

Aus der Neurochirurgischen Klinik,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. J. Oertel)

**Wachstumsrate von Meningeomzellen in der Zellkultur unter verschiedenen
Bedingungen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2025

Vorgelegt von: Anna-Lena Moroldo
Geb. am: 03.01.2001 in Völklingen

Tag der Promotion: 1. Oktober 2025
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig
Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Oertel
PD Dr. Johann Wolfgang Metzger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 Einleitung	3
2.1 Allgemeines zu Meningeomen	3
2.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren	3
2.1.2 Klassifikation der World Health Organization (WHO)	4
2.1.3 Symptome.....	5
2.1.4 Diagnostik	6
2.1.5 Therapie und Rezidivverhalten	7
2.1.5.1 Simpson-Klassifikation.....	8
2.2 Fragestellung.....	9
3 Material und Methodik	10
3.1 Material.....	10
3.1.1 Patientenkollektiv.....	10
3.1.2 Lösungen, Materialien und Geräte	12
3.2 Methodik	13
3.2.1 Kultivierung von Meningeomzellen	13
3.2.1.1 Ansatz.....	13
3.2.1.2 Mediumwechsel	15
3.2.1.3 Splitting	16
3.2.1.4 Abbruch der Zellkultur für die FISH	17
3.2.1.5 Herstellung der Tropfpräparate.....	19
3.2.2 Herstellung der Tupfpräparate.....	20
3.2.3 Zellen zählen, einfrieren und auftauen	21

3.2.3.1	Zellzählung	21
3.2.3.2	Einfrieren in Cryotubes	22
3.2.3.3	Auftauen der Zellen	22
3.2.4	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	23
3.2.4.1	RNase Verdau und Pepsinbehandlung	24
3.2.4.2	Fixierung und Ethanolreihe	25
3.2.4.3	Hybridisierung	25
3.2.4.4	Stringenzwaschung	26
3.2.4.5	Eindecken mit Antifade-4',6-Diamidin-2-pheylindol (DAPI)	26
3.2.4.6	Bestimmung der Cut-off-Werte	27
3.2.4.7	Auswertung	27
3.2.5	Loss-of-heterozygosity-Analyse (LOH-Analyse).....	28
3.2.6	Statistik	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Allgemeine Ergebnisse des Patientenkollektivs	30
4.2	Wachstumsrate der Primäransätze (p0-Ansätze).....	33
4.3	Wachstumsrate der Sekundäransätze (p2-Ansätze).....	41
4.4	Wachstumsrate der Ansätze aus gefrorenem, nativem Gewebe	48
4.5	Ergebnisse der Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung	50
4.5.1	Tropfpräparate der Primäransätze (p1-Ansätze)	51
4.5.2	Tropfpräparate der Sekundäransätze (p2-Ansätze)	52
4.5.3	Tupfpräparate aus gefrorenem, nativem Gewebe	54
4.5.4	Sonderfall T 9181	55
4.6	Ergebnisse der Loss-of-Heterozygosity-Analyse (LOH-Analyse).....	55
5	Diskussion	57
5.1	Daten aus dem Patientenkollektiv	58
5.2	Diskussion der Wachstumsraten	59
5.3	Diskussion der FISH-Ergebnisse.....	61
5.4	Betrachtung eines Sonderfalls.....	63

5.5	Ausblick	64
6	Literaturverzeichnis	65
7	Tabellenanhang	70
7.1	Lösungen, Materialien und Geräte	70
7.2	Ergebnisse der Zellzählung	74
7.3	FISH-Ergebnisse	76
7.3.1	Tropfpräparate der Primäransätze (p1) (zu 4.5.1)	76
7.3.2	Tropfpräparate der Sekundäransätze (p2) (zu 4.5.2)	81
7.3.3	Tupfpräparate aus gefrorenem, nativem Gewebe (zu 4.5.3)	85
8	Publikationen und Vorträge	88
9	Danksagung	89
10	Lebenslauf	90

Abkürzungsverzeichnis

A.d.	Aqua destillata
cMRT	craniale Magnet-Resonanz-Tomographie
cCT	craniale Computertomographie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure (DNS))
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FISH	Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung
GPS	Genetischer Progressionsscore
HCl	Salzsäure
HSG	Hintere Schädelgrube
KCl	Kaliumchlorid
KHBW	Kleinhirnbrückenwinkel
KM	Kontrastmittel
M	Mol/l (früher: molar)
MEM NEAA	Minimum Essential Medium, Non Essential Amino Acid Solution (Nicht-essenzielle Aminosäure-Lösung)
N	Anzahl (Statistik)
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
OT	Objektträger
p0	Passage 0, Primärkultur
p1	Passage 1, Primärkultur
p2	Passage 2, Sekundärkultur
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pen Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii (lat.)
RCF	relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)

RF	Raumforderung
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (Statistik)
SSC	Saline sodium citrate (Natriumcitrat-Salzlösung)
T-Nr.	Tumornummer
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
1p36	Spezifischer Abschnitt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1
1p-	Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1
14q-	Verlust des langen Armes von Chromosom 14
22q11	Spezifischer Abschnitt auf dem langen Arm von Chromosom 22
22q-	Verlust des langen Armes von Chromosom 22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 a-c: Präoperative, axiale cMRT-Aufnahmen	6
Abbildung 2 a-b: Axiale Schnittbildaufnahmen; postoperative Verlaufskontrollen	7
Abbildung 3: Beispielhafte, intraoperative Aufnahme.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Tropfpräparation.....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tupfpräparation	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung der FISH	24
Abbildung 7: Darstellung der hybridisierten Genloci 1p36 und 22q11	26
Abbildung 8: Verteilung der Geschlechter.....	30
Abbildung 9: Diagnose der Meningeome nach WHO-Klassifikation	31
Abbildung 10: Zytogenetische Befunde.....	32
Abbildung 11: Lokalisation der Meningeome	33
Abbildung 12: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze A p0	34
Abbildung 13 a-f: Zellwachstum der Kultur T 9181 A p0 und p1 im Verlauf.....	35
Abbildung 14 a-b: Zellwachstum der Kultur T 9168 A p0 im Verlauf	36
Abbildung 15: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze B p0	36
Abbildung 16 a-d: Zellwachstum der Kulturen T 9145 B p0 und T 9168 B p0 im Verlauf ...	37
Abbildung 17: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A und B p0	38
Abbildung 18: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p1.....	40
Abbildung 19: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze A p2	41
Abbildung 20 a-d: Zellwachstum der Kultur T 9181 A p2 im Verlauf	42
Abbildung 21: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze B p2	43
Abbildung 22 a-c: Zellwachstum der Kultur T 9181 B p2 im Verlauf.....	43
Abbildung 23: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A und B p2	44
Abbildung 24 a-c: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen	45
Abbildung 25: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p2.....	47
Abbildung 26 a-c: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen.....	48
Abbildung 27: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze aus gefrorenem, nativem Gewebe	49
Abbildung 28 a-b: Beobachtung der Kultur T 9077 aus gefrorenem, nativem Gewebe im Verlauf	49
Abbildung 29: FISH-Ergebnisse	50
Abbildung 30 a-b: Beispiele für Tropf- und Tupfpräparate	51
Abbildung 31 a-b: FISH-Aufnahmen: T 9152 B p1 und T 9194 A p1	52
Abbildung 32 a-b: FISH-Aufnahmen von T 9152 A p2 und T 9181 A p2	53
Abbildung 33: FISH-Aufnahme: Tupfpräparat T 9108	54

Abbildung 34 a-b: a Tupfpräparat T 9168 und FISH-Aufnahme	54
Abbildung 35 a-b: Übersicht über die verwendeten Sonden.....	56
Abbildung 36 a-b: Bandenmuster der LOH-Analyse	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Meningeome.....	5
Tabelle 2: Simpson-Klassifikation.....	8
Tabelle 3: Übersicht über die betrachteten Parameter der Tumorproben.....	11
Tabelle 4: Luftfeuchtigkeitsabhängige Einwirkzeit der KCl-Lösung (Hypotoniezeit)	18
Tabelle 5: Überblick über das Alter zum Zeitpunkt der Operation im Zusammenhang mit dem Geschlecht	31
Tabelle 6 a-c: Statistische Kennwerte für das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation	31
Tabelle 7: Wachstum der Zellkulturen der Passage 0 insgesamt (Ansätze A und B)	33
Tabelle 8: Durchschnittliche Dauer bis zum mikroskopisch sichtbaren Auswachsen der Zellen aus dem Gewebe der Ansätze A und B p0	38
Tabelle 9: Durchschnittliche Dauer bis zum Splitting der Ansätze A und B p0	39
Tabelle 10 a-b: Durchschnittliche Dauer bis zur Weiterverarbeitung der Zellkulturen A und B p1	39
Tabelle 11: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p1	40
Tabelle 12: Wachstum der Zellkulturen der Passage 2 insgesamt (Ansätze A und B)	41
Tabelle 13: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A p0, B p0, A p2 und B p2	45
Tabelle 14 a-b: Vergleich der durchschnittlichen Dauer bis zum Abbruch der Zellkulturen für die FISH innerhalb der Passage 2 sowie zwischen Primär- (p0/p1) und Sekundärgeneration (p2).....	46
Tabelle 15: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p2	47
Tabelle 16: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A p0, B p0, A p2, B p2 und gefrorenem, nativem Gewebe.....	50
Tabelle 17: Gegenüberstellung des Anteils der Zellen mit kombiniertem Verlust von 1p und 22q an der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen von T 9181 A und B p1 sowie des Tupfpräparates	55
Tabelle 18: Ergebnisse der LOH-Analyse	56
Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Reagenzien.....	70
Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten Lösungen	71
Tabelle 21: Übersicht über alle verwendeten Geräte und Softwares	72
Tabelle 22: Übersicht über die wichtigsten Verbrauchsmaterialien.....	73
Tabelle 23: Übersicht über alle Ergebnisse der Zellzählungen der Primärkulturen (p1)	74
Tabelle 24: Übersicht über alle Ergebnisse der Zellzählungen der Sekundärkulturen (p2) ..	75

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die Anzucht von primären Zellkulturen ist eine etablierte Methode in der Tumorforschung. Hierbei spielt die Wachstumsrate eine wichtige Rolle für die Ergebnisse. Abhängig vom experimentellen und klinischen Setting ist das verwendete Gewebe unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Der Einfluss dieser Bedingungen auf das Wachstumsverhalten von Zellkulturen ist bis jetzt noch nicht gut untersucht. In dieser Dissertation werden die Ergebnisse einer experimentellen Analyse von Zellkulturen primärer Meningeomzellen präsentiert, nachdem das Tumorgewebe initial unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt war.

Für diese experimentelle Arbeit wurden im Jahr 2022 von Juni bis Dezember 10 primäre, humane Meningeome nach Operation in der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes gesammelt. Um zu untersuchen, ob es eine Änderung im Wachstumsverhalten der Zellen gibt, wenn das Gewebe nicht direkt nach der Operation weiterverarbeitet wird, wurde am Tag der Operation eine primäre Zellkultur (Ansatz A p0) und mit einem zeitlichen Versatz von 24 Stunden eine zweite (Ansatz B p0) angesetzt. Zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens von Sekundärkulturen wurden Zellen nach Splitting der p0-Kulturen in zwei p1-Kulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach 6-7 Monaten rekultiviert. Ergänzend wurden im Vergleich zu den Primär- und Sekundärkulturen Ansätze aus Gewebe jedes Meningeoms angefertigt, das nativ ohne Nährlösung oder Frostschutz eingefroren wurde. Für jedes Meningeom wurden ein Tupfpräparat und pro Ansatz A und B jeweils ein Tropfpräparat der primären (p1) und der sekundären Zellkultur (p2) angefertigt und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unterzogen. Die Ergebnisse wurden mit denen der Loss-of-Heterozygosity-Analyse (LOH-Analyse) verglichen, um die valide Repräsentation des Tumorgewebes durch die Zellkultur zu überprüfen.

Es wurde gezeigt, dass das Wachstumsverhalten von Meningeomzellkulturen unabhängig vom oben genannten zeitlichen Ansatz war, vorausgesetzt, dass sich ausreichend lebende Zellen im verwendeten Gewebe befanden. Zudem wurde deutlich, dass eine Kultivierung aus nativem, gefrorenem Tumormaterial unter Verwendung derselben Methoden nicht möglich war. Auf der anderen Seite ließen sich die eingefrorenen Zellen sehr gut erneut kultivieren. Insgesamt waren circa 90 % aller Zellkulturen angewachsen. Zudem verifizierten die Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, dass die etablierten primären Zellkulturen das Tumormaterial valide repräsentierten, auch nach dem Einfrieren und Rekultivieren.

1.2 Abstract

Cell cultures are an established method in tumor research. Thereby, the growth rate is important for the results. Depending on the experimental and clinical setting, the tissue used is exposed to different conditions. The influence of these cell and tissue conditions on the growth pattern of cell cultures are not well reported yet. Here, the results of an experimental analysis of cell culture of primary meningioma cells after different initial tissue conditions are presented.

In 2022, from June to December, 10 primary human meningiomas were collected after surgery at the Neurosurgical Department of the Saarland University for this experimental work. In order to investigate whether there is a change in the growth pattern of the cells if the tissue is not processed immediately after surgery, a first cell culture was set up directly on the day of surgery (approach A p0) and a second cell culture (approach B p0) only 24 hours later. Cells were frozen in liquid nitrogen after splitting the p0-cultures into 2 p1-cultures and recultured after 6-7 months to observe the growth pattern of secondary cell cultures. Additionally and in comparison to the primary and secondary cell cultures, approaches were prepared from tissue of each meningioma that was frozen natively without nutrient or antifreeze solution. For each meningioma, a touch preparation was prepared, further a drop preparation of the primary (p1) and the secondary cell culture (p2) for each approach A and B. All preparations were subjected to Fluorescence in situ hybridization. The results were compared with those of the Loss-of-Heterozygosity-Analysis (LOH-Analysis) to verify the valid representation of tumor tissue by cell culture.

It has been shown that the growth pattern of meningioma cell cultures was independent of the time they are set up under the condition that there were enough living cells in the tissue. Further, the culturing of frozen tissues was not possible in the same setting. On the other hand, the frozen cell cultures could be recultivated very well. Moreover, the results of Fluorescence in situ hybridization verified that the established primary cell cultures validly represented the tumor material, even after freezing and recultivating.

2 Einleitung

2.1 Allgemeines zu Meningeomen

H. Cushing prägte 1922 den Begriff des Meningeoms [10]. Dabei handelt es sich um meistens benigne, langsam wachsende Tumoren mit leptomeningealem Ursprung. Meningeome stellen einen Anteil von 36,6 % aller Primärtumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS) und 53,2 % aller nicht-malignen Primärtumoren in den USA [7]. Die Inzidenz liegt bei circa 8 pro 100.000 Menschen und steigt mit zunehmendem Alter [7,17]. Zudem ist bekannt, dass insgesamt mehr Frauen als Männer an einem Meningeom erkranken. Das Verhältnis liegt etwa bei 2:1 bis 3:1 [7,48]. Höhergradige Meningeome (atypische oder anaplastische) haben die höchste Inzidenz bei Frauen im Alter von 35-64 Jahren und bei Männern ≥ 75 Jahre [26].

Mehr als 90 % (circa 92 %) der meningealen Tumoren sind intrakraniell vorzufinden, während weniger als 10 % (circa 8 %) spinal wachsen [21,22]. Bevorzugt entstehen Meningeome an den Umschlagsfalten der Durablätter. Prädilektionsstellen sind somit die Falx cerebri, die Konvexität, das Tentorium, die Schädelbasis und die venösen Sinus [35].

2.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Bereits 1922 war bekannt, dass der Ursprung der Meningeome in den Arachnoidalzellen liegt [10,48]. In den meisten Fällen entstehen Meningeome sporadisch. Die Entstehung ist oft mit Chromosomenaberrationen assoziiert, vor allem mit der Monosomie 22 [48,51]. Die Hypodiploidität, die vor allem die Chromosomen 14, 18 und 19 betrifft, aber auch die Chromosomen 6 und 10, spielt eine wichtige Rolle in der Progression der Meningeome. Höhergradige (atypische oder anaplastische) Meningeome sind assoziiert mit dem Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 [21,50].

Der stärkste Risikofaktor für die Entstehung eines Meningeoms ist die ionisierende Strahlenbelastung des Schädels [7]. Je höher die Strahlendosis ist, desto höher ist das Risiko für das Auftreten eines Meningeoms und desto kürzer ist die Latenzzeit. Zudem treten strahleninduzierte Meningeome oft multifokal auf und zeigen häufiger atypische Muster mit höheren Proliferationsindices als sporadisch auftretende Meningeome [46].

Der zweitstärkste Risikofaktor ist die genetische Prädisposition [48]. Sie liegt bei einigen Syndromen vor, die mit einem erhöhten Risiko für Meningeome einhergehen. Die häufigste vererbte Erkrankung in dieser Hinsicht ist die Neurofibromatose Typ II (NF2), die mit einer Mutation des NF2-Gens auf Chromosom 22 einhergeht [7,48]. Diese führt in den meisten Fällen zu einer Inaktivität des Merlin-Proteins durch verminderte Expression [44]. Weiterhin

sind beispielsweise das Von-Hippel-Lindau-Syndrom oder das Multiple-Endokrine-Neoplasie-Syndrom vom Typ 1 (MEN) zu nennen [7].

Das fakultative Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf Meningeomen macht sowohl die erhöhten Östrogenspiegel in der prämenopausalen Frau als auch die exogene Zufuhr von Östrogenen zu einem weiteren Risikofaktor [20,48].

2.1.2 Klassifikation der World Health Organization (WHO)

Erstmalig wurde eine histologische Einteilung der Neoplasien des ZNS 1979 publiziert [52]. Im Vordergrund stehen die Tumore des ZNS, die sowohl intrazerebrale als auch spinale Tumoren, eingeschlossen der Tumoren der Hirnnerven, umfassen [32].

2016 wurde die bis dahin aktuelle Version der WHO-Klassifikation für Tumoren des ZNS von 2007 [12,32] erneuert. An der Klassifikation der Meningeome veränderte sich bis auf ein Kriterium nichts. Neben dem Vorliegen von 4 oder mehr Mitosefiguren als histologisches Kriterium, das genügt, um die Diagnose eines atypischen Meningeoms zu stellen, reicht nun auch das invasive Wachstum in das umgebende Gehirngewebe aus. Die additiven, histologischen Kriterien (Nekrosen, Verlust des lobulären Musters („Sheeting“), große Nukleoli, hohe Zelldichte und kleine Zellen), die zur Diagnosestellung herangezogen werden können, sind gleich geblieben. Es müssen weiterhin 3 von 5 der genannten Kriterien erfüllt sein [33].

In der aktuellen Klassifikation werden 15 verschiedene Subtypen der Meningeome weiterhin den WHO-Graden I bis III zugeordnet (siehe Tabelle 1, [33]).

WHO-Grad-I-Meningeome kommen mit einem Anteil von 80-94,3 % mit Abstand am häufigsten vor [7,36]. Sie werden als benigne bezeichnet und zeichnen sich durch einen niedrigen Proliferationsindex aus [7]. Die Rezidivrate variiert in dieser Klasse von 7-20 % [38]. Die atypischen Meningeome gehören dem WHO-Grad II an und stellen 5-20 % aller Meningeome [7,36]. Sie zeigen ein intermediäres biologisches Verhalten, was durch die Invasivität, Multifokalität und das Resektionsausmaß beeinflusst wird. Die Rezidivrate dieses Grades steigt mit hoher Mitoserate, Hyperzellularität, Zellkern-Atypie, Prominenz des Nukleolus, „Sheeting“ und Nekrosen. Wenn diese Kriterien vorliegen, aber keine offensichtliche Anaplasie erkennbar ist, kann die Diagnose eines atypischen Meningeoms gestellt werden [23]. Prozentual gesehen, liegt das Risiko, ein Rezidiv eines Grad-II-Meningeoms zu erleiden, zwischen 30 und 40 % [38].

Nur 1-3 % sind maligne Meningeome, die dem WHO-Grad III zugeordnet werden [7,36]. Sie besitzen die Fähigkeit zu metastasieren und invasiv in das umliegende Gewebe einzuwachsen. Nicht alle zeigen ein anaplastisches Gewebemuster (siehe Tabelle 1). Das papilläre Meningeom beispielsweise ist eine äußerst aggressive Form des malignen Meningeoms. Es weist neben einer hohen Rate an Invasionen in das umliegende Gewebe,

Rezidiven und Metastasierung auch eine Letalität von 50 % auf [23]. Die Rezidivrate dieses Grades liegt bei 50-80 % [38].

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Meningeome [13,33]; WHO – World Health Organization.

WHO-Grad	Meningeom-Subtyp
I	Meningeome <i>Meningotheliales Meningeom</i> <i>Fibroblastisches Meningeom</i> <i>Transitionales Meningeom</i> <i>Psammomatöses Meningeom</i> <i>Angiomatöses Meningeom</i> <i>Mikrozystisches Meningeom</i> <i>Sekretorisches Meningeom</i> <i>Lymphoplasmazellreiches Meningeom</i> <i>Metaplastisches Meningeom</i>
II	Atypische Meningeome <i>Chordoides Meningeom</i> <i>Klarzelliges Meningeom</i> <i>Atypisches Meningeom</i>
III	Anaplastische (maligne) Meningeome <i>Papilläres Meningeom</i> <i>Rhabdoides Meningeom</i> <i>Anaplastisches Meningeom</i>

2.1.3 Symptome

Die klinische Präsentation der Meningeome ist abhängig von ihrer Lokalisation. Wachsen die Tumoren nach innen, kann es durch ihr verdrängendes Wachstum in das Gehirnparenchym ab einer gewissen Größe zu einem erhöhten Hirndruck kommen. Dieser kann sich beispielsweise in Form von Kopfschmerzen, Übelkeit bis hin zu Emesis oder fokale neurologischen Ausfällen äußern. Epileptische Anfälle können ebenfalls auftreten [35]. Neben diesen lokalisationsabhängigen Symptomen kann es aber auch zu unspezifischen Kopfschmerzen oder Veränderungen des Verhaltens oder der Persönlichkeit kommen. Meningeome können aber auch nach außen wachsen und Hyperostosen bilden [34]. In den meisten Fällen bleiben die Meningeome aufgrund ihres langsamen Wachstums über Jahre asymptomatisch und werden im Rahmen von diagnostischen Untersuchungen als Zufallsbefunde entdeckt [35].

2.1.4 Diagnostik

Die kraniale Magnetresonanztomographie (cMRT) ist der Goldstandard in der Meningeom-Diagnostik. Bei vorliegenden Kontraindikationen für die Durchführung der cMRT (zum Beispiel implantierte Herzschrittmacher) kann die Kontrastmittel-gestützte (KM) kraniale Computertomographie (cCT) eingesetzt werden. In letzterer kann man intratumorale Kalzifikationen gut erkennen [7]. Beispielhaft sind in Abbildung 1 präoperative cMRT-Aufnahmen eines in die Arbeit eingeschlossenen Patienten abgebildet. Man erkennt zwei homogen KM-anreichernde, gut abgrenzbare Strukturen in der hinteren Schädelgrube (HSG), die an die Meningen angelagert sind. Die homogene KM-Aufnahme und die gute Abgrenzbarkeit zum umliegenden Gehirnparenchym sind typisch für die Entität des Meningeoms. Zudem ist das „Dura-Tail-Sign“ hinweisend, aber nicht pathognomonisch, auf das Vorliegen eines Meningeoms [7] (siehe Abbildung 1 a und 2 a). Das Zeichen beschreibt eine auslaufende KM-Affinität der anliegenden Dura.



a T1-Wichtung, nach KM-Gabe: 2 RF in der HSG: T 9175 (gelber Pfeil) und T 9177 (roter Pfeil).

b T2-Wichtung, Nativaufnahme von T 9175: infratentoriell, retrocerebellär links gelegene RF.

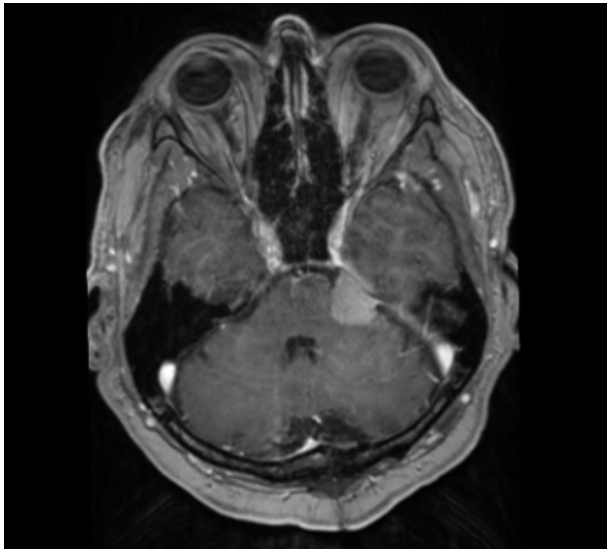
c T2-Wichtung, Nativaufnahme von T 9177: infratentoriell, im KHBW links gelegene RF.

Abbildung 1 a-c: Präoperative, axiale cMRT-Aufnahmen der Meningeome T 9175 und T 9177 (freundlicherweise bereitgestellt durch die Klinik für diagnostische und interventionelle Neuroradiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes); cMRT – kraniale Magnetresonanztomographie, HSG – Hintere Schädelgrube, KHBW – Kleinhirnbrückenwinkel, KM – Kontrastmittel, RF – Raumforderung.

Histopathologisch und molekularbiologisch erfolgt die weitere Klassifizierung der Meningeome auf neuropathologischer Ebene. Histopathologische Kriterien entscheiden über den WHO-Grad (siehe 2.1.2). Die Analyse molekularbiologischer Faktoren spielt eine wichtige Rolle, um eine Aussage über die Prognose und die Rezidivrate tätigen zu können [7].

2.1.5 Therapie und Rezidivverhalten

Die Operation ist die Therapie der Wahl bei operablen Patienten. WHO-Grad-I-Meningeome können durch eine totale Resektion kurativ therapiert werden. Die Patienten bedürfen postoperativ nach der Entlassung für 5 Jahre einer jährlichen CT- oder MRT-Aufnahme und anschließend alle 2 Jahre einer bildgebenden Verlaufskontrolle [2,7]. In Abbildung 2 sind postoperative Kontrollaufnahmen zu sehen, die am Tag nach der Resektion angefertigt wurden.



a cMRT-Aufnahme, T1-Wichtung nach KM-Gabe: erste postoperative Kontrolle nach Resektion des Meningeoms T 9175; komplette, retrocerebelläre Tumoresektion ohne restliche KM-Affinität; T 9177 unverändert KM-affin mit Dura-Tail-Sign.



b native cCT-Aufnahme: erste postoperative Kontrolle nach Resektion von T 9177; Lufteinschlüsse unter dem Trepanationsdefekt und okzipital am ehesten durch Resektion von T 9175 zu sehen.

Abbildung 2 a-b: Axiale Schnittbildaufnahmen; postoperative Verlaufskontrollen der Meningeome T 9175 und T 9177 (freundlicherweise bereitgestellt durch die Klinik für diagnostische und interventionelle Neuroradiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes); cCT – kraniale Computertomographie, cMRT – kraniale Magnetresonanztomographie, KM – Kontrastmittel.

Bei höhergradigen Meningeomen oder subtotaler Resektion eines Grad-I-Meningeoms ist neben der Operation eine adjuvante Radiatio notwendig, um das erhöhte Rezidivrisiko zu senken. Die Bestrahlung wird auch bei primär inoperablen Meningeomen oder beim Auftreten von Rezidiven eingesetzt. Eine Indikation für den Einsatz von Chemotherapie sind inoperable, progressive Meningeome, die nicht mehr bestrahlt werden können [2,7]. An zielgerichteten Therapien (targeted therapy), die in intrazelluläre Signalkaskaden der Meningeome eingreifen, wird immer noch geforscht [11].

Die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu erleiden, ist abhängig von biologischen, histopathologischen (WHO-Grad) und molekulargenetischen Faktoren sowie von der Operabilität des Meningeoms (siehe 2.1.5.1). Je älter der Patient und je höher der WHO-Grad ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs [17].

Auf molekulargenetischer Ebene haben Ketter et al. einen genetischen Progressionsscore (GPS) entwickelt, der eine Aussage über die Prognose und die Rezidivwahrscheinlichkeit ermöglicht [21]. Je höher der GPS ist, desto höher ist auch der histologische Grad des Meningeoms. Es gibt 3 GPS-Gruppen, denen die Meningeome nach ihrer molekulargenetischen Progression zugeordnet werden. Der kombinierte Verlust des langen Armes von Chromosom 22 und des kurzen Armes von Chromosom 1 (GPS Gruppe 2) geht im Vergleich zu einem normalen Karyotyp (GPS Gruppe 0) oder dem isolierten Verlust von 22q (GPS Gruppe 1) mit einem höheren Rezidivrisiko und einer verkürzten Latenzzeit bis zum Auftreten einher [21,22,30]. Auch die Deletion von 17q ist ein früher Marker für ein erhöhtes Rezidivrisiko [16]. Ebenso stellen heterogen verteilte Chromosomenaberrationen innerhalb des Tumors ein Risiko dar, weil sie das biologische Verhalten der Meningeome beeinflussen [36,47].

2.1.5.1 Simpson-Klassifikation

Das Risiko, nach der Resektion eines Meningeoms, ein Rezidiv zu erleiden, lässt sich anhand der Simpson-Klassifikation abschätzen. D. Simpson beschrieb erstmalig 1957 5-Jahres-Rezidivraten anhand des Umfangs der Resektion [41].

Tabelle 2: Simpson-Klassifikation [41].

Grad	Resektionszustand	Rezidivrate nach 5 Jahren
Grad I	Makroskopisch vollständige Resektion des Meningeoms, inklusive des Duraansatzes, betroffener Knochenstrukturen und wenn nötig eines Sinus	9 %
Grad II	Makroskopisch vollständige Resektion des Meningeoms mit thermischer Koagulation des Duraansatzes	19 %
Grad III	Makroskopisch vollständige Resektion des Meningeoms ohne thermische Koagulation des Duraansatzes oder Resektion eines betroffenen Knochens oder Sinus	29 %
Grad IV	Unvollständige Resektion mit Verbleib des intraduralen Tumoranteils in situ	44 %
Grad V	Dekompression mit oder ohne Biopsie	/

2.2 Fragestellung

Die Zellkultivierung ist eine etablierte Methode in der Tumorforschung, um Erkenntnisse über die verschiedenen Tumorentitäten zu erhalten. Sie bietet die Möglichkeit, unter anderem epigenetische und molekulargenetische Analysen an den Tumorzellen ex situ durchzuführen. Entscheidend für das Ergebnis und damit auch die Signifikanz ist das Wachstumsverhalten der Zellen. Das Tumorgewebe ist vom Zeitpunkt der Entnahme bis zur Bearbeitung im Labor unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Diese Konditionen hängen vom klinischen und experimentellen Setting ab. In der Literatur sind die Bedingungen aber kaum beschrieben oder untersucht worden.

In dieser Promotionsarbeit stellen Tumorproben von Meningeomen nach Operation der Patienten die Grundlage der Kulturen dar. Bei den beobachteten Konditionen steht vor allem die zeitliche Varianz im Vordergrund.

Primär wird in der vorliegenden Arbeit betrachtet, ob sich das Wachstumsverhalten der Meningeomzellen ändert, wenn man das Gewebe für einen Zellkulturansatz nicht sofort, sondern erst nach 24 Stunden Aufbewahrung in Nährlösung im Kühlschrank verarbeitet.

Darüber hinaus wird das Wachstumsmuster von Sekundärkulturen beschrieben, nachdem man die Primärkulturen für 6-7 Monate eingefroren und anschließend wieder aufgetaut hat.

Vervollständigt werden die Ansatzexperimente durch die Kultivierung von nativem, gefrorenem Meningeomgewebe und Beschreibung des Wachstumsverhaltens dieser Kulturen.

Zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen in den Meningeomzellen werden die Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) betrachtet. Dabei werden die Ergebnisse von allen angefertigten Tropfpräparaten sowohl mit denen der Tupfpräparate, angefertigt aus nativem Tumorgewebe, als auch den neuropathologischen Ergebnissen der Loss-of-Heterozygosity-Analyse (LOH-Analyse) verglichen. Somit kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Zellkultur das native Tumorgewebe valide repräsentiert.

3 Material und Methodik

Alle praktischen Experimente dieser Promotionsarbeit wurden in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes im Zeitraum von September 2022 bis einschließlich Juli 2023 durchgeführt.

Die zytogenetischen Befunde wurden vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer) erhoben und dürfen freundlicherweise in dieser Dissertation aufgeführt werden. Verwendete cMRT- und cCT-Aufnahmen entstammten dem Bildmaterial der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Reith) und durften dankenswerterweise in dieser Arbeit verwendet werden. Die Gestaltung einiger Abbildungen erfolgte mit der wissenschaftlichen Grafikdesign-Software BioRender.

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Das Tumormaterial wurde durch die Operation der Patienten in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes zwischen Juni und Dezember 2022 gewonnen (siehe Abbildung 3). Für diese experimentelle Arbeit wurde der Ethikantrag mit der Kenn-Nr. 02/20 verwendet [27]. Alle Patienten wurden über die Fragestellung dieser Dissertation und die experimentelle Verarbeitung ihres in der Operation entnommenen Tumormaterials sowohl mündlich als auch schriftlich ausführlich aufgeklärt. Zudem wurden sie darauf hingewiesen, dass sie ihr Einverständnis jederzeit und ohne Begründung widerrufen können. Ein Exemplar der Einverständniserklärung verblieb beim Patienten. Ein weiteres wird zur Dokumentation in der Neurochirurgie aufbewahrt.

Es wurden 10 Tumorproben von 9 Patienten in die Untersuchungen eingeschlossen. Dabei handelte es sich bei allen Patienten um einen Primärtumor. Rezidive wurden nicht eingeschlossen. Das Gewebe wurde nach Entnahme zeitnah in ein steriles Probengefäß mit flüssigem Nährmedium gegeben und entweder direkt ins Labor transportiert oder in einem Kühlschrank zwischengelagert. Das Nährmedium diente der Ernährung des Gewebes ex vivo bis zur weiteren Präparation. Ein Stück der Gewebeprobe wurde noch am selben Tag für einen Ansatz verwendet, ein weiteres in Nährlösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Rest des Gewebes wurde in Cryotubes im Gefrierschrank bei -20 °C kryokonserviert.

Die hier genannten biographischen und klinischen Daten wurden dem klinikinternen Patientenregister entnommen bzw. aus den Angaben errechnet. Die Angaben zum Patienten (P) umfassten das Geschlecht und das Alter zum Zeitpunkt der Operation.

Zur näheren Beschreibung des Tumors wurden folgende Variablen betrachtet: die Tumornummer (T-Nr.), der WHO-Grad, die Lokalisation und der zytogenetische Befund des Tumors. Die Lokalisation wurde dem OP-Bericht entnommen. Der WHO-Grad und die zytogenetischen Befunde wurden vom Institut für Neuropathologie erhoben und dem klinikinternen Patientenregister der Neurochirurgie entnommen.

In der folgenden Tabelle wurden die oben genannten Daten im Überblick dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht über die betrachteten Parameter der Tumorproben; HSG – Hintere Schädelgrube, KHBW – Kleinhirnbrückenwinkel, T-Nr. – Tumornummer, WHO – World Health Organization, 1p- – Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1, 14q- – Verlust des langen Armes von Chromosom 14, 22q- – Verlust des langen Armes von Chromosom 22.

T-Nr.	Patient	Geschlecht	Alter	WHO-Grad	Zytogenetischer Befund	Lokalisation
T 9077	P1	weiblich	82	I	Diploider Chromosomensatz	Konvexität , rechts, parasagittal
T 9092	P2	weiblich	65	I	Diploider Chromosomensatz	Keilbeinflügel , rechts
T 9108	P3	weiblich	74	I	14q-, 22q-	Konvexität , links, parietal
T 9145	P4	weiblich	84	I	1p-, 22q-	Parasagittal , links, parietal
T 9152	P5	weiblich	86	I	Diploider Chromosomensatz	Keilbeinflügel , mediolateral
T 9168	P6	männlich	75	I	1p-, 22q-	Keilbeinflügel , links
T 9175	P7	männlich	62	I	22q-	HSG , infratentoriell
T 9177	P7	männlich	62	II	Diploider Chromosomensatz	KHBW , links
T 9181	P8	männlich	65	I	1p-, 22q-	Falx cerebri , bifrontale Ausdehnung
T 9194	P9	weiblich	84	II	1p-	Frontobasal , links



Abbildung 3: Beispielhafte, intraoperative Aufnahme des Meningeoms mit der T-Nr. 9152. Es handelt sich um ein großes mediolaterales Keilbeinflügelmeningeom mit Infiltration der A. cerebri media und Knochenbeteiligung (Bild: OP-Mitarbeiter der neurochirurgischen Klinik).

3.1.2 Lösungen, Materialien und Geräte

Eine tabellarische Auflistung aller Reagenzien, Lösungen, Geräte und Softwares sowie den wichtigsten (Verbrauchs-)Materialien erfolgte im Tabellenanhang (siehe 7.1, Tabellen 19-22).

3.2 Methodik

Die Durchführung aller Methoden erfolgte anhand von laboreigenen Standardprotokollen des Forschungslabors der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

3.2.1 Kultivierung von Meningeomzellen

An dieser Stelle sollte vorweg betont werden, dass die Arbeit mit Zellkulturen ein steriles Vorgehen erforderte, um eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden die Methoden zum größten Teil unter der Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden vor und nach der Benutzung über dem Bunsenbrenner abgeflammt, sofern sie nicht steril verpackt waren. Die Reinigung der Arbeitsfläche vor und nach dem Gebrauch mit vergälltem Ethanol (70 %) und das Tragen von Handschuhen waren obligat. Zudem sollte das Nährmedium für die Zellen vor Verwendung auf RT erwärmt werden. Zudem wurden Bilder der Zellkulturen am Mikroskop „Zeiss Primovert“ mit der „AxioCam“ aufgenommen und mithilfe der Software „ZEN 2012 blue edition“ (beides von Zeiss) bearbeitet.

3.2.1.1 Ansatz

Das zur Anfertigung einer Zellkultur verwendete Tumormaterial wurde gegen Ende der Operation zum Teil in gekühlte, vorbereitete Probengefäße gegeben. Diese wurden dann entweder vorübergehend im Kühlschrank aufbewahrt, bis sie zur Weiterverarbeitung abgeholt wurden oder direkt vom Operationssaal ins Labor transportiert. Auch bei Zwischenlagerung erfolgte die Weiterverarbeitung noch am gleichen Tag. Die präparierten Behältnisse beinhalteten 15 ml Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), dem Penicillin und Streptomycin zugesetzt waren (siehe Tabelle 20 „Nährmedium für Probengefäße“). Dadurch wurde das Gewebe auch nach der Abtrennung von der Blutversorgung ex vivo weiter versorgt. Die Antibiotika sollten die Vermehrung von sich im Gewebe oder in den Probengefäßen befindlichen Bakterien verhindern. Durch den zeitlich begrenzten Verbleib des vitalen Gewebes in diesem Behältnis und die geringeren Anforderungen des Materials benötigte man keine weiteren Nährstoffe. Das Nährmedium, das für den Ansatz der Kulturen verwendet wurde, musste den höheren Ansprüchen der Zellen an ihre Umgebung gerecht werden. Daher unterschied es sich von der Nährlösung in den Probengefäßen dahingehend, dass es weitere Zusätze enthielt, die weiter unten genauer beschrieben wurden.

Bei den Kulturen, die analog zur folgenden Beschreibung angesetzt wurden, handelte es sich um Primäransätze oder auch Ansätze der Passage 0 (p0) genannt. Weiterhin wurde zwischen einem Ansatz A und einem Ansatz B unterschieden. Ersterer erfolgte am Tag der Operation des Patienten. Letzterer wurde einen Tag postoperativ angefertigt. Im Zuge des Ansatzes A

separierte man für den Ansatz B, der am Tag nach der Operation wie bereits beschrieben angefertigt wurde, ebenfalls ein linsengroßes Stück des Tumorgewebes und bewahrte es über Nacht in einem Probengefäß mit Nährmedium (siehe Tabelle 20 „Nährmedium für Probengefäße“) im Kühlschrank auf. Das restliche Resektat wurde in Kryoröhrchen im Gefrierschrank bei -80 °C für mindestens 3 Wochen eingefroren.

Die Durchführung der Kultivierung erfolgte komplett unter der Sterilbank. Für den Ansatz der Zellkulturen wurde eine Kulturflasche mit einem Fassungsvermögen von 50 ml mit „p0“, dem Datum des Ansatztages, der Tumorart („Me“ für Meningeom) und der Tumornummer beschriftet. Zudem stellte man eine kleine Petrischale, Pasteurpipetten mit Saugball, eine sterilisierte Pinzette sowie eine sterile, gebogene Schere und ein Kryoröhrchen bereit. Darüber hinaus benötigte man ein Nährmedium, das aus DMEM und verschiedenen Zusätzen hergestellt wurde (siehe Tabelle 20 „Nährmedium für die Zellkultur“). Das hier verwendete DMEM stellte das Basismedium dar, das sich durch eine hohe Konzentration an Glucose, dem Zusatz von L-Glutamin, Phenolrot und Natriumpyruvat auszeichnete. Im Unterschied zum originalen Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) bot es den Zellen eine vierfach höhere Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen. Aufgrund des Fehlens von Proteinen, Lipiden oder Wachstumsfaktoren benötigte man eine Supplementierung [53]. Diese bestand in diesem Nährmedium aus fetalem Kälberserum (FBS), einem komplexen Gemisch, das unter anderem Wachstumsfaktoren enthielt, die für das Wachstum der Zellen in der Kultur wichtig waren [54]. Minimum Essential Medium mit nicht-essenzieller Aminosäure-Lösung (MEM NEAA) stellte eine Ergänzung für Nährmedien dar, die das Zellwachstum und die Zellviabilität erhöhten, indem im Vergleich zum Standard MEM die gleichen nicht essenziellen Aminosäuren in hundertfacher Stärke enthalten waren [55]. Der Zusatz von Penicillin und Streptomycin sollte die bakterielle Kontamination der Zellkulturen verhindern. Durch ihre Kombination wirkten sie sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien, die durch etwaige Kontamination der Arbeitsmaterialien oder unzureichenden Abflämmens in die Flaschen gelangen konnten [56]. Die Nährflüssigkeit sollte bereits vor Beginn der Vorbereitungen aus dem Kühlschrank genommen werden, um sie vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (RT) zu erwärmen.

Die entnommene Gewebeprobe wurde zunächst hinsichtlich der Anzahl der Stücke, der Größe, des Aussehens (der Farbe) und der Konsistenz beschrieben. Daraufhin separierte man ein etwa linsengroßes Stück Gewebe vom Tumorsektat und zerkleinerte es im Trockenen in der Petrischale mit der Schere, bis es homogenisiert war. Falls sich mehrere Resektate im Tumortopf befanden, wurde von allen ein Stück abgetrennt und zusammen homogenisiert. Nun gab man wenige Tropfen Nährmedium hinzu und resuspendierte alles mit einer Pasteurpipette. Die Suspension wurde in die Zellkulturflasche überführt und die Petrischale noch einmal mit wenig DMEM gespült, das auch zur Zellsuspension gegeben wurde. Wenn

die Konsistenz des Tumors zu fest oder derb und das Schneiden im Trockenen nicht möglich war, wurden wenige Tropfen des Nährmediums hinzugegeben, um das Schneiden zu erleichtern. Vor dem Verschließen der Kulturflasche wurden sowohl der Deckel als auch der Flaschenhals vorsichtig abgeflammt. Dann wurde das Gefäß leicht geschwenkt, sodass sich die Suspension auf dem gesamten Boden gleichmäßig verteilte. Wenn es notwendig war, wurde die Flasche leicht beklopft, um bestehende freie Stellen zu benetzen. Zu beachten war, dass der Boden mit wenig Medium, aber vollständig, bedeckt war. Zur Bebrütung wurden die Kulturen bei einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlenstoffdioxid-Gehalt (CO₂) von 5 % in den Inkubator gestellt. Dieser CO₂-Gehalt war essenziell, um einen physiologischen pH-Wert für das im DMEM verwendete Natriumbikarbonatpuffersystem aufrechtzuerhalten [53]. Nach dem Ansatz durften die Zellkulturflaschen 24 Stunden nicht bewegt werden. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt (siehe 3.2.1.2).

Die Ansätze aus gefrorenem Gewebe wurden aus dem nativ eingefrorenen Material gefertigt. Dazu wurde das Gewebe so lange aufgetaut, bis wieder ein linsengroßes Stück separierbar war. Der Rest der Tumorable wurde wieder bei -80 °C eingefroren. Danach erfolgte der Ansatz aber analog zu den Ansätzen A und B.

Alle Ansätze wurden mindestens bis zum zehnten Tag im Inkubator aufbewahrt und beobachtet. Zeigten sie innerhalb dieses Zeitraums kein oder nur ein unzureichendes Wachstum, wurden sie verworfen.

3.2.1.2 Mediumwechsel

Wie der Ansatz der Kulturen wurden auch die Mediumwechsel unter der Sterilbank durchgeführt. Allgemein wurden die Kulturen immer 24 Stunden nach erfolgtem Ansatz oder Splitting unter dem Mikroskop beurteilt. Die Entwicklung wurde sowohl schriftlich als auch bildlich dokumentiert. Anhand dieser Beurteilung wurde über das weitere Vorgehen entschieden. Der zeitliche Abstand zwischen der Bearbeitung der Ansätze variierte. Manche Kulturen benötigten jeden Tag die Zugabe von neuem Medium, anderen wurde es nur alle 2-3 Tage zugeführt. Man orientierte sich an der Farbe des Mediums in der Zellkulturflasche, die auf den Verbrauch der Nährstoffe hinwies. Das Nährmedium selbst war rötlich und erschien in den Kulturflaschen pinkfarben. Kam es zum Verbrauch der enthaltenen Nährstoffe durch die Meningeomzellen (oder auch Erythrozyten), erkannte man eine Entfärbung des Mediums, das sich dann gelblich darstellte.

Bei frischen Kulturen wurde neues Medium so lange nur tropfenweise zugegeben, bis ein Wachstum von Zellen zu verzeichnen war. Nach Wachstumsbeginn wurde die Zellkulturflasche für den Mediumwechsel in den ersten Tagen in waagerechter Position belassen und nicht aufgestellt. Dies war wichtig, damit sich das noch nicht komplett fest am Boden abgesetzte Gewebe beim Aufstellen der Flasche nicht wieder löste. Die Menge des

entnommenen Nährmediums konnte von Wechsel zu Wechsel gesteigert werden. Sobald das Gewebe als festsitzend beurteilt wurde, konnte die Flasche senkrecht positioniert werden und es erfolgte ein kompletter Mediumwechsel mit 2 ml DMEM. Dazu wurde die in der Zellkulturflasche befindliche Suspension komplett abpipettiert und verworfen. 2 ml neues Medium wurden mithilfe einer elektrischen Pipettierhilfe eingefüllt. Es sollte zudem wieder darauf geachtet werden, dass sowohl der Flaschenhals als auch der Deckel ordentlich abgeflammt wurden, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Eine nähere Beschreibung erfolgte anhand von Beispielen im Ergebnisteil (siehe 4.2 und 4.3).

3.2.1.3 *Splitting*

Das Splitting der Zellkulturen, auch Passagierung genannt, erfolgte ebenfalls unter der Sterilbank. Die Zeitpunkte variierten von Tumor zu Tumor, je nachdem, wann der Boden der Zellkulturflasche dicht mit Zellen bewachsen war.

Das DMEM wurde aus dem Kühlschrank genommen, um es auf RT zu erwärmen. Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Des Weiteren stellte man Pasteurpipetten mit Saugball, ein steriles Rundröhrchen und eine neue 50 ml-Flasche bereit. Die Beschriftung der Zellkulturflaschen bestand nun aus „p1“ (Passage 1), dem Datum des Tages der Passagierung, der Tumorart („Me“) sowie der Tumornummer.

Zunächst wurden die Zellkulturen unter dem Mikroskop betrachtet. Wenn der Boden der Flasche dicht mit Zellen bewachsen war, konnte die p0-Kultur in 2 p1-Kulturen gesplittet werden. Zunächst wurde das komplette Medium abpipettiert und verworfen. 2 ml Trypsin-EDTA der Konzentration 0,05 % wurden in die Zellkulturflasche gegeben, um durch die proteolytische Wirkung des Trypsins die adhärennten Zellen vom Boden zu lösen [57]. Der Chelatbildner EDTA verstärkte die Wirkung der Protease. Dazu inkubierte man die Zellkulturen bei 37°C für mindestens 2 Minuten im Brutschrank. In der Zwischenzeit wurden 2 ml DMEM in ein Rundröhrchen pipettiert. Nachdem man die Kulturflasche beklopft und geschwenkt hatte, um die Zellen zu separieren, erfolgte eine optische Kontrolle unter dem Mikroskop. Wenn das Trypsin ausreichend gewirkt hatte, erkannte man eine „Abkuglung“ der Zellen. Waren die Zellen nicht ausreichend vom Boden gelöst, wurde die Zellkulturflasche erneut für wenige Minuten inkubiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in das Rundröhrchen mit dem neuen Nährmedium umgefüllt, um die Proteolyse durch Trypsin zu stoppen. Die Lösung wurde anschließend bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 5 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Die 1200 U/min entsprachen 160 RCF (relative centrifugal force). Währenddessen wurden sowohl in die ehemalige p0-Kulturflasche als auch in die neue Zellkulturflasche 2 ml Medium vorgegeben. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf ein Minimum abpipettiert. In dem Restmedium resuspendierte man das Zellpellet mit dem Ziel, die Zellen voneinander zu separieren. Die Zellsuspension wurde tropfenweise

gleichmäßig auf die vorbereiteten Zellkulturflaschen verteilt. Anschließend erfolgte das Abflammen der Flasche. Wie bereits beim Ansatz beschrieben wurde, musste das Medium die Wachstumsfläche lückenlos bedecken, bevor die Zellkulturen zurück in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gestellt werden konnten. In den anschließenden 24 Stunden durften die Zellkulturen nicht bewegt werden. Nach 24 Stunden erfolgte ein kompletter Mediumwechsel von 2 ml.

3.2.1.4 Abbruch der Zellkultur für die FISH

Der Abbruch der Zellkulturen erfolgte nach einer Beurteilung unter dem Mikroskop, was bildlich dokumentiert wurde. Die ersten Arbeitsschritte der Präparation erfolgten unter der Sterilbank. Anschließend wurden die Zellen außerhalb weiterverarbeitet.

Zunächst wurden 2 Tropfen Colcemid-Lösung pro Zellkulturflasche hinzugegeben, die daraufhin eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurden. Colcemid wurde dabei als Zellgift eingesetzt, ähnlich dem Colchicin, welches die Bildung des Spindelapparates während der Mitose verhindern sollte, sodass die Schwesterchromatiden nicht voneinander getrennt werden konnten und die Chromosomen als Zwei-Chromatid-Chromosomen bestehen bleiben sollten. Dadurch arretierten alle sich während der Inkubation in der Mitose befindlichen Zellen in der Metaphase [37,58]. In der Zwischenzeit wurden eine Kaliumchlorid-Lösung (KCl) der Konzentration 0,075 M (mol/l) und Trypsin der Konzentration 0,05 % im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das DMEM wurde ebenfalls unter der Sterilbank bereitgestellt, um es an die RT anzupassen. Zudem benötigte man Pasteurpipetten sowie ein steriles Spitzröhrchen pro Zellkulturflasche. Nach der einstündigen Inkubation überführte man das Medium aus der Zellkulturflasche in die Spitzröhrchen und gab wiederum 2 ml Trypsin-EDTA in jede Flasche. Diese wurden erneut für mindestens 2 Minuten in den Inkubator gestellt, um die Zellen durch das Trypsin vom Flaschenboden abzulösen. Es erfolgte anschließend eine optische Kontrolle unter dem Mikroskop. Schwammen die Zellen in der Lösung, wurden 2 ml DMEM in die Flasche pipettiert, um die proteolytische Wirkung des Trypsins zu stoppen. Die Flüssigkeit wurde in der Kulturflasche resuspendiert und zur wiederholenden Spülung des Flaschenbodens verwendet, um die Zellen weiter zu separieren und noch am Boden anhaftende Zellen zu lösen. Bei jeder Resuspension war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstanden. Anschließend überführte man die Suspension in ein steriles Spitzröhrchen. Man kontrollierte erneut unter dem Mikroskop, dass keine Zellen mehr am Boden der Kulturlasche zu finden waren und verwarf sie anschließend. Das Spitzröhrchen wurde bei 1000 U/min (110 RCF) für 8 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

An dieser Stelle erfolgte für die Kulturen der Passage 2 eine Zellzählung unter Colcemid-Einwirkung (siehe 3.2.3.1), weil nur eine Flasche der p2-Kulturen vorhanden war. Aufgrund der Resuspension im Rahmen der Zellzählung musste vor der Fortsetzung des Protokolls

„Kultur abbrechen für FISH“ eine weitere Zentrifugation zu den bereits genannten Bedingungen durchgeführt werden, um wieder ein Zellpellet zu gewinnen.

Die restlichen Arbeitsschritte wurden nicht mehr unter der Sterilbank durchgeführt. Der Überstand, der durch die Zentrifugation entstanden war, wurde abgenommen und verworfen. Anschließend bedeckte man die Zellen vorsichtig mit 5 ml erwärmter KCl-Lösung, indem man diese tropfenweise an der Innenseite des Spitzröhrchens herunterlaufen ließ, um die Zellen nicht aufzuwirbeln. Nun wurden die Zellen mithilfe einer Pasteurpipette im warmen Wasserbad resuspendiert. Dadurch sollten sie die hypotone Salzlösung besser aufnehmen und an Volumen gewinnen. Das Anschwellen der Zellen führte innerhalb des Zellkerns auch zu einem Auseinanderweichen der Chromosomen [3]. Die Dauer der Resuspension bis zum Start der Zentrifugation (auch Hypotoniezeit genannt) hing von der Luftfeuchtigkeit im Raum ab (siehe Tabelle 4), die die Einwirkzeit der KCl-Lösung bestimmte. In den meisten Fällen lag sie zwischen 30 % und 35 %. Dementsprechend konnte die Zeit der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 4: Luftfeuchtigkeitsabhängige Einwirkzeit der KCl-Lösung (Hypotoniezeit). Das Hygrometer zeigte am häufigsten die hervorgehobenen Werte; min:sek – Minuten:Sekunden.

Temperatur	Luftfeuchtigkeit	Hypotoniezeit (min:sek)	Tropfpräparation
23 °C	30 %	2:10	Nass
23 °C	35 %	1:55	Nass
23 °C	40 %	1:20	Trocken
23 °C	45 %	1:15	Trocken
23 °C	50 %	1:10	Trocken
23 °C	55 %	0:55	Trocken

Anschließend wurde das Spitzröhrchen erneut bei 1000 U/min (110 RCF) für 8 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Danach verwarf man den Überstand wieder bis auf ein Minimum. In diesem Rest wurden die Zellen wiederholt resuspendiert und am Ende des Vorgangs komplett in die Pasteurpipette eingezogen. Nun erfolgte die Behandlung der Suspension mit Fixativ, das man vor dem Abbruch aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3 zu 1 frisch ansetzte. Diese Lösung wurde zur Analyse von Metaphase-Chromosomen eingesetzt und musste bei -20 °C bereitgestellt werden. Zunächst wurden nur 2 Tropfen Fixativ in das Spitzröhrchen gegeben, um die Zellen langsam an die kalte Temperatur zu „gewöhnen“, da das Methanol-Essigsäure-Fixiermittel die Zellmembran schnell passierte. Die enthaltene Essigsäure bewirkte eine Koagulation der Nukleoproteine und eine Schwellung der Zellen. Diese wirkte der Schrumpfung durch Methanol entgegen. Insgesamt blieb die Chromosomenstruktur erhalten, nur die zytoplasmatischen Proteine wurden weitestgehend entzogen [37]. Man

steigerte die Menge des Fixativs tropfenweise, bis man circa 2-3 ml hinzugegeben hatte. Nach jeder erfolgten Zugabe wurden die Zellen resuspendiert. Anschließend stellte man die Spitzröhrchen zur Fixierung für eine Stunde bei -20 °C in den Gefrierschrank. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 U/min für 8 Minuten ohne Bremse. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, sodass ein Waschvorgang mit einer Pipette Fixativ (2 ml) durchgeführt werden konnte. Auch bei diesem Schritt wurde die zugegebene Menge tropfenweise gesteigert und die Zellen wurden durch wiederholte Resuspension an die Lösung „gewöhnt“. Nach der folgenden Zentrifugation zu den oben genannten Bedingungen wurde der Überstand erneut abgenommen und verworfen. Zum Sediment wurde nun neues Fixativ gegeben, in dem die Zellen wieder resuspendiert wurden. Nun konnte die Zellsuspension zur Herstellung von Tropfpräparaten genutzt werden oder das Zellpellet wurde in frischem Fixativ bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.5 Herstellung der Tropfpräparate

Die Tropfpräparation erfolgte auf einer Arbeitsfläche außerhalb der Sterilbank. Zur Vorbereitung wurden die Objektträger (OT) während der Durchführung des Abbruchs in vergälltes Ethanol (99 %) (siehe Tabelle 19) gestellt, um sie zu reinigen. Nach 1-2 Stunden ließ man sie auf Papier abtropfen, bis sie trocken waren. Zudem legte man ein Tuch auf der Arbeitsfläche bereit, das mit Aqua destillata (A.d.) benetzt wurde. Die Herstellung der Tropfpräparate auf einer nassen Unterlage ergab sich aus der Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit (siehe Tabelle 4).

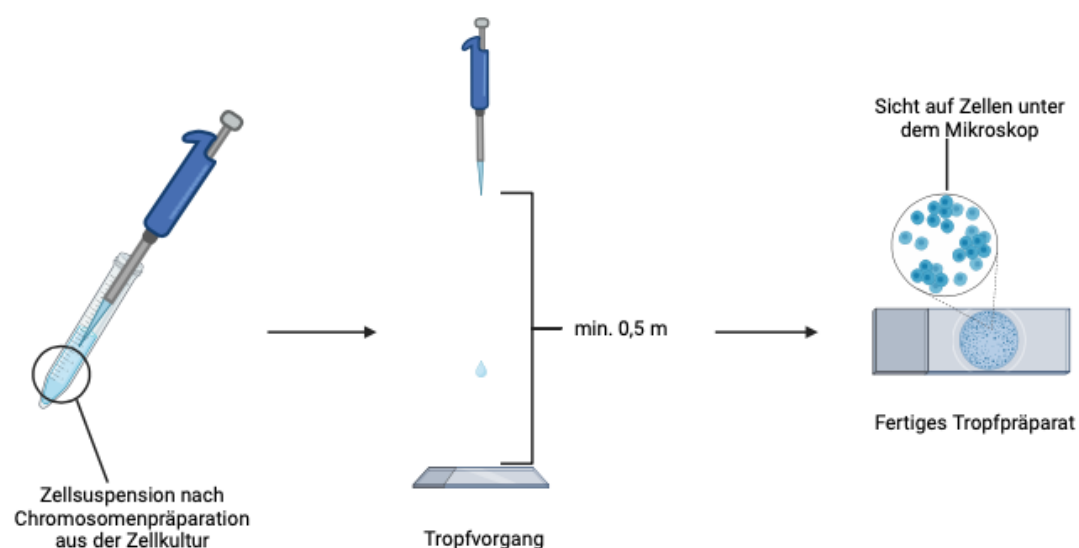


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Tropfpräparation (eigene Darstellung, gestaltet mit BioRender.com); min. – mindestens.

In Abbildung 4 wurde der Ablauf der Tropfpräparation schematisch dargestellt. Nach dem, wie oben beschrieben, erfolgte nach Abbruch der Zellkultur wurde die Zellsuspension noch einmal mit einer mechanischen Pipette resuspendiert, bevor 100 µl aufgezogen wurden. Dann wurde je ein Tropfen auf die sich auf dem nassen Tuch befindlichen OT aufgetropft. Dabei wurde die Pipette mindestens einen halben Meter über die Arbeitsfläche gehalten. Der Abstand sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die Zellen beim Aufkommen aufplatzten und dadurch den Zellkern oder sogar die Chromosomen freigaben. Die Feuchtigkeit diente dazu, dass sich der Tropfen weiter spreitete und damit auch die in ihm befindlichen Zellen mitsamt Chromosomen. Dafür ließ man die OT nach dem Tropfen noch wenige Sekunden auf dem nassen Untergrund liegen. Die Trocknung erfolgte für ungefähr 30 Minuten auf einer Heizplatte bei 37 °C. Sobald der Tropfen getrocknet war, kontrollierte man optisch, ob genug Zellkerne auf dem OT vorhanden waren, um eine FISH durchzuführen. Dies wurde bildlich festgehalten. Eine relevante Stelle (circa 18 x 18 mm groß (Größe eines Deckglases)) wurde abschließend mit einem Diamantschreiber auf der Rückseite des OT markiert. Um die Präparate für die FISH „reifen zu lassen“, das bedeutete eine Metaphasealterung zu bewirken, wurden sie 2-3 Tage bei RT in einer Objektträgermappe aufbewahrt.

3.2.2 Herstellung der Tupfpräparate

Neben der Herstellung der Tropfpräparate fertigte man auch Tupfpräparate an, die der FISH-Analyse unterzogen wurden. Zur Vorbereitung entnahm man dem Gefrierschrank die richtige Tumorseite und legte Adhäsionsobjektträger und steriles Besteck (Schere und Pinzette) sowie eine Petrischale unter der Sterilbank bereit.

Der schematische Ablauf der Tupfpräparation wurde in der folgenden Abbildung dargestellt.

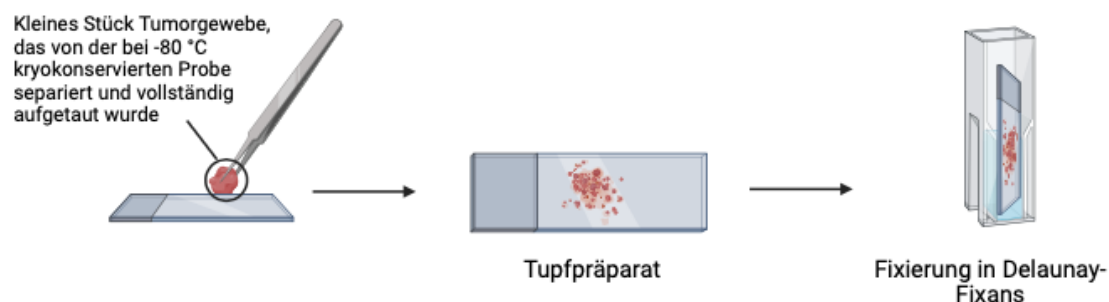


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tupfpräparation (eigene Darstellung, gestaltet mit BioRender.com); Herstellung Delaunay-Fixans (siehe Tabelle 20).

Man ließ zunächst das bei -80 °C gelagerte Kryoröhrchen mit dem nativen Tumorgewebe so lange antauen, bis man ein kleines Stück mit der Schere abtrennen konnte. Dieses Stück

musste in der Petrischale nun komplett auftauen. Der Rest des Gewebes wurde im Cryotube wieder tiefgefroren. Mit der Pinzette tupfte man das Gewebe auf 2-3 Adhäsionsobjektträger. Dabei sollten 3-4 Reihen gebildet werden. Das Tumormaterial sollte nur zart auf die OT aufgedrückt werden, um nicht zu viel Gewebe zu hinterlassen. Zum einen verhinderten Unebenheiten auf dem OT die gleichmäßige Ausbreitung der Reagenzien auf dem Präparat im Rahmen der FISH und erschwerten das Aufbringen von Deckgläsern. Zum anderen überlagerten sich die Zellen an diesen Stellen gegenseitig und konnten nicht mehr klar voneinander abgegrenzt werden, was eine Auswertung der Sondensignale nach der FISH unmöglich machte. Aus den angefertigten Präparaten suchte man nach Begutachtung unter dem Mikroskop das beste heraus und dokumentierte es fotografisch. Die anderen Slides wurden verworfen. Auf der Rückseite des OT markierte man ein relevantes Areal mit einem Diamantschreiber. Dann ließ man die Präparate etwa 15 Minuten antrocknen.

