-/Angelman-Syndroms und des Fragile-X-Syndroms, die in der Mehrzahl durch Imprintingfehler entstehen [Walter J & Paulsen M 2005].

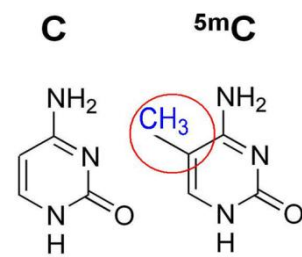


Abbildung 4 nach www.ZymoResearch.com: Cytosin (links) und 5-Methylcytosin (rechts).

Neben der Methylierung von DNA-Basen stellt auch die Modifikation von Histonen als Grundlage für die Heterochromatinbildung einen wichtigen epigenetischen Mechanismus dar. Hierbei wird die Bindungsfähigkeit der Histone durch Methylierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen, Ubiquitylierungen⁶ und Sumoylationen⁷ verstärkt oder abgeschwächt [Gioia J 2009; Lein S & Reuter G 2005].

1.2.2 Theorie der Krebsentstehung und epigenetische Mechanismen

Krebs bezeichnet umgangssprachlich „die maligne Entartung einer Zelle“ [Prawitt B & Zabel C 2005] und ist das „Ergebnis einer Abfolge von somatischen Mutationen“ [Strachan T & Read AP 2005]. Die Entwicklung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess, wobei man davon ausgeht, dass zum Beispiel zur Entstehung eines invasiven Karzinoms mehrere aufeinanderfolgende Mutationen erforderlich sind [Strachan T & Read AP 2005].

Solche Mutationen führen zu Fehlfunktionen von Genen, durch die die Zelle verschiedene, die Zellentartung begünstigende Eigenschaften erwirbt. Hierzu zählen unendliche Teilungsfähigkeit, Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Apoptosesuppression, Induktion von Angiogenese, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, invasives Wachstum und Metastasierungsfähigkeit. All diese Eigenschaften fasst man unter dem Begriff „hallmarks of cancer“ zusammen [Prawitt B & Zabel C 2005]. Die beteiligten Gene lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, nämlich in Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSG):

Onkogene sind Gene, die bei normaler Aktivität die Zellproliferation stimulieren. Sie werden in ihrer nicht mutierten, inaktiven Variante als *Proto-Onkogene* bezeichnet. Mutationen können einen Funktionsgewinn bedingen, wodurch eine übermäßige Expression resultiert. Schon die Mutation eines einzigen Allels kann zu einer Beeinträchtigung des Phänotyps führen (sogenannte „dominante Modifikation“).

Die zellulären Funktionen der Onkogene kann man in fünf große Gruppen unterteilen:

- Sezernierte Wachstumsfaktoren
- Zelloberflächenrezeptoren

⁶ **Ubiquitin** = ubiquitär in der Zelle vorhandenes Protein, das die Physiologie anderer Proteine verändert, wenn es reversibel an sie gebunden wird, alleine aber keinen Einfluss auf die Zelle besitzt [Löffler G et al. 2007].

⁷ **Sumoylation** = Anhängen von SUMO-Proteinen an das N-terminale Histondenende; **SUMO** = **S**mall **U**biquitin-like **M**odifier [Löffler G et al. 2007].

- Komponenten der intrazellulärem Signalübertragungssysteme
- DNA-bindende Proteine im Zellkern (zum Beispiel Transkriptionsfaktoren)
- Komponenten im Netzwerk der Cycline, cyclinabhängige Kinasen (CDK) und Kinaseinhibitoren, die die Zellproliferation fördern

Mechanismen der Onkogenaktivierung sind zum Beispiel Amplifizierungen, Punktmutationen und Translokationen [Strachan T & Read TA 2005]. Epigenetische Mechanismen werden im nächsten Kapitel erläutert.

Die Produkte von TSG verhindern normalerweise die Entstehung von Krebs. Ihre Funktionen sind unterschiedlich und umfassen Zellzyklusregulation, Apoptoseeinleitung oder Genomstabilisierung durch Replikationskontrolle sowie Reparatur der zellulären DNA, wodurch die Mutationsraten auf niedrigem Niveau gehalten werden. Der Two-Hit-Theorie nach Knudson zufolge sind zur Inaktivierung eines TSG Mutationen auf beiden Allelen erforderlich (sogenannte „rezessive Modifikation“). Durch das familiäre Vorliegen eines schon inaktiven TSG-Allels liegt eine Prädisposition vor, durch die eine zufällige weitere Mutation des zweiten aktiven Allels zur Entartung der Zelle ausreichen kann. Ein wichtiges Beispiel ist das Retinoblastomgen (*Rb*), welches bei sporadischem Auftreten zu unilateralen Retinoblastomen, bei familiärer Inaktivierung eines Allels zur Prädisposition für das Auftreten bilateraler Retinoblastome führt.

Mechanismen der TSG-Inaktivierung sind zum Beispiel chromosomale Instabilität, Mikrosatelliteninstabilität (vor allem bei erblich bedingtem Darmkrebs), Defekte der DNA-Reparaturmechanismen und Instabilität auf DNA-Ebene. Bei vielen Tumoren erscheint in herkömmlichen genetischen Analysen häufig ein Allel noch funktionstüchtig. Der Grund liegt häufig in einer epigenetischen Inaktivierung dieses Allels durch DNA-Methylierung, deren Feststellung besondere Nachweismethoden erfordert [Strachan T & Read TA 2005].

1.2.2.1 Epigenetische Mechanismen der Krebsentstehung

Epigenetische Mutationen können in gleichem Maße zu einer Entartung der Zelle führen wie genetische Mutationen [Jelinek J & Issa JP 2009]. Genetische und epigenetische Mutationen können hierbei auch in Kombination auftreten. Dabei ist es möglich, dass eine genetische Modifikation zu einer epigenetischen Veränderung führt [Prawitt D & Zabel B 2005]. Sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen werden bei jedem Individuum im Laufe des Lebens angehäuft und können somit zur malignen Entartung von Zellen führen [Jelinek J & Issa JP 2009]. Tumorzellen zeigen im Vergleich zu normalen Zellen Unterschiede im epigenetischen Muster [Feinberg & Vogelstein 1983]. Hierbei spielen vor allem Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen eine Rolle [Doerfler

W 2005]. Änderungen im DNA-Methylierungsmuster können zur Hypo- oder Hypermethylierung führen. Bei Promotoren führt eine Hypermethylierung zur Inaktivierung/Expressionsverminderung, eine Hypomethylierung zur Aktivierung/Expressionsverstärkung des nachfolgenden Gens. In Tumorzellen sind Promotoren von Onkogenen oft hypo-, Promotoren von TSG oft hypermethyliert. In beiden Fällen resultiert ein Selektionsvorteil der Zelle: Bei Aktivierung eines Onkogens durch die Stimulierung der Zellproliferation, bei Inaktivierung eines TSG meist durch den Wegfall der Zellzyklusregulation.

Hypomethylierung

In Tumoren ist das Genom normalerweise global hypomethyliert vorzufinden. Diese Hypomethylierung findet sich vor allem in repetitiven Sequenzen und Satelliten-DNA [Jelinek J & Issa JP 2009], aber auch in Promotoren von Onkogenen [Prawitt D & Zabel B 2005]. Folge dieser verminderten Methylierung können entweder die Aktivierung stillgelegter Gene, eine perizentromere Chromosomeninstabilität oder eine Aktivierung von Retrotransposons⁸ sein. Eine Promotor-Hypomethylierung von Proto-Onkogenen, wie zum Beispiel *c-myc* (im Hepatozellulären Karzinom) und *TLC1* (in chronisch lymphozytischen Leukämien), führt dann zur Entfaltung der onkogenen Wirkung [Prawitt D & Zabel B 2005].

Von Hoffmann & Schulz wurde 2005 ein Modell zur Erklärung der Hypomethylierung entwickelt. Sie gehen davon aus, dass eine gestörte Chromatinorganisation oder fehlerhafte DNMT-Expression zu einer zufälligen Hypomethylierung einzelner CpG-Inseln in stillgelegten (methylierten) Proto-Onkogenen führt, die eine partiell verminderte Transkriptionssuppression nach sich zieht. In der Folge kann der Promotor entweder remethyliert, oder durch aktive Transkription weiter demethyliert werden. Durch die konsekutive vollständige Demethylierung des Promotors wird das Proto-Onkogen zum Onkogen aktiviert und die Zelle kann maligne entarten [Prawitt D & Zabel B 2005].

Hypermethylierung

Neben der globalen Hypomethylierung findet man in vielen Tumoren eine lokale *de-novo*-Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen, die an die malignen Klone via *maintenance*-Methylierung weitergegeben wird. Diese Hypermethylierung bewirkt eine permanente Ausschaltung

⁸ **Retrotransposon:** DNA-Sequenz, die über eine RNA-Zwischenstufe unterschiedliche Positionen im Genom einnehmen kann.

der betroffenen Gene durch Verhinderung der Transkriptionsfaktorbindung und/oder der Bildung von inaktiven Chromatinstrukturen. Durch eine erneute Demethylierung kann die Inaktivierung partiell wieder rückgängig gemacht werden, wodurch sich neue Therapieoptionen für die Tumorbehandlung eröffnen [Jelinek J & Issa JP 2009, Prawitt D & Zabel D 2005, Esteller M et al. 2001].

Betrifft die Hypermethylierung Promotoren von TSG, kann dies durch deren Inaktivierung zur malignen Entartung der Zelle führen. Häufig betroffene Gene kodieren unter anderem für Zellzyklusregulatoren (*p16INK4a*, *p15INK4b*), DNA-Reparaturproteine (*MLH1*, *MGMT*, *BRCA1*), Apoptosefaktoren (*p53*, *p14ARF*, *p73*), nukleäre Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Faktoren der Zelladhäsion und Metastasierungssuppression (*CHD1*, *TIMP3*, *DAPK*), metabolische Enzyme (*GSTP1*) und den *APC/β-Catenin*-Weg [Prawitt D & Zabel B 2005, Esteller M et al. 2001]. Die Ausprägung der Hypermethylierung von CpG-Inseln ist je nach Tumorart unterschiedlich. Bei akuter myeloischer Leukämie und bei Kolon- und Hirntumoren liegt der Anteil mit zehn Prozent zum Beispiel höher als bei Tumoren von Brust, Kopf, Hals und Hoden, bei denen weniger als ein Prozent der CpG-Inseln hypermethyliert vorliegen. Die Hypermethylierungsmuster scheinen je nach Tumorart mit verschiedenen TSG assoziiert zu sein: Während beim Mamma- und Ovarialkarzinom häufig der *BRCA1*-Promotor betroffen ist, findet man beim klarzelligen Nierenzellkarzinom und bei Hämangioblastomen eher eine Hypermethylierung des *VHL*-Promotors, siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: TSG, die vorrangig in bestimmten Tumortypen hypermethyliert sind.

TSG	Tumor	Quellen
<i>p14ARF</i>	Magenkarzinom	Esteller M et al. (2001), Iida S et al. (2000)
<i>APC</i>	Kolorektales Karzinom, Magenkarzinom	Esteller M et al. (2000b, 2001), Hiltunen MO et al. (1997)
<i>BRCA1</i>	Mamma- und Ovarialkarzinome	Esteller M et al. (2000a, 2001)
<i>p73</i>	Hämatologische Malignome	Corn PG et al. (1999), Esteller M et al. (2001)
<i>p15INK4b</i>	Hämatologische Malignome	Batowa A t al. (1997), Esteller M et al. (2001), Kawano S et al. (1996), Wong IH et al. (2000)
<i>hMLH1</i>	HNPCC-assoziierte Tumoren (Kolorektales-, Endometriums- und Magenkarzinom)	Esteller M et al. (1998, 2001), Fleisher AS et al. (2000), Herman JG et al. (1998), Kane MF et al. (1997)

Interessanterweise wurden je nach Tumortyp charakteristische Kombinationen von hypermethylierten TSG gefunden. Das heißt es ergeben sich für verschiedene Tumorarten typische Methylierungsprofile, siehe Tabelle 4. Hierbei können mehrere Regulationsmechanismen der Zelle gleichzeitig betroffen sein [Esteller et al. 2001].

Tabelle 4: Beispiele für Tumorspezifische Methylierungsprofile [Esteller M et al. 2001].

Tumortyp	Methylierungsprofil
Gastrointestinale Tumoren (Magen, Kolon)	<i>p16INK4a, p14ARF, MGMT, APC, hMLH1</i>
Lunge und Tumoren im Kopf-Halsbereich	<i>DAPK, MGMT, und p16INK4a</i>
Mamma- und Ovarialkarzinome	<i>BRCA1, GSTP1, und p16INK4a.</i>
Hämatologische Malignome	<i>p73 und p15INK4b</i>

Es wurden auch Gene identifiziert, die eine Prädisposition zur Hypermethylierung aufweisen. Sie sind in einer Reihe unterschiedlicher Tumorarten häufig inaktiviert. Zu diesen Genen gehören vor allem solche, die in die DNA-Reparatur involviert sind, wie zum Beispiel *MGMT*, *p16INK4a* und *DAPK1* siehe Tabelle 5 [Esteller M et al. 2001].

Tabelle 5: Auswahl einiger TSG und Beispiele für Tumoren, in denen sie häufig hypermethyliert zu finden sind.

TSG	Tumoren mit häufiger Methylierung des Gens	Quellen
<i>p16INK4a</i>	Kolorektal-, Bronchial- und Mammakarzinome, Kopf-Hals-Tumoren	Esteller M et al. (2001), Gonzalez-Zulueta M et al. (1995), Herman JG et al. (1995), Merlo A et al. (1995), Righini CA et al. (2007)
	Zervixkarzinome	Dong SM et al. (2001), Esteller M et al. (2001), Nakashima R et al. (1999), Wong YF et al. (1999), Virmani AK et al. (2001)
	Harnblasenkarzinome	Esteller M et al. (2001), Salem C et al. (2000), Nuovo GJ et al. (1999)
	Melanome	Esteller M et al. (2001), Gonzalgo ML et al. (1997)
	Gliome	Costello JF et al. (1997), Esteller M et al. (2001)
<i>MGMT</i>	Bronchial- und Kolorektalkarzinome, Gliome, Glioblastome, Lymphome, Kopf-Halstumoren	Esteller M et al. (1999 a + b, 2001), Herfath KK et al. (1999), Sanchez-Cespedes M et al. (2000); Righini CA et al. (2007); Wemmert S et al. (2009)
<i>GPST1</i>	Mamma-, Leber-, Bronchial-, Nieren- und Prostatakarzinome,	Esteller M et al. (1998, 1999 a, 2001) , Sanchez-Cespedes M et al. (2000), Tchou JC et al. (2000), Lee WH et al. (1994)
<i>TIMP3</i>	Kopf-Halstumoren, Oligodendrogliome, Mamma-, Bronchial-, Magen und Nierenkarzinome ,	Righini CA et al. (2007), Bachmann KE et al. (1999), Hong C et al. (2003), Prawitt B & Zabel D (2005)
<i>DAPK</i>	Lymphome, Leukämie, Bronchialkarzinome	Esteller M et al. (2001), Sanchez-Cespedes M et al. (2000)

Die genauen Mechanismen der Hypermethylierung sind derzeit noch nicht komplett geklärt. Bekannt ist aber, dass die Hypermethylierung durch Proteine vermittelt wird, die auch in normalen Zellen für epigenetische Modifikationen zuständig sind. Ein Modell zur Entstehung von Hypermethylierungen wird in Abbildung 5 dargelegt.

Hypermethylierungsmodell

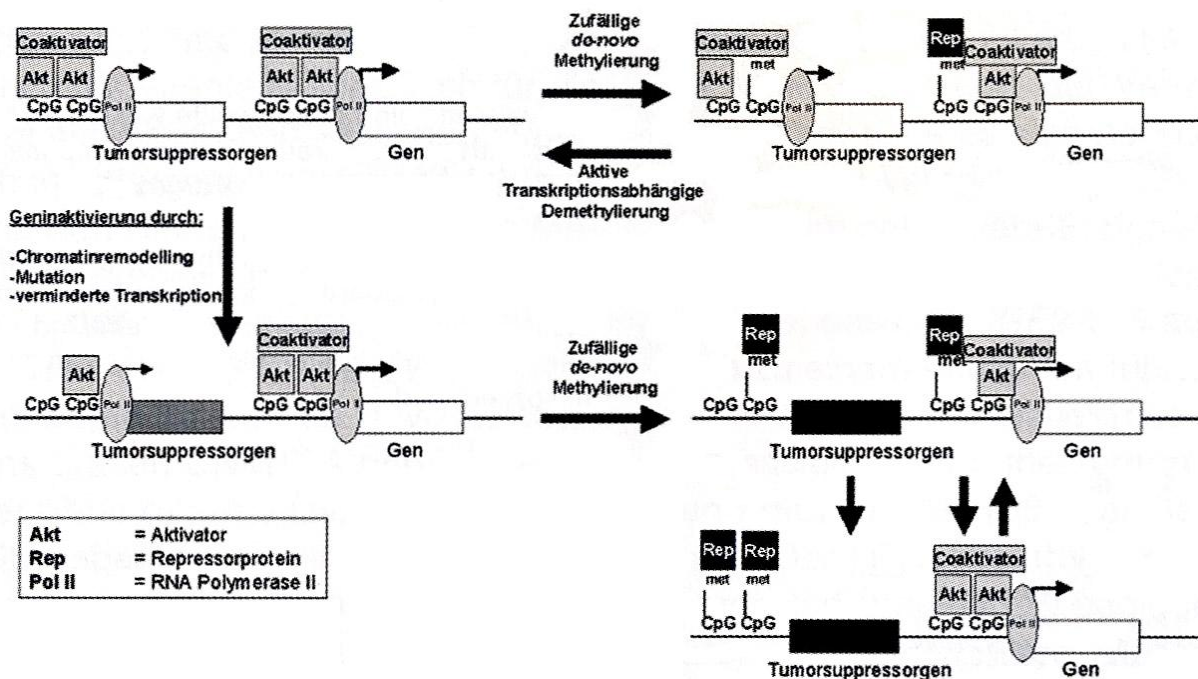


Abbildung 5 aus Prawitt D & Zabel B 2005: Hypermethylierungsmodell nach Clark & Melki (2002): Zufällig auftretende de-novo-Methylierungen einzelner CpG-Dinukleotide werden in normalen Zellen, vor allem in aktiv transkribierten Bereichen, durch Demethylierung wieder entfernt. Ist ein Gen inaktiviert oder in seiner Expression reduziert (hier ein TSG), kann durch eine Akkumulation zufälliger Methylierungen über mehrere Mitosen hinweg eine sukzessive CpG-Insel-Hypermethylierung im Promotorbereich resultieren. Erhalten wird der inaktive Status durch Chromatin-Repressorproteine (Aktive Gene = weiße Kästchen, reduzierte Genaktivität = graue Kästchen, inaktive Gene = schwarze Kästchen).

1.2.3 Hypermethylierungsstudien in Meningeomen

Meningeome gehören zu den genetisch am besten untersuchten Tumoren des Menschen. Auch in Hinsicht auf epigenetische Veränderungen stehen mittlerweile eine Reihe von Studienergebnissen zur Verfügung. Dies gilt vor allem für die Hypermethylierung von TSG. Eine detaillierte Übersicht hierzu gibt Tabelle 6.

In einer Studie von Bello und Kollegen zur Promotormethylierung von zehn TSG war in 77,5 Prozent der Meningeome mindestens ein Gen, in 25,5 Prozent sogar drei oder mehr Gene hypermethyliert [Bello MJ et al. 2004b]. Liu et al. untersuchten ebenfalls zehn TSG und fanden in der Hälfte der Fälle mindestens ein hypermethyliertes Gen, in 27 Prozent zwei oder mehr hypermethylierte Gene [Liu Y et al. 2005]. In dieser Studie war eine Hypermethylierung auch signifikant mit den WHO-Graden II und III assoziiert [Liu Y et al. 2005]. Aberrante Genmethylierungen in Meningeomen scheinen also häufige Ereignisse darzustellen, welche während der Meningeomentstehung und der Meningeomprogression in bestimmten Genen akkumulieren [Bello MJ et al. 2004b; Nakane Y et al. 2007]. Bello et al. und Lomas et al. konnten in zwei unterschiedlichen Studien zeigen, dass Meningeome mit 1p-Verlust höhere Methylierungsraten aufweisen, als solche mit 1p-Retention. Bei Bello und Kollegen traf dies vor allem für die Gene *THSB1* (47%), *TIMP3* (40%), *p73* (33%), *p14ARF* und *p16INK4a* (jeweils 23%) zu. Aber auch Meningeome mit einem 22q-Verlust wiesen erhöhte Methylierungsraten gegenüber Meningeomen mit einem normalem Karyotyp auf [Bello MJ et al. 2004b; Lomas J et al. 2004].

Für manche TSG konnten statistisch signifikante Zusammenhänge der Hypermethylierung mit unterschiedlichen Faktoren gefunden werden. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 ist zum Beispiel mit einer Methylierung von *THSB1* und *p73* assoziiert [Bello MJ et al. 2004b; Nakane Y et al. 2007; Lomas J et al. 2004]. Hypermethylierungen von *p73* [Nakane Y et al. 2007], *GTSB1* [Liu Y et al. 2005] und *p14ARF* [Kim YJ et al. 2005] korrelieren mit hohen WHO-Graden (II und III). Methylierungen des *NDRG2*-Promotors treten häufig in aggressiven Meningeomen auf [Lusis EA et al. 2005]. Nakane und Kollegen fanden bei Nicht-Konvexitätsmeningeomen eine signifikant höhere Rate an Methylierungen des *RASSF1A*-Promotors [Nakane Y et al. 2007].

Unlängst gelang es in Meningeomen ein charakteristisches Methylierungsmuster zu identifizieren, das mit aggressiverem Verhalten und erhöhtem Rezidivrisiko einhergeht. Dabei traten diese Methylierungscluster unabhängig vom histopathologischen Grad auf. Als Indikatorgene für erhöhte Aggressivität wurden *HOXA 6*, *HOXA 9*, *PENK*, *UPK3A* und *IGFBP1* angenommen [Kishida Y et al. 2012].

1.2.3.1 Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors

Die Forschungsergebnisse zur Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors fallen unterschiedlich aus. Anselmo et al. und Liu et al. fanden in keinem der von ihnen untersuchten Meningeome eine *TIMP3*-Hypermethylierung. Im Gegensatz dazu waren bei Bello und Mitarbeitern 24 Prozent, bei Barski et al. 28 Prozent der Meningeome *TIMP3*-methyliert [Anselmo NP et al. 2006; Liu Y et al. 2005; Bello MJ et

al. 2004b, Barski D et al. 2009]. Bello und Kollegen beobachteten in ihrer Methylierungsstudie eine signifikant erhöhte Methylierungsrate bei höhergradigen (Grad II und III) Meningeomen. Es zeigte sich weiterhin, dass 40 Prozent der Meningeome mit einem 1p-Verlust hypermethyliert waren (statistisch signifikant). *TIMP3* gehörte zu den am häufigsten methylierten Gene (24%) dieser Studienreihe [Bello MJ et al. 2004b].

Barski et al. untersuchten die *TIMP3*-Methylierung mittels MS-PCR und Bisulfitsequenzierung. Im ersten Teil ihrer Studie analysierten sie 22 Meningeome mittels MS-PCR und Bisulfitsequenzierung (Sequenzierungsregion: -72 bis -50, vergleiche Abbildung 16) und konnten bei keinem der Meningeome eine Methylierung finden. In einem zweiten Durchgang wurde bei 50 Meningeomen mittels Bisulfitsequenzierung die Region -18 bis +2 untersucht, welche mit dem Translationsstart überlappt und weiter distal liegt. Dabei konnten sie in 28 Prozent (14/50) der Meningeome eine Promotor-Hypermethylierung feststellen. Außerdem fanden sie signifikant höhere Methylierungsanteile in Grad-III-Meningeomen (67%) im Vergleich zu Grad-I- (17%) und Grad-II-Meningeomen (22%) ($p < 0.05$). Niedrigere *TIMP3*-mRNA-Expressionslevel korrelierten zudem mit hohen Methylierungsraten sowie mit atypischen und anaplastischen Meningeomen ($p < 0.05$). Die Arbeitsgruppe untersuchte auch den Zusammenhang einer *TIMP3*-Methylierung mit dem Verlust von 22q: 35 Prozent der Meningeomen mit -22q hatten eine Methylierung des *TIMP3*-Promotors ($p < 0.05$). Von den methylierten Fällen hatte nur ein Fall eine Retention von 22q. Barski et al. schlossen, dass ein Zusammenhang einer Methylierung von *TIMP3* mit 22q-Deletionen und Malignität besteht [Barski D et al. 2009].

1.2.3.2 Hypermethylierung des *p16INK4a*-Promotors

Auch bisherige Studien zur Hypermethylierung von *p16* zeigen uneinheitliche Ergebnisse. In sieben Studien reichte der Anteil der *p16*-Promotormethylierung von acht bis 47 Prozent [Aydemir F et al. 2012; Liu Y et al. 2005; Bello MJ et al. 2004b; Tse JY et al. 1998; Anselmo NP et al. 2006; Van Tilborg AA et al. 2006; Chen MN et al. 2004; Kim YJ et al. 2005]. Eine weitere Studie von Yin und Mitarbeitern zeigte dagegen keinen Fall von *p16*-Promotormethylierung [Yin D et al. 2002].

Trotzdem konnten bereits einige wichtige Erkenntnisse gewonnen werden: Bei Kim et al. korrelierten zum Beispiel höhere Methylierungsraten mit männlichem Geschlecht. Andere Studien zeigten erhöhte Methylierungsraten in atypischen und anaplastischen Meningeomen, allerdings ohne statistische Signifikanz [Kim YJ et al. 2005; Bello MJ et al. 2004b; Liu Y et al. 2005; Tse JY et al. 1998; Chen MN et al. 2004]. Meningeome mit LOH von *NF2* wiesen in einer Studie in 62 Prozent, solche mit Retention von *NF2* dagegen keine Methylierung von *p16INK4a* auf [Van Tilborg AA et al. 2006]. Bei

Bello und Kollegen war der *p16INK4a*-Promotor in 17 Prozent der Meningeome hypermethyliert und gehörte außerdem zu den am häufigsten methylierten Genen: Von den Meningeomen mit Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 zeigten 23 Prozent eine Hypermethylierung von *p16INK4a* (nicht statistisch signifikant) [Bello MJ et al. 2004b]. Eine Hypermethylierung von *p16INK4a* scheint zwar mit Tumorentstehung und Progression von höhergradigen Meningeomen zusammenzuhängen. Allerdings wird die Expression von *p16INK4a* nach Ansicht verschiedener Arbeitsgruppen wohl von einer Vielfalt teils unbekannter Mechanismen beeinflusst [Chen MN et al.2004; Tse JY et al. 1998; Liu Y et al. 2005].

Tabelle 6: Übersicht über Hypermethylierungsstudien in Meningeomen.

Gen	Lokus	Experimentelle Studiendaten zur Methylierung	Methode	Referenz
ADAM23	2q33	0% (0/2)	Sequ	Costa et al. 2005
APC	5q21-q22	0% (0/34)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
BRCA1	17q21	18% (6/34) ; LOH <i>NF2</i> : 0% (0/13); Ret. <i>NF2</i> : 26% (6/21) (§?) (I°: 15 II°: 3; III°: 2)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
CACNA1	17q33	0% (0/34)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
CASP8	2q33-q34	8% (8/98) ; I°: 7% (5/68); II°: 11% (3/27); III°: 0% (0/3); -1p UND -22q: 1/8; -1p: 0/8; -22q: 1/8; Ret. 1p/22q: 0/8; n.v.: 6/8	MSP/Sequ	Bello et al. 2004b
CDH1	16q22.1	59% (20/34) ; LOH <i>NF2</i> : 100% (13/13); Ret. <i>NF2</i> : 33% (7/21) (§?) (I°: 15 II°: 3; III°: 2)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
DAL-1	18q11.3	33% (20/60) extra-axiale Hirntumoren, davon 34 Meningeome	MSP/Sequ	Almeida et al. 2008
DAPK1	9q34.1	9% (9/98) ; I°: 10% (7/68); II°: 7% (2/27); III°: 0% (0/3); -1p UND -22q: 1/9; -1p: 0/9; -22q: 1/9; Ret. 1p/22q: 6/9; n.v.: 1/9	MSP/Sequ	Bello et al. 2004b
		4% (2/48) ; I°: 0% (0/16); II°: 11% (2/19); III°: 0% (0/13) n. s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp	MSP	Liu et al. 2005
		8% (1/13)	MSP	Anselmo et al. 2006
		6% (2/34) LOH <i>NF2</i> : 15% (2/13); Ret. <i>NF2</i> : 0% (0/21) (I°: 15 II°: 3; III°: 2)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
DLC1	8p22	0%(0/4) ; alle WHO I°		Hankins et al. 2008
ESR1	6q25.1	15% (15/98) ; I°: 15% (10/68); II°: 15% (4/27); III°: 33% (1/3); -1p UND -22q: 3/15; -1p: 3/15; -22q: 3/15; Ret. 1p/22q: 0/15; n.v.: 6/15	MSP/Sequ	Bello et al. 2004b
GSTP1	11q13.2	0% (0/18)	MSP	Esteller et al. 1998
		27% (13/48) ; I°: 0%(0/16); II°: 32% (6/19); III°: 54%(7/13) (§): WHO II+III; (§): Methylierung von ≥1 Genen häufiger in II° + III° als in I°; n. S.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp	MSP	Liu et al.2005
		9% (3/34) ; LOH <i>NF2</i> : 23% (3/13); Ret. <i>NF2</i> :0% (0/21)(§?) (I°: 15 II°: 3; III°: 2)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
		3% (1/36) ; n.s. Alter, Geschlecht, Histopathologie, WHO, Rez.	MSP	Aydemir et al. 2012
MEN1	11q13	18% (11/60) extra-axiale Hirntumoren, davon 34 Meningeome	MSP/Sequ	Almeida et al. 2008
MGMT	10q26	0% (0/25)	MSP	Esteller et al. 1999
		42% (8/19)	MSP/Sequ	Yin et al. 2003
		19% (14/73)	MSP	Bello et al. 2004a
		16% (16/98) ; I°: 13% (9/68); II°: 26% (7/27); III°: 0% (0/3); -1p UND -22q: 5/16; -1p: 0/16;-22q: 3/16	MSP/Sequ	Bello et al. 2004b
		6% (3/48) ; I°: 6% (1/16); II°: 5% (1/19); III°: 8% (1/13); n. s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp	MSP	Liu et al.2005
		0% (0/34)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
		8% (1/13)	MSP	Anselmo et al.

		<p>0% (0/36); I°: 69% (25/36); II°: 28% (10/36); III°: 3% (1/36)</p> <p>11% (4/36); n.s. Alter, Geschlecht, Histopathologie, WHO, Rez.</p>	<p>MSP</p> <p>MSP</p>	<p>2006</p> <p>De Robles et al. 2008</p> <p>Aydemir et al. 2012</p>
NDRG2	14q11.2	<p>31% (14/45); I°+ II°: 20% (7/25); III°: 70% (7/10); (§): niedrige mRNA-Expression assoz. mit Methyl. und aggressiveren Formen</p> <p>68% (23/34)</p>	<p>Sequ</p> <p>MSP/Sequ</p>	<p>Lusis et al. 2005</p> <p>Almeida et al. 2008</p>
NF2	22q12.2	<p>26% (23/88); I°: 31% (16/61); II°: 17% (4/24); III°: 0% (0/3);</p> <p>3% (1/34); LOH <i>NF2</i>: 0% (0/13); Ret. <i>NF2</i>: 5% (1/21); (I°: 15 II°: 3; III°: 2)</p> <p>1% (1/100)</p>	<p>MSP/Sequ</p> <p>MSP</p> <p>Pyrosequ</p>	<p>Lomas et al. 2005</p> <p>Van Tilborg et al. 2006</p> <p>Hansson et al. 2007</p>
p14ARF	9p21	<p>26% (5/19); 1 Fall mit gleichzeitiger p53-Mutation</p> <p>13% (13/98); I°: 13% (9/68); II°: 15% (4/27); III°: 0% (0/3); -1p UND -22q: 4/13; -1p: 3/13; -22q: 2/13; Ret. 1p/22q: 3/13; n.v.: 1/13</p> <p>13% (9/72); I°: 9% (9/68); II°: 20% (2/10); III°: 50% (2/4); Überexpr. von p53 und Unterexpr. von MDM2 in methyl. II° + III°; n. s.: Alter, Geschlecht, Lokal.</p> <p>4% (2/48); I°: 0% (0/16); II°: 5% (1/19); III°: 8% (1/13); n.s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp</p> <p>21% (17/81); I°: 16% (10/61); II°: 50% (6/12); III°: 13% (1/8); (§): II° + III° sowie II° ggü. I°; n. s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp</p> <p>62% (8/13)</p> <p>35% (12/34); LOH <i>NF2</i>: 62% (8/13); Ret. <i>NF2</i>: 19% (4/21) (§?); (I°: 15 II°: 3; III°: 2)</p>	<p>MSP</p> <p>MSP/Sequ</p> <p>MSP</p> <p>MSP</p> <p>MSP</p> <p>MSP</p>	<p>Yin et al. 2002</p> <p>Bello et al. 2004b</p> <p>Amatya et al. 2004</p> <p>Liu et al. 2005</p> <p>Kim et al. 2005</p> <p>Anselmo et al. 2006</p> <p>Van Tilborg et al. 2006</p>
p15INK4	9p21	<p>5% (1/19)</p> <p>4% (2/48); I°: 0% (0/16); II°: 11% (2/19); III°: 0% (0/13); n.s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp</p> <p>0% (0/34)</p>	<p>MSP</p> <p>MSP</p> <p>MSP</p>	<p>Yin et al. 2002</p> <p>Liu et al. 2005</p> <p>Van Tilborg et al. 2006</p>
p16INK4	9p21	<p>Partielle Methylierung: 22% (5/23); I°: 8% (1/12); II°: 25% (2/8); III°: 67% (2/3); Immunoblot: keine abberante Expression von <i>CDKN4</i> und <i>pRB</i></p> <p>Hypermethylierung von <i>p16</i>, <i>p15</i>, <i>p14</i> in den ersten Exonen: I°: 20% (1/5); II°: 60% (3/5); III°: 20% (1/5)</p> <p>0% (0/19)</p> <p>17% (17/98); I°: 15% (10/68); II°: 18,5% (5/27); III°: 67% (2/3) -1p UND 22q : 7/17, 23% mit -1p methyliert</p> <p>20% (10/50) mit Hypermethylierung <i>p16</i> ODER <i>pRB</i>; I°: 0% (0/20); II°: 38% (6/16); III°: 29% (4/14); beide methyliert: III°: 7% (1/14); 13 mit p16-Proteinexpression, alle unmethyliert</p> <p>47% (38/81); I°: 43% (26/61); II°: 67% (8/12); III°: 50% (4/8);</p>	<p>MS-Restr/Southern Blot</p> <p>Sequ</p> <p>MSP</p> <p>MSP/Sequ</p> <p>MSP</p> <p>MSP</p>	<p>Tse et al. 1998</p> <p>Boström et al. 2001</p> <p>Yin et al. 2002</p> <p>Bello et al. 2004b</p> <p>Chen et al. 2004</p> <p>Kim et al. 2005</p>

		(§): Geschlecht m>w; n. s.: Alter 10% (5/48) ; I°: 0% (0/16); II°: 26% (5/19); III°: 0% (0/13); n.s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp 24% (8/34) ; LOH <i>NF2</i> : 62% (8/13); Ret. <i>NF2</i> : 0% (0/21) (§?); (I°: 15 II°: 3; III°: 2) 23% (3/13) 32% (19/60) extraaxiale Hirntumoren, davon 34 Meningeome 8% (3/36) ; n.s. Alter, Geschlecht, Histopathologie, WHO, Rez.	MSP MSP MSP MSP	Liu et al. 2005 Van Tilborg et al. 2006 Anselmo et al. 2006 Almeida et al. 2008 Aydemir et al. 2012
p18INK4	1p32	0% (0/6)	MS-Restr.	Santarius et al. 2000
RARB	3p24	0% (0/34)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
RASSF1A	3q21.3	17% (2/12) alle WHO-I° 7% (6/81) ; I°: 7% (4/61); II°: 8% (1/12); III°: 13% (1/8); n. s. Alter, Geschlecht 35% (14/40) ; I°: 18% (4/22); II°: 64% (7/11); III°: 43% (3/7); (§): Nicht-Konvexitätslokalisierung	MSP MSP MSP	Horiguchi et al. 2003 Kim et al. 2005 Nakane et al. 2007
RB1	13q14.2	5% (1/19) 7% (7/98) ; I°: 7% (5/68); II°: 7% (7/27); III°: 0% (0/3); -1p UND -22q: 3/7; -1p: 1/7; -22q: 1/7; n.v.: 2/7 10% (5/48) ; I°: 0% (0/16); II°: 11% (2/19); III°: 23% (3/13); n.s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp 42% (34/81) ; I°: 43% (26/61); II°: 42% (5/12); III°: 38% (3/8); n. s.: Alter, Geschlecht 0% (0/13) 35% (12/34) ; LOH <i>NF2</i> : 46% (6/13); Ret. <i>NF2</i> : 29% (6/21); (I°: 15 II°: 3; III°: 2)	MSP MSP/Sequ MSP MSP MSP	Yin et al. 2002 Bello et al. 2004b Liu et al. 2005 Kim et al. 2005 Anselmo et al. 2006 Van Tilborg et al. 2006
TIMP3	22q12.3	24% (24/98) ; I°: 18% (12/68); II°: 41% (11/27); III°: 33% (1/3); (§): WHO; (§): -1p bzw. -1p UND -22q: 12/30; 0% (0/48) 0% (0/13) 28% (14/50) (2. Bisulfidsequenzierung), 0% (0/22) (MSP und 1. Bisulfidsequenzierung) ; I°: 15% (4/27); II°: 18% (2/11); III°: 67% (8/12); (§): III° ggü II°/I°; (§): -22q: 51% (20/39), davon 35% methyliert(7/20); (§): niedrigere Proteinlevel in II° + III°	MSP/Sequ MSP MSP MSP/Sequ/Immunobl	Bello et al. 2004b Liu et al. 2005 Anselmo et al. 2006 Barski et al. 2009
THBS1	15q15	30% (30/98) ; I°: 28% (19/68); II°: 37% (10/27); III°: 33% (1/3); (§): -1p bzw. -1p UND -22q: 14/30 15% (7/48) ; I°: 0% (0/16); II°: 32% (6/19); III°: 8% (3/13); n.s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp 0% (0/34)	MSP/Sequ MSP MSP	Bello et al. 2004b Liu et al. 2005 Van Tilborg et al. 2006

		0% (0/36) ; n.s. Alter, Geschlecht, Histopathologie, WHO, Rez.	MSP	Aydemir et al. 2012
TP53	17p13.1	42% (25/60) extraaxiale Hirntumoren, davon 34 Meningeome	MSP/Sequ	Almeida et al. 2008
		38% (18/48)	MSP/Sequ	Almeida et al. 2009
TP73	1p36.3	15% (15/98) ; I°: 13% (9/68); II°: 18,5% (5/27); III°: 33% (1/3); (§): -1p bzw. -1p UND -22q: 10/30	MSP/Sequ	Bello et al. 2004b
		21% (13/60) ; I°: 21% (7/33); II°: 20% (5/24); III°: 33% (1/3); (§): -1p: 77% (10/13);	MSP/Sequ	Lomas et al. 2004
		15% (2/13)	MSP	Anselmo et al. 2006
		0% (0/34)	MSP	Van Tilborg et al. 2006
		35% (14/40) I°: 0% (0/22); II°: 82% (9/11); III°: 71% (5/7); (§): WHO; (§): -1p: 14/14	MSP	Nakane et al. 2007
uPa	10q24	keine Korrelation von Methylierung mit WHO-Grad, MIB-1-Index, Invasivität, Größe, Lokal., peritumorales Ödem, Multiplizität, PF oder OS (I°: 26; II°: 27; III°: 12;)	MS-Restr	Kandenwein et al. 2010
VHL	3q25.3	4% (2/48) ; I°: 0% (0/16); II°: 11% (2/19); III°: 0% (0/13); n.s.: Alter, Geschlecht, Lokal., Rez., ÜLZ, Subtyp	MSP	Liu et al. 2005
		0% (0/34)	MSP	Van Tilborg et al. 2006

(§) = statistisch signifikant; (§?) = nicht eindeutig der Studie zu entnehmen; Ret. = Retention; n. s. = nicht signifikant; ÜLZ = Überlebenszeit; Lokal. = Lokalisation; OS = Overall survival; PFS = Progression-free-survival; n. v. = nicht verfügbar; -1p = LOH 1p; -22q = LOH 22q; MSP/ Sequ = MSP und Bisulfitsequenzierung; MS-Restr. = methylsensitive Restriktionsanalyse

1.3 Fragestellung

Promotor-Hypermethylierungen werden in vielen humanen Tumoren gefunden. In manchen Tumorarten können Methylierungsanalysen bestimmter TSG zur Einschätzung der Prognose und zur Vorhersage des Ansprechens auf bestimmte Therapeutika genutzt werden. Für Meningeome ist dies bisher nicht der Fall, jedoch gibt es vielversprechende Kandidaten für epigenetische Prognosemarker. Hierzu zählen die TSG *TIMP3* und *p16INK4a*. Mit der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Spielen *TIMP3*- und *p16INK4a*-Promotor-Hypermethylierungen eine Rolle in der Entstehung oder Progression von Meningeomen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Promotor-Hypermethylierung von *p16INK4a* und/oder *TIMP3* und dem WHO-Grad?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Hypermethylierung von *p16INK4a* und/oder *TIMP3* mit bestimmten chromosomalen Verlusten?

