Aus dem Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik Hamburg- Eppendorf der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Untersuchungen von Biomarkern zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen

Dissertationsschrift

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin vorgelegt

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

von

Tobias Kreher aus Itzehoe 2008 Untersuchungen von Biomarkern zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **3.12.2018**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: AM Dn. M. Glalul Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: AD Dn. O. Heist Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: AD Dn. J. Fiihlu

Inhaltsverzeichnis

1		Ein	leitur	ng	. 1		
	1.	1	Prob	lembehandlung	. 1		
	1.2	2	Grui	ndlagen zu Meningeomen	. 1		
	1.3	3	WH	O-Klassifizierung und Prognose	. 4		
	1.4	4	Bior	narker bei Meningeomen	. 6		
2		Mat	terial	und Methoden	. 6		
	2.	1	TMA	A-Technik	. 6		
	2.2	2	TMA	A-Herstellung	. 7		
	2.3	3	Tum	orkollektiv	. 9		
		2.3.	1	Histologie-Review	. 9		
		2.3.	2	Tumorproben	. 9		
	2.4	4	TMA	A-Aufbau	18		
	2.5	5	Imm	unhistochemische Färbung (IHC)	18		
		2.5.	1	Antikörper/Gene	20		
3		Erg		se			
	3.	1		entendaten			
	3.2	2		uf der Auswertungen			
	3.3	3		tellung der Ergebnisse			
	3.4	4	U	bnisse			
		3.4.		EMA			
		3.4.		MIB-1			
		3.4.		C-Kit			
		3.4.		Vimentin			
		3.4.		Östrogen und p53			
		3.4.		Cytokeratin (PAN CK)			
	3.5			unhistochemische Färbungen im Zeitverlauf			
	3.0				39		
4				on			
5				enfassung			
6							
7	Lebenslauf50						
8				g			
9				ngsverzeichnis			
10)	Lite	eratur		53		

1 Einleitung

1.1 Problembehandlung

Meningeome sind meist langsam wachsende gutartige Tumore. Ein Teil von ihnen hat eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit. Bis heute gibt es keinen eindeutigen klinischen oder histologischen Marker, der eine Aussage über die Rezidivwahrscheinlichkeit ermöglicht. Die aktuelle WHO-Einteilung zeigt zwar Tendenzen auf, dennoch zeigen auch Subgruppen gutartiger Meningeome ein aggressives Verhalten mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit.

Für wiederkehrende oder nicht vollständig entfernte Meningeome bleibt als einzige therapeutische Maßnahme die Strahlentherapie. Eine hormonelle oder zytostatische Therapie kann im Allgemeinen nicht empfohlen werden, weil für diese Therapieansätze keine Daten aus kontrollierten und randomisierten Studien vorliegen.¹

Vor diesem Hintergrund sollte für die weitere Nachsorge ein besseres Kontrollsystem entwickelt werden, welches aus neuropathologischer Sicht bei einer besseren Rezidivvorraussagewahrscheinlichkeit mittels Biomarkern seinen Ursprung finden könnte.

1.2 Grundlagen zu Meningeomen

Meningeome entstehen aus arachnoidalen Zellen der Leptomeningen, die zwei unterschiedliche embryonale Ursprünge haben. Die telencephalen Meningen entstehen aus Zellen der Neuralleiste, wohingegen die rostral gelegenen Meningen einen mesodermalen Ursprung aufweisen. Zwischen beiden sind phenotypisch keine Unterschiede bekannt.²

Meningeome machen zwischen 13% und 26% aller primären intrakranialen Tumore mit einer jährlichen Inzidenz von 6/100.000 Einwohnern aus.³ Sie treten hauptsächlich zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf. Frauen sind im Verhältnis von 2: 1 häufiger betroffen als Männer.³ 15% aller Meningeome sind im Spinalkanal gelegen; bei diesen liegt

das Verhältnis sogar bei 8: 1.⁴ Im Gegensatz dazu scheinen bösartige Meningeome ein erhöhtes Auftreten beim männlichen Geschlecht zu haben.

Meningeome sind vor allem im Bereich der Granulationes arachnoidales, in der Nähe der venösen Sinus und der in diese drainierenden kortikalen Venen aufzufinden.⁵ Sie wachsen meist als glatt begrenzte, intradurale Raumforderung oder mit einer breiten Anheftung an der Dura, z. B. der Falx oder der Konvexität und dehnen sich langsam vorwachsend sekundär zum Hirnparenchym aus. Neben den intracranialen Räumen wachsen Meningeome auch in dem Spinal-Kanal und in der Orbita.³ Des Weiteren wurden Meningeome in seltenen Einzelfällen auch außerhalb durabedeckter Strukturen beobachtet.

Das allgemeine Konzept der Entwicklung von Tumoren geht von der klonalen Entwicklung einer Zelle aus, die eine Mutation inne hat, die ihr einen Wachstumsvorteil bringt. Zellen, die aus diesem Klon entstehen, können weitere genetische Veränderungen ansammeln und somit Subklone bilden, die sowohl schneller als auch aggressiver wachsen können. Somit ist die Tumorentwicklung ein Prozess, der häufig von genetischen Veränderungen begleitet wird.⁶

Es wird davon ausgegangen, dass das Wachstum von Meningeomen durch exogene und endogene Faktoren ausgelöst bzw. verstärkt wird. Als exogene Faktoren stehen Virus-Erkrankungen und Kopftraumata neben der Strahlentherapie zur Diskussion. Hierbei ist Strahlung als einziger exogener Faktor, der die Tumorentstehung begünstigt, bewiesen. Eine Vielzahl an hormonellen und genetischen Faktoren bildet den Teil an endogenen Einflüssen auf das Meningeomwachstum. Vor allem durch klinische Beobachtungen erscheinen weibliche Geschlechtshormone, wie z.B. Östrogen, die Tumorprogression positiv zu beeinflussen. Diese herausstehende Rolle der weiblichen Geschlechtshormone wird an einigen Fakten deutlich. Am augenscheinlichsten ist, dass Meningeome bei Frauen häufiger auftreten als bei Männern. Außerdem tritt ein erhöhtes Risiko bei einem relativ erhöhten Progesteronspiegel auf, z.B. während einer Schwangerschaft oder der lutealen Phase der Periode. Zusätzlich steht ein Zusammenhang zwischen Meningeomen und Brustkrebs zur Diskussion.