Abschließend erfolgte die Fixierung in einer Küvette mit Delaunay-Fixans (siehe Tabelle 20) unter dem Abzug für 30 Sekunden. Die Mischung aus vergälltem Ethanol und Aceton dehydratisierte die Zellen und fällte Proteine aus. Dadurch festigten sich die Zellstrukturen. Gleichzeitig wurde die Zellmembran permeabilisiert. Die Trichloressigsäure führte ebenfalls zur Proteinpräzipitation und zur Denaturierung, sodass die Proteine in ihrem aktuellen Zustand fixiert wurden. Zum Abtropfen stellte man die Tupfpräparate mindestens 30 Minuten auf Papier. Waren die Präparate ganz getrocknet, erfolgte die Aufbewahrung in einer Objektträgermappe für 2-3 Tage bei RT.

3.2.3 Zellen zählen, einfrieren und auftauen

3.2.3.1 Zellzählung

Die zweite Kulturflasche der ersten Passage wurde zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff abgebrochen. Zuvor erfolgte jedoch eine Zellzählung unter der Sterilbank. Die Durchführung umfasste zu Beginn die gleichen Schritte wie beim Splitting.

Zunächst wurde das in der Zellkulturflasche befindliche Medium in ein steriles Rundröhrchen überführt. Danach inkubierte man die Zellkulturflasche mit 2 ml Trypsin-EDTA der Konzentration 0,05 % bei 37 °C im Brutschrank für mindestens 2 Minuten. Nach der optischen Kontrolle unter dem Mikroskop wurde die Proteolyse durch die Zugabe von 2 ml DMEM beendet. Die Resuspension der Zellen in der Lösung diente der weiteren Separation und der Spülung des Flaschenbodens, um noch leicht adhärente Zellen zu lösen. Die Zellsuspension wurde anschließend in das Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 U/min für 5 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem Medium resuspendiert.

Für die Zellzählung wurden zunächst 10 µl Trypanblaue Lösung der Konzentration 0,4 % in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 µl Zellsuspension. Beide Flüssigkeiten wurden durch erneute Resuspension gut miteinander vermischt. Von diesem Gemisch wurden 10 µl mit der Pipette in ein Cell Counting Slide gegeben. Der Zellzähler LUNAII wertete die Probe aus und gab die Gesamt-Zellzahl, die Anzahl der lebenden und der toten Zellen sowie die Viabilität an.

3.2.3.2 Einfrieren in Cryotubes

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein spezielles Einfriermedium verwendet. Dieses wurde aus 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 ml DMEM angesetzt und zu je 5 ml in Rundröhrchen aliquotiert bei -20 °C gelagert. DMSO schützte die Zellen beim Einfrieren vor mechanischer Beschädigung durch Eiskristalle [59]. Vorbereitend musste das Einfriermedium aufgetaut werden.

Ausgehend von der zuvor beschriebenen Zellzählung wurde die Zellsuspension weiterverarbeitet. Das zugesetzte Medium wurde bei 1200 U/min für 5 Minuten mit Bremse abzentrifugiert. Man pipettierte den Überstand ab und verwarf ihn. Daraufhin wurde das Pellet mit 1 ml des Einfriermediums resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde in eine Einfrierbox gestellt. Der mit Isopropanol gefüllte Gefrierbehälter diente dem kontrollierten Herunterkühlen der Zellen in den Cryotubes. Man erreichte eine Kühlrate von ziemlich genau -1 °C pro Minute. Die Einfrierbox wurde über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde das Kryoröhrchen entnommen und in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von -196 °C überführt. Darin erfolgte die Aufbewahrung der Zellen für 6-7 Monate.

3.2.3.3 Auftauen der Zellen

Nach 6-7 Monaten wurde das entsprechende Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und kurz bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die erneute Kultivierung erfolgte auch unter der Sterilbank. Dafür wurde eine neue Zellkulturflasche mit „p2“, dem Datum des Ansatztages, der Tumorart („Me“ für Meningeom) und der Tumornummer beschriftet.

In ein Rundröhrchen wurden 10 ml DMEM vorpipettiert. Davon gab man wenige Tropfen in das Kryoröhrchen. Die Zellen tauten sofort auf und konnten nach kurzer Resuspension in das Rundröhrchen überführt werden. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die komplette Zellsuspension überführt war. Nach einer Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 Minuten pipettierte man den Überstand ab und verwarf ihn. Das Zellpellet wurde mit 1 ml frischem DMEM resuspendiert und in die 50 ml-Flasche gegeben. Diese stellte man in den CO₂-Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Für 24 Stunden durfte die Zellkultur nicht bewegt werden. Danach erfolgte ein Mediumwechsel von 2 ml.

Die Kulturen der Passage 2 wurden anschließend bis auf das Splitting genauso weiterbehandelt wie die Primärkulturen. Es erfolgten Medienwechsel und der Abbruch der Kulturen, sobald ein dichter Zellrasen unter dem Mikroskop zu sehen war. Da kein Splitting durchgeführt wurde, gab es keine zweite Kulturflasche, die zum Einfrieren abgebrochen werden konnte. Damit gab es von den eingeschlossenen Tumoren kein Zellmaterial mehr, was in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden konnte.

3.2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH ist ein zytogenetisches und molekulargenetisches Standardverfahren zum Nachweis von Chromosomenaberrationen, das Ende der 1980er Jahre etabliert wurde [19]. Es können sowohl Chromosomen(teil)verluste als auch -zugewinne sein, die bei Meningeomen für das Auftreten von Rezidiven entscheidend sind. Die Methode wird aber nicht nur in der Onkologie verwendet, sondern zum Beispiel auch in der Pränatal-Diagnostik. Sie hat den Vorteil, dass sie im Vergleich zu anderen Methoden sensitiver ist und auch eine Diagnostik an Interphase-Chromosomen ermöglicht, die direkt am Zellkern stattfindet. Der Einsatz der FISH erfolgt bei gezielten Fragestellungen und ist nicht zum Screening geeignet [19].

Das Prinzip der FISH beruht auf der Bindung einer künstlich hergestellten Sonde an eine spezifische, komplementäre zu untersuchende Desoxyribonukleinsäure-Sequenz (DNS, DNA). Die Sonden sind an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, der unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Um die Hybridisierung zu ermöglichen, erfolgt eine Denaturierung, um sowohl die doppelsträngige Ziel-DNA in 2 Einzelstränge aufzutrennen als auch die doppelsträngige Sonden-DNA. Die Spezifität der Sonde ist wichtig, um unspezifische Bindungen an andere Genloci, die eine ähnliche Basensequenz aufweisen wie die Ziel-DNA, zu verhindern. Dafür ist eine gründliche Vorbehandlung der Objektträger notwendig. Zudem ist der Erhalt der Zellintegrität und der DNA-Struktur entscheidend für die Qualität der Ergebnisse [9]. Ein Vorteil der FISH ist die Durchführung mit mehreren, verschiedenfarbigen Sonden gleichzeitig. Diese Variante der FISH wird als Multicolor-FISH bezeichnet [5].

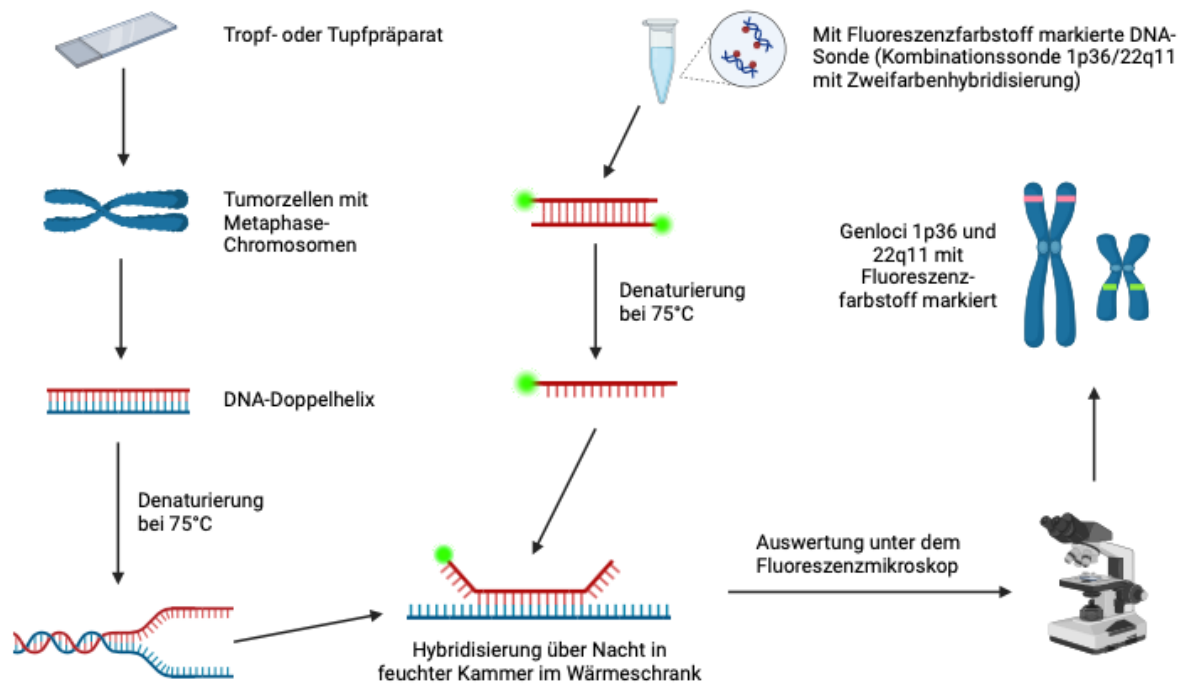


Abbildung 6: Schematische Darstellung der FISH (eigene Darstellung, gestaltet mit BioRender.com); 1p36 – Abschnitt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, 22q11 – Abschnitt auf dem langen Arm von Chromosom 22.

Die Durchführung der FISH erfolgte nach dem laboreigenen Protokoll „FISH an Tupf- und Tropfpräparaten für Meningeome mit direkt markierten Sonden der Firma MetaSystems“, das bereits in anderen Publikationen der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes vorbeschrieben wurde [29,30]. Eine schematische Darstellung der Methode erfolgte in Abbildung 6.

Für diese Arbeit wurden pro Meningeom maximal 5 Präparate der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unterzogen, ein Tupfpräparat und je Ansatz A und B ein Tropfpräparat der Primär- und Sekundärkulturen.

Die mit Diamantschreiber markierten Areale auf der Rückseite der OT dienten zur Orientierung beim Auftragen der Reagenzien.

3.2.4.1 RNase Verdau und Pepsinbehandlung

Zur Vorbereitung der Pepsinbehandlung wurden 100 ml A.d. und 120 µl Salzsäure (HCl, 25 %) in eine Küvette gegeben und im Schüttelwasserbad auf 37 °C erwärmt.

Je OT pipettierte man 100 µl sterilisierte Natriumcitrat-Lösung (2x SSC) aus dem -20 °C Gefrierschrank und 1 µl RNase, ebenfalls im Gefrierschrank aufbewahrt, in ein Eppendorfgefäß. Dieses wurde gevortext und kurz zentrifugiert, damit sich beide Reagenzien

gut vermischten. Von dieser Lösung gab man je 100 µl in das markierte Areal der OT. Die Abdeckung erfolgte mit einem großen Deckglas (24 x 60 mm). Daraufhin wurde der OT in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Wärmeschränk für 30 Minuten inkubiert. Die feuchte Kammer bestand aus einer Metalldose mit Deckel, in die ein Stück Papier gelegt wurde, das man mit A.d. durchnässte. Die OT wurden dann auf Pasteurpipetten in die Kammer gelegt, damit sie nicht unmittelbar im Nassen lagen.

Nach der Inkubation wurden die Deckgläser von den OT abgeschüttelt. Dann erfolgte eine dreimalige Waschung der Präparate in einer Küvette mit 2x SSC zu je 5 Minuten bei RT.

Während des letzten Waschschriffs musste die Pepsinlösung (10 %) aufgetaut werden. Von ihr wurden kurz vor der Pepsinbehandlung der OT 100 µl in die bereits erwärmte Küvette im Schüttelwasserbad pipettiert. Dann wurden die Präparate je nach Herstellungsart 1:35 Minute (Tropfpräparate) oder 1:55 Minute (Tupfpräparate) bei 37 °C in der Küvette belassen.

3.2.4.2 Fixierung und Ethanolreihe

Zunächst wurden die OT für 5 Minuten in eine Küvette mit phosphatgepufferter Salzlösung (1x PBS) bei RT gestellt, um die Pepsinlösung aus dem Gewebe und vom Objektträger zu waschen. Daraufhin erfolgte die Fixierung der Präparate in einer auf Eis gestellten Küvette mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)/PBS für 10 Minuten. Anschließend wurden die OT kurz in der zuvor verwendeten Küvette mit 1x PBS gespült, bevor sie dann in einer neuen Küvette mit 1x PBS erneut für 5 Minuten bei RT gewaschen wurden.

Zur Entwässerung der fixierten Zellen wurde eine Ethanolreihe angesetzt. Dabei steigerte man die Konzentration des Alkohols schrittweise. Zuerst gab man die Präparate bei RT für 5 Minuten in eine Ethanolösung mit einem Ethanolgehalt von 70 %, dann für 5 Minuten in eine Lösung mit 80 % Ethanol. Den Abschluss der Reihe bildete das fast reine vergällte Ethanol (99 %), in dem die Präparate für weitere 5 Minuten belassen wurden.

Zum Lufttrocknen wurden die OT für mindestens 30 Minuten bei RT an Küvetten angelehnt, damit die Flüssigkeit nach unten ablaufen konnte.

3.2.4.3 Hybridisierung

Sobald die Präparate getrocknet waren, konnte die Hybridisierung mit DNA-Sonden erfolgen. Die Schritte liefen im Dunkeln ab. Bei der verwendeten Sonde handelte es sich um die Kombinationssonde 1p36/22q11 mit Zweifarbenhybridisierung von der Firma MetaSystems. Die untersuchten Genloci wurden in Abbildung 7 dargestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C im Gefrierschränk, sodass die Sonde zunächst aufgetaut, dann gevortext und abschließend kurz zentrifugiert werden musste. Daraufhin gab man auf jeden OT je 5 µl der DNA-Sonden. Auf das relevante Areal wurde ein kleines Deckglas (18 x 18 mm) gelegt und

mit einem elastischen Montagekleber (Fixogum) luftdicht verschlossen. Der Kleber musste nun mindestens 20-30 Minuten bei RT trocknen, bis er durchsichtig wurde. Um die Präparate vor Abschwächung der Fluoreszenzsignale durch Lichteinstrahlung zu schützen, wurden sie mit einem Dunkelhut abgedeckt. In der Zwischenzeit wurde die Heizplatte auf 75 °C erhitzt. Sobald sich die Temperatur stabilisiert hatte, wurden die OT 2 Minuten auf die Heizplatte gelegt. Dabei erfolgte die Denaturierung der DNA der Tumorzellen sowie die der Sonde. Die Hybridisierung fand anschließend in der feuchten Kammer bei 37 °C über Nacht statt.

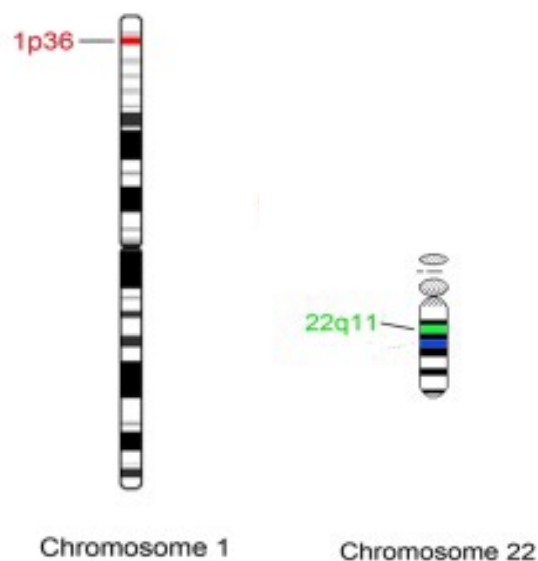


Abbildung 7: Darstellung der hybridisierten Genloci 1p36 und 22q11 (modifiziert nach Linsler et al. (2014) [30]); 1p36 – Abschnitt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, 22q11 – Abschnitt auf dem langen Arm von Chromosom 22.

3.2.4.4 Stringenzwaschung

Die Stringenzwaschung wurde am nächsten Tag durchgeführt. Dabei sollten die Präparate von ungebundenen Sonden gereinigt werden. Zunächst musste das Fixogum entfernt werden. Dann wurde das Deckglas in 2x SSC abgeschwemmt.

Als erstes wurden die OT in 0,4x SSC 2 Minuten gewaschen. Die Lösung wurde dafür auf 72 °C vortemperierte. Anschließend wusch man die Präparate in 2x SSC/0,05 % Tween-20 bei RT. Abschließend wurden die OT bei RT kurz in A.d. gespült. Nachfolgend mussten die Präparate mindestens 30 Minuten bei RT unter dem Dunkelhut lufttrocknen.

3.2.4.5 Eindecken mit Antifade-4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Das verwendete Antifade-DAPI wurde aus „Antifade Mounting Medium for Fluorescence“ und „Antifade Mounting Medium for Fluorescence with DAPI“ im Verhältnis 1:1 gemischt (siehe

Tabelle 20). Gelagert wurde die Lösung im Kühlschrank bei 4 °C. DAPI wurde als fluoreszierender Farbstoff eingesetzt, der die gesamte DNA anfärbte und somit die Lokalisation der Zellkerne und Metaphase-Chromosomen bei der Fluoreszenzmikroskopie erlaubte. Die Mischung mit dem reinen Antifade-Medium diente der Verstärkung der Schärfe, mit der die Chromosomen vor dem Hintergrund abgebildet wurden [28]. Sobald die OT unter dem Dunkelhut getrocknet waren, wurden sie mit 25 µl Antifade-DAPI eingedeckt und mit einem großen Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt. Dann wurden die Präparate in einer Objektträgermappe zum Trocknen in den Kühlschrank bei 4 °C gelegt.

3.2.4.6 Bestimmung der Cut-off-Werte

Die Cut-off-Werte stellen Grenzwerte dar, ab denen von einem chromosomalen Zugewinn oder Verlust gesprochen werden darf. Es handelt sich um Prozentwerte, die bei der Auswertung erreicht werden müssen, um von einer statistischen Signifikanz sprechen zu können.

Diese Werte werden mithilfe von Lymphozyten aus einer Blutprobe gesunder, männlicher Probanden bestimmt. Dazu wird ein Lymphozytenpräparat nach einem laboreigenen Protokoll angefertigt, das bereits vorbeschrieben ist [40]. Die Präparate werden der FISH unterzogen, wobei die Hybridisierung mit den zu testenden Sonden erfolgt. Aufgrund der Tatsache, dass es sich um gesunde Probanden handelt, sollten die Lymphozytenzellkerne einen diploiden Chromosomensatz besitzen. Für die Auswertung bedeutet dies, dass pro Zellkern 2 Signale pro Sonde zu sehen sein sollten, im Falle der Kombinationssonde 1p36/22q11 2 rote und 2 grüne. Weicht die Zählung von dieser Konstellation ab, handelt es sich zum Beispiel um Fehlhybridisierungen. Der Cut-off-Wert wird nun als Quotient aus den abweichenden Signalkonstellationen und der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen errechnet und in Prozent angegeben.

Für den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p-) wurde für die in dieser Dissertation verwendete Sonde ein Cut-off-Wert von 4 % ermittelt, für den Verlust des langen Arms von Chromosom 22 (22q-) ein Wert von 2 %.

3.2.4.7 Auswertung

Die Auswertung der Sondensignale erfolgte erst 1-2 Tage später unter einem Lichtmikroskop, Typ BX43 von Olympus mit einer Fluoreszenzeinheit (FLUOLED® 3CFW von Fraen Machining Corporation) mit dem 100x Objektiv. Zugrunde lagen dabei die Kriterien bei der Auswertung von Hopman et al. aus dem Jahr 1988 [18].

Diese gaben vor, dass überlappende Zellkerne nicht betrachtet wurden und unmittelbar nebeneinander aufleuchtende Signale, die keine Signalbreite auseinander lagen, als ein

Signal gezählt werden sollten. Zudem wurden Sondensignale, die außerhalb eines blau leuchtenden Zellkerns zu sehen waren, nicht gewertet.

Insgesamt sollten pro Präparat 200 Zellkerne ausgezählt werden. Durch die Dreidimensionalität der Zellen konnten die Signale in unterschiedlichen Ebenen liegen, die im zweidimensionalen Bild nicht alle abgebildet wurden. Daher musste jeder Zellkern durchfokussiert werden. Die Zellkerne leuchteten durch die Anregung des Farbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durch UV-Licht der Wellenlänge 365 nm blau und konnten dadurch lokalisiert werden. Durch das Licht der blauen LED-Kassette mit einer Wellenlänge von 480 nm wurde der grüne Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein) angeregt und die grüne LED-Kassette gab Licht der Wellenlänge 535 nm ab, welches den roten Fluorophor (Rhodamin) zur Emission anregte.

Die Signalkonstellationen wurden in einer Strichliste vermerkt und am Ende für jedes Feld addiert. Dann berechnete man den prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen. Anhand der Cut-off-Werte konnte dann über einen chromosomalen Verlust oder Zugewinn entschieden werden.

Während der Auswertung wurden Bilder mithilfe der Kamera des Fluoreszenzmikroskops (XC30) von Olympus angefertigt (siehe 4.5). Dazu erfolgten zunächst 3 Einzelbildaufnahmen, je eine der DAPI-Färbung, des grünen (22q11) und des roten (1p36) Fluorophors. Mit der Software „cellSens Dimension“ von Olympus war eine Bearbeitung der Aufnahmen möglich. Die 3 Einzelaufnahmen wurden übereinandergelegt, sodass alle Färbungen in einem Bild zu sehen waren. Anschließend wurden die Kontraste optimiert, um die Sondensignale möglichst deutlich von dem blauen Hintergrund abzuheben.

3.2.5 Loss-of-heterozygosity-Analyse (LOH-Analyse)

Die LOH-Analyse wurde vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes an den eingeschlossenen Meningeomen durchgeführt.

Das Prinzip der auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierten Mikrosatelliten-Analyse wurde an Meningeomen analog zur Beschreibung an Oligodendrogliomen unter Verwendung anderer Sonden durchgeführt [4,15]. Dabei wurden für die Untersuchung des kurzen Armes von Chromosom 1 die Sonden D1S 1608, D1S 1161, D1S 1184 und eine Sonde für den ARID1A-Genloкус verwendet. Für den langen Arm von Chromosom 14 kamen die Sonden D14S 81, D14S DPF3, D14S 1018 und D14S 70 zum Einsatz und für den langen Arm von Chromosom 22 folgende Sonden: D22S 445, D22S 684, D22S 268 und D22S 258 (siehe Abbildung 35 a). Die Untersuchung auf den Verlust der Heterozygotie erfolgte auf Elchromgelen durch einen Vergleich der Tumorbände mit der daneben aufgetragenen Blutbande des Patienten. Die Blutbande stellte die Kontrolle dar und sollte im Falle einer Heterozygotie des Patienten bezüglich eines Allels 2 Banden aufzeigen. Zeigte das

Tumorgewebe dasselbe Muster, sprach man auch von Heterozygotie. War 1 Bande abgeschwächt zu sehen oder gar nicht vorhanden, lag ein Loss of Heterozygosity (LOH) vor. Falls auch in der Blutprobe nur 1 Bande abgebildet war, lag eine Homozygotie vor und es konnte keine Auswertung erfolgen [4].

3.2.6 Statistik

Die deskriptiven Statistiken dieser Beobachtungsstudie wurden mithilfe der Software „IBM SPSS Statistics“, einer Software für statistische Datenanalyse (Version 27), erstellt. Alle Ergebnisse wurden auf die zweite Nachkommastelle gerundet und alle Standardabweichungen auf die dritte, sofern keine andere Angabe gemacht wurde.

Die Ermittlung der p-Werte erfolgte ebenfalls mithilfe der Software „IBM SPSS Statistics“ (Version 27). Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf 5 % ($p < 0,05$) festgelegt. Für die Interpretation der p-Werte bedeutete dies, dass die Nullhypothese H_0 nicht verworfen werden durfte, wenn $p > 0,05$ war. Die Alternativhypothese musste angenommen werden, wenn $p < 0,05$ war.

Die Variablen wurden zunächst mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Die Nullhypothese H_0 beschrieb bei diesem Test, dass die Daten der Variable normalverteilt waren. Von einer Normalverteilung wurde daher ausgegangen, wenn der p-Wert über dem Signifikanzniveau lag.

Einige Variablen waren nicht normalverteilt, daher wurde der p-Wert mit dem Mann-Whitney-U-Test oder dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. Ersterer wurde zur Überprüfung der Nullhypothese H_0 bei 2 unabhängigen Variablen verwendet; letzterer, wenn mehr als 2 unabhängige Variablen verglichen werden sollten.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Ergebnisse des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv umfasste 3 Männer und 6 Frauen (Anzahl (N) = 9) (siehe Abbildung 8), wobei von einem Patienten (P7) 2 Meningeome eingeschlossen wurden. Diese befanden sich an unterschiedlichen Lokalisationen im Gehirn und wiesen auch verschiedene WHO-Grade sowie zytogenetische Befunde auf (siehe Tabelle 3). Das mittlere Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation betrug 75,22 Jahre (Standardabweichung (SD) = 9,365 Jahre). Der jüngste Patient wurde im Alter von 62 und die älteste Patientin im Alter von 86 Jahren operiert (siehe Tabelle 5 und 6 a). Im Teilkollektiv der Männer (N = 3) betrug das mittlere Alter 67,33 Jahre (SD = 6,807 Jahre), wobei der jüngste Patient 62 Jahre und der älteste 75 Jahre alt waren (siehe Tabelle 6 b). Die Patientinnen (N = 6) waren im Durchschnitt am Operationstag 79,17 Jahre (SD = 8,110 Jahre) alt. Die jüngste Patientin wurde mit 65 Jahren operiert und die älteste mit 86 Jahren (siehe Tabelle 6 c).

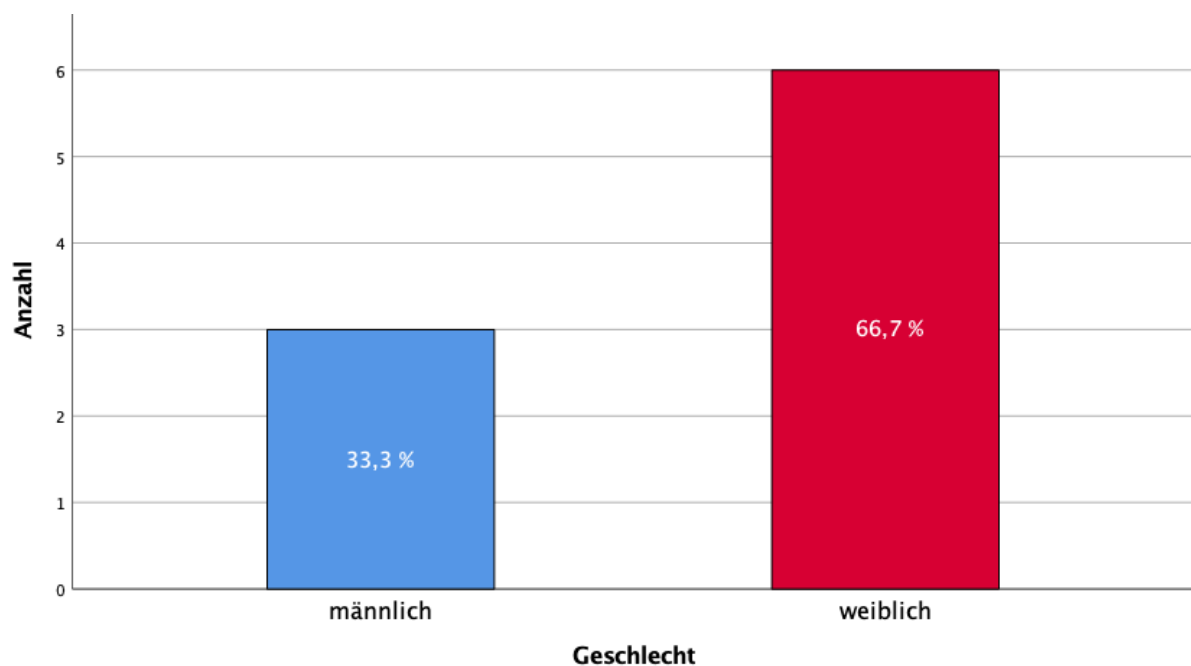


Abbildung 8: Verteilung der Geschlechter im eingeschlossenen Patientenkollektiv (N = 9); die Prozentzahlen wurden auf die erste Nachkommastelle gerundet (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Tabelle 5: Überblick über das Alter zum Zeitpunkt der Operation im Zusammenhang mit dem Geschlecht (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

		Alter							Gesamt
		62	65	74	75	82	84	86	
Geschlecht	männlich	1	1	0	1	0	0	0	3
	weiblich	0	1	1	0	1	2	1	6
Gesamt		1	2	1	1	1	2	1	9

Tabelle 6 a-c: Statistische Kennwerte für das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); N – Anzahl, Std. – Standard.

N	Gültig	9
	Fehlend	0
Mittelwert		75,22
Median		75,00
Std.-Abweichung		9,365
Minimum		62
Maximum		86

N	Gültig	3
	Fehlend	0
Mittelwert		67,33
Median		65,00
Std.-Abweichung		6,807
Minimum		62
Maximum		75

N	Gültig	6
	Fehlend	0
Mittelwert		79,17
Median		83,00
Std.-Abweichung		8,110
Minimum		65
Maximum		86

a Statistische Kennwerte für das Gesamtkollektiv der Patienten (N = 9).

b Statistische Kennwerte für das Teilkollektiv der Männer (N = 3).

c Statistische Kennwerte für das Teilkollektiv der Frauen (N = 6).

Nach der Klassifikation der WHO aus dem Jahr 2016 lagen 8 Meningeome vom WHO Grad I und 2 vom WHO Grad II vor [33] (siehe Abbildung 9).

