

**Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universitätsklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann**

**Wachstum von Meningeomen an der Hirn-Tumor-
Grenze:
Eine immunhistochemische Studie.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jasmin Caterina Fritz
aus
Memmingen**

2005

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Frau Professor Dr. A. Bornemann
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Ruck

Dedicato alle mie zie Maria Gabriella, Maria Rosaria e Rita
Für meine Tanten Maria Gabriella, Maria Rosaria und Rita

„We apologize if we appear to make a simple lesion seem unnecessarily complex, but meningiomas are more heterogenous than often assumed“
(Burger et al., 2002)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Pathologie der Meningeome	1
1.1.1	Ätiologie, Epidemiologie, Klinik	1
1.1.2	Histopathologie und Immunhistochemie	1
1.1.3	Biologie und klinischer Verlauf der Meningeome	2
1.1.4	Onkogenese.....	5
1.2	Anatomie der Kortexoberfläche und der Meningen	6
1.2.1	Struktur der Kortexoberfläche und der Meningen	6
1.2.2	Extrazelluläre Matrix der Cortexoberfläche und der Meningen	8
1.3	Die extrazelluläre Matrix der Meningeome	10
1.4	Basalmembran- Morphologie und Funktion	10
1.5	Fragestellung	11
2	METHODEN.....	13
2.1	Patientendaten	13
2.2	Material	14
2.2.1	Herstellung der histologischen Präparate	14
2.2.2	Antikörper	14
2.2.3	Farbstoffreagenzien	15
2.2.4	Lösungen	15
2.2.5	Chemikalien	17
2.3	Methoden	17
2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	17
2.3.2	Immunhistochemie	18
3	ERGEBNISSE	22
3.1	MIB-1	25
3.2	EMA	27
3.3	Kollagen IV.....	30
3.4	GFAP	37
4	DISKUSSION	40
4.1	MIB-1	41
4.2	EMA	43
4.3	Kollagen IV.....	43

4.4	GFAP	47
5	ZUSAMMENFASSUNG	48
6	LITERATURVERZEICHNIS	50
7	ANHANG.....	54

Liste der verwendeten Abkürzungen

AB-Methode	Avidin-Biotin-Methode
BM	Basalmembran
BSA	Bovine serum albumine
DAB	Diamino benzidine
EMA	Epitheliales Membranantigen
GFAP	Saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
MIB-1	Bezeichnung für den Klon des Antikörpers gegen das proliferationsassoziierte Antigen Ki 67
MMP	Matrix-Metalloproteinase
SPARC	Secreted protein, acidic and rich in cysteine
TBS	Tris buffered saline
TGF β	Transforming growth factor beta
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Pathologie der Meningeome

1.1.1 Ätiologie, Epidemiologie, Klinik

Meningeome sind in der Regel langsam wachsende, scharf begrenzte, gutartige Tumore (Burger et al., 2002). Sie entstehen aus neoplastischen Arachnoideadeckzellen (Kepes, 1986). Meningeome treten mit einer Inzidenz von 6:10.000 auf und machen 13% bis 26% der primär intrakraniellen Tumoren aus (Lantos et al., 2002). Typisch ist das Auftreten im mittleren und höheren Alter mit einem Gipfel in der sechsten und siebten Lebensdekade. Das weibliche Geschlecht ist häufiger betroffen, bei einer Verteilung weiblich zu männlich von 3:2 (Louis et al., 2000). Meningeome kommen in der gesamten kraniospinalen Achse vor. Intrakranielle Prädilektionsstellen sind die Parasagittalregion, der Sinus sagittalis superior, die zerebrale Konvexität, die Keilbeinflügel, das Tuberculum sellae, die Olfactoriusrinne, der Nervus Opticus, das Tentorium und die Foramen Magnum-Region. Meningeome können Dura und Knochen invadieren und venöse Sinus verschließen (Burger et al., 2002). Benachbartes Hirngewebe wird oft komprimiert, jedoch finden selten Hirninvansion oder Verwachsungen mit Strukturen des zentralen Nervensystems statt (Louis et al., 2000). Klinisch manifestieren sich Meningeome durch epileptische Anfälle, Hemiparesen, Gesichtsfeldausfälle, Aphasien und andere fokale Symptome (Black, 1993).

Diese neurologischen Defekte betreffen Patienten mit hirninvasiven Meningeomen häufiger (Akeyson und McCutcheon, 1996). Meningeome können jedoch auch symptomlos bleiben (Black, 1993).

1.1.2 Histopathologie und Immunhistochemie

Das histologische Bild der Meningeome ist heterogen. Es werden 13 histologische Subtypen klassifiziert: Meningotheliomatöses, fibromatöses, transitionales, psammomatöses, angiomatöses, metaplastisches, mikrozystisches und sekretorisches Meningeom, Klarzellmeningeom, chordoides, rhabdoides, lymphoplasmozytenreiches und papilläres Meningeom. Von diesen Subtypen gehört das „klassische“ meningotheliomatöse Meningeom zu den häufigsten. Es ist gekennzeichnet durch Tumorlobuli, welche von dünnen

kollagenösen Septen umrandet werden (Abb.5). Innerhalb der Lobuli formen die Tumorzellen ein Pseudosynzitim. Meningeomzellen des meningotheliomatösen Subtyps sind ihren Ursprungszellen, den Arachnoideadeckzellen, sehr ähnlich (Louis et al., 2000). Anhand immunhistochemischer Studien konnte nachgewiesen werden, dass Meningeome sowohl mesodermale als auch ektodermale Merkmale exprimieren (Meis et al., 1986). EMA, das epitheliale Membran-Antigen, eignet sich als epitheliales Markerenzym für Meningeome. Bis zu 95% der Meningeome sind immunpositiv für EMA (Langford, 1996). In der Literatur variieren die Angaben zu EMA in Meningeomen jedoch. Bisher ist nicht bekannt, ob das Ausmaß EMA-exprimierender Meningeomzellen mit klinischen oder anderen Parametern korreliert. EMA-Expression ist in atypischen und malignen Meningeomen weniger ausgeprägt. Tumorzellgruppen, die das ZNS-Gewebe infiltrieren, können eine reaktive Astrozytose hervorrufen (Louis et al., 2000). Bei Hirninvasion können durch den Tumor eingeschlossene Inseln von Gliagewebe durch die GFAP-Färbung von Meningeomgewebe unterschieden werden (Chronwall et al., 1983). Eine Positivität des Meningeomgewebes für GFAP, ein neuroglia-spezifisches fibrilläres Protein, wurde nicht festgestellt (Meis et al., 1986). Ungefähr 64% aller Meningeome exprimieren Progesteronrezeptoren (Carroll et al., 1993).

1.1.3 Biologie und klinischer Verlauf der Meningeome

Die Biologie der Meningeome zu beschreiben erweist sich als schwierig, weil ihr biologisches Verhalten sehr variabel ist und sich nur schwer mit histologischen Merkmalen korrelieren lässt. Meningeome können benigne, langsam wachsende Tumoren sein, die durch eine Kapsel von umliegendem Gewebe getrennt sind. Sie können aber auch maligne Neoplasie darstellen, welche Hirngewebe invadieren, eine starke Neovaskularisierung und eine hohe Wachstumsrate aufweisen. Ihr Verhalten in Hinsicht auf Wachstumsrate und Invasion ist genauso variabel wie ihr morphologisches und histologisches Bild (McCutcheon, 1996). Die wichtigste Therapieform ist die chirurgische Entfernung (Akeyson und McCutcheon, 1996). Es gibt Faktoren, die prognostisch negativ sind und die Rezidivrate von Meningeomen signifikant

steigern. Die wichtigsten dieser Faktoren sind der Resektionsgrad (Jellinger und Slowik, 1975) und das Grading nach WHO (Louis et al., 2000). Wenn der Tumor gut vom Hirn abgrenzbar ist, wird eine Resektion ohne Schädigung des Hirngewebes ermöglicht. Eine bindegewebige Kapsel, die zusätzlich aus Arachnoidea, arachnoidalen Trabekeln, Pia mater und Tumorstroma besteht, trennt den Tumor vom ZNS-Gewebe. Diese Kapsel variiert in der Dicke. Je breiter sie ist, desto eher wird eine hirnschonende Operation ermöglicht. Schwierigkeiten ergeben sich, wenn der Tumor dicht mit der pialen Membran verbunden ist, den Subarachnoidalraum aufgebraucht hat und Tumorgewebe durch Gefäße mit dem Kortex verbunden ist (Nakasu et al., 1989). Eine irregulär geformte Grenze zwischen Tumor und Hirn, die aggressives Tumorverhalten kennzeichnet, ist bereits radiologisch sichtbar (Burger et al., 2002). Arachnoidea, Pia mater und der cerebrale Kortex sind anatomische Barrieren, die das Gehirn vor einem Meningeom-assoziiertem Ödem beschützen (Bitzer et al., 1997). Zerstörung dieser Barrieren, peritumorale Adhärenzen und Obliteration des Subarachnoidalraumes durch das Meningeom können ein Hirnödeme verursachen. Ein peritumorales Ödem tritt in durchschnittlich 60% aller Meningeome auf. Dieses Hirnödeme ist multifaktoriell bedingt (Bitzer et al., 1999). Auch mikroskopisch erkennbare Invasion des Kortex und Aneinanderhaften von Hirn und Tumor an der Grenze begünstigen das Auftreten eines Hirnödems. Wenn chirurgisch unter diesen Umständen keine vollständige Schonung des Hirngewebes möglich ist, wird im Präparat Hirngewebe gefunden. In diesem Zusammenhang tritt ein Hirnödeme dann signifikant häufiger auf, wenn im histologischen Präparat anhängendes Hirngewebe vorhanden ist und wird noch häufiger gefunden, wenn Hirninvasion im Resektat nachgewiesen wird (Bitzer et al., 1997). 5 Jahre nach vollständiger Resektion benigner Meningeome treten Rezidive in 3% der Fälle auf, wobei die Rezidivrate bei subtotaler Resektion steigt (Jääskeläinen et al., 1986). Auch histologische und immunhistochemische Merkmale lassen Aussagen über eine negative Prognose zu. Zu diesen Merkmalen zählt man den Verlust des lobulären Musters (sheeting), Hyperzellularität, eine zytologische Atypie, große Nucleoli, erhöhte Mitoseraten ($>4/10$ high-

power field), Nekrosen, erhöhte MIB-1 Raten und Veränderungen wie Abnahme der Zellgröße und Hirninvasion (Burger et al., 2002).

Der Proliferationsindex ist ein wichtiger prognostischer Faktor für Rezidivrate und Überlebensprognose (Louis et al., 2000). Generell beobachtet man steigende Proliferationsraten von benignen zu atypischen zu anaplastischen Tumoren, welche potentiell aggressiveres Verhalten aufweisen. Ki-67 ist ein Antigen, welches nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird und dadurch ein Marker für die Wachstumsrate ist. MIB-1 ist sein spezifischer Antikörper (Abramovich und Prayson, 1998). Der MIB-1/ Ki-67 Index beträgt in benignen Meningeomen durchschnittlich 3,8%, in atypischen Meningeomen 7,2% und in anaplastischen Meningeomen 14,7% (Maier et al., 1997). Bei rezidivierenden Meningeomen ist der Index in Tumorrezidiven gegenüber dem Primärtumor erhöht (Roser et al., 2004). Ungeklärt bleibt, ob eine erhöhte MIB-1 Rate unabhängig vom histopathologischen Grad, z.B. bei benignen Meningeomen, mit Hirninvasivität korreliert. Ein negativer Progesteronrezeptorstatus zählt auch zu den prognostisch ungünstigen Faktoren (Burger et al., 2002). Meningeome werden nicht nur in histologische Subtypen, sondern auch nach WHO-Graden klassifiziert. Diese Klassifikation teilt Meningeome in 3 Kategorien ein: Das gut differenzierte, am häufigsten vorkommende benigne WHO Grad I Meningeom, das atypische WHO Grad II Meningeom (4,7-7,2%) und das anaplastische, maligne WHO Grad III Meningeom (1,0-2,8%) (Louis et al., 2000). Das Grading basiert auf histologischen, prognostisch wichtigen Faktoren, die für ein erhöhtes Rezidivrisiko kausal sind. Nicht alle oben aufgeführten prognostisch negativen Faktoren fließen in das Grading mit ein. Durch das Grading soll eine Grundlage für die Prognose von biologischem Tumorverhalten und Rezidivrisiko geschaffen werden. Das WHO-Grading beschäftigt sich lediglich mit histologischen Merkmalen. Dies ist unbefriedigend, da der histologische Befund allein nur ungenau das biologische Verhalten des Tumors repräsentiert (Langford, 1996). Zum Beispiel hat der Resektionsgrad auf das Rezidivrisiko Einfluss (s.o.). Entsprechend sind gut resezierbare Meningeome (zum Beispiel der Konvexität) prognostisch günstiger als nicht ideal resezierbare (zum Beispiel der Schädelbasis).

Die Rezidivraten der Meningeome steigen mit ihrem Malignitätsgrad. Nach fünf Jahren haben 3% der benignen und 38% der atypischen Meningeome Rezidive gebildet, bei anaplastischen Meningeomen liegt diese Rate sogar bei 78% (Jääskeläinen et al., 1986). Der MIB-1 Index als Proliferationsindex, der nicht für das Grading gewertet wird, liegt bei Grad I-Meningeomen durchschnittlich bei 3,8% (Maier et al., 1997). Ein weiterer negativ prognostischer Faktor, der nicht auf das Grading nach WHO Einfluß nimmt, ist die Invasion von anliegendem Hirngewebe durch das Meningeom. Bei hirninvasiven Grad I Meningeomen ist das Rezidivrisiko auf ca. 40%, also einem atypischen Meningeom Grad II entsprechend, erhöht (Perry et al., 1999). Dies legt nahe, dass ihr morphologisch gutartiger Aspekt ihrem klinisch aggressiven Verhalten widerspricht. Obwohl Hirninvasion mit klinischer Malignität assoziiert ist, können sowohl histologisch benigne als auch atypische und maligne Meningeome Hirninvasion aufweisen (Rempel et al., 1999). Hirninvasion allein im Sinne von klinischer Malignität ist kein Kriterium für die Einteilung eines Meningeoms in WHO Grad III (Burger et al., 2002).

1.1.4 Onkogenese

Die genetischen Befunde bei Meningeomen sind genauso heterogen und vielfältig wie ihre Histologie, Biologie und Klinik. Es wurden viele Genveränderungen gefunden, die zur Entstehung von Meningeomen und deren Progression zu höheren Malignitätsgraden führen (Abb.1). Jedoch wurden in benignen Meningeomen, die Hirn invadieren, keine spezifischen genetischen Veränderungen entdeckt (Weber et al., 1997).

Arachnoideazellen

⇓ NF 2-Genmutation/ Chromosom 22q-Verlust

Meningeom WHO Grad I

⇓ Verlust von 1p, 6q, 10q, 14q, 18q

⇓ Zugewinn an 1q, 9q, 12 q, 15 q, 17q, 20q.

Meningeom WHO Grad II

⇓ Verlust von 6q, 9q, 10 and 14q

⇓ 17q-Amplifikation

⇓ Seltene Mutationen: TP53, PTEN

⇓ Seltene Deletionen: CDKN2A

Meningeom WHO Grad III

Abb. 1: Genetische Veränderungen, die zur Entstehung von Meningeomen und deren Progression zu höheren Malignitätsgraden führen (modifiziert nach Louis et al., 2000).

1.2 Anatomie der Kortexoberfläche und der Meningen

Um die pathologischen Veränderungen an der Grenze von Meningeom und Gehirn zu erläutern, ist die Darstellung der physiologischen anatomischen Verhältnisse und der extrazellulären Matrix im Bereich der Meningen wichtig.