Auf molekularer Ebene unterscheidet man zwischen einem Tumor-Supressor-Gen und einem Onco-Gen. 10 Unter dem Begriff Tumor-Supressor-Gen versteht man ein Gen, welches durch eine Inaktivierung die Tumorentwicklung begünstigt. Hier ist vor allem die Mutation des NF2-Gens zu nennen, das sich in der chromosomalen Region 22q12.2 befindet. Mutationen im NF2-Gen werden bei bis zu 60% aller sporadischen Meningeome gefunden. 11 12 13 Meningeome mit einer solchen Mutation weisen eine verminderte Expression von Merlin (Schwannomin) auf. 14 Diese Art von Mutation ist in Meningeomen aller Malignitätsgrade zu finden, was darauf hinweist, dass die Inaktivierung dieses Gens einen frühen Schritt in der Pathogenese des Meningeoms darstellt. 15

Die Tumorentstehung kann auch durch Überexpression eines Genes ausgelöst werden. In einem solchen Falle spricht man von einem Onco-Gen. Die Überexpression des so genannten Onco-Gens kann durch eine aktivierende Mutation oder eine genetische Amplifikation ausgelöst sein. Es trifft z.B. auf das EGFR-Gen (epidermal growth factor receptor) in Glioblastomen zu. Dieser Faktor steht ebenso wie die Faktoren IGF (insulin like growth factor) und PDGF (platelet-derived growth factor receptor) unter Verdacht das Wachstum von Meningeomen zu begünstigen.⁸

Zytogenetische Studien deuten darauf hin, dass in Meningeomen der WHO Grade II und III mehr numerische und strukturelle chromosomale Abnormitäten auftreten als in WHO Grad I Meningeomen. Durch diese Analysen wurden Gen-Regionen gefunden, die selten bei WHO Grad I Meningeomen aber häufig bei WHO Grad II und III Meningeomen Veränderungen aufweisen. Hierzu zählen die Anwesenheit von dizentrischen oder Ring-Chromosomen, der Verlust der chromosomalen Arme von 1p, 6q, 9p, 10, 14q und 18q genau so wie Gewinn oder Amplifikationen von 1q, 9q, 12q, 15q, 17q und 20q. 16 17 18 19 20

Weber et al.²⁰ entwickelten ein Modell, das bestimmte Zugewinne und Verluste von Chromosomabschnitten mit der Entstehung und Progression von Meningeomen in Verbindung bringt (siehe Abb. 1).

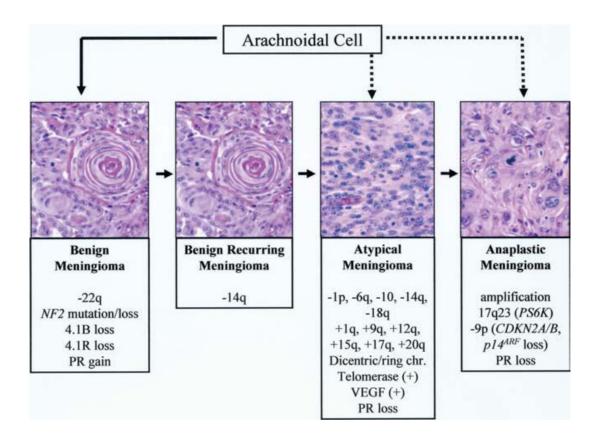


Abbildung 1: Weber-Modell. Das aktuelle Modell zur Meningeomentstehung und Progression aus: Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. J Neurooncol. 2004 Nov;70(2):183-202.

1.3 WHO-Klassifizierung und Prognose

Die beiden wichtigsten Faktoren mit denen die Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit möglich erscheint sind zum einen ihre histologisches Gradierung und zum anderen der Grad der Tumorresektion. Der Grad der Tumorresektion wird nach der Simpson-Gradierung aus dem Jahr 1957 eingeteilt. Diese Einteilung der Tumorresektion reicht vom Grad 1 (komplette Resektion) bis zum Grad 5 (nur Dekompression).²¹

Die Meningeom-Klassifizierung beruht auf der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2000.²² Die vorangegangene WHO-Klassifizierung zog keine klaren Grenzen zwischen gutartigen, atypischen und anaplastischen Meningeomen, wohingegen die neue Klassifizierung diese Unterschiede deutlicher hervorhebt.

Die Mehrheit der Meningeome ist gutartig und wird als WHO-Grad I eingeteilt. Der relativ große prozentuale Anteil (80-90%) umfasst eine große Anzahl histologischer Subtypen.³ ²³ Die drei häufigsten Subtypen der WHO-Klasse I sind die meningotheliomatösen, die fibroblastischen und die transitionalen Meningeome. Weniger häufige Subtypen der gleichen WHO-Klasse sind psammomatöse, angiomatöse, mikrozystische, sekretorische, lymphoplasmazellen-reiche und metaplastische Meningeome. Meningeome des WHO-Grades I haben eine geringe Rezidivwahrscheinlichkeit, welche zwischen 7 und 20% liegt. Zudem zeigen sie in ihrem Wachstum kein aggressives Verhalten.

Etwa zwischen 5 und 15% der Meningeome werden dem WHO-Grad II zugeteilt.³ ²³ Atypische Meningeome zeigen eine erhöhte mitotische Aktivität und drei oder mehr der folgenden Kennzeichen:

- 1. erhöhte Zellularität,
- 2. kleine Zellen mit einer hohen Nukleus-Plasma-Relation,
- 3. Fokus einer spontanen und geographischen Nekrose,
- 4. vier oder mehr Mitosen pro 10 "high power fields" (definiert als 0.16 mm² Gesichtsfelder).

Diese Kriterien werden in Verbindung mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit gebracht, die bei diesem WHO-Grad zwischen 30 und 40% liegt. Meningeome vom chordoiden und klarzelligen Typ zählt die WHO ebenfalls zur Klasse II. Ihnen wird dasselbe aggressive Verhalten mit ähnlicher Rezidivwahrscheinlichkeit zugesprochen.