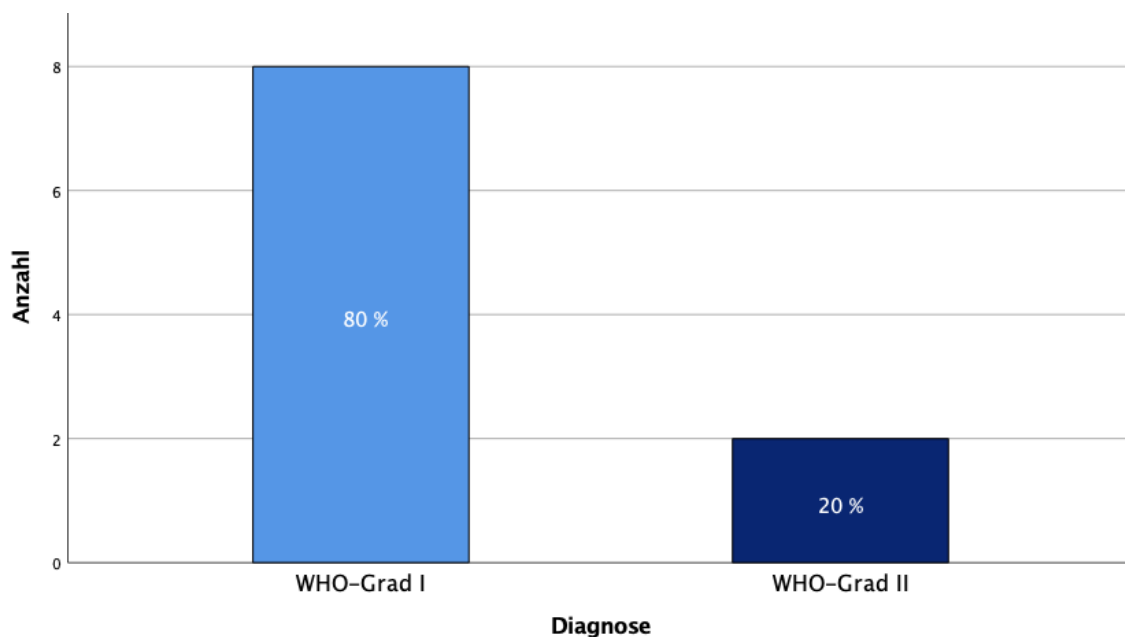


Abbildung 9: Diagnose der Meningeome nach WHO-Klassifikation (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); WHO – World Health Organization.

In 4 Meningeomen wurde bei der zytogenetischen Untersuchung keine Chromosomenaberration festgestellt. Einen kombinierten Verlust von 1p und 22q zeigten 3 Tumore auf. Ein isolierter 22q-Verlust, ein isolierter 1p-Verlust und ein kombinierter 14q- und 22q-Verlust wurden in je einem Meningeom vorgefunden (siehe Abbildung 10).

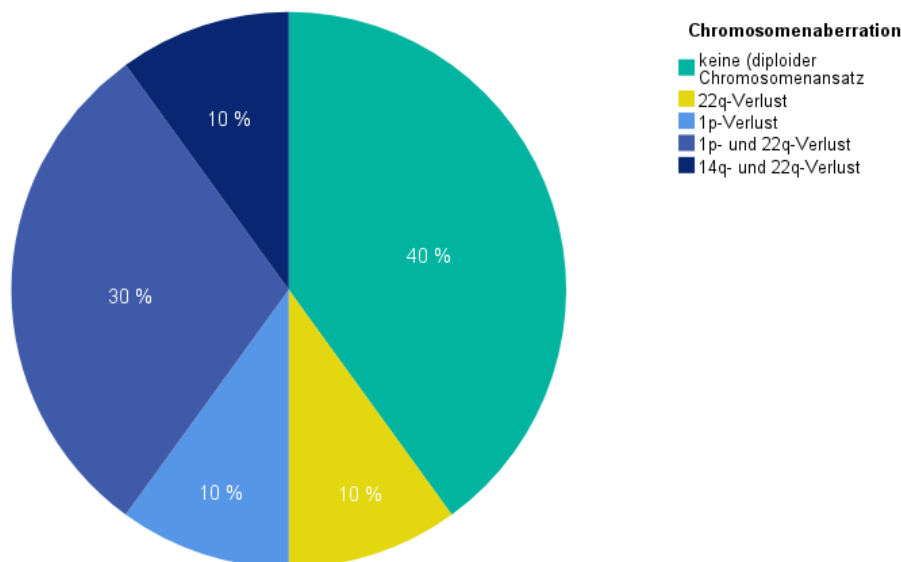


Abbildung 10: Zytogenetische Befunde nach Untersuchung der Meningeome durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes; die Ergebnisse wurden dem klinikinternen Patientenregister der Neurochirurgie entnommen (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); 1p-Verlust – Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1, 22q-Verlust – Verlust des langen Armes von Chromosom 22, 1p- und 22q-Verlust – kombinierter Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 und des langen Armes von Chromosom 22, 14q- und 22q-Verlust – kombinierter Verlust des langen Armes von Chromosom 14 und des langen Armes von Chromosom 22.

Ein WHO-Grad-II-Meningeom zeigte keine chromosomalen Verluste. Das andere hingegen wies einen 1p-Verlust auf.

Am häufigsten waren die Meningeome bei den Patienten im Keilbeinflügel lokalisiert (N = 3). Bei 2 Patientinnen wuchs der Tumor an der Konvexität (N = 2). An den folgenden Lokalisationen wurden je ein Meningeom detektiert (N = 1): parasagittal, in der hinteren Schädelgrube (HSG), im Kleinhirnbrückenwinkel (KHBW), an der Falx cerebri und frontobasal (siehe Abbildung 11).

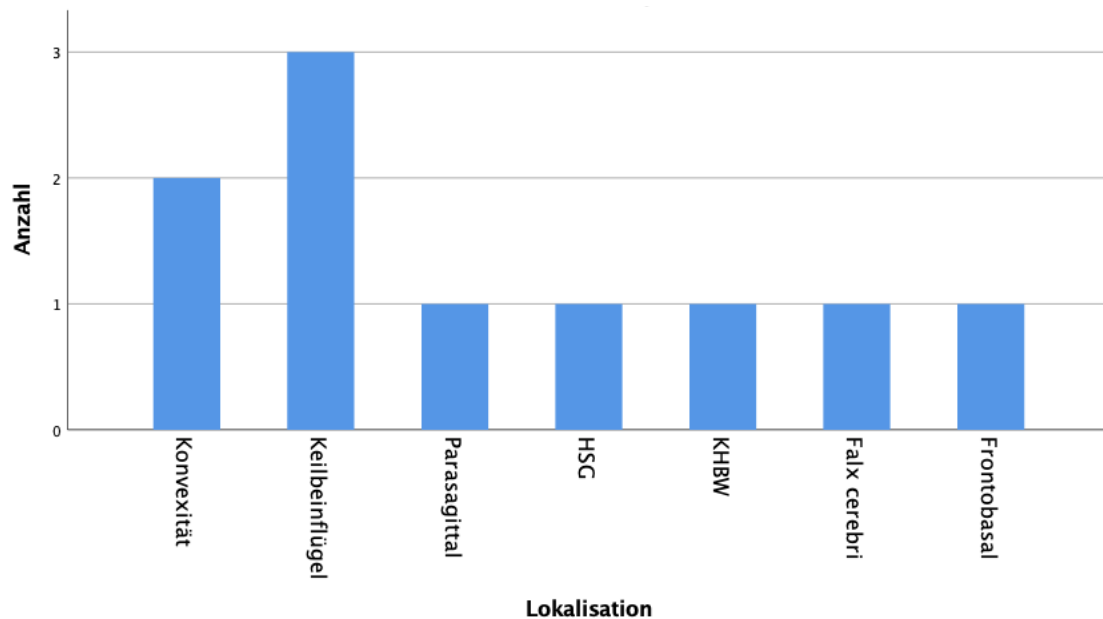


Abbildung 11: Lokalisation der Meningeome (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); HSG – Hintere Schädelgrube, KHBW – Kleinhirnbrückenwinkel.

4.2 Wachstumsrate der Primäransätze (p0-Ansätze)

Insgesamt wurden 10 Meningeome in diese Studie eingeschlossen. Ansatz A bezeichnete den Ansatz des Operationstages und Ansatz B den Ansatz des ersten postoperativen Tages. In beiden Ansätzen, A und B, zeigten 8 von 10 Meningeomen ein Anwachsen. In einem Fall wuchs nur der Ansatz des Operationstages an und bei einem Meningeom konnte kein Wachstum verzeichnet werden. Insgesamt wuchsen von 20 angesetzten Primärkulturen 17 an und 3 nicht. Daraus ergab sich eine Anwachsrate von 85 % für die Passage 0 (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Wachstum der Zellkulturen der Passage 0 insgesamt (Ansätze A und B) (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	Wachstum	17	85,0
	Kein Wachstum	3	15,0
	Gesamt	20	100,0

Ansatz am Tag der Operation (Ansatz A)

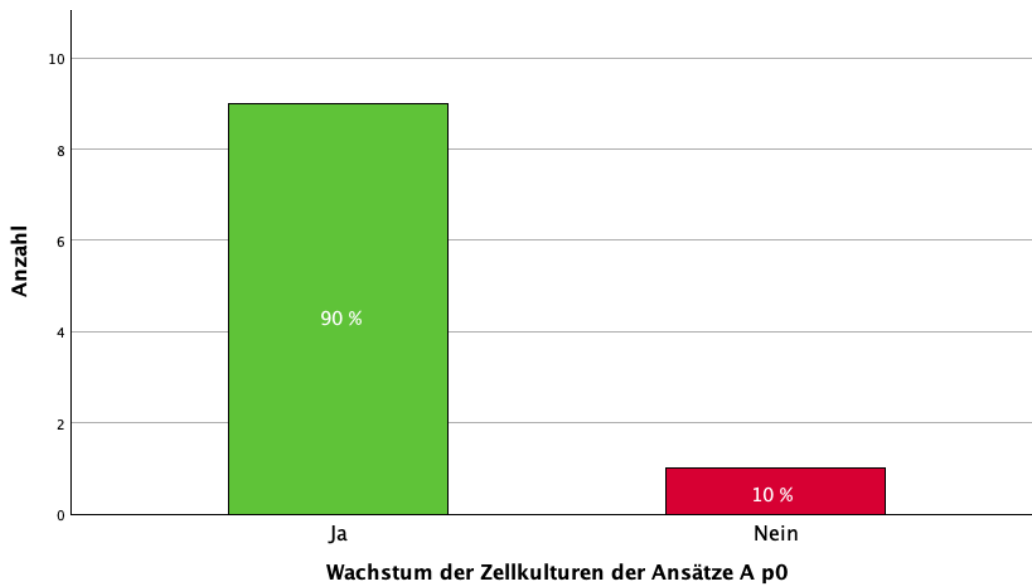


Abbildung 12: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze A p0 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

In Abbildung 12 wurde die Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze des Operationstages dargestellt. Ein ausreichendes Zellwachstum, um die p0-Zellkulturen in je 2 p1-Zellkulturflaschen umzusetzen, zeigten 9 von 10 angesetzten Kulturen (90 %). Das Splitting führte dazu, dass die Zellen sich wieder schneller vermehrten, sodass die p1-Flaschen genügend Zellen enthielten, um eine Kultur für die FISH abzubereiten und die andere in flüssigem Stickstoff einzufrieren.

Exemplarisch ist der Verlauf des Wachstumsverhaltens der Meningeomzellen des Tumors 9181 in Abbildung 13 gezeigt. Man erkannte direkt an Tag 1 ein Auswachsen von Zellen aus dem Gewebestück heraus (siehe Abbildung 13 a rote Pfeile). Mit der weiteren Vermehrung begannen die Zellen untereinander Verbindungen herzustellen und somit ein flächenhaftes Zuwachsen des Bodens der Zellkulturflasche zu ermöglichen (siehe Abbildung 13 b). Der Ansatz A dieses Tumors konnte an Tag 9 auf 2 p1-Flaschen aufgesplittet werden (siehe Abbildung 13 c). In einer p1-Flasche erkannte man bereits am ersten Tag nach dem Splitting, dass sich die Zellen deutlich schneller vermehrten als in der p0-Flasche zu Beginn des Ansatzes (siehe Abbildung 13 d). An Tag 15 nach dem Ansatz konnten die p1-Kulturen sowohl für die FISH (siehe Abbildung 13 e) als auch zum Einfrieren (siehe Abbildung 13 f) abgebrochen werden, da die Böden der Zellkulturflaschen flächenhaft zugewachsen waren. Beim Splitting wurde eine neue Kulturflasche angelegt und die alte p0-Flasche weiterverwendet. Aufgrund der Tatsache, dass in der alten p0-Flasche noch Zellen vorhanden waren, die sich beim Splitting nicht abgelöst hatten, waren diese Zellkulturflaschen meist

schneller dicht bewachsen als die neuen Kulturflaschen (siehe 3.2.1.3). Dies führte dazu, dass bei wenigen Meningeomen (T 9145 A, T 9152 A und B) die p1-Kultur in der neuen Kulturflasche erst später abgebrochen werden konnte als die andere Kultur.

Allgemein wurden die p1-Kulturen in der ehemaligen p0-Flasche zum Abbruch für die FISH und im Rahmen dessen auch für die Zellzählung verwendet, weil die Zelldichte mikroskopisch sichtbar ein wenig größer war als in der neuen Kulturflasche. Die Zellen in den neuen p1-Flaschen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

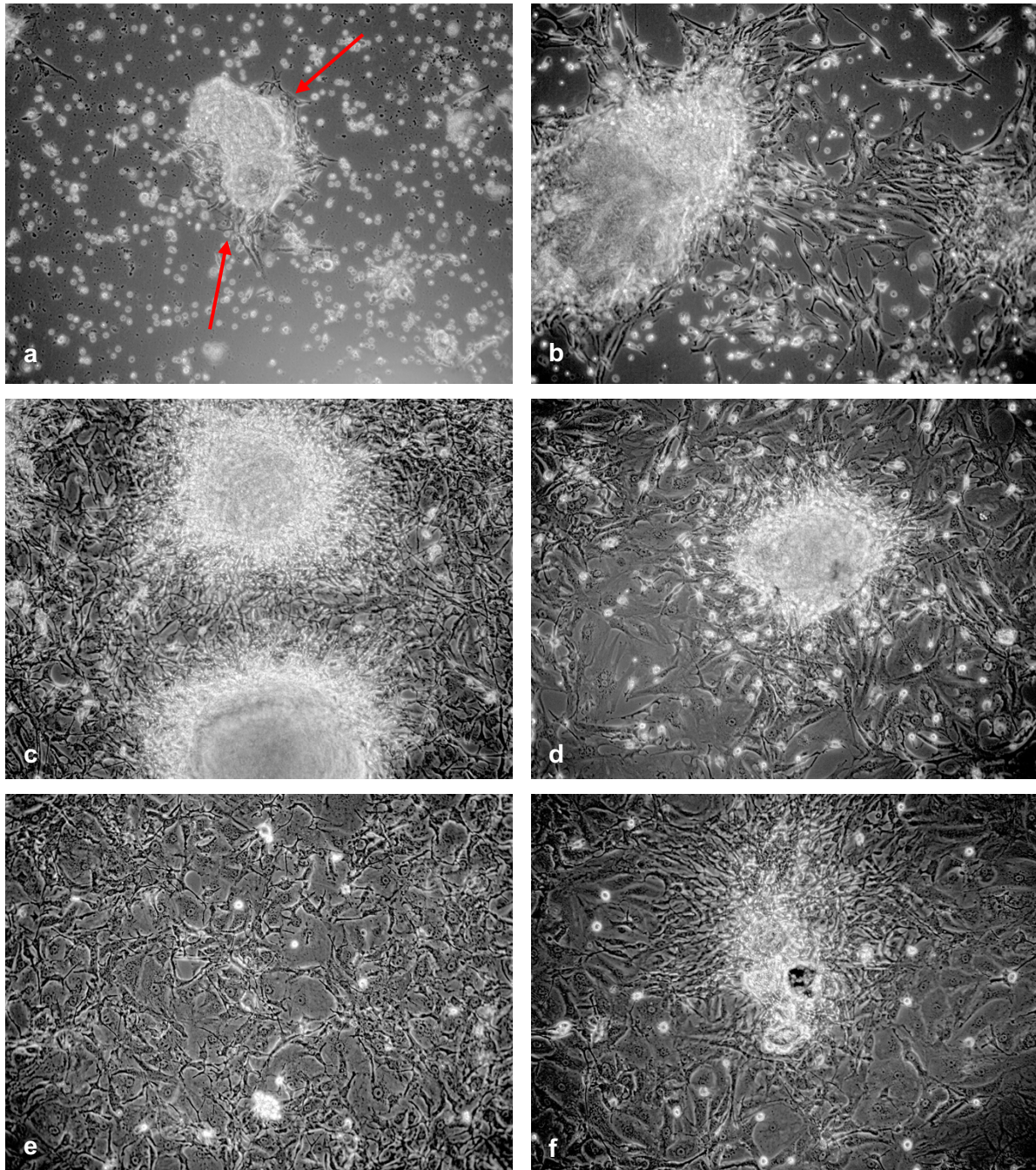


Abbildung 13 a-f: Zellwachstum der Kultur **T 9181 A p0** und **p1** im Verlauf: **a** Tag 1, **b** Tag 3, **c** Tag 9: Splitting in 2 p1-Kulturen, **d** Tag 10, **e** Tag 15: 1x p1 Abbruch für FISH, **f** Tag 15: 1x p1 Abbruch zum Einfrieren; rote Pfeile: auswachsende Zellen (eigene Darstellung mit dem 10x Objektiv).

Nur der Ansatz A des Tumors 9168 zeigte kein flächenhaftes Auswachsen von Zellen aus dem Gewebe, sondern lediglich das Wachstum von Einzelzellen (siehe Abbildung 14). Daher konnten keine weiteren Methoden durchgeführt werden, sodass es nach 10 Tagen zum Verwerfen der Kultur kam (siehe 5.2).

Das Zeitfenster der Beobachtung für das Anwachsen der Zellen wurde auf 10 Tage begrenzt, da innerhalb dieses Zeitraumes alle Primäransätze der, für diese wissenschaftliche Arbeit, verwendeten Meningeome flächenhaft angewachsen waren.

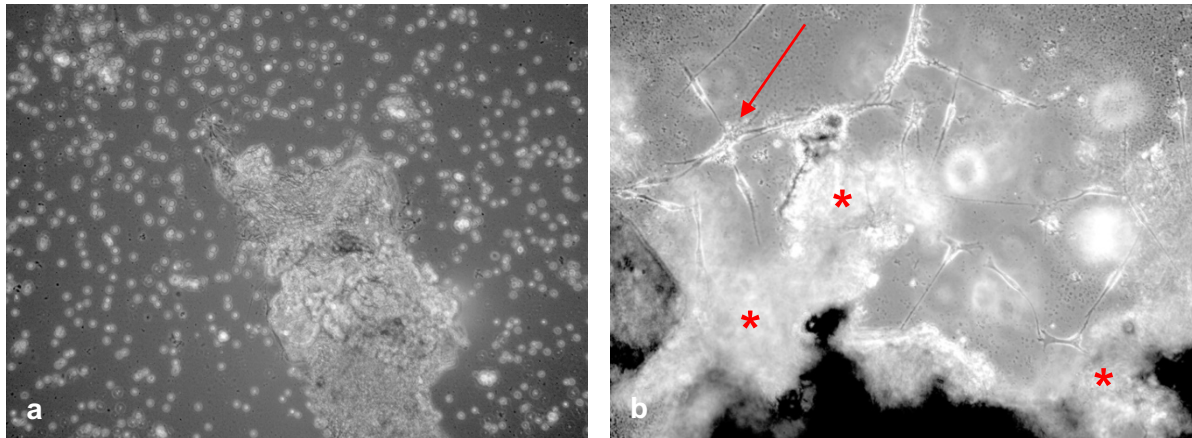


Abbildung 14 a-b: Zellwachstum der Kultur **T 9168 A p0** im Verlauf: **a** Tag 1, **b** Tag 10: Zellkultur verworfen; roter Pfeil: Einzelzelle, rote Sterne: Gewebe in Suspension (eigene Darstellung mit dem 10x Objektiv).

Ansatz am ersten postoperativen Tag (Ansatz B)

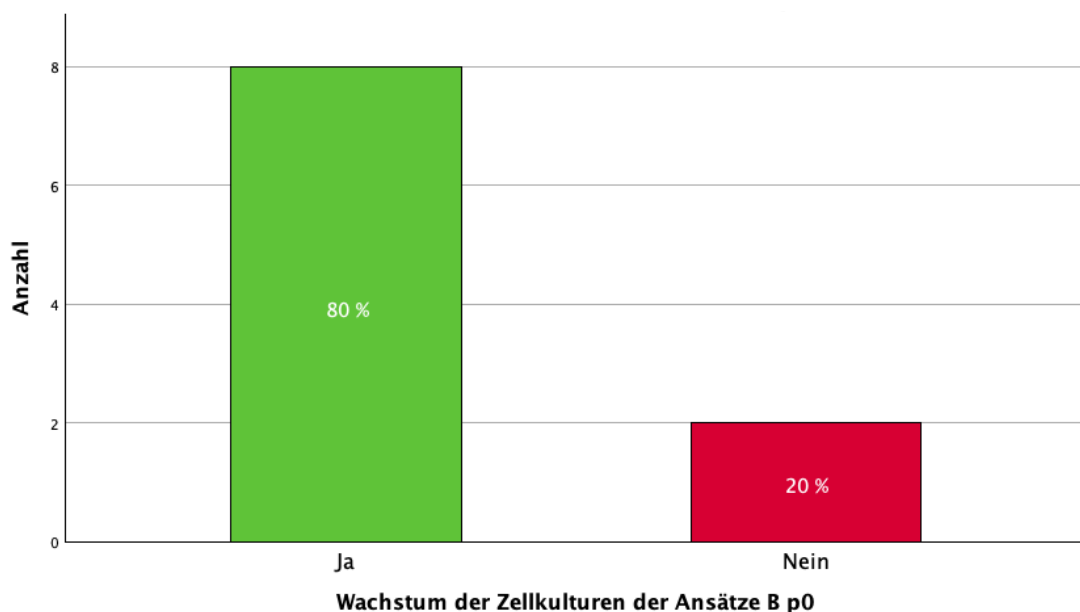


Abbildung 15: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze B p0 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

In Abbildung 15 wurde nun die Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze des ersten postoperativen Tages dargestellt. Ein flächenhaftes Wachstum der Meningeomzellen zeigten 8 von 10 angesetzten Kulturen (80 %) und boten somit die Möglichkeit der Weiterverarbeitung. Der Ansatz B des Meningeoms 9145 zeigte kein Zellwachstum (siehe Abbildung 16 a und b). Ebenso verhielt es sich mit der Zellkultur T 9168 B (siehe Abbildung 16 c und d). Es konnten keine Zellen detektiert werden, sodass beide Kulturen nach 10 Tagen verworfen wurden (siehe 5.2).

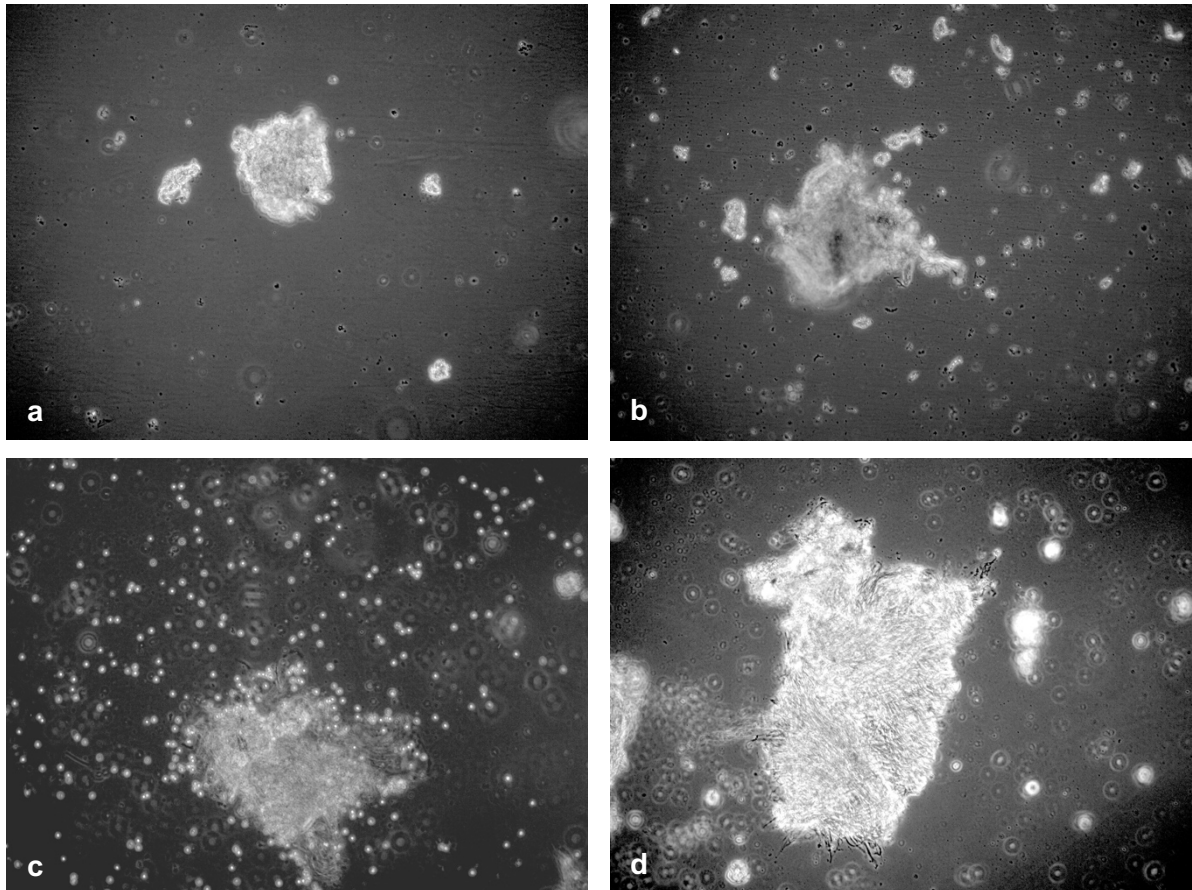


Abbildung 16 a-d: Zellwachstum der Kulturen im Verlauf: **T 9145 B p0:** a Tag 2, b Tag 10; **T 9168 B p0:** c Tag 1, d Tag 10: Zellkultur verworfen (eigene Darstellung mit dem 10x Objektiv).

Im nachfolgenden Diagramm wurden die Anwachsrate der Ansätze A und B gegenübergestellt. Bei den Ansätzen am ersten Tag postoperativ wuchs eine Meningeomzellkultur weniger an als bei den Ansätzen am Tag der Operation selbst. Dennoch lag keine statistische Signifikanz vor ($p = 0,542$, Mann-Whitney-U-Test).

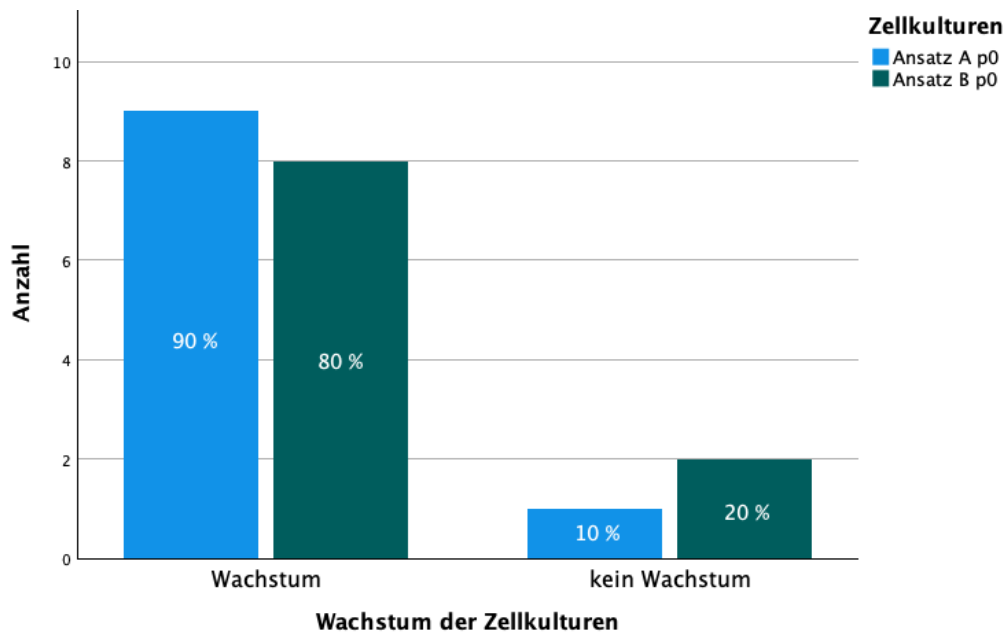


Abbildung 17: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A und B p0 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Betrachtung durchschnittlicher Dauern und der Viabilitäten

Im Durchschnitt konnte man das Auswachsen der Zellen aus dem Gewebe bei den Primäransätzen nach 1,41 Tagen ($N = 17$, $SD = 0,939$ Tage) beobachten. Bei den Primäransätzen, die am Tag der Operation angesetzt wurden (Ansätze A), konnten die ersten Zellen im Mittel bereits nach 1,33 Tagen ($N = 9$, $SD = 1$ Tag) fotografiert werden. Die Ansätze des ersten postoperativen Tages (Ansätze B) zeigten ein Zellwachstum im Durchschnitt nach 1,5 Tagen ($N = 8$, $SD = 0,926$ Tage) (siehe Tabelle 8). Die zeitliche Differenz zwischen den beiden Ansatzreihen bis zum Auswachsen der Zellen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,562$, Mann-Whitney-U-Test). Die Angaben bezogen sich auf die weiterverarbeiteten Zellkulturen und schlossen die verworfenen Ansätze nicht mit ein.

Tabelle 8: Durchschnittliche Dauer bis zum mikroskopisch sichtbaren Auswachsen der Zellen aus dem Gewebe der Ansätze A und B p0 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); N – Anzahl, Std. – Standard.

Ansatz	Mittelwert	N	Std.- Abweichung
A p0	1,33	9	1,000
B p0	1,50	8	,926
Insgesamt	1,41	17	,939

Das Splitting der Passage 0 konnte im Durchschnitt nach 8,24 Tagen ($N = 17$, $SD = 3,052$ Tage) erfolgen. Getrennt betrachtet ergab sich für die Ansätze A eine mittlere Dauer von 7,78

Tagen (N = 9, SD = 3,270 Tage) bis zum Splitting und für die Ansätze B von 8,75 Tagen (N = 8, SD = 2,915 Tage) (siehe Tabelle 9). Dies hieß, dass die Ansätze B im Durchschnitt fast einen ganzen Tag später gesplittet werden konnten als die Ansätze A. Dennoch war auch dieser zeitliche Unterschied statistisch nicht signifikant ($p = 0,498$, Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 9: Durchschnittliche Dauer bis zum Splitting der Ansätze A und B p0 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); N – Anzahl, Std. – Standard.

Ansatz	Mittelwert	N	Std.– Abweichung
A p0	7,78	9	3,270
B p0	8,75	8	2,915
Insgesamt	8,24	17	3,052

Die durchschnittliche Dauer bis zum Abbruch der Zellkulturen der Primärgeneration (p0/p1) für die FISH belief sich auf 11,94 Tage (N = 17, SD = 3,152 Tage). Der Abbruch der Ansätze A vom Operationstag erfolgte im Mittel nach 11,56 Tagen (N = 9, SD = 2,789 Tage). Die Zellkulturen der Ansätze B wurden durchschnittlich nach 12,38 Tagen für die FISH weiterverarbeitet (N = 8, SD = 3,662 Tage) (siehe Tabelle 10 a). Das bedeutete, dass die Abbruchzeiten der beiden Ansatzreihen keinen ganzen Tag auseinanderlagen und auch hier keine statistische Signifikanz vorlag ($p = 0,699$, Mann-Whitney-U-Test).

Durch den zeitlich späteren Abbruch der 3 weiter oben genannten Tumoren zum Einfrieren in Stickstoff gegenüber dem Abbruch für die FISH wurde die durchschnittliche Dauer bis zum Einfrieren der Zellkulturen extra aufgeführt. Im Mittel belief sich diese für alle Kulturen der Primärgeneration zusammen auf 12,59 Tage (N = 17, SD = 3,607 Tage). Für die Ansätze A separat betrachtet, ergab sich eine durchschnittliche Dauer von 12,44 Tagen (N = 9, SD = 3,358 Tage) und für die Ansätze B von 12,75 Tagen (N = 8, SD = 4,097 Tage) (siehe Tabelle 10 b). Daraus ergab sich, dass sich die Differenz der mittleren Dauer bis zum Einfrieren der Kulturen der Ansätze A und B im Vergleich auf keinen halben Tag belief. Der p-Wert betrug 0,961 (Mann-Whitney-U-Test). Damit unterschieden sich die mittleren Dauern zwischen den Ansatzreihen A und B bis zum Einfrieren nicht signifikant.