In der vorliegenden Arbeit konnte auch eine Gruppe von Erstmeningeomen und ihren zugehörigen Rezidiven analysiert werden. Hierbei war das Ziel folgende Fragen zu beantworten:

- Wie verhalten sich WHO-Grad, zyto- und epigenetische Veränderungen während der Meningeomprogression?
- Kann eine der Modifikationen als initiales Ereignis für die Progression identifiziert werden?
- Existieren Methylierungs- bzw. chromosomale Aberrationsmuster, anhand derer Meningeome in Subgruppen unterteilt werden können?
- Finden sich Kombinationen aus Veränderungen des epi- oder zytogenetischen Status und/oder der WHO-Klassifikation, anhand derer die Meningeome in Subgruppen klassifiziert werden können?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Substanzen, Puffer und Geräte

Substanz	Firma
Aqua ad iniect	Braun, Melsungen
dNTPs, PCR Grade, Sodium Salt, 100mM	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hot-Star Taq-Polymerase 5 units/ μ l	Qiagen, Hilden
MgCl ₂	Qiagen, Hilden
Proteinkinase K recombinant, PCR-Grad	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PeqGOLD Universal-Agarose	Peqlab, Erlangen
PeqGOLD Ultra Low Range DNA-Leiter II	Peqlab, Erlangen
Taq-Puffer	Qiagen, Hilden
Universal Methylated Human DNA Standard	Zymo Research, Irvine, USA

Puffer/Lösung	Bestandteile
Lysispuffer (pH 7,4)	155mM NH ₄ Cl; 10mM KHCO ₃ ; 0,1mM EDTA
SE-Puffer (pH 7,4)	75mM NaCl; 24mM EDTA
10%iger SDS-Puffer	10g SDS auf 100ml Aqua dest.
Stop-Lade-Puffer	0,1M Na ₂ EDTA, 40% Saccharose; 1 Spatelspitze Bromphenolblau pro 10ml
5x TBE-Puffer (pH 8,0)	54g Tris-Base; 27,5g Borsäure; 1,86g EDTA; mit Aqua dest. auf 1l auffüllen
TE-Puffer (pH 7,6)	10mM Tris HCl (pH 7,6); 1mM EDTA (pH 8,0)

Gerät/Software	Firma
DeVision G, Version 2.0.	Decon Science Tec.GmbH, Hohengandern
Elektrophoresekammer: Owl 800-242-5560, B3	OWL Separation Systems Inc., Portsmouth, USA
EZ DNA Methylation-GOLD Kit	Zymo Research, Irvine, USA
Kamera CU 105M, 8030102	Rainbow, Japan
Nanodrop ND-1000UV/Vis-Spektrometer	Peqlab, Erlangen
Thermocycler PTC-100/PTC-200	MJ Research, Hessisch Oldendorf
QIA DNA Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden

2.1.2 Patientenpopulation

Für die epigenetischen Untersuchungen wurde kryokonserviertes Tumorgewebe aus der von PD Dr. Ketter geführten Tumordatenbank (Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Direktor: Prof. Dr. Joachim Oertel) verwendet. Die Tumorproben wurden im Zeitraum von 1997 bis 2010 gewonnen und unmittelbar postoperativ in Kryo-Cups mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es erfolgte anschließend eine Kryoasservierung bei -80°C. Die klinischen Variablen wurden dem institutseigenen Tumorregister entnommen. Sie beinhalten Patientengeschlecht und -alter, Tumorlokalisation und zytogenetische Untersuchungsbefunde sowie die WHO-Klassifikation und die Präsentation des untersuchten Meningeoms (Erst- oder Rezidivmeningeom). Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung zur Durchführung der Untersuchungen im Sinne eines "informed consent" vor. Diese Einverständniserklärungen befinden sich in den Patientenakten. Das klinische Follow-Up der Patienten wurde in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Ein Rezidiv wurde als erneutes Auftreten des Meningeoms im CT oder MRT nach vollständiger Tumorexstirpation (Simpson Grad 1 oder 2) gewertet. Die Erhebung der histopathologischen Befunde an repräsentativen formalinfixierten Tumorproben erfolgte durch die Institute für Neuropathologie der Universitätskliniken Homburg und Heidelberg nach der aktuellen WHO-Klassifikation (Louis DN et al. 2007). Für die Tumorprobe MN 125 (weiblich) war keine WHO-Einteilung vorhanden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden epigenetische Untersuchungen an 67 Meningeomproben durchgeführt. Diese wurden unterteilt in 18 (27%) Meningeomproben von männlichen und 49 (73%) von weiblichen Patienten. Zusätzlich konnten die Daten von 59 Meningeomproben aus früheren Analysen in die Auswertung mit einbezogen werden, wodurch die Betrachtung einer größeren Fallzahl möglich war. Von diesen 59 Meningeomproben stammten 41 (70%) von Frauen, 18 (30%) von Männern. Diese zusätzlichen Daten sind in den Übersichtstabellen mit einem Stern (*) gekennzeichnet und wurden von Herrn Dennis Kraemer in einer Vorarbeit erhoben [Kraemer D 2011, Diplomarbeit]. Insgesamt wurden 126 Meningeomproben in die Auswertung einbezogen. Eine Übersicht der klinischen Variablen - mit fortlaufender Nummerierung der Fälle - bietet Tabelle 7. Geschlecht, Tumorpräsentation, mittleres Alter und WHO-Grad sind in Tabelle 8 dargestellt. Weitere ergänzende Tabellen befinden sich im Tabellenanhang dieser Arbeit.

Tabelle 7: Patientenpopulation.

Lfd. Nr.	Patient	Op-Nr.	Alter/Geschlecht	WHO-Grad	Präsentation	Lokalisation
MN 1	P 1	997/08	64/w	1	Ersttumor	1
MN 2	P 2	1018/08	53/w	1	Ersttumor	3
MN 3	P 3	1139/08	68/m	1	Ersttumor	8
MN 4	P 4	1142/08	79/w	2	Ersttumor	1
MN 5*	P 5 §	1039/08	58/m	3	Ersttumor	8
MN 6*	P 6	1368/08	70/w	1	Ersttumor	1
MN 7*	P 7	1204/08	68/m	2	Ersttumor	5
MN 8*	P 8	1407/08	88/m	3	Rezidiv	1
MN 9*	P 9	1038/08	48/w	1	Ersttumor	5
MN 10*	P 10	1587/08	52/m	3	Rezidiv	1
MN 11*	P 11	1445/08	66/m	1	Ersttumor	5
MN 12*	P 12	1449/08	56/w	2	Ersttumor	1
MN 13*	P 13	1568/08	43/m	1	Ersttumor	7
MN 14*	P 14	1575/08	47/w	1	Ersttumor	1
MN 15*	P 15	1601/08	31/m	1	Ersttumor	8
MN 16*	P 16	1671/08	73/w	1	Ersttumor	9
MN 17*	P 17 §	1746/08	57/m	2	Rezidiv	9
MN 18*	P 18	1842/08	65/m	1	Ersttumor	1
MN 19*	P 19	1792/08	81/w	1	Ersttumor	1
MN 20*	P 20	1825/08	68/m	1	Ersttumor	11
MN 21	P 21	92/09_1	63/m	3	Rezidiv	1
MN 22	P 21	92/09_2	63/m	2	Rezidiv	1
MN 23*	P 21	92/09_3	63/m	2	Rezidiv	1
MN 24	P 22	73/09	63/m	2	Ersttumor	9
MN 25	P 23	268/09	54/w	2	Ersttumor	7
MN 26	P 24	133/09	50/w	2	Ersttumor	2
MN 27	P 25	273/09	49/w	1	Ersttumor	8
MN 28	P 26	351/09	66/w	1	Ersttumor	5
MN 29	P 27	369/09	46/w	2	Ersttumor	2
MN 30	P 28	581/09	70/w	2	Ersttumor	5
MN 31	P 29	751/09	48/w	1	Ersttumor	5
MN 32	P 30	1011/09	55/w	1	Ersttumor	5
MN 33	P 31	1172/09	47/m	1	Ersttumor	5
MN 34	P 32	1180/09	60/w	1	Ersttumor	9
MN 35	P 33	1245/09	56/w	1	Ersttumor	2
MN 36	P 34	1247/09	72/w	1	Ersttumor	4
MN 37	P 35	1276/09	44/w	1	Ersttumor	5
MN 38	P 36	1336/09	63/m	2	Ersttumor	1
MN 39	P 37	1347/09	46/m	1	Ersttumor	7
MN 40	P 38	1401/09	65/w	1	Ersttumor	1
MN 41	P 39	1408/09	82/m	2	Ersttumor	2
MN 42	P 40	1418/09	73/w	1	Ersttumor	5
MN 43	P 41	1436/09	65/m	2	Ersttumor	4
MN 44	P 42	1473/09	73/w	2	Ersttumor	9
MN 45	P 43	1481/09	51/w	1	Rezidiv	5
MN 46	P 44	1630/09	54/w	2	Ersttumor	8
MN 47	P 45	229/09	50/m	1	Ersttumor	5
MN 48	P 46	1652/09	68/w	1	Ersttumor	1

MN 49	P 47	1675/09	47/w	1	Ersttumor	1
MN 50	P 48	1746/09	38/m	3	Ersttumor	2
MN 51	P 49	1822/09	45/w	1	Ersttumor	5
MN 52	P 50	1832/09	40/w	1	Ersttumor	3
MN 53	P 51	1867/09	48/w	1	Ersttumor	2
MN 54	P 52	1957/09	47/w	1	Ersttumor	9
MN 55	P 53	112/10	50/w	2	Ersttumor	1
MN 56	P 54	134/10	68/w	1	Ersttumor	6
MN 57	P 55	185/10	68/w	2	Ersttumor	1
MN 58	P 56	207/10	56/w	2	Ersttumor	3
MN 59	P 57	346/10	28/m	2	Ersttumor	6
MN 60	P 58	374/10	62/w	1	Ersttumor	4
MN 61	P 59	461/10	64/w	1	Ersttumor	8
MN 62	P 60	487/10	45/w	1	Ersttumor	5
MN 63	P 61	509/10	46/m	2	Ersttumor	1
MN 64	P 62 §	987/08	83/w	2	Ersttumor	5
MN 65	P 62 §	559/10	84/w	2	Rezidiv	5
MN 66	P 63	613/10	39/w	1	Ersttumor	11
MN 67	P 64	620/10	76/w	1	Ersttumor	2
MN 68	P 65	701/10	50/w	1	Ersttumor	1
MN 69	P 66	710/10	42/w	1	Ersttumor	9
MN 70	P 67	727/10	60/w	1	Ersttumor	8
MN 71	P 68	741/10	80/w	1	Ersttumor	2
MN 72	P 69	748/10	76/w	1	Ersttumor	8
MN 73	P 70	757/10	59/w	1	Ersttumor	5
MN 74	P 71	827/10	53/m	1	Ersttumor	1
MN 75	P 72	834/10	47/w	1	Ersttumor	2
MN 76	P 73	842/10	51/w	1	Ersttumor	1
MN 77	P 74	1745/09	50/w	2	Ersttumor	6
MN 78	P 74	876/10	51/w	2	Rezidiv	6
MN 79	P 75	939/10	72/m	2	Ersttumor	1
MN 80	P 76	555/09	41/w	2	Ersttumor	11
MN 81	P 77	205/09	80/w	1	Ersttumor	7
MN 82	P 78	1874/08	62/m	2	Rezidiv	11
MN 83*	P 79	232/03	69/w	3	Ersttumor	6
MN 84*	P 79	798/03	70/w	3	Rezidiv	5
MN 85*	P 80	1534/97	56/w	1	Ersttumor	1
MN 86*	P 80	1767/04	63/w	1	Rezidiv	1
MN 87*	P 81	828/02	38/w	1	Ersttumor	8
MN 88*	P 81	91/05	40/w	1	Rezidiv	8
MN 89*	P 82	244/05	64/m	1	Ersttumor	6
MN 90*	P 82	295/07	66/m	1	Rezidiv	6
MN 91*	P 83	1407/97	46/w	2	Ersttumor	1
MN 92*	P 83	1014/07	55/w	2	Rezidiv	2
MN 93*	P 84	904/00	68/w	2	Ersttumor	2
MN 94*	P 84	1382/08	76/w	2	Rezidiv	2
MN 95*	P 85	306/99	47/w	1	Ersttumor	5
MN 96*	P 86	230/99	9/m	1	Ersttumor	10
MN 97*	P 87	671/02	64/w	1	Ersttumor	2
MN 98*	P 88	170/01	54/w	1	Ersttumor	3

MN 99*	P 89	94/98	55/w	2	Ersttumor	4
MN 100*	P 90	899/98	58/w	2	Ersttumor	5
MN 101*	P 91	794/99	64/w	2	Ersttumor	1
MN 102*	P 92	768/98	69/m	1	Ersttumor	4
MN 103*	P 93	1214/97	44/w	1	Ersttumor	1
MN 104*	P 94	1568/97	70/w	1	Ersttumor	4
MN 105*	P 95	1939/08	40/w	1	Ersttumor	5
MN 106*	P 96	1072/99	32/w	2	Ersttumor	8
MN 107*	P 96	32/02	35/w	2	Rezidiv	1
MN 108*	P 97	2043/01	48/w	1	Ersttumor	8
MN 109*	P 98	948/00	58/w	2	Ersttumor	2
MN 110*	P 99	1258/01	52/w	1	Ersttumor	1
MN 111*	P 100	1237/04	80/w	2	Ersttumor	1
MN 112*	P 101	1210/98	65/w	2	Ersttumor	2
MN 113*	P 101	1778/99	66/w	2	1. Rezidiv	2
MN 114*	P 101	67/02	69/w	2	2. Rezidiv	9
MN 115*	P 102	379/01	61/w	3	Ersttumor	6
MN 116*	P 102	1342/01	61/w	3	1. Rezidiv	6
MN 117*	P 102	1808/01	61/w	3	2. Rezidiv	6
MN 118*	P 103	587/99	71/w	2	Ersttumor	4
MN 119*	P 103	570/02	74/w	2	Rezidiv	4
MN 120*	P 104	1812/05	56/m	2	Ersttumor	4
MN 121*	P 105 §	704/01	65/m	2	Ersttumor	1
MN 122*	P 105 §	961/07	71/m	2	1. Rezidiv	1
MN 123	P 105 §	201/09	72/m	3	2. Rezidiv	2
MN 124	P 105 §	516/10	73/m	3	3. Rezidiv	2
MN 125*	P 106	2090/01	67/w	nd	Ersttumor	3
MN 126*	P 106	1196/08	73/w	1	Rezidiv	3

* = Daten von Dennis Kraemer; § = verstorben; nd = nicht durchgeführt; U = unmethyliert; M = methyliert; -1 = Verlust; 0 = kein Verlust des Chromosomenabschnitts. Lokalisationsverschlüsselung siehe Abkürzungsverzeichnis.

Tabelle 8: Übersicht über die Patientenpopulation.

		Alter	WHO	
Meningeome gesamt	n = 126	Ø = 57,55 Jahre [SD ± 13,13]	I	66 (53%)
			II	47 (37%)
			III	12 (10%)
Weiblich	90/126 (71%)	Ø = 58,2 Jahre [SD ± 11,8]	I	52 (58%)
			II	32 (36%)
			III	5 (6%)
Männlich	36/126 (29%)	Ø = 55,9 Jahre [SD ± 15,8]	I	14 (39%)
			II	15 (42%)
			III	7 (19%)

Ersttumoren	100/126 (79%)	Ø = 57,1 Jahre [SD ± 13,2]	I	61	(62%)
			II	34	(34%)
			III	4	(4%)
Rezidive	26/126 (21%)	Ø = 64,8 Jahre [SD ± 12,5]	I	5	(19%)
			II	13	(50%)
			III	8	(31%)

Die Follow-Up-Zeit betrug 37,5 Monate (Standardabweichung 44 Monate) mit einem Minimum von null und einem Maximum von 169 Monaten. Von 100 Ersttumoren hatten bis zum 31.12.2011 insgesamt 16 (16%) Patienten mindestens ein Rezidiv erlitten. In der WHO-Klassifikation der Primärmeningeome dieser 16 Patienten wurden drei (19%) als benigne, zehn (62,5%) als atypisch und zwei (13%) als anaplastisch eingestuft. Für eines dieser Erstmeningeome war der WHO-Grad unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit lag die Rezidivrate der benignen Ersttumoren bei fünf Prozent (3/61), die der atypischen Ersttumoren bei 29 Prozent (10/34) und die der anaplastischen Ersttumoren bei 50 Prozent (2/4). In der statistischen Auswertung zeigte sich eine signifikant kürzere rezidivfreie Zeit für Patienten mit WHO-Grad II und III im Vergleich zu WHO-Grad I ($p < 0.001$), vergleiche Abbildung T1 im Tabellenanhang. Weiterhin waren die Rezidivtumoren signifikant häufiger WHO-Grad-II- und -III-Meningeome als Primärmeningeome ($p < 0.001$). Interessanterweise wurde auch bei männlichen Patienten häufiger ein hoher WHO-Grad (II und III) festgestellt als bei Frauen ($p = 0.03$, signifikant).

Meningeomlokalisierungen und chromosomale Aberrationen

Im Folgenden werden die Meningeome aus den Methylierungsanalysen nach Gesichtspunkten früherer Studien der Arbeitsgruppe zu Meningeomlokalisierung und FISH-Analysen betrachtet.

2.1.2.1 Lokalisationsbestimmung

Die Einteilung der Tumorlokalisierungen erfolgte anhand präoperativer CTs und MRTs in Konvexität, parasagittale Region, Tuberkulum sellae, Olfaktoriusrinne, Keilbeinflügel, Tentorium, Spinalkanal, hintere Schädelgrube und Falx sowie petroclival und intraventrikulär. Diese elf Lokalisierungen wurden gemäß der Einteilung von Ketter et al. in drei Gruppen zusammengefasst: Konvexität (Konvexität, parasagittale Region, Tentorium, hintere Schädelgrube, Falx), Schädelbasis (Tuberkulum sellae, Olfaktoriusrinne, Keilbeinflügel, petroclival) und Spinalkanal [Ketter R et al. 2008]. Entsprechend waren von den Meningeomen 64 Prozent an der Konvexität, 33 Prozent an der Schädelbasis und drei

Prozent im Spinalkanal lokalisiert. Intraventrikuläre Meningeome sind sehr selten und gehören zu keiner der drei Gruppen. Da in dieser Arbeit nur ein intraventrikuläres Meningeom betrachtet wurde, wird dieses in den folgenden Abbildungen nicht aufgeführt. Die untersuchten Parameter dieses Meningeoms sind den Tabellen 8 und 12 zu entnehmen (MN 96).

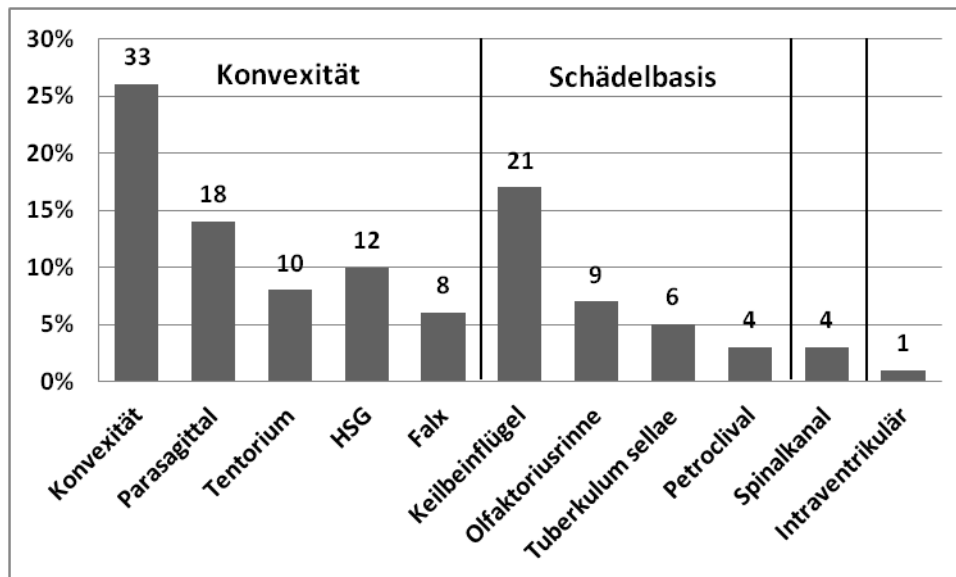


Abbildung 6: Lokalisationsverteilung (n=126). Absolutwerte über den Balken.

Etwa ein Viertel der Konvexitätsmeningeome waren Rezidive (19/81). An der Schädelbasis waren es 18 Prozent (7/39) und im Spinalkanal war keines der Meningeome ein Rezidivtumor.

Betrachtet man jeweils die Häufigkeit der drei WHO-Grade in den drei Lokalisationen so fällt auf, dass an der Schädelbasis 67 Prozent (26/39) und im Spinalkanal 75 Prozent (3/4) der Meningeome zu WHO-Grad I gehörten. An der Konvexität waren nur 46 Prozent (37/81) der Meningeome benigne. Dagegen fanden sich atypische Meningeome mit 41 Prozent am häufigsten an der Konvexität (33/81). An der Schädelbasis wurden 33 Prozent der Fälle als atypisch eingestuft (13/39). Im Spinalkanal waren sie am seltensten (1/4). Anaplastische Meningeome waren insgesamt seltener und machten 14 Prozent (11/81) der Fälle an der Konvexität und drei Prozent (1/39) der Fälle an der Schädelbasis aus. Im Spinalkanal hatte keines der Meningeome anaplastische Merkmale.

Bei der Verteilung der Lokalisationen in den drei WHO-Gruppen fällt auf, dass 92 Prozent (11/12) der anaplastischen Meningeome an der Konvexität und die restlichen acht Prozent an der Schädelbasis (1/12) lokalisiert waren. Für die benignen Meningeome zeigte sich folgende Verteilung: 56 Prozent (37/66) Konvexitätsmeningeome, 38 Prozent (25/66) Schädelbasismeningeome und fünf Prozent (3/66) spinale Meningeome. Ein benignes Meningeom war intraventrikulär lokalisiert. Die atypischen

Meningeome stammten zu 70 Prozent (33/47) von der Konvexität, zu 28 Prozent (13/47) von der Schädelbasis und nur zu zwei Prozent (1/47) aus dem Spinalkanal.

Eine Assoziation von Lokalisation und WHO-Grad konnte nicht festgestellt werden ($p=0.245$), ebenso wenig wie ein Zusammenhang der Lokalisation mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall ($p=0.563$).

2.1.2.2 FISH-Analysen

Von 126 in dieser Arbeit untersuchten Meningeomproben standen für 116 Meningeomproben zusätzlich Informationen zu Verlusten der Chromosomenabschnitte 1p36 und 22q (welches die Region 22q12.1-13.2 mit dem *TIMP3*-Gen enthält) aus früheren FISH-Studien unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung. Der Abschnitt 9p21 (als Lokalisationsregion von *p16INK4a*) wurde in 117 Proben analysiert. Die Abbildung 7 zeigt zwei repräsentative FISH-Bilder der Meningeomprobe MN 34.

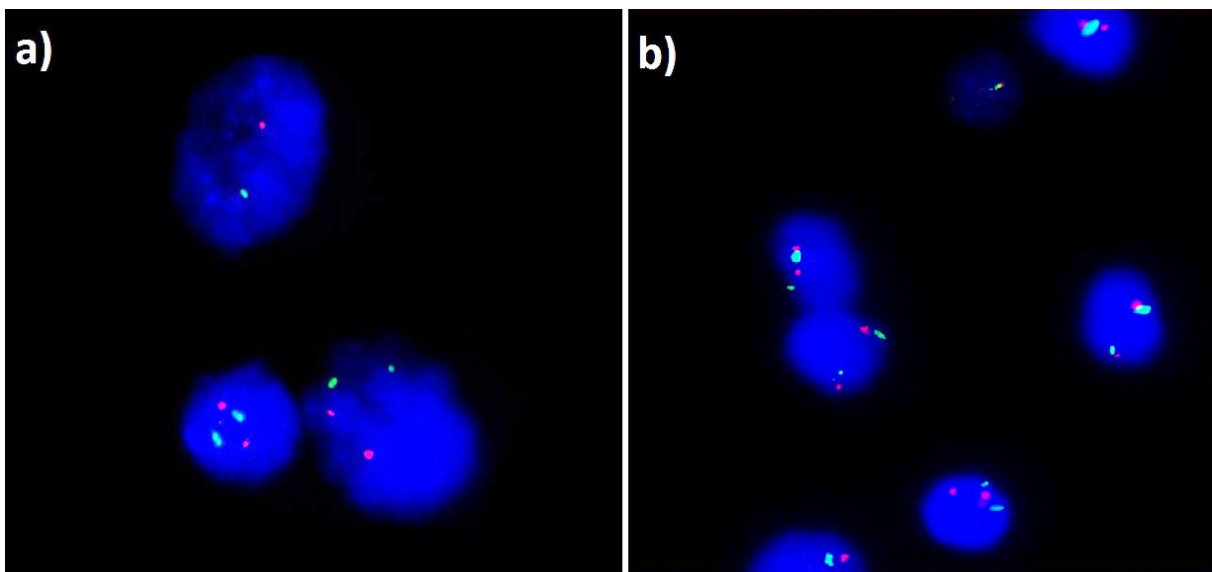


Abbildung 7: Exemplarische FISH-Aufnahmen des Falls MN 34. **a)** 1p36 (grün) und 22q (rot): In der oberen Zelle ist ein Monoploidie für beide Abschnitte zu erkennen. **b)** 9q11 (grün) und 9p21 (rot): Jeweils Diploidie für beide chromosomale Abschnitte.

Insgesamt wurden zur Auswertung der FISH-Analyse sechs zytogenetische Gruppen gebildet, vergleiche Tabelle 9. Hierbei wurden die Fälle zunächst unterteilt in solche ohne Deletion und solche mit einem Verlust von mindestens einem der untersuchten Chromosomenabschnitte. Letztere wurde anschließend zusätzlich danach aufgeteilt, welche Chromosomenabschnitte im Speziellen deletiert waren:

22q isoliert: Diese Gruppe setzt sich aus den Meningeomen zusammen, die eine isolierte Deletion von 22q und keine Deletionen von 1p36 und 9p21 hatten. Diese Meningeome mit alleiniger 22q-Deletion haben im Vergleich zu den anderen fünf zytogenetischen Gruppen das geringste Rezidivrisiko [Ketter R et al. 2007].

22q kombiniert: Diese Gruppe beinhaltet alle Fälle, die mindestens eine 22q-Deletion aufwiesen, einschließlich der Fälle, bei denen gleichzeitig auch eine 1p-und/oder 9p-Deletion vorlag. Es wurde somit nicht unterschieden, ob die Deletion isoliert oder mit weiteren Deletionen zusammen aufgetreten war. Die Gruppe diente dazu, den Zusammenhang zwischen einer Methylierung des auf dem Abschnitt 22q lokalisierten *TIMP3*-Promotors und einer Deletion von 22q analysieren zu können.

1p36-Deletion: In dieser Gruppe wurden alle Fälle zusammengefasst, die mindestens eine 1p36-Deletion aufwiesen, inklusive solcher mit eventuell gleichzeitig vorliegendem 9p21- und/oder 22q-Verlust. Die 1p36-Deletion war somit für diese Gruppe das Hauptkriterium. Eine 1p36-Deletion geht häufig mit einem 22q-Verlust einher, was höchstwahrscheinlich daran liegt, dass der 22q-Abschnitt früher in der Meningeomentwicklung verloren geht und die weiteren Chromosomendeletionen erst darauf folgen [Lekanne-Deprez RH et al. 1995, Ketter R et al. 2001 und 2007; Al Saadi A et al. 1987; Perry A et al. 1996; Henn W et al. 1995; Niedermayer I et al. 1997a; Boström J et al. 1997; Leone PE et al. 1999; Lamszus K et al. 1999]. Die 1p36-Deletion stellt einen wichtigen prognostischen Faktor dar und hat ein höheres Rezidivrisiko bzw. kürzeres rezidivfreies Intervall zur Folge [Ketter R et al. 2001 und 2007; Niedermayer I et al. 1997a; Steudel WI et al. 1996].

9p21-Deletion: Diese Gruppe enthält alle Meningeome mit einer 9p21-Deletion, ungeachtet zusätzlich vorhandener Chromosomenverluste. Sie diente der Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer Methylierung des auf diesem Abschnitt lokalisierten *p16INK4A*-Promotors und einem 9p21-Verlust. Außerdem stellt der Verlust von 9p21, der hauptsächlich in anaplastischen Meningeomen auftritt und mit kürzerem Überleben assoziiert ist, ein Progressionszeichen dar [Perry A et al. 2002; Riemenschneider MJ et al. 2006]. Aus diesem Grund war auch die Betrachtung der Hypermethylierung von *TIMP3* im Hinblick auf einen Zusammenhang dieser epigenetischen Modifikation mit Malignität und Progression interessant. Die Gruppe enthält lediglich acht Fälle, da 9p21-Deletion seltener auftreten als 22q- und 1p36-Deletionen. Dies ist bei der folgenden Auswertung zu beachten, da die Ergebnisse dieser Gruppe nicht in dem Ausmaß gewichtet werden können wie die der übrigen zytogenetischen Gruppen mit größeren Fallzahlen.

Tabelle 9: Zytogenetische Gruppen

Zytogenetische Gruppe	Einschlusskriterium
Keine Deletion	Keine der analysierten Regionen (22q,1p,9p) deletiert
Mit Deletion	Mindestens eine der drei Regionen deletiert: 22q und/oder 1p und/oder 9p
22q isoliert	NUR 22q-Deletion
22q kombiniert	Mindestens 22q-Deletion +/- Deletion von 1p und/oder 9p
1p36	Mindestens 1p-Deletion +/- Deletion von 22q und/oder 9p
9p21	Mindestens 9p-Deletion +/- Deletion von 1p und/oder 9p

In der FISH-Analyse zeigten 62 Prozent, also mehr als die Hälfte, der Meningeome mindestens eine chromosomale Deletion.

Ein isolierter 22q-Verlust trat in 21 Prozent, ein kombinierter 22q-Verlust in 53 Prozent der Fälle auf. Kombinierte 22q-Deletionen stellten in der untersuchten Patientenpopulation somit die häufigste Deletion dar. Die Deletion von 1p36 (41%) wurde am zweithäufigsten gefunden. Bei 79 Prozent (37/47) der Meningeomen waren zusätzlich zur 1p36-Deletion weitere Deletionen vorhanden. Von den acht Fällen mit einer 9p21-Deletion zeigten sechs Fälle mindestens auch eine 1p36-Deletion. Bei einem der Fälle wurde in der FISH-Analyse nur der Abschnitt 9p21 untersucht, sodass der Status von 22q und 1p36 unbekannt war. Die Ergebnisse der FISH-Analyse für die sechs Gruppen sind in Abbildung 8 dargestellt.

In der statistischen Analyse zeigte sich eine Assoziation der Deletion 1p36 sowohl mit der 22q-Deletion ($p < 0.001$) als auch mit der von 9p21 ($p = 0.017$).