1.2.1 Struktur der Kortexoberfläche und der Meningen

Die Meningen bestehen aus 3 Hirnhäuten und liegen der Kortexoberfläche an (Abb.2). Die äußerste Hirnhaut ist die Dura mater, welche mit dem Schädelknochen in Kontakt steht. Die Leptomeningen bestehen aus Arachnoidea und Pia mater. Die Arachnoidea ist der Dura mater zugewandt. Die Pia mater liegt dem Kortex in engem Abstand auf. Zwischen Pia mater und Arachnoidea besteht ein variabel breiter Subarachnoidalraum, der von Trabekeln durchquert wird. An manchen Stellen sind diese beiden Hirnhäute dicht miteinander verbunden, und der Subarachnoidalraum ist stark verschmälert (Peters et al., 1991).

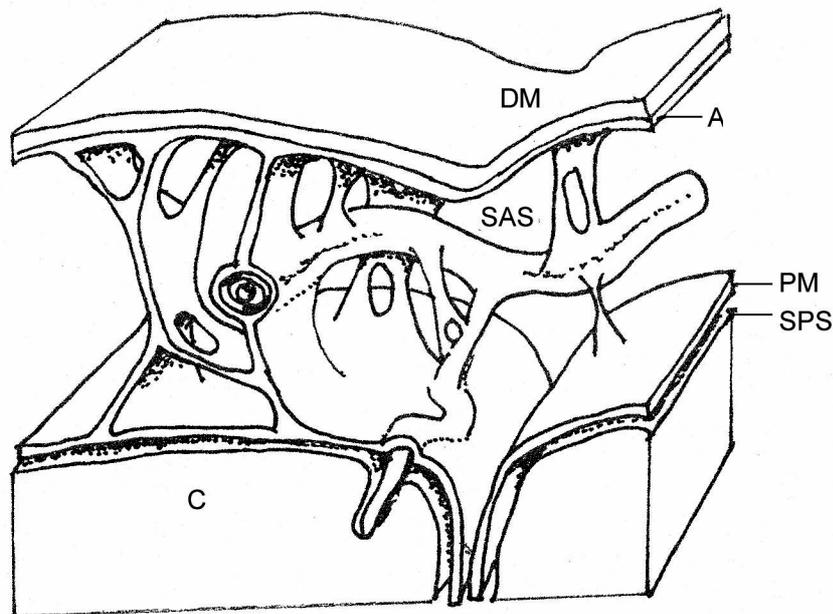


Abb. 2: Die Meningen (modifiziert nach Alcolado et al., 1988).

DM: Dura mater; A: Arachnoidea; SAS: Subarachnoidal space; PM: Pia mater; SPS: Subpial space; C: Kortex

1.2.1.1 Arachnoidea

Die Arachnoidea besteht aus 2 Zellschichten. Die Duragrenzschicht (dural border layer) ist 5-6 Zellschichten dick und steht mit den duralen Fibroblasten in Kontakt. Dem Subarachnoidalraum zugewandt befindet sich die Arachnoideagrenzschicht (arachnoid barrier layer). Die Zellen dieser Schicht sind irregulär geformt und über Desmosomen, tight junctions und gap junctions dicht miteinander verbunden. Arachnoideagrenzschicht und Duragrenzschicht können durch einen schmalen Spalt voneinander getrennt sein. Die Pia mater steht durch Trabekel mit der Arachnoideagrenzschicht in Kontakt (Alcolado et al., 1988).

1.2.1.2 Pia mater und Kortexoberfläche

Die Pia mater besteht aus einer einzelnen, zum Teil fenestrierten Zelllage. Sie folgt dem Verlauf des Kortex und liegt der pial-glialen Grenzbasalmembran auf, welche von Astrozyten gebildet wird. Pia mater und Basalmembran sind durch einen 6nm breiten Subpialraum getrennt. Die oberste Schicht der Kortexoberfläche, Membrana limitans gliae genannt, besteht aus Astrozytenfortsätzen (Lopes und Mair, 1974b).

1.2.2 Extrazelluläre Matrix der Kortexoberfläche und der Meningen

1.2.2.1 Blutgefäße

Basalmembran umgibt die Blutgefäße in Gehirn und Leptomeningen (Rutka et al., 1986).

1.2.2.2 Dura mater und Arachnoidea

Zwischen Dura mater und Arachnoidea besteht keine Basalmembran. Innerhalb der Arachnoidea wird variabel Basalmembran exprimiert (Waggener und Beggs, 1967). Duragrenzschicht und Arachnoideagrenzschicht können durch einen Spalt getrennt sein. Zwischen beiden Schichten werden fakultativ zwei Basalmembranen exprimiert. Basalmembran findet man an der inneren Fläche der Duragrenzschicht und an der äußeren Fläche der Arachnoideagrenzschicht. Es können auch lediglich eine oder gar keine Basalmembran exprimiert werden (Abb.3). Die Basalmembran der Arachnoidea ist im Gegenteil zu üblicher Basalmembran diskontinuierlich. Auch an der dem Subarachnoidalraum zugewandten Arachnoideagrenzschicht wird fakultativ eine diskontinuierliche Basalmembran exprimiert. Diese Basalmembran kann die Trabekel im Subarachnoidalraum begleiten und sie von den umgebenden Kollagenfasern trennen (Lopes und Mair, 1974a).

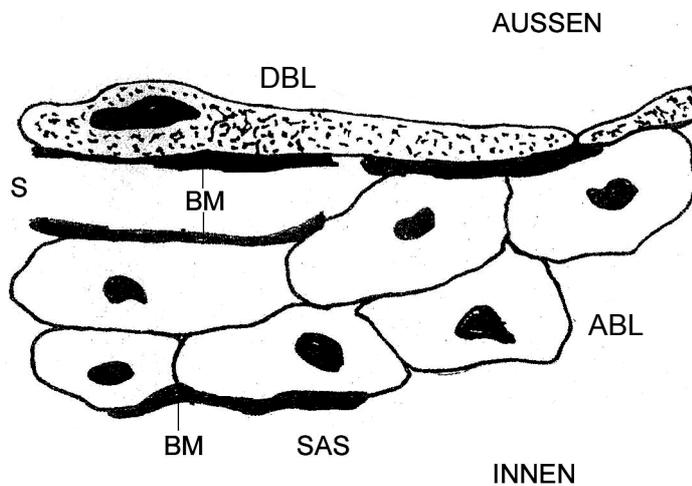


Abb.3: Struktur und extrazelluläre Matrix der Arachnoidea (modifiziert nach Lopes und Mair, 1974a). S: Raum zwischen Duragrenzschicht und Arachnoideagrenzschicht; DBL: dural border layer; ABL: arachnoid barrier layer; BM: Basalmembran; SAS: Subarachnoidal space

1.2.2.3 Die pial-gliale Grenzbasalmembran

Die Pia mater ist eine einzelne fenestrierte Zelllage, die die pial-gliale Grenzbasalmembran überzieht (Abb.4). Diese Basalmembran wird von der Membrana limitans gliae gebildet, ist unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich und bedeckt die gesamte Kortexoberfläche, ohne dabei zwischen die Astrozytenfortsätze zu dringen. Die Pia mater ist durch einen schmalen Subpialraum von dieser Basalmembran getrennt (Lopes und Mair, 1974b). Findet eine Trennung zwischen Membrana limitans gliae und Pia mater statt, bleibt die pial-gliale Grenzbasalmembran stets an der Membrana limitans gliae haften (Waggener und Beggs, 1967).

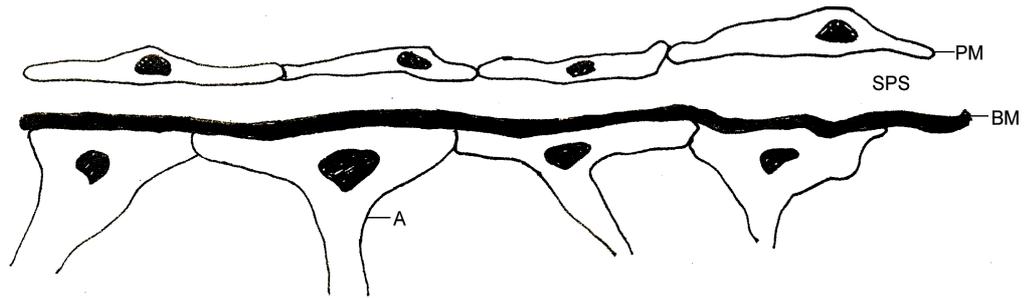


Abb.4: Pia mater und Kortexoberfläche (modifiziert nach Peters et al., 1991).
 PM: Pia mater; SPS: Subpial space; BM: pial-gliale Grenzbasalmembran; A:
 Astrozytenfortsätze der Membrana limitans gliae

1.3 Die extrazelluläre Matrix der Meningeome

Meningeome stammen von Arachnoideazellen ab. Diese können unter physiologischen und pathologischen Bedingungen Bestandteile der extrazellulären Matrix herstellen (Nitta et al., 1990). Sowohl normale leptomeningeale Zellen als auch Meningeomzellen synthetisieren *in vitro* Kollagen IV und andere Basalmembranbestandteile (Rutka et al., 1986). Basalmembran wird sowohl an Blutgefäßen als auch an der Oberfläche von Lobuli exprimiert und trennt diese von fibrösen Septen und dem perivaskulären Virchow-Robin-Raum. Meningotheliomatöse Meningeome exprimieren innerhalb der Pseudosynzition interzellulär keine Basalmembran (Nitta et al., 1990).

1.4 Basalmembran- Morphologie und Funktion

Die Basalmembran ist ein wichtiges Strukturelement der extrazellulären Matrix (Martinez-Hernandez und Amenta, 1983). Sie kommt im gesamten menschlichen Körper vor und trennt epitheliale Zellen von Bindegewebe (Rutka et al., 1988). Basalmembran verleiht mechanische Stabilität, hält die Polarität und Organisation epithelialer Zellen aufrecht und nimmt Einfluss auf Proliferation und Differenzierung von Zellen, Adhäsion, Migration und Genexpression (Lohi, 2001). Strukturelle Komponenten, die ausschliesslich in der Basalmembran zu finden sind, sind Kollagen IV und Laminin (Barsky et al., 1983). Kollagen IV, ein nicht-fibrilläres Kollagen, ist der Hauptbestandteil der Lamina densa und für die normale Struktur der Basalmembran zuständig (Rutka et al., 1986). Laminin, Fibronectin und Tenascin sind Molekü-

le, welche die Bindung von Zellen an die Basalmembran ermöglichen (Lohi, 2001). Im zentralen Nervensystem ist die Basalmembran wichtig für den Erhalt der normalen Struktur und Funktion. Sie ist beteiligt an pathologischen Vorgängen wie neoplastischen Prozessen. Als pial-gliale Grenzbasalmembran und als vaskuläre Basalmembran unterscheidet sie sich nicht von der im übrigen Körper vorkommenden Basalmembran (Rutka et al., 1988).

1.5 Fragestellung

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Meningeome sowohl im biologischen Verhalten als auch histomorphologisch heterogen sind. Es bestehen wenige klare Forschungsergebnisse in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Proliferation, histologischen Merkmalen, Cytogenetik und den prognostischen Wert dieser Parameter. Uns interessiert im Speziellen die Pathogenese der Hirninvansion in histomorphologisch benignen Meningeomen. Die Rolle der extrazellulären Matrix im Invasionsmechanismus von Meningeomen bleibt unklar. Dieser Arbeit liegt die Fragestellung zugrunde, ob es spezifische histomorphologische Kriterien gibt, die unabhängig von histologischem Subtyp und WHO-Grad mit aggressivem Tumorwachstum und Invasion an der Hirn-Tumor-Grenze einhergehen. Dies wollen wir durch mikroskopische Beurteilung der Hirn-Tumor Grenze in situ untersuchen. Dabei beschränken wir uns auf benigne Tumoren WHO Grad I und den meningotheiomatösen Subtyp. Wir gehen so vor, um hirninvasive mit nicht-hirninvasiven Meningeomen unabhängig von Malignitätsgrad oder Subtyp zu vergleichen. Dadurch schließen wir den Einfluss atypischer oder anaplastischer Meningeome auf das Invasionsverhalten aus. Unsere Einteilung beinhaltet Kategorie I (hirninvasive Meningeome), Kategorie II und III (nicht-invasive Meningeome mit oder ohne anhängendem Hirngewebe). Um die Mechanismen der Hirninvansion bei Meningeomen besser erklären zu können, müssen sie vor den Hintergrund der Struktur der Meningen, der Kortexoberfläche und deren extrazellulären Matrix gestellt werden. Diese Arbeit geht von der Hypothese aus, dass ein hirninvasives Meningeom die pial-gliale Basalmembran zerstören muss. Durch den Einsatz des Kollagen IV Antikörpers wollen wir das Ausmaß der Degradation der Basalmembran

zwischen Tumor und Hirn untersuchen. Dabei berücksichtigen wir das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Tumorinvasion. Die Proliferationsrate untersuchen wir mittels des MIB-1 Antikörpers, um zu überprüfen, ob eine heterogene Verteilung von proliferierenden Zellen im Sinne eines erhöhten MIB-1 Index an der Invasionsgrenze aufzufinden ist. Der Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) dient uns dazu, häufiger auftretende Verteilungsmuster von ektodermalen Zellen zu charakterisieren. Durch die GFAP-Färbung untersuchen wir, ob bei mikroskopischer Tumorinvasion die gliotische Reaktion des Hirngewebes stärker ausfällt oder ob man von genereller Astrozytose des benachbarten ZNS-Gewebes bei Vorhandensein eines Meningeoms ausgehen kann.

2 METHODEN

2.1 Patientendaten

Wir wählten aus dem Gewebearchiv des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen 49 Meningeome als in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus. Um den Einfluß atypischer oder anaplastischer Meningeome auf das Invasionsverhalten auszuschließen, verwendeten wir nur anhand histopathologischer Kriterien als WHO Grad I eingestufte Meningeome. Des Weiteren beschränkten wir uns auf intrakranielle Meningeome des meningothelomatösen Subtyps. Das Gewebe war intraoperativ in den neurochirurgischen Abteilungen der Universitätsklinik Tübingen (Prof. Dr. Grote) und der Asklepios Klinik in Seesen (Dr. Wickboldt) in den Jahren 1996-2003 entnommen worden (Tabelle 1 im Anhang). Die Gewebeproben stammen von 18 männlichen Patienten im Alter von 41 bis 82 Jahren und 31 weiblichen Patientinnen im Alter von 29 bis 80 Jahren, das Verhältnis männlich zu weiblich beträgt 1:1,7. Der Altersdurchschnitt der Patienten liegt bei 62 Jahren (männlich) und 59,6 Jahren (weiblich). Anhand von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen beurteilten wir, ob Hirngewebe im Schnitt vorhanden ist und ob dieses durch den Tumor infiltriert ist. Aus der Auswertung ergab sich, dass 21 der 49 Meningeome eine Hirninfiltration aufweisen. Die Meningeome wurden anhand dieser Befunde in drei Gruppen eingeteilt:

- Gruppe I: 21 Meningeome, Hirninfiltration vorhanden.
 14 weiblich (37-79 J., Durchschnitt 59,8 J.)
 7 männlich (44-65 J., Durchschnitt: 55,1 J.)
- Gruppe II: 20 Meningeome, Hirngewebe im Präparat vorhanden, jedoch nicht infiltriert.
 13 weiblich (40- 80 J., Durchschnitt 60,6 J.)
 7 männlich (54-82 J., Durchschnitt 70 J.)
- Gruppe III: 8 Meningeome ohne vorhandenes Hirngewebe im Präparat.
 4 weiblich (29-74 J., Durchschnitt 55,8 J.)
 4 männlich (41-80 J., Durchschnitt 60 J.)