Meningeome, die dem WHO-Grad III zugeordnet werden, werden als anaplastisch bezeichnet. Sie sind selten (1 bis 3% aller Meningeome) und zeichnen sich durch eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit (zwischen 50 und 80%) aus.³ Anaplastische Meningeome (WHO-Grad III) zeigen ein malignes Wachstum mit Kriterien der Malignität, die weit über die Veränderungen der atypischen Meningeome hinausgehen und Ähnlichkeiten mit Sarkomen, Karzinomen und Melanomen haben. Ebenso weisen sie einen hohen Mitosen-Index auf (>19 Mitosen/ 10 high power fields). Die eher seltenen Subtypen, die rhabdoiden und papillären Meningeome, werden ebenfalls zum WHO-Grad III gezählt.

In die WHO-Klassifizierung werden weder Infiltration des Hirnparenchyms noch ihr Proliferations-Index mit einbezogen. Meningeome, die das Hirn infiltrieren, zeigen eine deutlich höhere Rezidivwahrscheinlichkeit und ein Verhalten, das einem Meningeom der WHO-Klasse II entspricht. Aus diesem Grunde teilen einige Autoren diese dem WHO-Grad II zu.^{5 8} Der Proliferations-Index wird als Klassifizierungsmerkmal nicht in die Gradierung aufgenommen, da dieser hohe interinstitutionale und interindividuelle Unterschiede birgt. Dessen ungeachtet weisen Infiltration des Hirns und ein hoher Proliferations-Index auf aggressiveres Verhalten hin.

Wenngleich die WHO-Arbeitsgruppe diese Merkmale nicht einkalkuliert, vervollständigt sie die Diagnose durch Zusätze wie: "with brain invasion" oder "with high proliferative activity". ²²

1.4 Biomarker bei Meningeomen

Die bisherigen immunhistologischen Meningeomuntersuchungen zeigten nur Marker mit einem geringen diagnostischen und prognostischen Wert. Hierzu zählen Vimentin und EMA. Vimentin zeigt in diesen Untersuchungen eine starke und diffuse Positivität, so dass Vimentin nur eine geringe Spezifität aufweist. Gleiches gilt für EMA. Trotzdem werden diese, neben MIB-1, im klinischen Alltag am häufigsten angewendet.

Weitere Kandidaten konnten sich im klinischen Alltag nicht durchsetzen. Hier sind vor allem E-Cadherin, Claudin, Desmoplakin und Connexin zu nennen.

2 Material und Methoden

2.1 TMA-Technik

Die Gewebearray-Technik (tissue microarray / TMA) macht es möglich eine große Anzahl von Gewebeproben mit einem geringen Aufwand unter gleichen Bedingungen zu untersuchen. Dies bedeutet, dass man bis zu 1000 verschiedene Gewebeproben auf einen einzigen Gewebeschnitt bringen kann und diese gleichzeitig mit *in-situ* Methoden (Immunhistochemische Färbung, Immunfluoreszenz *in-situ* Hybridisierung) untersucht.

Folglich erwirbt man einen deutlichen Zeitgewinn bei der Untersuchung einer großen Anzahl von Tumoren. Darüber hinaus ist diese Methode für weitere Untersuchungen von Vorteil, da nur eine geringe Menge an Gewebe verwertet wird, somit stehen für anschließende Analysen ausreichende Mengen an Gewebe zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil ist eine erhebliche Kostenersparnis, da die Menge an Reagenzien pro untersuchter Probe deutlich reduziert ist. Dies führt außerdem zu einer maximalen Standardisierung der Methodik, da gleichzeitig sämtliche Tumore unter identischen Bedingungen in den gleichen Reagenzien behandelt werden. Somit wird die Schnitt-zu-Schnitt-Variabilität, die die Auswertung erschwert, minimiert.^{24 25}

2.2 TMA-Herstellung

Das TMA-Verfahren erlaubt das Einbringen von vielen Gewebezylindern (Durchmesser 0,6mm) von histologisch definierten Regionen verschiedener Tumore in einen einzigen Paraffinblock. Die Funktionsweise des "Arrays" ist in Abb. 2 dargestellt.

Zur Herstellung eines solchen Arrays wurden die Paraffinblöcke der Tumore und die dazugehörigen histologischen Schnitte, die bei der Diagnostik Verwendung fanden, aus dem Archiv der Neuropathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) herausgesucht. Hierbei fand die erste Auslese der nicht geeigneten Meningeome statt. Keine Verwendung fanden solche Tumore deren Paraffinblöcke nur unzureichend Gewebe enthielt. Nach dieser Auslese wurden von geeigneten Meningeomen neue HE-Schnitte (Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung) hergestellt, um die exakte Schnittebene zu ermitteln. Auf Basis der HE-Schnitte ist mittels Mikroskop die relevante und beste Stelle ausgewählt worden und diese mit einem Markerstift markiert worden. Anschließend wurde der markierte Bereich auf den Paraffinblock übertragen und auf diesem ebenfalls mit einem Markerstift markiert, so dass mit Hilfe des Hohlzylinders der gekennzeichnete Bereich ausgestanzt werden konnte.

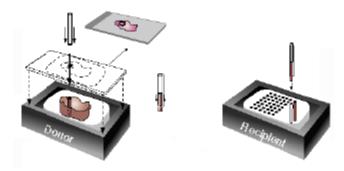


Abbildung 2: Tumor-Array-Herstellung. Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600μm), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen von Gewebestücken in mit einem analogen Instrument (äußerer Durchmesser ca. 600μm) vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock. Bis zu 1000 Gewebezylinder können in einen 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden.





Abbildung 3: Gewebe-Array-Stanzgerät

Links: Übersicht. Rechts: Detailaufnahme der zwei "Nadeln". Erklärungen siehe Text.