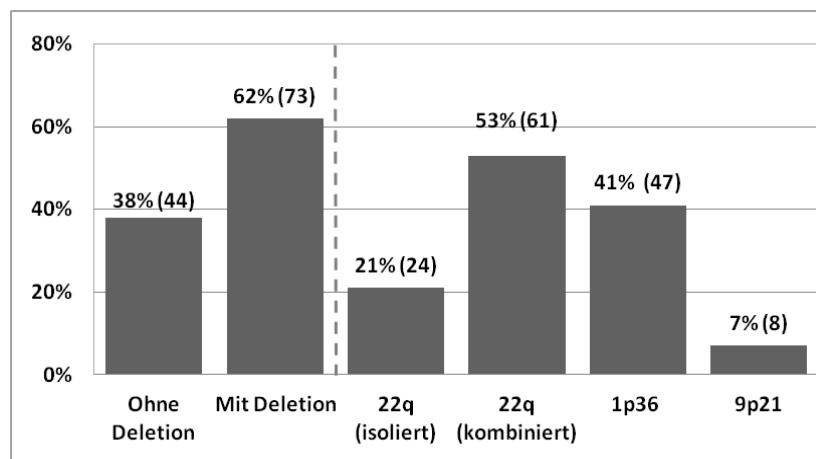


Abbildung 8: Chromosomale Deletionen in der Patientenpopulation. $n = 117$ für die Gruppe "Ohne Deletion" und die 9p21-Gruppe bzw. $n = 116$ für alle übrigen Gruppen.

Geschlecht und chromosomale Deletionen

Männer zeigten generell häufiger Deletionen als Frauen: 75 Prozent der Meningeome von männlichen Patienten und 57 Prozent der Meningeome von weiblichen Patienten wiesen mindestens eine chromosomale Deletion auf (nicht statistisch signifikant, $p=0.67$)

Isolierte (Männer 17% vs. Frauen 22%) und kombinierte (Männer 57% vs. Frauen 51%) Deletionen von 22q traten bei beiden Geschlechtern fast gleich häufig auf. Verluste von 1p36 (Männer 54% vs. Frauen 35%) und 9p21 (Männer 17% vs. Frauen 2%) waren dagegen bei Männern häufiger als bei Frauen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte nur für die Deletion von 9p21 gezeigt werden ($p=0.01$).

Präsentation und chromosomale Deletionen

Von den Ersttumoren wiesen 60 Prozent (56/93), von den Rezidiven 71 Prozent (17/24) der Fälle eine Deletion von mindestens einem Chromosomenabschnitt auf (nicht statistisch signifikant, $p=0.237$).

Ein isolierter Verlust von 22q wurde in 26 Prozent der Ersttumoren gefunden. Bei den Rezidiven war dagegen kein isolierter Verlust von 22q aufgetreten (statistisch signifikant: $p=0.003$). Der kombinierte Verlust von 22q wurde in 51 Prozent (47/93) der Ersttumoren und in 61 Prozent (14/23) der Rezidive nachgewiesen. Während ein 1p36-Verlust bei einem Drittel der Ersttumoren zu finden war, war der Anteil bei den Rezidivmeningeomen mit 70 Prozent signifikant höher ($p=0.001$). Die 9p21-Deletion trat bei nur drei Prozent (3/93) der Ersttumoren auf. Bei den Rezidiven war diese Deletion mit 21 Prozent signifikant häufiger ($p=0.001$). Meningeomen mit einer 9p21-Deletion waren in 62,5 Prozent Rezidivtumoren.

Rezidivfreies Überleben

Für die isolierte Deletion von 22q zeigte sich ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben ($p=0.049$). Bei Patienten mit Deletionen von 1p36 war das rezidivfreie Intervall dagegen signifikant kürzer als bei solchen ohne diese Deletion ($p=0.027$). Eine Tendenz zu einem verkürzten rezidivfreien Überleben zeigte sich zwar auch für die Deletion 9p21, allerdings war diese insignifikant ($p=0.179$). Die Diagramme zur rezidivfreien Zeit finden sich im Tabellenanhang.

WHO-Grad und chromosomale Deletionen

Chromosomale Deletionen treten in den drei WHO-Graden unterschiedlich häufig auf [Dumanski JP et al. 1987; Lindblom A et al. 1994; Boström J et al. 1997; Müller P et al. 1999; Ketter R et al. 2007]: Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Chromosomendeletionen und den WHO-Graden II und III ($p=0.013$), vergleiche Abbildung 9.

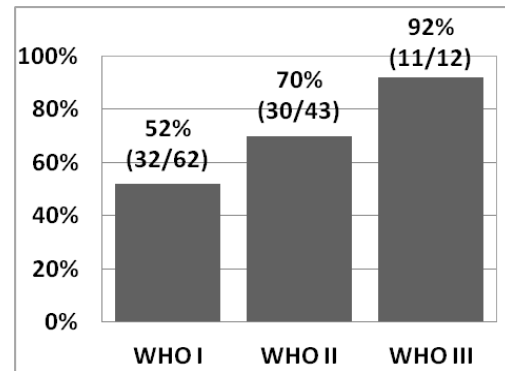


Abbildung 9: Häufigkeit der Fälle mit mindestens einer Deletion in den drei WHO-Graden.

Während atypische und benigne Meningeome einen isolierten 22q-Verlust gleich häufig aufwiesen (I: 22%; II: 23%), trat diese Veränderung bei keinem der anaplastischen Fälle auf. Die Häufigkeit kombinierter 22q-Deletionen nahm dagegen mit dem WHO-Grad zu (I: 45%; II 58%; III 72%). Gleiches galt auch für die Häufigkeit von 1p36-Deletionen (I: 29%; II: 47%; III: 82%), vergleiche Abbildung 10. Wie erwartet zeigten benigne und atypische Meningeomen kaum 9p21-Deletionen (I: 2%; II: 5%), während diese bei anaplastischen Meningeomen mit 42 Prozent häufiger auftraten.

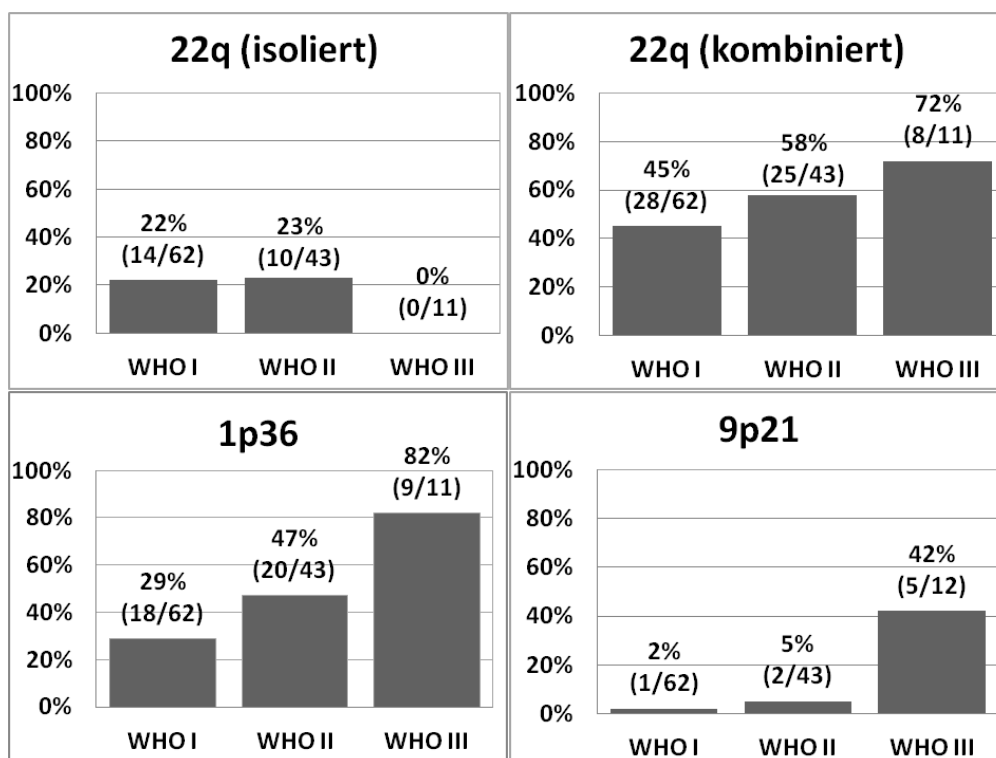


Abbildung 10: Häufigkeit der unterschiedlichen Chromosomendeletionen in den drei WHO-Graden.

Je nach chromosomaler Region treten Deletionen unterschiedlich häufig in benignen, atypischen und anaplastischen Meningeomen auf. Deswegen wurde auch die Verteilung der WHO-Grade in den sechs zytogenetischen Gruppen betrachtet:

Von den Meningeomen ohne Deletion waren 68 Prozent benigne, 30 Prozent atypisch und nur zwei Prozent anaplastisch. In der Gruppe mit Deletion dagegen waren 44 Prozent mit benignen, 41 Prozent atypischen und 15 Prozent mit anaplastischen Merkmalen.

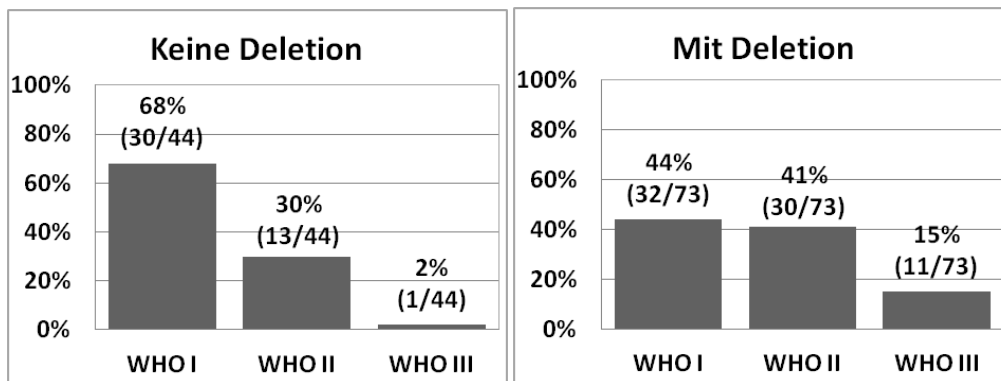


Abbildung 11: Häufigkeit der drei WHO-Grade bei den Meningeomen ohne und mit Deletion.

Meningeome mit isoliertem 22q-Verlust waren in 58 Prozent der Fälle benigne, in 42 Prozent atypische und in keinem der Fälle anaplastische Meningeome. Bei Meningeomen mit einem kombinierten 22q-Verlust war der Anteil an benignen und atypischen Fällen etwa gleich groß (46% vs. 41%), im Vergleich zum isolierten 22q-Verlust zeigten sie jedoch einen Anteil von 13 Prozent anaplastischen Meningeomen. Auch bei den Tumoren mit 1p36-Deletion waren benigne und atypische Fälle ähnlich verteilt (38% vs. 43%), der Anteil an anaplastischen Fällen betrug hier 19 Prozent. Meningeome mit 9p21-Deletion waren nur in 12,5 Prozent benigne und in 25 Prozent atypisch. Die meisten Meningeome mit 9p21-Verlust waren - wie erwartet - anaplastische Meningeome (62,5%). Hier muss allerdings wiederum die kleine Fallzahl beachten werden.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit höheren WHO-Graden (II und III) zeigte sich für die Deletionen 1p36 ($p=0.002$) und 9p21 ($p<0.001$), sowie für das Auftreten von Deletionen allgemein ($p=0.013$). Für die isolierte und kombinierte 22q-Deletion zeigte sich keine Assoziation mit dem WHO-Grad.

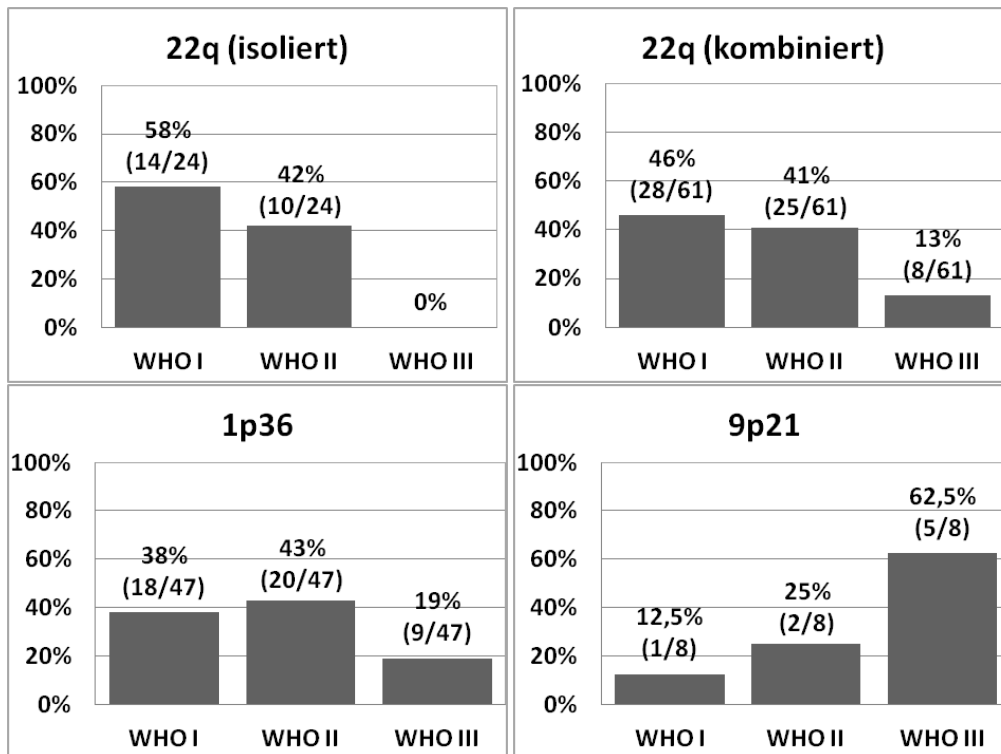


Abbildung 12: Häufigkeit der drei WHO-Grade. Die Darstellung erfolgt jeweils für die Gruppen mit isolierter und kombinierter 22q-Deletion sowie die Gruppen mit 1p36- und 9p21-Deletion.

Lokalisationsverteilung der zytogenetischen Gruppen

An der Konvexität war bei fast zwei Drittel (50/76), an der Schädelbasis bei etwa der Hälfte (19/36) der Meningeome mindestens ein Abschnitt deletiert.

Alle untersuchten Deletionen waren an der Konvexität am häufigsten: Ein isolierter 22q-Verlust war in 19 Prozent (14/75), eine kombinierte 22q-Deletion in 56 Prozent (42/75), eine 1p36-Deletion in 45 Prozent (34/75) und eine 9p21-Deletion in elf Prozent (8/76) der Fälle aufgetreten. An der Schädelbasis hatten 19 Prozent (7/36) eine isolierte 22q-Deletion, 41 Prozent (15/36) eine kombinierte 22q-Deletion und 33 Prozent (12/36) einen 1p36-Verlust. Eine 9p21-Deletion wurde nicht nachgewiesen. Bei Meningeomen im Spinalkanal war in allen Fällen (4/4) eine Deletion vorhanden: Ein Meningeom zeigte eine kombinierte Deletion von 1p36 und 22q und die übrigen drei isolierte 22q-Deletionen. Keines der spinalen Meningeome wies eine 9p21-Deletion auf. Eine Assoziation mit der Lokalisation konnte für keinen der Chromosomenverluste festgestellt werden.

2.2 Methodik

2.2.1 DNA-Gewinnung

2.2.1.1 Konventionelle DNA-Isolierung nach Müllenbach et al. (1989)

Tiefgefrorenes Tumorgewebe (über 0,3g) wurde in einer kleinen Petrischale mithilfe einer sterilisierten Schere oder einem Skalpell sorgfältig mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde das Tumorgewebe mit 4,5ml SE-Puffer, 0,5ml 10%ige SDS-Lösung und einer Spatelspitze Proteinkinase K in ein Falcon®-Gefäß überführt. Die Lösung wurde bei 56°C im Schüttelbad über ein bis zwei Tage inkubiert. Zur Beschleunigung der Zelllyse erfolgte die tägliche Zugabe einer Spatelspitze Proteinkinase K bis die Lösung klar und ohne Gewebsreste war. Nach vollständiger Zelllyse wurden zur Präzipitation der DNA 2ml 6M-NaCl-Lösung zugegeben. Das Präzipitat wurde mithilfe von 7ml Chloroform ausgeschüttelt. Zur DNA-Extraktion wurde die Lösung in einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur für 30 Minuten vorsichtig geschwenkt und anschließend die Phasen mittels Zentrifugierung (2 000rpm, 30 Minuten, 4°C) getrennt. Unter Vermeidung einer Verunreinigung durch die organische Phase erfolgte das vorsichtige Abpipettieren der wässrigen, DNA-haltigen Phase. Nach einem erneuten Extraktionsvorgang wurde die vereinigte DNA-Lösung zum Ausschluss einer möglichen Verschleppung von Chloroform nochmals zentrifugiert. Die DNA konnte im Anschluss durch Zugabe eiskalten Isopropanols als Knäuel ausgefällt werden. Der Volumenanteil des Isopropanols entsprach dem der gewonnenen DNA-Lösung. Das DNA-Knäuel wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit 1ml 70%igem Ethanol (EtOH) überführt, um es darin für eine Stunde bei 4°C zu waschen. Anschließend wurde die DNA luftgetrocknet und über Nacht in Aqua ad. inieci gelöst. Die DNA-Konzentration konnte anschließend photometrisch bestimmt werden.

2.2.1.2 DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA Mini Kit

Für Tumorproben unter 0,3g wurde die DNA-Isolation mit dem kommerziell erhältlichen QIAamp DNA Mini Kit® (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Vor Gebrauch wurden die als Konzentrate vorliegenden Waschpuffer AW1 und AW2 mit einem den Herstellerangaben entsprechenden Volumen EtOH absolut aufgefüllt.

Das Tumorgewebe wurde wie oben beschrieben zerkleinert und anschließend mit 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinkinase K (600mU/ml) aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt. Zum Durchmischen wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß ca. 15 Sekunden im Vortex-Mischer durchmischt und über Nacht oder für mehr als drei Stunden bei 56°C unter Schütteln inkubiert bis alle Zellen lysiert waren. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugierung (8 000rpm) zur Entfernung von Tropfen aus dem Deckel. Danach wurden 200µl AL-Puffer hinzugefügt und die Lösung kurz durchmischt. Es folgten eine Inkubation für zehn Minuten bei 70°C und eine kurze Zentrifugierung (8 000rpm). Nach Zugabe von 200µl reinem (96 bis 100%) Ethanol (EtOH) wurde wiederholt durchmischt und kurz zentrifugiert. Die Lösung wurde anschließend inklusive dem Präzipitat in eine QIAamp Mini-Spin-Column mit 2ml Auffangröhrchen überführt und durch Zentrifugierung (8 000rpm) für eine Minute sedimentiert. Das Auffangröhrchen mit dem Filtrat wurde verworfen und die Spin-Column in ein neues Auffangröhrchen gestellt. Nach der Zugabe von 500µl AW1-Puffer und einer Zentrifugierung für eine Minute bei 8 000rpm wurden erneut Sammelgefäß und Filtrat verworfen und die Spin-Column in ein neues Sammelgefäß gestellt. Diese wurde anschließend mit 500µl AW2-Puffer aufgefüllt und für drei Minuten bei 14 000rpm zentrifugiert. Gegebenenfalls musste dieser Schritt solange wiederholt werden bis die gesamte Flüssigkeit filtriert war. Die Spin-Column wurde auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5ml) gestellt und es wurden 100µl Aqua dest. auf den Filter gegeben. Es folgte eine einminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch eine anschließende einminütige Zentrifugierung (8 000rpm) konnte dann die DNA eluiert werden. Der letzte Schritt wurde mit dem Eluat wiederholt und dieses anschließend bei 4°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch.

2.2.1.3 DNA-Isolierung aus peripherem Vollblut

Aus Lymphozyten des peripheren Vollblutes einer freiwilligen gesunden Spenderin wurde genomische DNA als Referenz zur Negativ-Kontrolle für die Methylierungsanalyse mittels MS-PCR isoliert. Der Spenderin wurden durch Venenpunktion 10ml EDTA-Vollblut entnommen, welches anschließend mit drei Volumina Lysispuffer (pH 7,4) aufgefüllt und für mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Dies erfolgte so lange, bis das Gemisch durch Lyse der Erythrozyten in der hypotonen Lösung klar wurde. Die in der Lösung verbliebenen Lymphozyten wurden abzentrifugiert (zehn Minuten bei 2000rpm) und das Sediment in 4,5ml SE-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Um die Lymphozyten zu lysieren wurden 0,5ml 10%ige SDS-Lösung sowie eine Spatelspitze Proteinkinase K hinzugegeben und anschließend die DNA aus den Lymphozyten gemäß dem Protokoll für die konventionelle DNA-Isolierung aus Tumorgewebe gewonnen.

2.2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen erfolgte mithilfe des Nanodrop ND-1000 UV/Vis-Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen). Nach jeweiliger Kalibrierung des Gerätes mit dem Lösungsmittel wurden 2µl der zu analysierenden DNA-Lösung unverdünnt photometrisch gemessen.

2.2.2 Prinzip der Bisulfitkonversion genomischer DNA

[Clark SJ et al. 1994; Damman R 2006; Rein T et al. 1998; Shapiro R et al. 1974; Wang RY et al. 1980]

Die Bisulfitkonversion beruht auf der hydrolytischen Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. Methyliertes Cytosin ist der Modifikation gegenüber resistent und bleibt als Cytosin erhalten, da die Methylgruppe die Sulfonierung sterisch unterbindet.

Unmethyliertes Cytosin wird mittels Natriumbisulfit (NaHSO_3 , Synonym: Hydrogensulfit) in Uracil umgewandelt, indem das Bisulfit (Konzentration: 3 bis 5M) unter schwach sauren Bedingungen ($\text{pH} = 5,0$) das C6 des Cytosins sulfoniert. Auf die Sulfonierung folgt eine spontane hydrolytische Desaminierung am C4-Atom. Die Umwandlung von Cytosin zu Uracil wird durch eine Desulfonierung im alkalischen Milieu komplettiert, siehe Abbildung 13. Gesteuert wird die reversible Bildung des Cytosin-Bisulfit-Addukts durch den pH-Wert und die Bisulfitkonzentration. Die Bisulfitkonversion erlaubt es, Methylierung von Basen mittels Amplifikationsmethoden bei sehr geringer Ausgangsmenge zu detektieren, siehe Kapitel 2.2.3.

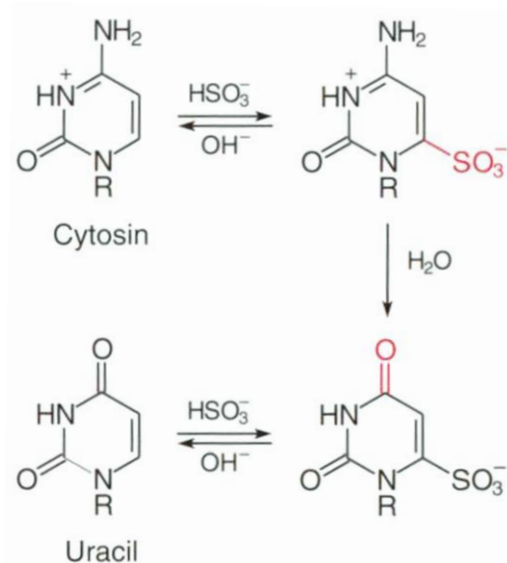


Abbildung 13 aus Dammann R 2006: Reaktionsschema der Bisulfitkonversion von unmethyliertem Cytosin.

1. C6 wird unter schwach sauren Bedingungen unter Einwirkung von Bisulfit (HSO_3^-) ständig sulfoniert.
2. Spontane hydrolytische Desaminierung am C4-Atom.
3. Uracilsulfonat wird unter alkalischen Bedingungen erneut desulfoniert, womit die Cytosin-Uracil-Transition komplett ist.

Bisulfitkonversion mit dem EZ DNA Methylation Gold TM Kit von Zymo Research®

1. Herstellung des CT-Conversion-Reagenz (nach Herstellerprotokoll): Eine Tube CT-Conversion-Reagenz wurde mit 900µl Aqua dest., 300µl M-Dilution-Puffer und 50µl M-Dissolving-Puffer angesetzt und anschließend für zehn Minuten geschüttelt.

2. Herstellung des M-Wash-Puffers (nach Herstellerprotokoll): Zu den 6ml M-Wash-Puffer-Konzentrat wurden 24ml 100%iges EtOH hinzugefügt und die Lösung anschließend kurz geschüttelt.

Eine 20µl DNA Probe à 500ng DNA wurde mit 130µl CT-Conversion-Reagenz aufgefüllt, gemischt und kurz zentrifugiert. Die Zentrifugierung erfolgte für die Bisulfitkonversion stets bei 14 000 rpm für 30 Sekunden. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler für zehn Minuten auf 98°C erhitzt um die DNA in Einzelstränge zu trennen. Zur Konversion verblieben die Proben für weitere 2,5 Stunden bei 64°C im Thermocycler (PTC-200 von MJ Research). Eine Lagerung bei 4°C ist bis zu maximal 20 Stunden möglich. Für die weitere Verarbeitung wurde 60µl Binding-Puffer in eine Zymo-Spin™-IC-Column gegeben und danach die im Thermocycler behandelte Probe hinzugefügt. Diese Lösung wurde durch mehrmaliges Umdrehen der Spin-Column vermischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugierung der Probe. Das Filtrat wurde verworfen und 100µl M-Wash-Puffer in die Spinsäule gegeben. Es folgte eine Zentrifugierung und das erneute Verwerfen des Filtrats. Im Anschluss wurden 200µl M-Desulphonation-Puffer hinzugegeben und die Probe für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugierung folgte ein Waschschrift, bei dem 200µl M-Wash-Puffer zur Probe pipettiert wurden. Nach dem Zentrifugieren und Wiederholen des Waschvorgangs wurde die Spin-Column in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10µl M-Elution-Puffer (oder Aqua dest. oder TE-Puffer) und Zentrifugierung eluiert. Die Bisulfit-behandelte DNA wurde anschließend bei -20°C (bzw. -70°C bei langer Lagerung) aufbewahrt.

2.2.3 Prinzip der Polymerase Chain Reaction (PCR)

[Bangsow T et al. 2007, Löffler G et al. 2007, Bayrhuber H & Kull U 1998]

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) wurde im Jahr 1986 von Kary Mullis und Kollegen entwickelt. Sie dient der selektiven in vitro-Replikation von Nukleinsäureabschnitten definierter Sequenz und Länge. Der zu amplifizierende Bereich auf dem Nukleinsäurestrang wird durch die Wahl sogenannter Primer⁹ definiert. Als kurzes Anfangsstück

⁹**Primer:** Synthetisch hergestellte Oligonukleotidpaare, zueinander gegenläufig und spezifisch in den Randbereichen des gewünschten Abschnittes hybridisierend (Annealing). Dadurch wird gezielt der Bereich zwischen den beiden Primern vervielfältigt.

liefern die Primer das 3'-OH-Ende, an das durch DNA-Polymerase ein zur einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) komplementärer Nukleinsäurestrang synthetisiert wird. Zusätzlich zu den beiden im Überschuss vorliegenden Oligonukleotidpaaren und dem Template sind für die PCR folgende Komponenten essentiell: Eine hitzestabile DNA-Polymerase, Mg^{2+} -Ionen als Kofaktor der Polymerase, ein äquimolares Gemisch aller vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie ein geeigneter Reaktionspuffer. Als DNA-Polymerase verwendet man meist die Taq-Polymerase¹⁰. Die eigentliche Polymerasekettenreaktion beruht auf 25 bis 35 Zyklen, wobei je Zyklus drei definierte Arbeitsschritte stattfinden (Abbildung 14):

1. Denaturierungsprozess: Erhitzen des Reaktionsansatzes auf Temperaturen zwischen 90 und 95°C um die Nukleinsäurematrize in zwei komplementäre Einzelstränge zu trennen.
2. Annealing: Hybridisierung der Primer bei einer Temperatur von, je nach Primer, etwa 52 bis 62°C.
3. Extension: Steigerung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase bei 72°C. In diesem Schritt polymerisiert das Enzym mit dNTPs einen zur Matrize komplementären Strang an das 3'OH-Ende des Primers.

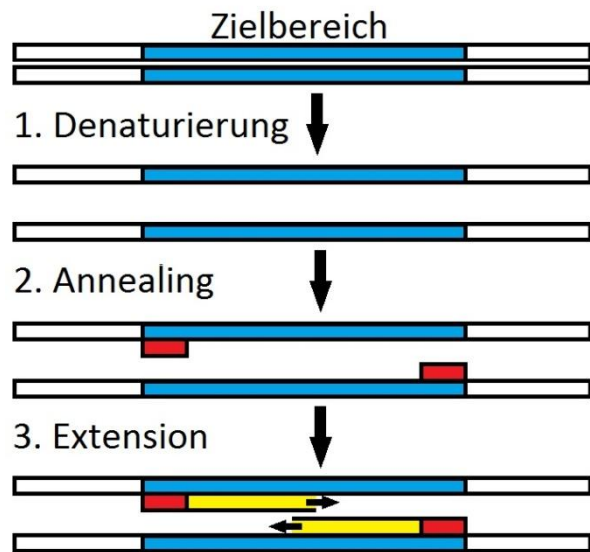


Abbildung 14: Schematischer Ablauf einer Polymerasekettenreaktion.

In dieser Arbeit wurde die Hotstart-Methode verwendet. Diese verhindert bei vorhandenen unspezifischen Primer-Bindungen die Amplifikation ungewünschter Sequenzen bei Raumtemperatur, wodurch die Spezifität erhöht wird. Initial ist bei der Durchführung der Methode eine 15-minütige Inkubation bei 95°C zur Aktivierung der Polymerase nötig. Durch Zugabe von anti-Taq-Polymerase-Antikörpern oder mittels chemischer Modifikationen wird die Aktivität der Polymerase bis zu diesem initialen Denaturierungsschritt inhibiert. Die chemische Modifikation unterbindet die Aktivität durch kovalente Bindung komplett, während durch die Antikörper eine Restaktivität vorhanden bleibt [QIAGEN 2007].

¹⁰**Taq-Polymerase:** Hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*.

2.2.4 Methylierungs-Sensitive Polymerasekettenreaktion

[Dammann R 2006; Licchesi JDF & Herman JG 2009]

Die Methylierungs-Sensitive Polymerasekettenreaktion (MS-PCR) wurde im Jahr 1996 von Herman und Mitarbeitern entwickelt. Sie erlaubt die Methylierungsanalyse von sehr kleinen Probenmengen und ist außerdem schnell und einfach durchführbar. Mit der MS-PCR wurde es möglich in einer Probe bis zu 0,1 Prozent methylierte bzw. unmethylierte DNA-Sequenzen zu erfassen. Da durch die Bisulfitbehandlung methyliertes Cytosin auch weiterhin als Cytosin erhalten bleibt, unmethyliertes Cytosin jedoch in Uracil umgewandelt wird, verändert sich die Basenfolge der DNA-Sequenz und die beiden DNA-Stränge liegen nicht mehr komplementär zueinander vor. Dadurch kann man in getrennten PCR-Ansätzen zwei unterschiedliche Primerpaare zur methylierungssensitiven DNA-Amplifikation nutzen. Diese sind entweder spezifisch für die (jeweils bisulfitkonvertierte) methylierte oder unmethylierte Sequenz des Plus- oder Minusstranges, siehe Abbildung 15.

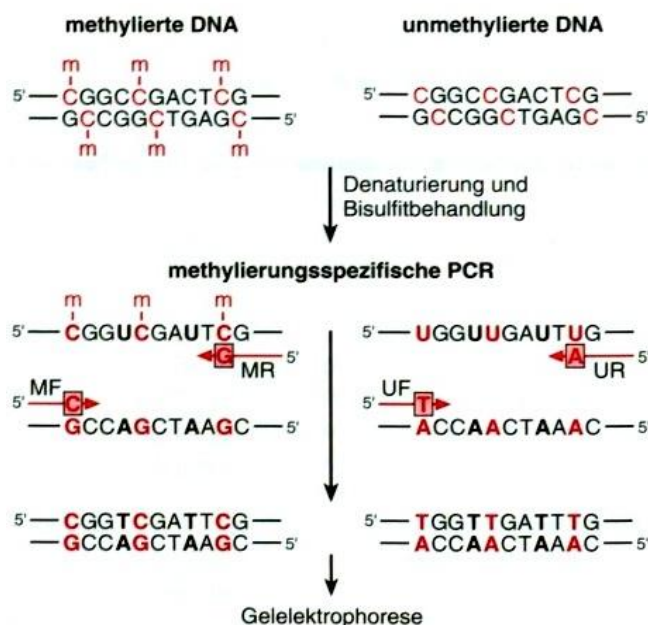


Abbildung 15 aus Dammann R 2006: Prinzip der MS-PCR.

Die DNA wird denaturiert und bisulfitiert. Methyliertes Cytosin bleibt dabei erhalten, nicht methyliertes wird in Uracil umgewandelt, welches später in der PCR durch das DNA-Analogon Thymin ersetzt wird. Methylierungs-spezifische Primer (MF=Methylierte DNA, Forward-Primer; MR=Methylierte DNA, Reverse-Primer) binden an "methylierte DNA", "nicht-methyliert"-spezifische Primer (UF= nicht-methyliert, Forward-Primer; UR=nicht-methyliert, Reverse-Primer) binden "nicht-methylierte" DNA und erlauben die Amplifikation derselben.

2.2.4.1 Primerdesign

In den methylierungs-spezifischen Primern werden im forward-Primer die Cytosine bzw. im reverse-Primer die Guanosine beibehalten, damit diese nur an bisulfitmodifizierte, methylierte DNA binden und diese amplifiziert. Im "nicht-methyliert"-spezifischen Primer wird im forward-Primer Cytosin durch Thymin ersetzt und im reverse-Primer Guanosin durch Adenosin, wodurch diese spezifisch nur an nicht methylierte DNA mit dem desaminierten Cytosin bindet. Für beide Primer gilt, dass sie drei bis vier CpGs bzw. TpGs enthalten sollten, damit eine spezifische Amplifikation von methylierter bzw.

nicht methylierter DNA gewährleistet ist. Sie sollten in etwa dem gleichen Bereich der DNA binden, um die erfassten CpG-Positionen miteinander vergleichen zu können. Der hohen Sensitivität wegen stellt die MS-PCR eine kontaminationsanfällige Methode dar. Deshalb ist das Mitführen geeigneter Kontrollen unerlässlich, siehe Kapitel 2.2.5. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer sollte zwischen 60 und 65°C liegen und eine Ausbildung von Sekundärstrukturen oder Primer-Dimer-Paaren vermieden werden. Das entstandene PCR-Produkt sollte zudem eine Größe von 200bp nicht überschreiten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen wurden den jeweils angegebenen Originalpublikationen entnommen, siehe Tabelle 10, und von unserer Arbeitsgruppe vor Experimentdurchführung bioinformatisch überprüft [Kraemer D 2011, Diplomarbeit]. Beide Primerpaare wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg) in leicht löslicher Form bezogen und dann mit dem im Syntheseprotokoll angegebenen Volumen Aqua ad iniect. auf eine Endkonzentration von 100pmol/ μ l eingestellt. Die Primer wurden anschließend für die Dauer von mindestens einer Stunde gelöst und anschließend nach Aliquotierung bei -20°C aufbewahrt.

Die verwendeten *p16INK4a*-Primer binden an eine zentrale Sequenz des Promotors, die innerhalb des stromaufwärts beginnenden Transkriptionsstarts liegt. Sie binden in einer das gesamte Exon 1 α umgreifenden CpG-Insel, die sich relativ zum ATG-Startcodon von -802 bis +550 erstreckt. Die exonischen Priming-Sites flankieren den Translationsstart (forward-Primer: -80 bis -57, reverse-Primer: +50 bis +71) und enthalten insgesamt acht potentiell methylierte CpG-Positionen. Das PCR-Produkt der nicht methylierten *p16*-Sequenz besteht aus 151bp, das der methylierten Sequenz aus 150bp, siehe Tabelle 10.

Mithilfe des *TIMP3*-Primers wurde das Methylierungsmuster in der chromosomalen Region 22q12 zwischen +1054 und +1077 (forward-Primer) sowie +1126 und +1151 (reverse-Primer) untersucht. Wie bei der *p16*-MS-PCR wurden durch die *TIMP3*-Primer acht CpG-Positionen erfasst. Diese liegen in einer CPG-Insel des ersten Exons von *TIMP3*. Der forward-Primer bindet an den CpG- Positionen "-21" bis "-18", der Reverse-Primer an den Positionen "-8" bis "-5". Abbildung 16 stellt die Lokalisation der hier benutzten Primer im Vergleich mit Primerlokalisationen früherer Studien dar, welche im Kapitel 4.3 diskutiert werden. Die PCR-Produkte bestanden für die methylierte Sequenz aus 95bp und für die nicht-methylierte Sequenz aus 98bp, siehe Tabelle 10.