Tabelle 10 a-b: Durchschnittliche Dauer bis zur Weiterverarbeitung der Zellkulturen A und B p1: **a** bis zum Abbruch für die FISH, **b** bis zum Einfrieren (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); N – Anzahl, Std. – Standard.

Ansatz	Mittelwert	N	Std.– Abweichung	Ansatz	Mittelwert	N	Std.– Abweichung
A p1	11,56	9	2,789	A p1	12,44	9	3,358
B p1	12,38	8	3,662	B p1	12,75	8	4,097
Insgesamt	11,94	17	3,152	Insgesamt	12,59	17	3,607

a Bis zum Abbruch für die FISH.

b Bis zum Einfrieren.

Die Ergebnisse der Zellzählungen der Primärkulturen wurden im Anhang in Tabelle 23 aufgelistet.

Bei der Gegenüberstellung der Viabilitäten der Ansatzreihen A und B erkannte man, dass die Ansätze B tendenziell eine höhere Viabilität aufwiesen als die Ansätze A (siehe Abbildung 18).

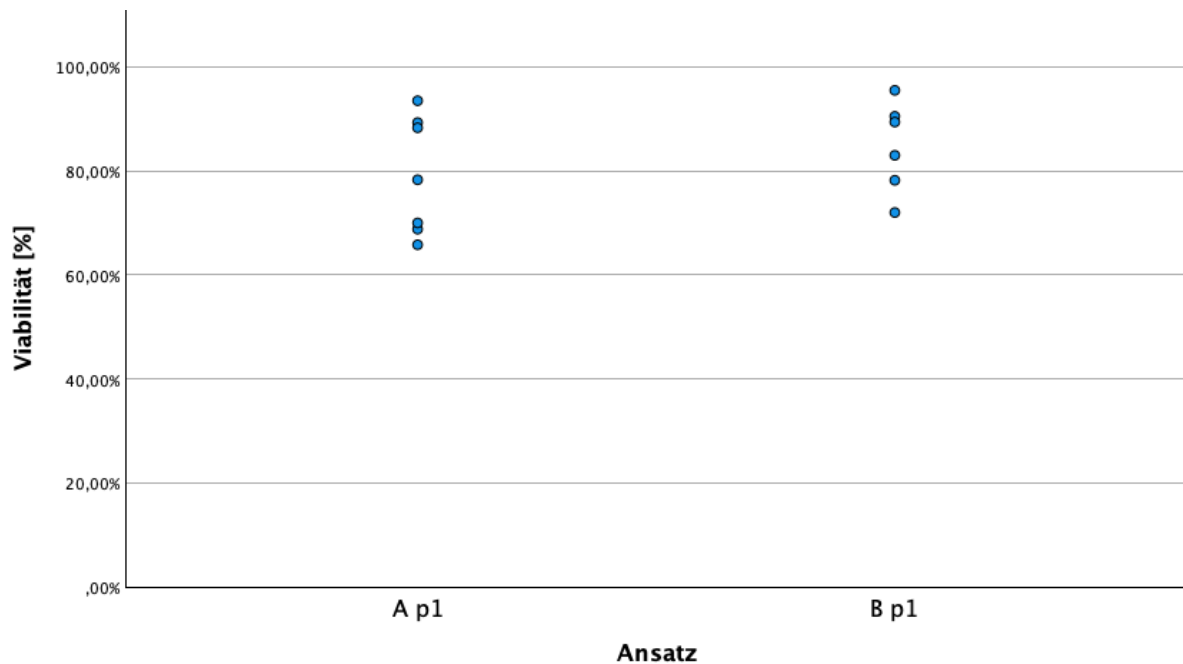


Abbildung 18: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p1 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Die mittlere Viabilität aller Ansätze der Primärgeneration zusammen lag bei 81,74 % (N = 13, SD = 10,179 %). In die Berechnung gingen nur 13 Ansätze mit ein, weil an den Kulturen der Meningeome 9077 und 9092 keine Zellzählung erfolgte. Die durchschnittliche Viabilität der Ansätze A betrug 79,14 % (N = 7, SD = 11,273 %) und die der Ansätze B 84,77 % (N = 6, SD = 8,704 %) (siehe Tabelle 11). Statistisch gesehen lag aber keine Signifikanz vor ($p = 0,253$, Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 11: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p1 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); N – Anzahl, Std. – Standard.

Ansatz	Mittelwert	N	Std.- Abweichung
A p1	79,1429%	7	11,27281%
B p1	84,7667%	6	8,70372%
Insgesamt	81,7385%	13	10,17927%

4.3 Wachstumsrate der Sekundäransätze (p2-Ansätze)

Insgesamt wuchsen in der Sekundärgeneration von den 17 aufgetauten Zellkulturen 16 erneut an. Es konnten 9 Zellkulturen der Ansätze A und 8 Zellkulturen der Ansätze B rekultiviert werden. Daraus ergab sich eine Anwachsrate von 94,1 % für die Passage 2 (siehe Tabelle 12). Bei allen Ansätzen, die im Verlauf Zellwachstum zeigten, setzten sich die Zellen bereits nach 24 Stunden am Boden fest.

Tabelle 12: Wachstum der Zellkulturen der Passage 2 insgesamt (Ansätze A und B) (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	Wachstum	16	94,1
	Kein Wachstum	1	5,9
	Gesamt	17	100,0

Rekultivierung der Ansätze A

In Abbildung 19 wurde die Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze des Operationstages in der Sekundärkultur dargestellt. Alle (9 von 9) angesetzten Kulturen (100 %) zeigten ein ausreichendes Zellwachstum, um die Zellkulturen für die FISH abbrechen zu können.

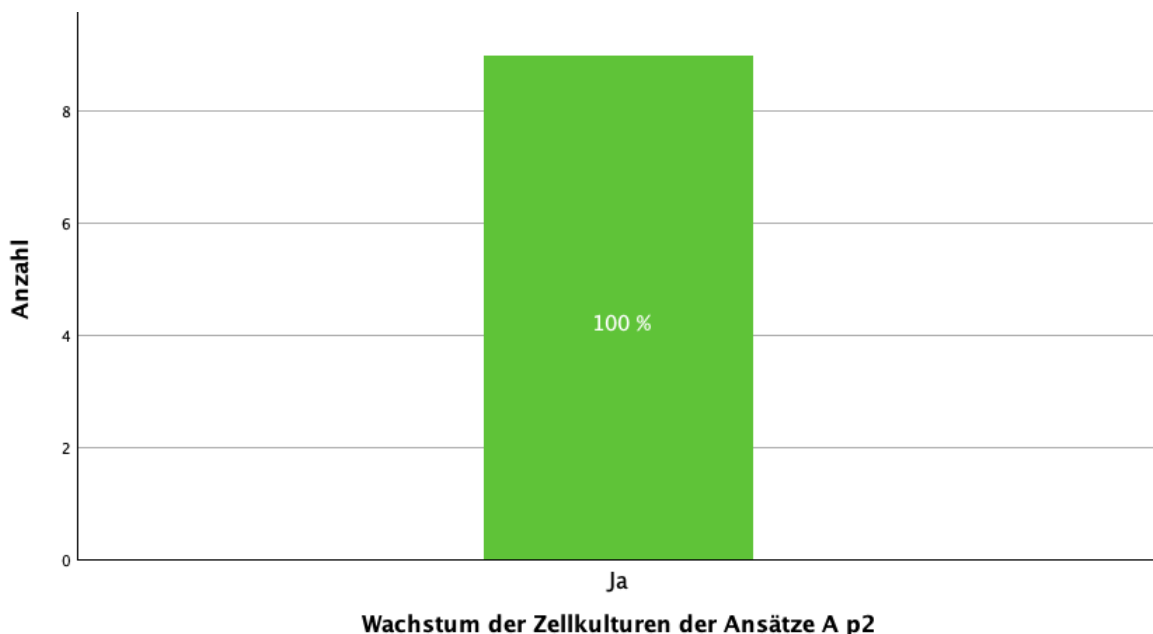


Abbildung 19: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze A p2 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Das dokumentierte Wachstumsverhalten in der Sekundärgeneration wurde beispielhaft für den Ansatz A des Meningeoms mit der T-Nr. 9181 in Abbildung 20 dargestellt. 24 Stunden nach der Rekultivierung bot sich das in Abbildung 20 a dargestellte Bild unter dem Mikroskop. Man konnte anhand des Leuchtens viele vitale Zellen identifizieren. Im Verlauf setzten sich die Zellen am Boden fest und vermehrten sich zügig, sodass an Tag 10 der Boden der Zellkulturflasche flächenhaft bewachsen war und die Zellen für die FISH präpariert werden konnten (siehe Abbildung 20 b-d).

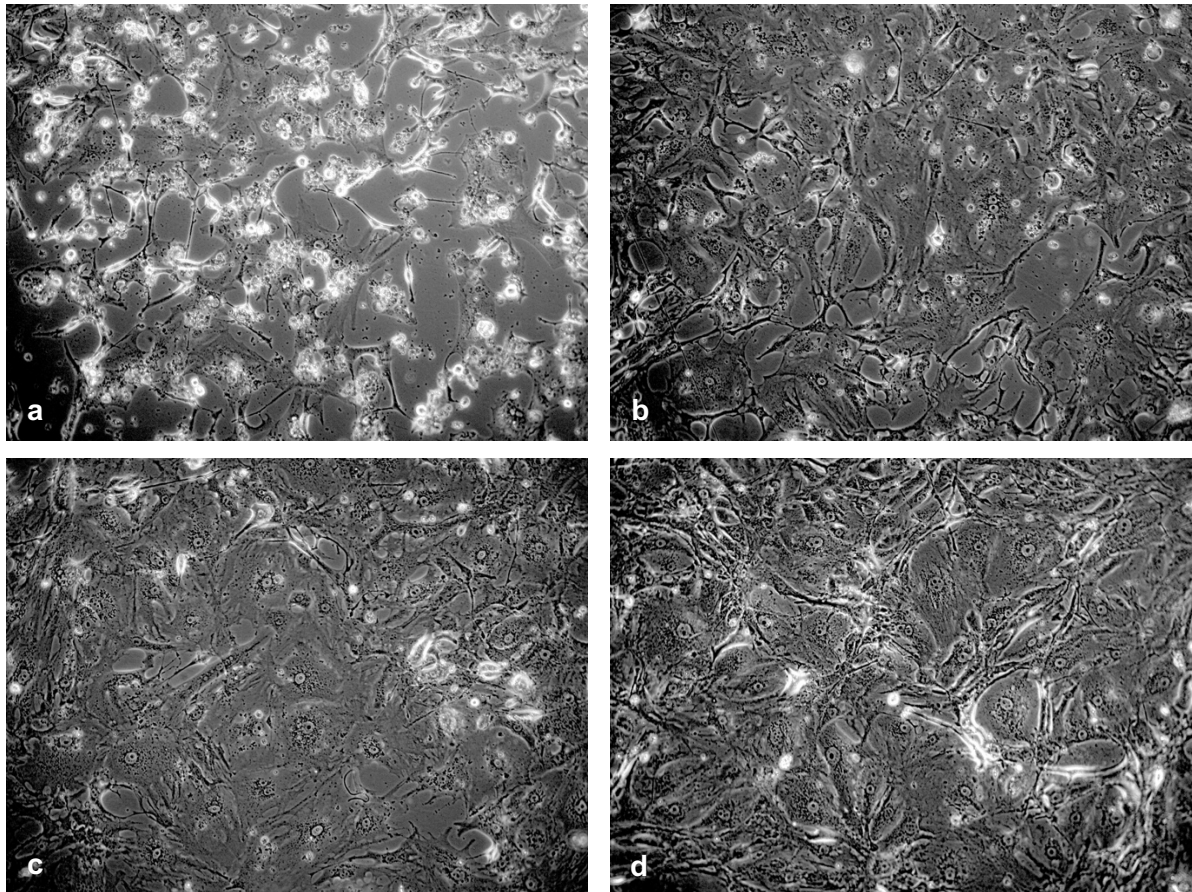


Abbildung 20 a-d: Zellwachstum der Kultur **T 9181 A p2** im Verlauf: **a** Tag 1, **b** Tag 4, **c** Tag 7, **d** Tag 10: Abbruch für FISH (eigene Darstellung mit dem 10x Objektiv).

Rekultivierung der Ansätze B

Bei der Rekultivierung der Zellkulturen, die in der Primärgeneration einen Tag postoperativ angesetzt wurden, zeigten in der Sekundärgeneration 7 von 8 Ansätzen (87,5 %) ein flächenhaftes Bewachsen des Bodens (siehe Abbildung 21).

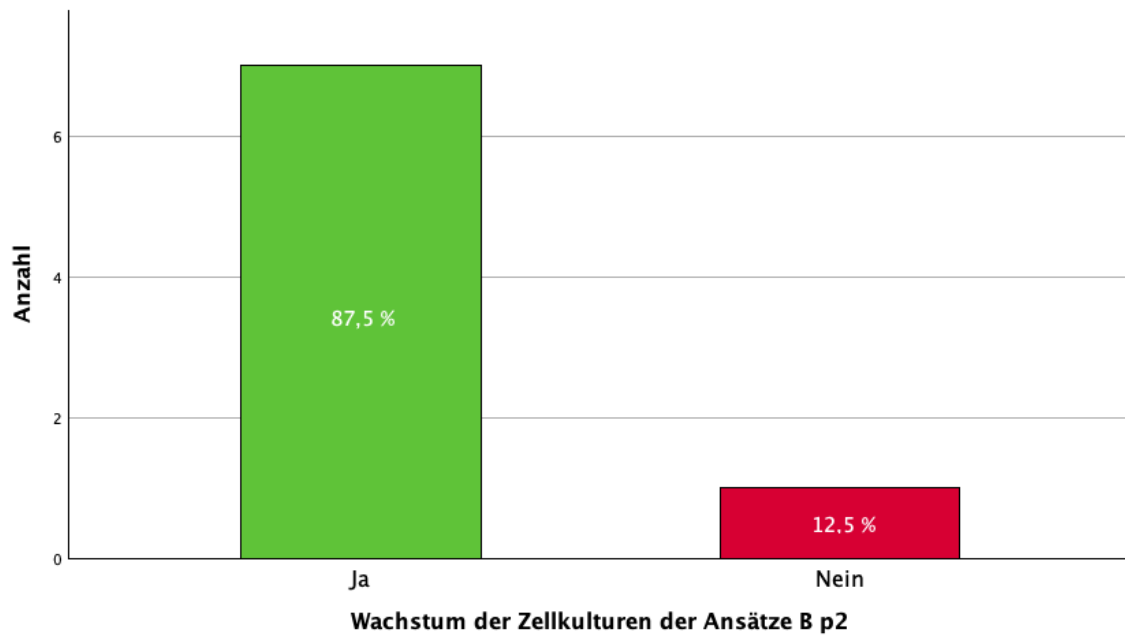


Abbildung 21: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze B p2 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Der größte Teil der Zellen der Kultur T 9181 B p2 setzte sich nicht am Boden ab, sondern verblieb in Suspension (siehe Abbildung 22 a-b). Einzelne Zellen setzten sich fest, vermehrten sich aber nicht ausreichend, um den Boden der Kulturflasche vollständig zu bedecken (siehe Abbildung 22 c). Dennoch wurde die Kultur am zehnten Tag für die FISH abgebrochen und ausgezählt, da die Zellen in Suspension vorlagen (siehe Tabelle 24).



Abbildung 22 a-c: Zellwachstum der Kultur T 9181 B p2 im Verlauf: **a** Tag 1, **b** Tag 4, **c** Tag 10 (eigene Darstellung mit dem 10x Objektiv).

Vergleich der Wachstumsraten der Ansätze beider Generationen

In Abbildung 23 wurden die Anwachsrate der Sekundärgeneration für die Ansätze A und B im Vergleich dargestellt. Während von den ursprünglichen Ansätzen vom Operationstag alle rekultiviert werden konnten, zeigte sich bei den Zellen eines Meningeoms der Ansatzreihe B kein Absetzen am Boden und damit auch keine ausreichende Zellteilung. Ein statistischer

Vergleich auf Signifikanz zwischen der Ansatzreihe A und B p2 war aufgrund der Abhängigkeit von den Anwachsrate der Primärgeneration nicht möglich.

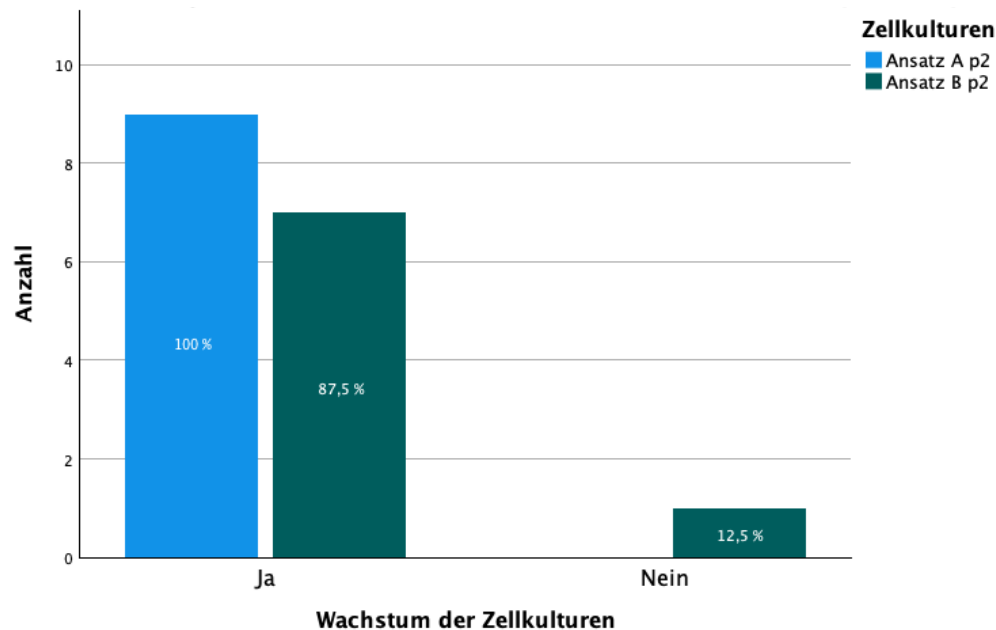
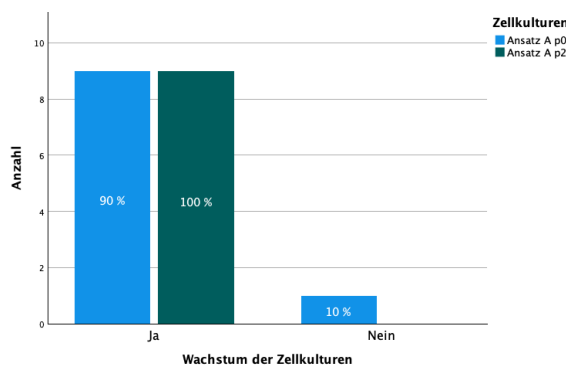


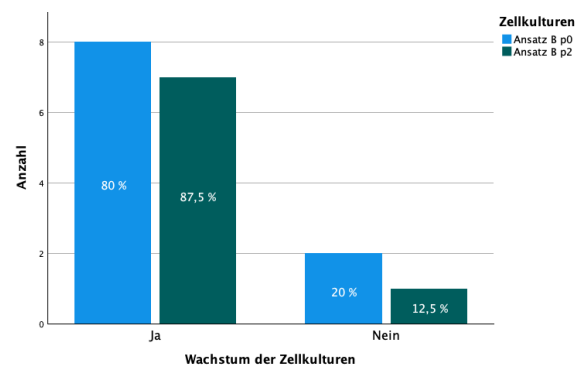
Abbildung 23: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A und B p2 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Der Vergleich der Wachstumsraten beider Generationen, aufgetrennt nach den Ansatzreihen A und B, wurde in Abbildung 24 a-c dargestellt. Von den 10 angesetzten Primärkulturen am Operationstag (Ansatz A) konnten 9 eingefroren werden. Diese konnten als Sekundärkulturen rekultiviert werden und zeigten alle ein flächenhaftes Wachstum.

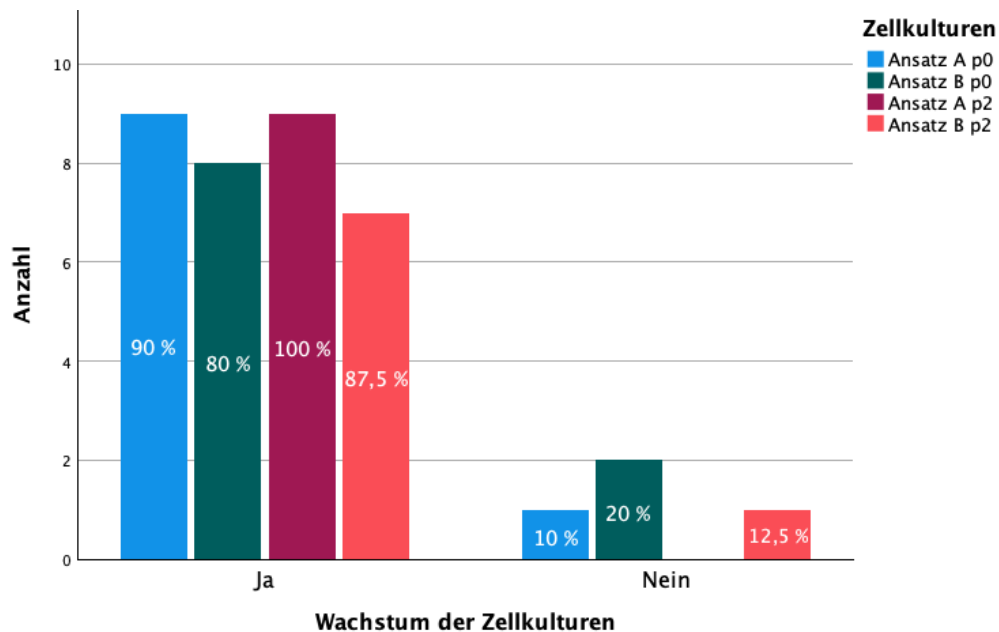
Von den 10 angesetzten Zellkulturen der Ansatzreihe B konnten 8 eingefroren und als Sekundärkulturen erneut kultiviert werden. Davon zeigten wiederum 7 ein flächenhaftes Wachstum in der Zellkultur.



a Vergleich der Ansätze A p0 und A p2.



b Vergleich der Ansätze B p0 und B p2.



c Vergleich aller Ansätze und Generationen.

Abbildung 24 a-c: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Vergleich man das Wachstumsverhalten der Generationen miteinander, ergab sich für die Primärkulturen eine Wachstumsrate von 85 % (siehe Tabelle 7) und für die Sekundärkulturen von 94,1 % (siehe Tabelle 12). Insgesamt wurden 37 Zellkulturen aus vitalem Gewebe oder vitalen Zellen angesetzt, von denen 33 ein flächenhaftes Wachstum zeigten (siehe Tabelle 13). Prozentual ergab sich daraus eine Wachstumsrate von 89,19 % für alle Generationen. Ein Vergleich zwischen den Generationen auf statistische Signifikanz war nicht möglich, weil in der Primärgeneration Gewebe das Ausgangsmaterial darstellte und in der Sekundärgeneration bereits präparierte Zellen.

Tabelle 13: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A p0, B p0, A p2 und B p2 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

		Wachstum der Zellkulturen		Gesamt
		Ja	Nein	
Zellkulturen	Ansatz A p0	9	1	10
	Ansatz B p0	8	2	10
	Ansatz A p2	9	0	9
	Ansatz B p2	7	1	8
Gesamt		33	4	37

Die durchschnittliche Dauer bis zum Abbruch der Zellkulturen der Sekundärgeneration (p2) für die FISH belief sich auf 7,94 Tage (N = 17, SD = 1,676 Tage). Der Abbruch der Ansätze A vom Operationstag erfolgte im Mittel nach 7,67 Tagen (N = 9, SD = 1,658 Tage). Die Zellkulturen der Ansätze B wurden durchschnittlich nach 8,25 Tagen für die FISH

weiterverarbeitet (N = 8, SD = 1,753 Tage) (siehe Tabelle 14 a). Die Differenz zwischen den Ansätzen A und B war gering und es lag keine statistische Signifikanz vor (p = 0,396, Mann-Whitney-U-Test).

Im Gegensatz dazu unterschied sich die Dauer vom Ansatz bis zum Abbruch für die FISH deutlich zwischen der Primär- und Sekundärgeneration. Die Primärgeneration konnte im Mittel nach 11,94 Tagen (N = 17, SD = 3,152 Tage) für die FISH präpariert werden, wohingegen die Sekundärkulturen im Durchschnitt bereits 4 Tage früher, also nach 7,94 Tagen (N = 17, SD = 1,676 Tage), zum Abbruch bereit waren (siehe Tabelle 14 b).

Dadurch dass sich die Ausgangslagen der verschiedenen Ansätze aber stark unterschieden (siehe 5.2) und die Fallzahl klein war (jeweils N = 17 für beide Generationen), konnte hier keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

Tabelle 14 a-b: Vergleich der durchschnittlichen Dauer bis zum Abbruch der Zellkulturen für die FISH: **a** innerhalb der Passage 2 zwischen A und B, **b** zwischen der Primär- (p0/p1) und Sekundärgeneration (p2) in Tagen (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); N – Anzahl, Std. – Standard.

Ansatz	Mittelwert	N	Std.– Abweichung
A p2	7,67	9	1,658
B p2	8,25	8	1,753
Insgesamt	7,94	17	1,676

a Zwischen A und B p2.

Ansatz	Mittelwert	N	Std.– Abweichung
p0/p1	11,94	17	3,152
p2	7,94	17	1,676

b Zwischen p0/p1 und p2.

Die Ergebnisse der Zellzählungen der Sekundärkulturen wurden im Anhang in Tabelle 24 aufgelistet.

Eine Tendenz zu einer höheren Viabilität (den Ausreißer ausgenommen) ließ sich in der Ansatzreihe B erkennen (siehe Abbildung 25). Diese Tendenz konnte bereits in der Primärgeneration festgestellt werden (siehe Abbildung 18). Jedoch konnte auch hier aufgrund der geringen Fallzahl (N = 9 für die Ansatzreihe A und N = 7 (ohne Ausreißer) für die Ansatzreihe B) nicht von einer statistischen Signifikanz ausgegangen werden. Dies bestätigte sich bei der Berechnung des p-Wertes mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests, der ohne Berücksichtigung des Ausreißers 0,204 betrug.

Der Ausreißer im Diagramm stellte die Viabilität der Zellen der Kultur T 9181 B p2 dar. Sie betrug bei der Zellzählung 2,8 % (siehe Tabelle 24). Somit konnte man auf das Vorliegen überwiegend avitaler Zellen in der Kultur schließen. Bei der Kultur T 9181 B p2 handelte es sich um die bereits beschriebene Sekundärkultur, bei der sich die Zellen bei der Rekultivierung nicht am Boden festsetzten, sondern in Suspension verblieben.

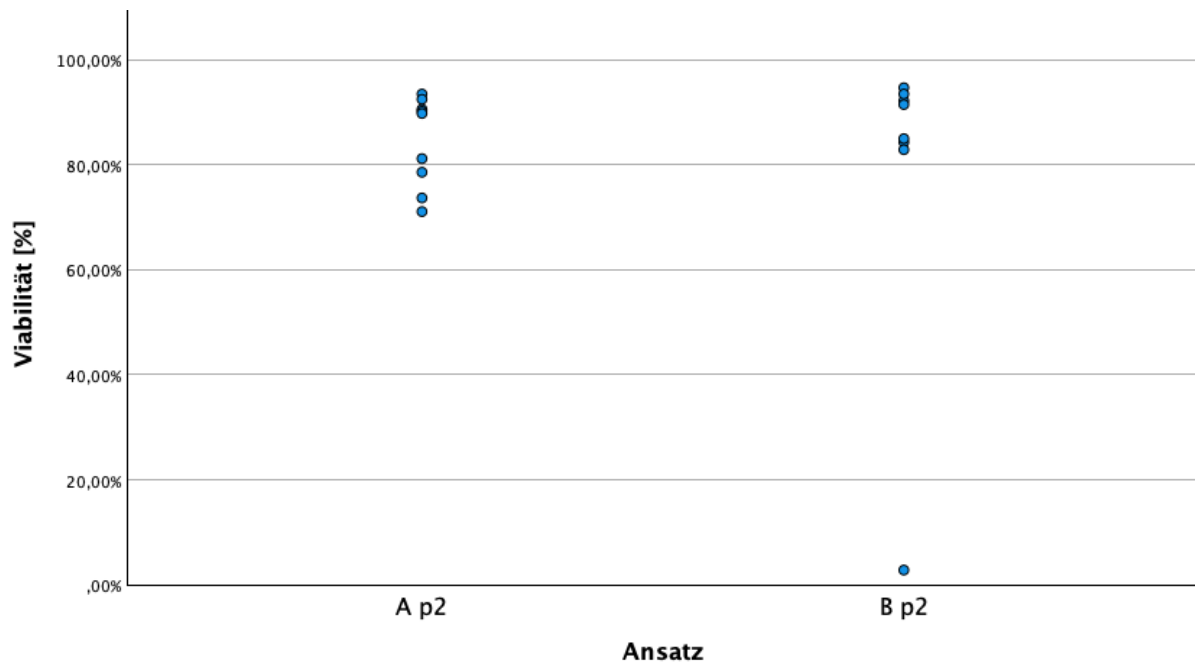


Abbildung 25: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p2 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

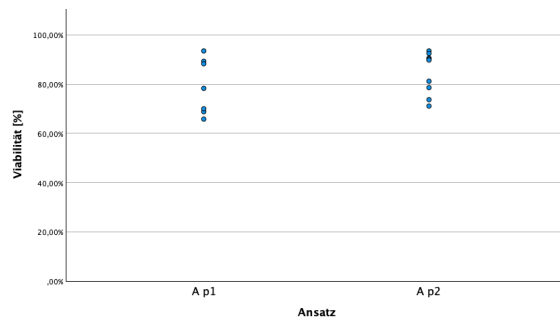
Die mittlere Viabilität aller Ansätze der Sekundärgeneration zusammen lag bei 81,65 % (N = 17, SD = 21,532 %). Die durchschnittliche Viabilität der Ansätze A betrug 84,58 % (N = 9, SD = 8,549 %) und die der Ansätze B 78,36 % (8, SD = 30,868 %) (siehe Tabelle 15). Der Mittelwert der Viabilität wurde unter Berücksichtigung des Ausreißers berechnet und musste daher auch unter Beachtung dessen interpretiert werden. Die unterschiedlichen Viabilitäten zwischen den Ansatzreihen zeigten auch unter Berücksichtigung des Ausreißers keine statistische Signifikanz ($p = 0,470$, Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 15: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen der Ansätze A und B p2 (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); N – Anzahl, Std. – Standard.