Abb. 3 zeigt das Array-Stanzgerät. Kernstück der Konstruktion sind zwei an der Spitze geschärfte Hohlzylinder. Die kleinere "Nadel" hat einen äußeren Durchmesser von 0,6 mm. Diese "Nadel" wird ausschließlich zum Stanzen von Löchern in die Empfängerblöcke gebraucht. Die dickere "Nadel" dient dem Ausstanzen von Tumorgewebestücken aus Spenderblöcken und das Einbringen dieser Zylinder in den Empfängerblock. Der innere Durchmesser dieser zweiten "Nadel" entspricht dem äußeren Durchmesser der dünneren "Nadel".

2.3 Tumorkollektiv

2.3.1 Histologie-Review

Von jedem Tumor wurden alle histologischen Schnitte von erfahrenen Neuropathologen gemäß der aktuellen WHO-Klassifizierung aus dem Jahr 2000 angepasst.²² An klinischen Daten wurden das OP-Datum, Alter sowie das Geschlecht der Patienten registriert

2.3.2 Tumorproben

Es wurden Proben von 359 Tumoren untersucht. Sämtliche Gewebeproben stammen von Biopsien, die zwischen den Jahren 1972 und 2006 am Institut für Neuropathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) untersucht wurden. Es wurden Tumorproben von insgesamt 229 Patienten entnommen. Von 107 Patienten stammen 107 Meningeome, die nicht als Rezidiv geführt worden waren. Diese Tumore stammen aus den Jahren 1999 und 2000. Da von diesen Patienten keine Rezidiventfernung am UKE vorgenommen wurde bzw. keine Anforderungen von Daten, neuropathologischen Befunden oder Gewebeproben von externen Kliniken oder Instituten vorlagen, wurden diese Patienten als rezidivfrei angesehen. ²⁶ ²⁷ ²⁸ Die restlichen 252 Tumore stammen von 122 Patienten. Sie wurden auf Grund von Rezidiven unterschiedlich häufig operiert.

Eine genaue Übersicht über die Tumortypen ist in den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
123	atypisch	2	W	29
124	meningotheliomatös	1	W	61
125	fibroblastisch	1	W	84
126	transitional	1	W	61
127	psammomatös	1	W	67
128	atypisch	2	W	75
129	atypisch	2	m	51
130	transitional	1	W	57
131	fibroblastisch	1	W	58

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
132	meningotheliomatös	1	m	78
133	fibroblastisch	1	W	70
134	atypisch	2	W	59
135	psammomatös	1	W	60
136	fibroblastisch	1	W	68
137	angiomatös	1	W	50
138	meningotheliomatös	1	W	46
139	fibroblastisch	1	W	77
140	meningotheliomatös	1	m	75
141	transitional	1	W	41
142	atypisch	2	W	50
143	atypisch	2	m	56
144	mikrozystisch	1	m	42
145	fibroblastisch	1	W	53
146	meningotheliomatös	1	W	60
147	fibroblastisch	1	W	74
148	psammomatös	1	W	49
149	meningotheliomatös	1	W	74
150	meningotheliomatös	1	W	62
151	sekretorisch	1	W	77
152	mikrozystisch	1	W	66
153	meningotheliomatös	1	W	77
154	transitional	1	W	52
155	atypisch	2	m	49
156	meningotheliomatös	1	W	85
157	transitional	1	W	56
158	psammomatös	1	m	52
159	atypisch	2	m	54
160	meningotheliomatös	1		75
161	meningotheliomatös	1	m	56
162	atypisch	2	W	70
163	fibroblastisch	1	W	36
164		1	W	62
	fibroblastisch	1	W	
165 166	transitional	1	W	67
167	transitional		W	77 41
168	transitional transitional	1	W	55
		2	W	
169	atypisch	2	W	76
170	atypisch		m	63
171	meningotheliomatös	1	W	32
172	fibroblastisch	1	m 	81
173	transitional	1	W	68
174	meningotheliomatös	1	W	66
175	fibroblastisch	1	W	59
176	klarzellig	2	m	42

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
rauememumme	Зивтур	WIIO-GIAU	Geschiecht	Aitei
177	meningotheliomatös	1	m	31
178	meningotheliomatös	1	m	45
179	meningotheliomatös	1	W	67
180	atypisch	2	W	65
181	atypisch	2	W	54
182	meningotheliomatös	1	m	65
183	meningotheliomatös	1	m	38
184	meningotheliomatös	1	W	59
185	fibroblastisch	1	W	49
186	mikrozystisch	1	W	59
187	meningotheliomatös	1	W	35
188	meningotheliomatös	1	W	47
189	meningotheliomatös	1	W	52
190	meningotheliomatös	1	W	62
191	fibroblastisch	1	W	60
192	transitional	1	W	59
193	meningotheliomatös	1	W	49
194	fibroblastisch	1	W	66
195	meningotheliomatös	1	W	51
196	transitional	1	W	52
197	transitional	1	W	45
198	psammomatös	1	W	57
199	transitional	1	W	67
200	sekretorisch	1	W	65
201	fibroblastisch	1	W	69
202	meningotheliomatös	1	W	78
203	meningotheliomatös	1	W	51
204	fibroblastisch	1	W	51
205	meningotheliomatös	1	m	56
206	sekretorisch	1	m	59
207	atypisch	2	W	75
208	meningotheliomatös	1	W	43
209	fibroblastisch	1	W	65
210	meningotheliomatös	1	W	78
211	meningotheliomatös	1	W	79
212	mikrozystisch	1	W	55
213	atypisch	2	m	29
214	transitional	1	W	69
215	fibroblastisch	1	m	57
216	mikrozystisch	1	W	55
217	transitional	1	m	63
218	fibroblastisch	1	W	43
219	meningotheliomatös	1	W	59
220	fibroblastisch	1	W	48
221	transitional	1	W	46

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
222	meningotheliomatös	1	W	58
223	transitional	1	m	39
224	transitional	1	W	53
225	atypisch	2	W	38
226	sekretorisch	1	W	63
227	meningotheliomatös	1	W	44
228	transitional	1	W	39
229	meningotheliomatös	1	W	56

Tabelle 1: Patientenübersicht aller NRM (Nicht-Rezidiv-Meningeome)