2.2 Material

2.2.1 Herstellung der histologischen Präparate

Von den Paraffinblöcken wurden an einem Mikrotom (2040, Leica) 3 µm dicke Präparate gefertigt, diese auf silanbeschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37° getrocknet.

2.2.2 Antikörper

2.2.2.1 Primärantikörper

Antikörper sind Eiweißstoffe aus der Immunglobulinfraktion, die spezifische Bindungen zu Antigenen eingehen. Monoklonale Antikörper erkennen nur ein Epitop eines Antigens und reagieren daher sehr spezifisch.

EMA (Epitheliales Membran-Antigen): Färbt Zellen epithelialen Ursprungs an, in diesem Falle Arachnoideadeckzellen. Monoklonaler (mouse-anti-human) EMA-Antikörper, Klon E29, Verdünnung 1:50. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

GFAP (Gliafaserprotein): Färbt die Intermediärfilamentproteine von Astrozyten an, soweit diese nicht unter der immunhistochemischen Nachweisgrenze liegen. Polyklonaler (rabbit-anti-bovine) Saurer-Gliafaserprotein-Antikörper, Verdünnung 1:500. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

Kollagen IV : Färbt Kollagen IV, einen Hauptbestandteil der Basalmembran an. Monoklonaler (mouse-anti-human) Kollagen IV-Antikörper, Klon CIV22, Verdünnung 1:200. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

MIB-1: Proliferationsindex, Ermittlung des Ki-67-Index (nukleäres Protein) Monoklonaler (mouse-anti-human) Protein Ki-67-Antikörper, Klon MIB-1, Verdünnung 1:100. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

2.2.2.2 Sekundärantikörper

Brückenantikörper zur AB-Methode

Polyklonale Anti-Kaninchen (swine-anti-rabbit) Immunglobuline, biotinyliert F (ab')², affinitätsisoliert, Verdünnung 1:400. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

Polyklonale Anti-Maus (rabbit-anti-mouse) Immunglobuline, biotinyliert F (ab')², affinitätsisoliert, Verdünnung 1:400. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

Brückenantikörper zur indirekten Peroxidase-Methode

Polyklonale Anti-Maus (rabbit-anti-mouse) Immunglobuline, HRP (horseradish-protein)-konjugiert (Peroxidasekonjugat), Verdünnung 1:100. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

2.2.3 Farbstoffreagenzien

Avidin-Biotin-Komplex: Reagenzien: Je 5 µl Avidin (Reagenz A) und 5 µl biotinylierte Meerrettichperoxidase (horseradish, Reagenz B) wurden mit 1ml Tris-buffered saline (TBS)-Gebrauchslösung mindestens 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt. Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

DAB: 60 mg DAB (3,3 Diaminobenzidintetrahydrochlorid, Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden in 180 ml Aqua dest. gelöst, danach wurden 20 ml Substratpuffer-Stammlösung, 34 gr Imidazol (Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim) und 29,2 gr NaCl (Quelle: Merck, Darmstadt) hinzugefügt, die Lösung mit aqua dest. bei pH =7,0 auf 500 ml aufgefüllt und 66,6 µl H₂O₂ dazugegeben. Die DAB-Lösung wurde vor Gebrauch filtriert.

2.2.4 Lösungen

Citratpuffer-Gebrauchslösung

Lösung A: 21,1 gr Zitronensäure-Monohydrat (Quelle: Merck, Darmstadt) gelöst in 1000 ml aqua dest. =0,1 M

Lösung B: 29,41 gr Natriumcitrat (tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Quelle: Merck, Darmstadt) gelöst in 1000 ml aqua dest. =0,1 M
500 ml Zitratpuffer-Gebrauchslösung, bestehend aus 7 ml Lösung A, 43 ml Lösung B und 450 ml aqua dest wurde auf pH=6 eingestellt.

Protease-Lösung (0,05%)

100 mg Protease (Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde in 200 ml TBS-Gebrauchslösung gelöst.

Schweineserum

Schweineserum (Quelle: Biochrom(Seromed), Berlin) wurde 1:10 mit 0,1% TBS-Gebrauchslösung verdünnt.

Substratpuffer-Stammlösung (10fach)

21 gr Zitronensäure- Monohydrat (Quelle: Merck, Darmstadt), 34 gr Imidazol (Quelle: Sigma- Aldrich, Steinheim) und 29,2 gr NaCl (Quelle: Merck, Darmstadt) wurden in 500 ml aqua dest. gelöst. Kontrolle des pH-Wertes (7,0).

TBS-CaCl₂-Stammlösung

7,35 gr CaCl₂ (Quelle: Serva, Heidelberg) wurde in 500 ml TBS-Stammlösung gelöst und mit Tris-Puffer auf pH=8,0 eingestellt.

TBS-Gebrauchslösung

TBS-Stammlösung wurde mit aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

TBS-Stammlösung

60,6 gr Tris-BSA-Puffer und 163,6 gr NaCl wurden in 1500 ml aqua dest. gelöst und mit 25% HCl auf pH=7,5 eingestellt. Danach wurde die Lösung mit aqua dest. auf 2 l aufgefüllt.

Tris-BSA-Puffer

100 mg von 0,01% Albumin (Albumin bovine fraction V, Quelle: Serva, Heidelberg) wurde in 100 ml TBS-Gebrauchslösung gelöst.

Trypsin-Lösung

50 mg Trypsin (Quelle: Serva, Heidelberg) wurde in 90 ml aqua dest. gelöst und 10 ml TBS-CaCl₂-Stammlösung hinzugefügt.

2.2.5 Chemikalien

Erythrosin B (Eosin): Quelle: Merck, Darmstadt

H₂O₂ (30%): Quelle: Merck, Darmstadt

Hämatoxylin: Gill 3 Hämatoxylin, Quelle: Shandon Inc., Pittsburgh, USA

HCl/Ethanol: 100 ml 70% Ethanol und 1 ml 25% HCL (Quelle: Merck, Darmstadt)

HICO-MIC: Permanentes Mikroskopier-Einschlussmittel, Quelle: Hirtz & Co., Köln

Methanol: Quelle: Merck, Darmstadt

2.3 Methoden

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Entparaffinieren: Zum Entparaffinieren wurden die Präparate für jeweils 10 Minuten in 3 verschiedene Xylol-Küvetten eingebracht, danach in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (jeweils 2 Minuten 100°-100°-96°-70°), 5 Minuten in Leitungswasser und kurz in aqua dest. gespült.

Färben: Das Tumorgewebe wurde für eine Minute in Hämalaun (Quelle: Merck, Darmstadt) belassen, 10 Minuten in Leitungswasser und danach kurz in aqua dest. gespült und für 1 Minute in Erythrosin (Erythrosin B, Quelle: Merck, Darmstadt) eingebracht.

Fertigstellen: Die Gewebsschnitte wurden zur Dehydratation durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen (70°-96°-100°-100°), wobei sie für eine

Minute in der letzten Küvette belassen wurden. Danach wurden sie wieder für jeweils eine Minute in 3 Xylol-Küvetten eingebracht und mit dem Einschussmittel HICO-MIC eingedeckelt.

2.3.2 Immunhistochemie

2.3.2.1 Vorbehandlung

Entparaffinieren: Um ein Freilegen der Epitope im Gewebe gewährleisten zu können, wurden die Gewebeproben zum Entparaffinieren für jeweils 10 Minuten in 3 verschiedene Chloroform-Küvetten eingebracht.

Rehydrieren: Einbringen in eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 2 Minuten (100°-100°-96°-70°).

Spülen: Spülen für 5 Minuten in Leitungswasser und anschließend Spülen in aqua dest.

Demaskieren: Um die Epitope im Gewebe für die Antikörperbindung freizulegen, ist eine Vorbehandlung notwendig. Die für die Kollagen IV-Färbung bestimmten Schnitte wurden für 10 Minuten in Trypsin-Lösung eingebracht und dabei im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die zur EMA-Färbung bestimmten Gewebeproben wurden für 15 Minuten in Trypsin-Lösung eingebracht und dabei im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Für die MIB-1-Färbung wurden die Präparate in einer bis zum Rand mit Citratpuffer-Gebrauchslösung gefüllten Küvette für 2x10 Minuten bei 1000 Watt in der Mikrowelle erhitzt und danach zum Abkühlen für 30 Minuten aus der Mikrowelle entnommen.

Blockierung der endogenen Peroxidase: Um zu verhindern, dass das Chromogen mit der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase reagiert, muss diese blockiert werden. Dazu wurde eine Küvette mit 10 ml H₂O₂, das in 200 ml Methanol gelöst war, gefüllt und auf einen Rüttler gestellt. Die Gewebeschnitte wurden in die Küvette eingebracht und jeweils 15 Minuten in der Lösung belassen.

Spülen: Die Präparate wurden 5 Minuten in Leitungswasser und danach in aqua dest. gespült. Danach wurden sie für mindestens 5 Minuten noch einmal in TBS-Gebrauchslösung eingebracht. Die Präparatträger wurden auf Coverplates (Quelle: Shandon inc., Pittsburgh, USA) aufgespannt, um beim Färben eine gleichmäßige Drainage zu gewährleisten.

Blockierung

Um ein unspezifisches Anfärben des Gewebes zu verhindern, müssen die elektrostatischen Ladungen im Gewebe abgesättigt werden. Dazu wurden auf jeden Träger 100 µl Blockierungslösung (Schweineserum) pipettiert und diese für 15 Minuten inkubiert.

2.3.2.2 Immunhistochemische Färbung

Antikörper

Bei der indirekten Immunhistochemie wird der spezifische, unkonjugierte Primärantikörper direkt an das nachzuweisende Antigen gebunden. In einem zweiten Schritt verbindet sich der mit einem Markerenzym konjugierte Sekundärantikörper, der spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist, mit dem Primärantikörper. Für die Avidin-Biotin-Methode ist der Sekundärantikörper biotinyliert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, dessen freie Avidinbindungsstellen mit dem freien Biotin des Sekundärantikörpers reagieren. Avidin, ein Eiweißglykoprotein, hat die Fähigkeit, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Für die Indirekte-Peroxidase-Methode ist das Markerenzym Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish-protein) bereits an den Sekundärantikörper gebunden. Die Peroxidase des AB-Komplexes und des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers werden mit dem Chromogen DAB sichtbar gemacht. Zu jedem Primärantikörper wird eine Positivkontrolle mitgeführt, um die Sensitivität der Methode zu überprüfen. Für die GFAP-Färbung benutzten wir dafür Gewebe von einem Patienten mit cerebraler Amyloid-Angiopathie mit Leukencephalopathie, für die Kollagen IV-Färbung Gewebe von einem Glioblastom Grad IV WHO, für die MIB-1-Färbung Gewebe von einer Rund-Zell-Liposarkom-Metastase und für die EMA-Färbung

embryonale Haut. Zur Prüfung der Spezifität führtem wir eine Isotypenkontrolle mittels gegen *Aspergillus niger* gerichteten IgG-Antikörpern durch. Für die Kollagen-IV- und die MIB-1 Färbung war dies IgG1, für die EMA-Färbung IgG2a. Für die GFAP-Färbung verwendeten wir Verdünnungsmedium.

Primärantikörper

Verdünnung:

EMA: Verdünnung 1:50

GFAP: Verdünnung 1:500

Kollagen IV: Verdünnung 1:400

MIB-1: Verdünnung 1:100

Auftragen: Auf die Objektträger wurden je 100 µl der Antikörperlösung pipettiert und diese eine Stunde inkubiert.

Spülen: Die Präparate wurden mit je 100 µl TBS-Gebrauchslösung gespült, um ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde 5 Minuten zugewartet. Dieser Schritt wurde nach Auftragen des Sekundärantikörpers und nach Auftragen des ABC-Komplexes wiederholt.

Sekundärantikörper

Auf die Objektträger wurden je 100 µl der Antikörperlösung aufpipettiert und diese für 30 Minuten inkubiert.

EMA und Kollagen IV: Biotinylierter Brückenantikörper rabbit-anti-mouse, 1:400 verdünnt.

GFAP: Biotinylierter Brückenantikörper swine-anti-rabbit, 1:400 verdünnt.

MIB-1: HRP (horseradish-protein)-konjugierter Brückenantikörper rabbit-anti-mouse, 1:100 verdünnt.

Avidin-Biotin-Komplex: Auf die Gewebsschnitte zur EMA-, GFAP- und Kollagen IV-Färbung wurden je 100 µl der AB-Komplex-Lösung aufpipettiert und diese für 30 Minuten inkubiert. Nach dem letzten Spülvorgang wurden die Objektträger von den Coverplates abgespannt und für mindestens 5 Minuten in eine Küvette mit TBS-Gebrauchslösung eingebracht.

Färben

DAB (Diaminobenzidin) fungiert als Chromogen für HRP (horseradish-protein). Zusammen mit dem Substratpuffer und H_2O_2 bilden sie einen Farbkomplex.

DAB-Substratlösung: Die Präparate wurden in Küvetten mit DAB-Substratlösung eingebracht. Für die EMA-, GFAP- und MIB-1-Färbung wurden sie für 10 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert, die Kollagen IV-Schnitte jedoch nur für 2 Minuten, um eine starke Hintergrundfärbung zu vermeiden. Danach Spülen in Leitungswasser für 5 Minuten.

Hämatoxylin-Eosin: Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde das Gewebe für 5 Sekunden in Hämatoxylin-Eosin eingebracht, danach für 5 Minuten in Leitungswasser gespült.

Differenzieren:

Die Objektträger wurden für 20 Sekunden in HCl-Alkohol eingetaucht, danach wieder für 5 Minuten in Leitungswasser gespült.

Fertigstellen

Um das Gewebe zu dehydrieren, wurde es für jeweils 2 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe (70° - 96° - 100° - 100°) eingebracht. Danach wurden die Präparate für jeweils 2 Minuten in 3 verschiedenen Küvetten mit Xylol inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte mit dem Mikroskopier-Einschlussmittel HICO-MIC eingedeckelt.

3 ERGEBNISSE

Unsere Einteilung der Meningeome in 3 Kategorien berücksichtigt Vorhandensein von Hirngewebe im Präparat und Hirninvasion durch den Tumor. Das Vorhandensein von Hirngewebe im Operationspräparat könnte einen Hinweis darauf geben, dass Gefäßverbindungen von Hirn- und Tumorgewebe bestehen, der Subarachnoidalraum aufgehoben ist und das Meningeom sich daher operativ nicht vom Hirngewebe trennen ließ. Diese Einteilung geschah anhand von HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbungen. Als Hirninvasion werteten wir mikroskopische, in situ erkennbare Invasion im Sinne von Tumorzapfen, die in das ZNS-Gewebe hineinreichen und gänzlich von Hirngewebe umgebene Tumorstrukturen. Neuroradiologische oder neurochirurgische Befunde werteten wir nicht, um allein auf histologischer Basis auch Frühstadien zu erfassen.

- Kategorie I: Meningeome mit ZNS-Gewebe im Präparat, die eine Hirninvasion aufweisen (21 Exemplare). (Abb.5)
- Kategorie II: Meningeome mit ZNS-Gewebe im Präparat, die keine Hirninvasion aufweisen (20 Exemplare). (Abb.6)
- Kategorie III: Meningeome ohne ZNS-Gewebe im Präparat (8 Exemplare).