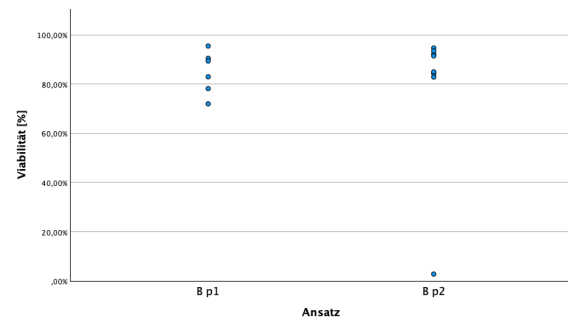
Ansatz	Mittelwert	N	Std.– Abweichung
A p2	84,5778%	9	8,54865%
B p2	78,3625%	8	30,86773%
Insgesamt	81,6529%	17	21,53190%

Analog den Wachstumsraten wurden in den folgenden Diagrammen die Viabilitäten der Generationen, getrennt nach den Ansätzen, vergleichend dargestellt. Man erkannte nicht nur innerhalb einer Generation eine Tendenz, sondern auch zwischen diesen. Die Zellen der Ansätze A der Passage 2 zeigten im Mittel eine höhere Viabilität (84,58 %) auf als die der Passage 1 (79,14 %) (siehe Abbildung 26 a, Tabelle 11 und 15). Statistisch signifikant war das Ergebnis aber nicht ($p = 0,168$, Mann-Whitney-U-Test). Genauso verhielt es sich bei den

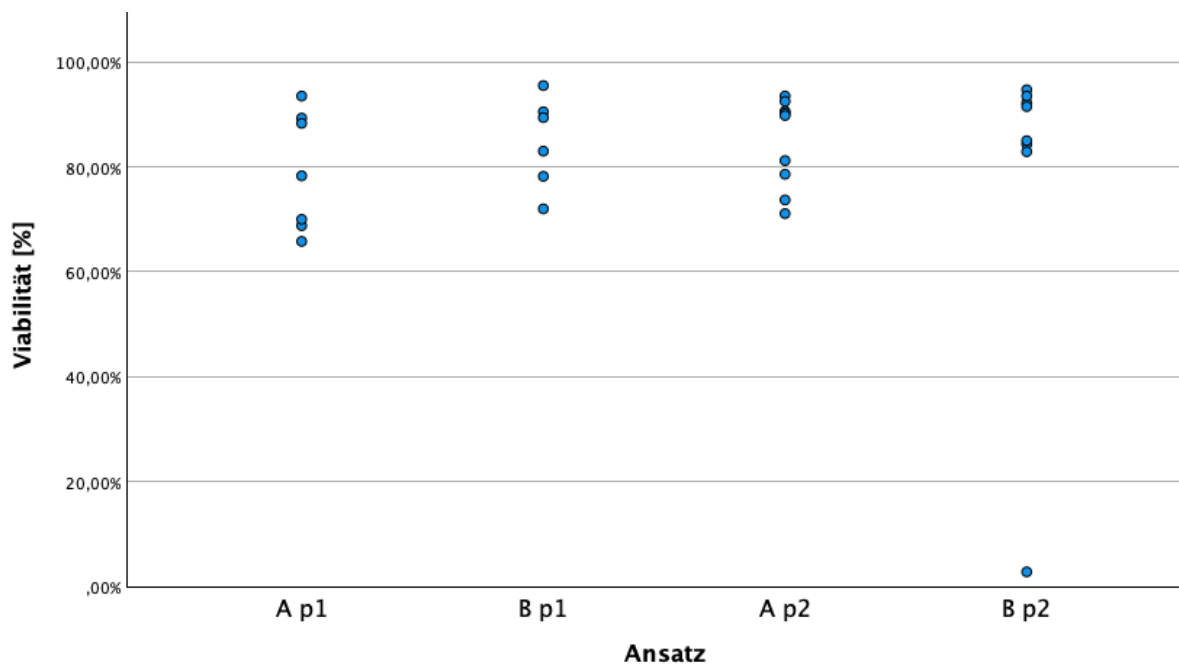
Zellen der Ansatzreihe B, wenn man den Ausreißer ungeachtet ließ (89,16 % (B p2 ohne Ausreißer), 84,77 % (B p1)) (siehe Abbildung 26 b, Tabelle 11). Von einer statistischen Signifikanz konnte aber auch hier nicht gesprochen werden, weder mit ($p = 0,606$, Mann-Whitney-U-Test) noch ohne Ausreißer ($p = 0,317$, Mann-Whitney-U-Test). Man konnte lediglich Tendenzen aus den Grafiken ablesen, denn auch der Vergleich zwischen allen Generationen und Ansätze ergab unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests keine Signifikanz ($p = 0,474$).



a Vergleich der Ansätze A p1 und A p2.



b Vergleich der Ansätze B p1 und B p2.



c Vergleich aller Ansätze und Generationen.

Abbildung 26 a-c: Vergleich der Viabilitäten der Zellkulturen (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

4.4 Wachstumsrate der Ansätze aus gefrorenem, nativem Gewebe

Das native Tumorgewebe, das für diese Ansätze verwendet wurde, wurde in Cryotubes bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank eingefroren. Von den 10 angesetzten Zellkulturen aus dem gefrorenen Gewebe wuchs keine an (0 %) (siehe Abbildung 27).

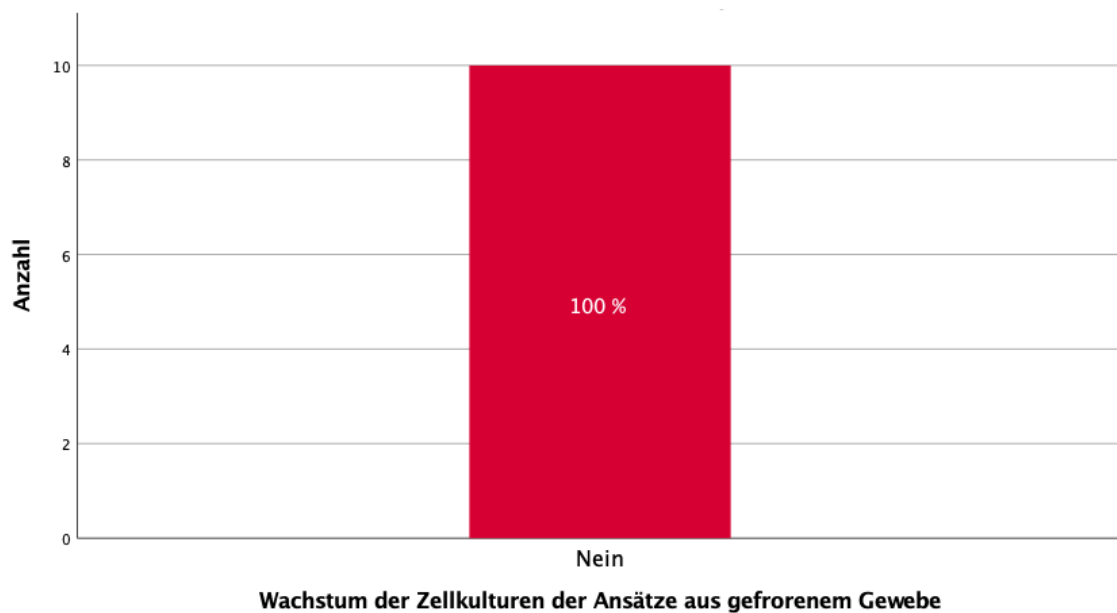


Abbildung 27: Wachstumsrate der Zellkulturen der Ansätze aus gefrorenem, nativem Gewebe (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

Die Zellkulturen, die aus gefrorenem Gewebe angesetzt wurden, zeigten alle kein Wachstum von Zellen (siehe 5.2).

Der Verlauf wurde anhand eines Beispiels (T 9077) demonstriert (siehe Abbildung 28). Hier konnte auch kein Wachstum von Einzelzellen festgestellt werden.

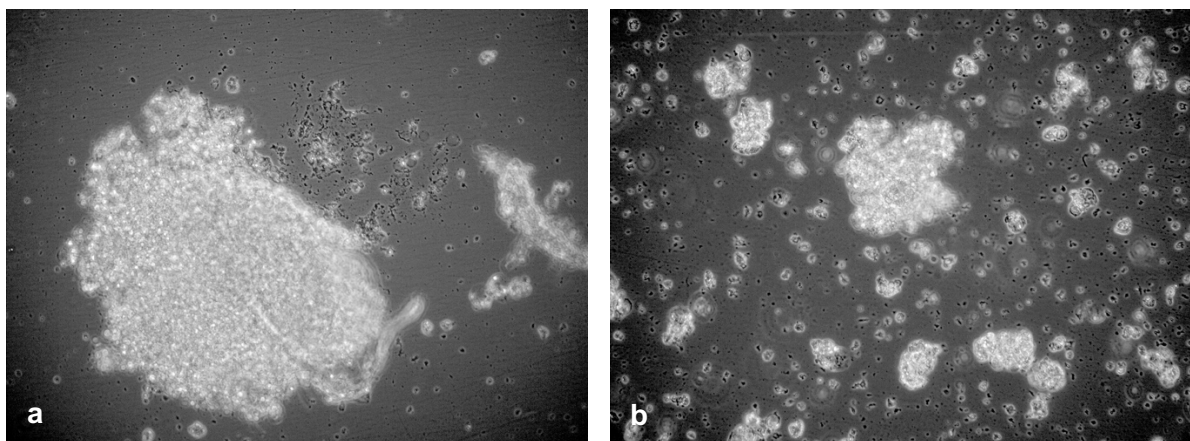


Abbildung 28 a-b: Beobachtung der Kultur T 9077 aus gefrorenem, nativem Gewebe im Verlauf: **a** Tag 1, **b** Tag 10 (eigene Darstellung mit dem 10x Objektiv).

Abschließend für den Ergebnisteil des Wachstumsverhaltens wurden die Anwachsrate aller Zellkulturansätze aller Generationen und die der Ansätze aus gefrorenem, avitalem Gewebe tabellarisch gegenübergestellt (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Vergleich der Wachstumsraten der Zellkulturen der Ansätze A p0, B p0, A p2, B p2 und gefrorenem, nativem Gewebe (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27).

		Wachstum der Zellkulturen		Gesamt
		Ja	Nein	
Zellkulturen	Ansatz A p0	9	1	10
	Ansatz B p0	8	2	10
	Ansatz aus gefrorenem Gewebe	0	10	10
	Ansatz A p2	9	0	9
	Ansatz B p2	7	1	8
Gesamt		33	14	47

4.5 Ergebnisse der Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung

Alle Ergebnisse der FISH im Überblick wurden in Tabellen im Anhang aufgeführt (siehe 7.3).

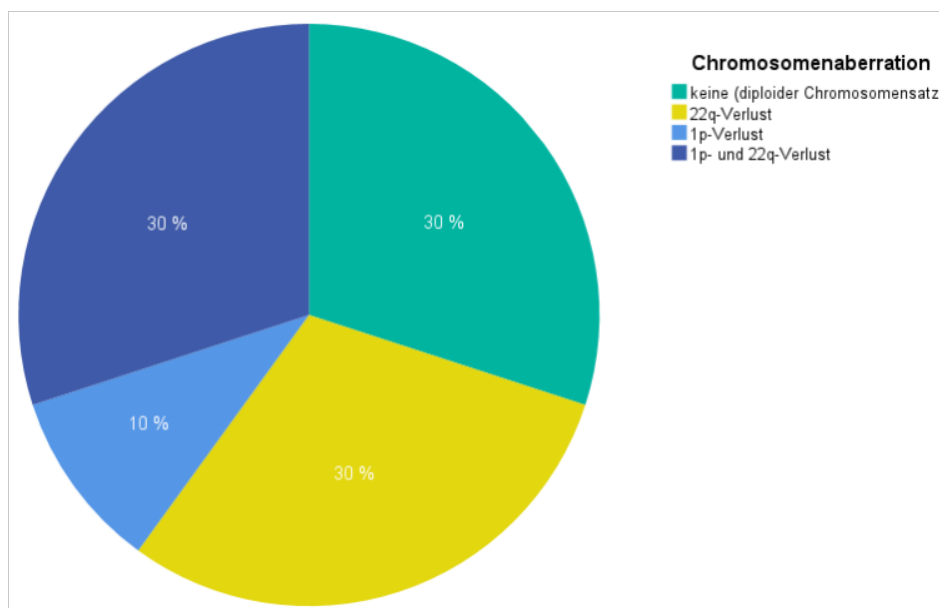


Abbildung 29: FISH-Ergebnisse (eigene Darstellung mithilfe von IBM SPSS Statistics, Version 27); 1p-Verlust – Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1, 22q-Verlust – Verlust des langen Armes von Chromosom 22, 1p- und 22q-Verlust – kombinierter Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 und des langen Armes von Chromosom 22.

Bei der Auswertung der FISH wiesen 3 der 10 Meningeome (30 %) keine Chromosomenaberration vor, 3 weitere (30 %) einen isolierten Verlust des langen Armes von Chromosom 22. Ein Meningeom (10 %) zeigte einen Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 und 3 (30 %) hatten einen kombinierten Verlust von 1p und 22q. Die FISH wurde an Tupfpräparaten (nativer Tumor) und den Tropfpräparaten (Zellkultur) der Passagen 1 und 2 durchgeführt (Beispiele in Abbildung 30).

Insgesamt entstanden im Rahmen dieser Promotionsarbeit 43 Präparate, von denen 2 keine valide Auswertung zuließen, weil zu wenige Zellen auf dem Objektträger waren (Tupfpräparat von T 9168 (siehe Abbildung 34 a und 7.3.3) und Tropfpräparat von T 9175 A p2 (siehe 7.3.2). Von jedem Meningeom konnte es maximal 5 OT geben, an denen die FISH durchgeführt wurde: ein Tupfpräparat, je ein Tropfpräparat der Ansätze A und B der Passage 1 und je ein Tropfpräparat der Ansätze A und B der Passage 2. Alle Präparate eines Meningeoms zeigten das gleiche Ergebnis [31].

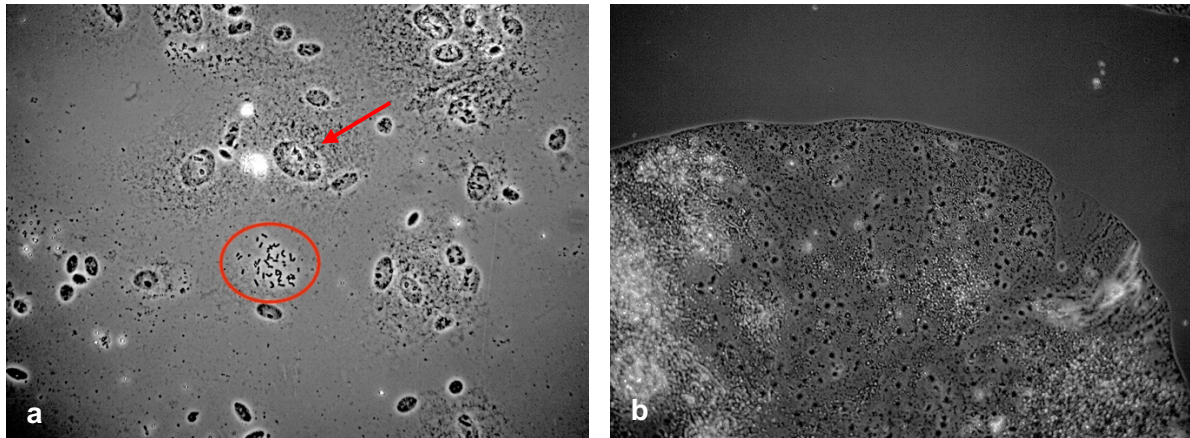


Abbildung 30 a-b: Beispiele für Tropf- und Tupfpräparate: **a** Tropfpräparat **T 9152 B p1** (20x Objektiv), **b** Tupfpräparat **T 9181** (10x Objektiv) (eigene Darstellung).

Neben den Zellen (siehe roter Pfeil) erkannte man unter dem Mikroskop Chromosomen (siehe Abbildung 30 a rote Umrandung), die durch das Aufplatzen der Zelle beim Auftreffen auf den OT aus dem Zellkern freigesetzt wurden.

Rechts daneben wurde als Ausschnitt eines OT des Tupfpräparates T 9181 ein Randbereich der betupften Stelle dargestellt.

Die Kriterien der Auswertung für die FISH nach Hopman et al. [18] wurden bereits erläutert (siehe 3.2.4.7), daher wurden im Folgenden nur noch einige Bilder der FISH von Tropfpräparaten der verschiedenen Generationen und Tupfpräparaten gezeigt.

Die Prozentangaben in Klammern im folgenden Abschnitt (4.5.1) wurden auf die zweite Nachkommastelle gerundet.

4.5.1 Tropfpräparate der Primäransätze (p1-Ansätze)

Aus den Primäransätzen der Zellkulturen ergaben sich 17 Tropfpräparate. 9 Präparate aus den Ansätzen A und 8 aus den Ansätzen B. Der Ansatz B des Tumors 9145 sowie beide Ansätze des Tumors 9168 zeigten kein Wachstum. Die Auswertungen ergaben für die beiden Präparate A und B eines Tumors immer das gleiche Ergebnis. Keinen chromosomalen Verlust

zeigten 6 der 17 (35,29 %) Tropfpräparate. Das hieß, dass 3 Präparate der Ansätze A und 3 der Ansätze B dieses Ergebnis zeigten. Einen diploiden Chromosomensatz wiesen 3 Meningeome vor. Ebenfalls 6 Präparate (35,29 %) wiesen einen 22q-Verlust vor (3 Meningeome). Einen isolierten 1p-Verlust zeigten 2 Präparate (11,77 %). Bei 3 Präparaten (17,65 %) ergab die Auswertung einen kombinierten 1p- und 22q-Verlust.

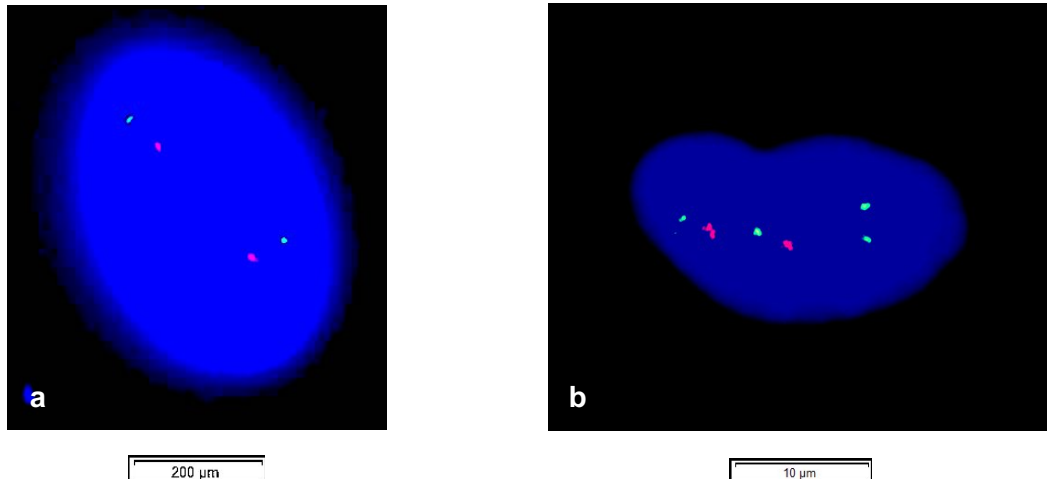


Abbildung 31 a-b: FISH-Aufnahmen (100x Objektiv): rot: 1p36, grün: 22q11 (eigene Darstellung); **a T 9152 B p1:** Man erkannte einen Zellkern, der 2 rote und 2 grüne Sondersignale aufwies. Die Chromosomen 1 und 22 lagen demnach jeweils zweimal vor. Es war davon auszugehen, dass in dieser Zelle ein diploider Chromosomensatz vorlag. Diese Chromosomenkonstellation zeigten 96,5 % der 200 ausgezählten Zellkerne dieses Präparates (siehe 7.3.1). Zudem wurde kein Cut-off-Wert überschritten, der für einen (Teil-)Verlust eines Chromosoms gesprochen hätte. Demzufolge wies das Meningeom T 9152 in der FISH keinen chromosomalen Verlust auf. **b T 9194 A p1:** Der abgebildete Zellkern des Tropfpräparates T 9194 A p1 zeigte 2 rote und 4 grüne Signale auf. Vermutlich lag hier eine Tetraploidie bezüglich des Chromosoms 22 und eine Deletion von Chromosom 1 vor. Von den 200 ausgezählten Zellen zeigten nur 1 % diese Signalkonstellation. Aber in 43,5 % der Zellkerne zählte man 1 rotes Signal und 2 grüne, was eine deutliche Überschreitung des Cut-off-Wertes von 4 % darstellte und damit für einen Verlust von 1p36 in diesem Meningeom sprach (siehe 7.3.1).

4.5.2 Tropfpräparate der Sekundäransätze (p2-Ansätze)

Aus den Sekundäransätzen der Zellkulturen ergaben sich 16 Tropfpräparate, 9 Präparate aus den Ansätzen A und 7 aus den Ansätzen B. Die Auswertungen ergaben auch hier für die beiden Präparate A und B eines Tumors immer das gleiche Ergebnis. Keinen chromosomalen Verlust zeigten 6 der 16 (37,5 %) Tropfpräparate. Einen diploiden Chromosomensatz wiesen 3 Meningeome vor. Ebenfalls 6 Präparate (37,5 %) wiesen einen 22q-Verlust vor, (3 Meningeome). Einen isolierten 1p-Verlust zeigten 2 Präparate (12,5 %), daraus ergab sich 1 Meningeom mit 1p-. Bei 2 Präparaten (12,5 %) ergab die Auswertung einen kombinierten 1p- und 22q-Verlust. Dies betraf 2 Meningeome.

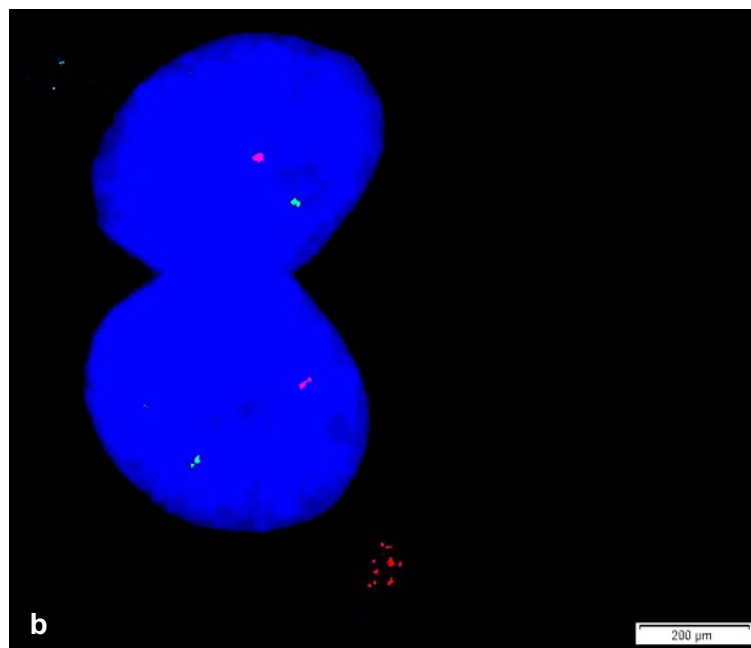
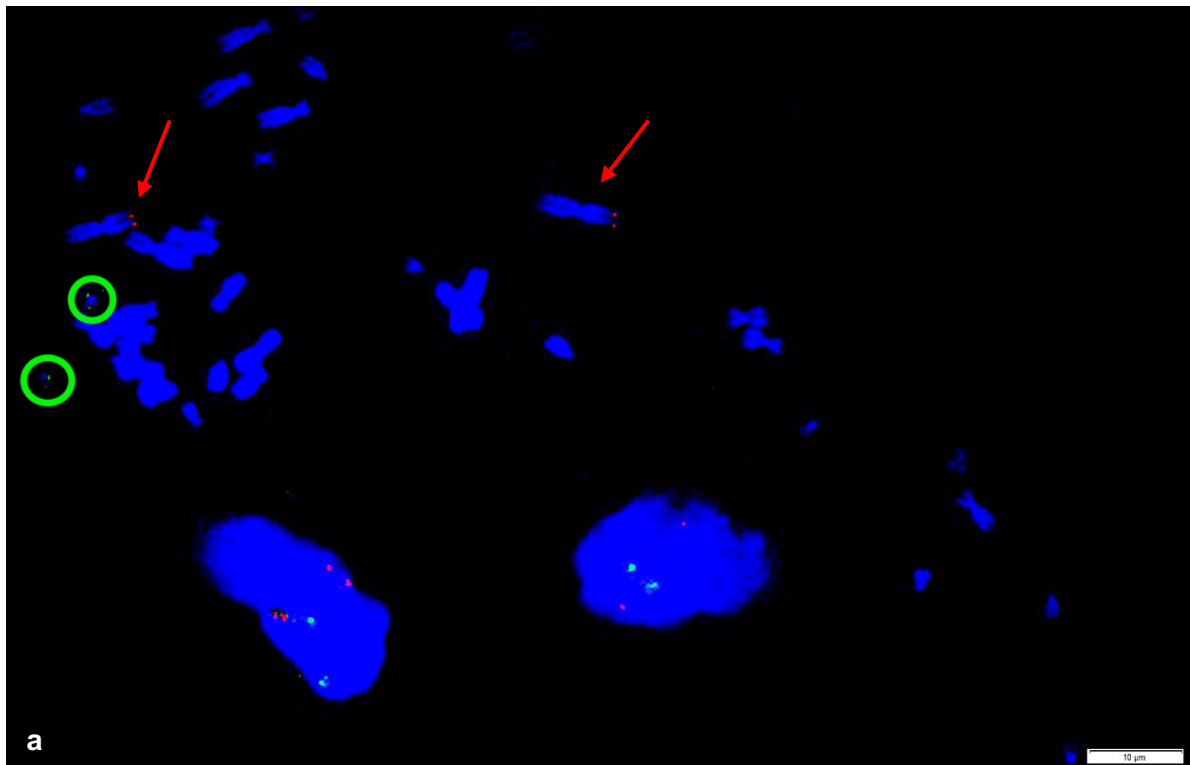


Abbildung 32 a-b: FISH-Aufnahmen (100x Objektiv): rot: 1p36, grün: 22q11 (eigene Darstellung); **a T 9152 A p2:** Man erkannte freigesetzte Metaphase-Chromosomen, bei denen man die Bindung der Sonde 1p36 an den kurzen Arm des Chromosoms 1 sehr deutlich sah (siehe rote Pfeile). Das Chromosom 22 ist deutlich kleiner als das Chromosom 1, sodass die Sondenhybridisierung auf dem Bild schwerer zu sehen war (siehe grüne Kreise). Dennoch erkannte man das Vorliegen einer Diploidie bezüglich beider betrachteten Chromosomen. **b T 9181 A p2:** Am ehesten sah man eine sich teilende Zelle mit je einem roten und einem grünen Signal in jeder Tochterzelle. In diesem Tropfpräparat zeigten 73 % der 200 Zellen die Signalkonstellation 1/1, wodurch eine Überschreitung des Cut-off-Wertes vorlag und ein Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 und des langen Armes von Chromosom 22 angenommen werden musste (siehe 7.3.2).

4.5.3 Tupfpräparate aus gefrorenem, nativem Gewebe

Die Aufnahmen der Tupfpräparate stammten aus den Randbereichen der betupften Bereiche des OT.

Es wurde von allen 10 Meningeomen jeweils 1 Tupfpräparat angefertigt. Keinen chromosomalen Verlust zeigten 3 Präparate (30 %), weitere 3 Präparate (30 %) einen 22q-Verlust. Einen isolierten 1p-Verlust wies 1 Tupfpräparat (10 %) vor. Einen kombinierten Verlust von 1p und 22q ergab die Auswertung von 3 Tupfpräparaten.

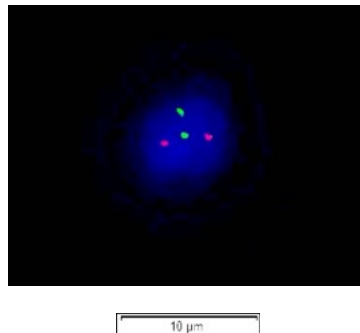


Abbildung 33: FISH-Aufnahme (100x Objektiv): rot: 1p36, grün: 22q11 (eigene Darstellung); Tupfpräparat **T 9108**: Unter dem Mikroskop erkannte man einen Zellkern mit 2 roten und 2 grünen Signalen. Dies deutete wieder auf einen diploiden Chromosomensatz in dieser Zelle hin. Insgesamt wiesen 37,5 % der ausgezählten Zellen dieses Tupfpräparates dieses Ergebnis auf. Mit 61,5 % stellte die Signalkonstellation 2/1 (rot/grün) den häufigsten Befund dar und lag über dem Cut-off-Wert von 2 %, ab dem man von einem Verlust von 22q11 sprechen konnte (siehe 7.3.3).

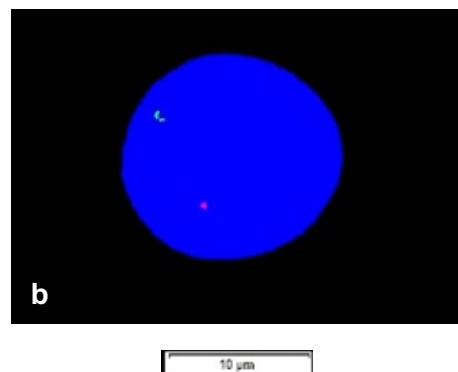
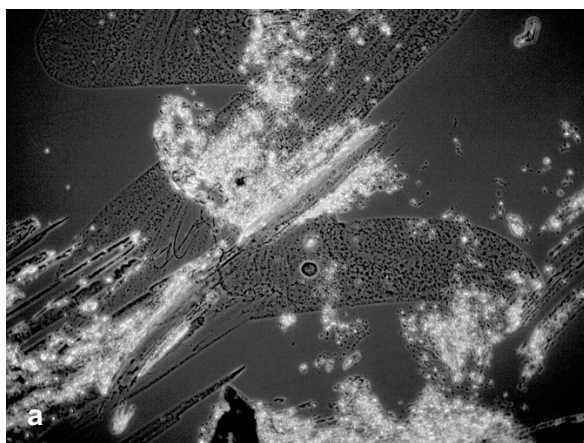


Abbildung 34 a-b: **a** Tupfpräparat **T 9168** (10x Objektiv), **b** FISH-Aufnahme (100x Objektiv): rot: 1p36, grün: 22q11 (eigene Darstellung); Links wurde das Tupfpräparat T 9168 unter dem Lichtmikroskop abgebildet. Man erkannte hier viel Gewebe, aber nur eine Zelle mittig im Bild. Die Zelldichte in diesem Präparat war gering, sodass nach Durchführung der FISH lediglich 50 Zellen ausgezählt werden konnten, die keine valide Interpretation bezüglich einer chromosomalen Aberration in diesem Meningeom zuließen (siehe 7.3.3). Im zugehörigen FISH-Bild rechts erkannte man einen Zellkern, in dem ein rotes und ein grünes Signal aufleuchteten. Dies sprach in dieser Zelle für einen Verlust von 1p36 und 22q11.

4.5.4 Sonderfall T 9181

Das Meningeom des Patienten Nr. 9 wies eine starke Heterogenität zwischen den angefertigten Präparaten auf.

Tabelle 17: Gegenüberstellung des Anteils der Zellen mit kombiniertem Verlust von 1p und 22q (1p- und 22q-) an der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen (hier bei allen Präparaten 200 Zellen) von T 9181 A und B p1 sowie des Tupfpräparates.