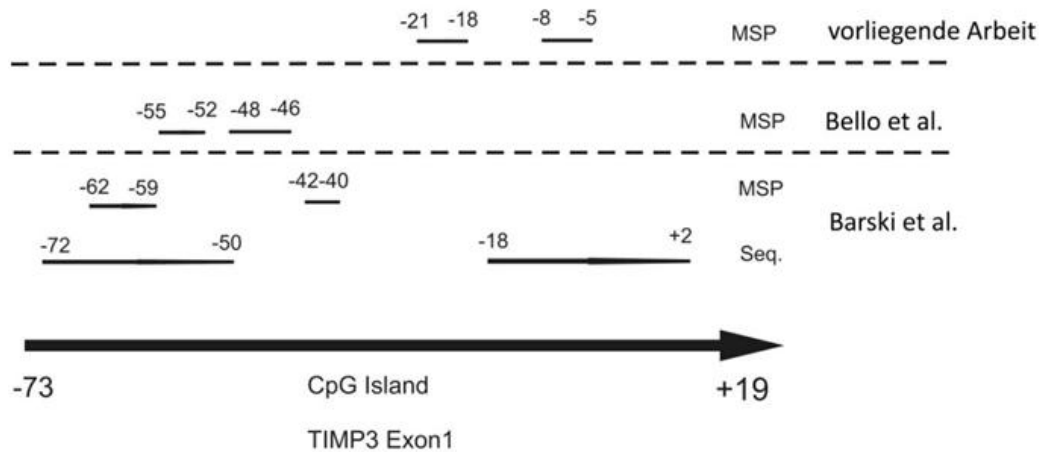


Abbildung 16: Lokalisationen des TIMP3-Primers im Vergleich. CpGs werden in Relation zum Translationsstart (TLS) durchnummeriert. Dabei werden solche CpGs, die sich vor dem TLS befinden mit einem "-", solche nach dem TLS mit einem "+" gekennzeichnet. Der in dieser Arbeit verwendete Forward-Primer bindet an die CpGs mit den Positionen "-21" bis "-18", der Reverse-Primer an die mit den Positionen "-8" bis "-5".

Tabelle 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Locus	Spezifikation	Sequenz	T_m	Lokalisation ¹¹	Größe ¹²	Referenz
p16	Methyliert (forward)	5'-TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3'	62,6° C	21.974.906– 21.974.756 (NC_000009.11)	150 bp	Herman et al. 1996, Righini et al. 2007
	Methyliert (reverse)	5'-GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3'	64,1° C			
	Unmethyliert (forward)	5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3'	57,6° C	21.974.906– 21.974.757 (NC_000009.11)	151 bp	
	Unmethyliert (reverse)	5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3'	55,9° C			
TIMP3	Methyliert (forward)	5'-GCG TCG GAG GTT AAG GTT GTT-3'	59,8° C	31.527.857– 31.527.949 (NC_000022.9)	95 bp ¹³	Righini et al. 2007
	Methyliert (reverse)	5'-CTC TCC AAA ATT ACC GTA CGC G-3'	60,3° C			
	Unmethyliert (forward)	5'-TGT GTT GGA GGT TAA GGT TGT TTT-3'	57,6° C	31.527.856– 31.527.953 (NC_000022.9)	98 bp	
	Unmethyliert (reverse)	5'-ACT CTC CAA AAT TAC CAT ACA CAC C-3'	59,7° C			

¹¹GenBank Accession

¹²Amplifikatgröße

¹³In der Referenz sind falsche Amplifikatgrößen (116 bp für methylierte und 122 bp für unmethylierte Sequenz) angegeben, vgl. auch De Schutter H et al. (2009).

2.2.4.2 Durchführung der MS-PCR

Zur Verifizierung einer tumorspezifischen Methylierung und zum Kontaminationsausschluss der PCR-Reagenzien wurden bei der Durchführung der MS-PCR folgende Kontrollen verwendet, vergleiche Abbildung 17:

1. DNA peripherer Blutlymphozyten (PBL) eines gesunden Probanden als nicht-methylierte Probe, das heißt als Negativkontrolle.
2. Universal Methylated Human DNA Standard (Zymo Research, Irvine, USA) als methylierte Probe (M+), das heißt als Positivkontrolle.
3. Aqua ad iniectionem, das auch für die anderen PCR-Ansätze verwendet wurde, als Nullkontrolle (NTC = No-Template Control). Sie diente dem Ausschluss möglicher Kontaminationen der PCR-Reagenzien.
4. Bei der Etablierung der MS-PCR in unserer Arbeitsgruppe wurde auch nicht-bisulfitmodifizierte DNA als Kontrolle der Spezifität der MS-PCR für das konvertierte Template („Wildtyp-Kontrolle“) verwendet.

Die Durchführung der PCR erfolgte jeweils mit einem 25µl-Ansatz. Dazu wurde ein Mastermix in ein PCR-Gefäß vorgelegt. Dieser bestand aus Aqua ad iniectionem, 10x Taq-Polymerase-Puffer (15mM MgCl₂) (QIAGEN, Hilden), einem äquimolaren dNTP-Mix (je 2,5mM Endkonzentration) und dem entsprechenden M- bzw. U-Primerpaar (Endkonzentration 4pmol). Zum Schluss wurde die HotStarTaq®-Polymerase (5U/µl) (Qiagen, Hilden) hinzugegeben. Nach dem Herstellen des Standardansatzes wurden 1µl der bisulfitierten Tumor-DNA-Proben bzw. entsprechend 1µl der PBL-DNA/Universal Methylated Human DNA Standard hinzupipettiert. Die Präparation der PCR-Ansätze erfolgte unter einer PCR-Reinluft-Werkbank in separaten Räumen.

Um die Effizienz und Spezifität zu steigern, wurde dem Reaktionsmix in der MS-PCR mit *TIMP3*-Primern noch MgCl₂ (25mM) und Dimethylsulfoxid (DMSO) (≅5% v/v) beigefügt. Durch den Zusatz von fünf Prozent DMSO wird die DNA-Denaturierung und das korrekte Primer-Annealing unterstützt und zudem die Sekundärstrukturformation der Template-DNA verhindert. Somit wird insbesondere die effiziente und spezifische Vervielfältigung GC-reicher Matrizen begünstigt [Hung T et al. 1990; Varadaraj K & Skinner DM 1994]. Eine Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration verbessert das Primer-Annealing, das Schmelzverhalten und die Produktionsspezifität. Allerdings ist zu beachten, dass zu hohe Konzentrationen die Reaktionsstringenz herabsetzen können [Rolfs A et al. 1992].

Standardreaktionsansatz (1x) für <i>p16</i>	Standardreaktionsansatz (1x) für <i>TIMP3</i>
2,5µl Taq-Puffer (10x) (15mM MgCl ₂)	2,5µl Taq-Puffer (10x) (15mM MgCl ₂)
2,5µl dNTPs (25mM)	2,5µl dNTPs (25mM)
1,0µl M/U-Primer forward (100pmol/µl)	1,0µl M/U-Primer forward (100pmol/µl)
1,0µl M/U-Primer reverse (100 pmol/µl)	1,0µl M/U-Primer reverse (100 pmol/µl)
0,2µl HotStarTaq®-Polymerase (5U/µl)	0,2µl HotStarTaq®-Polymerase (5U/µl)
1,0µl Bisulfit-DNA	0,5µl MgCl ₂ (25mM)
16,8µl Aq. ad inieci	1,25µl DMSO (±5% v/v)
	1,0µl Bisulfit-DNA
	15,05µl Aq. ad inieci.
Total = 25µl	Total = 25µl

Die MS-PCR wurde nach Herstellung der Standardansätze in Thermocyclern der Firma MJ Research (PTC-100/PTC-200) bei beheiztem Deckel zur Verdunstungsverhinderung mit folgenden reaktionsspezifischen Thermoprofilen durchgeführt:

a) <i>p16</i> (M = methylierungsspezifische Reaktion; U = "nicht-methyliert"-spezifische Reaktion)			
1. Initiale Denaturierung (Hot Start)	15min	95°C	
2. Denaturierung	1min	95°C	} 40 M/37 U Zyklen
3. Primer-Annealing	1min	65°C M/60°C U	
4. Extension	1min	72°C	
5. Finale Extension	10min	72°C	
6. gekühlte Inkubation	∞	4°C	
b) <i>TIMP3</i> (gleiche Thermoprofile für beide Reaktionen)			
1. Initiale Denaturierung (Hot Start)	15min	95°C	
2. Denaturierung	1min	95°C	} 37 Zyklen
3. Primer-Annealing	1min	59°C	
4. Extension	1min	72°C	
5. Finale Extension	10min	72°C	
6. gekühlte Inkubation	∞	4°C	

Im Anschluss an den Amplifikationsprozess wurden geeignete Aliquota elektrophoretisch separat mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert, vergleiche Kapitel 2.2.5.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die MS-PCR-Amplifikate wurden in einem 1xTBE- gepufferten, 3,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Herstellung wurden 2,8g PeqGOLD Universal-Agarose in 80ml 1xTBE (bei großer Elektrophoresekammer: 5,6g in 160ml 1xTBE) suspendiert und in einer Mikrowelle kurz aufgeköcht, bis sich beim Schwenken des Erlenmeyerkolbens eine schlierenfreie Lösung ergab. Diese wurde in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt, mit 8µl des fluoreszierenden DNA-Interkalators Ethidiumbromid versetzt (bei großer Elektrophoresekammer: 16µl) und anschließend in eine horizontale Gelkammer gegossen (Owl 800-242-5560, B3; Owl Separation Systems Inc.). Nach ca. 30

Minuten war die Agarosematrix vollständig polymerisiert und es wurden je 9µl der Proben mit 1µl Stopp-Lade-Puffer versetzt und in die Geltaschen transferiert. Es folgte dann die elektrophoretische Trennung für ein bis zwei Stunden bei 7 bis 10V/cm (120 V/260 mA [14er-Kamm] bzw. 135V/260mA [20er-Kamm]) in 1xTBE als Laufpuffer. Zur Größenquantifizierung wurde stets 6µl der peqGOLD Ultra Low Range DNA-Leiter II (25 bis 700bp) mitgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wurden die Gelbanden bei UV-Anregung (302nm) unter einem UV-Transilluminator (Wealtec, Sparks, USA) mit einer Kamera (CU105M, 8030102 Rainbow, Japan) visualisiert und bildlich erfasst (DeVision G, Vers. 2.0.; Decon Science Tec GmbH, Hohengandern). Die Auswertung erfolgte qualitativ: War bei der visuellen Inspektion des Elektrophoresebildes ein Produkt bei der methylierungsspezifischen Teilreaktion zu sehen, wurde die Probe als methyliert eingestuft. Dies geschah ungeachtet eines möglichen Signals bei der komplementären Reaktion mit für nicht-methylierte DNA spezifischen Primern, vergleiche Ebinger M et al. 2004 und Mühlisch J et al. 2007. Eine positive Bande der methylierungsspezifischen Probe entspricht also definitionsgemäß einer Hypermethylierung. Dementsprechend werden "Methylierung" und "Hypermethylierung" hier synonym verwendet. Bei schwachem oder nur schlecht interpretierbarem Signal wurde die MS-PCR mit erneut bisulfitkonvertierte Proben-DNA wiederholt. Nur bei replizierbarem Methylierungssignal wurde die Probe als methyliert gewertet. Abbildung 17 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Auswertung der Gelelektrophorese.

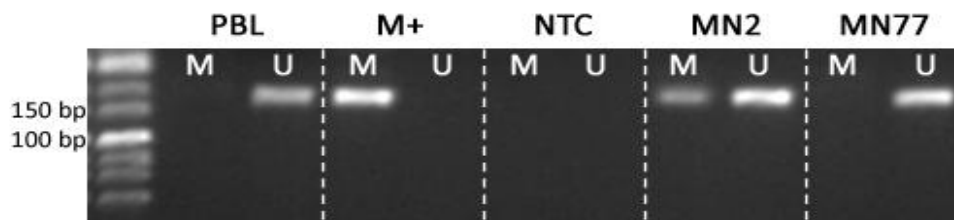


Abbildung 17: Repräsentatives Beispiel für die Darstellung der PCR-Produkte und der Kontrollen in der Gelelektrophorese; **M+** = Methylierungspositive Kontrolle, **PBL** = Methylierungsnegative Kontrolle; **NTC** = No-Template Control; **MN2** = methylierte Probe; **MN77** = unmethylierte Probe.

2.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse und die graphische Darstellung erfolgten mithilfe des Programms SPSS (IBM, Version 22.0) und Microsoft Excell (Microsoft, Version 2007). Zur Identifizierung von signifikanten Prädiktoren für das Auftreten von Rezidiven wurden die Kaplan-Meier-Methode und die multivariate Cox-Regressionsanalyse (Konfidenzintervall 95%) durchgeführt. Statistische Zusammenhänge zwischen Methylierungsstatus, Chromosomenverlusten, WHO-Grad, Lokalisation, Präsentation und Geschlecht wurden mit dem exakten Fisher Test berechnet. Alle p-Werte wurden mittels zweiseitiger Tests bestimmt.

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Resultate der Methylierungsanalysen aufgeführt. Hierbei werden Vergleiche zu FISH-Untersuchungen und verschiedenen klinischen Variablen angestellt. Eine ausführliche Darstellung erfolgt für die Gesamtpopulation. Zusätzlich wurden Rezidiv- und Erstmeningeome auf Zusammenhänge mit Geschlecht, WHO-Grad, Lokalisation, allgemeiner Chromosomendeletion, 1p36-, 9p21- und 22q-Verlust untersucht. Der diesem Kapitel zugrunde liegende Datensatz findet sich in Tabellenform im Anhang dieser Arbeit.

Tabelle 11: Übersicht über die Ergebnisse der epi- und zytogenetischen Analysen.

Lfd. Nr.	Patient	Op-Nr.	WHO	Präsentation	<i>TIMP3</i>	<i>p16</i>	1p36	22q	9p21
MN 1	P 1	997/08	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 2	P 2	1018/08	1	Ersttumor	U	M	-1	-1	0
MN 3	P 3	1139/08	1	Ersttumor	U	M	0	-1	0
MN 4	P 4	1142/08	2	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 5*	P 5 §	1039/08	3	Ersttumor	U	U	0	0	-1
MN 6*	P 6	1368/08	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 7*	P 7	1204/08	2	Ersttumor	U	U	-1	0	0
MN 8*	P 8	1407/08	3	Rezidiv	U	U	-1	-1	-1
MN 9*	P 9	1038/08	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 10*	P 10	1587/08	3	Rezidiv	U	U	-1	0	0
MN 11*	P 11	1445/08	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 12*	P 12	1449/08	2	Ersttumor	U	M	0	-1	0
MN 13*	P 13	1568/08	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 14*	P 14	1575/08	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	-1
MN 15*	P 15	1601/08	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 16*	P 16	1671/08	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 17*	P 17 §	1746/08	2	Rezidiv	U	M	-1	0	-1
MN 18*	P 18	1842/08	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 19*	P 19	1792/08	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 20*	P 20	1825/08	1	Ersttumor	nd	U	0	-1	0
MN 21	P 21	92/09_1	3	Rezidiv	U	M	-1	-1	-1
MN 22	P 21	92/09_2	2	Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 23*	P 21	92/09_3	2	Rezidiv	nd	U	-1	-1	0
MN 24	P 22	73/09	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 25	P 23	268/09	2	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 26	P 24	133/09	2	Ersttumor	U	M	0	-1	0
MN 27	P 25	273/09	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 28	P 26	351/09	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 29	P 27	369/09	2	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 30	P 28	581/09	2	Ersttumor	M	M	0	-1	0
MN 31	P 29	751/09	1	Ersttumor	U	U	0	0	0

MN 32	P 30	1011/09	1	Ersttumor	U	U	-1	0	0
MN 33	P 31	1172/09	1	Ersttumor	U	U	-1	0	0
MN 34	P 32	1180/09	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 35	P 33	1245/09	1	Ersttumor	U	U	nd	nd	nd
MN 36	P 34	1247/09	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 37	P 35	1276/09	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 38	P 36	1336/09	2	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 39	P 37	1347/09	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 40	P 38	1401/09	1	Ersttumor	U	M	-1	-1	0
MN 41	P 39	1408/09	2	Ersttumor	U	M	-1	-1	0
MN 42	P 40	1418/09	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 43	P 41	1436/09	2	Ersttumor	M	U	-1	-1	0
MN 44	P 42	1473/09	2	Ersttumor	M	U	0	-1	0
MN 45	P 43	1481/09	1	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 46	P 44	1630/09	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 47	P 45	229/09	1	Ersttumor	U	M	0	0	0
MN 48	P 46	1652/09	1	Ersttumor	U	M	0	-1	0
MN 49	P 47	1675/09	1	Ersttumor	U	M	0	0	0
MN 50	P 48	1746/09	3	Ersttumor	U	M	-1	-1	0
MN 51	P 49	1822/09	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 52	P 50	1832/09	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 53	P 51	1867/09	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 54	P 52	1957/09	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 55	P 53	112/10	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 56	P 54	134/10	1	Ersttumor	U	M	0	0	0
MN 57	P 55	185/10	2	Ersttumor	U	U	nd	nd	nd
MN 58	P 56	207/10	2	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 59	P 57	346/10	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 60	P 58	374/10	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 61	P 59	461/10	1	Ersttumor	U	M	-1	-1	0
MN 62	P 60	487/10	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 63	P 61	509/10	2	Ersttumor	M	M	-1	0	0
MN 64	P 62 §	987/08	2	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 65	P 62 §	559/10	2	Rezidiv	M	U	-1	-1	0
MN 66	P 63	613/10	1	Ersttumor	M	U	-1	0	0
MN 67	P 64	620/10	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 68	P 65	701/10	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 69	P 66	710/10	1	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 70	P 67	727/10	1	Ersttumor	U	M	0	0	0
MN 71	P 68	741/10	1	Ersttumor	U	U	-1	0	0
MN 72	P 69	748/10	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 73	P 70	757/10	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 74	P 71	827/10	1	Ersttumor	U	M	0	0	0
MN 75	P 72	834/10	1	Ersttumor	U	M	0	0	0
MN 76	P 73	842/10	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 77	P 74	1745/09	2	Ersttumor	U	M	-1	0	0
MN 78	P 74	876/10	2	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 79	P 75	939/10	2	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 80	P 76	555/09	2	Ersttumor	U	U	nd	nd	nd
MN 81	P 77	205/09	1	Ersttumor	U	nd	0	-1	0

MN 82	P 78	1874/08	2	Rezidiv	U	M	0	0	0
MN 83*	P 79	232/03	3	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 84*	P 79	798/03	3	Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 85*	P 80	1534/97	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 86*	P 80	1767/04	1	Rezidiv	M	U	nd	nd	nd
MN 87*	P 81	828/02	1	Ersttumor	nd	U	0	0	0
MN 88*	P 81	91/05	1	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 89*	P 82	244/05	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 90*	P 82	295/07	1	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 91*	P 83	1407/97	2	Ersttumor	U	U	nd	nd	nd
MN 92*	P 83	1014/07	2	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 93*	P 84	904/00	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 94*	P 84	1382/08	2	Rezidiv	M	U	-1	0	-1
MN 95*	P 85	306/99	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 96*	P 86	230/99	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 97*	P 87	671/02	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 98*	P 88	170/01	1	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 99*	P 89	94/98	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 100*	P 90	899/98	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 101*	P 91	794/99	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 102*	P 92	768/98	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 103*	P 93	1214/97	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 104*	P 94	1568/97	1	Ersttumor	U	M	0	-1	0
MN 105*	P 95	1939/08	1	Ersttumor	U	M	nd	nd	nd
MN 106*	P 96	1072/99	2	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 107*	P 96	32/02	2	Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 108*	P 97	2043/01	1	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 109*	P 98	948/00	2	Ersttumor	U	M	0	0	0
MN 110*	P 99	1258/01	1	Ersttumor	U	U	nd	nd	nd
MN 111*	P 100	1237/04	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 112*	P 101	1210/98	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 113*	P 101	1778/99	2	1. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 114*	P 101	67/02	2	2. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 115*	P 102	379/01	3	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 116*	P 102	1342/01	3	1. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 117*	P 102	1808/01	3	2. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 118*	P 103	587/99	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 119*	P 103	570/02	2	Rezidiv	U	U	nd	nd	nd
MN 120*	P 104	1812/05	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 121*	P 105 §	704/01	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 122*	P 105 §	961/07	2	1. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 123	P 105 §	201/09	3	2. Rezidiv	M	U	-1	-1	-1
MN 124	P 105 §	516/10	3	3. Rezidiv	M	M	nd	nd	-1
MN 125*	P 106	2090/01	nd	Ersttumor	nd	U	nd	nd	nd
MN 126*	P 106	1196/08	1	Rezidiv	U	U	-1	-1	0

* = Daten von Dennis Kraemer; § = verstorben; nd = nicht durchgeführt; U = unmethyliert; **M** = methyliert; -1 = Verlust; 0 = kein Verlust des Chromosomenabschnitts

3.1 Methylierungsstatus

In einem ersten Schritt wurden insgesamt 126 Meningeome mittels MS-PCR auf das Vorhandensein einer Methylierung von mindestens einem der beiden Gene (*TIMP3* und *p16*) untersucht. Dabei zeigte sich bei 40 (32%) Meningeomen eine Methylierung, wobei 26 der Tumoren (65%) von weiblichen und 14 (35%) von männlichen Patienten stammten. Bei den Männern war der Methylierungsanteil etwas größer (39% (14/36)) als bei den Frauen (29% (26/90)), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0.295$).

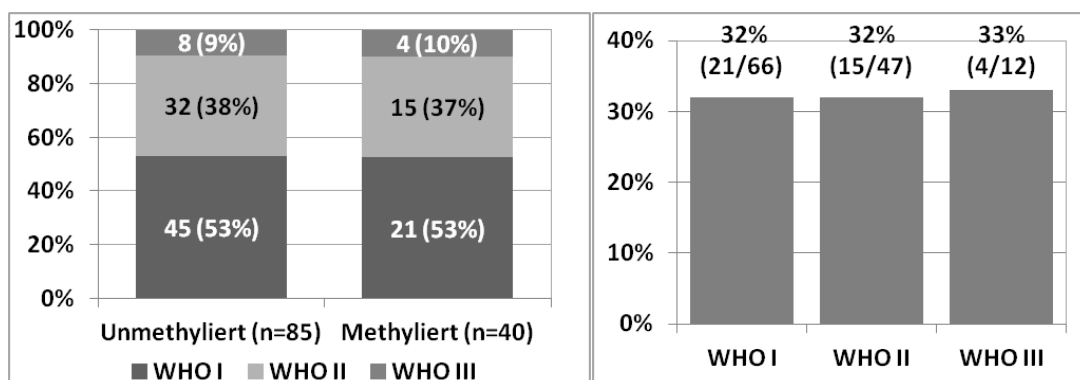
Bei den Ersttumoren betrug der Anteil der methylierten Meningeome 47 Prozent (32/68). Von den Rezidiven waren 44 Prozent (8/18) methyliert (nicht statistisch signifikant, $p=1$). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Methylierung und der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs ($p=0.939$) bestand nicht.

3.1.1 Verteilung der WHO-Grade

Bei der Klassifizierung der Meningeome nach WHO-Kriterien ergab sich für beide Gruppen eine fast identische Verteilung: sowohl bei den unmethylierten, als auch bei den methylierten Tumoren wurden 53 Prozent als benigne, 38 Prozent bzw. 37 Prozent als atypisch und neun Prozent bzw. zehn Prozent als anaplastisch klassifiziert, siehe Abbildung 18.

Der Anteil methylierter Fälle betrug in allen WHO-Graden jeweils ca. ein Drittel, siehe Abbildung 19.

Zwischen Methylierungsstatus und WHO-Grad der Meningeome zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=1$).



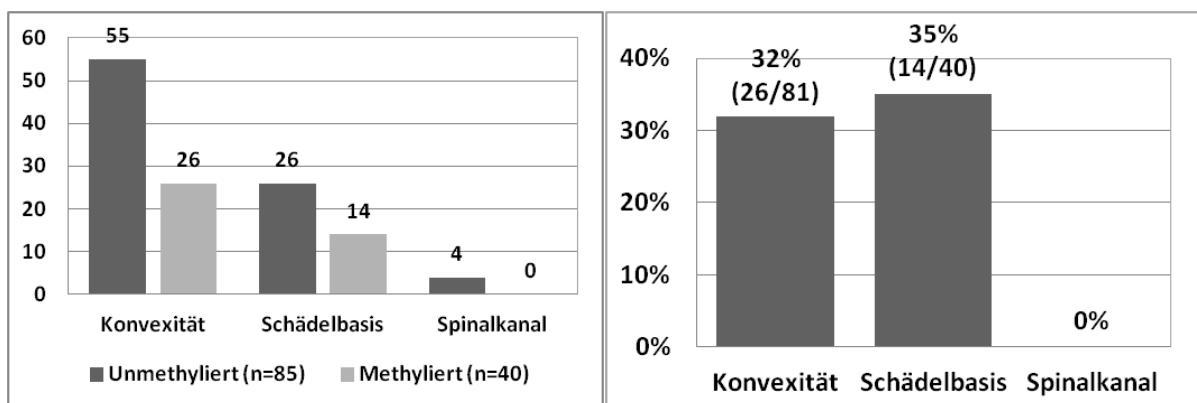
Abbildungen 18 und 19: Links: Verteilung der WHO-Grade jeweils für unmethylierte und methylierte Meningeome. **Rechts:** Häufigkeit methylierter Fälle in den drei WHO-Graden.

3.1.2 Lokalisationsverteilung

Die meisten Meningeome waren - unabhängig von ihrem Methylierungsstatus - an der Konvexität lokalisiert, gefolgt von Meningeomen der Schädelbasis. Kein Meningeom im Spinalkanal wies eine Methylierung des *p16*- oder des *TIMP3*-Promotors auf, siehe Abbildung 20.

Bei Betrachtung der Häufigkeit von Promotormethylierungen in den drei Lokalisationsgruppen wiesen Meningeome an der Schädelbasis mit 35 Prozent und der Konvexität mit 32 Prozent fast gleich häufig Methylierungen von *TIMP3* und/oder *p16* auf, vergleiche Abbildung 21.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und Lokalisation konnte nicht festgestellt werden ($p=0.643$).



Abbildungen 20 und 21: Links: Verteilung der Lokalisationen jeweils für unmethylierte und methylierte Meningeome. **Rechts:** Häufigkeit von Methylierungen in den drei Lokalisationsgruppen.

3.1.3 Vergleich mit FISH-Analysen

Sowohl nicht-methylierte als auch methylierte Meningeome wiesen in der Mehrheit der Fälle mindestens eine chromosomale Deletion auf. Am häufigsten handelte es sich dabei - unabhängig vom Methylierungsstatus - um einen kombinierten Verlust von 22q (nicht-methyliert 57%, methyliert 43%). Dieser wurde gefolgt von 1p36-Deletionen (nicht-methyliert 42%, methyliert 38%) und isolierten 22q-Verlusten (nicht-methyliert 22%, methyliert 19%). Eine Deletion von 9p21 war in vier Prozent der nicht-methylierten und 13 Prozent der methylierten Meningeome zu beobachten, siehe Abbildung 22.

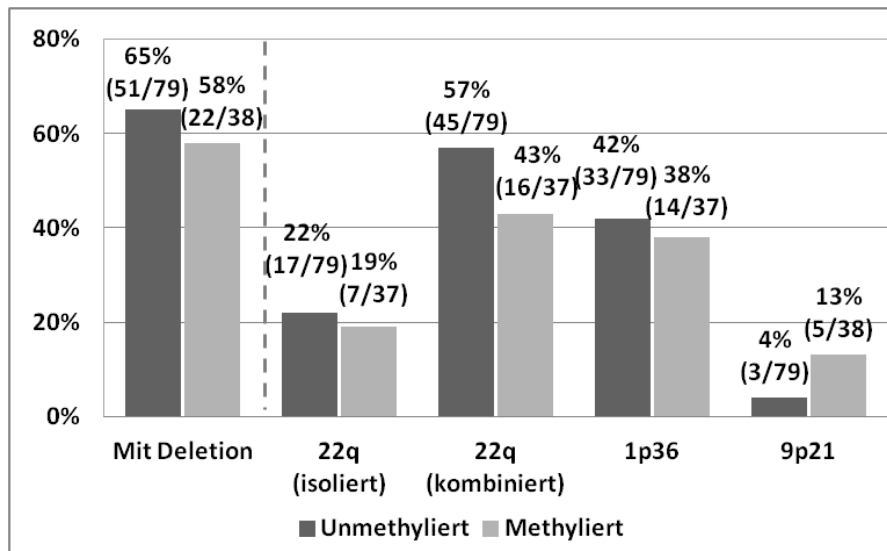


Abbildung 22: Häufigkeit der Chromosomenverluste jeweils für methylierte und unmethylierte Meningeome.

Meningeome mit einer 9p21-Deletion zeigten am häufigsten (62,5%) *TIMP3*- und/oder *p16*-Methylierungen (nicht statistisch signifikant, $p=0.11$). In den übrigen fünf zytogenetischen Gruppen betrug der Anteil der methylierten Fälle jeweils etwa ein Drittel, vergleiche Abbildung 23. Es zeigte sich somit auch kein statistisch signifikanter Zusammenhang einer Methylierung mit Deletionen von 22q (isoliert: $p=0.811$, kombiniert: $p=0.231$), 1p36 ($p=0.839$) oder einer Deletion allgemein ($p=0.543$). In der detaillierten Analyse fiel jedoch auf, dass eine Methylierung bei den Rezidivtumoren mit einer 9p21-Deletion assoziiert war ($p=0.003$).

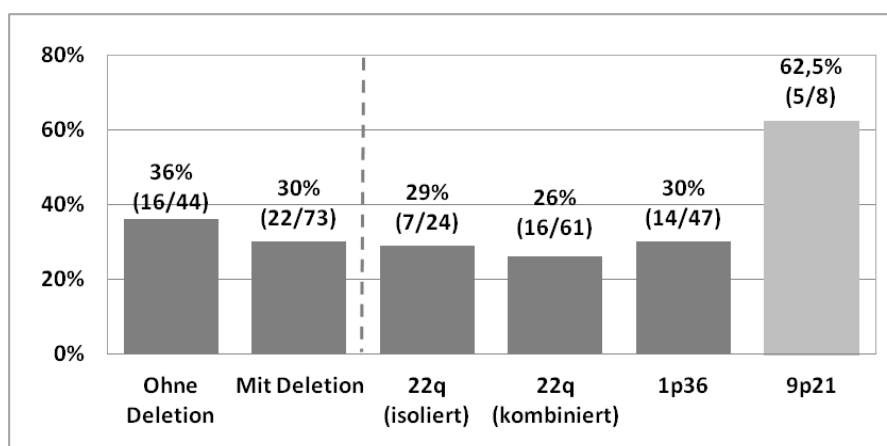
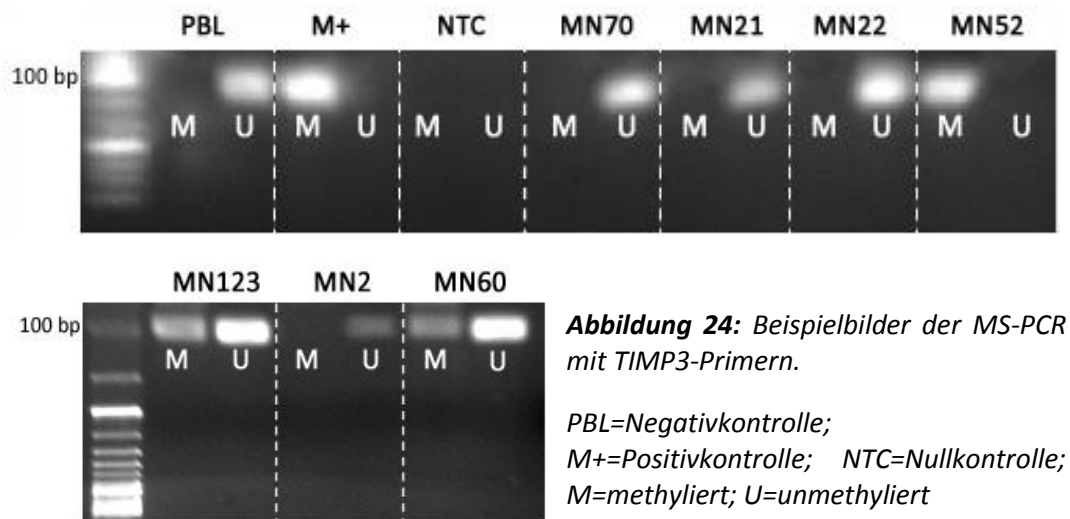


Abbildung 23: Häufigkeit von Methylierungen des *TIMP3*- oder *p16*-Promotors in den sechs zytogenetischen Gruppen.

3.2 Methylierungsanalysen des *TIMP3*-Promotors

Insgesamt wurde bei 18 von 122 (15%) untersuchten Meningeomen eine Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors festgestellt. Abbildung 24 zeigt repräsentative Beispielbilder der MS-PCR von sieben verschiedenen Meningeomen.



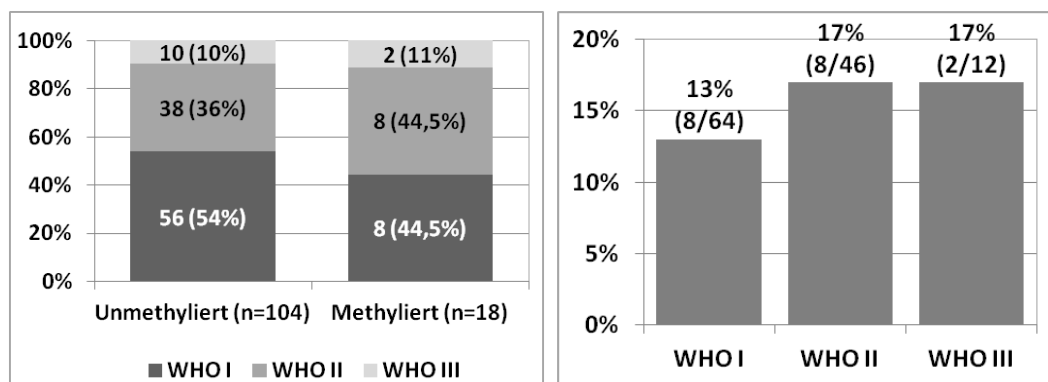
Sechs (33%) der methylierten Meningeome stammten von männlichen, zwölf (67%) von weiblichen Patienten. Dabei hatten männliche Patienten in 18 Prozent (6/34), Frauen in 14 Prozent (12/88) der Fälle eine Methylierung des *TIMP3*-Promotors ($p=0.578$, nicht signifikant).

Von den Ersttumoren wiesen zwölf Prozent (12/97) eine *TIMP3*-Promotormethylierung auf. Von den Rezidiven waren 24 Prozent (6/25) methyliert. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Methylierung und der Tumorpräsentation zeigte sich allerdings nicht ($p=0.526$). In der Analyse der rezidivfreien Zeit hatten *TIMP3*-methylierte Meningeome sowohl in der uni- als auch in der multivariaten Analyse tendenziell ein kürzeres Intervall bis zum Auftreten eines Rezidivs. Diese Tendenz war jedoch nicht statistisch signifikant (univariat: $p=0.082$, multivariat: $p=0.055$), vergleiche auch Abbildung T10 im Tabellenanhang.

3.2.1 Verteilung der WHO-Grade

Bei den *TIMP3*-methylierten Meningeomen war der Anteil der WHO-Grade I und II mit je 44,5 Prozent gleich groß. Elf Prozent der Meningeome mit *TIMP3*-Methylierung waren WHO-Grad-III-Meningeome. In der Gruppe der Meningeome ohne eine Methylierung von *TIMP3* ergab sich eine ähnliche Verteilung wie in der Gesamtpopulation (I: 54%; II: 36%; III: 10%), siehe Abbildung 25.

Betrachtet man die Häufigkeit von *TIMP3*-Methylierungen in den drei WHO-Gruppen, so fällt auf, dass nur 13 Prozent (8/64) der benignen Meningeome eine Methylierung zeigten. Bei den atypischen und anaplastischen Meningeomen war *TIMP3* dagegen in je 17 Prozent (8/46 und 2/12), siehe Abbildung 26. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer *TIMP3*-Methylierung und hohen WHO-Graden konnte nicht festgestellt werden ($p=0.694$).



Abbildungen 25 und 26: Links: Verteilung der WHO-Grade jeweils für unmethylierte und methylierte Meningeome. Rechts: Häufigkeit methylierter Fälle in den drei WHO-Graden.