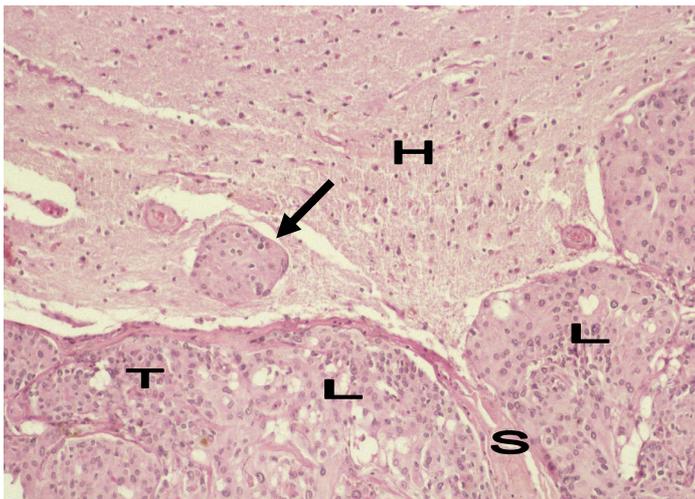


Abb.5 (Hämatoxylin-Eosin x100): Hirninvasion mit Tumorinseln (Pfeil) im ZNS-Gewebe. Das Tumorgewebe besteht aus Lobuli (L), die von kollagenösen Septen (S) umgeben werden. H= Hirngewebe, T= Tumor

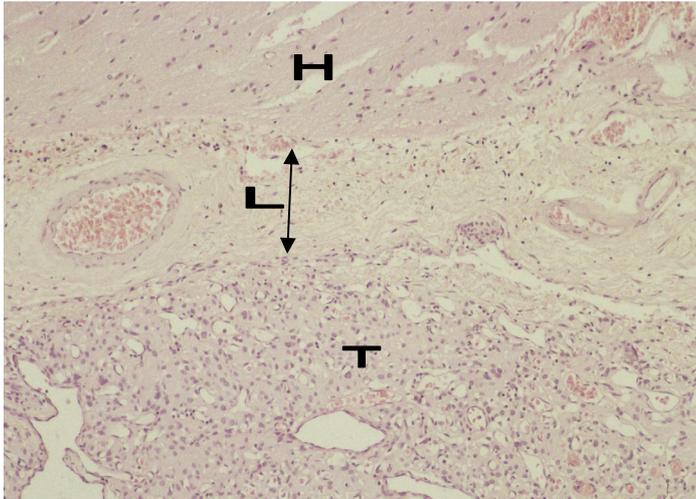


Abb.6 (Hämatoxylin-Eosin x100): Nicht-invasives Meningeom mit erhaltenen Leptomeningen (Pfeil). H=Hirngewebe, T=Tumor, L=Leptomeningen

Invasionsverhalten des Tumors

Wir überprüften Obliteration des Subarachnoidalraumes und mikroskopische Invasion in Leptomeningen und zentralnervöses Gewebe durch die Meningeome.

Der Subarachnoidalraum

Während des Invasionsprozesses dringen Meningeome in den zwischen Tumor und Hirn gelegenen Subarachnoidalraum. Im Falle eines weit fortgeschrittenen Invasionsprozesses ist der Subarachnoidalraum komplett aufgehoben, und Tumorgewebe grenzt direkt an zentralnervöses Gewebe. Diese komplette Obliteration des Subarachnoidalraumes besteht in 38,1% (8/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv), 10% (2/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) und keinem Exemplar der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendes Hirngewebe). Durchgehend vorhandene Leptomeningen oder eine kontinuierliche einlagige leptomeningeale Schicht besteht in keinem Exemplar, der Subarachnoidalraum ist immer fokal aufgehoben. Reste von Leptomeningen konnten wir in 38,1% (8/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv) auffinden. In (5/21) Meningeomen dieser Kategorie (23,8%) wiesen wir fokal eine einlagige leptomeningeale Schicht nach. In den Meningeomen der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) sind in 55% (11/20) noch Reste

von Leptomeningen vorhanden. In 35% (7/20) besteht fokal eine einlagige leptomeningeale Schicht. In den Meningeomen der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe) fanden wir in 37,5% (3/8) eine einlagige leptomeningeale Schicht und in 62,5% (5/8) Reste von Leptomeningen. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Subarachnoidalraum durch die Invasion stark beeinträchtigt, oft sogar komplett aufgehoben ist, jedoch auch in nicht-invasiven Meningeomen verschmälert sein kann.

Invasion der Leptomeningen

Invasives Wachstum zeichnet sich durch in die Leptomeningen hineinragende Tumorzapfen und abgelöste Tumorinseln in den Leptomeningen aus. Auch diffuse Invasion durch disseminierte Tumorzellen existiert. Das Tumorgewebe erscheint hierbei mit dem leptomeningealen Gewebe verwachsen. 61,9% (13/21) der Meningeomen der Kategorie I (hirninvasiv) weisen teilweise erhaltenen Subarachnoidalraum und Leptomeningen auf. Die verbliebenen Leptomeningen sind in 100% der Fälle (13/13) von Tumor infiltriert. Meningeome der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) weisen zu 90%(18/20) erhaltene Leptomeningen auf, auch hier besteht in 100% der Fälle (18/18) eine Tumordinvasion in verbliebenes leptomeningeales Gewebe. Meningeome der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendes Hirngewebe) weisen in 100% der Fälle leptomeningeales Gewebe an der Tumoroberfläche auf, das in 87,5% (7/8) der Fälle von Tumorgewebe invadiert ist. In einem Fall (12,5%) lässt sich keine Invasion der Leptomeningen nachweisen, das Tumorgewebe wird frontartig von den Leptomeningen zurückgehalten. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass fast alle Meningeome durch Invasion der Leptomeningen charakterisiert sind, auch jene die nicht hirninvasiv sind.

Invasion des zentralnervösen Gewebes

Hirninvasion durch Meningeome existiert als Invasion durch Zapfen, die vom Tumorgewebe ausgehend in das ZNS hineinragen und teilweise von Hirngewebe eingeschlossen sind (Abb.5, 17-18). In Meningeomen der Kategorie I (hirninvasiv) lässt sich in 100% (21/21) der Fälle Hirninvasion nachweisen,

in 95,2% (20/21) sind komplett von Hirngewebe umgebene Tumorstrukturen vorhanden.

In Tumor eingeschlossenes Hirngewebe

Neben Tumoranteilen im Hirngewebe wiesen wir auch Hirngewebsinseln, die durch den Invasionsprozess in Tumorgewebe eingeschlossen sind, nach (Abb.22). Diese Hirngewebsinseln fanden wir in 19% (4/21) der hirninvasiven Meningeome (Kategorie I).

3.1 MIB-1

Wir verwendeten MIB-1 als Antikörper, um den Proliferationsindex der Meningeome abzuschätzen. MIB-1 wird in den Zellkernen proliferierender Zellen exprimiert, der MIB-1-Index fließt nicht in das WHO-Grading mit ein. Wir wollten die Proliferationsindices der drei verschiedenen Kategorien und die Korrelation zwischen Proliferationsindex und Hirninvasivität überprüfen. Des Weiteren interessierte uns, ob das Muster MIB-1 positiver Tumorzellen homogen verteilt ist oder ob invadierende Tumorstrukturen stärker proliferieren. Wir nahmen eine semiquantitative Abschätzung des MIB-1 Scores vor, indem wir die MIB-1 Raten in die Gruppen unter 1%, 1-2%, bis zu 5%, bis zu 10% und über 10% einteilten. In jeder Kategorie demonstrieren die meisten Meningeome Proliferationsraten unter 1% (Abb.7). Ungewöhnlich hohe Werte von bis zu 10% oder darüber (Abb.8) treten selten auf und sind in hirninvasiven Tumoren nicht häufiger aufzufinden. In Kategorie I (hirninvasive Meningeome) exprimieren 61,9% (13/21) der Meningeome MIB-1 Raten von <1%, 14,3% (3/21) Raten von 1-2% und 23,8% (5/21) Raten von bis zu 5%. Höhere Proliferationsindices sind nicht nachzuweisen. In Kategorie II (nicht-hirninvasive Meningeome mit anhängendem Hirngewebe) exprimieren 40% (8/20) der Meningeome MIB-1 Raten von <1%, 5% (1/20) Raten von 1-2%, 35% (7/20) Raten von bis zu 5% und 10% (2/20) Raten von bis zu 10%. Weitere 10% (2/20) weisen Raten von über 10% auf. Ein Exemplar weist einen MIB-1 Index von bis zu 15% und ein weiteres einen Index von bis zu 30% auf. Auch in Kategorie III (nicht-hirninvasive Meningeome ohne anhängendem Hirngewebe) exprimieren 50% (4/8) der Meningeome MIB-1 Raten

unter 1%. 12,5% (1/8) weisen Raten von 1-2%, 25% (2/8) Raten von bis zu 5% und ein Exemplar (12,5%) einen Index von bis zu 10% auf.

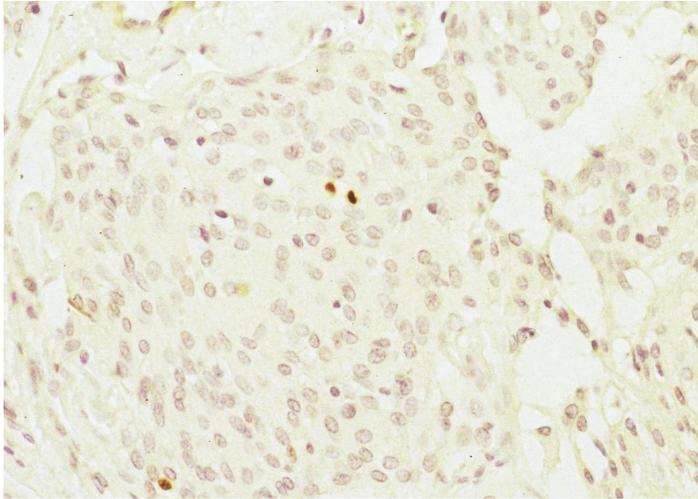


Abb.7 (MIB-1 x400): MIB-1 Rate unter 1% in Meningeom der Kategorie I (hirninvativ)

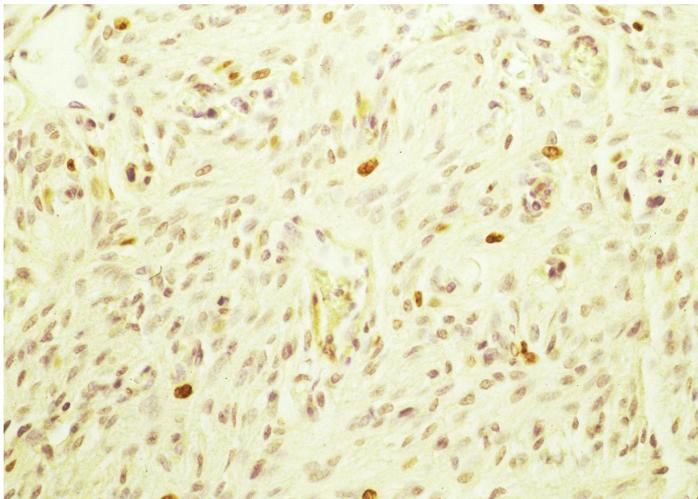


Abb.8 (MIB-1 x400): MIB-1 Rate bis zu 10% in Meningeom der Kategorie II (nicht-hirninvativ mit anhängendem Hirngewebe)

Das Verteilungsmuster der MIB-1 positiven Zellen lässt keine quantitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorarealen erkennen. Proliferierende Zellen sind im gesamten Tumor homogen verteilt und konzentrieren sich nicht an der Invasionsgrenze. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der MIB-1 Index in den verschiedenen Meningeomen unseres Patientengu-

tes variabel ist und unter den invasiven Meningeomen keine höheren Raten zu verzeichnen sind. Auch innerhalb des Tumorgewebes stellten wir keine Steigerung der Proliferationsrate in invasiven Tumorarealen fest.

3.2 EMA

Wir verwendeten EMA (Epitheliales Membran-Antigen), einen spezifischen Antikörper für Gewebe epithelialen Ursprungs, um zu untersuchen, ob dieses Antigen in allen Tumorzellen vorhanden ist und um vorhandene Verteilungsmuster zu charakterisieren. Alle Meningeomgewebe ließen sich mit dem epithelialen Membran-Antigen EMA anfärben, sowohl invasive als auch nicht-invasive Exemplare. Wir konnten kein komplett EMA-negatives Meningeom nachweisen. Es ließen sich bestimmte Verteilungsmuster charakterisieren. Ein häufig auftretendes Merkmal ist das komplementäre Muster (Abb.9).

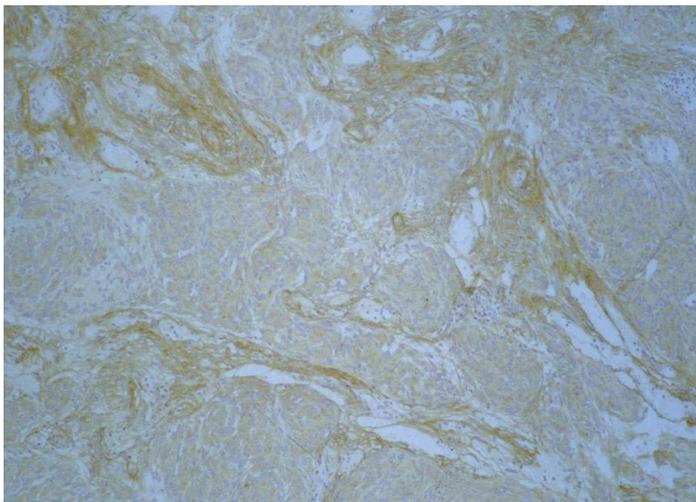


Abb.9 (EMA x200): Komplementäres Verteilungsmuster in nicht-invasivem Meningeom (Kategorie II)

Stark angefärbte Zellgruppierungen wechseln mit schwächer angefärbten Tumorarealen in einem groben Muster ab. Andere Meningeome weisen ein diffuses Verteilungsmuster auf. In Kategorie I (hirninvase Menigeome) demonstrieren 76,2% (16/21) der Meningeome ein komplementäres und 23,8% (5/21) ein diffuses Muster. In Kategorie II (nicht-hirninvase mit anhängendem Hirngewebe) zeigen 75% (15/20) ein komplementäres und 25%

(5/20) ein diffuses Muster. 62,5% (5/8) der Meningeome der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe) weisen ein komplementäres und 37,5% (3/8) ein diffuses Muster auf. Unterschiede zwischen stärker und schwächer angefärbten Tumorbereichen ergeben sich auch zwischen Lobuli und bindegewebigen Septen (Abb.10).

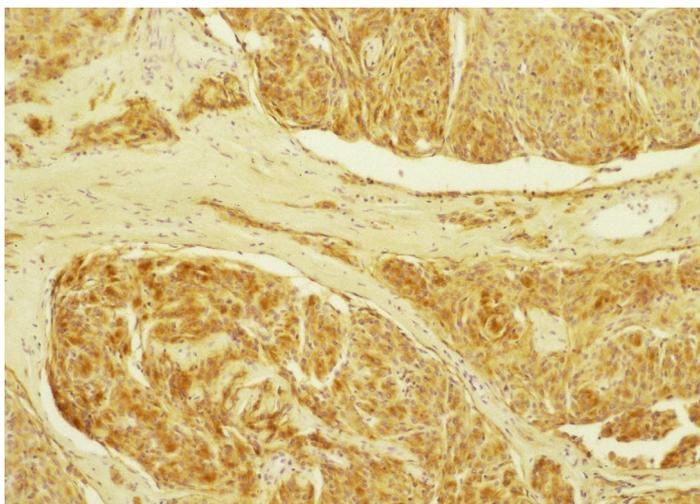


Abb.10 (EMA x100): Stärkere Anfärbung der Lobuli in hirninvasivem Meningeom (Kategorie I)

Keinen Unterschied diesbezüglich zeigen 47,6% (10/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasive Meningeome), 65% (13/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) und 62,5% (5/8) der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe). Die Septen sind in 23,8% (5/21) der Meningeome der Kategorie I, 25% (5/20) der Kategorie II und 25% (2/8) der Kategorie III stärker angefärbt. In 28,6% (6/21) der Meningeome der Kategorie I, 10% (2/20) der Kategorie II und 12,5% (1/8) der Kategorie III sind die Lobuli stärker angefärbt.