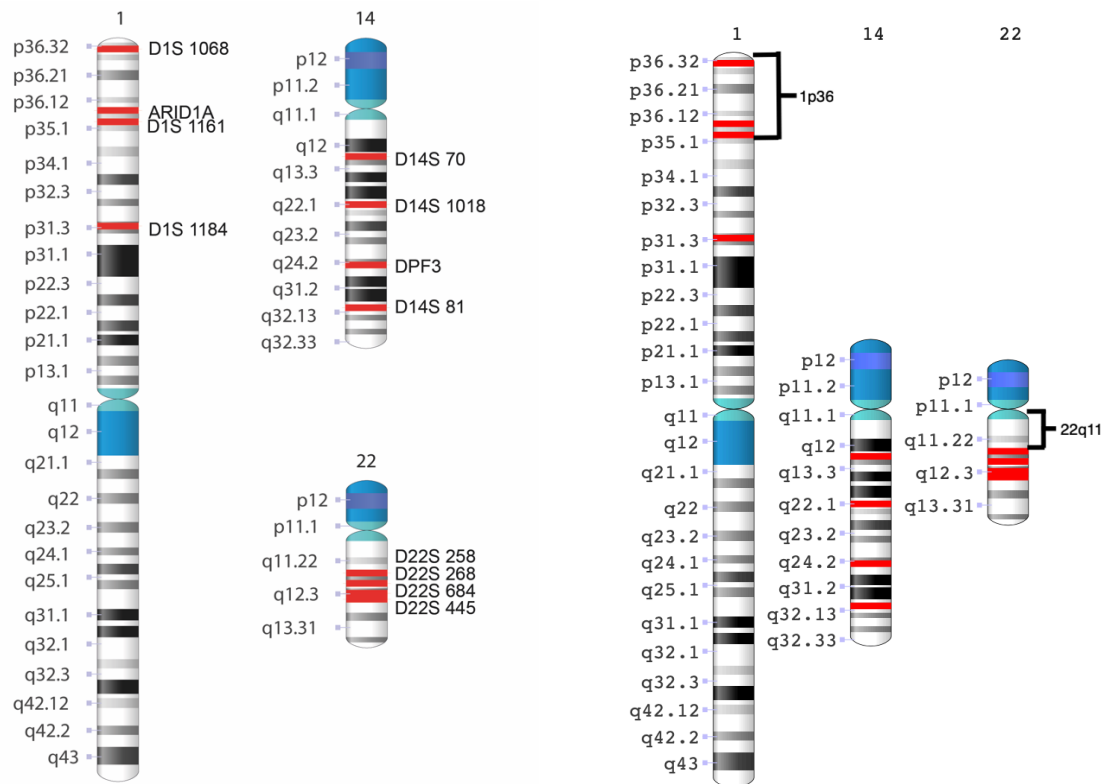
	T 9181 A p1	T 9181 B p1	T 9181 Tupfpräparat
1/1 (1p36/22q11)	74,5 %	30 %	89 %

So zeigte das Gewebestück, das für die Anfertigung des Tupfpräparates verwendet wurde, einen starken 1p- und 22q-Verlust von 89 %, was sich in etwa mit dem Befund des Tropfpräparates T 9181 A p1 deckte (74,5 %). Im Gewebestück, das für den Ansatz B der Primärkultur verwendet wurde, konnte mit der FISH nur ein deutlich geringerer Verlust an 1p und 22q (30 %) detektiert werden (siehe Tabelle 17). Bei den Sekundärkulturen konnte dieser Unterschied nicht mehr beobachtet werden, weil die Kultur T 9181 B p2 nicht rekultivierbar war.

4.6 Ergebnisse der Loss-of-Heterozygosity-Analyse (LOH-Analyse)

Die Ergebnisse der LOH-Analyse wurden freundlicherweise vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes für diese Arbeit bereitgestellt. Die Angabe der molekularzytogenetischen Befunde (siehe Tabelle 3 und Abbildung 10) entstammte den Ergebnissen der LOH-Analyse.

Die Durchführung und Auswertung der LOH wurde bereits beschrieben (siehe 3.2.5). Für die FISH wurde eine Kombinationssonde (1p36/22q11) verwendet, deren Fluorochrome in den Regionen 1p36 bzw. 22q11 banden. Über eine Aberration des Chromosomensatzes hinsichtlich Chromosom 14 konnte bei dieser Methode keine Aussage getroffen werden, da keine entsprechende Sonde eingesetzt wurde (siehe Abbildung 35 b). Für das Chromosom 22 erkannte man, dass die verwendete Sonde näher am Zentromer band als die Sonden, die für die LOH-Analyse verwendet wurden.



a Verwendete Sonden für die LOH-Analyse. **b** Verwendete Sonden für die FISH.

Abbildung 35 a-b: Übersicht über die verwendeten Sonden für die verschiedenen Methoden (Abbildungen freundlicherweise bereitgestellt durch das Institut für Neuropathologie, erstellt mithilfe der Genom Decoration Page [42], modifiziert).

In der folgenden Tabelle wurden die Ergebnisse der LOH aufgelistet.

Tabelle 18: Ergebnisse der LOH-Analyse; T-Nr. – Tumornummer, LOH – Loss of Heterozygosity.

T-Nr.	Ergebnis der LOH-Analyse
T 9077	Diploider Chromosomensatz
T 9092	Diploider Chromosomensatz
T 9108	14q-, 22q-
T 9145	1p-, 22q-
T 9152	Diploider Chromosomensatz
T 9168	1p-, 22q-
T 9175	22q-
T 9177	Diploider Chromosomensatz
T 9181	1p-, 22q-
T 9194	1p-

Die Auswertung der FISH und die Ergebnisse der LOH-Analyse lieferten bei 8 Meningeomen identische Resultate. T 9108 zeigte in der FISH einen 22q-Verlust und in der LOH-Analyse einen kombinierten 14q- und 22q-Verlust. Aufgrund der Sondenauswahl für die FISH konnte keine Aussage über den Verlust von 14q getroffen werden, sodass bei diesem Tumor nicht von einer Divergenz gesprochen werden konnte. T 9177 zeigte divergente Ergebnisse. Der Tumor wies in der LOH-Analyse einen diploiden Chromosomensatz vor. Dahingegen konnte in der FISH sowohl in den Tropfpräparaten p1 und p2 als auch im Tupfpräparat ein deutlicher Verlust des langen Armes von Chromosom 22 festgestellt werden (siehe 7.3, siehe Abbildungen 10 und 29).

Abschließend wurden im Ergebnisteil im Folgenden beispielhaft die Ergebnisse zweier LOH-Analysen dargestellt.

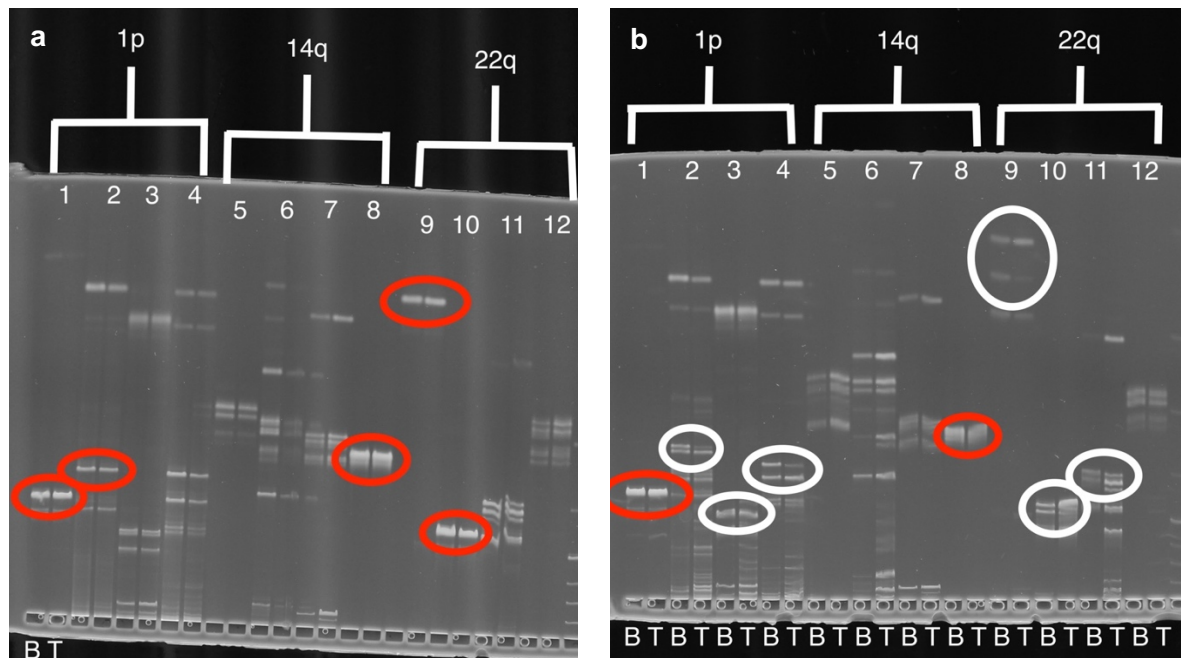


Abbildung 36 a-b: Bandenmuster der LOH-Analyse (modifizierte Aufnahme des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes). Die Zahlen 1-12 standen jeweils für eine Sonde, die zur Hybridisierung verwendet wurde. Links befand sich immer die Blutprobe (B), die als Kontrolle diente und rechts die damit zu vergleichende Tumorprobe (T).
Spur – Sonde: 1 – D1S 1608, 2 – ARID1A, 3 – D1S 1161, 4 – D1S 1184, 5 – D14S 81, 6 – D14S DPF3, 7 – D14S 1018, 8 – D14S 70, 9 – D22S 445, 10 – D22S 684, 11 – D22S 268, 12 – D22S 258; **a T 9177:** In den Spuren 1, 2, 9 und 10 wurden Doppelbanden rot umrandet, die auf eine Homozygotie hinwiesen und damit keine Aussage über einen LOH bezüglich dieser Sonden zuließen. In Spur 8 zeigte sich ein nicht eindeutig auswertbares Bandenmuster (ebenfalls rot umrandet). In allen anderen Spuren waren 2 Banden zu sehen und es lag kein LOH vor.
b T 9181: In Spur 1 wurde eine Doppelbande rot umrandet, die auf eine Homozygotie hinwies und damit keine Aussage über einen LOH bezüglich dieser Sonde zuließ. Auch hier zeigte sich in Spur 8 ein nicht eindeutig auswertbares Bandenmuster (rot umrandet). In den Spuren 5-7 fand man 2 Banden vor, sodass bezüglich Chromosom 14 kein Verlust vorlag. Eine Abschwächung einer Bande in der Tumorspur im Vergleich zur Blutspur erkannte man in den Spuren 2-4 und 9-11 (weiß umrandet). Daraus ließ sich ableiten, dass sowohl bezüglich Chromosom 1 als auch Chromosom 22 ein Loss of Heterozygosity im Tumor vorzuliegen schien.

5 Diskussion

In dieser Dissertation wurde Meningeomgewebe gezielt verschiedenen Bedingungen ausgesetzt, bevor daraus Zellkulturen angesetzt wurden. Dabei stand vor allem die zeitliche Varianz bis zur Weiterverarbeitung des Gewebes im Vordergrund. Primär wurde das Wachstumsverhalten der Meningeomzellen auf Änderungen hin beobachtet, wenn man das Gewebe für einen Zellkulturansatz erst nach 24 Stunden Aufbewahrung in Nährlösung im Kühlschrank verarbeitete und nicht am Tag der Operation, wie es bei den Vergleichszellkulturen der Fall war. Zudem wurde das Wachstumsmuster von Sekundärkulturen beobachtet, nachdem man die Primärkulturen für 6-7 Monate eingefroren und anschließend wieder aufgetaut hatte. Zum Vergleich wurden auch Zellkulturen aus nativem, gefrorenem Gewebe auf Wachstum untersucht.

Die FISH wurde zur Detektion von Chromosomenaberrationen in den Meningeomzellen eingesetzt. Die Ergebnisse der verschiedenen Tropf- und Tupfpräparate wurden mit den neuropathologischen Ergebnissen der Loss-of-Heterozygosity-Analyse (LOH-Analyse) verglichen. Dadurch konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob das native Tumorgewebe durch die Zellkultur valide repräsentiert wurde [31].

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten aus dem Patientenkollektiv wurden im Folgenden hinsichtlich Geschlechterverteilung, Alter, WHO-Grad des Meningeoms und vorliegenden Chromosomenaberrationen im Chromosomensatz des Tumors mit bereits publizierten Werten verglichen. Die Ergebnisse der Wachstumsraten der Meningeome in der Zellkultur wurden anhand der Gewebezusammensetzung und im Hinblick auf die Zelldichte mithilfe der Bildaufnahmen interpretiert. Weiterhin wurden die FISH-Ergebnisse mit den Ergebnissen der LOH-Analyse der Neuropathologie verglichen und etwaige Abweichungen diskutiert. Darüber hinaus wurde ein Patient mit 2 Meningeomen in der HSG als Sonderfall im Detail betrachtet. Abschließend erfolgte ein Ausblick.

5.1 Daten aus dem Patientenkollektiv

Das Verhältnis von Frauen zu Männern lag in diesem Kollektiv bei 2:1, was sich in etwa mit den Angaben in der Literatur deckte [7,48]. Das mittlere Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 75 Jahre (siehe Tabelle 6 a). Dieses Alter lag deutlich über den beschriebenen Zahlen in der Literatur (zum Beispiel 63 Jahre [17]). Ein Grund dafür könnte die kleine Fallzahl ($N = 10$) der Dissertation sein. Bei 80 % der in dieser Arbeit eingeschlossenen Meningeome wurde WHO-Grad I und bei 20 % Grad II diagnostiziert (siehe Abbildung 9). Ein malignes Meningeom lag bei keinem der Patienten vor. Vergleichbare Daten

waren in der Literatur zu finden. Im Patientenkollektiv von Hollecze et al. lagen 70 % benigne (WHO-Grad I), 28 % atypische (WHO-Grad II) und 3 % maligne Meningeome (WHO-Grad III) vor [17]. Die häufigste Chromosomenaberration, die in den Meningeomen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, war der Verlust von 22q, gefolgt vom Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 und abschließend dem Verlust von 14q (siehe Abbildung 10 und 29). Diese Verteilung wurde durch andere Publikationen bestätigt [44,47]. 1967 wurde erstmalig der Verlust eines Chromosoms aus der Gruppe G als gemeinsamer Verlust der in der Arbeit verwendeten Meningeome beschrieben [49]. Dieses Chromosom der Gruppe G wurde 1972 als Chromosom 22q identifiziert [51]. Seitdem fand man heraus, dass 50-70 % aller sporadischen Meningeome einen LOH bezüglich Chromosom 22 aufweisen [44]. Insgesamt war das Patientenkollektiv, bis auf das mediane Alter der Patienten, als repräsentativ, hinsichtlich der bereits publizierten Daten zu Meningeomen, zu werten.

5.2 Diskussion der Wachstumsraten

In der Primärgeneration lag in der Ansatzreihe A eine Anwachsrate von 90 % vor. Die Ansatzreihe B zeigte in 80 % der Kulturen ein ausreichendes Wachstum. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant. Man konnte schlussfolgern, dass das 24-Stunden-Intervall bis zum Ansatz der Kulturen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hatte [31]. Es ist daher nicht notwendig, das Gewebe direkt nach Entnahme weiterzuverarbeiten. Es kann im Kühlschrank aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt bearbeitet werden.

In der Sekundärgeneration wuchsen von der Ansatzreihe A alle kryokonservierten Zellkulturen an (100 %). Von den 8 eingefrorenen B-Zellkulturen waren 7 rekultivierbar. Daraus ergab sich eine Anwachsrate von 87,5 % (siehe Abbildung 24 c). Die Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff stellte somit für den von uns betrachteten Zeitraum von 6-7 Monaten eine gute Möglichkeit dar, um die Zellen vital und damit vermehrungsfähig zu erhalten. Dabei wurde aber die Frage aufgeworfen, wie lange Meningeomzellen in flüssigem Stickstoff vital und vermehrungsfähig bleiben. Diese Fragestellung wurde bereits an mesenchymalen Zellen untersucht. Sugimoto et al. untersuchten unter anderem die Zellzahl, die Viabilität, die Differenzierungsfähigkeit und die Alterung an mesenchymalen Stromazellen, die aus dem Beckenknochen von Kindern gewonnen wurden. Diese Zellen wurden für eine Zeitspanne von 1-20 Jahren kryokonserviert. Es zeigte sich, dass auch nach 20 Jahren noch eine Zellvermehrung stattfand. Die Viabilität der Zellen verhielt sich umgekehrt proportional zur Anzahl der kryokonservierten Jahre. Je länger die Zellen eingefroren waren, desto weniger vitale Zellen wurden in der Sekundärkultur gemessen. Um eine mögliche Alterung der Zellen festzustellen, wurden sie auf eine Ablagerung von Seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase hin untersucht. Alle Zellen, die 5 Jahre oder länger eingefroren waren, zeigten eine Ablagerung. Das Ausmaß dieser war jedoch unabhängig von der Anzahl der Jahre. Dies führte

zur Schlussfolgerung, dass die Kryokonservierung die Alterung der Zellen nicht beschleunigte. Darüber hinaus behielten die Zellen ihre Differenzierungsfähigkeit [43].

Ein Vergleich der Anwachsrate zwischen den beiden Generationen war aufgrund der verschiedenen Ausgangslagen nicht möglich. Die Zellkulturen der Primärgeneration wurden aus nativem Gewebe angesetzt, aus dem die Zellen erst auswachsen mussten und dann nach ausreichender Vermehrung noch gesplittet wurden. Dahingegen wurden die Sekundärkulturen aus aufgetauten Zellen angesetzt, die sich nur vermehren mussten und nicht mehr gesplittet wurden. Das Auswachsen der Zellen aus dem Gewebe mit anschließender Vermehrung und Splitting (p0/p1) dauerte länger als die reine Vermehrung der bereits vorhandenen Zellen (p2). Somit ließ sich erklären, weshalb die Zellkulturen der Primärgeneration im Durchschnitt erst nach 11,94 Tagen zum Abbruch für die FISH bereit waren und die der Sekundärkulturen bereits nach 7,94 Tagen (siehe Tabelle 14 b).

Bereits 1928 wurden Meningeomzellen kultiviert. Die Erfolgsrate lag in der Studie von Kredel bei 60 % [25]. Die Kultivierung im Rahmen der Dissertation zeigte deutlich bessere Ergebnisse. Diese sind auch auf die jahrelange Erfahrung der Experimentellen Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes mit der erfolgreichen Kultivierung von Meningeomzellen zurückzuführen.

Anhand der Dokumentation ließ sich rückblickend ein Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit des Tumormaterials bei der Präparation für den Ansatz und dem Wachstumsverhalten herstellen. Die Zellkulturen, die ein Wachstum zeigten, basierten auf einem Gewebestück, das überwiegend weiche Anteile besaß und sich gut zerschneiden ließ. Nekrotische Anteile durch intraoperative Koagulation und Blutbeimengungen gab es auch bei diesen Tumoren, stellten aber nicht den Hauptbestandteil des Probenmaterials dar.

Die Zellkulturen, bei denen kein Wachstum erfolgte, wurden im folgenden Abschnitt genauer hinsichtlich ihrer Ursprungsgewebe beschrieben.

Das abgetrennte Gewebestück für die Zellkultur T 9145 B, das über Nacht in Nährmedium im Kühlschrank gelagert wurde, war derber und schlechter zu schneiden als das Gewebestück für den Ansatz A. Der größte Teil des Meningeomgewebes setzte sich nicht am Boden ab (siehe Abbildung 16 a) und zeigte auch kein Zellwachstum. Ab Tag 5 lösten sich die wenigen festgesetzten Stücke wieder vom Boden ab und schwammen im Nährmedium. Am Tag 10 wurde die Zellkultur dann verworfen (siehe Abbildung 16 b).

Die derben, harten und faserigen Anteile des Gewebes des Tumors 9168, das zum Ansatz der Zellkultur zur Verfügung stand, boten einen Erklärungsansatz für das nicht erfolgte Wachstum in den Kulturen. Die Gewebeprobe für die Zellkultur T 9168 A war sehr blutig und nekrotisch. Man erkannte unter dem Mikroskop viel Zellsuspension in der Zellkulturflasche, wobei diese

unter anderem aus Erythrozyten bestand (siehe Abbildung 14 a). Das Gewebe war derb und faserig und ließ sich schlecht schneiden. In diesem Fall hatte das Material auch viele weißliche Anteile, bei denen es sich um Duragewebe handelte. Nach 10 Tagen ergab sich das in Abbildung 14 b dargestellte Bild in der Zellkultur. Das Gewebe hatte sich zum größten Teil wieder vom Boden gelöst und lag in Suspension vor (mit roten Sternen markiert). Unter der Zellsuspension konnte man an wenigen Stellen in der Kulturflasche vereinzelt Zellen sehen (mit rotem Pfeil markiert). Wie in der Zellkulturflasche T 9168 A erkannte man auch bei T 9168 B viele Erythrozyten in Zellsuspension aufgrund größerer Blutbeimengungen im Tumormaterial (siehe Abbildung 16 c). Das Gewebe hatte sich an Tag 1 bereits festgesetzt, zeigte aber kein Zellwachstum. An Tag 10 lag der größte Teil der Gewebestücke in Suspension vor. Einen weiteren Erklärungsansatz bot die Bildaufnahme des Tupfpräparates (siehe Abbildung 34 a). Im Vergleich zu den anderen Tupfpräparaten konnten bei diesem Meningeom nur 50 Zellen bei der Auswertung der FISH ausgezählt werden (siehe 7.3.3). Dies wies darauf hin, dass im verwendeten Tumormaterial nur wenige vitale Zellen enthalten waren. Anhand des Vergleiches der Bilder der Tupfpräparate T 9168 und T 9181 (siehe Abbildung 34 a und 30 b) ließ sich dies in Ansätzen nachvollziehen.

Das ohne DMSO eingefrorene, native Gewebe zeigte beim Ansatz kein Zellwachstum. An Tag 1, 24 Stunden nach dem Ansatz, konnte in allen Zellkulturflaschen überwiegend Zellsuspension beobachtet werden. Nach und nach setzten sich die Gewebestücke auf dem Boden der Kulturflasche ab. Ein Auswachsen von Zellen konnte aber im Gegensatz zu den Ansätzen A und B nicht festgestellt werden. Bereits nach wenigen Tagen löste sich das Gewebe wieder vom Untergrund ab, sodass erneut hauptsächlich Zellsuspension in der Zellkulturflasche vorzufinden war. Die Zellen wurden durch die Kälte bis zur Avitalität geschädigt, sodass sie nicht mehr lebensfähig waren [31].

5.3 Diskussion der FISH-Ergebnisse

Bei der Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop sollten 200 Zellen gezählt werden, um ein valides Ergebnis zu erhalten. Dabei wurden zudem die Kriterien von Hopman et al. berücksichtigt (siehe 3.2.4.7) [18]. Dies war bei der Auswertung der Tupfpräparate besonders wichtig. Im nativen Tumorgewebe war die Zelldichte oft so hoch, dass nicht alle Zellen des Tupfpräparates mit der Sonde hybridisiert wurden. Vor allem in der Mitte des betupften Gebietes lagen viele Zellen übereinander und erschwerten die Auswertung. Daher wurden bei der Auswertung der Tupfpräparate eher Zellen ausgezählt, die in den Randbereichen lagen und eine eindeutige Abgrenzung zueinander ermöglichten (siehe Abbildung 30 b).

Die Auswertungen von T 9175 A p2 und des Tupfpräparates von T 9168 konnten aufgrund einer zu geringen Zellzahl nicht als valide angesehen werden (siehe 7.3.2. und 7.3.3).

Trotz der überwiegend übereinstimmenden Ergebnisse der neuropathologischen Befunde und der FISH-Auswertung gab es bei 2 Tumoren abweichende Ergebnisse. Diese waren durch die unterschiedlich verwendeten Methoden zur Bestimmung des histopathologischen Befundes der Tumorzellen entstanden. Während das Institut für Neuropathologie eine PCR-basierte Mikrosatelliten-Analyse zur LOH-Analyse verwendete, wurde in der experimentellen Neurochirurgie die FISH durchgeführt. Beim erstgenannten Verfahren erfolgte eine DNA-Extraktion aus dem, durch die Neurochirurgie, bereitgestellten Tumorgewebe mit anschließender PCR nach Zugabe der Primer für die jeweiligen Mikrosatelliten. Die Auftrennung der PCR-Produkte fand mittels Gel-Elektrophorese statt. Die Tumorbanden wurden mit Blutbanden der Patienten verglichen [4]. Für die FISH wurde ein anderes Stück des Tumorgewebes zum Zellkulturansatz genutzt. Hierbei wurden die Chromosomen der aus dem Gewebe ausgewachsenen Zellen der Methode unterzogen.

Ansätze für eine Erklärung der Ergebnisse der Tumoren 9108 und 9177 wurden im Folgenden diskutiert.

Bei der LOH-Analyse wurden 4 Sonden eingesetzt, die an Chromosom 14 binden konnten. Die Untersuchung des Tumorgewebes von T 9108 ergab einen Verlust von 14q und 22q, wohingegen in der FISH ein isolierter Verlust von 22q vermerkt wurde. In der FISH wurde keine Sonde für 14q eingesetzt, sodass dies bereits den Unterschied zwischen den Ergebnissen in diesem Fall zwischen beiden Methoden erklärte.

Zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse bei der Untersuchung von T 9177 mussten mehrere Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen waren die Gewebeproben, die der Neuropathologie und der Experimentellen Neurochirurgie zur Verfügung gestellt wurden, verschiedenen Stellen des Tumors entnommen worden, wie bereits erwähnt wurde. Dadurch konnten diese schon unterschiedlich mutiertes Genmaterial enthalten. Die Heterogenität chromosomaler Aberrationen in unterschiedlichen Regionen eines Meningeoms wurde bereits mehrfach beschrieben, unter anderem von Pfisterer et al. 2004 und Urbschat et al. 2011 [36,39,47]. Zum anderen spielten vermutlich auch die unterschiedlichen Methoden der beiden Institute, die sich in ihrer oben beschriebenen Durchführung unterschieden, eine Rolle. Die Auswertung beider Methoden war vom Untersucher abhängig. Sowohl die Bewertung der Banden bei der LOH-Analyse, und damit die Entscheidung über einen chromosomalen Verlust, als auch die Zählung der Sondensignale bei der FISH, und damit die Angabe des Chromosomensatzes der Zelle, waren subjektive Angaben. Dennoch stimmten die Ergebnisse der FISH mit den Ergebnissen der LOH-Analyse - unter Beachtung der Sondenauswahl - bei 9 Meningeomen überein.

Die überwiegend identischen Ergebnisse der neuropathologischen Befunde und der FISH führten zu einer weiteren wichtigen Erkenntnis. Die Zellen der Zellkulturen repräsentierten das

Tumorgewebe valide. Die chromosomalen Aberrationen veränderten sich weder beim Auswachsen der Zellen aus dem Tumorgewebe noch nach dem Splitting der Zellkulturen. Diese Beobachtung wurde bereits in anderen Studien gemacht. Lerner et al. (2014) beschrieben die FISH als nützliche Ergänzung zu histopathologischen Untersuchungen, die eine frühzeitige Therapie höhergradiger Meningeome erlaubte. Die Ergebnisse seien so zuverlässig wie die anderer zytogenetischer Untersuchungen, die in der klinischen Routine bereits etabliert sind. Dazu erhalte man die Ergebnisse kostengünstiger und schneller [29]. Auch Uhlmann et al. (2021) nutzten in ihrer Arbeit primäre Meningeomzellkulturen und beschrieben eine Korrelation zwischen dem Tumorgewebe und den kultivierten Zellen bezüglich der Zellmorphologie, der Wachstumseigenschaften und der Expression der Prostaglandin D2 Synthase. Letztere stellte einen Linienmarker der Deckzellen der Arachnoidea dar, wodurch gezeigt wurde, dass die Zellkulturen ihr Ursprungsgewebe repräsentierten [45].

Nicht auf zytogenetischer Ebene, aber anhand der mikroskopischen Zellmorphologie beschrieben Buckley und Eisenhardt bereits 1929, dass sich Meningeomzellen in Paraffinschnitten, in der Zellkultur und supravitalen Präparaten morphologisch ähnelten [6].

Einen Sonderfall stellte Patient Nr. 8 dar, dessen Meningeom (T 9181) eine starke Heterogenität aufwies. Dabei zeigte das Gewebestück der Primärkultur des Ansatzes B einen deutlich geringeren kombinierten 1p- und 22q-Verlust als die Gewebestücke zur Anfertigung des Tupfpräparates und des Tropfpräparates A p1.

Diese Heterogenität innerhalb eines Meningeoms war, wie oben bereits angemerkt, in einigen Studien vorbeschrieben [36,39,47]. Dabei ging eine heterogene Verteilung der Chromosomenaberration mit einer kürzeren Latenzzeit bis zum Auftreten eines Rezidivs einher. Je mehr Chromosomen eine Aberration aufwiesen und je heterogener diese intratumoral verteilt vorlagen, desto kürzer war die Latenzzeit [36].

5.4 Betrachtung eines Sonderfalls

Ein Patient (P7) hatte 2 Meningeome an unterschiedlichen Lokalisationen mit verschiedenen neuropathologischen Befunden und WHO-Graden. Beide Meningeome befanden sich in der HSG. Ein Tumor lag retrocerebellär infratentoriell, wurde dem WHO-Grad I zugeordnet und wies sowohl in der LOH-Analyse als auch in der FISH einen isolierten 22q-Verlust auf. Das zweite Meningeom war im linken KHBW lokalisiert, wurde dem WHO-Grad II zugeordnet und wies in der LOH-Analyse im Gegensatz zur FISH keinen chromosomalen Verlust auf. In der FISH zeigte sich ein isolierter 22q-Verlust (siehe Tabelle 3). Aufgrund der Rarität von multiplen Meningeomen (1-2 % aller Fälle nach Cushing et al. 1938) waren in der Literatur nur vereinzelt Fälle vorbeschrieben (zum Beispiel [1,8,24]). Bis heute ist die Pathophysiologie hinter der

Entstehung von sporadischen Meningeomen an verschiedenen Lokalisationen im Gehirn zur selben Zeit nicht abschließend geklärt [14]. Bereits 1981 gab es aber Hypothesen, wie es dazu kommen kann. Die Multifokalität von neoplastischen Herden, die auch bereits von anderen Tumoren bekannt ist, wurde als eine Hypothese diagnostiziert. Darüber hinaus wurde über eine Verteilung der Tumorzellen durch die Liquorzirkulation oder die venösen Gefäße diskutiert [1]. 2022 fanden Erson-Omay et al. heraus, dass multiple Meningeome mit oder ohne Verlust des NF2-Gens durch monoklonale Ausbreitung entstehen und durch unterschiedliche Entwicklung heterogene Genomprofile aufzeigen konnten. So ließ sich die Koexistenz von WHO-Grad-I- und -II-Meningeomen in einem Patienten erklären [14].

5.5 Ausblick

Eine Weiterführung der Arbeit wäre im Hinblick auf die Untersuchung einer größeren Fallzahl interessant, um mögliche Signifikanzen zu erkennen. Dabei könnte man den Schwerpunkt auf die Beobachtung der Zellzahl und der Viabilität sowie der Wachstumsdauer legen. Die Frage ist, ob die angedeutete Tendenz einer höheren Viabilität in der Sekundärgeneration gegenüber der Primärgeneration bzw. der Ansatzreihe B gegenüber der Ansatzreihe A bei einer größeren Fallzahl statistisch signifikant wird. Konkret könnte durch die Fragestellung untersucht werden,

- ob die Rekultivierung der Meningeomzellen nach Kryokonservierung zu einer höheren Zellzahl und Viabilität in kürzerer Zeit führt als beim Primäransatz aus nativem Gewebe und
- ob die Viabilität im Ansatz nach 24 Stunden signifikant höher ist als im Ansatz am Operationstag.

Zudem wäre ein weiterer Aspekt, der zu beobachten interessant wäre, wie lange eingefrorene Meningeomzellen kultivierbar sind und ob sich ihre Eigenschaften währenddessen ändern.