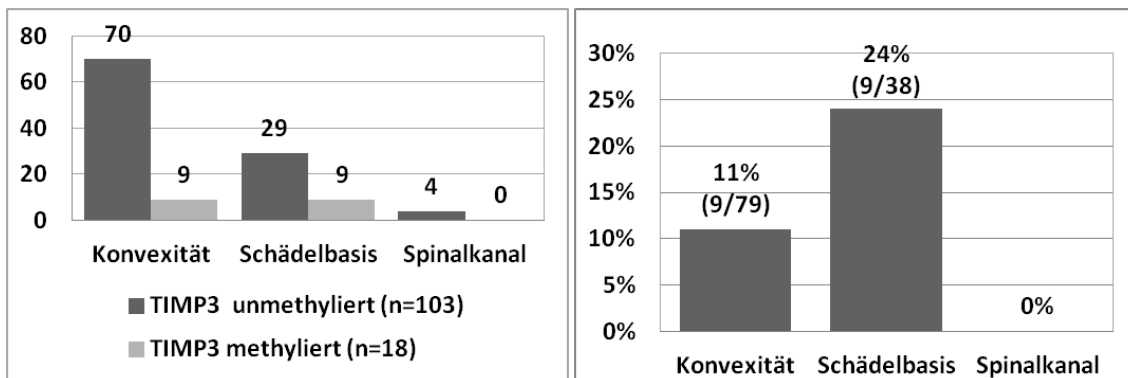
3.2.2 Lokalisationsverteilung

Meningeome mit einer *TIMP3*-Methylierung waren zu je 50 Prozent (9/121) an Konvexität und Schädelbasis lokalisiert. Spinale Meningeomen waren nicht *TIMP3*-methyliert, siehe Abbildung 27.

Bezüglich der Häufigkeit von *TIMP3*-Methylierungen in den drei Lokalisationsgruppen zeigte sich, dass der Anteil methylierter Meningeome an der Schädelbasis mit 24 Prozent (9/38) am größten war. An der Konvexität zeigten elf Prozent aller Meningeome eine Methylierung des *TIMP3*-Promotors, siehe Abbildung 28.

Bei gesonderter Betrachtung aller elf Lokalisationen fiel auf, dass keines der Meningeome der hinteren Schädelgrube (0/11) eine *TIMP3*-Methylierung aufwies.

In der statistischen Analyse fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer *TIMP3*-Methylierung und der Meningeomlokalisierung ($p=0.578$).



Abbildungen 27 und 28: Links: Verteilung der Lokalisationen jeweils für unmethylierte und methylierte Meningeome. **Rechts:** Häufigkeit des Auftretens von Methylierungen in den Lokalisationsgruppen.

3.2.3 Vergleich mit FISH-Analysen

In den FISH-Analysen war - unabhängig vom *TIMP3*-Methylierungsstatus - in der Mehrheit der Fälle mindestens ein Chromosomenabschnitt deletiert. Bei methylierten Meningeomen traten Deletionen in 53 Prozent der Fälle auf, bei Tumoren ohne die entsprechende Methylierung in 64 Prozent.

Die häufigste Deletion bei Meningeomen mit *TIMP3*-Methylierung war die der Region 1p36 (38%). Es folgten die Verluste von 22q (kombiniert) (31%) und 9p21 (18%). Die isolierte Deletion des Abschnitts 22q wurde in 13 Prozent nachgewiesen.

In der Gruppe der Tumoren ohne Methylierung von *TIMP3* stellte der kombinierte Verlust von 22q mit 56 Prozent die häufigste Deletion dar. Die isolierte 22q-Deletion war mit 22 Prozent etwas häufiger als bei den methylierten Fällen. Eine 1p36-Deletion kam ähnlich häufig (41%) vor wie bei den methylierten Meningeomen. Im Gegensatz dazu war der 9p21-Verlust in der Gruppe ohne *TIMP3*-Methylierung seltener (5%), siehe Abbildung 29.

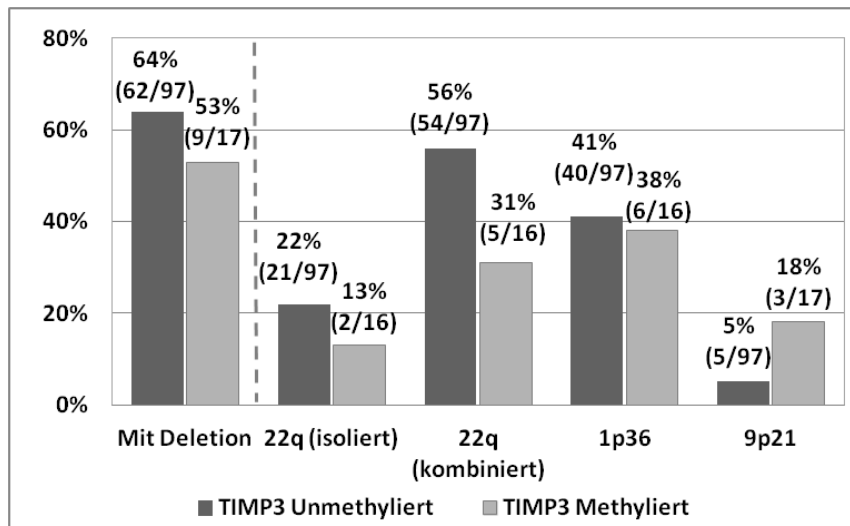


Abbildung 29: Häufigkeit der Chromosomenverluste jeweils für methylierte und unmethylierte Meningeome.

Bei Meningeomen ohne chromosomale Deletionen war *TIMP3* in 19 Prozent, bei solchen mit Deletion in 13 Prozent der Fälle methyliert. In Tumoren mit 22q- (9%) und 1p36-Verlust (13%) war eine Methylierung von *TIMP3*-Methylierung seltener. Mit 37,5 Prozent wiesen die Meningeome mit Verlust des Abschnitts 9p21 den größten Anteil an *TIMP3*-Methylierungen auf, siehe Abbildung 30. Hier muss jedoch die kleine Fallzahl der Gruppe mit einem 9p21-Verlust beachtet werden.

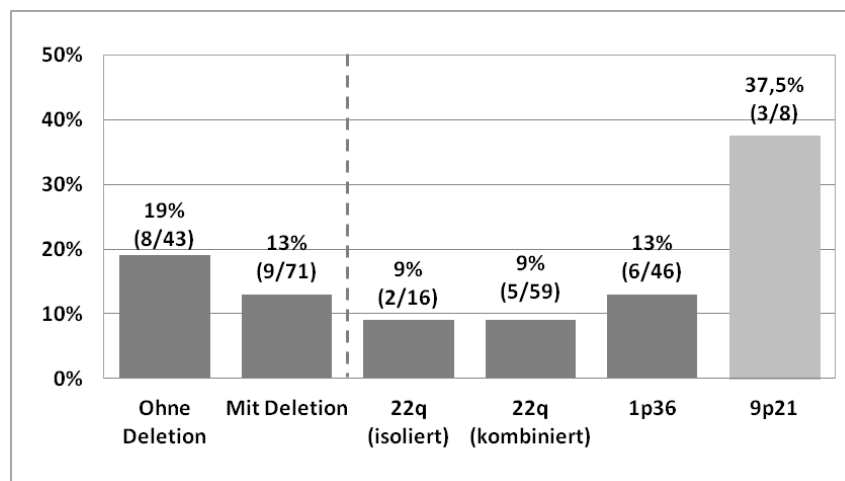
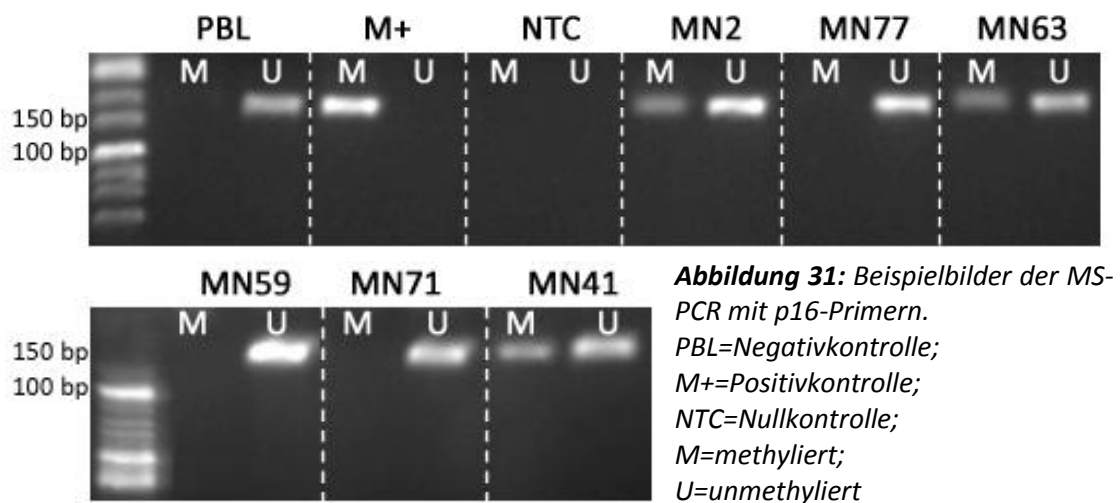


Abbildung 30: Häufigkeit von *TIMP3*-Methylierungen in den sechs zytogenetischen Gruppen.

In der Gesamtpopulation konnte weder für eine Deletion allgemein ($p=0.424$) noch für die Verluste von 22q (isoliert: $p=0.519$, kombiniert: $p=0.104$), 1p36 ($p=1$) oder 9p21 ($p=0.096$) ein signifikanter Zusammenhang mit einer Hypermethylierung von *TIMP3* festgestellt werden. Bei Rezidivtumoren war eine *TIMP3*-Hypermethylierung dagegen signifikant mit der Deletion von 9p21-assoziiert ($p=0.04$).

3.3 Methylierungsanalysen des *p16/INK4A*-Promotors

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methylierung des *p16*-Promotors in 25 der 125 (20%) analysierten Meningeome festgestellt. Abbildung 31 zeigt repräsentative Beispielbilder der MS-PCR von sechs verschiedenen Meningeomen.



Von den 25 Meningeomen mit Methylierung des *p16*-Promotors stammten zehn (40%) von männlichen und 15 (60%) von weiblichen Patienten. Bei Männern war eine Methylierung etwas häufiger (28% (10/36)) als bei Frauen (17% (15/89)), allerdings ohne statistische Signifikanz ($p=0.217$).

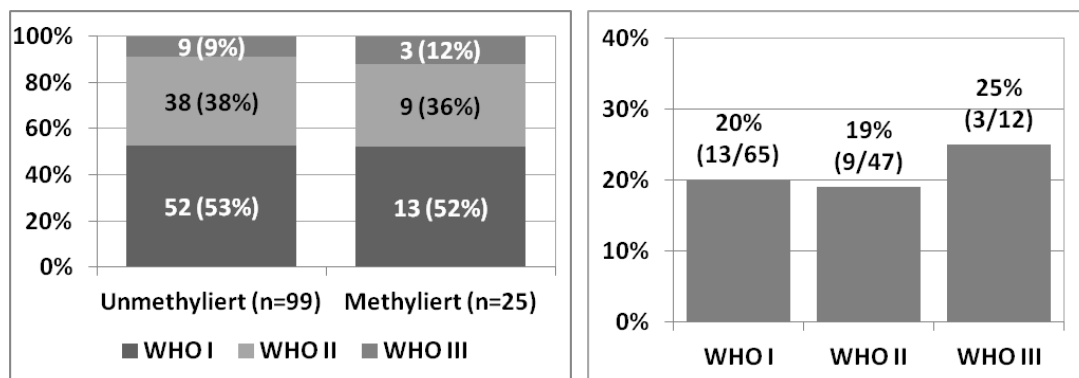
Primärtumoren zeigten in 22 Prozent (22/99), Rezidive in zwölf Prozent (3/26) der Fälle eine Hypermethylierung von *p16* (nicht signifikant, $p=0.593$). Hervorzuheben ist, dass alle methylierten Rezidive von männlichen Patienten stammten. Sowohl in der uni- ($p=0.124$) als auch in der multivariaten ($p=0.186$) Analyse der rezidivfreien Zeit ergab sich für die Methylierung von *p16* keine statistische Signifikanz.

3.3.1 Verteilung der WHO-Grade

Die WHO-Grade waren in den Gruppen mit und ohne Methylierung von *p16* sehr ähnlich verteilt: 52 Prozent bzw. 53 Prozent waren WHO-Grad-I-, 36 Prozent bzw. 38 Prozent WHO-Grad-II-

Meningeome. Meningeome mit WHO-Grad III machten zwölf Prozent der methylierten Fällen und neun Prozent der nicht-methylierten Fälle aus, siehe Abbildung 32.

Je ca. ein Fünftel der benignen und atypischen Meningeome wies eine Methylierung von *p16* auf. Von den anaplastischen Meningeomen war etwa ein Viertel *p16*-methyliert, siehe Abbildung 33. Ein signifikanter Zusammenhang der *p16*-Hypermethylierung und WHO-Graden zeigte sich nicht ($p=0.893$)



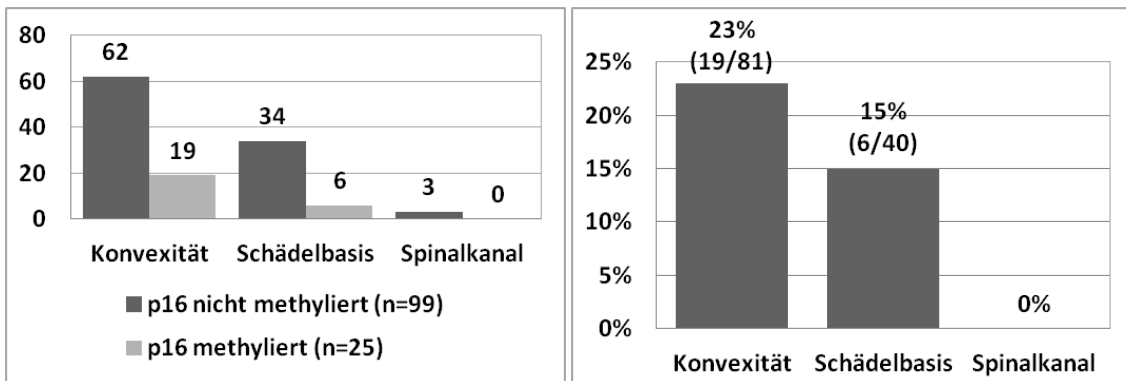
Abbildungen 32 und 33: Links: Verteilung der WHO-Grade jeweils für unmethylierte und methylierte Meningeome. **Rechts:** Häufigkeit methylierter Fälle in den drei WHO-Graden.

3.3.2 Lokalisationsverteilung

Sowohl Meningeome mit *p16*-Methylierung (79%) als auch ohne *p16*-Methylierung (63%) waren am häufigsten an der Konvexität lokalisiert. Die Schädelbasis stellte - ebenfalls unabhängig vom Methylierungsstatus - die zweithäufigste Lokalisation dar. Dort waren Meningeome mit Methylierung von *p16* jedoch etwas seltener (24%) als die unmethylierten Fälle (34%). Im Spinalkanal fanden sich nur Meningeome ohne eine Promotormethylierung von *p16*, siehe Abbildung 34.

Die Häufigkeit von Methylierungen des *p16*-Promotors war bei Meningeomen der Konvexität am größten (23%). An der Schädelbasis wurde bei 15 Prozent der Meningeome eine *p16*-Methylierung festgestellt, vergleiche Abbildung 35.

In der statistischen Analyse fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung von *p16* und der Meningeomlokalisierung ($p=0.569$).



Abbildungen 34 und 35: Links: Verteilung der Lokalisationen jeweils für unmethylierte und methylierte Meningeome. Rechts: Häufigkeit des Auftretens von Methylierungen in den Lokalisationsgruppen.

3.3.3 Vergleich mit FISH-Analysen

Die meisten Meningeome - unabhängig vom Methylierungsstatus von *p16* - zeigten mindestens eine chromosomale Deletion. Sowohl methylierte als auch unmethylierte Meningeome wiesen in ca. 40 Prozent der Fälle einen 1p36-Verlust auf. Auch für den kombinierten 22q-Verlust fand sich kein Unterschied zwischen Meningeomen mit und ohne *p16*-Methylierung (je 52%), siehe Abbildung 36. Eine isolierte 22q-Deletion zeigten 18 Prozent der nicht-methylierten und 26 Prozent der methylierten Meningeome. Die 9p21-Deletion wurde in fünf Prozent der Tumoren ohne Methylierung und 13 Prozent der Meningeome mit einer *p16*-Methylierung gefunden.

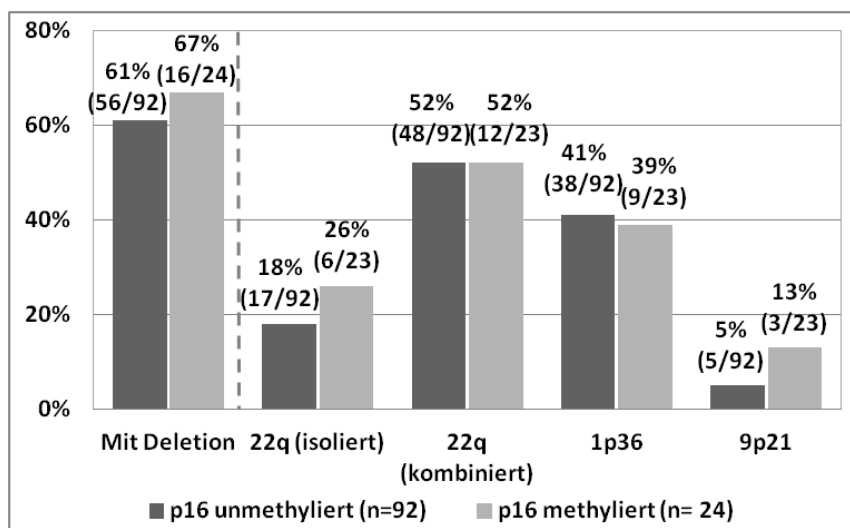


Abbildung 36: Häufigkeit der Chromosomenverluste jeweils für methylierte und unmethylierte Meningeome.

Eine Methylierung des *p16*-Promotors fand sich am häufigsten in der Gruppe mit 9p21-Verlust (38%), wobei erneut auf die kleine Fallzahl der Gruppe hingewiesen wird. Bei allen weiteren zytogenetischen Gruppen war kaum ein Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens einer *p16*-Methylierung feststellbar, siehe Abbildung 37.

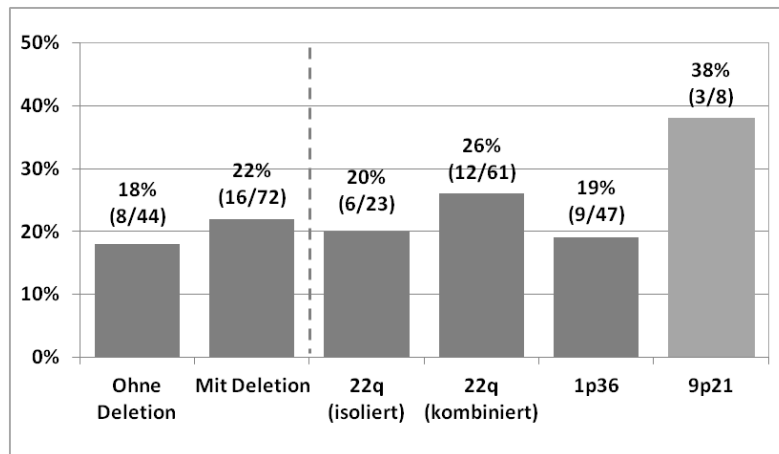


Abbildung 37: Häufigkeit von *p16*-Methylierungen in den sechs zytogenetischen Gruppen.

In der Gesamtpopulation war die *p16*-Methylierung weder mit einer Deletion allgemein ($p=0.645$), noch mit den Verlusten von 22q (isoliert: $p=0.398$, kombiniert: $p=1$), 1p36 ($p=1$) oder 9p21 ($p=0.359$) assoziiert. Bei den Rezidivtumoren zeigte sich dagegen in 67 Prozent (2/3) der Fälle mit *p16*-Methylierung eine Deletion von 9p21 (statistisch signifikant $p=0.035$).

3.4 Epi- und Zytogenetische Analysen in der Meningeomprogression

Von 14 Patienten standen sowohl Erst- als auch Rezidivtumoren für epi- und zytogenetische Analysen zur Verfügung. Dadurch konnten Veränderungen und mögliche Zusammenhänge dieser Parameter im Hinblick auf die Meningeomprogression genauer untersucht werden.

Tabelle 12: Übersicht über die Ergebnisse der epi- und zytogenetischen Analysen.

Lfd. Nr.	Patient	Op-Nr.	WHO	Präsentation	TIMP3	p16	1p36	22q	9p21
MN 64	P 62 §	987/08	2	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 65	P 62 §	559/10	2	Rezidiv	M	U	-1	-1	0
MN 77	P 74	1745/09	2	Ersttumor	U	M	-1	0	0
MN 78	P 74	876/10	2	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 83*	P 79	232/03	3	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 84*	P 79	798/03	3	Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 85*	P 80	1534/97	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 86*	P 80	1767/04	1	Rezidiv	M	U	nd	nd	nd
MN 87*	P 81	828/02	1	Ersttumor	nd	U	0	0	0
MN 88*	P 81	91/05	1	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 89*	P 82	244/05	1	Ersttumor	M	U	0	0	0
MN 90*	P 82	295/07	1	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 91*	P 83	1407/97	2	Ersttumor	U	U	nd	nd	nd
MN 92*	P 83	1014/07	2	Rezidiv	U	U	0	0	0
MN 93*	P 84	904/00	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 94*	P 84	1382/08	2	Rezidiv	M	U	-1	0	-1
MN 106*	P 96	1072/99	2	Ersttumor	U	U	0	-1	0
MN 107*	P 96	32/02	2	Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 112*	P 101	1210/98	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 113*	P 101	1778/99	2	1. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 114*	P 101	67/02	2	2. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 115*	P 102	379/01	3	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 116*	P 102	1342/01	3	1. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 117*	P 102	1808/01	3	2. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 118*	P 103	587/99	2	Ersttumor	U	U	0	0	0
MN 119*	P 103	570/02	2	Rezidiv	U	U	nd	nd	nd
MN 121*	P 105 §	704/01	2	Ersttumor	U	U	-1	-1	0
MN 122*	P 105 §	961/07	2	1. Rezidiv	U	U	-1	-1	0
MN 123	P 105 §	201/09	3	2. Rezidiv	M	U	-1	-1	-1
MN 124	P 105 §	516/10	3	3. Rezidiv	M	M	nd	nd	-1
MN 125*	P 106	2090/01	nd	Ersttumor	nd	U	nd	nd	nd
MN 126*	P 106	1196/08	1	Rezidiv	U	U	-1	-1	0

* = Daten von Dennis Kraemer; § = verstorben; nd = nicht durchgeführt; U = unmethyliert; **M** = methyliert; -1 = Verlust; 0 = kein Verlust des Chromosomenabschnitts

3.4.1 WHO-Grade

Bei 13 der Primärtumoren lag eine WHO-Grad-Klassifizierung vor. Diese setzten sich aus drei (23%) benignen, acht (62%) atypischen und zwei (15%) anaplastischen Meningeomen zusammen. Nur bei einem Patienten veränderten sich die WHO-Grade im Verlauf: Erstmeningeom sowie Erstrezidiv von Patient P 105 wurden beide als atypisch klassifiziert, während Zweit- und Drittmanifestation anaplastische Merkmale zeigten. Alle anderen Rezidive hatten den gleichen WHO-Grad wie ihre Erstmanifestationen.

3.4.2 Zytogenetische Veränderungen

Bei sieben (7/13) Patienten wies das Primärmeningeom keine chromosomale Deletion auf; drei dieser Patienten entwickelten jedoch im Verlauf mindestens eine 1p36-Deletion. In einem Fall folgte ein kombinierter 1p36- und 9p21-Verlust.

Von 18 Rezidiven hatten 14 eine Deletion von mindestens einem Chromosomenabschnitt. Neun der Rezidive mit Deletion hatten einen kombinierten 1p36- und 22q-Verlust, eines eine Deletion von allen drei Abschnitten. Eine 9p21-Deletion wurde bei drei Rezidiven, jedoch bei keinem der Erstmeningeome gefunden. Die 9p21-Deletion trat dabei immer im Zusammenhang mit einer *TIMP3*-Methylierung auf (statistisch signifikant: $p=0.007$).

3.4.3 Deletionen und Rezidivverhalten

Alle drei Patienten mit kombiniertem 1p36- und 22q-Verlust im Erstmeningeom entwickelten mindestens zwei Rezidive.

3.4.4 Epigenetische Veränderungen

Eine *TIMP3*-Promotormethylierung wurde bei drei Patienten schon im Primärmeningeom gefunden, wobei zwei die Methylierung im Rezidiv beibehielten. In drei weiteren Fällen zeigte sich erst im Rezidiv eine *TIMP3*-Methylierung. Die mittels FISH untersuchten *TIMP3*-methylierten Rezidive wiesen alle mindestens einen Verlust der untersuchten Chromosomenabschnitte auf (insignifikant, $p=0.539$).

Eine *p16*-Promotormethylierung trat bei einem Erstmeningeom und einem Viertrezidiv, hier zusammen mit einer *TIMP3*-Methylierung, auf.

3.4.5 Betrachtung ausgewählter Fälle

- Patient P 62 (WHO-Grad II) wies eine *TIMP3*-Hypermethylierung in Erstmeningeom und Rezidiv auf. Bei Letzterem lag zusätzlich auch ein kombinierter Verlust von 1p36 und 22q vor.
- Bei Patient P 80 wurden beide Manifestationen als benigne eingestuft. Beide wiesen eine *TIMP3*-Hypermethylierung auf. Bei diesem Patienten stand keine FISH-Analyse des Rezidivs zur Verfügung.
- Auch Erstmeningeom und Rezidiv von Patient P 82 zeigten histopathologisch nur benigne Merkmale. Hier wurde im Erstumor eine *TIMP3*-Methylierung gefunden, welche im Rezidiv nicht mehr nachweisbar war.
- Das atypische Meningeom von Patient P 84 war in seiner Erstmanifestation zyto- und epigenetisch unauffällig. Im Rezidiv zeigte sich neben Deletionen von 1p36 und 9p21 auch eine Methylierung von *TIMP3*.
- Zwei Fälle mit mehr als einem Rezidiv zeigten von Anfang an eine kombinierte Deletion von 1p36 und 22q und behielten diese auch bei. Epigenetische Veränderungen traten bei diesen Tumoren nicht auf.
- Der dritte Patient (P 105) mit multiplen Rezidiven zeigte bereits im Erstmeningeom einen kombinierten 1p36- und 22q-Verlust. Ab dem Drittrezidiv kam es zu einer Hochstufung des WHO-Grades von II auf III. Gleichzeitig traten ein 9p21-Verlust und eine Promotormethylierung von *TIMP3* auf. Im Viertrezidiv wurde zusätzlich noch eine *p16*-Hypermethylierung festgestellt.

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Erkenntnisse

Frauen erkranken generell häufiger an Meningeomen als Männer [Riemenschneider MJ et al. 2006; Ketter R 2008]. Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit mit einem Geschlechterverhältnis von 2,5 : 1 (w : m). Das mittlere Alter der hier untersuchten Patientenpopulation betrug 58,7 Jahre mit einer Standardabweichung von 13,4 Jahren. Die Follow-Up-Zeit betrug 37,5 Monate. Bei der Mehrzahl (84/100) der Patienten war bis zum 31.12.2011 kein Rezidiv bekannt.

Meningeome sind in den meisten Fällen Tumoren mit benignen Eigenschaften. Auch in dem hier betrachteten Tumorkollektiv waren 53 Prozent, und somit die Mehrzahl der Meningeome, WHO-Grad-I-Tumoren. Am zweithäufigsten waren Meningeome des WHO-Grades II (37%). Diese waren, wie auch die anaplastischen Meningeome (10%), etwas häufiger als für die Allgemeinbevölkerung erwartet werden würde. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich der hohe Rezidivanteil (21%), welcher der Fragestellung wegen eingeschlossen wurde. Vor allem in den höhergradigen Meningeomen war der Anteil an Rezidiven hoch: Ein Viertel der atypischen und zwei Drittel der anaplastischen Fälle waren Rezidivmeningeome. Wie erwartet zeigte sich außerdem, dass die Rezidive im Gegensatz zu den Erstmanifestationen eher maligne Merkmale aufwiesen: Während bei den Rezidiven vor allem WHO-Grad II und III (81% der Rezidive) vorherrschten, waren 62 Prozent der Erstmeningeome benigne (statistisch signifikant, $p=0.001$).

Studien zur Rezidivwahrscheinlichkeit haben gezeigt, dass WHO-Grad-II-Meningeome in bis zu 40 Prozent, WHO-Grad-III-Meningeome sogar in bis zu 79 Prozent der Fälle Rezidive entwickeln [Kim YJ et al. 2009; Ketter R 2008; Campbell BA et al. 2009]. So war es nicht überraschend, dass auch in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich Patienten mit höhergradigen Primärmanifestationen schon Rezidive entwickelt hatten: Bis zum 31.12.2011 war bei 29 Prozent der atypischen und 50 Prozent der anaplastischen Primärmeningeome bereits ein Rezidiv bekannt. Die benignen Ersttumoren hatten dagegen eine deutlich niedrigere Rezidivrate von nur fünf Prozent. Meningeome mit WHO-Grad II und III zeigten außerdem ein signifikant kürzeres rezidivfreies Intervall ($p<0.001$).

Die von Zang [2001], Ketter [2008] und Lekanne-Deprez et al. [1995] festgestellte Häufung der WHO-Grade II und III bei Männern zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit ab: Meningeome von männlichen Patienten waren in 42 Prozent atypisch und in 19 Prozent anaplastisch, während bei den

Frauen 36 Prozent zu den atypischen und nur sechs Prozent zu den anaplastischen Meningeomen gehörten (signifikant, $p=0.03$).

Die häufigste Meningeomlokalisierung in der untersuchten Patientenpopulation war, wie bereits 2008 von Ketter beschrieben, die Konvexität (nach Einteilung in drei Lokalisationsgruppen). Im Spinalkanal waren die Meningeome dagegen - wie bei Greenberg [2006] und bei Ketter [2008] - am seltensten lokalisiert (4/126). Diese spinalen Meningeome waren allesamt Erstmanifestationen und in 75 Prozent der Fälle benigne Tumoren, was sich ebenfalls gut mit früheren Beobachtungen deckt [Zang KD 2001]. Die Schädelbasismeningeome der vorliegenden Arbeit zeigten in über 50 Prozent der Fälle benigne Merkmale, während atypische und anaplastische Merkmale bei Meningeomen an der Konvexität am häufigsten waren: Dort fanden sich 92 Prozent (11/12) aller anaplastischen Fälle. Die Tendenz von Konvexitätsmeningeomen zu höhergradigen und von Spinalkanalmeningeomen zu benignen Formen ist ebenfalls bereits von Ketter vorbeschrieben [Ketter R 2008].

Chromosomale Verluste sind häufige Veränderungen in Meningeomen. Auch in dieser Arbeit wurde bei der Mehrzahl der Meningeome (62%) mindestens eine chromosomale Deletion beobachtet. Wie von verschiedenen Arbeitsgruppen vorbeschrieben, war auch hier die (kombinierte) Deletion des langen Arms von Chromosom 22, welche in über der Hälfte der Meningeome auftrat, am häufigsten [Zang H & Singer KD 1967; Dumanski JP et al. 1990; Meese E et al. 1987; Weber RG et al. 1997; Riemenschneider MJ et al. 2006]. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 war in der vorliegenden Patientenpopulation mit 41 Prozent am zweithäufigsten. Auch in Studien von Lindblom et al. und Weber et al. wurde diese Beobachtung gemacht [Lindblom A et al. 1994; Weber RG et al. 1997]. Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 sind im Allgemeinen seltener [Boström J et al. 2001; Riemenschneider MJ et al. 2006]. Dies zeigte sich auch bei den hier untersuchten Meningeomen, bei denen der kurze Arm von Chromosom 9 nur in sieben Prozent der Fälle deletiert war.

Generell treten chromosomale Aberrationen in Meningeomen bei Männern häufiger auf als bei Frauen [Lekanne-Deprez RH et al. 1995]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden bei Männern häufiger Deletionen festgestellt (75% vs. 57%). Vor allem die progressionsassoziierten Verluste von 1p36 und 9p21 traten häufiger bei Meningeomen von männlichen Patienten auf, was frühere Beobachtungen von Lekanne-Deprez et al. bestätigt [Lekanne-Deprez RH et al. 1995]. Eine 1p36-Deletion trat bei 54 Prozent der Männer und nur 35 Prozent der Frauen auf. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied war bei der 9p21-Deletion statistisch signifikant ($p=0.01$): 17 Prozent der Männer und nur zwei Prozent der Frauen wiesen den Verlust auf.

Die Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen wird unter anderem durch chromosomale Deletionen bestimmt. Während Meningeome mit einem isolierten 22q-Verlust nur ein geringes Rezidivrisiko haben, gelten die Deletionen von 1p36 und 9p21 als Marker für Malignität und Progression. Diese sind vor allem in höhergradigen Meningeomen zu finden [Ketter R et al. 2001 und 2007; Niedermayer I et al. 1997a; Perry A et al. 1999 und 2002; Steudel WI et al. 1996]. Somit ist es nicht überraschend, dass bei keinem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rezidive eine isolierte 22q-Deletion gefunden wurde (signifikant, $p=0.003$). Die Rezidive wiesen jedoch in 70 Prozent eine Deletion von 1p36 und in 21 Prozent eine Deletion von 9p21 auf. Primärmeningeome hatten dagegen in nur 33 Prozent eine 1p36- (signifikant, $p=0.001$) und in drei Prozent eine 9p21-Deletion (signifikant, $p=0.001$). Während Patienten mit einer 1p36-Deletion erwartungsgemäß ein signifikant kürzeres rezidivfreies Intervall zeigten ($p=0.027$), hatten solche mit einer isolierten 22q-Deletion signifikant längere rezidivfreie Intervalle ($p=0.049$) und damit eine bessere Prognose.

Wie erwartet wurde in der vorliegenden Arbeit bei fast allen anaplastischen (92%) und bei der Mehrzahl der atypischen Meningeome (70%) mindestens ein chromosomaler Verlust gefunden (signifikant, $p=0.013$). Isolierte 22q-Deletionen traten nur bei benignen (22%) und atypischen (23%) Meningeomen auf. Bei den Fällen mit kombinierter 22q-Deletion waren die WHO-Grade wie folgt verteilt: Grad I: 45 Prozent, Grad II: 58 Prozent, Grad III: 72 Prozent. Der höhere Anteil an atypischen und anaplastischen Fällen lässt sich vor allem dadurch erklären, dass in der Gruppe auch Fälle eingeschlossen waren, die zusätzlich schon Verluste von 1p36 und 9p21 aufwiesen. 1p36- und 9p21-Deletionen waren in der vorliegenden Studie signifikant häufiger bei höhergradigen Meningeomen zu finden als bei den benignen Fällen. Der Chromosomenabschnitt 1p36 war bei 29 Prozent (18/62) der benignen, 47 Prozent (20/43) der atypischen und 82 Prozent (9/11) der anaplastischen Meningeome deletiert ($p=0.002$). Hinsichtlich der Deletion von 9p21 fielen vor allem die anaplastischen Meningeome auf: Während benigne und atypische Meningeome die Veränderung nur in zwei bis fünf Prozent der Fälle aufwiesen, stieg der Anteil bei den anaplastischen mit 42 Prozent stark an ($p<0.001$). Diese Ergebnisse decken sich mit den oben erwähnten Aussagen früherer Publikationen, wonach 1p36- und 9p21-Deletionen, im Gegensatz zur isolierten 22q-Deletion, mit höheren WHO-Graden und somit höherer Malignität assoziiert sind [Dumanski JP et al. 1987; Lindblom A et al. 1994; Weber RG et al. 1997; Zankl H & Zang KD 1980; Zang KD 2001; Ketter R et al. 2001 und 2007; Niedermayer I et al. 1997a; Perry A et al. 1999 und 2002; Steudel WI et al. 1996]. Verluste von 1p36 traten signifikant häufig gemeinsam mit Deletionen von 22q auf (37/47) ($p<0.001$), während isolierte Deletionen von 1p36 (17% (8/47)) eher selten waren. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, der zufolge ein 22q-Verlust als initiales Ereignis in Meningeomen auftritt, auf die dann weitere Deletionen, insbesondere der von 1p36, folgen [Müller P et al. 1999; Lekanne-Deprez RH et al. 1995, Ketter R et al. 2001 und 2007; Al Saadi A et al. 1987; Perry A et al. 1996; Henn W et al. 1995;

Niedermayer I et al. 1997a; Boström J et al. 1997; Leone PE et al. 1999; Lamszus K et al. 1999]. Die Deletion von 9p21 trat signifikant häufig zusammen mit der von 1p36 auf, was wahrscheinlich darin begründet liegt, dass Deletionen von 9p21 fast ausschließlich bei WHO-Grad-III-Meningeomen auftreten. Diese haben im Laufe ihrer Progression meist schon 1p36-Deletionen erlitten, auf die dann die 9p21-Deletion gefolgt ist.