In 61,9% (13/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasive Meningeome), 60% (12/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) und 37,5% (3/8) der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe) ergibt sich aus der Übersicht des gesamten Tumorgewebes kein Unterschied in der EMA-Färbeintensität zwischen dem Zentrum der Pseudolobuli und deren Peripherie. Ein Gefälle der EMA-Färbeintensität im Sinne einer stärkeren Anfärbung in der Peripherie der

Lobuli mit kontinuierlicher Abschwächung zum Zentrum der Lobuli hin beobachtet werden in 23,8% (5/21) der Meningeome der Kategorie I, 25% (5/20) der Kategorie II und 25% (2/8) der Kategorie III (Abb.11).



Abb.11 (EMA x50): Gefälle der Färbintensität von außen nach innen in nichtinvasivem Meningeom (Kategorie II)

Ein entgegengesetztes Gefälle mit einer stärkeren Anfärbung zentral in den Lobuli im Vergleich zu einer schwächer angefärbten Lobulusperipherie zeigt sich in 14,3% (3/21) der Meningeomen der Kategorie I, 15% (3/20) der Kategorie II und 37,5% (3/8) der Kategorie III.

Wirbel und Psammomkörper sind in 38,1% (8/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvase Meningeome), 30% (6/20) der Kategorie II (nicht-hirninvase mit anhängendem Hirngewebe) und 37,5% (3/8) der Kategorie III (nicht-hirninvase ohne anhängendem Hirngewebe) im Vergleich zum umliegenden Tumorgewebe stärker angefärbt (Abb.12).

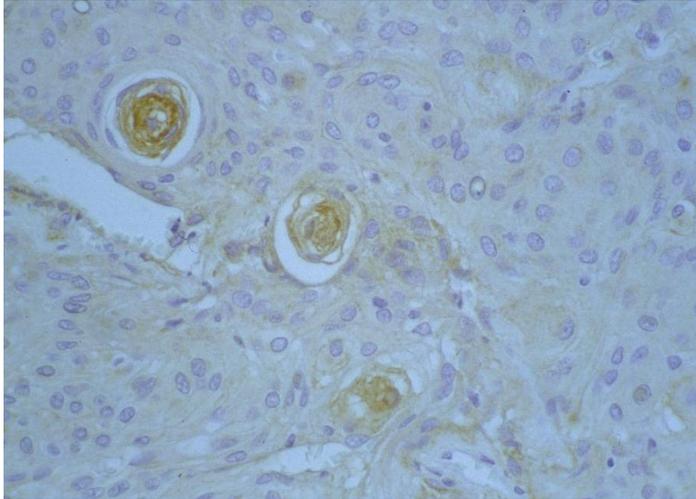


Abb.12 (EMA x400): Anfärbung der Psammomkörper in hirninvasivem Meningeom (Kategorie I)

In 10% (2/20) der Meningeome der Kategorie II sind Wirbelformationen schwächer als der Rest des Tumorgewebes angefärbt.

Die Oberfläche der einzelnen Meningeome, definiert als die Grenze zum Subarachnoidalraum, ist in 76,2% (16/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasive Meningeome), 70% (14/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) und 50% (4/8) der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe) stärker angefärbt im Sinne eines schmalen Saumes stark EMA-positiver Zellen. In einem Meningeom der Kategorie I (5%) lässt sich ein stärker angefärbter Randsaum in jedem Lobulus nachweisen. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die EMA-Färbung variabel ist und keine wesentlichen Unterschiede zwischen invasiven und nicht-invasiven Meningeomen erkennen lässt.

3.3 Kollagen IV

Durch die Kollagen IV-Färbung überprüften wir, ob die Meningeome zusätzliche Produktion von Basalmembran (BM) im Tumorrinneren oder an der Tumoroberfläche aufweisen. Zusätzlich wollten wir prüfen, ob physiologisch vorhandene Basalmembran durch das Tumorstadium degradiert ist.

Wir konnten Produktion von Basalmembran im Tumorrinneren und an der Tumoroberfläche nachweisen. Diese Basalmembran findet sich größtenteils an oberflächlichen Tumorstrukturen. Unabhängig vom Invasionsverhalten

der Meningeome beobachteten wir Basalmembran an der dem Subarachnoidalraum zugewandten Tumoroberfläche und im Inneren der Tumore als Begrenzung der einzelnen Lobuli (Abb.13-14+16).

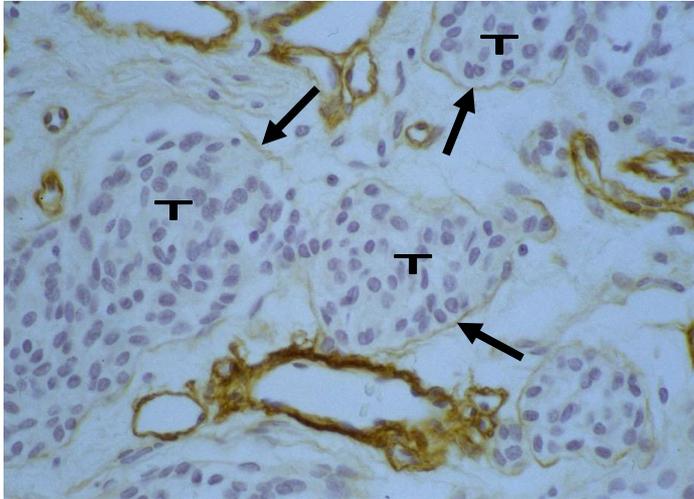


Abb.13 (Kollagen IV x400): Basalmembran (Pfeile) an der Oberfläche von Tumorlobuli (T) in hirninvasivem Meningeom (Kategorie I)

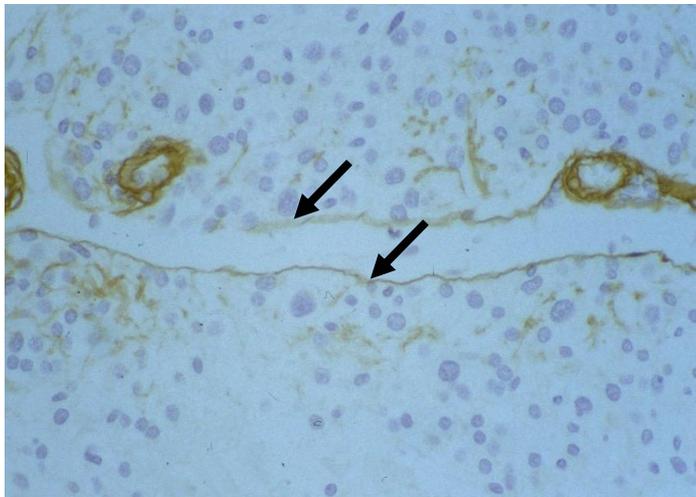


Abb.14 (Kollagen IV x400): Basalmembran (BM) an der Oberfläche von Lobuli (Pfeile) sowie an Blutgefäßen in hirninvasivem Meningeom (Kategorie I)

Kollagen IV grenzt die Tumorlobuli von perivaskulären Virchow-Robin-Räumen ab und trennt sie von interlobulären kollagenösen Septen. Dadurch scheint das Meningeomgewebe in ein Muster aus Tumorstroma (interlobulä-

re Septen) und Tumormatrix (Lobuli) eingeteilt. Basalmembran an der Oberfläche von Pseudosynzytien wiesen wir in 42,8% (9/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv), 20% (4/20) der Meningeome der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) und in 12,5% (1/8) der Meningeome der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe) nach. Dieses appositionelle Kollagen IV ist fokal vorhanden und weist eine dünne, unregelmäßige Struktur auf. Basalmembran von Blutgefäßen innerhalb des Tumors, im Subarachnoidalraum und im zentralnervösen Gewebe ist an keiner Stelle degradiert. Sie zeichnet sich durch eine durchgehende Kollagen IV-Reaktivität aus (Abb.14). In 5% (1/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv), 20% (4/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) und keinem Meningeom der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe) wiesen wir interstitielles Kollagen IV im Tumor nach. Dieses ist in einem retikulärem Muster zwischen den einzelnen Tumorzellen verteilt (Abb.15).

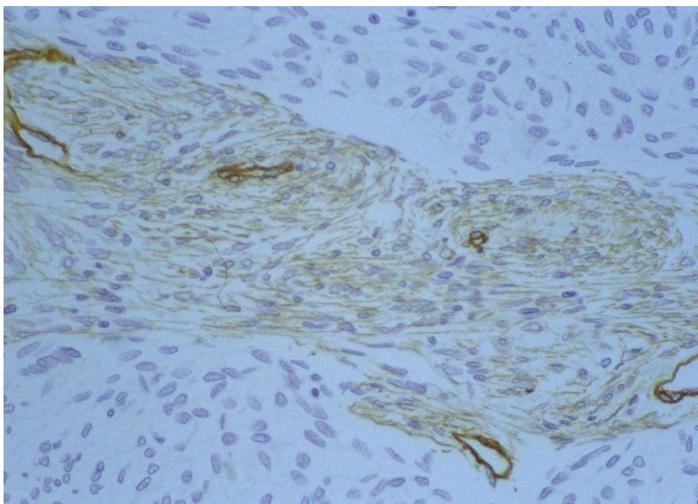


Abb.15 (Kollagen IV x400): Interzelluläre BM in nichtinvasivem Meningeom (Kategorie II).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Meningeome sich durch die Fähigkeit zur autonomen Basalmembranproduktion auszeichnen. Diese Produktion ist fakultativ. Es scheint kein Zusammenhang zum Invasionsverhalten des Tumors zu bestehen, da sowohl invasive als auch nicht-invasive Meningeome Basalmembran exprimieren.

Wir untersuchten die Hirn-Tumor-Grenze auf Degradation der pial-glialen Grenzbasalmembran bei mikroskopischer Hirninvasion. Des Weiteren wollten wir das Vorkommen von appositioneller Basalmembran an der Invasionsgrenze beschreiben.

Die pial-gliale Grenzbasalmembran

Die pial-gliale Grenzbasalmembran (Abb.16) als physiologisch vorkommende Basalmembran an der Kortexoberfläche ist in den Invasionsprozess der Meningeome involviert. Sie wird schon in Frühstadien der Invasion affektiert. Die pial-gliale Grenzbasalmembran kann verdünnt, fragmentiert sein oder sogar komplett fehlen. Diese Degradation findet lokal unter erkennbarem Einfluß von invadierenden Tumoranteilen (Abb.17+18) oder über weite Strecken statt. Zerstörung der pial-glialen Grenzbasalmembran findet auch bei nicht-invasiven Meningeomen statt. In 14,3% (3/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv) und 15% (3/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) lässt sich keine pial-gliale Grenzbasalmembran nachweisen. An der Hirn-Tumor-Grenze von 85,7% (18/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv) und 70% (14/20) der Meningeome der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) lässt sich fokal eine verdünnte, diskontinuierliche pial-gliale Grenzbasalmembran erkennen. In keinem Meningeom der Kategorie I (hirninvasiv) und 15% (3/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) lässt sich eine komplett erhaltene pial-gliale Grenzbasalmembran entlang der gesamten Hirnoberfläche verfolgen. In 87,5% (7/8) der Meningeome der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendem Hirngewebe) konnten wir aufgrund mangelnder Oberfläche das Vorhandensein der pial-glialen Grenzbasalmembran nicht beurteilen. In 12,5% (1/8) lässt sich eine fragmentierte Basalmembran erkennen.

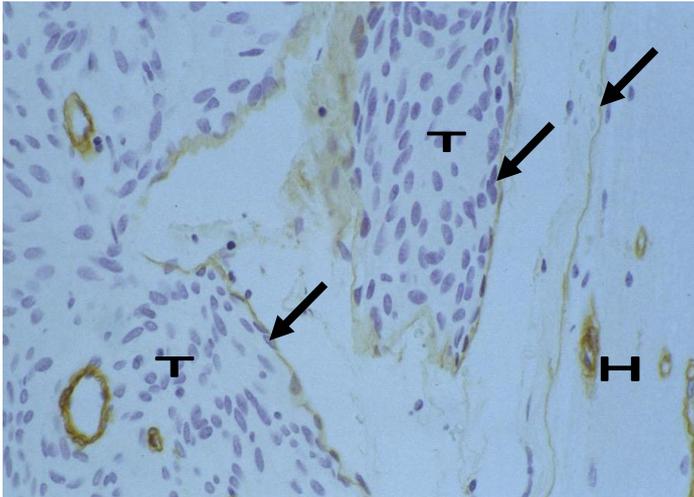


Abb.16 (Kollagen IV x400): Hirninvasives Meningeom (Kategorie I). Die pial-gliale Grenzbasalmembran (Pfeil re.) trennt das Gehirn (H) vom Tumor (T). Der Tumor weist hier eine zusätzliche Basalmembran auf (Pfeile Mitte+li.).

Ein Exemplar von Tumorzapfen schiebt eine doppelte, fokal degradierte Membran, bestehend aus pial-glialer Grenzbasalmembran und Tumorerflächenbasalmembran, vor sich her (Abb.17).

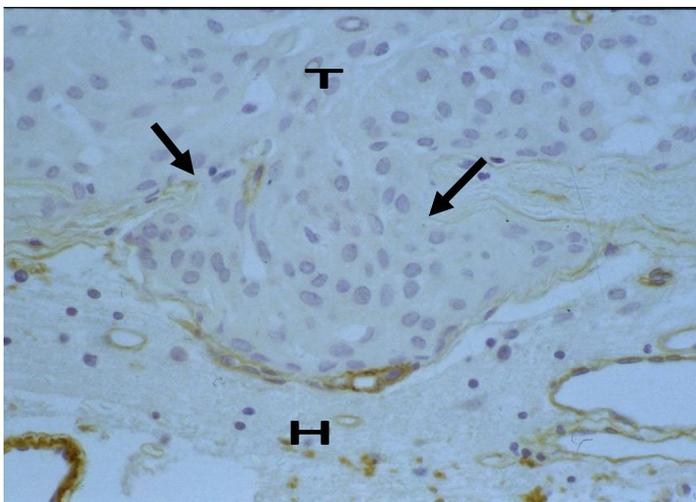


Abb.17 (Kollagen IV x400): Hirninvasives Meningeom (Kategorie I). Ein invading Tumorzapfen schiebt eine doppelte Basalmembran, bestehend aus pial-glialer Grenzbasalmembran und appositioneller Basalmembran, vor sich her. Diese Basalmembran ist fokal zerstört (Pfeile deuten auf Stellen mit Basalmembranabbruch). T= Tumor, H= Hirngewebe.

Pseudopodien stellen eine spezielle Form der Hirninvasion dar. Sie zerstören lokal die pial-gliale Grenzmembran und dringen in den subpialen Raum vor (Abb.18). Diese Pseudopodien fanden wir in 42,9% (9/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv).