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
1	atypisch	2	m	67
1	atypisch	2	m	69
2	mikrozystisch	1	W	59
2	transitional	1	W	60
2	papillär	3	W	60
3	transitional	1	W	40
4	meningotheliomatös	1	W	29
4	meningotheliomatös	1	W	34
5	atypisch	2	m	74
5	atypisch	2	m	84
6	meningotheliomatös	1	W	53
6	meningotheliomatös	1	W	54
6	atypisch	2	W	57
6	atypisch	2	W	59
6	atypisch	2	W	60
7	meningotheliomatös	1	W	41
7	meningotheliomatös	1	W	49
8	fibroblastisch	1	W	22
8	fibroblastisch	1	W	26
8	fibroblastisch	1	W	27
9	meningotheliomatös	1	W	64
9	meningotheliomatös	1	W	63
10	transitional	1	W	47
11	transitional	1	W	78
12	atypisch	2	W	26
12	atypisch	2	W	27

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
12	atypisch	2	W	28
13	meningotheliomatös	1	m	26
13	transitional	1	m	31
14	meningotheliomatös	1	m	58
15	transitional	1	W	62
15	transitional	1	w	63
16	atypisch	2	W	65
17	anaplastisch	3	W	69
17	atypisch	2	w	71
18	meningotheliomatös	1	W	31
18	meningotheliomatös	1	w	55
19	transitional	1	W	39
20	fibroblastisch	1	W	65
21	meningotheliomatös	1	W	37
22		2		60
	atypisch	2	m	
23	atypisch		W	20
24	meningotheliomatös	1	m	41
24	meningotheliomatös	1	m	41
25	meningotheliomatös	1	m	65 67
25	transitional	1	m	67
26	fibroblastisch	1	m	61
122	meningotheliomatös	1	m	82
27	meningotheliomatös	1	W	61
28	mikrozystisch	1	W	51
28	transitional	1	W	54
29	meningotheliomatös	1	m	63
29	meningotheliomatös	1	m	70
30	fibroblastisch	1	W	77
30	meningotheliomatös	1	W	82
31	meningotheliomatös	1	m	54
31	meningotheliomatös	1	m	60
31	atypisch	2	m	64
32	mikrozystisch	1	W	44
32	meningotheliomatös	1	W	49
32 32	meningotheliomatös atypisch	1 2	W	53 58
32 32	atypisch atypisch	2	W W	58 60
33	meningotheliomatös	1	W	48
33	meningotheliomatös	1	W	53
34	mikrozystisch	1	W	30
34	mikrozystisch	1	W	43
35	meningotheliomatös	1	W	58
00	meningotheliomatös	'	**	60

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
36	fibroblastisch	1	m	30
36	meningotheliomatös	1	m	36
37	meningotheliomatös	1	W	67
37	anaplastisch	3	W	69
38	atypisch	2	m	56
38	meningotheliomatös	1	m	61
39	meningotheliomatös	1	W	41
40	fibroblastisch	1	W	32
40	transitional	1	W	37
40	fibroblastisch	1	W	40
41	atypisch	2	m	43
41	atypisch	2	W	45
41	atypisch	2	W	46
42	meningotheliomatös	1	W	50
43	transitional	1	m	34
44	meningotheliomatös	1	W	56
44	meningotheliomatös	1	W	56
45	atypisch	2	W	37
46	transitional	1	m	62
46	meningotheliomatös	1	m	62
47	transitional	1	W	54
47	psammomatös	1	W	59
48	klarzellig	2	m	69
48	atypisch	2	m	72
49	meningotheliomatös	1	m	66
49	atypisch	2	m	66
49	anaplastisch	3	m	67
50	transitional	1	W	55
51	fibroblastisch	1	W	47
52	fibroblastisch	1	m	14
53	meningotheliomatös	1	W	52
53	meningotheliomatös	1	W	57
54	transitional	1	W	27
54	transitional	1	W	29
55	meningotheliomatös	1	m	69
55	fibroblastisch	1	m	71
55	transitional	1	m	72
55	fibroblastisch	1	m	73
56	meningotheliomatös	1	w	42
56	meningotheliomatös	1	W	45
57	meningotheliomatös	1	W	52
58	mikrozystisch	1	W	70
59	fibroblastisch	1	W	33

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
59	meningotheliomatös	1	W	33
60	fibroblastisch	1	W	76
61	mikrozystisch	1	W	48
61	meningotheliomatös	1	w	50
61	meningotheliomatös	1	w	52
62	fibroblastisch	1	W	50
62	fibroblastisch	1	w	56
63	fibroblastisch	1	W	54
63	fibroblastisch	1	W	76
64	meningotheliomatös	1	W	65
64	transitional	1	W	70
65	fibroblastisch	1	W	60
65	atypisch	2	W	68
66	transitional	1	W	54
66	fibroblastisch	1	W	56
66	atypisch	2	W	62
67	transitional	1	W	47
68	atypisch	2	m	79
68	atypisch	2	m	81
69	atypisch	2	m	72
69	anaplastisch	3	m	72
70	atypisch	2	W	12
71	meningotheliomatös	1	W	52
72	atypisch	2	m	75
73	atypisch	2	W	33
74	klarzellig	2	W	11
74	fibroblastisch	1	W	11
75	meningotheliomatös	1	W	42
75	meningotheliomatös	1	W	61
76	transitional	1	w	53
76	transitional	1	w	56
76	fibroblastisch	1	W	63
77	fibroblastisch	1	m	46
77	meningotheliomatös	1	m	45
77	transitional	1	m	46
77	meningotheliomatös	1	m	47
78	meningotheliomatös	1	W	46
78	mikrozystisch	1	W	47
79 	atypisch	2	W	66
79 70	atypisch	2	W	70 75
79	atypisch	2	W	75
80	atypisch	2	m	11
81	atypisch	2	m	51