Die Verteilung und Häufigkeit verschiedener chromosomaler Verluste im Hinblick auf die Meningeomlokalisierung wurde bereits in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe untersucht. Hierbei fiel auf, dass fast alle spinalen Meningeome eine isolierte Deletion von 22q aufweisen [Zankl H und Zang KD 1980; Ketter R et al. 2007]. Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit gemacht werden, in der alle vier spinalen Meningeome einen 22q-Verlust zeigten. Nur einer dieser Fälle hatte einen zusätzlichen 1p36-Verlust. Bei Konvexitätsmeningeomen traten dagegen gehäuft 1p36-Deletionen auf, was sich ebenfalls gut mit früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe deckt [Ketter R et al. 2007].

4.2 Methylierung allgemein

Aberrante Promotor-Hypermethylierungen spielen eine Rolle bei der Entwicklung und Progression zahlreicher menschlicher Tumoren. Dass sie tumorspezifisch sind und zu einem Expressionsverlust der betroffenen Gene führen, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden [Liu Y et al. 2005; Lusa EA et al. 2005]. Die Methylierungs-Sensitive PCR ist eine etablierte Methode um Promotormethylierungen festzustellen. Auch für Meningeome wird angenommen, dass die Genmethylierung einen wichtigen Mechanismus in der Entstehung und womöglich auch der Progression darstellt. Bei kontroverser Studienlage ist die Rolle der Hypermethylierung von *TIMP3* und *p16* jedoch noch nicht abschließend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 126 Meningeome auf eine Methylierung der Promotoren von *TIMP3* und *p16* untersucht. Insgesamt war bei 32 Prozent (40/126) der Meningeomproben mindestens einer der beiden Promotoren methyliert. In 29 Prozent (37/126) der Meningeome zeigte sich eine Methylierung von einem der beiden Promotoren, in zwei Prozent (3/126) waren beide methyliert. Somit war eine Methylierung fast ebenso häufig wie bei Bello und Kollegen, bei denen in 31 Prozent der Fälle ein und in fünf Prozent beide Promotoren methyliert vorlagen [Bello MJ et al. 2004b]. Die Tatsache, dass nur drei der 40 methylierten Meningeomproben eine gleichzeitige Methylierung von *TIMP3* und *p16* aufwiesen, lässt den Schluss zu, dass die gleichzeitige Methylierung beider Promotoren eine Ausnahme zu sein scheint. Es ist daher möglich, dass bei Meningeomen epigenetische Subgruppen existieren, in denen unterschiedliche Promotoren hypermethyliert vorliegen.

Promotormethylierungen traten in der vorliegenden Arbeit häufiger bei Meningeomen von Männern auf als bei solchen von Frauen (39% vs. 29%) (nicht signifikant, $p=0.295$). Es scheint, als würden Meningeome von männlichen Patienten generell mehr Modifikationen anhäufen als solche von weiblichen, da auch chromosomale Aberrationen häufiger auftreten. Dieses auffällige Phänomen kann noch nicht erklärt werden und sollte deshalb Gegenstand künftiger Forschung sein.

Interessanterweise zeigten Primärmeningeome und Rezidive etwa gleich häufig Promotormethylierungen (Primärtumoren 47% vs. Rezidive 44%), was darauf hindeutet, dass kein Zusammenhang zwischen Methylierung allgemein und Tumorpräsentation besteht.

Im Gegensatz zur Studie von Liu et al., bei der eine Methylierung signifikant häufiger in atypischen und anaplastischen Meningeomen war, waren die drei WHO-Grade in der vorliegenden Arbeit zu fast gleichen Anteilen methyliert, siehe Abbildung 19 [Liu Y et al. 2005].

Im Hinblick auf die Lokalisationsverteilung ergaben sich deutliche Unterschiede, wenn auch ohne statistische Signifikanz ($p=0.643$). Spinale Meningeome scheinen keine oder nur selten eine Methylierung der untersuchten Gene aufzuweisen (0/4). Dies muss allerdings an einer größeren Fallzahl überprüft werden. An der Konvexität (34%) und der Schädelbasis (24%) tritt eine Promotor-Hypermethylierung dagegen nicht selten auf.

Von den hier untersuchten Meningeomen mit einer Hypermethylierung konnte in 58 Prozent der Fälle gleichzeitig eine Deletionen von einer oder mehreren chromosomalen Regionen festgestellt werden. Diese Daten stehen im Einklang mit einer Studie von Bello et al., bei der Meningeome mit einer Methylierung von *TIMP3* und/oder *p16* in 54 Prozent der Fälle ebenfalls eine Deletion von 1p36 und/oder 22q aufwiesen [Bello MJ et al. 2004b]. Der Abschnitt 9p21 wurde von Bello und Kollegen nicht untersucht.

Methylierte wiesen nicht häufiger als unmethylierte Meningeome einen Verlust der Abschnitte 22q und/oder 1p36 auf. Es scheint somit kein Zusammenhang zwischen diesen Veränderungen zu bestehen. Bemerkenswert ist, dass Deletionen von 9p21 bei Meningeomen mit einer Promotormethylierung in 13 Prozent (5/38) und somit häufiger festgestellt wurden als bei solchen ohne Methylierung (4% (3/79)). Dies deutet darauf hin, dass methylierte Meningeome eher zu 9p21-Deletionen tendieren als nicht-methylierte.

Bei Betrachtung der zytogenetischen Gruppen fiel nur in einem Fall ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Promotormethylierung und chromosomalen Deletionen auf: In der Gruppe mit 9p21-Deletion waren 62,5 Prozent (5/8) der Fälle methyliert. Unter alleiniger Berücksichtigung der Rezidive war dieser Zusammenhang sogar statistisch signifikant ($p=0.003$): Bei 80 Prozent (4/5) mit einem 9p21-Verlust fand sich eine Methylierung. Das gemeinsame Auftreten dieser beiden Veränderungen, von denen die 9p21-Deletion als Malignitäts- und Progressionszeichen gilt [Perry A et al. 2002; Riemenschneider MJ et al. 2006], stützt die Annahme eines Zusammenhangs zwischen aberranter Genmethylierung und Progression [Liu Y et al. 2005]. Bedacht werden muss jedoch die kleine Fallzahl an Meningeomen mit einer 9p21-Deletion. Weitere Studien zur Überprüfung dieser Vermutung sind also unerlässlich.

4.3 Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors

Promotor-Hypermethylierungen der *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)* werden in vielen menschlichen Tumorarten gefunden. Hierzu gehören unter anderem Kopf-Halstumoren, Bronchial-, Mamma-, Nieren- und Magenkarzinome sowie Oligodendrogliome [Righini CA et al. 2007; Bachmann KE et al. 1999; Hong C et al. 2003; Prawitt B & Zabel D 2005]. Die Bedeutung einer Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors in Meningeomen ist allerdings unklar und die Studienlage widersprüchlich: Während Liu et al. und Anselmo et al. keine Methylierung feststellen konnten, fanden Bello und Kollegen in 24 Prozent, Barski et al. in 28 Prozent der Fälle eine solche [Liu Y et al. 2005; Anselmo NP et al. 2006, Bello MJ et al. 2004b].

In der vorliegenden Arbeit betrug der Anteil *TIMP3*-methylierter Fälle 15 Prozent und war somit niedriger als bei Bello et al. und Barski et al. Die abweichenden Ergebnisse könnten unter anderem durch eine unterschiedliche Methodik zum Methylierungsnachweis entstanden sein: Für die vorliegende Arbeit und von Bello et al. wurde die MS-PCR eingesetzt, Barski et al. gewannen ihre signifikanten Resultate mittels Bisulfitsequenzierung. Eine weitere Erklärung könnten unterschiedliche Primerlokalisationen sein: In allen Studien wurden verschiedene Primer genutzt und somit verschiedene Abschnitte der CpG-Insel auf eine Methylierung untersucht, vergleiche Abbildung 16 im Kapitel 2.2.4.1. Der Einfluss von Primerlokalisation und Methodik auf die Ergebnisse wird bei näherer Betrachtung der Studie von Barski et al. deutlich. Zunächst konnte in der MS-PCR keine Methylierung von *TIMP3* festgestellt werden. Auch eine Bisulfitsequenzierung der Region -72 bis -50 zeigte keine Methylierung. Erst nach Durchführung einer Bisulfitsequenzierung mit Verwendung anderer Primer, welche mit dem Translationsstart (-18 bis +2) überlappten, erhielten Barski und Kollegen die oben genannten Ergebnisse. Von diesen zweiten Sequenzierungsprimern wurde jedoch keine der CpG-Positionen erfasst, die zuvor durch die Primer der MS-PCR und in der ersten Sequenzierung untersucht worden waren. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Primerlokalisation gewählt, die bereits in einer Arbeit zu Kopf-Halstumoren von Righini et al. erfolgreich angewandt wurde [Righini CA et al. 2007]. Die eingesetzten Primer binden weiter distal in der CpG-Insel und scheinen sensitiver zu sein als die von Barski et al. in der MS-PCR verwendeten. Der Reverse-Primer liegt zudem in der Region, die von Barski et al. in der zweiten Sequenzierung analysiert wurde. Inwieweit Primerlokalisation und verwendete Methode eine Rolle spielen, sollte in geeigneten Studien überprüft werden. Weiterhin wäre es wünschenswert diejenigen Primerlokalisationen und Methoden zu identifizieren, die am sensitivsten und spezifischsten eine Promotormethylierung nachweisen, vergleiche hierzu auch Kapitel 4.6.4.

Eine statistisch signifikanter Zusammenhang von WHO-Grad III und *TIMP3*-Promotormethylierung wurde von Barski et al. postuliert. Die Arbeitsgruppe fand in 67 Prozent der anaplastischen Meningeome eine Methylierung und somit signifikant häufiger als in atypischen (22%) und benignen (17%) Meningeomen [Barski D et al. 2009]. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen atypischen und anaplastischen Meningeomen gefunden werden (je 17%). Eine *TIMP3*-Methylierung von benignen Meningeomen (13%) war jedoch, wie bei Barski und Kollegen, seltener als bei WHO-Grad II und III (nicht signifikant, $p=0.694$). Eine Methylierung des Promotors scheint somit insgesamt in höhergradigen Meningeomen zwar etwas häufiger zu sein, allerdings nicht in dem bisher angenommenen Ausmaß. Hierzu passen auch die Resultate von Bello et al., die ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang feststellen konnten [Bello MJ et al. 2004b].

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Häufigkeit der Methylierung von *TIMP3* konnten nicht gefunden werden (Männer 18% vs. Frauen 14%).

Bei der lokalisationsabhängigen Analyse fiel auf, dass der Anteil der Meningeome mit *TIMP3*-Methylierung an der Schädelbasis (24%) etwa doppelt so hoch war wie an der Konvexität (11%) (nicht signifikant, $p=0.578$). Diese Beobachtung ist insofern überraschend, als dass Konvexitätsmeningeome häufiger hohe WHO-Grade, mehr Chromosomenveränderungen und ein höheres Rezidivrisiko aufweisen als Schädelbasismeningeome [Ketter R et al. 2007]. Bei genauerer Betrachtung fiel zudem auf, dass der Anteil benigner und zytogenetisch unauffälliger Meningeome bei den methylierten Fällen an der Schädelbasis (55%) größer war als an der Konvexität (33%). Gleichzeitig waren an der Konvexität mehr methylierte Meningeome zytogenetisch verändert (Konvexität 67% vs. Schädelbasis 33%). Dies deutet erstmals auf die Existenz zweier lokalisationsabhängiger Subgruppen von methylierten Meningeomen hin: zum einen die an der Schädelbasis gelegene Gruppe mit hauptsächlich benignen und zytogenetisch unauffälligen Merkmalen. Zum anderen die Gruppe der eher zytogenetisch aberranten und/oder höhergradigen Meningeome an der Konvexität. Unbedingt sollte diese Hypothese an einer größeren Fallzahl überprüft werden.

Verschiedene zytogenetische Veränderungen im Zusammenhang mit einer *TIMP3*-Hypermethylierung sind in der Literatur vorbeschrieben. Bello et al. postulierten einen signifikanten Zusammenhang der *TIMP3*-Methylierung und der 1p36-Deletion alleine oder in Kombination mit einem 22q-Verlust: 40 Prozent der Fälle ihrer Studie mit den genannten Verlusten waren methyliert [Bello MJ et al. 2004b]. Auch in der vorliegenden Arbeit waren 1p36- und kombinierte 22q-Deletionen bei methylierten Meningeomen mit 38 Prozent bzw. 31 Prozent relativ häufig. Allerdings traten diese Veränderungen in den nicht-methylierten Fällen noch häufiger auf (42% bzw. 57%). Bei Barski und Kollegen war die *TIMP3*-Methylierung signifikant mit einer Deletion von 22q assoziiert [Barski D et al. 2009]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Meningeome mit 22q-Deletion jedoch

sowohl bei isoliertem als auch bei kombiniertem 22q-Verlust mit je neun Prozent den geringsten Methylierungsanteil. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Zusammenhang zwischen *TIMP3*-Hypermethylierung und 1p36- oder 22q-Deletion. Die widersprüchlichen Beobachtungen lassen sich möglicherweise auf die geringen Fallzahlen bei Barski et al. (39 Fälle) und Bello et al. (60 Fälle) zurückführen. Für die vorliegende Arbeit wurden deutlich mehr Meningeome (116 Fälle) zytogenetisch untersucht.

Die Deletion von 9p21 war, im Gegensatz zu den anderen Deletionen, bei den methylierten Fällen deutlich häufiger (18%) als bei solchen ohne *TIMP3*-Methylierung (5%). Umgekehrt zeigten Meningeome mit dieser Deletion auch den größten Anteil an *TIMP3*-Methylierungen (37,5%). Bei den Rezidivtumoren war eine *TIMP3*-Methylierung signifikant mit der Deletion von 9p21 assoziiert ($p=0.04$). Dieser Zusammenhang muss jedoch an einem größeren Kollektiv überprüft werden.

Dass eine Methylierung von *TIMP3* mit Malignität einhergeht, schlossen Barski und Kollegen aus dem hohen Methylierungsanteil bei WHO-Grad-III-Meningeomen [Barski D et al. 2010]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die WHO-Klassifikation nicht bestätigt werden. Die Tatsache, dass Rezidive (24%) doppelt so häufig *TIMP3*-methyliert waren wie Erstmeningeome (12%), legt trotzdem einen Zusammenhang mit Malignität nahe. Die Vermutung wird durch die häufig beobachtete *TIMP3*-Methylierung bei Meningeomen mit einer 9p21-Deletion gestützt. Der genannte Verlust gilt als Zeichen erhöhter Malignität [Perry A et al. 2002; Riemenschneider MJ et al. 2006]. Weiterhin war auch in der Analyse der rezidivfreien Zeit eine deutliche Tendenz *TIMP3*-methylierter Meningeome zu kürzeren rezidivfreien Intervallen sichtbar. Diese Tendenz war allerdings nicht signifikant (univariat: $p=0.082$, multivariat: $p=0.055$), was der kurzen Follow-Up-Zeit und einer zu geringen Fallzahl zu Grunde liegen könnte.

Vielfach wurde eine mit dem WHO-Grad ansteigende Anzahl chromosomaler Verluste in Meningeomen beschrieben [Lekanne-Deprez RH et al. 1995, Ketter R et al. 2001 und 2007; Al Saadi A et al. 1987; Perry A et al. 1996; Henn W et al. 1995; Niedermayer I et al. 1997a; Boström J et al. 1997; Leone PE et al. 1999; Lamszus K et al. 1999]. Simon et al. vermuteten deshalb einen Zusammenhang zwischen Meningeomprogression und der Anhäufung chromosomaler Aberrationen [Simon M et al. 1996]. Meningeome scheinen im Verlauf auch epigenetische Modifikationen anzuhäufen. Es wird davon ausgegangen, dass auch diese eine Rolle in der Progression spielen [Bello MJ et al. 2004b; Nakane Y et al. 2007]. Ob hierbei eine bestimmte Veränderung den anderen als initiales Ereignis vorangeht, oder die Gesamtheit der Modifikationen die Progression auslöst, ist derzeit noch unklar. Zang und Kollegen vermuteten, dass nur wenige Veränderungen zur Entstehung und Progression von Meningeomen ausreichen, zusätzlich aber eine Reihe weiterer Modifikationen mit modulierendem Einfluss auftritt [Zang KD 2001]. Eine Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors als alleinige Ursache

für Malignität und Progression ist unwahrscheinlich, da in der vorliegenden Population nur 17 Prozent der malignen Meningeome eine solche Methylierung aufwiesen. Es muss also von dem von Zang postulierten modulierenden Effekt ausgegangen werden.

4.4 Hypermethylierung des *p16INK4A*-Promotors

Bereits 2001 äußerten Boström et al. den Verdacht, dass eine Deletion des *CDNK2A*-Gens, welches für die TSG *p16* und *p14* kodiert, in der Entstehung von malignen Meningeomen eine Rolle spielen könnte. Ihre Annahme beruhte auf der Beobachtung, dass die Deletion in WHO-Grad-III-Meningeomen häufiger war als in solchen niedrigerer WHO-Grade [Weber RG et al. 1997, Boström J et al. 2001]. Weiterhin wurde in anaplastischen Meningeomen und in Rezidiven häufiger eine Expressionsverminderung von *p16INK4A* gefunden [Korshunov A et al. 2003]. Neben der Deletion kommt als Mechanismus einer *p16*-Inaktivierung auch eine Promotor-Hypermethylierung in Frage. Die Studienlage ist hierzu jedoch - wie beim *TIMP3*-Promotor - nicht eindeutig. Während Yin und Kollegen keine Methylierung des *p16*-Promotors in Meningeomen feststellen konnten, fanden andere Arbeitsgruppen eine Hypermethylierung des Promotors in zehn bis 47 Prozent [Tse JY et al. 1998; Boström J et al. 2001; Yin D et al. 2002; Bello MJ et al. 2004b; Chen MN et al. 2004; Kim YJ et al. 2005; Liu Y et al. 2005; Van Tilborg AA et al. 2006; Anselmo NP et al. 2006; Aydemir F et al. 2012].

In der vorliegenden Arbeit war die Methylierung von *p16* mit 20 Prozent ähnlich häufig wie in einer Reihe früherer Studien, bei denen zwischen 17 und 24 Prozent der Meningeome methyliert waren [Tse JY et al. 1998; Bello MJ et al. 2004b; Chen MN et al. 2004; Van Tilborg AA et al. 2006; Anselmo NP et al. 2006]. Bei Bello und Mitarbeitern trat die Methylierung von *TIMP3* (24%) häufiger auf als eine *p16*-Methylierung, welche sie in 17 Prozent der Fälle fanden. In der vorliegenden Arbeit verhielt es sich umgekehrt: *TIMP3* war nur in 15 Prozent der untersuchten Meningeome methyliert, der *p16*-Promotor dagegen in 20 Prozent und somit häufiger. Ein Grund hierfür könnte in den in Kapitel 4.3 erwähnten verschiedenen Primerlokalisationen der *TIMP3*-Analysen liegen.

Männliche Patienten der hier untersuchten Patientenpopulation wiesen häufiger Methylierungen des *p16*-Promotors auf als weibliche (28% vs. 17%). Bei den Rezidiven stammten alle drei methylierten Fälle von Männern. Die beobachtete Häufung der *p16*-Methylierung bei Männern findet sich auch bei Kim et al. Dort konnte sogar ein signifikanter Zusammenhang zwischen männlichem Geschlecht und Hypermethylierung von *p16* gezeigt werden [Kim YJ et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit wiesen (vor allem parasagittale) Meningeome der Konvexität am häufigsten Promotormethylierungen von *p16* auf. Interessanterweise traten Rezidive in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe ebenfalls am häufigsten bei parasagittalen Meningeomen auf [Ketter R 2008]. Als Erklärung könnte entweder eine erschwerte chirurgische Resektion durch die hier häufig auftretende Infiltration venöser Sinus oder eine erhöhte Malignität von Meningeomen dieser Lokalisation dienen [Ketter R 2008]. Trifft Letzteres zu, könnte eine Hypermethylierung von

p16 zur erhöhten Malignität beitragen. Im Gegensatz zu Konvexitätsmeningeomen sind solche im Spinalkanal eher benigner Natur [Ketter R et al. 2007]. Zur vermuteten Progressionsbeteiligung einer *p16*-Hypermethylierungen passend, waren alle spinalen Meningeome unmethyliert.

Im Hinblick auf die WHO-Klassifikation ist die Datenlage zur *p16*-Methylierung widersprüchlich. Bei Kim et al. traten Methylierungen in allen WHO-Graden auf, waren allerdings in Grad-II-Meningeomen am häufigsten. Zwischen benignen und anaplastischen Meningeomen war der Unterschied nur gering [Kim YJ et al. 2005]. Liu und Mitarbeiter beobachteten eine Methylierung von *p16* sogar ausschließlich in atypischen Meningeomen (26%) [Liu Y et al. 2005]. Dagegen fanden zwei weitere Arbeitsgruppen eine *p16*-Methylierung viel häufiger bei anaplastischen (je 67%) als bei benignen und atypischen Meningeomen (Tse et al.: 8% und 25%, Bello et al.: 15% und 18,5%) [Tse JY et al. 1998; Bello MJ et al. 2004b]. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Methylierung von *p16* und höheren WHO-Graden ergab sich jedoch in keiner Studie. In der vorliegenden Arbeit waren benigne und atypische Meningeome etwa gleich häufig *p16*-methyliert (20% vs. 19%). Der Anteil war bei anaplastischen Meningeomen mit 25 Prozent zwar etwas höher, allerdings ebenfalls ohne statistische Signifikanz ($p=0.893$).

In der FISH-Analyse konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen methylierten und nicht-methylierten Meningeomen festgestellt werden. Lediglich der isolierte 22q-Verlust trat etwas häufiger bei *p16*-methylierten Meningeomen auf (26% vs. 18%, nicht signifikant: $p=0.398$).

Die Häufigkeit einer *p16*-Methylierung betrug in allen zytogenetischen Gruppen, exklusive der mit 9p21-Deletion, etwa 20 Prozent. Bello und Kollegen fanden leicht erhöhte, jedoch insignifikante Methylierungsraten in Meningeomen mit einer 1p-Deletion (23% mit 1p-Deletion vs. 17% ohne 1p-Deletion). In der vorliegenden Arbeit waren die Methylierungsraten von Meningeomen mit 1p-Deletion nicht erhöht (19% mit 1p36-Deletion vs. 20% ohne 1p36-Deletion), sodass ein Zusammenhang zwischen beiden Veränderungen unwahrscheinlich ist.

Auffällig war, dass *p16*-methylierte Meningeome etwa dreimal so häufig 9p21-Verluste aufwiesen wie unmethylierte. Gleichzeitig waren Tumoren mit einer Deletion von 9p21 auch am häufigsten methyliert (38%). Bei den Rezidivfällen war dieser Zusammenhang sogar statistisch signifikant ($p=0.035$). Ein Zusammenhang zwischen einer 9p21-Deletion und einer *p16*-Hypermethylierung liegt demnach nahe.

Mithilfe des Two-Hit-Modells nach Knudson lässt sich das Zusammenwirken beider Veränderungen erklären. Hierfür muss bekannt sein, dass auf dem Abschnitt 9p21 das Gen *CDKN2A* liegt, welches für das TSG *p16* kodiert. Dem Knudsonschen Modell zufolge führt die Inaktivierung beider Allele eines TSG zum Selektionsvorteil der betroffenen Zelle. Zu einem kompletten Verlust der inhibierenden

Funktion von *p16* kann es durch verschiedene Kombinationen aus zyto- und epigenetischen Veränderungen kommen. Ein Allel von *p16* kann z.B. durch Deletionen des ganzen Abschnitts (9p21) oder nur des Gens *CDKN2A*, ein zweites durch Hypermethylierung des Promotors inaktiviert werden. Es können also sowohl Deletionen der kodierenden DNA-Abschnitte als auch Promotor-Hypermethylierungen von *p16* durch einen Selektionsvorteil zur Meningeomprogression beitragen.

Da eine *p16*-Methylierung bereits in 20 Prozent der benignen und atypischen Meningeome vorliegt, kann es als wahrscheinlich gelten, dass diese epigenetische Modifikation die erste der zwei benötigten Veränderungen sein kann. Eine zwingende Voraussetzung für Progression ist die Methylierung von *p16* jedoch nicht, schließlich findet sich diese nur in einem Viertel der WHO-Grad-III-Meningeome.

Insgesamt sind Deletionen von 9p21 selten, weshalb für die vorliegende Arbeit nur wenige solcher Tumoren für Vergleiche mit epigenetischen Veränderungen zur Verfügung standen. Um die hier aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, sind größere Fallzahlen notwendig, was am besten im Rahmen einer multizentrischen Studie erreicht werden kann.

4.5 Progression zyto- und epigenetischer Veränderungen

Durch die Untersuchung von Primär- und dazugehörigen Rezidivmeningeomen können im Verlauf der Meningeomprogression auftretende Veränderungen aufgedeckt und außerdem deren Zusammenhänge mit WHO-Graden analysiert werden. Möglicherweise lassen sich so progressionsassoziierte Veränderungen identifizieren, die als initiales Ereignis in der Meningeomprogression auftreten. Solche Veränderungen könnten zukünftig als Progressionsmarker dienen und es ermöglichen, Meningeome mit hohem Rezidivrisiko noch vor dem Auftreten histopathologischer Malignitätszeichen zu erkennen.

In der hier untersuchten Progressionsgruppe waren ca. drei Viertel (10/13) der Primärmanifestationen atypische und anaplastische Meningeome und somit solche mit einem erhöhtem Rezidivrisiko. Die Gruppe enthielt jedoch auch drei histopathologisch benigne Tumoren. Eine Hochstufung des WHO-Grades erfuhr im Progressionsverlauf nur Patient P 105, der auch mehrere Rezidive entwickelte. Zweit- und Drittrezidiv des Patienten wurden als anaplastisch eingestuft, während Erstmanifestation und Erstrezidiv nur atypische Merkmale aufwiesen.

Die FISH-Analyse der Rezidive ergab vermehrt zytogenetische Malignitätsmerkmale. Während die Hälfte der Primärmeningeome noch keine Deletionen aufwies, hatten 78 Prozent (14/18) der Rezidive mindestens eine Deletion. Dass vor allem die 1p36-Deletion häufig gefunden wurde, ist nicht überraschend. Sie trat nur in einem Fall ohne gleichzeitige 22q-Deletion auf. Wie bereits erläutert, wird angenommen, dass der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 in der Meningeomprogression als zweiter Schritt auf die 22q-Deletion folgt und für die Progression und ein verkürztes rezidivfreies Überleben verantwortlich ist. Die Tatsache, dass die atypischen und anaplastischen Rezidive häufiger Deletionen aufwiesen, bestätigt die Theorie verschiedener Studien, laut der höhergradige Meningeome zur Hypodiploidie neigen [Lekanne-Deprez RH et al. 1995; Ketter R et al. 2001 und 2007; Al Saadi A et al. 1987; Perry A et al. 1996; Henn W et al. 1995; Niedermayer I et al. 1997a; Boström J et al. 1997; Leone PE et al. 1999; Lamszus K et al. 1999]. In der Progressionsgruppe zeigte sich weiterhin, dass die chromosomale Region 9p21 bei den Erstmanifestationen immer diploid vorlag. Erst bei drei Rezidivmeningeomen kam es zu einer Deletion des Abschnitts, wobei zwei davon als anaplastisch und eines als atypisch klassifiziert wurden. Diese Beobachtung passt gut zur von Perry und Kollegen beschriebenen Korrelation der 9p21-Deletion mit hohen WHO-Graden [Perry A et al. 2002].

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass Meningeome mit einem Verlust von 1p36 ein erhöhtes Rezidivrisiko (30 bis 60%) und ein verkürztes rezidivfreies Intervall aufweisen [Ketter R et al. 2001

und 2007; Steudel WI et al. 1996]. Auch in der Progressionsgruppe der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass die Primärtumoren mit diesem Merkmal vermehrt Rezidive entwickelten, vergleiche die Patienten P 101, P 102 und P 105.

Im Hinblick auf die Promotormethylierung zeigte sich ein leichter Anstieg der Häufigkeit von *TIMP3*-Methylierungen bei den Rezidiven (3 vs. 5 methylierte Fälle). Die mittels FISH analysierten Rezidive zeigten gleichzeitig auch eine Deletion von 1p36 (3/3) und/oder 9p21 (3/4). Es scheint also, als würden *TIMP3*-methylierte Rezidive zu Deletionen von 1p36 und 9p21 neigen, wobei sich für die Deletion von 9p21 eine statistische Signifikanz zeigte ($p=0.007$). Wie bereits erwähnt werden gerade diese zytogenetischen Ereignisse mit Malignität und Progression in Verbindung gebracht [Ketter R et al. 2001 und 2007; Niedermayer I et al. 1997a; Perry A et al. 2002; Steudel WI et al. 1996]. Auffallend war weiterhin, dass bei allen Fällen mit 9p21-Verlust auch eine *TIMP3*-Methylierung vorlag.

Im Rezidiv von Patient P 82 war die im Erstmeningeom gefundene *TIMP3*-Methylierung nicht mehr nachweisbar. Als mögliche Erklärung kommt die spontane Reversibilität von Methylierungen in Betracht. Die beiden anderen Patienten behielten ihre Methylierung im Rezidiv bei.

Alle drei Ersttumoren mit *TIMP3*-Methylierung hatten einen unauffälligen Karyotyp. Erstmeningeome mit verändertem Karyotyp wiesen dagegen keine *TIMP3*-Promotormethylierungen auf. Zytogenetisch unauffällige Primärmanifestationen scheinen somit eher *TIMP3*-methyliert zu sein als solche mit verändertem Karyotyp.

Bei keinem der drei Patienten mit benigner Erstmanifestation konnte eine chromosomale Deletion gefunden werden. Jedoch wiesen zwei der drei Fälle im Primärmeningeom eine Methylierung von *TIMP3* auf. Für den dritten Fall stand für die *TIMP3*-Analyse kein Tumormaterial zur Verfügung. Bisher wurde eine *TIMP3*-Methylierung nur mit höhergradigen und vor allem Grad-III-Meningeomen in Verbindung gebracht [Barski D et al. 2009; Bello MJ et al. 2004b]. Die Analyse der Progressionsgruppe legt jedoch erstmals nahe, dass eine *TIMP3*-Hypermethylierung ein früher Hinweis auf ein erhöhtes Rezidivrisiko von benignen, zytogenetisch unauffälligen Meningeomen sein könnte. Der sehr kleinen Fallzahl wegen ist es jedoch unerlässlich, die Hypothese an einem größeren Kollektiv zu überprüfen. Auch erscheint es sinnvoll benigne, zytogenetisch unauffällige Erstmeningeome mit *TIMP3*-Hypermethylierung weiter zu beobachten, da diese ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen könnten.

Eine erst im Rezidiv auftretende *TIMP3*-Methylierung scheint vor allem dann stattzufinden, wenn Deletionen von 1p36 und 9p21 vorliegen und die Tumoren mindestens als atypisch eingestuft wurden. Dieser Eindruck entstand bei Betrachtung der Progressionsgruppe: Bei Patient P 84 war das erste und bisher einzige, bei Patient P 105 sowohl Zweit- als auch Drittrezidiv *TIMP3*-methyliert. Allen

drei Fällen war gemein, dass sie mindestens als atypisch klassifiziert wurden und gleichzeitig eine Deletion von 9p21 vorlag. Auch die 1p36-Deletion schien hier mit der Methylierung einherzugehen. Leider war für das Drittrezidiv von Patient P 105 der Status von 1p36 und 22q nicht verfügbar. Es ist jedoch anzunehmen, dass diese ebenfalls deletiert waren. Die Hypermethylierung von *TIMP3* trat bei den Rezidivmeningeomen also vor allem zusammen mit zytogenetischen Veränderung auf, welche als Zeichen für Malignität und Progression gelten.

Der Patient P 105 hatte insgesamt die meisten Rezidive entwickelt und zeigte eine besonders interessante Entwicklung: Ab dem zweiten Rezidiv wurden in der Histopathologie anaplastische Merkmale gefunden. Gleichzeitig traten eine *TIMP3*-Methylierung und, zusätzlich zur vorbestehenden 1p36- und 22q-Deletion, der Verlust von 9p21 auf. Im Drittrezidiv kam es zusätzlich noch zu einer Methylierung von *p16*. Die Betrachtung der Patienten P 84 und P 105 stützt die in den vorherigen Kapiteln genannte Hypothese, dass Meningeome im Laufe ihrer Progression zyto- und epigenetische Modifikationen anhäufen. Unbedingt sollten die hier gewonnenen Hinweise und Tendenzen an einer größeren Gruppe mit längerer Follow-Up-Zeit verifiziert werden.

4.6 Ausblick

4.6.1 Epigenetische Veränderungen als Progressionsmarker

Durch epigenetische Forschung an Meningeomen sollen neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten eröffnet werden. Zwar sind Meningeome meist benigne Tumoren, es gibt allerdings Fälle, die trotz benigner Histopathologie frühe oder häufige Rezidive entwickeln [Kishida Y et al. 2012]. Bisher ist es nicht möglich solche Tumoren sicher frühzeitig zu identifizieren. Man hofft jedoch epigenetische Marker zu finden, mit deren Hilfe sich Tumorverhalten und Prognose besser vorhersagen lassen. Durch die Früherkennung von Meningeomen mit erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit könnten betroffene Patienten eine engmaschigere Nachsorge und eventuell eine adjuvante Radiotherapie erhalten. Um als Progressionsmarker dienen zu können, müssen die epigenetischen Veränderungen noch vor dem Auftreten histopathologischer Malignitätszeichen feststellbar sein.

Eine interessante Studie hierzu stammt von Kishida et al. Die Arbeitsgruppe fand in ihrem Meningeomkollektiv drei Gruppen mit jeweils typischen Methylierungscleistern. Diese traten unabhängig vom WHO-Grad auf. Eines der Cluster (mit fünf TSG) korrelierte signifikant mit höheren Rezidivraten [Kishida Y et al. 2012]. Der geringen Fallzahl wegen (60 Fälle) sind jedoch weitere Studien an großen Meningeomkollektiven unabdingbar. Auch Methylierungsanalysen weiterer TSG sind nötig, um geeignete Marker zu finden. Hierbei sollte insbesondere das in der vorliegenden Arbeit untersuchte *TIMP3* als Progressionsmarker in benignen, zytogenetisch unauffälligen Meningeomen beachtet werden, siehe Kapitel 4.5.

Bei anderen Tumorentitäten werden epigenetische Untersuchungen bereits zur Vorhersage von Rezidivwahrscheinlichkeit und Prognose genutzt. Beispiele hierfür sind die Analyse von Histonmodifikationen beim Prostatakarzinom und die kombinierte Methylierung von *APC* und *E-Cadherin* beim Magenkarzinom, die mit einer verkürzten mittleren Überlebenszeit korreliert [Prawitt B & Zabel D 2005].

4.6.2 Neue Therapieansätze durch epigenetische Forschung

Derzeitiger Goldstandard in der Meningeomtherapie ist die radikale Tumorresektion, an die sich bei höhergradigen Meningeomen eine fraktionierte Radiotherapie anschließen kann [Engenhart-Cabillic R et al. 2006]. Medikamentöse Therapiemöglichkeiten stehen gegenwärtig kaum zur Verfügung.

Epigenetische Analysen von Meningeomen sollen dazu beitragen die Entstehungsmechanismen dieser Tumoren aufzuklären. Durch ein besseres Verständnis könnten zum einen Therapien in Erwägung gezogen werden, die bei anderen Tumorentitäten mit ähnlichen Pathomechanismen schon eingesetzt werden. Zum anderen könnten auch neue Behandlungsstrategien entwickelt werden. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist die Reversibilität epigenetischer Modifikationen von großer Bedeutung. Die Wirksamkeit von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren, wie 5-Aza-2-Desoxy-Cytidin, in der Therapie des myelodysplastischen Syndroms konnte bereits belegt werden. Gleiches gilt für die Inhibition der Histon-Deacetylase, zum Beispiel durch Vorinostat (Suberoylanilide Hydroxamic Acid), in der Therapie von T-Zell-Lymphomen der Haut [Jelinek J & Issa JP 2009]. Diese Medikamente reaktivieren epigenetisch modifizierte TSG. Problematisch ist zurzeit noch die nicht-selektive Wirkung der Präparate. Durch weitere Forschung hofft man gezielt an Tumorzellen wirkende, effizientere Therapeutika mit besser vorhersehbaren Effekten entwickeln zu können [Prawitt B & Zabel D 2005].