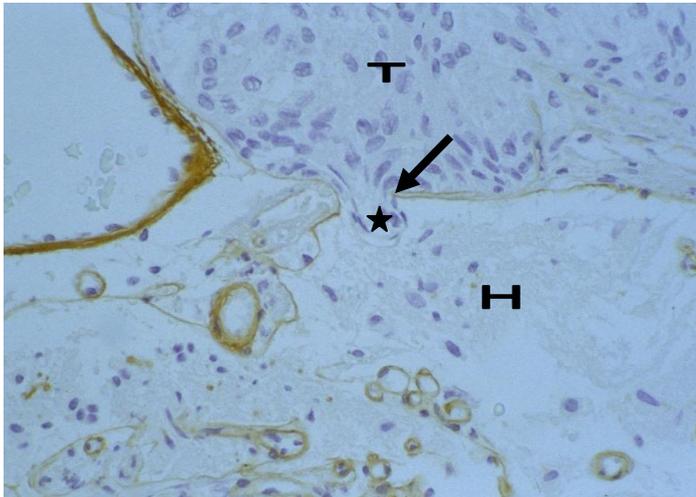


Abb.18 (Kollagen IV x400): Hirninvasives Meningeom (Kategorie I). Pseudopodium (Stern) im Subpialraum mit Zerstörung der doppelt vorhandenen Basalmembran (Pfeil: Abbruch der BM). T= Tumor, H= Hirn.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich Meningeome durch die Fähigkeit zur Zerstörung der pial-glialen Grenzbasalmembran auszeichnen. Dies kann ohne direkten Kontakt von Basalmembran und Tumorgewebe geschehen. Auch Meningeome ohne Hirninvasion weisen eine Zerstörung der pial-glialen Grenzbasalmembran auf. Die Kollagen IV-Färbung unterscheidet zwischen Invasion mit erhaltener Basalmembran und Invasion ohne erhaltener Basalmembran. Pseudopodienartige mikroinvasive Tumorausläufer degradieren fokale die pial-gliale Grenzbasalmembran.

Appositionelle Basalmembran an der Hirn-Tumor-Grenze

Wir wollten untersuchen, ob sich an der Hirn-Tumor-Grenze und in Invasionszonen appositionelle Basalmembran nachweisen lässt. Des Weiteren wollten wir überprüfen, ob Unterschiede zwischen invasiven und nicht-invasiven Meningeomen bestehen.

Meningeome zeichnen sich durch oberflächliche Basalmembranexpression aus. Diese tritt an der an der Grenze zum Subarachnoidalraum und an der Hirn-Tumor-Grenze auf (Abb.16). Dabei kann durch die direkte Beziehung zur pial-glialen Grenzbasalmembran das Bild einer doppelten Basalmembran entstehen. Diese Basalmembran an der Tumeroberfläche lässt sich in invasiven und nicht-invasiven Meningeomen nachweisen. Auch Tumorzapfen und Tumorzapfen im zentralnervösen Gewebe sind teilweise noch von Basalmembran bedeckt (Abb.17+19). Appositionelle Basalmembran ist in keinem Fall wie übliche Basalmembran als durchgehend Kollagen-IV-reaktive Struktur vorhanden, weder in invasiven noch in nicht-invasiven Meningeomen. Oberflächliche Basalmembran lässt sich in 76,2% (16/21) der Meningeome der Kategorie I (hirn-invasiv) und 90% (18/20) der Kategorie II (nicht-hirn-invasiv mit anhängendem Hirngewebe) nachweisen. In 33,3% (7/21) der Meningeome der Kategorie I (hirn-invasiv) mit komplett von Hirngewebe umgebenen Tumorstrukturen sind diese von verdünnter, diskontinuierlicher Basalmembran umgeben (Abb.19).

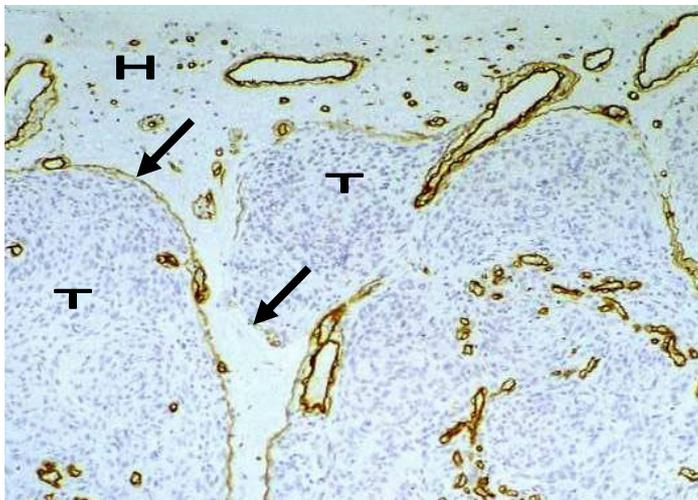


Abb.19 (Kollagen IV x200): Tumor (T) im Hirngewebe (H) ist teilweise von Basalmembran bedeckt (Pfeil li.). Der Pfeil rechts kennzeichnet eine Stelle ohne Basalmembran.

Durchgehend Kollagen-IV-negativ ist die Oberfläche von 23,8% (5/21) der Meningeome der Kategorie I (hirn-invasiv) und 10% (2/20) der Kategorie II

(nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe). Meningeome der Kategorie III (nicht-hirninvasiv ohne anhängendes Hirngewebe) weisen in 37,5% (3/8) Kollagen IV-Reaktivität an der Oberfläche auf. 62,5% (5/8) lassen keine Basalmembran an der Oberfläche erkennen. Sowohl invasive als auch nicht-invasive Meningeome exprimieren oberflächlich tumoreigene Basalmembran. Diese lässt sich durch Abgrenzung von der pial-glialen Grenzbasalmembran als tumoreigen definieren. Nicht nur die Tumoroberfläche, sondern auch invadierende Tumoranteile können von Basalmembran umgeben sein. Appositionelle Basalmembran ist im Gegensatz zu physiologisch vorhandener Basalmembran verdünnt, fragmentiert und in keinem Fall kontinuierlich.

3.4 GFAP

Wir wollten überprüfen, ob GFAP als Reaktion auf das Meningeom von den glialen Zellen verstärkt exprimiert wird und ob die Reaktion bei invasiven Meningeomen (Abb.20) im Vergleich mit nicht-invasiven Meningeomen (Abb.21) stärker ausfällt. Fast alle Meningeome der Kategorien I (hirninvasiv) und II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) lassen eine GFAP-Positivität des anhängenden ZNS-Gewebes erkennen. Dieses GFAP-positive gliale Gewebe ist als Saum an der Kortexoberfläche nachzuweisen. Nicht das gesamte miterfasste ZNS-Gewebe ist GFAP-reaktiv (Abb.21). Dies trifft auf 90,5% (19/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv) und 95% (19/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe) zu. In 26,3% (5/19) der Meningeome der Kategorie II ist dieser GFAP-positive Saum schmaler als in Meningeomen der Kategorie I (Abb.21). Reaktives Hirngewebe mit GFAP-positiven Astrozyten kann schmale, in die Tumorperipherie hineinragende Septen bilden. In hirninvasiven Fällen kann man dieses Phänomen mit Tumorgewebe in Zusammenhang setzen, das sich in zentralnervöses Gewebe hineingeschoben hat und dieses zwischen die Tumorzapfen einschließt. GFAP-Positivität der interlobulären Septen besteht in 61,9% (13/21) der Meningeome der Kategorie I (hirninvasiv) und 20% (4/20) der Kategorie II (nicht-hirninvasiv mit anhängendem Hirngewebe). In den Meningeomen der Kategorie III (nicht-

hirn-invasiv ohne anhängendem Hirngewebe) tritt dieses Phänomen nicht auf.

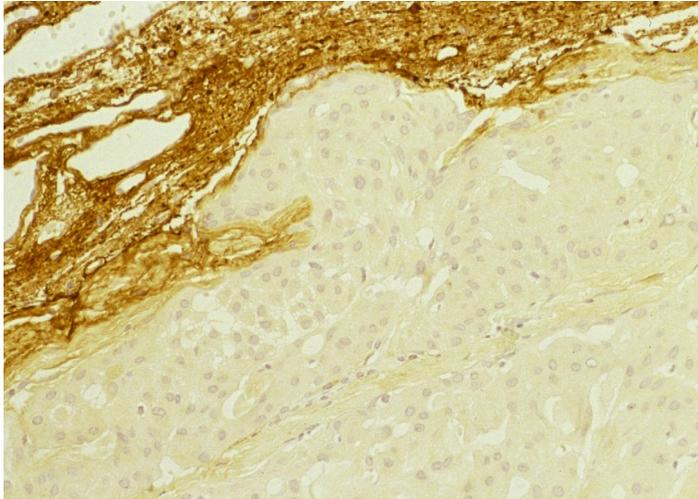


Abb.20 (GFAP x200): Hirn-invasives Meningeom (Kategorie I). Ein Tumorzapfen invadiert das GFAP-positive Hirngewebe.

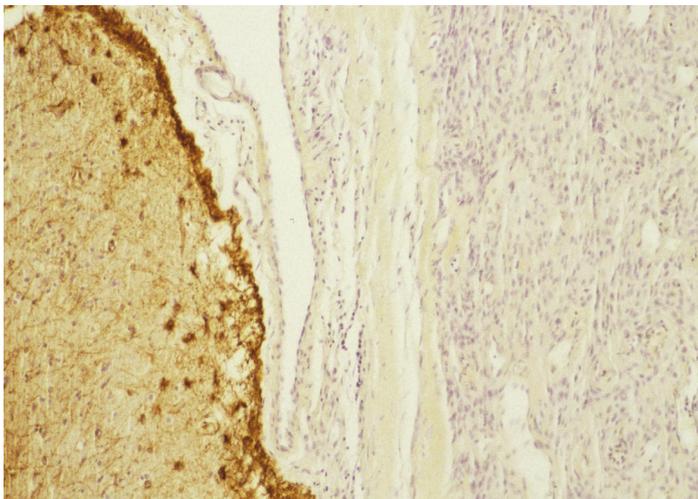


Abb.21 (GFAP x100): Nicht-hirn-invasives Meningeom (Kategorie II) mit anhaftendem ZNS-Gewebe. Die GFAP-Positivität konzentriert sich auf einen Saum an der Kortexoberfläche.

In vier Fällen der Kategorie I (hirn-invasiv) (19%) lässt sich GFAP-positives Gewebe innerhalb des Tumors als eingeschlossenes Hirngewebe identifizieren (Abb. 22).

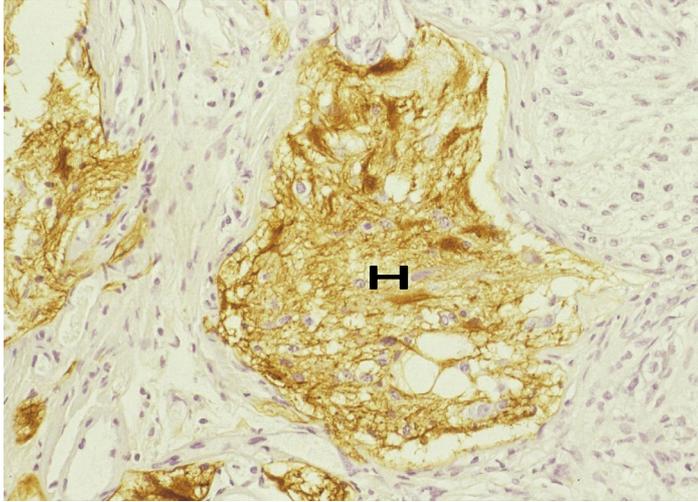


Abb.22 (GFAP x200): Hirninvasives Meningeom (Kategorie I) mit in Tumor eingeschlossenem Hirngewebe (H), das GFAP-positiv ist.

GFAP stellt sich als nicht aussagekräftig für das Auftreten von Hirninvasion bei Meningeomen heraus. Gliales Gewebe ist auch dann GFAP-positiv, wenn keine mikroskopische Hirninvasion durch den Tumor vorhanden ist (Abb.21). Die Färbintensität korreliert nicht mit dem Grad der Hirninvasion. Der GFAP-positive Randsaum im ZNS-Gewebe fällt im Vergleich zwischen invasiven und nicht-invasiven Meningeomen bei Invasivität oft breiter aus.

4 DISKUSSION

Unsere Studie untersucht die Hirn-Tumor-Grenze von Meningeomen. Vergleichbarkeit der Gewebeproben erzielten wir durch Beschränkung auf Meningeome des WHO-Grades I und des meningotheiomatösen Subtypes. Dadurch verglichen wir die Tumore nur in Bezug auf ihr Invasionsverhalten. Wir teilten das Patientengut in die drei Kategorien Meningeome mit Hirninvasion (Abb.5), ohne Hirninvasion (Abb.6) und Tumore ohne Hirngewebe im Präparat ein. Das Nichtvorhandensein von Hirngewebe könnte darauf hindeuten, dass der Tumor während der Operation besser vom Hirn trennbar war. Diese Art von Tumor könnte sich neuroradiologisch durch eine scharfe Trennung vom Hirngewebe ohne peritumorales Hirnödem auszeichnen. Anhaften des Tumors am Hirn könnte auf aggressives Wachstum gegenüber dem Hirn oder eine Adhäsion durch Gefäßverbindungen hindeuten. Die mikroskopische Beurteilung der Hirn-Tumor Grenze hat den Vorteil, die anatomischen Verhältnisse zu berücksichtigen und die Grenze genauer als durch radiologische Methoden zu beurteilen.

Invasionsverhalten des Tumors

Wir beschrieben verschiedene Stadien der Hirninvasion durch Meningeome. Meningeome können die pial-gliale Grenze respektieren, jedoch auch massiv zerstören und Hirngewebe invadieren. Während es zur direkten Untersuchung der pial-glialen Grenzbasalmembran bei invasiven Meningeomen bisher keine Untersuchungen gibt, liegen zahlreiche Studien zum invasiven Wachstum von Karzinomen vor. Veränderungen der extrazellulären Matrix, vor allem der Basalmembran sind grundlegende Voraussetzungen für die Entstehung und das Wachstum von Karzinomen (Rutka et al., 1988). Es wurden verschiedene Arten der Modifikation von extrazellulärer Matrix durch invasive Neoplasmen beschrieben. Diese sind Degradation von Matrixkomponenten durch den Tumor (Barsky et al., 1983), Desmoplasie im Sinne von Produktion von Matrixkomponenten durch Zellen des invadierten Gewebes (Barsky et al., 1982) und Synthese von Matrixkomponenten durch Tumorzellen (Liotta et al., 1983). Die wohl wichtigste Komponente ist die Degradation von Basalmembran. Der Verlust von Basalmembran geht mit Invasion ein-

her (Barsky et al., 1983). Tumorzellen benutzen degradierende Enzyme, um sich durch Barrieren bewegen zu können. Viele dieser Enzyme sind spezifisch gegen Basalmembran gerichtet. Auch Druck auf die Basalmembran durch schnelle Volumenzunahme der Tumormasse könnte zu Fragmentation dieser führen. Die Wirkung von Proteasen wird jedoch durch die Beobachtung von Mikroinvasion in streng umschriebenen Arealen unterstrichen. Barsky und Mitarbeiter (1983) unterschieden durch die Kollagen IV-Färbung bei Karzinomen zwischen benignen Tumoren, in situ Karzinomen mit intakter Basalmembran, mikroinvasiven Karzinomen und invasiven, die Basalmembran zerstörenden Karzinomen. Mikroinvasive Karzinome weisen eine verdünnte und fragmentierte Basalmembran mit fokaler Zerstörung auf. Dieses Bild kommt unserer Beschreibung mikroskopischer Tumorausläufer im Subpialraum nahe (Abb.18). Die Zellbeugung im Tumorausläufer impliziert, dass an dieser Stelle Hirninvasion stattfindet und nicht artefiziell bei der Präparation Tumorgewebe in das Hirngewebe verschoben wurde. Ungeklärt bleibt, ob nicht-invasive und mikroinvasive Meningeome Vorstufen zu invasiven Meningeomen bilden. Möglicherweise invadieren alle Meningeome zu einem bestimmten Zeitpunkt das Hirn. Es bleibt auch offen, ob nur bestimmte Tumore die nötigen Voraussetzungen erfüllen, um invasiv zu werden. Durch weiterführende Studien könnte man untersuchen, ob eine Degradation von Basalmembran und mikroskopische Hirninvasion mit einem verstärkten Hirn-ödem korrelieren.