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
81	atypisch	2	m	60
82	meningotheliomatös	1	W	45
82	meningotheliomatös	1	w	51
82	meningotheliomatös	1	W	56
83	meningotheliomatös	1	W	52
84	meningotheliomatös	1	W	46
84	meningotheliomatös	1	W	48
84	meningotheliomatös	1	W	48
85	atypisch	2	m	62
85	atypisch	2	m	62
85	atypisch	2	m	63
86	transitional	1	m	58
87	meningotheliomatös	1	m	40
88	meningotheliomatös	1	W	53
88	meningotheliomatös	1	W	53
89	transitional	1	W	57
90	transitional	1	m	52
90	atypisch	2	m	53
91	anaplastisch	3	W	75
91	atypisch	2	W	76
92	meningotheliomatös	1	W	51
92	meningotheliomatös	1	W	64
93	transitional	1	m	56
93	psammomatös	1	m	66
93	transitional	1	m	66
93	atypisch	2	m	67
94	meningotheliomatös	1	m	63
94	meningotheliomatös	1	m	66
94	mikrozystisch	1	m	67
95	meningotheliomatös	1	m	51
95	transitional	1	m	54
96	atypisch	2	m	71
97	meningotheliomatös	1	w	35
97	transitional	1	W	44
98	fibroblastisch	1	w	52
98	atypisch	2	w	52
98	atypisch	2	w	53
98	atypisch	2	W	53
98	atypisch	2	W	53
99	transitional	1	W	49
100	atypisch	2	W	25
100	atypisch	2	W	26
100	atypisch	2	W	27
100	anaplastisch	3	W	27

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
100	anaplastisch	3	W	27
100	anaplastisch	3	W	28
100	anaplastisch	3	W	28
100	anaplastisch	3	W	29
101	fibroblastisch	1	m	71
101	fibroblastisch	1	m	76
101	transitional	1	m	80
102	transitional	1	W	43
102	transitional	1	W	48
103	atypisch	2	W	25
104	meningotheliomatös	1	W	46
104	meningotheliomatös	1	W	52
105	fibroblastisch	1	m	44
105	fibroblastisch	1	m	48
106	meningotheliomatös	1	W	29
107	atypisch	2	W	63
108	meningotheliomatös	1	W	63
109	meningotheliomatös	1	W	22
109	transitional	1	W	22
109	transitional	1	W	23
110	transitional	1	W	73
111	meningotheliomatös	1	W	58
111	transitional	1	W	61
112	meningotheliomatös	1	W	39
112	transitional	1	W	43
112	transitional	1	W	45
112	meningotheliomatös	1	W	45
113	meningotheliomatös	1	W	48
114	meningotheliomatös	1	W	70
115	atypisch	2	W	31
115	meningotheliomatös	1	W	35
115	meningotheliomatös	1	W	37
115	atypisch	2	W	42
115	meningotheliomatös	1	W	45
115	atypisch	2	w	47
116	meningotheliomatös	1	m	35
116	meningotheliomatös	1	m	41
116	meningotheliomatös	1	m	46
116	meningotheliomatös	1	m	49
116	meningotheliomatös	1	m	51
116	atypisch	2	m	52
117	fibroblastisch	1	m	58
117	fibroblastisch	1	m	63
118	transitional	1	W	69

Patientennummer	Subtyp	WHO-Grad	Geschlecht	Alter
119	fibroblastisch	1	m	55
119	atypisch	2	m	57
119	atypisch	2	m	57
119	atypisch	2	m	59
119	anaplastisch	3	m	60
120	fibroblastisch	1	m	55
120	fibroblastisch	1	m	57
120	atypisch	2	m	58
121	transitional	1	W	75

Tabelle 2: Patientenübersicht aller RM (Rezidiv-Meningeome)

2.4 TMA-Aufbau

Es wurden zwei identische TMAs hergestellt. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass von jedem Tumor eine Gewebeprobe zur Untersuchung zur Verfügung steht. Die TMAs enthalten jeweils 390 Gewebeproben. Von einigen Tumoren sind zwei Proben auf einem TMA-Block. Dies ist der Fall, wenn während des Stanzens Verarbeitungsfehler aufgetreten sind bzw. die gesetzte Gewebeprobe unvollständig ist.

Zusätzlich ist nach erstmaligem Durchschauen einer HE-Färbung (Hämatoxilin-Eosin-Färbung) ein dritter Array-Block hergestellt worden. Dieser enthält Gewebeproben von Tumoren, die sich weder auf Schnitten von Array-Block 1 noch auf Schnitten von Array-Block 2 darstellen.

Auf dem Array-Block 3 sind von dem jeweiligen Tumor zwei weitere Tumorproben gesetzt. Somit ist gewährleistest, dass von allen Tumoren ausreichend Gewebestanzen auswertbar waren.

2.5 Immunhistochemische Färbung (IHC)

Für die immunhistochemische Untersuchung des Array-Schnittes ist eine standardisierte, indirekte Immunoperoxidase-Methode verwendet worden. Hier bindet ein unkonjugierter Primär-Antikörper (AK) an das Antigen. Anschließend wird ein 2. enzymgekoppelter AK, der gegen das Fc-Fragment des Primär-AK (jetzt als Antigen wirkend) gerichtet ist,

aufgetragen. Es folgt die Substrat-Chromogenreaktion. Es wird ein Enzym eingesetzt, das farblose Vorstufen von Chromogenen in farbige Enzymprodukte umsetzt. Als Enzym wird eine Peroxidase verwendet (Meerrettich-Peroxidase (HRP)) als Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB).

Die eingesetzten Antikörper, ihre Verdünnungen und die Art der Schnitt-Vorbehandlung sind in Tabelle 3 dargestellt. Tumore mit bekannter Positivität fanden als positive Kontrolle Verwendung. Als negative Kontrolle dienten Präparate, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde. Eine Auswertung der Tumor-Array-Gewebeproben erfolgte nur, wenn mindestens 80 auswertbare Tumorzellen vorlagen.