4.6.3 Epigenetische Klassifizierung von Meningeomen

Meningeome zeigen ein breites Bild an histologischen Subgruppen. Es ist denkbar, dass in verschiedenen Subgruppen typische epigenetische Modifikationen auftreten. Auf genetischer Ebene wurde eine solche Beobachtung bereits für *NF2*-Mutationen gemacht: Während *NF2*-Mutationen gleich häufig in Meningeomen aller WHO-Grade gefunden wurden, war das Gen in bestimmten histologischen Subtypen häufiger mutiert [Boström J et al. 1997; Wellenreuther R et al. 2001]. Auch vom histologischen Erscheinungsbild unabhängige "Subtypen" mit typischen epigenetischen Veränderungsmustern und möglicherweise dadurch unterschiedlichem Rezidivverhalten sind denkbar. Erste Hinweise auf die Existenz solcher epigenetischer Subtypen fanden Kishida und Kollegen, siehe 4.6.1 [Kishida Y et al. 2012]. Auch die Progressionsstudie der vorliegenden Arbeit deutet darauf hin. So zeigte sich eine *TIMP3*-Methylierung auf der einen Seite bei benignen, zytogenetisch unauffälligen Erstmanifestationen, auf der anderen Seite bei Rezidiven, die mindestens als WHO-Grad II eingestuft wurden und zudem 1p36- und 9p21-Deletionen hatten. Solche epigenetischen Subtypen könnten unterschiedlich gut auf (zukünftige) Therapien ansprechen. Für andere Tumorarten wurde dies bereits gezeigt, dass mittels Methylierungsanalyse Aussagen über das Ansprechen einer Therapie getroffen werden können. Zum Beispiel profitieren Patienten mit Glioblastomen nur dann von einer Behandlung mit Temozolomid, wenn sie eine Promotormethylierung von *MGMT* aufweisen [Hegi ME et al. 2005]. Auch bei der akuten myeloischen Leukämie kann mithilfe von Methylierungsanalysen auf die Chemosensibilität geschlossen werden [Prawitt B & Zabel D 2005]. Des Weiteren ermöglichen epigenetische Biomarker

eine zuverlässige Aussage darüber, ob die alleinige Tamoxifentherapie ohne Chemotherapie bei Frauen mit Mammakarzinomen nach Resektion des Primärtumors ausreicht [Beck S et al. 2005].

4.6.4 Weitere Forschungsansätze auf Basis der vorliegenden Arbeit

Für ein ausreichend langes Follow-Up sollten die Patienten des untersuchten Tumorkollektivs weiter beobachtet werden. Mit den gewonnenen Daten könnten dann genauere und sicherere Aussagen über den Einfluss der *TIMP3*- und/oder *p16*-Methylierung auf Rezidivverhalten und Prognose von Meningeomen getroffen werden, gegebenenfalls auch im Hinblick auf gleichzeitige zytogenetische Veränderungen. Zusätzlich wäre es denkbar auch den Zusammenhang mit histologischen Subtypen zu untersuchen. Gleichzeitig sollte Tumormaterial von weiteren Meningeompatienten für die epi- und zytogenetische Untersuchung gewonnen werden, um eine größere Fallzahl zu erhalten. Hier sollte die Durchführung einer multizentrischen Studie erwogen werden. Dies wäre besonders im Hinblick auf seltene Modifikationen, wie die 9p21-Deletion, interessant. So können eher statistisch signifikante Erkenntnisse gewonnen werden. Auch eine Analyse von zwischenzeitlich aufgetretenen Rezidiven ist wichtig, um diese einerseits gesondert zu betrachten und andererseits die Gruppe für die Progressionsstudie zu vergrößern. Die Frage, ob sich zuerst WHO-Grad, Chromosomen-, oder Methylierungsstatus ändern oder womöglich mehrere Änderungen gleichzeitig auftreten, könnte so gegebenenfalls beantwortet werden.

Als mögliche Erweiterung der Studien am Tumorkollektiv des Universitätsklinikums des Saarlandes würden sich Methylierungsanalysen zusätzlicher TSG und die Durchführung einer Bisulfitsequenzierung, auch der *TIMP3*- und *p16*-Promotoren, anbieten. Hierbei sollten die in der MS-PCR erfassten CpGs innerhalb der mittels Bisulfitsequenzierung betrachteten Region liegen. Dies würde auch einen Vergleich beider Techniken ermöglichen. Im Hinblick auf die Arbeit von Barski und Kollegen erscheint dies sinnvoll, kam es doch zu einer erheblichen Diskrepanz der mit verschiedenen Techniken gewonnenen Ergebnisse. Ein sicherer Vergleich war in der Arbeit von Barski et al. nicht möglich, da nur ein Teil der in der MS-PCR erfassten CpGs in der Sequenzierung untersucht wurde.

Des Weiteren sollte eine Kompletsequenzierung der CpG-Insel des *TIMP3*-Promotors in Erwägung gezogen werden, da hierdurch alle Positionen auf eine Methylierung untersucht werden könnten. Eine solche Studie wäre zwar aufwendig, könnte aber solche Bereiche der CpG-Insel identifizieren, die in Meningeomen am häufigsten methyliert vorliegen. Die Ergebnisse sollten dann mit MS-PCR-Analysen mit Primern aus den bisherigen Studien verglichen werden. Auf diese Weise könnte man herausfinden, ob die abweichenden Resultate darin begründet liegen, dass die verwendeten MS-PCR-Primer einen Teil der in Meningeomen häufig methylierten CpGs des *TIMP3*-Promotors nicht

erfasst haben und somit falsch negative Ergebnisse entstanden sind. In Zukunft könnten so einheitliche Primer, welche repräsentative Bereiche erfassen, für die MS-PCR verwendet werden. Zum einen wären Studien dadurch besser vergleichbar, zum anderen die Gefahr, methylierte CpGs durch "falsche" Primer nicht zu erfassen, geringer.

5. Literaturverzeichnis

1. Almeida LO, Custodio AC, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, Casartelli C (2008) Hypermethylation of genes NDRG2, GSTP1, MEN1, DAL1, TP16, TP53 and DNMTs 3A, 3B and 3L in extra axial brain tumors. Annual Meeting on Molecular Markers in Cancer, American Society of Clinical Oncology (ASCO)-NCI-EORTC, Hollywood (Florida, USA), Tagungsabstrakt Nr. 117
2. Almeida LO, Custódio AC, Pinto GR, Santos MJ, de Almeida JRW, Clara CA, Rey JA, Casartelli C (2009) Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet Mol Res* 8: 8-18
3. Al Saadi A, Latimer F, Madercic M, Robbins T (1987) Cytogenetic Studies of Human Brain Tumors and their clinical significance. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 127-141
4. Amatya VJ, Takeshima Y, Inai K (2004) Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod Pathol* 17:705–710
5. Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS, Zetter B (1997) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 817-823
6. Anselmo NP, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Dias LAA, de Almeida JRW, dos Santos MJ, Rey JA, Casartelli C (2006) Epigenetic alterations in human brain tumors in a Brazilian population. *Genet Mol Biol* 3: 413-422
7. Apte SS, Olsen BR, Murphy G (1995) The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 270: 14313-14318
8. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG (eds) (2007) *Duale Reihe Anatomie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart
9. Aydemir F, Yurtcu E, Balci TB, Sahin FI, Gulsen S, Altinors N (2012) Identification of promoter region methylation patterns of MGMT, CDKN2A, GSTP1, and THBS1 genes in intracranial meningioma patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 16 (Abstract): 335-340. Epub 2012 Jan 30.
10. Bachmann KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR (1999) Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 59:798-802
11. Bangsow T, Deutsch U, Engel H, Korfhage C, Löffert D (2007) *Polymerase Kettenreaktion in Jansohn M (2007) Gentechnische Methoden* 4.Ed Elsevier GmbH München
12. Bayrhuber H, Kull U (eds) (1998) *Linder Lehrbuch der Biologie*. 21. Ed Schroedel Verlag GmbH Hannover
13. Barski D, Wolter M, Reifenberger G, Riemenschneider MJ (2009) Hypermethylation and transcriptional Downregulation of the *TIMP3* Gene is Associated with Allelic Loss on 22q12.3 and Malignancy in Meningiomas. *Brain Pathol* 20: 623–631

14. Batova A, Diccianni MB, Yu JC, Nobori T, Link MP, Pullen J, Yu AL (1997) Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 57: 832-836
15. Beck S, Berlin K, Eckhardt F (2005) *Krebsepigenetik*. *medgen* 17: 265-269
16. Bello MJ, Campos JM, de Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA (1994) Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 9: 296–298
17. Bello MJ, Alonso ME, Amiñoso C, Anselmo NP, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Lopez-Marin I, de Campos JM, Gutierrez M, Isla A, Kusak ME, Lassaletta L, Sarasa JL, Vaquero J, Casartelli C, Rey JA (2004a) Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with TP53 G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors. *Mutat Res* 554: 23-32
18. Bello MJ, Amiñoso C, Lopez-Marin I, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, Lomas J, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA (2004b) DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathol* 108: 413-421
19. Bian J, Wang Y, Smith MR, Kim H, Jacobs C, Jackman J, Kung HF, Colburn NH, Sun Y (1996) Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis* 17: 1805-1811
20. 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
21. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G (2001) Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 159: 661-669
22. 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
23. Bradač GB, Ferszt R, Kendall BE (eds) (1990) *Cranial Meningeomas, Diagnosis- Biology-Therapy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
24. 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
25. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hedrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidransky D (1995) Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 11: 210-212
26. Campbell BA, Jhamb U, Maguire JA, Toyota B, Ma R (2009) Review: Meningiomas in 2009-Controversies and Future Challenges. *American Journal of Clinical Oncology* 32: 73-85
27. Chen MN, Mao Q, Liu YH, Mao BY (2004) Methylation and expression analysis of p16 (INK4a) and RB genes in meningiomas. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 21:277–279
28. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Fommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research* 22: 2990-2997

29. Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG (1999) Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 59: 3352-3356
30. Costa FF, Colin C, Shinjo SM, Zanata SM, Marie SK, Sogayar MC, Camargo AA (2005) ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. *Neurosci Lett* 380: 260-264
31. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK (1996) Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 56: 2405–2410
32. Dammann R (2006) Analyse der genomischen DNA-Methylierung. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.): *Bioanalytik*. 2. Ed Springer Akademischer Verlag, Heidelberg: 821-832
33. De Robles P, McIntyre J, Kalra S, Roldán G, Cairncross G, Forsyth P, Magliocco T, Hamilton M, Easaw J (2008) Methylation status of MGMT gene promoter in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 187: 25-27
34. De Schutter H, Geeraerts H, Verbeken E, Nuyts S (2009) Promoter methylation of *TIMP3* and *CDH1* predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. *Oncology Rep* 21: 507–513
35. Doco-Fenzy M, Cornillet P, Scherpereel B, Depernet B, Bisian-Leconte S, Ferre D, Pluot M, Graftiaux JP, Teyssier JR (1993) Cytogenetic changes in 67 cranial and spinal meningiomas: relation to histopathological and clinical pattern. *Anticancer Res* 13: 845–850
36. Doerfler W (ed) (2005) DNA-Methylierung – ein wichtiges genetisches Signal in Biologie und Pathogenese. *medgen* 17: 260-264
37. Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D (2001) Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 7: 1982-1986
38. 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* 84: 9275-9279
39. 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
40. Dupont C, Randall AD, Brenner CA (2009) Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* 27: 351-357
41. Ebinger M, Senf L, Wachowski O, Scheurlen W (2004) Promoter methylation pattern of Caspase-8, *p16INK4a*, *MGMT*, *TIMP3*, and E-cadherin in medulloblastoma. *Pathol Oncol Res* 10: 17–21
42. Engenhardt-Cabillic R, Farhoud A, Sure U, Heinze S, Henzel M, Mennel HD, Bertalanffy H (2006) Clinicopathologic features of aggressive meningioma emphasizing the role of radiotherapy in treatment. *Strahlenther Onkol* 182: 641-646
43. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG (1998) Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 58: 4515-4518
44. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG (1999a) Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell cancer patients. *Cancer Res* 59: 67–70

45. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999b) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59: 793-797
46. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG (2000a) Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60: 129-133
47. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG (2000b) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60: 2368–2371
48. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61: 3225-3229
49. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ (2000) Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 59: 1090-1095
50. Gioia J (ed) (2009) Epigenetics. *Zymo Research Peanuts* 9: 3-5
51. Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA (1995) Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 55: 4531-4535
52. Gonzalgo ML, Bender CM, You EH, Glendening JM, Flores JF, Walker GJ, Hayward NK, Jones PA, Fountain JW (1997) Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res* 57: 5336–5347
53. Graham RT, Logan WP (1995) The polymerase chain reaction: new variations on an old theme. *Biotechnology* 6: 24-29
54. Greenberg MS (ed) (2006) *Handbook of Neurosurgery*. 6.Ed Georg Thieme-Verlag Stuttgart
55. Griffin CA, Hruban RH, Long PP, Miller N, Volz P, Carson B, Brem H (1994) Chromosome abnormalities in meningeal neoplasms: do they correlate with histology. *Cancer Genet Cytogenet* 78: 46–52
56. Hankins GR, Sasaki T, Lieu AS, Saulle D, Karimi K, Li JZ, Helm GA (2008) Identification of the deleted in liver cancer 1 gene, DLC1, as a candidate meningioma tumor suppressor. *Neurosurgery* 63: 771-781
57. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K, Jarbo C, Mathiesem 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: 16
58. Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Midnick RJ, Sachdev VP (1991) Radiation-induced meningioma: Experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg* 75: 564-574
59. Hegi ME, Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* Abstract 352: 997-1003

60. Henn W, Cremerius U, Heide 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
61. Herfarth KK, Brent TP, Danam RP, Remack JS, Kodner I J, Wells SA, Goodfellow PJ (1999) A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoterregion associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Mol Carcinog* 24: 90–98
62. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-9826
63. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55: 4525-4530
64. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci SA* 95:b6870-6875
65. Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, Myöhänen S, Pääkkönen M, Marin S, Kosma VM, Jänne J (1997) Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 70: 644-648
66. Hong C, Bollen AW, Costello JF (2003) The contribution of genetic and epigenetic mechanisms to gene silencing in oligodendrogliomas. *Cancer Res* 63: 7600-7605
67. Hoque MO, Begum S, Brait M, Jeronimo C, Zahurak M, Ostrow KL, Rosenbaum E, Trock B, Westra WH et al. (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. *J Urol* 179: 743-747
68. Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishuchi S, Kurihara H, Mori M, Saito N (2003) Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 22: 7862–786
69. Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G (eds) (2005) *Biochemie des Menschen*. 3.Ed Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
70. Horstehmke B (ed) (2005) *Was ist Epigenetik?* Medgen 17: 251-253
71. Hung T, Mak K, Fong K (1990) A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 18: 4953
72. Ibelgaufts H (ed) (1992) *Gentechnologie von A bis Z*. VCH-Verlagsgesellschaft GmbH Weinheim
73. Iida S, Akiyama Y, Nakajima T, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K, Yuasa Y (2000) Alterations and hypermethylation of the p14 (ARF) gene in gastric cancer. *Int J Cancer* 87:654-658
74. 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
75. Jagannathan J, Oskouian RJ, Yeoh HK, Saulle D, Dumont AS (2008) Molecular biology of unresectable meningiomas: implications for new treatments and review of the literature. *Skull Base* 18: 173-187
76. Jelinek J, Issa JP (eds) (2009) *Epigenetics & Cancer*. Zymo Research Peanuts 9: 9-12

77. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440.
78. Kandenwein JA, Park-Simon TW, Schramm J, Simon M (2010) uPA/PAI-1 expression and uPA promoter methylation in meningiomas. *J Neurooncol* 103: 533-539
79. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R (1997) Methylation of the *hMLH1* Promoter Correlates with Lack of Expression of hMLH1 in Sporadic Colon Tumors and Mismatch Repair-defective Human Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 57: 808-811
80. Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A, Said J, Tatsumi E, Koeffler HP (1999) Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 94: 1113-1120
81. Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, König J, Zang KD, Steudel WI (2001) Predictive value of progression-associated chromosome aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 95: 601-607
82. Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, Steudel WI, 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: 1473-1480
83. Ketter R (ed) (2008) Etablierung eines Genetischen Tumorprogressions Scores für das Meningeom basierend auf zytogenetischen Daten. Universität des Saarlandes, Habilitationsschrift
84. Kim YJ, Ketter R, Henn W, Zang KD, Steudel WI, Feiden W (2006) Histopathologic indicators of recurrence in meningiomas: correlation with clinical and genetic parameters. *Virchows Arch* 449: 529-538
85. Kim YJ, Bochem N, Ketter R, Henn W, Feiden W (2008) Meningeome: Multiparametrische Risikostratifizierung und Grading. *Pathologe* 29: 428-433
86. Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashita T et al. (1998) The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 4: 915-922
87. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of Tumors of the Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 215-225
88. Korshunov A, Shishkina L, Golanov A (2003) Immunohistochemical analysis of p16INK4a, p14ARF, p18INK4c, p21CIP1, p27KIP1 and p73 expression in 271 meningiomas correlation with tumor grade and clinical outcome. *Int J Cancer* 104: 728-734
89. Kraemer D (2011) Methylierungsanalysen von zytogenetisch charakterisierten Meningeomen in besonderem Hinblick auf Rezidivität und Progression. Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
90. Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M (1999) Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 110: 103-110
91. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG (1994) Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-

- transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 11733–11737
92. Lein S, Reuter G (2005) Heterochromatin und “Gene silencing”. *medgen* 17: 254-259
 93. Lekan-Deprez RH, Riegmann PH, Van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ et al. (1995) Cytogenetic, Molecular Genetic and Pathological Analyses in 126 Meningiomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 54: 224-235
 94. Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Sarasa JL, Pestaña A, Rey JA (1999) NF2 gene mutations and allelic status of 1p. 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 18: 2231–2239
 95. Licchesi JDF, Herman JG (2009) Methylation specific PCR. 507-513. In: Tost J: DNA- Methylation: Methods and Protocols. 2. Ed Humana Press, Totowa NJ (USA)
 96. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y (1994) Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 54: 6078-6082
 97. Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP (1994) Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 56: 354-357
 98. Liu Y, Pang JC, Dong S, Mao B, Poon WS, Ng HK (2005) Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol* 36: 416-425
 99. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (eds) (2007) *Biochemie&Pathobiochemie*. 8. Ed Springer Medizinverlag Heidelberg
 100. Lomas J, Amiñoso C, Gonzalez-Gomez P, Eva Alonso M, Arjona D, Lopez-Marin I, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Gutierrez M, Sarasa JL, Josefa Bello M, Rey JA (2004) Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 148: 148-151
 101. Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Martinez-Glez V, Lopez-Marin I, Amiñoso C, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Rey JA (2005) Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 314-319
 102. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (Review). *Acta Neuropathol* 114: 97–109
 103. Lusk EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann DH, Perry A (2005) Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res* 65: 7121-7126
 104. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, Vecht C (2008) Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol* 67: 153-171
 105. Mawrin C, Perry A (2010) Review: Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 99: 379–391
 106. Meese E, Blin N, Zang KD (1987) Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 77: 349-351
 107. Meissner A (2009) Epigenetic Regulation in Mammalian Genomes. *Zymo Research Peanuts* 7:5-9

108. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1: 686-692
109. Mühlisch J, Bajanowski T, Rickert CH, Roggendorf W, Würthwein G, Jürgens H, Frühwald MC (2007) Frequent but borderline methylation of *p16INK4a* and *TIMP3* in medulloblastoma and sPNET revealed by quantitative analyses. *J Neurooncol* 83: 17–29
110. Müllenbach R, Lagoda P, Welter C (1989) An efficient salt chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trend Genet* 5: 391
111. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel WI, 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
112. Murakami M, Hashimoto N, Takahashi Y, Hosokawa Y, Inazawa J, Mineura K (2002) A consistent region of deletion on 1p36 in meningiomas: identification and relation to malignant progression. *Cancer Genet Cytogenet* 140: 99-106
113. Nakane Y, Natsume A, Wakabayashi T, Oi S, Ito M, Inao S, Saito K, Yoshida J (2007) Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A. *J Neurosurg* 107: 398-404
114. Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, Kurachi H, Sasaki M, Wakasa K, Inoue M, Buzard G, Murata Y (1999) Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J Cancer* 80: 458-467
115. Niedermayer I, Kolles H, Zang KD, Feiden W (1996) Characterization of intermediate type (WHO "atypical") meningiomas. *Clin Neuropathol* 15: 330–336
116. Niedermayer I, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Zang KD (1997a) 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 (Abstract)* 56: 879-886.
117. Niedermayer I, Kolles H, Henn W, Zang KD, Steudel WI, Feiden W (1997b) Meningeome: Klassifikation und Grading. *Pathologie* 18: 353–358
118. Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG (1999) In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis.
119. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M (2002) Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602: 73-87
120. Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW (1996) Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic features. *Cancer* 77: 2567–2573
121. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW (2002) A role for chromosome 9p21 Deletions in the malignant Progression of Meningiomas and the Prognosis of Anaplastic Meningiomas. *Brain Pathol* 12: 183-190
122. Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, Hendricks WP, Puschel J, Coons SW, Scheck AC (2004) Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro Oncol* 6: 290-299

123. Pham MH, Zada G, Mosich GM, Chen TC, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ (2011) Molecular genetics of meningiomas: a systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. *Neurosurg Focus* 30: E7
124. Prawitt D, Zabel B (2005) *Krebsepigenetik*. *medgen* 17: 296-302
125. Pulst SM, Rouleau GA, Marineau C, Fain P, Sieb JP (1993) Familial meningioma is not allelic to neurofibromatosis 2. *Neurology* 43: 2096-2098.
126. Quiagen (2007) Critical success factors and new technologies for PCR and RT-PCR. *QIAGEN PCR-Brochure 08/2007*: 1-16
127. Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-onkology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 111-126
128. Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H (1998) Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genome. *Nucleic Acids Research* 26: 2255–2264
129. Riede UN, Werner MH, Schaefer HE (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Ed. Georg Thieme Verlag Stuttgart
130. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G (2006) Review: Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 5: 1045-1054
131. Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, Favrot MC (2007) Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 13: 1179-1185
132. Rolfs A, Schuller I, Finkh U, Weber-Rolfs I (1992) *PCR-Clinical diagnostics and research*. Springer, Berlin
133. Rouleau 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
134. Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C Hoang-Xuan K, Demczuk S et al. (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363: 515-521
135. Ruas M & Peters G (1998) The p16 INK4a /CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta* 1378: 115-177
136. Saffroy R, Lemoine A, Debuire B (2004) Gene Section Mini Review: CDKN2a (cyclin dependent kinase 2a)/p16. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*: 287-288
137. Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA (2000) Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 60: 2473-2476
138. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D (2000) Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 60: 892–895
139. Santarius T, Kirsch M, Nikas DC, Imitola J, Black PM (2000) Molecular analysis of alterations of the p18INK4c gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 67-75

140. Sayagués JM, Tabernero MD, Maíllo A, Espinosa A, Rasillo A, Díaz P, Ciudad J, López A et al. (2004) Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? *J Mol Diagn* 6: 316-325
141. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (eds) (2006) *Prometheus-Kopf und Neuroanatomie*. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart
142. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707
143. Shapiro R, DiFate V, Welcher M (1974) Deamination of cytosine derivatives by bisulfate. Mechanism of the reaction. *J Am Chem Soc* 96: 906-912
144. Simpson D (1957) The Recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 20: 22-39
145. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM, Menon AG (1995) Allelic losses on chromosome 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas. A genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 55: 4696-4701
146. Simon M, Kokkino AJ, Warnick RE, Tew JM Jr, von Deimling A, Menon AG (1996) Role of genomic instability in meningioma progression. *Genes Chromosomes Cancer* 16: 265-269
147. Simon M, Park TW, Köster G, Mahlberg R, Hackenbroch M, Boström J, Löning T, Schramm J (2001) Alterations of INK4a (p16-p14ARF)/INK4b (p15) expression and telomerase activation in meningioma progression. *J Neurooncol* 55: 149-158
148. Smith E, De Young NJ, Tian ZQ, Caruso M, Ruzskiewicz AR, Liu JF, Jamieson GG, Drew PA (2008) Methylation of TIMP3 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 14: 203-210
149. Smith M, Weiss MJ, Griffin CA, Murray JC, Kuetow KH, Emanuel BS, Henthorn PS, Harris H (1988) Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-34. *Genomics* 2: 139-143
150. Steudel WI, Feld R, Henn W, Zang KD (1996) Correlation between cytogenetic and clinical findings in 215 human meningiomas. *Acta Neurochir Suppl (Abstract)* 65: 73-76
151. Strachan T & Read AP eds (2005) *Molekulare Humangenetik*. 3.Ed Spektrum Akademischer Verlag
152. Tchou JC, Lin X, Freije D, Isaacs WB, Brooks JD, Rashid A, De Marzo AM, Kanai Y, Hirohashi S, Nelson WG (2000) GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 16: 663-676
153. Tonn JC, Westphal M, Ruthka JT, Grossmann SA (eds) (2006) *Neuro-Oncology of CNS Tumors*. Springer Verlag Heidelberg
154. Thein SL, Wallace RB (1986) The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: *Human Genetic Diseases: A Practical Approach* (Davis KE) : 33-50
155. Tse JY, Ng HK, Lo KW, Chong EY, Lam PY, Ng EK, Poon WS, Huang DP (1998) Analysis of cell cycle regulators: p16INK4A, pRb, and CDK4 in low- and high-grade meningiomas. *Hum Pathol* 29: 1200-1207

156. Twist EC, Rutledge MH, Rousseau M, Sanson M, Papi L, Merel P, Delattre O, Thomas G, Rouleau GA (1994) The neurofibromatosis type 2 gene is inactivated in schwannomas. *Hum Mol Genet* 3: 147-151
157. Varadaraj K, Skinner DM (1994) Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 140: 1-5
158. Van Tilborg AA, Morolli B, Giphart-Gassler M, de Vries A, van Geenen DA, Lurkin I, Kros JM, Zwarthoff EC (2006) Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *J Pathol* 208: 564-573
159. Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zochbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF (2001) Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 7: 584-589
160. Walter J, Paulesen M (2005) Genomic Imprinting – Evolution eines neuen Konzepts der Genregulation bei Säugetieren. *medgen* 17: 270-274
161. Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M (1980) Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 8: 4777-4790
162. Weber RG, Boström J, Wolters M, Baudis M, Collins P, 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
163. 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
164. Wemmert S, Bettscheider M, Alt S, Ketter R, Kammers K, Feiden W, Steudel WI, Rahnenführer J, Urbchat S (2009) p15 promoter methylation - a novel prognostic marker in glioblastoma patients. *Int J Oncol* 34 : 1743-1748
165. Wilson RC (1994) Meningiomas: genetics, malignancy, and the role of radiation induction and treatment. *J Neurosurg* 81: 666-675
166. Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC (2000) Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 95: 1942-1949
167. Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Nobori T, Yu AL, Yu J, Batova A, Lai KW, Chang AM (1999) Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy. *Cancer Lett* 136:231-235
168. Yin D, Xie D, Hofmann WK, Miller CW, Black KL, Koeffler HP (2002) Methylation, expression, and mutation analysis of the cell cycle control genes in human brain tumors. *Oncogene* 21: 8372-8378
169. Yin D, Xie D, Hofmann WK, Zhang W, Asotra K, Wong R, Black KL, Koeffler HP (2003) DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase: promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of p53 in brain tumors. *Mol Carcinog* 36: 23-31
170. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216: 84-85
171. Zang KD (2001) Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93: 207-220

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 bis 3: Mawrin C, Perry A (2010) Review: Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. J Neurooncol 99: 379–391, Figures 2a - c, 3 and 4, ©Springer,Science+Business Media (mit freundlicher Genehmigung des Autors und von Springer Science+Business Media)

Abbildung 4: www.zymoresearch.com

Abbildung 5: Prawitt D, Zabel B (2005) Kapitel: Krebs epigenetik, Seite 299, Abbildung B. medgen 17: 296-302. In: Themenschwerpunkt Epigenetik, ©Springer,Science+Business Media (mit freundlicher Genehmigung des Autors und der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik)

Abbildung 13: Dammann R (2006) Analyse der genomischen DNA-Methylierung, Seite 823, Abbildung 31.2. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.): Bioanalytik. 2. Ed Springer Akademischer Verlag, Heidelberg: 821-832 (mit freundlicher Genehmigung des Autors und von Springer Science+Business)

Abbildung 15: Dammann R (2006) Kapitel: Analyse der genomischen DNA-Methylierung, Seite 826, Abbildung 31.7. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.): Bioanalytik. 2. Edition, Springer Akademischer Verlag, Heidelberg ©Springer,Science+Business Media (mit freundlicher Genehmigung des Autors und von Springer Science+ Business)

7. Publikationen und Vorträge

Publikationen

- Linsler S, Kraemer D, Drieß C, Oertel J, Kammers K, Rahnenführer J, Ketter R, Urbschat S (2014) **Molecular biological determinations of meningioma**. PLoS ONE (under Review)
- Ketter R, Linsler S, Kraemer D, Drieß C, Lerner C, Oertel J, Urbschat S (2012) **Hypermethylation of *TIMP3* is a predictive diagnostic marker in meningioma**. Neuro Oncol 14 (suppl 3): 1–94

Vorträge

- Kraemer D, Urbschat S, Drieß C, Linsler S, Oertel J, Ketter R (2012) **Hohe zytopogenetische Progressionsscores (GPS) sind prädiktiv für ein frühes Rezidiv und antizipieren eine histopathologische Malignisierung und Hypermethylierung in Meningeomen – ein Fallbericht**. 25. Tumor-zytopogenetische Arbeitstagung, Wetzlar, 10.–12.05.2012
- Linsler S, Urbschat S, Drieß C, Kraemer D, Lerner C, Oertel J, Ketter R, Urbschat S (2012) **Detection of *TIMP-3* promoter hypermethylation and its prognostic significance in meningiomas**. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Leipzig, 13.–16.06.2012
- Ketter R, Linsler S, Kraemer D, Drieß C, Lerner C, Oertel J, Urbschat S (2012) **Hypermethylation of *TIMP3* is a predictive diagnostic marker in meningioma**. 10th Meeting of the European Association of NeuroOncology (EANO), Marseille, 06.–09.09.2012
- Drieß C, Linsler S, Kraemer D, Urbschat S, Lerner C, Oertel J, Ketter R (2012) **Hypermethylation and down-regulation of tumor suppressor gene *TIMP3* following chromosomal aberrations in meningiomas**. Sektionstagung Neuroonkologie der DGNC, Münster, 26.– 27.10.2012
- Kraemer D, Urbschat S, Drieß C, Linsler S, Oertel J, Ketter R (2012) **High Genetic Progression Scores (GPS) are predictive for early recurrence and anticipate histopathological malignisation in a case of multi-recurrent intracranial meningioma**. Sektionstagung Neuroonkologie der DGNC, Münster, 26.–27.10.2012
- Kraemer D, Urbschat S, Drieß C, Linsler S, Oertel J, Ketter R (2013) **High Genetic Progression Scores are predictive for early recurrence and anticipate histopathological malignisation in a case of multi-recurrent intracranial meningioma**. 64. Jahrestagung der DGNC, Düsseldorf, 26.–29.06.2013

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Joachim Oertel, bedanken. Durch die unkomplizierte Übernahme dieser Arbeit hat er das Zustandekommen derselben überhaupt erst ermöglicht.

Großer Dank gebührt auch meiner Betreuerin, Frau Privatdozentin Dr. Steffi Urbschat, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit kompetenter Hilfe zur Seite stand. Ohne sie wäre die Realisierung dieser Arbeit kaum möglich gewesen. Dies gilt ebenso für Frau Dr. Silke Wemmert, auf deren fachmännischen und freundlichen Rat ich jederzeit zählen konnte.

Wichtige und stets freundliche Unterstützung habe ich auch von Herrn Dr. Stefan Linsler erhalten, dem ich zu besonderem Dank verpflichtet bin. Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Dennis Kraemer für die großzügige Bereitstellung seiner Daten. Für wertvolle Tipps bedanke ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. Ralf Ketter und dem ganzen Laborteam.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen meine Freundin Margarita Becker, der ich für ihre Hilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung danke sowie Herr Professor Dr. Stefan Wagenpfeil für seine Beratung bei der statistischen Auswertung.

Für seine unglaubliche Unterstützung, für seine Geduld und konstruktive Kritik gilt mein Dank meinem wundervollen Partner Dr. Moritz Medart. Schließlich möchte ich mich bei meiner phantastischen Familie für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und ihre Liebe bedanken. Ihretwegen bin ich sehr glücklich und der Mensch geworden, der ich heute bin.

9. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Christina Drieß
 Geburtsdatum: 27.01.1987
 Geburtsort: Saarbrücken
 Adresse: Uhlandstraße 16, 66121 Saarbrücken

Aktuelle Tätigkeit

Seit 12/2013 Assistenzärztin in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums Saarbrücken

Schulische Ausbildung

08/1993 – 07/1997 Grundschule Reinheim
 08/1997 – 07/2006 Von-der-Leyen-Gymnasium Blieskastel
 Abschluss: Abitur (Note 1,5)

Studium

ab 10/2006 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg
 09/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
 09/2008 – 07/2009 Studium an der Universidade de Coimbra, Portugal (ERASMUS)
 09/2009 – 05/2013 weiteres Studium der Humanmedizin in Homburg
 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)

seit 04/2010 Dissertation in der experimentellen Neurochirurgie/Neuroonkologie des Universitätsklinikums Homburg bei Herrn Prof. Dr. Joachim Oertel

Praktika und Famulaturen

09/2006 Pflegepraktikum im St. Elisabeth Krankenhaus, Zweibrücken (Innere Medizin)
 03/2007 Pflegepraktikum im St. Elisabeth Krankenhaus, Zweibrücken (Orthopädie)
 09/2007 Pflegepraktikum in der Caritasklinik St. Theresia, Saarbrücken (Pädiatrie)
 08/2009 Famulatur im Chirurgischen Zentrum Homburg, Dres. med. Loew, Gross und Holanda
 03/2011 Famulatur in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums des Saarlandes
 08/2011 Famulatur im Sozialmedizinischen Zentrum Ost in Wien (Pädiatrie)
 09/2011 Famulatur im Sozialmedizinischen Zentrum Ost in Wien (Innere Medizin)
 02/2012 – 06/2012 Unterassistentin im Kantonsspital Winterthur (Chirurgie)
 06/2012 – 01/2013 PJ im Centre Hospitalier de Luxembourg (Innere Medizin und Gynäkologie)

Saarbrücken, den 29. Januar 2014

10. Tabellenanhang

Rezidivfreie Zeit und Follow-Up

Lfd. Nr.	Patient	Op-Nr.	OP-Datum	Nächstes	Rezidivfreie	Letztes
MN 1	P 1	997/08	20.06.2008		42	15.11.2010
MN 2	P 2	1018/08	24.06.2008		42	22.10.2011
MN 3	P 3	1139/08	14.07.2008		41	30.06.2009
MN 4	P 4	1142/08	14.07.2008		41	05.12.2008
MN 5*	P 5 §	1039/08	26.06.2008		42	22.11.2008
MN 6*	P 6	1368/08	22.08.2008		40	01.12.2010
MN 7*	P 7	1204/08	25.07.2008		41	14.04.2011
MN 8*	P 8	1407/08	01.02.2008	01.08.2008	6	11.09.2008
MN 9*	P 9	1038/08	26.06.2008		42	03.08.2011
MN 10*	P 10	1587/08	29.09.2008		0	23.11.2011
MN 11*	P 11	1445/08	05.09.2008		39	21.04.2010
MN 12*	P 12	1449/08	05.09.2008		39	02.09.2011
MN 13*	P 13	1568/08	25.09.2008		39	24.09.2008
MN 14*	P 14	1575/08	26.09.2008		39	23.09.2009
MN 15*	P 15	1601/08	01.10.2008		38	20.09.2011
MN 16*	P 16	1671/08	13.10.2008		38	20.01.2011
MN 17*	P 17 §	1746/08	24.10.2008		0	11.01.2009
MN 18*	P 18	1842/08	11.11.2008		37	05.12.2008
MN 19*	P 19	1792/08	03.11.2008		37	06.01.2009
MN 20*	P 20	1825/08	07.11.2008		37	17.05.2011
MN 21	P 21	92/09_1	19.01.2009		0	04.10.2011
MN 22	P 21	92/09_2	19.01.2009		0	04.10.2011
MN 23*	P 21	92/09_3	19.01.2009		0	04.10.2011
MN 24	P 22	73/09	15.01.2009		35	26.04.2010
MN 25	P 23	268/09	19.02.2009		34	24.04.2009
MN 26	P 24	133/09	26.01.2009		35	10.05.2011
MN 27	P 25	273/09	18.02.2009		34	24.11.2011
MN 28	P 26	351/09	03.03.2009		33	16.02.2009
MN 29	P 27	369/09	12.03.2009		33	02.08.2011
MN 30	P 28	581/09	17.04.2009		32	28.10.2011
MN 31	P 29	751/09	19.05.2009		31	15.01.2010
MN 32	P 30	1011/09	06.07.2009		29	04.07.2011
MN 33	P 31	1172/09	29.07.2009		29	22.09.2009
MN 34	P 32	1180/09	30.07.2009		29	13.12.2011
MN 35	P 33	1245/09	11.08.2009		28	27.01.2011
MN 36	P 34	1247/09	11.08.2009		28	29.10.2009
MN 37	P 35	1276/09	17.08.2009		28	03.05.2011
MN 38	P 36	1336/09	27.08.2009		28	22.11.2011
MN 39	P 37	1347/09	28.08.2009		28	22.10.2009
MN 40	P 38	1401/09	09.09.2009		27	19.09.2009
MN 41	P 39	1408/09	10.09.2009		27	21.10.2009
MN 42	P 40	1418/09	11.09.2009		27	28.06.2010

MN 43	P 41	1436/09	15.09.2009			27	12.10.2009
MN 44	P 42	1473/09	21.09.2009			27	10.12.2011
MN 45	P 43	1481/09	22.09.2009	15.03.2011		18	07.10.2011
MN 46	P 44	1630/09	20.10.2009			26	03.12.2009
MN 47	P 45	229/09	10.02.2009			34	21.10.2010
MN 48	P 46	1652/09	22.10.2009			26	04.11.2009
MN 49	P 47	1675/09	28.10.2009			26	12.01.2010
MN 50	P 48	1746/09	09.11.2009			25	02.08.2011
MN 51	P 49	1822/09	23.11.2009			25	05.11.2010
MN 52	P 50	1832/09	25.11.2009			25	10.11.2011
MN 53	P 51	1867/09	02.12.2009			24	15.02.2010
MN 54	P 52	1957/09	18.12.2009			24	15.09.2011
MN 55	P 53	112/10	25.01.2010			23	19.05.2011
MN 56	P 54	134/10	28.01.2010			23	22.11.2011
MN 57	P 55	185/10	04.02.2010			22	14.07.2011
MN 58	P 56	207/10	08.02.2010			22	15.09.2011
MN 59	P 57	346/10	04.03.2010			21	18.10.2011
MN 60	P 58	374/10	09.03.2010			21	29.11.2011
MN 61	P 59	461/10	25.03.2010			21	07.11.2011
MN 62	P 60	487/10	31.03.2010			21	24.05.2011
MN 63	P 61	509/10	07.04.2010			20	16.09.2011
MN 64	P 62 §	987/08	18.06.2008	01.04.2010		21	28.09.2010
MN 65	P 62 §	559/10	15.04.2010	01.09.2010		5	28.09.2010
MN 66	P 63	613/10	23.04.2010			20	22.08.2011
MN 67	P 64	620/10	26.04.2010			20	01.08.2011
MN 68	P 65	701/10	11.05.2010			19	20.07.2010
MN 69	P 66	710/10	12.05.2010			19	19.07.2011
MN 70	P 67	727/10	17.05.2010			19	11.11.2010
MN 71	P 68	741/10	19.05.2010			19	01.06.2010
MN 72	P 69	748/10	20.05.2010			19	25.08.2010
MN 73	P 70	757/10	21.05.2010			19	02.08.2011
MN 74	P 71	827/10	08.06.2010			18	03.08.2011
MN 75	P 72	834/10	09.06.2010			18	15.11.2010
MN 76	P 73	842/10	10.06.2010			18	31.01.2011
MN 77	P 74	1745/09	09.11.2009	01.06.2010		6	08.11.2011
MN 78	P 74	876/10	16.06.2010			18	08.11.2011
MN 79	P 75	939/10	25.06.2010			18	01.07.2010
MN 80	P 76	555/09	02.04.2009			32	11.07.2011
MN 81	P 77	205/09	05.02.2009			34	03.05.2010
MN 82	P 78	1874/08	19.11.2008			0	17.05.2010
MN 83*	P 79	232/03	11.02.2003	01.05.2003		2	19.08.2003
MN 84*	P 79	798/03	21.05.2003			103	19.08.2003
MN 85*	P 80	1534/97	18.09.1997	01.10.2004		84	16.08.2011
MN 86*	P 80	1767/04	28.10.2004			86	16.08.2011
MN 87*	P 81	828/02	23.05.2002	01.02.2005		32	03.02.2011
MN 88*	P 81	91/05	19.01.2005			83	03.02.2011
MN 89*	P 82	244/05	14.02.2005	01.02.2007		23	12.07.2011
MN 90*	P 82	295/07	19.02.2007			58	12.07.2011
MN 91*	P 83	1407/97	22.08.1997	01.07.2007		118	16.08.2011
MN 92*	P 83	1014/07	05.07.2007			53	16.08.2011

MN 93*	P 84	904/00	31.05.2000	01.08.2008	98	12.11.2009
MN 94*	P 84	1382/08	26.08.2008		40	12.11.2009
MN 95*	P 85	306/99	25.02.1999		154	08.11.2011
MN 96*	P 86	230/99	16.02.1999		154	29.07.2008
MN 97*	P 87	671/02	24.04.2002		116	16.11.2004
MN 98*	P 88	170/01	31.01.2001		131	24.02.2010
MN 99*	P 89	94/98	20.01.1998	01.02.2010	144	04.10.2011
MN 100*	P 90	899/98	12.06.1998		162	09.07.2002
MN 101*	P 91	794/99	18.05.1999		151	14.10.2010
MN 102*	P 92	768/98	18.05.1998		163	24.04.2001
MN 103*	P 93	1214/97	29.07.1997		173	30.03.2004
MN 104*	P 94	1568/97	25.09.1997		171	08.11.2011
MN 105*	P 95	1939/08	26.11.2008		37	03.02.2009
MN 106*	P 96	1072/99	06.07.1999	01.01.2002	29	15.08.2009
MN 107*	P 96	32/02	08.01.2002	15.01.2009	84	15.08.2009
MN 108*	P 97	2043/01	27.11.2001		121	12.04.2011
MN 109*	P 98	948/00	07.06.2000		138	18.03.2011
MN 110*	P 99	1258/01	27.07.2001		125	25.05.2011
MN 111*	P 100	1237/04	04.08.2004		88	01.08.2005
MN 112*	P 101	1210/98	12.08.1998	01.11.1999	14	07.05.2009
MN 113*	P 101	1778/99	08.11.1999	01.01.2002	26	07.05.2009
MN 114*	P 101	67/02	15.01.2002		119	07.05.2009
MN 115*	P 102	379/01	05.03.2001	01.08.2001	4	27.11.2001
MN 116*	P 102	1342/01	10.08.2001	01.11.2001	3	27.11.2001
MN 117*	P 102	1808/01	12.11.2001		121	27.11.2001
MN 118*	P 103	587/99	19.04.1999	01.04.2002	35	22.06.2009
MN 119*	P 103	570/02	09.04.2002		116	22.06.2009
MN 120*	P 104	1812/05	22.11.2005	01.11.2006	11	17.08.2011
MN 121*	P 105 §	704/01	26.04.2001	01.06.2007	73	21.05.2010
MN 122*	P 105 §	961/07	27.06.2007	01.02.2009	19	21.05.2010
MN 123	P 105 §	201/09	05.02.2009	01.04.2010	14	21.05.2010
MN 124	P 105 §	516/10	08.04.2010		20	21.05.2010
MN 125*	P 106	2090/01	05.12.2001	01.07.2008	78	06.01.2009
MN 126*	P 106	1196/08	24.07.2008		41	06.01.2009

* = Daten von Dennis Kraemer; § = verstorben; nd = nicht durchgeführt; U = unmethyliert; M = methyliert; -1 = Verlust; 0 = kein Verlust des Chromosomenabschnitts. Lokalisationsverschlüsselung siehe Abkürzungsverzeichnis.

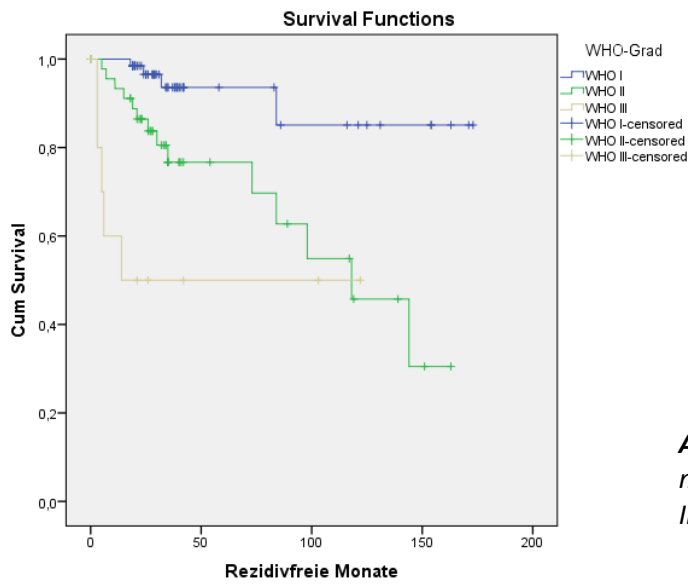


Abbildung T1: Die WHO-Grade II und III war mit einem signifikante kürzeren rezidivfreien Intervall assoziiert ($p < 0.001$).

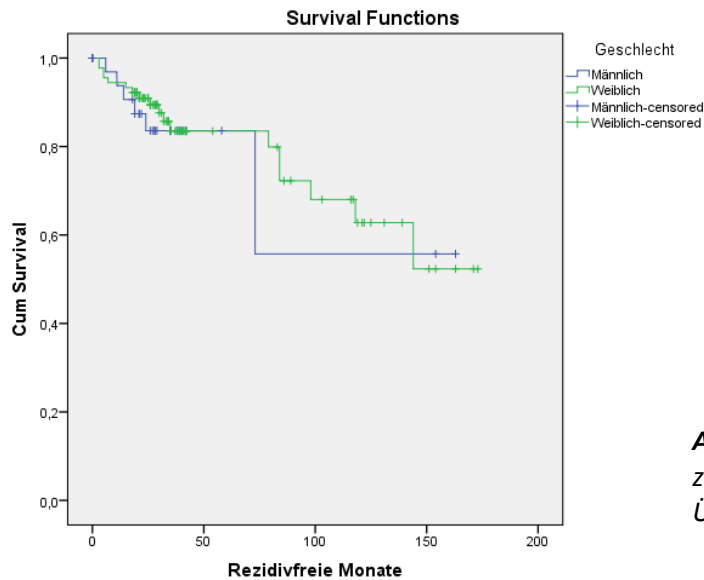


Abbildung T2: Es zeigte sich keine Assoziation zwischen Geschlecht und rezidivfreiem Überleben ($p = 0.741$).

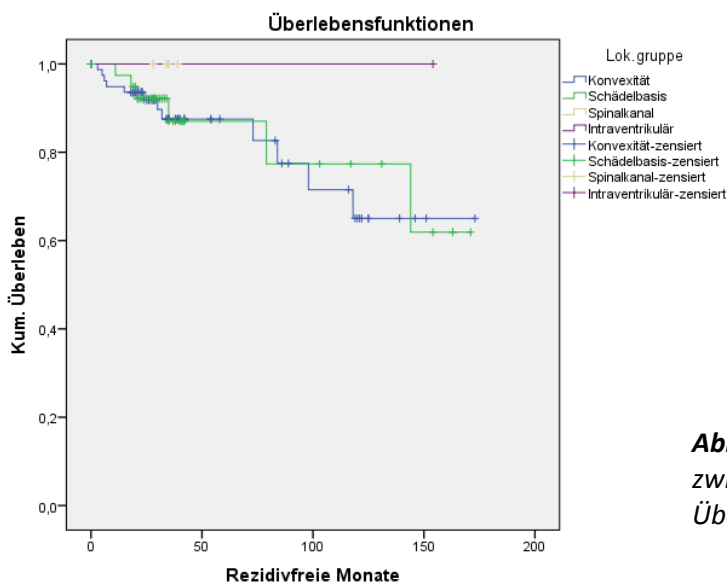


Abbildung T3: Es zeigte sich keine Assoziation zwischen Lokalisation und rezidivfreiem Überleben ($p = 0.8$).

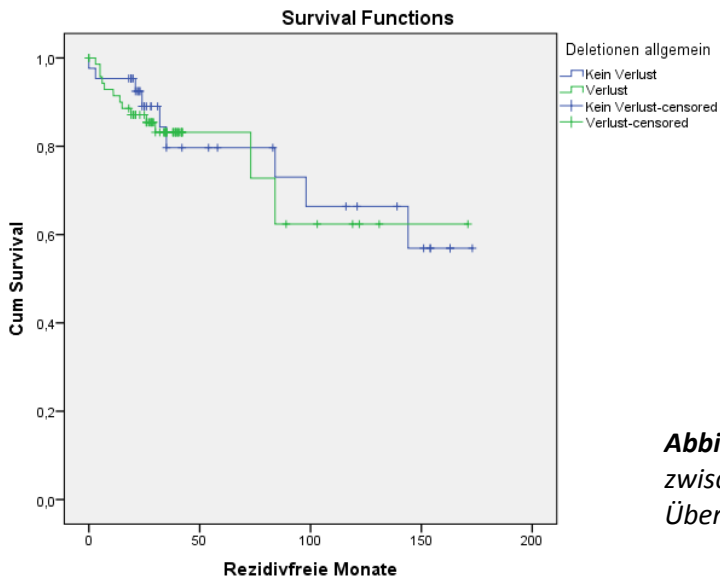


Abbildung T4: Es zeigte sich keine Assoziation zwischen Deletionen und rezidivfreiem Überleben ($p=0.717$).

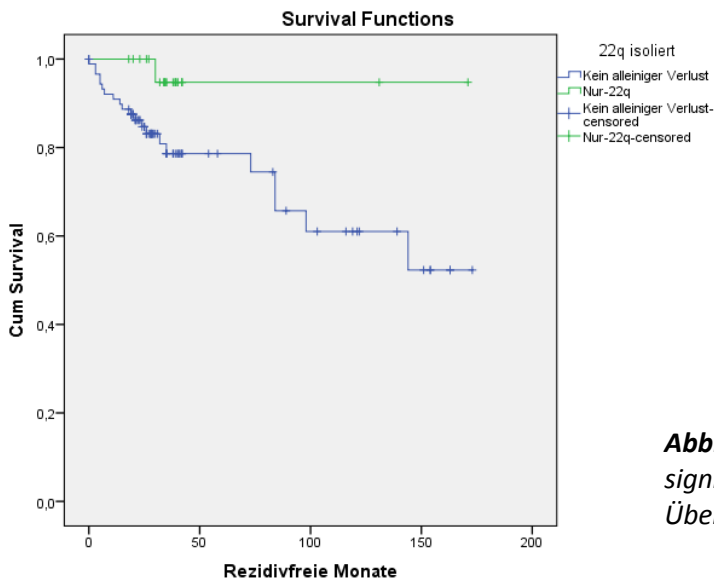


Abbildung T5: Isolierte 22q-Deletionen sind signifikant mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert ($p=0.049$).

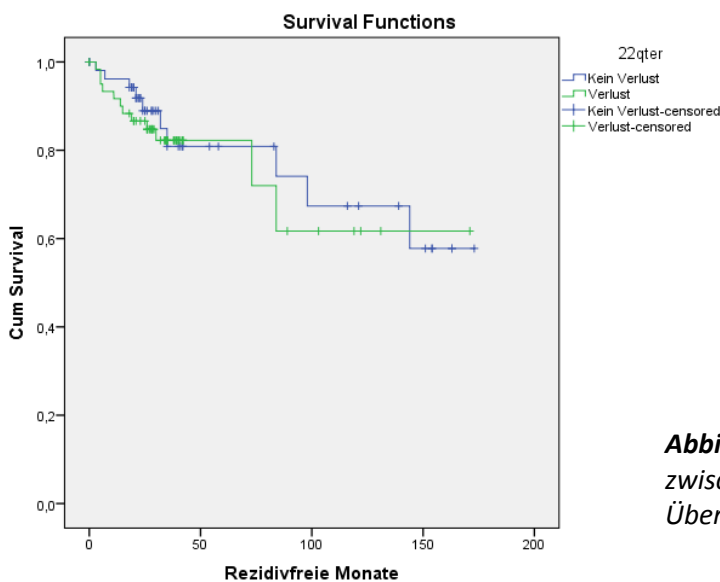


Abbildung T6: Es zeigte sich keine Assoziation zwischen einer 22q-Deletion und rezidivfreiem Überleben ($p=0.625$).

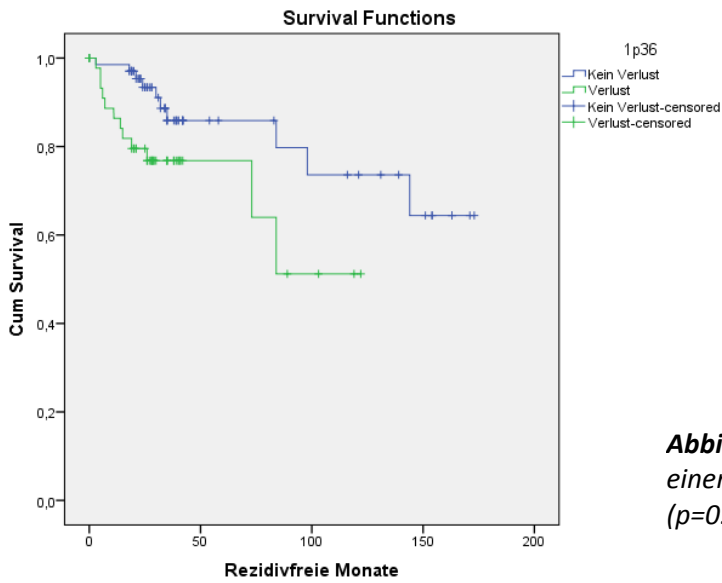


Abbildung T7: Eine Deletion von 1p36 war mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall assoziiert ($p=0.027$).

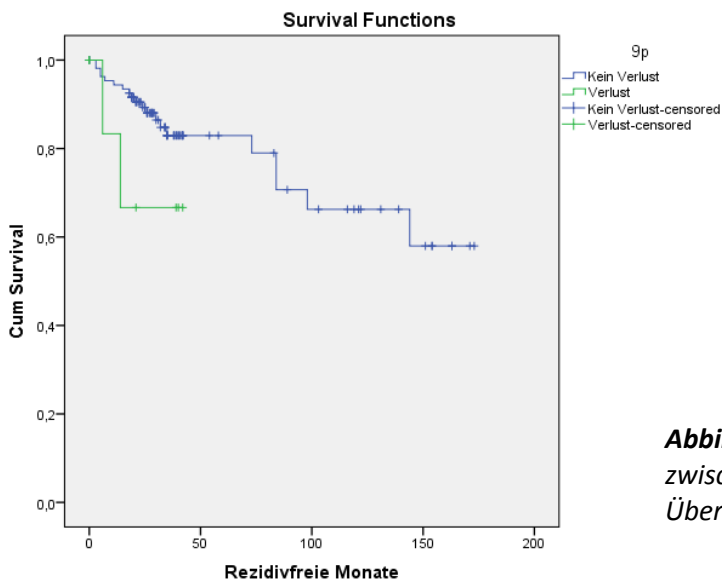


Abbildung T8: Es zeigte sich keine Assoziation zwischen einer 9p21-Deletion und rezidivfreiem Überleben ($p=0.179$).

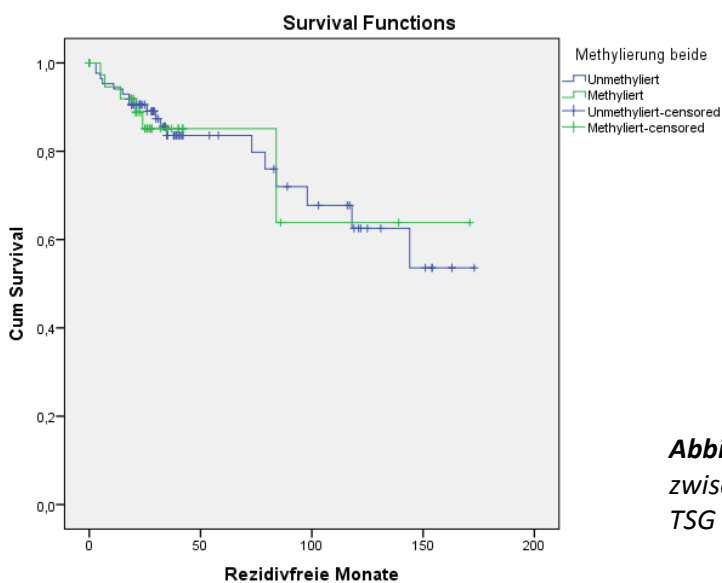


Abbildung T9: Es zeigte sich keine Assoziation zwischen einer Methylierung von einem beider TSG und rezidivfreiem Überleben ($p=0.939$).

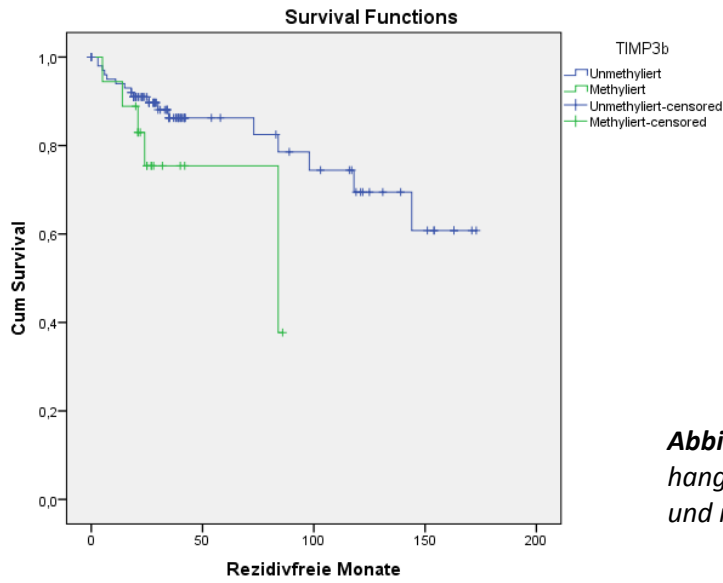


Abbildung T10: Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen einer TIMP3-Hypermethylierung und rezidivfreiem Überleben ($p=0.082$).

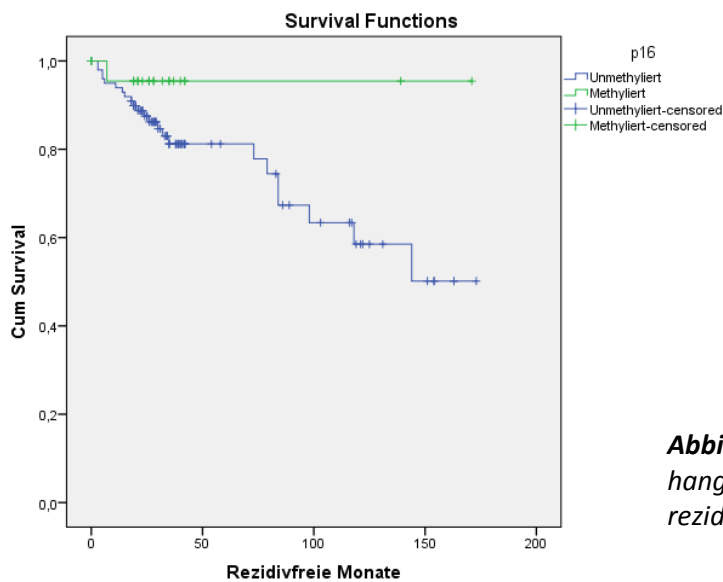


Abbildung T11: Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen einer p16-Hypermethylierung und rezidivfreiem Überleben ($p=0.124$).

Zu 2.1 Material und Methoden

WHO-Grade

	Männlich	Weiblich	Gesamt
WHO I	14	52	66
WHO II	15	32	47
WHO III	7	5	12
Gesamt	36	89	125

	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
WHO I	61	5	66
WHO II	34	13	47

WHO III	4	8	12
Gesamt	99	26	125

Lokalisationen

Lokalisation	Männlich	Weiblich	Gesamt
Konvexität	12	21	33
Parasagittal	4	14	18
Tub. Sellae	0	6	6
Olfaktoriusrinne	3	6	9
Keilbeinflügel	4	17	21
Tentorium	3	7	10
Spinal	2	2	4
HSG	3	9	12
Falx	2	6	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	2	2	4
Gesamt	36	90	126

Lokalisation	Männlich	Weiblich	Gesamt
Konvexität	24	57	81
Schädelbasis	9	31	40
Spinalkanal	2	2	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	36	90	126

Lokalisation	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Konvexität	25	8	33
Parasagittal	13	5	18
Tub. Sellae	5	1	6
Olfaktoriusrinne	8	1	9
Keilbeinflügel	17	4	21
Tentorium	6	4	10
Spinal	4	0	4
HSG	11	1	12
Falx	7	1	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	3	1	4
Gesamt	100	26	126

Lokalisation	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Konvexität	62	19	81
Schädelbasis	33	7	40
Spinalkanal	4	0	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	100	26	126

Lokalisation	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Konvexität	15	15	3	33
Parasagittal	6	9	3	18
Tub. Sellae	4	1	0	5
Olfaktoriusrinne	4	5	0	9
Keilbeinflügel	15	5	1	21
Tentorium	3	3	4	10
Spinal	3	1	0	4

HSG	9	2	1	12
Falx	4	4	0	8
Intraventrikulär	1	0	0	1
Petroclival	2	2	0	4
Gesamt	66	47	12	125

Lokalisation	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Konvexität	37	33	11	81
Schädelbasis	25	13	1	39
Spinalkanal	3	1	0	4
Intraventrikulär	1	0	0	1
Gesamt	66	47	12	125

FISH-Analysen

	Verlust	Ø Verlust	Gesamt
Deletion	73	44	117
1p36	47	69	116
22q (isoliert)	24	88	116
22q (kombiniert)	61	55	116
9p21	8	109	117

	22q Ø Verlust	22q-Verlust	Gesamt
1p36 Ø Verlust	45	24	69
1p36-Verlust	10	37	47
Gesamt	55	61	116

	9p21 Ø Verlust	9p21-Verlust	Gesamt
1p36 Ø Verlust	68	1	69
1p36-Verlust	41	6	47
Gesamt	109	7	116

FISH und Geschlecht

Alle Deletionen			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Männlich	9	27	36
Weiblich	35	46	81
Gesamt	44	73	117

1p36			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Männlich	16	19	35
Weiblich	53	28	81
Gesamt	69	47	116

22q(kombiniert)			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Männlich	15	20	35
Weiblich	40	41	81
Gesamt	55	61	116

22q (isoliert)			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Männlich	29	6	35
Weiblich	63	18	81
Gesamt	92	24	116

9p21			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Männlich	30	6	36
Weiblich	79	2	81
Gesamt	109	8	117

FISH und Präsentation

Alle Deletionen			
	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Ø Verlust	37	7	44
Verlust	56	17	73
Gesamt	93	24	117

1p36			
	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Ø Verlust	62	7	69
Verlust	31	16	47
Gesamt	93	23	116

22q (kombiniert)			
	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Ø Verlust	46	9	55
Verlust	47	14	61
Gesamt	93	23	116

22q (isoliert)			
	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Ø Verlust	69	19	88
Verlust	24	0	24
Gesamt	93	19	112

9p21			
	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Ø Verlust	90	19	109
Verlust	3	5	8
Gesamt	93	24	117

FISH und WHO-Grad

Deletionen				
	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Ø Verlust	30	13	1	44
Verlust	32	30	11	73
Gesamt	62	43	12	117

1p36				
	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Ø Verlust	44	23	2	69
Verlust	18	20	9	47
Gesamt	62	43	11	116

22q (kombiniert)				
	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Ø Verlust	34	18	3	55
Verlust	28	25	8	61
Gesamt	62	43	11	116

22q (isoliert)				
	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Nicht isoliert	47	31	10	88
Isoliert	14	10	0	24
Gesamt	61	41	10	112

9p21				
	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Ø Verlust	61	41	7	109
Verlust	1	2	5	8
Gesamt	62	43	12	117

Lokalisationen

Alle Deletionen			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	9	20	29
Parasagittal	5	12	17
Tub. Sellae	1	4	5
Olfaktoriusrinne	4	4	8
Keilbeinflügel	11	9	20
Tentorium	6	4	10
Spinal	0	4	4
HSG	5	7	12
Falx	1	7	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	1	2	3
Gesamt	44	73	117

Alle Deletionen			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	26	50	76
Schädelbasis	17	19	36
Spinalkanal	0	4	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	44	73	117

1p36			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	14	15	29
Parasagittal	8	8	16

Tub. Sellae	3	2	5
Olfaktoriusrinne	5	3	8
Keilbeinflügel	14	6	20
Tentorium	6	4	10
Spinal	3	1	4
HSG	10	2	12
Falx	3	5	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	2	1	3
Gesamt	69	47	116

1p36			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	41	34	75
Schädelbasis	24	12	36
Spinalkanal	3	1	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	69	47	116

22q (kombiniert)			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	11	18	29
Parasagittal	7	9	16
Tub. Sellae	1	4	5
Olfaktoriusrinne	4	4	8
Keilbeinflügel	14	6	20
Tentorium	7	3	10
Spinal	0	4	4
HSG	6	6	12
Falx	2	6	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	2	1	3
Gesamt	55	61	116

22q (kombiniert)			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	33	42	75
Schädelbasis	21	15	36
Spinalkanal	0	4	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	55	61	116

22q (isoliert)			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	24	5	29
Parasagittal	13	3	16
Tub. Sellae	3	2	5
Olfaktoriusrinne	7	1	8
Keilbeinflügel	17	3	20
Tentorium	10	0	10
Spinal	1	3	4
HSG	8	4	12
Falx	6	2	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	2	1	3
Gesamt	92	24	116

22q (isoliert)			
Lokalisation	Nicht isoliert	isoliert	Gesamt
Konvexität	61	14	75
Schädelbasis	29	7	36
Spinalkanal	1	3	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	92	24	116

9p21			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	26	3	29
Parasagittal	14	3	17
Tub. Sellae	5	0	5
Olfaktoriusrinne	8	0	8
Keilbeinflügel	20	0	20
Tentorium	10	0	10
Spinal	4	0	4
HSG	11	1	12
Falx	7	1	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	3	0	3
Gesamt	109	8	117

9p21			
Lokalisation	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Konvexität	68	8	76
Schädelbasis	36	0	37
Spinalkanal	4	0	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	109	8	117

Zu 3.1.1 Methylierungsstatus

Geschlecht und Präsentation

	Männlich	Weiblich	Gesamt
Unmethyliert	22	64	86
Methyliert	14	26	40
Gesamt	36	90	126

	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Unmethyliert	68	18	86
Methyliert	32	8	40
Gesamt	100	26	126

Verteilung der WHO-Grade

	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Unmethyliert	45	32	8	85
Methyliert	21	15	4	40
Gesamt	66	47	12	125

Lokalisationsverteilung

Lokalisation	Unmethyliert	Methyliert	Gesamt
Konvexität	23	10	33
Parasagittal	10	8	18
Tub. Sellae	4	2	6
Olfaktoriusrinne	6	3	9
Keilbeinflügel	14	7	21
Tentorium	7	3	10
Spinal	4	0	4
HSG	9	3	12
Falx	6	2	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	2	2	4
Gesamt	86	40	126

Lokalisation	Unmethyliert	Methyliert	Gesamt
Konvexität	55	26	81
Schädelbasis	26	14	40
Spinalkanal	4	0	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	86	40	126

FISH-Analysen

Alle Deletionen			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	28	51	79
Methyliert	16	22	38
Gesamt	44	73	117

1p36			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	46	33	79
Methyliert	23	14	37
Gesamt	69	47	116

22q (kombiniert)			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	34	45	79
Methyliert	21	16	37
Gesamt	55	61	116

22q (isoliert)			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	61	27	88
Methyliert	17	7	24
Gesamt	78	34	112

9p21			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	76	3	79
Methyliert	33	5	38
Gesamt	109	8	117

Ergänzende Tabellen

9p21 (Rezidive)			
	Ø Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	16	1	17
Methyliert	3	4	7
Gesamt	19	5	24

Zu 3.1.2 *TIMP3*-Methylierung

Geschlecht und Präsentation

	Männlich	Weiblich	Gesamt
Unmethyliert	28	76	104
Methyliert	6	12	18
Gesamt	34	88	122

	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Unmethyliert	85	19	104
Methyliert	12	6	18
Gesamt	97	25	122

Verteilung der WHO-Grade

	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Unmethyliert	56	38	10	104
Methyliert	8	8	2	18
Gesamt	64	46	12	122

Lokalisationsverteilung

Lokalisation	Unmethyliert	Methyliert	Gesamt
Konvexität	28	4	32
Parasagittal	15	3	18
Tub. Sellae	4	1	5
Olfaktoriusrinne	7	2	9
Keilbeinflügel	16	5	21
Tentorium	9	1	10
Spinal	4	0	4
HSG	11	0	11
Falx	7	1	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	2	1	3

Gesamt	104	18	122
---------------	-----	----	-----

Lokalisation	Unmethyliert	Methyliert	Gesamt
Konvexität	70	9	79
Schädelbasis	29	9	38
Spinalkanal	4	0	4
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	104	18	122

FISH-Analysen

1p36			
	Verlust	∅ Verlust	Gesamt
Unmethyliert	40	57	97
Methyliert	6	10	16
Gesamt	46	67	113

22q (kombiniert)			
	Verlust	∅ Verlust	Gesamt
Unmethyliert	54	43	97
Methyliert	5	11	16
Gesamt	59	54	113

22q (isoliert)			
	Verlust	∅ Verlust	Gesamt
Unmethyliert	75	11	86
Methyliert	21	2	23
Gesamt	96	13	109

9p21			
	Verlust	∅ Verlust	Gesamt
Unmethyliert	5	92	97
Methyliert	3	14	17
Gesamt	8	106	114

Alle Deletionen			
	∅ Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	35	62	97
Methyliert	8	9	17
Gesamt	43	71	114

Zusätzliche Tabellen

9p21 (Rezidive)			
	Verlust	∅ Verlust	Gesamt
Unmethyliert	16	2	18
Methyliert	2	3	5
Gesamt	18	5	23

Zu 3.1.3 p16-Methylierung

Geschlecht und Präsentation

	Männlich	Weiblich	Gesamt
Unmethyliert	26	74	100
Methyliert	10	15	25
Gesamt	36	89	125

	Primärt.	Rezidiv	Gesamt
Unmethyliert	77	23	100
Methyliert	22	3	25
Gesamt	99	26	125

WHO-Grade

	WHO I	WHO II	WHO III	Gesamt
Unmethyliert	52	38	9	99
Methyliert	13	9	3	25
Gesamt	65	47	12	124

Lokalisationsverteilung

Lokalisation	Unmethyliert	Methyliert	Gesamt
Konvexität	26	7	33
Parasagittal	12	6	18
Tub. Sellae	5	1	6
Olfaktoriusrinne	8	1	9
Keilbeinflügel	18	3	21
Tentorium	8	2	10
Spinal	3	0	3
HSG	9	3	12
Falx	7	1	8
Intraventrikulär	1	0	1
Petroclival	3	1	4
Gesamt	100	25	125

Lokalisation	Unmethyliert	Methyliert	Gesamt
Konvexität	62	19	81
Schädelbasis	34	6	40
Spinalkanal	3	0	3
Intraventrikulär	1	0	1
Gesamt	100	25	125

FISH-Analysen

Alle Deletionen			
	∅ Verlust	Verlust	Gesamt
Unmethyliert	36	56	92
Methyliert	8	16	24
Gesamt	44	72	116

1p36			
	Verlust	Ø Verlust	Gesamt
Unmethyliert	38	54	92
Methyliert	9	14	23
Gesamt	47	68	115

22q (kombiniert)			
	Verlust	Ø Verlust	Gesamt
Unmethyliert	48	44	92
Methyliert	12	11	23
Gesamt	60	55	115

22q (isoliert)			
	Verlust	Ø Verlust	Gesamt
Unmethyliert	71	17	88
Methyliert	17	6	23
Gesamt	88	23	111

9p21			
	Verlust	Ø Verlust	Gesamt
Unmethyliert	5	87	92
Methyliert	3	21	24
Gesamt	8	108	116

Zusätzliche Tabellen

Geschlecht (Rezidive)			
	Verlust	Ø Verlust	Gesamt
Unmethyliert	7	16	23
Methyliert	3	0	3
Gesamt	10	16	26

9p21 (Rezidive)			
	Verlust	Ø Verlust	Gesamt
Unmethyliert	3	18	21
Methyliert	2	1	3
Gesamt	5	19	24