Abschließend lässt sich zu dieser Studie sagen, dass die hier genannten Anwachsdaten klinikintern oder -extern in anderen Forschungseinrichtungen genutzt werden können, um den Erfolg der Kultivierung von Meningeomzellen abschätzen zu können. Zum Beispiel könnte dies für Labore, die im Bereich der Neuroonkologie forschen, relevant sein, wenn eine neue Zellkultur mit humanen Meningeomzellen aufgezogen werden soll. Zudem stellt die Zellkultur eine Möglichkeit dar, um natives Gewebe valide zu repräsentieren, ohne dass das Genom der Zellen verändert wird. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, die Zellkulturen genauso als Grundlage für die Untersuchung des Tumors auf Genmutationen verwenden zu können wie natives Tumorgewebe. Darüber hinaus kann man auch noch nach Jahren auf vitale Zellen eines individuellen Tumors zurückgreifen, um beispielsweise das Ansprechen der Tumorzellen auf verschiedene Therapien untersuchen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Andrioli GC, Rigobello L, Iob I, Casentini L (1981) Multiple meningiomas. *Neurochirurgia (Stuttg)* 24:67–69.
2. Apra C, Peyre M, Kalamarides M (2018) Current treatment options for meningioma. *Expert Rev Neurother* 18:241–249.
3. Arnemann J (2019) Chromosomenanalyse. In: Gressner, A.M., Arndt, T. (eds) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer, Berlin, Heidelberg.
4. Bartelmei K (2021) Analyse der Loss of Heterozygosity des Chromosoms 1p sowie der Untereinheiten BAF47, BAF45c und BAF250a des ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF in Meningeomen. Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek. URL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/32742>; zuletzt geöffnet: 05.11.2024.
5. Bayani J, Squire J (2004) Multi-color FISH techniques. *Curr Protoc Cell Biol Chapter* 22:Unit 22.5.
6. Buckley RC, Eisenhardt L (1929) Study of a Meningioma in Supravital Preparations, Tissue Culture and Paraffin Sectios. *Am J Pathol* 5:659-664.3.
7. Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, Horowitz PM, James CD, Lukas RV (2018) An overview of meningiomas. *Future Oncol Lond Engl* 14:2161–2177.
8. Bukovac A, Panić H, Mrgan T, Šlaus N, Kafka A, Njirić N, Pećina-Šlaus N (2022) Bilateral Meningioma: A Case Report and Review of the Literature. *Int J Mol Sci* 23:1187.
9. Chrzanowska NM, Kowalewski J, Lewandowska MA (2020) Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors. *Molecules* 25:1864.
10. Cushing H (1922) The meningiomas (dural endotheliomas): Their source, and favoured seats of origin. *Brain* 45:282–316.
11. Delgado-López PD, Cubo-Delgado E, González-Bernal JJ, Martín-Alonso J (2020) A Practical Overview on the Molecular Biology of Meningioma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 20:62.
12. DN L, H O, OD W, WK C (2007) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.
13. DN L, H O, OD W, WK C (2016) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.
14. Erson-Omay EZ, Vetsa S, Vasandani S, Barak T, Nadar A, Marianayanam N, Yalcin K, Miyagishima D, Aguilera SM, Robert S, Mishra-Gorur K, Fulbright RK, McGuone D, Günel M, Moliterno J (2022) Genomic profiling of sporadic multiple meningiomas. *BMC Med Genomics* 15:112.

15. Hartmann C, Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S (2005) Molecular Genetic Analysis of Oligodendroglial Tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 10-14.
16. Hemmer S, Urbschat S, Oertel J, Ketter R (2019) Deletions in the 17q chromosomal region and their influence on the clonal cytogenetic evolution of recurrent meningiomas. *Mol Cytogenet* 12:22.
17. Holleczer B, Zampella D, Urbschat S, Sahm F, von Deimling A, Oertel J, Ketter R (2019) Incidence, mortality and outcome of meningiomas: A population-based study from Germany. *Cancer Epidemiol* 62:101562.
18. Hopman AHN, Ramaekers FCS, Raap AK, Beck JLM, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP (1988) In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* 89:307–316.
19. Jauch, A (2014) Molekulare Zytogenetik: FISH. In: Moog, Ute et al. Medizinische Genetik für die Praxis. 2014. edition. Thieme Verlag.
20. Jhawar BS, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ (2003) Sex steroid hormone exposures and risk for meningioma. *J Neurosurg* 99:848–853.
21. Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, Steudel W-I, Zang KD, Rahnenführer J (2007) Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. *Int J Cancer* 121:1473–1480.
22. Ketter R, Rahnenführer J, Henn W, Kim Y-J, Feiden W, Steudel W-I, Zang KD, Urbschat S (2008) Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningiomas. *Neurosurgery* 62:61-69.
23. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol Zurich Switz* 3:255–268.
24. Koech F, Orege J, Ndiangui F, Macharia B, Mbaruku N (2013) Multiple Intracranial Meningiomas: A Review of the Literature and a Case Report. *Case Rep Surg* 2013:131962.
25. Kredel FE (1928) Tissue Culture of Intracranial Tumors with a Note on the Meningiomas. *Am J Pathol* 4:337-340.3.
26. Kshetry VR, Ostrom QT, Kruchko C, Al-Mefty O, Barnett GH, Barnholtz-Sloan JS (2015) Descriptive epidemiology of World Health Organization grades II and III intracranial meningiomas in the United States. *Neuro-Oncol* 17:1166–1173.
27. Landau BF (2022) Vergleichende Expressionsanalyse der microRNAs 21, 34a, 200a und 409 in Tumorgewebe und Blutplasma von Meningeompatienten. Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek. URL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/35613>; zuletzt geöffnet: 05.11.2024.
28. Lerner C (2012) Molekularzytogenetische Analysen von Tumoren der Meningen an Zellkultur-Präparaten im Vergleich zu nativem Tumorgewebe. Technische Universität Kaiserslautern, Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg.

29. Lerner C, Ketter R, Linsler S, Henn W, Oertel J, Urbschat S (2014) Establishment of a molecular cytogenetic analysis for native tumor tissue of meningiomas-suitable for clinical application. *Mol Cytogenet* 7:12.
30. Linsler S, Kraemer D, Driess C, Oertel J, Kammers K, Rahnenführer J, Ketter R, Urbschat S (2014) Molecular Biological Determinations of Meningioma Progression and Recurrence. *PloS One* 9:e94987.
31. Linsler S, Moroldo A, Oertel J, Urbschat S (2023) P18.05.A The growth pattern of meningioma cells in cell culture under different conditions. *Neuro-Oncol* 25:ii122–ii123.
32. 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. *Acta Neuropathol (Berl)* 114:97–109.
33. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 131:803–820.
34. Mehdorn HM, Meyermann R, Engenhart-Cabillic R (2003) Intrakranielle Meningeome. *Onkol* 9:746–754.
35. Neuschmelting V, Goldbrunner R (2020) Meningeome. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-662-46764-0_122-1; zuletzt geöffnet: 05.11.2024.
36. Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, Hendricks WP, Pueschel J, Coons SW, Scheck AC (2004) Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro-Oncol* 6:290–299.
37. Rønne M, Andersen O, Erlandsen M (1979) Effect of colcemid exposure and methanol acetic acid fixation on human metaphase chromosome structure. *Hereditas* 90:195–201.
38. Saraf S, McCarthy BJ, Villano JL (2011) Update on meningiomas. *The Oncologist* 16:1604–1613.
39. Sayagués JM, Tabernero MD, Maíllo A, Espinosa A, Rasillo A, Díaz P, Ciudad J, López A, Merino M, Gonçalves JM, Santos-Briz A, Morales F, Orfao A (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 JMD* 6:316–325.
40. Schiebel PA (2009) Analyse der Chromosomenabschnitte 1p und 22q in Meningeomen mittels Inter- und MetaphasenFluoreszenz-in situ-Hybridisierung an Zellen aus der Zellkultur. Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg.
41. Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical

treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22–39.

42. Staff N (2023) NCBI's Genome Decoration Page (GDP) to Retire in September 2023. URL: <https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2023/03/21/gdp-retire-september-2023/>; zuletzt geöffnet: 01.01.2024.

43. Sugimoto Y, Yamazaki Y, Moriyama K, Sugimoto T, Kumazawa K, Baba K, Sone Y, Takeda A (2021) Differentiation and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation — Comparison among cells stored for 1, 5, 10, 15, and 20 years. *Regen Ther* 18:363–371.

44. Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T (1999) Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 59:5995–5998.

45. Uhlmann E, Rabinovsky R, Varma H, El fatimy R, Kasper E, Moore J, Vega R, Thomas A, Alterman R, Stippler M, Anderson M, Uhlmann E, Kipper F, Krichevsky A (2021) Tumor-Derived Cell Culture Model for the Investigation of Meningioma Biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 80:1117-1124.

46. Umansky F, Shoshan Y, Rosenthal G, Fraifeld S, Spektor S (2008) Radiation-induced meningioma. *Neurosurg Focus* 24:E7.

47. Urbschat S, Ketter R, Rahnenführer J, Henn W, Feiden W, Wemmert S, Linsler S, Zang KD, Oertel J (2011) Clonal cytogenetic progression within intratumorally heterogeneous meningiomas predicts tumor recurrence. *Int J Oncol* 39:1601-1608.

48. Wiemels J, Wrensch M, Claus EB (2010) Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol* 99:307–314.

49. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal Constitution of Meningiomas. *Nature* 216:84–85.

50. 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.

51. Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14:167–169.

52. Zülch KJ (1979) Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization, Geneva.

53. DMEM, high glucose, pyruvate. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/41966029>; zuletzt geöffnet: 01.01.2024.

54. Fetales Kälberserum (FBS). URL: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-supplements-and-reagents/fbs>; zuletzt geöffnet: 01.01.2024.

55. MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X). URL:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/11140035>; zuletzt geöffnet:
01.01.2024.
56. Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml). URL:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/15140122>; zuletzt geöffnet:
01.01.2024.
57. Trypsin-EDTA (0,05 %), phenolrot. URL:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/25300054>; zuletzt geöffnet:
01.01.2024.
58. KaryoMAX™ Colcemid™-Lösung in PBS. URL:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/15212012>; zuletzt geöffnet:
01.01.2024.
59. Dimethylsulfoxid Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7% | Sigma-Aldrich. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/>; zuletzt geöffnet: 01.01.2024.

7 Tabellenanhang

7.1 Lösungen, Materialien und Geräte

Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Reagenzien (eigene Darstellung).

Reagenz	Name/Konzentration	Firma/Hersteller	Menge
Acet Acid	Wasserfreie Essigsäure (Eisessig)/ 100 %	VWR Chemicals	2500 ml
Acetone (Aceton)	Propanon/ $\geq 99,8$ %	Fisher Scientific GmbH	2500 ml
Antifade Mounting Medium for Fluorescence		Vector Laboratories H-1000	10 ml
Antifade Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	Vector Laboratories H-1200	10 ml
Aqua destillata	Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	1000 ml
Colcemid Solution	N-Desacetyl-N-methylcolchicin-Lösung in PBS/ 10 $\mu\text{g/ml}$	Gibco™	10 ml
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium	Gibco™	500 ml
DMSO	Dimethylsulfoxid/ $\geq 99,7$ %	Sigma-Aldrich	10 ml
DNA-Sonde	Kombinationssonde 1p36/22q11 mit Zweifarbenhybridisierung	MetaSystems GmbH	100 μl
Ethanol	99 %, vergällt mit 1 % MEK (Methylethylketon)	Universität des Saarlandes, Zentrale für Beschaffung und Dienste	2500 ml
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)	Gibco™	500 ml
HCl	Salzsäure/ 25 %	Merck KGaA	/
Immersionsöl	Gemisch mit Hauptbestandteil Benzylbenzoat (455 g/l)	Merck KGaA	500 ml
KCl	Kaliumchlorid	Merck KGaA	500 g
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	1000 g
MEM NEAA	Minimum essential medium Non essential amino acid solution/ 100 %	Gibco™	100 ml
Methanol	$\geq 99,9$ %	Fisher Scientific GmbH	2500 ml
NaCitrat	Natriumcitrat	Merck KGaA	1000 g
NaCl	Natriumchlorid/ 99,5 %	Grüssing GmbH	1000 g
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat/ $\geq 99,5$ %	Merck KGaA	500 g
Paraformaldehyd	Polyoxymethylen/ 95 %	Merck KGaA	500 g
Pen Strep	Penicillin/ 10.000 Units/ml Streptomycin/ 10.000 $\mu\text{g/ml}$	Gibco™	100 ml
Pepsin	≥ 2.500 Units/mg Protein	Sigma-Aldrich	/
RNase A	10 mg/ml	Sigma-Aldrich	/

Fortsetzung Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Reagenzien (eigene Darstellung).

Reagenz	Name/Konzentration	Firma/Hersteller	Menge
Trichloressigsäure	98,0-100,5 %	VWR Chemicals	1000 g
Trypan Blue Stain	Trypanblaue Lösung/ 0,4 %	Gibco™	100 ml
Trypsin-EDTA	0,05 %, unverdünnt	Gibco™	100 ml
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat	Sigma-Aldrich	/

Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten Lösungen, die alle nach der beschriebenen Herstellung im Labor angesetzt wurden (eigene Darstellung).

Lösung	Herstellung	pH	Menge
Delaunay-Fixans	100 ml vergälltes Ethanol (99 %) + 100 ml Aceton + 0,1 ml 1 M Trichloressigsäure	/	/
Einfriermedium	10 ml DMSO + 90 ml DMEM	/	100 ml, zu je 5 ml aliquotieren
70 % Ethanol (vergällt)	700 ml vergälltes Ethanol (99 %) und 300 ml A.d. werden gemischt	/	1000 ml
80 % Ethanol (vergällt)	800 ml vergälltes Ethanol (99 %) und 200 ml A.d. werden gemischt	/	1000 ml
Fixativ	Methanol mit Eisessig im Verhältnis 3:1 mischen	/	/
Fluorescence with DAPI	DAPI-Antifade und Antifade im Verhältnis 1:1 in einem dunklen Eppendorfgefäß mischen (Schutz vor Lichteinstrahlung und damit dem Ausbleichen)	/	/
0,075 M KCl	2,8 g KCl in 500 ml A.d. lösen	/	Zu je 40 ml aliquotieren
Nährmedium für Probengefäße	500 ml DMEM + 5 ml Pen Strep	/	Zu je 15 ml aliquotieren
Nährmedium für die Zellkultur	500 ml DMEM + 50 ml FBS + 5 ml MEM NEAA + 5 ml Pen Strep	/	560 ml
1x PBS	200 ml 5x PBS und 800 ml A.d. mischen und pH-Wert einstellen	7,0-7,1	1000 ml
5x PBS	1,0 g KCl, 1,0 g KH ₂ PO ₄ , 40,0 g NaCl, 8,9 g Na ₂ HPO ₄ in 800 ml A.d. lösen und pH-Wert einstellen, auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren	7,0-7,1	1000 ml
10 % Pepsin-lösung	1g Pepsin in 10 ml A. d. lösen → in Eppendorfgefäßen zu je 1 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern	/	Zu je 1 ml aliquotieren
4 % PFA/1x PBS	4 g Paraformaldehyd in 100 ml 1x PBS lösen, über Nacht rührend auf 55 °C erhitzen, filtrieren und pH-Wert einstellen	7,4	100 ml
RNase A	50 mg RNase in 5 ml 2x SSC lösen; 10 min kochen, damit DNase denaturiert, auf Eis stellen und in Eppendorfgefäßen zu je 100 µl aliquotieren; bei -20 °C lagern	/	Zu je 100 µl aliquotieren
0,4x SSC	20 ml 2x SSC mit 980 ml A.d. mischen und pH-Wert einstellen	7,0-7,1	1000 ml

Fortsetzung Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten Lösungen, die alle nach der beschriebenen Herstellung im Labor angesetzt wurden (eigene Darstellung).

Lösung	Herstellung	pH	Menge
2x SSC	100 ml 20x SSC mit 900 ml A.d. mischen und pH-Wert einstellen	7,0-7,1	1000 ml
20x SSC	3,0 M NaCl = 175,32 g und 0,3 M NaCitrat = 88,23 g in 800 ml A.d. lösen und pH auf 7,0 einstellen, dann auf 1000 ml auffüllen	7,0-7,1	1000 ml
2x SSC/0,05 % Tween-20	100 ml 20x SSC, 900 ml A.d. und 0,5 ml Tween-20 mischen und pH-Wert einstellen	7,0-7,1	1000 ml

Tabelle 21: Übersicht über alle verwendeten Geräte und Softwares (eigene Darstellung).

Gerät	Firma/Hersteller
Abzug	wrt-Laborbau GmbH & Co. KG
Autoclav	Systec GmbH & Co. KG
Axiocam (Kamera am Mikroskop)	Zeiss
CellCounter, LUNAII	BioCat GmbH
cellSens Dimension (Software für mikroskopische Bildaufnahme der FISH)	Olympus
CO ₂ -Wärmeschrank	Heraeus
Computer (FISH-Bilder)	Fujitsu
Computer (Zellkulturbilder)	LG
Digital Timer Count Down/Up	Blanko
Eisbereiter	Scotsman
Fireboy (Bunsenbrenner)	Integra Biosciences
Lichtmikroskop (BX43)	Olympus
FLUOLED® 3CFW (Fluoreszenzeinheit)	Fraen Machining Corporation
Flüssigstickstofftank	Messer SE & Co. KGaA
Stickstoffbehälter GT 40 (zur Zelllagerung)	Air Liquide
Gefrierschrank Premium No Frost (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank Öko Super (-20 °C)	Liebherr
Heizplatte	Medax
Hygrometer	Oregon Scientific
IBM SPSS Statistics (Software für statistische Datenanalyse, Version 27)	IBM
Kamera am Fluoreszenzmikroskop (XC30)	Olympus
Kühlschrank	VWR
Kühlschrank	Senator Automatic
Magnetrührer mit Heizplatte	VWR
Mikrozentrifuge	Labnet International
Minishaker	IKA
pH-Meter	Mettler Toledo
Primovert (Mikroskop)	Zeiss
Schüttelwasserbad	Lauda
Sicherheitswerkbank, LaminAir	Heraeus
Trockenschrank	VWR
Ultratiefkühlschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific

Fortsetzung Tabelle 21: Übersicht über alle verwendeten Geräte und Softwares (eigene Darstellung).

Gerät	Firma/Hersteller
Universalschrank (Trockenschrank) UN30	Memmert GmbH
Waage	Sartorius
Wärmeschrank	Jouan
Wasserbad	Braun Thermomix
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific
Labor-Medienzelle SCALA	Waldner Holding Verwaltung GmbH
ZEN 2012 blue edition (Software für mikroskopische Bildaufnahme der Zellkultur)	Zeiss
Zentrifuge, Rotina 35, Typ 1705	Hettich

Tabelle 22: Übersicht über die wichtigsten Verbrauchsmaterialien (eigene Darstellung).

Material	Firma/Hersteller
Adhäsionsobjektträger, SuperFrost® Plus (für Tupfpräparate)	Thermo Scientific™ (Fisher Scientific GmbH)
Cell Counting Slides LUNAII	BioCat GmbH
CO ₂	Nippon Gases
Cryotubes	Greiner Bio-One GmbH
Deckgläser, 18 x 18 mm und 24 x 60 mm	VWR
Eppendorf Research® plus (Pipetten) 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Fixogum, elastischer Montagekleber	Marabu Beteiligungs-GmbH
Gefrierbehälter, mit Isopropanol gefüllt	Thermo Scientific™ (Fisher Scientific GmbH)
Objektträger (für Tropfpräparate)	Marienfeld GmbH & Co. KG
Petrischale mit Deckel, Cellstar	Greiner Bio-One GmbH
Röhrchen mit rundem Boden (14 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Spitzröhrchen	Nunc™ (VWR)
Tissue Culture Flask (50 ml)	Falcon™ (Fisher Scientific GmbH)
Tumortöpfe	Greiner Bio-One GmbH

7.2 Ergebnisse der Zellzählung

Tabelle 23: Übersicht über alle Ergebnisse der Zellzählungen der **Primärkulturen (p1)** nach dem Abbruch für die FISH. Die Zellzählung umfasste die Gesamtzellzahl, die Anzahl der lebenden sowie der toten Zellen und die Viabilität.

T-Nr. und Passage	Total cell number [cells/ml]	Live cells [cells/ml]	Dead cells [cells/ml]	Viability [%]
T 9077 A, B p1	Keine Zellzählung erfolgt			
T 9092 A, B p1	Keine Zellzählung erfolgt			
T 9108 A p1	$1,16 \times 10^6$	$1,04 \times 10^6$	$1,24 \times 10^5$	89,3
T 9108 B p1	$7,04 \times 10^5$	$6,37 \times 10^5$	$6,70 \times 10^4$	90,5
T 9145 A p1	$3,78 \times 10^5$	$2,49 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$	65,8
T 9145 B p1	Kein Wachstum erfolgt			
T 9152 A p1	$3,86 \times 10^5$	$2,63 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$	68,8
T 9152 B p1	$9,91 \times 10^5$	$8,86 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	89,4
T 9168 A, B p0	Kein Wachstum erfolgt			
T 9175 A p1	$1,10 \times 10^5$	$8,61 \times 10^4$	$2,39 \times 10^4$	78,3
T 9175 B p1	$3,21 \times 10^5$	$3,06 \times 10^5$	$1,44 \times 10^4$	95,5
T 9177 A p1	$4,40 \times 10^5$	$4,12 \times 10^5$	$2,87 \times 10^4$	93,5
T 9177 B p1	$4,83 \times 10^5$	$3,78 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	78,2
T 9181 A p1	$8,18 \times 10^5$	$7,23 \times 10^5$	$9,57 \times 10^4$	88,3
T 9181 B p1	$2,39 \times 10^5$	$1,72 \times 10^5$	$6,70 \times 10^4$	72,0
T 9194 A p1	$2,87 \times 10^5$	$2,01 \times 10^5$	$8,61 \times 10^4$	70,0
T 9194 B p1	$2,25 \times 10^5$	$1,87 \times 10^5$	$3,83 \times 10^4$	83,0

Tabelle 24: Übersicht über alle Ergebnisse der Zellzählungen der **Sekundärkulturen (p2)** nach dem Abbruch für die FISH. Die Zellzählung umfasste die Gesamtzellzahl, die Anzahl der lebenden sowie der toten Zellen und die Viabilität. Die Zellzählungen der Tumoren mit den Nummern T 9145 B p2 und T 9168 fehlten, weil in den Primärkulturen kein Wachstum erfolgte und somit keine Zellen eingefroren werden konnten, um eine Sekundärkultur anzusetzen.

T-Nr. und Passage	Total cell number [cells/ml]	Live cells [cells/ml]	Dead cells [cells/ml]	Viability [%]
T 9077 A p2	3,30 x 10 ⁵	2,68 x 10 ⁵	6,22 x 10 ⁴	81,2
T 9077 B p2	6,32 x 10 ⁵	5,98 x 10 ⁵	3,35 x 10 ⁴	94,7
T 9092 A p2	1,56 x 10 ⁶	1,46 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁵	93,5
T 9092 B p2	6,75 x 10 ⁵	6,22 x 10 ⁵	5,27 x 10 ⁴	92,2
T 9108 A p2	8,28 x 10 ⁵	6,51 x 10 ⁵	1,77 x 10 ⁵	78,6
T 9108 B p2	5,89 x 10 ⁵	5,50 x 10 ⁵	3,83 x 10 ⁴	93,5
T 9145 A p2	3,97 x 10 ⁵	2,82 x 10 ⁵	1,15 x 10 ⁵	71,1
T 9152 A p2	6,13 x 10 ⁵	5,55 x 10 ⁵	5,74 x 10 ⁴	90,6
T 9152 B p2	7,94 x 10 ⁵	6,70 x 10 ⁵	1,24 x 10 ⁵	84,3
T 9175 A p2	9,09 x 10 ⁴	6,70 x 10 ⁴	2,39 x 10 ⁴	73,7
T 9175 B p2	9,57 x 10 ⁴	8,14 x 10 ⁴	1,44 x 10 ⁴	85,0
T 9177 A p2	4,40 x 10 ⁵	3,97 x 10 ⁵	4,31 x 10 ⁴	90,2
T 9177 B p2	8,66 x 10 ⁵	7,18 x 10 ⁵	1,48 x 10 ⁵	82,9
T 9181 A p2	9,62 x 10 ⁵	8,90 x 10 ⁵	7,18 x 10 ⁴	92,5
T 9181 B p2	1,72 x 10 ⁵	4,79 x 10 ³	1,67 x 10 ⁵	2,8
T 9194 A p2	6,56 x 10 ⁵	5,89 x 10 ⁵	6,70 x 10 ⁴	89,8
T 9194 B p2	5,07 x 10 ⁵	4,64 x 10 ⁵	4,31 x 10 ⁴	91,5

7.3 FISH-Ergebnisse

Die Durchführung der FISH wurde bereits im Kapitel 3.2.4 unter Material und Methoden beschrieben. In diesem Anhang wurden nun alle Ergebnisse der Auswertung tabellarisch dargestellt. Die Ziffern 0-4 stehen für die Anzahl der Signale der grünen (22q11) und roten (1p36) Sonden, die unter dem Fluoreszenzmikroskop in einem Zellkern zu sehen war. Die Prozentzahlen in den Ergebnisfeldern stellen den Anteil der Zellen an der Gesamtheit der ausgezählten Zellen dar, die die entsprechende Signalkonstellation aufgewiesen haben. Dabei stellen alle hervorgehobenen Zahlen die zytogenetischen Befunde dar, die durch die FISH erhoben wurden.

7.3.1 Tropfpräparate der Primäransätze (p1) (zu 4.5.1)

T 9077 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			1 %		
	2		1,5 %	94,5 %	0,5 %	
	3					
	4					2,5 %
T 9077 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		0,5 %	1 %		
	2		1,5 %	96 %		
	3					
	4					1 %

T 9092 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			1 %		
	2		1 %	97,5 %		
	3					
	4					0,5 %

T 9092 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			1 %		
	2		0,5 %	96,5 %	0,5 %	
	3					
	4					1,5 %

T 9108 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		2 %	66,5 %	1 %	0,5 %
	2			27 %	0,5 %	2,5 %
	3					
	4					

T 9108 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		0,5 %	65 %	1,5 %	0,5 %
	2		0,5 %	27,5 %		4,5 %
	3					
	4					

T 9145 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		5,5 %	56 %	2,5 %	
	2		0,5 %	28,5 %	2 %	5 %
	3					
	4					

T 9152 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2		2 %	90,5 %	1 %	
	3			0,5 %	0,5 %	
	4			1 %		4,5 %
T 9152 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			0,5 %		
	2		1 %	96,5 %		0,5 %
	3					
	4					1,5 %

T 9175 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		2 %	35 %	1 %	
	2			47,5 %		14,5 %
	3					
	4					
T 9175 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		0,5 %	37,5 %	1 %	
	2			44 %	0,5 %	16,5 %
	3					
	4					

T 9177 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		1,5 %	48,5 %		0,5 %
	2			48,5 %		1 %
	3					
	4					
T 9177 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		0,5 %	55 %	1 %	1,5 %
	2			31,5 %		10,5 %
	3					
	4					

T 9181 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		74,5 %	3,5 %		
	2			22 %		
	3					
	4					
T 9181 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		30 %	5 %		
	2		2 %	63 %		
	3					
	4					

T 9194 A p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			1 %		
	2		43,5 %	53,5 %		
	3					
	4		1 %	1 %		
T 9194 B p1 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		1 %			
	2		28,5 %	68,5 %		
	3					
	4			2 %		

7.3.2 Tropfpräparate der Sekundäransätze (p2) (zu 4.5.2)

T 9077 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2			67,5 %		
	3					
	4			0,5 %		32 %
T 9077 B p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2		1 %	90 %	0,5 %	
	3					
	4					8,5 %

T 9092 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2			97 %		
	3				0,5 %	
	4					2,5 %
T 9092 B p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2		1 %	93 %		
	3				0,5 %	
	4					5,5 %

T 9108 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		1,5 %	72 %	0,5 %	
	2			17,5 %		8 %
	3					
	4					0,5 %
T 9108 B p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		1 %	61 %	2 %	
	2			13,5 %		22 %
	3					
	4					0,5 %

T 9145 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		6 %	52 %		
	2		1 %	27,5 %		9,5 %
	3					
	4					4 %

T 9152 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			0,5 %		
	2			87 %	1,5 %	
	3					
	4					11 %
T 9152 B p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2			91 %	1 %	
	3					
	4					8 %

T 9175 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 44		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		4,6 %	38,6 %		
	2			15,9 %		38,6 %
	3					
	4					2,3 %
T 9175 B p2 Ausgezählte Zellkerne: 100		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		2 %	52 %		
	2			26 %	4 %	14 %
	3					
	4					2 %

Aufgrund der geringen Anzahl an Zellen auf dem Objektträger konnte die Auswertung des Tumors T 9175 A p2 nicht als valide gewertet werden.

T 9177 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			62,5 %		
	2			30 %		5,5 %
	3					
	4					2 %
T 9177 B p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			52,5 %	2 %	
	2		0,5 %	28,5 %		15 %
	3					
	4					1,5 %

T 9181 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		73 %	3 %		
	2		4,5 %	19,5 %		
	3					
	4					

T 9194 A p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1	0,5 %	0,5 %			
	2		15,5 %	79 %		
	3			0,5 %		
	4			4 %		

T 9194 B p2 Ausgezählte Zellkerne: 200		Sonde 1p36; rot				
		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2		15,5 %	82 %		
	3					
	4			0,5 %		2 %

7.3.3 Tupfpräparate aus gefrorenem, nativem Gewebe (zu 4.5.3)

T 9077 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		0,5 %	0,5 %		
	2		1 %	96,5 %		
	3					
	4					1,5 %

T 9092 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1			1 %		
	2		1 %	97 %		
	3			0,5 %		
	4					0,5 %

T 9108 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		0,5 %	61,5 %		
	2			37,5 %		0,5 %
	3					
	4					

T 9145 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		12 %	62 %	1 %	
	2		1 %	20,5 %	1,5 %	2 %
	3					
	4					

T 9152 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1					
	2		1 %	95,5 %	0,5 %	
	3					
	4					3 %

T 9168 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 50		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		36 %	10 %	2 %	
	2		2 %	50 %		
	3					
	4					

Aufgrund der geringen Anzahl an ausgezählten Zellen konnte diese Auswertung nicht als valide gewertet werden. Dieses Ergebnis konnte aber zur Erklärung des nicht vorhandenen Wachstums herangezogen werden (siehe 5.2).

T 9175 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		3 %	31 %	2 %	
	2			61 %		3 %
	3					
	4					

T 9177 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		1 %	59 %		
	2		0,5 %	27,5 %		10,5 %
	3					
	4					1,5 %

T 9181 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		89 %	2 %		
	2		3 %	6 %		
	3					
	4					

T 9194 Tupfpräparat		Sonde 1p36; rot				
Ausgezählte Zellkerne: 200		0	1	2	3	4
Sonde 22q11; grün	0					
	1		1 %			
	2		92,5 %	6 %		
	3					
	4			0,5 %		

8 Publikationen und Vorträge

Publikation

- Linsler S, Moroldo A, Oertel J, Urbschat S (2023) P18.05.A The growth pattern of meningioma cells in cell culture under different conditions. Neuro-Oncol 25:ii122–ii123.

Vortrag

- Linsler S, Moroldo A, Oertel J, Urbschat S (2023) **The growth pattern of meningioma cells in cell culture under different conditions.** 18th Meeting of the European Association of Neuro-Oncology (EANO), Rotterdam, 21.-24.09.2023 [31].

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim Oertel (Direktor der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes), für die Möglichkeit der Promotion in der Klinik für Neurochirurgie und für die Bereitstellung des Tumorgewebes bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Stefan Linsler (ehemaliger leitender Oberarzt der Klinik für Neurochirurgie), aussprechen, der jederzeit ansprechbar war, schnelle Rückmeldungen gegeben hat und mir mit vielen hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Steffi Urbschat (Leiterin des Forschungslabors der Experimentellen Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes) für die herzliche Aufnahme in das Forschungsteam und die gute Erreichbarkeit bei Fragen.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Joachim Oertel, Frau Prof. Steffi Urbschat und Herrn Prof. Dr. Stefan Linsler herzlich für das Ermöglichen und die Unterstützung bei der Kongressteilnahme in Rotterdam danken.

Zudem möchte ich auch Frau Sigrid Welsch (MTLA) ein Dankeschön aussprechen, die mich in die Methoden der vorliegenden Arbeit eingearbeitet hat und mir bei Fragen eine sehr große Hilfe war.

Mein Dank gilt auch dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, vor allem Herrn Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer, Frau Dr. med. vet. Wiebke Jürgens-Wemhauer sowie Frau Dr. rer. nat. Julia Kettern für die freundliche Unterstützung und für die Zurverfügungstellung der Ergebnisse der LOH-Analyse und der Bilder.

Außerdem möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Reith (Direktor der Klinik für Diagnostische und interventionelle Neuroradiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes) danken, dass mir die Erlaubnis zur Verwendung der cMRT- und cCT-Aufnahmen erteilt wurde.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.