Antikörper	Vorbehandlung	Hersteller	Verdünnung
PAN-CK	Mikrowelle,		
(Cytokeratin)	Citratpuffer	DAKO	1:50
C-Kit	Keine	DAKO	1:50
EMA (Epitheliales	Mikrowelle,		
Membranantigen)	Citratpuffer	DAKO	1:50
MIB-1 (Ki 67-	Mikrowelle,	Neo	
Antigen)	Citratpuffer	Markers	1:10
p53 Protein	Mikrowelle,		
pooriotein	Citratpuffer	DAKO	1:200
Vimentin	Mikrowelle,		
VIIIIGIIIIII	Citratpuffer	DAKO	1:100
Östrogen-	Mikrowelle,		
Rezeptor	Citratpuffer	Novocastra	1:80

Tabelle 3: Verwendete Antikörper, Hersteller und Inkubationsbedingungen für die immunhistochemische Färbung, Nachweissystem HRP, Chromogen DAB

Für jeden Antikörper wurde bei jedem Tumorgewebe die Färbeintensität (Skala von 0-3) oder die Zahl der positiven Zellen gezählt. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Tumore nach festgelegten Kriterien in Kategorien eingeteilt (Tabelle 4). Übersichtsaufnahmen HE gefärbter Tumorarray-Schnitte und Beispiele von positiven immunhistochemischen Befunden sind in den Abbildungen 4, 5 und 6 dargestellt. Nach Testen verschiedener Verdünnungen von C-Kit (1:30; 1:50; 1:100) stellte sich die 1:100-Verdünnung als optimal heraus.

Antikörper	IHC-Resultat	IHC- Auswertung	Kriterium				
	0	nogativ	FI 0				
EMA (Epitheliales	1	negativ	FI 1				
Membranantigen)	2	positiv	FI 2				
go	3	ροσιτίν	FI 3				
	schwach	-	< 3% aller Zellen positiv				
MIB-1 (Ki 67- Antigen)	mittel	-	3% <= x < 6% aller Zellen positiv				
	stark	-	>= 6% aller Zellen positiv				
	0	negativ	FI 0				
C-Kit	1	Hegativ	FI 1				
C-Kit	2	pocitiv	FI 2				
	3	positiv	FI 3				
	0	pogotiv	FI 0				
	1	negativ	FI 1				
Vimentin	2	n o o i tiv	FI 2				
	3	positiv	FI3				
Östrogen- Rezeptor			Zellkernen zu gesamten Anzahl				
p53 Protein	von ausgewen	leten Zellen (mina.	100 Zellen wurden ausgewertet)				
	0	negativ	FI 0				
PAN-CK	1		FI 1				
I AN-OK	2	positiv	FI 2				
	3		FI 3				

Tabelle 4: Kriterien für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen (IHC). FI = Färbeintensität

2.5.1 Antikörper/Gene

In dieser Untersuchung kommen mehrere Antikörper zum Einsatz, die teilweise in der Routinediagnostik Verwendung finden:

Epitheliales Membranantigen (EMA):

EMA ist eines von verschiedenen menschlichen Milch-Fett-Globuli-Proteinen (HMFGPs), die vom Mamma-Epithel abstammen. In erster Linie handelt es sich hierbei um Glycoproteine, die zum Plasmalemma von Epithelzellen in der Nähe von tight junctions gehören. Die genaue Funktion der HMFGPs, EMA eingeschlossen, ist nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass sie eine Schutzfunktion haben oder zur Sekretion der Zellen beitragen.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass EMA der nützlichste Marker in der klinischen Diagnostik von Meningeomen ist. EMA zeigt eine positive immunhistochemische Reaktion bei 50-100% aller Meningeome. ^{29 30 31}

MIB-1:

Der monoklonale Antikörper MIB-1 detektiert das nukleäre, zellproliferationsassozierte Antigen Ki 67, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, dass heißt in allen Phasen außer der G0-Phase.³² Mittels einer immunhistochemischen Untersuchung für MIB-1 kann die Anzahl an proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellenzahl ermittelt werden (Proliferationsindex).

MIB-1 soll ein nützlicher Marker zur Klassifizierung von Meningeomen sein, weil die WHO-Arbeitsgruppe diesen als richtungweisenden Marker für die Vorhersage und Prognose der Rezidivwahrscheinlichkeit ansieht.²²

C-Kit:

Die Mutation des Protooncogens C-Kit ist eine der Schlüsselmutationen bei der Entstehung von Gastrointestinalem-Stroma-Tumoren (GISTs). C-KIT-Mutationen wurden bei 90-100% aller GISTs festgestellt. Diese Mutation hat die Aktivierung des KIT-Proteins, einer transmembranen Typ 3 Rezeptor-Tyrosin-Kinase, zur Folge, die mittels immunhistochemischer Anfärbung mit einem Antikörper gegen C-Kit nachgewiesen werden kann. Die KIT-Tyrosinkinase soll eine Rolle bei der Zellproliferation spielen und/oder die Apoptose verhindern.

C-Kit färbt außerdem die Cajal-Zellen an. Sie stellen ein komplexes Zellsystem dar, das eine Vermittlungsfunktion zwischen den autonomen Nerven und den glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes übernimmt. Sie sind im Auerbach-Plexus des Dickdarms und in der glatten Muskulatur der Darmwand gelegen.

Cajal-Zellen exprimieren das KIT Protooncogen und sind wahrscheinlich die Ausgangszellen für die Entstehung von GISTs.

Frühere immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass ca. 2% von 44 getesteten Meningeomen C-Kit expremieren.³³

Vimentin:

Vimentin ist ein Intermediär-Filament-Protein, das hauptsächlich in Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommt.³⁴ weshalb es in vielen anderen Tumoren auftritt. Außerdem wurde es in nahezu allen Meningeomen und fetalen Meningealzellen nachgewiesen.³⁵

Östrogen-Rezeptor:

10% aller Meningeome bilden Östrogen-Rezeptoren.⁸ Östrogen-Rezeptoren gehören zur Gruppe der Steroid-Rezeptoren und sind somit am Nukleus gelegen.

Neue Daten aus in vitro Studien zeigen, dass Östrogen weder das Wachstum von Meningeomen begünstigt noch stimmuliert,⁸ somit ist der Zusammenhang von Östrogen-Rezeptoren und Meningeomen weiterhin ungeklärt.

p53:

Der Tumor-Suppressor p53 ist einer der Schlüsselregulatoren des Zellzykluses. Eine Inaktivierung führt zu Zellwachstum und Tumorentwicklung. Sein Genort, TP53, ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17. Eine Mutation von TP53 hat eine erhöhte Stabilität des p53 Proteins zur Folge, welches aus diesem Grunde immunhistochemisch nachweisbar wird. TP53 ist eines der meist betroffenen Gene in der menschlichen Tumorentwicklung. Dennoch sind Mutationen in Meningeomen relativ selten. Verschiedene Studien zeigten entweder keine oder nur in vereinzelten Meningeomen TP53-Mutationen.^{36 37 38 39 40} Die Überexpression wird zudem im Zusammenhang zum einen mit einem erhöhtem MIB-1-Index und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit^{41 42} zum anderen mit einer aggressiven bösartigen Histologie⁴³ und gesehen. Die genaue Rolle von p53 in der Meningeomentwicklung ist jedoch nicht abschließend geklärt.