4.1 MIB-1

Der MIB-1 Index unserer Meningeome liegt größtenteils unter 4% (Abb.7). Auch an der Invasionsgrenze ist der Index nicht erhöht. Mikroskopische Hirninvasion geht nicht mit einem erhöhten Proliferationsindex einher. In der Literatur ist der durchschnittliche MIB-1 Index von WHO Grad I Meningeomen 3,8% (Maier et al., 1997). Eine zentrale Frage ist, ob bei Meningeomen ein höherer Proliferationsindex mit einem höherem Malignitätsgrad und Rezidiven korreliert. Eine Tendenz scheint zu bestehen (Abramovich und Prayson, 1998), auch wenn die Ergebnisse verschiedener Studien unterschiedlich sind. Bei einem MIB-1 Index von über 5-10% ist das Auftreten eines

Tumorrezidivs wahrscheinlicher (Louis et al., 2000), und bei Rezidivtumoren ist der MIB-1 Index im Vergleich zum Primärtumor erhöht (Roser et al., 2004). Ungeklärt bleibt, ob ein höherer MIB-1 Index mit aggressivem Tumorwachstum im Sinne von Hirninvasion korreliert und ob dieser Zusammenhang auch auf histopathologisch benigne Meningeome zutrifft. Abramovich und Prayson (1998) fanden signifikante Unterschiede in den MIB-1 Raten von benignen Meningeomen ohne Hirninvasion und klinisch malignen, aggressiven Tumoren, die sich durch Hirninvasion und Metastasierung auszeichnen. Madsen und Schroder (1997) konnten mittels des MIB-1 Index zwischen benignen nichtinvasiven Meningeomen, knocheninvasiven/atypischen Meningeomen und hirninvasiven Meningeomen, die unter diesen Gruppen den höchsten MIB-1 Index hatten, unterscheiden. Für die Wachstumsfaktoren IGF (insulin-like growth factors), welche potente Mitogene sind, besteht eine Korrelation mit dem Auftreten von Hirninvasion. Vor allem die Expression von IGF-II und IGFBP-6 korreliert stark mit der Entwicklung von Hirninvasion und Hirnödemen (Nordqvist und Mathiesen, 2002). Auch radiologische Kriterien für aggressives Tumorwachstum wie eine unscharfe Hirn-Tumor Grenze und Hirnödem konnten mit einem erhöhten Proliferationsindex korreliert werden (Nakasu et al., 1995). Ide und Mitarbeiter (1996) fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Proliferationsindex und starkem Hirnödem. Khoshyomn und Koautoren (1999) fanden keinen Zusammenhang zwischen in vitro gemessenen Invasionsraten und dem Ki-67 Index in Meningeomen. Auch Prayson (1996) konnte das Auftreten von Hirninvasion und Metastasen nicht mit dem MIB-1 Index korrelieren.

4.2 EMA

Die Expression von EMA ist variabel und zeigt teilweise auch EMA-negative Tumorzellen in manchen Tumoren (Abb.10). Dies entspricht Daten in der Literatur (Langford, 1996). EMA stellt die ektodermale Komponente der Meningeome dar. Das Verteilungsmuster impliziert einen dualen, mesodermal-ektodermalen Ursprung von Meningeomen. Hinsichtlich der Hirninvasion macht das Verteilungsmuster keine Aussage.

4.3 Kollagen IV

Bei der Untersuchung des Tumorsinneren fanden wir eine fakultative Produktion von Basalmembran. Kollagen IV begrenzt die für meningotheiomatöse Meningeome spezifischen Lobuli und ruft ein Bild von Matrix und Stroma hervor (Abb.13+14). Auch Nitta und Mitarbeiter (1990) beschrieben an in situ Präparaten von meningotheiomatösen Meningeomen an der Oberfläche von Lobuli Kollagen IV, das die Lobuli von fibrösen Septen und perivaskulären Virchow-Robin Räumen trennt. Sowohl Meningeome als auch ihre Ursprungszellen, die Arachnoideadeckzellen, haben die Fähigkeit unter physiologischen und pathologischen Bedingungen Kollagen IV und andere Basalmembranbestandteile zu synthetisieren. Vorkommen von Kollagen IV ist an das Vorkommen von Basalmembran gebunden. In wenigen Meningeomen fanden wir auch interzelluläres Kollagen IV im Stroma (Abb.15), dies mag als fibroblastischer oder transitionaler Anteil des Meningeomes gewertet werden. Interzelluläres Kollagen IV ist ein Merkmal fibroblastischer Meningeome (Nitta et al., 1990). Tumoreigene Basalmembran ist nie kontinuierlich, sondern fragmentiert, wie jene der Arachnoideadeckzellen, die von Lopes und Mair (1974a) beschrieben wurde. Vaskuläre Basalmembran ist nicht degradiert. Auch Bellon und Koautoren (1985) beschrieben eine intensive Kollagen IV-Färbung der Blutgefäße in Meningeomen. Invasives Wachstum von Karzinomen ist oft verbunden mit Gefäßinvasion und hämatogener Metastasierung. Meningeome metastasieren nur selten hämatogen (Louis et al., 2000). Hierzu passend zeigte unsere Studie, dass die pial-gliale Basalmembran zerstört sein kann, während die Basalmembran der Blutgefäße intakt bleibt (Abb.19).

Erstmalig untersuchten wir die Basalmembran in Hinblick auf mikroskopische Hirninvasion. Kollagen IV-Expression im Tumorinneren korreliert nicht mit dem Invasionsverhalten an der Hirn-Tumorgrenze. Es bleibt unklar, ob diese Basalmembranproduktion tumorspezifisch oder ein erhaltenes Merkmal der Ursprungszellen ist und ob die diskontinuierliche Beschaffenheit dieser Basalmembran auf eine minderwertige Produktion durch den Tumor oder eine Degradation hinweist. An der Hirn-Tumor Grenze konnten wir an manchen Tumoren zwei Basalmembranen nachweisen (Abb.16). Da eine die pial-gliale Grenzbasalmembran sein muss, ist die andere vom Tumor neugebildet. Um zu klären, welche Zellen die neue Basalmembran synthetisieren, müsste man in situ Hybridisierung durchführen. Die neugebildete Basalmembran ist fragmentiert und diskontinuierlich, die pial-gliale Grenzbasalmembran fokal von Tumorausläufern (Abb.18) oder über weite Strecken degradiert. Nicht nur Degradation, sondern auch Neusynthese von Basalmembranbestandteilen kann bei Karzinomen stattfinden (Lohi, 2001). Wachstumsfaktoren wie TGF- β stimulieren die Kollagenproduktion (Igotz und Massagué, 1986). Unklar ist, ob die Produktion von Kollagen IV und anderen Basalmembranbestandteilen das Tumorwachstum hemmt oder die Invasion erleichtert (Rutka et al., 1988). Liotta und Mitarbeiter (1983) postulierten eine 3-Schritt Hypothese der Tumordinvasion. Der erste Schritt ist die Adhäsion von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix, es folgt die Degradation der Matrix durch Proteasen. Die Degradation ist ein notwendiger Schritt im Invasionsprozess, jedoch nicht ausreichend. Zuletzt findet Migration statt, Tumorzellen durchwandern die degradierte Matrix und breiten sich im Gewebe aus. Ein ähnlicher Mechanismus lässt sich bei Meningeomen denken. Ein Adhäsionsmolekül der Basalmembran ist das Laminin (Rutka et al., 1988). In neoplastischen Prozessen bewirken Isoformen des Laminins Migration und Proliferation von Karzinomzellen. Laminin-5 wird in einigen invasiven Karzinomen und in invasiven Tumoranteilen verstärkt exprimiert (Lohi, 2001). CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das mit Invasion und Metastasierung von Tumorzellen in Verbindung gebracht wird. Ariza und Koautoren (1995) untersuchten die CD44 Expression in ZNS-Tumoren. Die Isoform CD44s wurde stark in hirninvasiven Glioblastomen exprimiert,

wohingegen die schwache oder nicht vorhandene Expression in klassischen Meningeomen ihr seltenes hirninvasives Verhalten erkläre. Figarella-Branger und Koautoren (1997) wiesen in hirninvasiven Meningeomen höhere CD44s-Level im Vergleich zu nichtinvasiven Meningeomen nach. Während die Basalmembran im Zusammenhang mit der Hirninvasion von Meningeomen bisher nicht direkt untersucht wurde, liegen mehrere Studien vor, die Proteasen und ihre Inhibitoren untersucht haben. Spezifische, Kollagen IV-degradierende Proteasen sind die Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 (Nordqvist et al., 2001). TIMP-1 und TIMP-2 sind spezifische Gewebelinhibitoren für diese Metalloproteasen (Gomez et al., 1997). Das Gleichgewicht zwischen Proteasen und ihren Inhibitoren beeinflusst die Invasionsfähigkeit von Meningeomen (McCutcheon, 1996). Nordqvist und Mitarbeiter (2001) konnten eine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmaß der MMP-9 Expression und der Hirninvasivität von Meningeomen feststellen. Auch die Ausbildung eines Hirnödems war bei höherer Expression von Metalloproteasen eher zu finden. Kirches und Koautoren (2001) beschrieben, dass weder die Expression von MMP-2 noch die von MMP-9 eine hauptsächliche Rolle für Hirninvasion bei Meningeomen spielen. Wenigstens ein Teil der Meningeome benutze andere Mechanismen für Degradation von extrazellulärer Matrix. Siddique und Mitautoren (2003) fanden in Meningeomen MMP-2- und MMP-9-Level, die im Vergleich zu normalem Hirngewebe erhöht waren. Jedoch unterschieden sich die Level an TIMP-1 und TIMP-2 nicht von denen in normalem Hirngewebe. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeiten beruhen möglicherweise darauf, dass die Intaktheit der Basalmembran nicht berücksichtigt wurde. Auch wurde nicht in Erwägung gezogen, dass Basalmembran neugebildet sein kann (Abb.16). Cathepsine sind Cystein-Proteinasen, die mit der Hirninvasivität von Meningeomen assoziiert sind. Grenzwertige „border benign tumors“ im Sinne von histomorphologisch benignen, aber hirninvasiven Meningeomen zeichnen sich durch einen signifikant erhöhten Level an Cathepsin B aus. Mittels Cathepsin B kann man zwischen histomorphologisch benignen Meningeomen ohne Hirninvasion und Exemplaren mit Invasion unterscheiden. Cathepsin B ist geeignet, bereits sehr frühe Stadien der Umwandlung eines benignen

Tumors in einen malignen hirninvasiven Tumor zu erfassen. Auch in Tumorrezidiven ist Cathepsin B erhöht (Strojnik et al., 2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), auch Osteonectin genannt, ist eine Protease, die nicht basalmembrandegradierend, sondern adhäsions- und migrationsmodulierend wirkt. Auch SPARC ist hochspezifisch für klinisch invasive Meningeome, unabhängig vom histologischen Grad. Durch SPARC kann man benigne nicht-invasive von benignen hirninvasiven Meningeomen unterscheiden, auch ohne mikroskopischen Nachweis einer Hirninvasion (Rempel et al., 1999). Retinolsäure inhibiert in vitro die Invasion von Basalmembran, indem es die Adhäsion von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix stimuliert. Dadurch werden die Migration von Zellen und Invasion verhindert. Die in vitro gemessenen Werte korrelieren mit der klinischen Manifestation von Hirninvasion. Retinolsäure induziert einen nicht-invasiven Phänotyp von Meningeomen (Páez Pereda et al., 1999).

Wir konnten erstmals mikroskopisch eine in situ durch das Meningeom zerstörte Basalmembran darstellen (Abb.17+18). Zerstörung von Basalmembran ist in die Hirninvasion von Meningeomen involviert. Dies wurde bisher durch Studien zu degradierenden Proteasen impliziert. Degradation von Kollagen IV findet in verschiedenen Graden bei allen Meningeomen statt. Auch Neubildung von Basalmembran durch den Tumor konnten wir nachweisen. An der Hirn-Tumor Grenze wiesen wir eine doppelte Basalmembran nach, von der eine die pial-gliale Grenzbasalmembran und die anderer tumoreigene Basalmembran sein muss (Abb.16). Ungeklärt bleibt, ob nichtinvasive Meningeome eine Vorstufe zu invasiven Meningeomen darstellen und ob alle Meningeome zu einem bestimmten Zeitpunkt hirninvasiv werden. Langzeitbeobachtung mittels radiologischen Befunden und Untersuchung von Tumorrezidiven auf eine veränderte Hirn-Tumor-Grenze könnte diese Entwicklung verfolgen. Der Mechanismus der Degradation von Basalmembran bleibt weiterhin unklar. Degradation könnte mechanisch durch zunehmendes Tumolvolumen oder enzymatisch durch Proteasen bedingt sein. Dies könnte man durch in situ Untersuchungen von Metalloproteasen erforschen. Ob das Ausmaß der Basalmembrandegradation zwangsläufig mit dem Ausmaß der Hirninvasion korreliert, bleibt unklar. Ob Menin-

geome eines höheren Malignitätsgrades die Basalmembran stärker degradieren und mehr Proteasen als benigne Meningeome exprimieren, könnte man durch Vergleich von Meningeomen verschiedener Malignitätsgrade untersuchen. Die klinischen Auswirkungen von Basalmembrandegradation wie die Entwicklung von peritumoralem Hirnödem erfordern bildgebende Verfahren. Das Invasionsverhalten von Meningeomen und Karzinomen weist Analogien auf, ob die Entstehung von Invasion hierbei aber dem gleichen Mechanismen folgt bleibt unklar.

4.4 GFAP

Unter physiologischen Bedingungen exprimieren Astrozyten zu wenig GFAP, um es immunhistochemisch nachweisen zu können. Der Nachweis ist ein Zeichen für Aufregulation. Das Hirngewebe in unseren Proben ist immer GFAP-positiv, unabhängig davon ob das Meningeom direkt an das zentralnervöse Gewebe angrenzt oder ob es durch Leptomeningen von diesem getrennt ist (Abb.20+21). Dies könnte eventuell durch Hirninvasion, die nicht im Gewebsschnitt getroffen war, bedingt sein. Bezüglich der Invasion erweist sich die GFAP-Färbung in unserer Studie als wenig aussagekräftig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchten 49 Gewebeproben von meningotheliomatösen, benignen WHO Grad I Meningeomen und verglichen hirninvasive (n=21) mit nichtinvasiven Exemplaren. Dabei unterschieden wir nichtinvasive Meningeome mit anhängendem Hirngewebe (n=20) von solchen ohne Hirngewebe im Präparat (n=8). Mittels immunhistochemischer Methoden konnten wir in der Kollagen IV-Färbung Neubildung von Basalmembran durch das Meningeom und Zerstörung der pial-glialen Grenzbasalmembran durch den Tumor nachweisen. Zerstörung der pial-glialen Grenzbasalmembran konnte in allen hirninvasiven Fällen (100%) und 17 nichtinvasiven Meningeomen (61%) nachgewiesen werden. Ruptur der Basalmembran tritt in folgenden Mustern auf: Kleine pseudopodienartige Ausstülpungen, die fokal die pial-gliale Basalmembran durchbrechen, Zerstörung durch Tumorzapfen, die zum Teil ganz von Hirngewebe ummauert sind, aber auch Verlust der pial-glialen Basalmembran über weite Strecken ohne direkten Einfluss von invasiven Meningeomanteilen. In manchen Gewebeproben kann man das Verhalten an der Hirn-Tumor-Grenze als karzinomanalog werten. Diese Degradation ist in verschiedenen Graden bei allen Meningeomen festzustellen und unterscheidet nicht zwischen hirninvasiven und nicht-invasiven Exemplaren. Es konnte nicht entschieden werden, ob die Ruptur der Basalmembran mechanisch bedingt ist oder auf Grund von Abbau durch Proteasen stattfindet. Weiterführende Studien mit Bestimmung von Proteasen sind notwendig, um den Invasionsmechanismus zu erforschen. Zusätzlich fanden wir Neubildung von Basalmembran an der Hirn-Tumor-Grenze in 37 Fällen. Dies ähnelt der Neubildung von Basalmembran in manchen Karzinomarten. Das Invasionsverhalten korreliert nicht mit dem Proliferationsindex MIB-1. Die EMA-Färbung sollte aufdecken, ob sich hirninvasive Meningeome von nicht-invasiven hinsichtlich der Verteilung neuroektodermaler und neurodermaler Zellen unterscheiden. Auch mittels der EMA-Färbung ergaben sich keine aussagekräftigen Unterschiede zwischen invasiven und nicht-invasiven Meningeomen. Die GFAP-Färbung zeigt eine Aufregulation unabhängig von der Hirninvasion. Die immunhistochemische Darstellung der Basalmembran, zum Beispiel durch Anti-Kollagen IV, sollte in die Routinediagnostik mit auf-

genommen werden, da so Frühstadien der Hirninvasion erfasst werden können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abramovich CM, Prayson RA (1998): MIB-1 labeling indices in benign, aggressive, and malignant meningiomas: A study of 90 tumors. *Hum Pathol* 29, 1420-1427
2. Akeyson EW, McCutcheon IE (1996): Management of benign and aggressive intracranial meningiomas. *Oncology (Huntingt)* 10, 747-759.
3. Alcolado R, Weller RO, Parrish EP, Garrod D (1988): The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 1-17
4. Ariza A, López D, Mate JL, Isamat M, Musulén E, Pujol M, Ley A, Navas-Palacios JJ (1995): Role of CD44 in the Invasiveness of Glioblastoma Multiforme and the Noninvasiveness of Meningioma: An Immunohistochemistry Study. *Hum Pathol* 26, 1144-7
5. Barsky SH, Rao CN, Grotendorst GR, Liotta LA (1982): Increased Content of Type V Collagen in Desmoplasia of Human Breast Carcinoma. *Am J Pathol* 108, 276-283
6. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA (1983): Loss of Basement Membrane Components by Invasive Tumors but not by their benign Counterparts. *Lab Invest* 49, 140-147
7. Bellon G, Caulet T, Cam Y, Pluot M, Poulin G, Pytlinska M, Bernard MH (1985): Immunohistochemical Localisation of Macromolecules of the Basement Membrane and Extracellular Matrix of Human Gliomas and Meningiomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 66, 245-252
8. Bitzer M, Wöckel L., Morgalla M., Keller C, Friese S, Heiss E, Meyer-mann R, Grote E, Voigt K (1997): Peritumoural Brain Oedema in intracranial meningiomas: influence of tumour size, location and histology. *Acta Neurochir (Wien)* 139, 1136-1142
9. Bitzer M, Klose U, Nägele T, Mundinger P, Freudenstein D, Heiss E, Voigt K (1999): The significance of morphological changes in the brain-tumor border area for the pathogenesis of brain edema in meningiomas: magnetic resonance tomographic and intraoperative studies. *Rofo* 171, 32-7
10. Bitzer M, Nägele T, Geist-Barth B, Klose U, Grönewäller E, Morgalla M, Heiss E, Voigt K (2000): Role of hydrodynamic processes in the pathogenesis of peritumoral brain edema in meningiomas. *J Neurosurg* 93, 594-604
11. Black P McL (1993): Meningiomas. *Neurosurgery* 32, 643-657
12. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS (2002): *Surgical Pathology of the nervous System and its coverings*. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia, 49-71
13. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM (1993): Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53, 1312-6
14. Chronwall BM, McKeever PE, Kornblith PL (1983): Glial and Nonglial Neoplasms Evaluated on Frozen Section by Double Immunofluorescence for Fibronectin and Glial Fibrillary Acidic Protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 59, 283-287
15. Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N, Pellissier JF (1997): Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation

- with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23, 113-22
16. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation, and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74, 111-122
 17. Ide M, Jimbo M, Yamamoto M, Umebara Y, Hagiwara S, Kubo O (1996): MIB-1 Staining Index and Peritumoral Brain Edema of Meningiomas. *Cancer* 78, 133-43
 18. Ignatz RA, Massagué J (1986): Transforming Growth Factor- β stimulates the Expression of fibronectin and Collagen and their Incorporation into the Extracellular Matrix. *J Biol Chem* 261, 4337-4345
 19. Jääskeläinen J, Haltia M, Servo A (1986): Atypical and anaplastic meningiomas: Radiology, Surgery, Radiotherapy, and Outcome. *Surg Neurol* 25, 233-242
 20. Jellinger K, Slowik F (1975): Histological Subtypes and Prognostic Problems in Meningiomas. *J Neurol* 208, 279-298
 21. Kepes JJ (1986): Presidential Address: The Histopathology of Meningiomas. A Reflection of Origins and Expected Behavior? *J Neuropathol Exp Neurol* 45, 95-107
 22. Khoshyomn S, Lew S, DeMattia J, Singer EB, Penar PL (1999): Brain tumor invasion rate measured in vitro does not correlate with Ki-67 expression. *J Neurooncol* 45, 111-6
 23. Kirches E, Grunewald J, Bossanyi P von, Szibor R, Plate I, Krüger S, Warich-Kirches M, Dietzmann K (2001): Expression of matrix metalloproteinases in a series of 12 meningiomas. *Clin Neuropathol* 20, 26-30
 24. Langford LA (1996): Pathology of meningiomas. *J Neurooncol* 29, 217-21
 25. Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P (2002): Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (Hrsg): *Greenfield's Neuropathology*, 7. Aufl. Arnold, London, New York, New Delhi, 767-980
 26. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH (1983): Tumor Invasion and the Extracellular Matrix. *Lab Invest* 49, 636-649
 27. Lohi J (2001): Laminin-5 in the progression of carcinomas. *Int J Cancer* 94, 763-767
 28. Lopes CAS, Mair WGP (1974a): Ultrastructure of the Arachnoid Membrane in Man. *Acta Neuropathol (Berl)* 28, 167-173
 29. Lopes CAS, Mair WGP (1974b): Ultrastructure of the Outer Cortex and the Pia mater in Man. *Acta Neuropathol (Berl)* 28, 79-86
 30. Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, Deimling A von, Kepes JJ (2000): Meningeal Tumours. In: Kleihues P, Cavenee WK (Hrsg): *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. IARC Press, Lyon, 175-184
 31. Madsen C, Schroder HD (1997): Ki-67 immunoreactivity in meningiomas-determinaton of the proliferative potential of meningiomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Clin Neuropathol* 16, 137-42
 32. Maier H, Wanschitz J, Sedivy R, Rössler K, Öfner D, Budka H (1997): Proliferation and DNA fragmentation in meningioma subtypes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23, 496-506
 33. Martinez-Hernandez A, Amenta PS (1983): The basement membrane in pathology. *Lab invest* 48, 656-677

34. McCutcheon IE (1996): The biology of meningiomas. *J Neurooncol* 29, 207-216
35. Meis JM, Ordonez NG, Bruner JM (1986): Meningiomas. An immunohistochemical study of 50 cases. *Arch Pathol Lab Med* 110, 934-7
36. Nakasu S, Hirano A, Llena JF, Shimura T, Handa J (1989): Interface between the Meningioma and the brain. *Surg Neurol* 32, 206-12
37. Nakasu S, Nakajima M, Matsumura K, Nakasu Y, Handa J (1995): Meningioma: Proliferating Potential and Clinicoradiological Features. *Neurosurgery* 37, 1049-1055
38. Nitta H, Yamashima T, Yamashita J, Kubota T (1990): An ultrastructural and immunohistochemical study of extracellular matrix in meningiomas. *Histol Histopathol* 5, 267-274
39. Nordqvist AC, Smurawa H, Mathiesen T (2001): Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in meningiomas associated with different degrees of brain invasiveness and edema. *J Neurosurg* 95, 839-44
40. Nordqvist AC, Mathiesen T (2002): Expression of IGF-II, IGFBP-2, -5, and -6 in meningiomas with different brain invasiveness. *J Neurooncol* 57, 19-26
41. Páez Pereda M, Hopfner U, Pagotto U, Renner U, Uhl E, Arzt E, Missale C, Stalla GK (1999): Retinoic acid stimulates meningioma cell adhesion to the extracellular matrix and inhibits invasion. *Br J Cancer* 81, 381-386
42. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC (1999): "Malignancy" in Meningiomas. *Cancer* 85, 2046-2056
43. Peters A, Palay SL, Webster H (1991): *The Fine Structure of the Nervous System*. Oxford University Press, New York, Oxford, 395-406
44. Prayson RA (1996): Malignant Meningioma. *Am J Clin Pathol* 105, 719-726
45. Rempel SA, Ge S, Gutiérrez JA (1999): SPARC: A Potential Diagnostic Marker of Invasive Meningiomas. *Clin Cancer Res* 5, 237-241
46. Roser F, Samii M, Ostertag H, Bellinzona M (2004): The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. *Acta Neurochir (Wien)* 146, 37-44
47. Rutka JT, Giblin J, Dougherty DV, McCulloch JR, DeArmond SJ, Rosenblum ML (1986): An Ultrastructural and Immunocytochemical Analysis of Leptomeningeal and Meningioma Cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 45, 285-303
48. Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M (1988): The extracellular matrix of the central and peripheral nervous system: structure and function. *J Neurosurg* 69, 155-70
49. Siddique K, Yanamandra N, Gujrati M, Dinh D, Rao JS, Olivero W (2003): Expression of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and urokinase plasminogen activator in human meningiomas. *Int J Oncol* 22, 289-294
50. Strojnik T, Zidanik B, Kos J, Lah TT (2001): Cathepsin B and L are markers for clinically invasive types of meningiomas. *Neurosurgery* 48, 598-605
51. Waggener JD, Beggs J (1967): The membranous coverings of neural tissues: an electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 26, 412-26

52. Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins WP, Reifenberger G, Lichter P (1997): Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. Proc Natl Acad Sci USA 94, 14719-24

7 ANHANG

Tabelle 1: Allgemeine Patientendaten (Patientennummer im Gewearchiv des Hirnforschungsinstitutes, Alter, Geschlecht, histologischer Subtyp, WHO-Grad, Invasivität, Kategorie)

Pat.-Nr.	Alter	Sex	Histolog. Subtyp	WHO Grad	Invasiv	Kategorie
1007/96	38	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
652/97	37	w	Endotheliomatös	I	Ja	I
249/98	58	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
520/98	74	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
635/98	63	m	Meningotheliomatös	I	Ja	I
1026/98	69	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
1050/98	49	m	Meningotheliomatös	I	Ja	I
384/99	79	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
391/99	74	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
408/99	47	w	Endotheliomatös	I	Ja	I
1078/99	50	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
1338/99	44	m	Meningotheliomatös	I	Ja	I
205/00	68	w	Mesotheliomatös	I	Ja	I
273/00	74	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
813/00	69	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
1168/00	56	m	Meningotheliomatös	I	Ja	I
1318/00	57	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
1391/00	43	w	Meningotheliomatös	I	Ja	I
189/02	65	m	Meningotheliomatös	I	Ja	I
504/02	52	m	Mesotheliomatös	I	Ja	I
1223/02	57	m	Meningotheliomatös	I	Ja	I
444/98	40	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
630/98	76	m	Meningotheliomatös	I	Nein	II
21/96	45	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
743/97	75	m	Mesotheliomatös	I	Nein	II
753/98	57	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
181/99	75	m	Meningotheliomatös	I	Nein	II
565/99	74	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
650/99	82	m	Meningotheliomatös	I	Nein	II
243/00	75	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
1198/00	70	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
364/00	69	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
569/01	80	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
1448/01	72	m	Mesotheliomatös	I	Nein	II
196/02	54	m	Meningotheliomatös	I	Nein	II
1489/02	52	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
219/03	56	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
333/00	56	m	Meningotheliomatös	I	Nein	II
821/00	70	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
1136/00	47	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
1233/00	53	w	Meningotheliomatös	I	Nein	II
37/97	62	m	Endotheliomatös	I	Nein	III
579/97	41	m	Meningotheliomatös	I	Nein	III
212/99	29	w	Meningotheliomatös	I	Nein	III
1352/00	57	w	Meningotheliomatös	I	Nein	III
458/01	74	w	Meningotheliomatös	I	Nein	III
925/02	80	m	Meningotheliomatös	I	Nein	III
76/03	57	m	Mesotheliomatös	I	Nein	III
221/03	63	w	Mesotheliomatös	I	Nein	III

PUBLIKATIONEN

Fritz J, Roser F, Tatagiba M, Bornemann A (2005): The basement membrane of brain-invasive meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31, 339-42.

Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter W, Fritz J, Lang F, Huber TSM, Wieder T (2002): Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem.* 12, 365-72.

DANKSAGUNGEN

Ich danke...

Prof. Dr. med. Antje Bornemann für das entgegengebrachte Vertrauen, das Überlassen des Themas und die tolle Zusammenarbeit, sie haben immer ein offenes Ohr für meine Fragen...

Prof. Dr. med. Richard Meyermann dafür, dass ich diese Doktorarbeit im Hirnforschungsinstitut erstellen durfte und dabei Labor, Archiv und alles weitere zur Verfügung gestellt bekam...

Allen Neurochirurgen, ohne deren Arbeit diese Dissertation nie entstanden wäre...

Allen Assistenzärzten und Mitdoktoranden des Hirnforschungsinstitutes für die Inspiration und Hilfe, deren Aufzählung hier den Rahmen sprengen würde...

Dem gesamten Personal des Hirnforschungsinstitutes für die freundliche Aufnahme ins Team und die geduldige Einführung in die Laborarbeit, allen voran Thai-Dung Nguyen, der mir mit seinem sympathischen Wesen stets mit Rat und Tat zur Seite stand...

Alexia Stathopoulou (xiaworks), Stuttgart, für die Hilfe bei den Grafiken...

Meiner Familie, meinen Freunden und Alexandros Stathopoulos, dessen Unterstützung es mir von Anfang an ermöglicht hat alle Felsen zu erklimmen und dabei nie die Begeisterung zu verlieren...ohne ihn wären auch so manche computertechnische Fragen nicht gelöst worden.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Jasmin Caterina Fritz
Geburtstag und -ort: 25.05.1979, Memmingen
Stand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische und universitäre Ausbildung:

-Besuch der Grundschule in Freiburg-Tiengen
-Besuch des Königin-Katharina-Stift Gymnasiums in Stuttgart
-Juni 1999: Abitur (Note: 1,5)
-Oktober 1999: Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
-September 2001: Physikum (Note: 2,6)
-Februar 2002: Beginn der Dissertation am Hirnforschungsinstitut Tübingen
-August 2002: Erstes Staatsexamen (Note: 3)
-Januar 2004: Mitglied im Graduiertenkolleg Onkologie der Universität Tübingen
-September 2004: Zweites Staatsexamen (Note: 2,0)
-18. November 2005: Drittes Staatsexamen (Note: 2,0)

Praktisches Jahr:

Oktober 2004- September 2005:

1. Tertial: Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart (Innere Medizin)
2. Tertial: Queens Square Hospital und Royal London Hospital, London (Neurologie)
3. Tertial: Singapore General Hospital, Singapur (Chirurgie)

Sprachen:

Deutsch, Italienisch (Muttersprachen)
Englisch, Spanisch fließend
Grundkenntnisse in Französisch