Cytokeratin (PAN-CK):

Cytokeratin ist ein Intermediär-Filament-Protein welches spezifisch für alle Epithelien ist. Der PAN-CK Antikörper KL1 erfaßt aufgrund seines breiten Reaktionsspektrums mit Cytokeratinen eine Vielzahl von Geweben mit epithelialer Differenzierung. Vor allem gastrointestinales Epithel und seine Tumore sowie muziöse Tumore des Ovars und Merkel-Zell-Tumoren exprimieren PAN-CK. Außerdem gilt es als spezifischer Marker der Ursprungszellen von Meningeomen, den Arachnoidalzellen. Die Expression dieses

Intermediär-Filament-Proteins ist in Meningeomen nicht abschließend geklärt, obwohl PAN-CK in verschiedenen Studien in Meningeomen nachgewiesen worden ist. 46

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Es wurden 359 Tumore von 229 Patienten untersucht. Die untersuchten Patienten weisen ein Durchschnittsalter von $53,73 \pm 14,92$ Jahren auf. Hierbei wurde berücksichtigt, dass durch wiederholte Operationen die Daten von verschiedenen Altersstufen in die Berechnung eingegangen sind. Das Alter der Patienten mit RM ist zum Zeitpunkt ihrer ersten Op im Durchschnitt $50,67 \pm 15,96$ Jahre. Das Verhältnis des weiblichen zum männlichen Geschlecht beläuft sich auf 2,5 zu 1. Die Subtypen der einzelnen Meningeome sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

3.2 Ablauf der Auswertungen

Die Zahl der auswertbaren Gewebezylinder variiert sowohl zwischen den Array-Blöcken als auch zwischen den einzelnen Färbungen. Gründe hierfür sind zum einen Schwankungen bei der Blockherstellung zum anderen Ablösungen von Gewebezylindern während des Schneidens. Folglich ist nicht garantiert, dass die Anzahl von Proben in den jeweiligen Auswertungen und Färbereihen eine übereinstimmende Größe aufweist. Diese Schwankungen minimierten sich durch die Herstellung von zwei identischen TMA-Blöcken.

Wenn mehrere Gewebeproben ausgewertet wurden, sind jeweils die Mittelwerte aller Proben in die Endbewertung eingegangen. Somit besteht die Möglichkeit, dass ein Endergebnis bis zu vier Einzelergebnisse umfasst. Die Mittelwerte wurden nach gängigen Regeln gerundet, so dass in der IHC-Auswertung ganze Zahlen Eingang finden. Anschließend wurde eine Einteilung vorgenommen. Proben mit Mittelwerten von 0 oder 1 wurden mit "negativ" bewertet und Proben mit Mittelwerten von 2 oder 3 wurden mit "positiv" bewertet (siehe Tabelle 4).

Bei der Auswertung der Färbungen von Östrogen und p53 wurden alle positiven Zellen in 100 bis 400 Zellen gezählt. Die Prozentsätze, die sich aus dem Quotienten K_{pos}/K_{ges} x 100 ergeben, wurden für jede Gewebeprobe ermittelt und anschließend wurde der Mittelwert der gesamten Proben eines Tumors errechnet.

Der MIB-1 Index wurde nach folgender Methode bestimmt:

Im Bereich des Gebiets mit den meisten MIB-1 positiven Kernen wurden 3 Gesichtsfelder unter Ölimmersion ausgewertet (MIB 3 GF). Ein Gesichtsfeld hat dabei die Größe von $0,031 \text{ mm}^2$. Der MIB-1 Index ergibt sich aus dem Verhältnis der MIB-1 positiven Zellkerne (K_{pos}) zu der Gesamtheit der Zellkerne pro Gesichtsfeld (K_{ges}). Durch folgende Formel lässt sich der MIB-1-Index zusammenfassen: $K_{pos}/K_{ges} \times 100 = MIB-1$ Index.

3.3 Darstellung der Ergebnisse

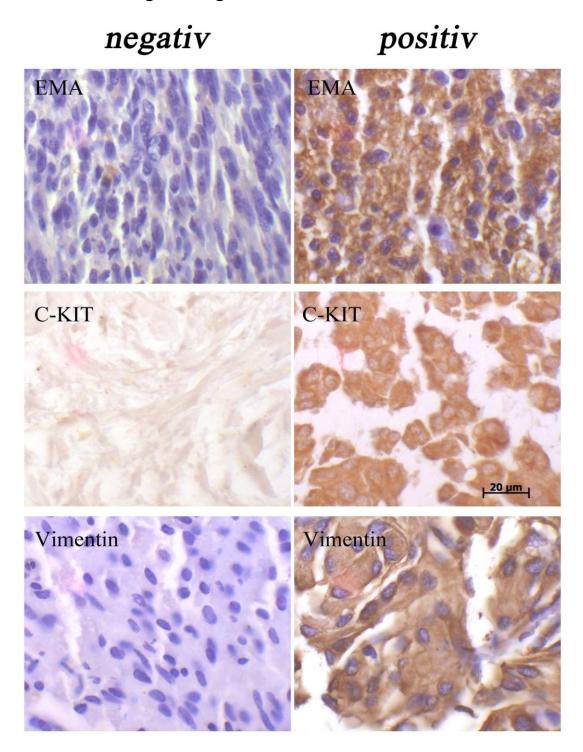


Abbildung 5a: Repräsentative immunhistologische Färbungen für EMA, C-KIT und Vimentin mit einem positiven und einem negativen Färbebeispiel. Balken entspricht 20 μm.

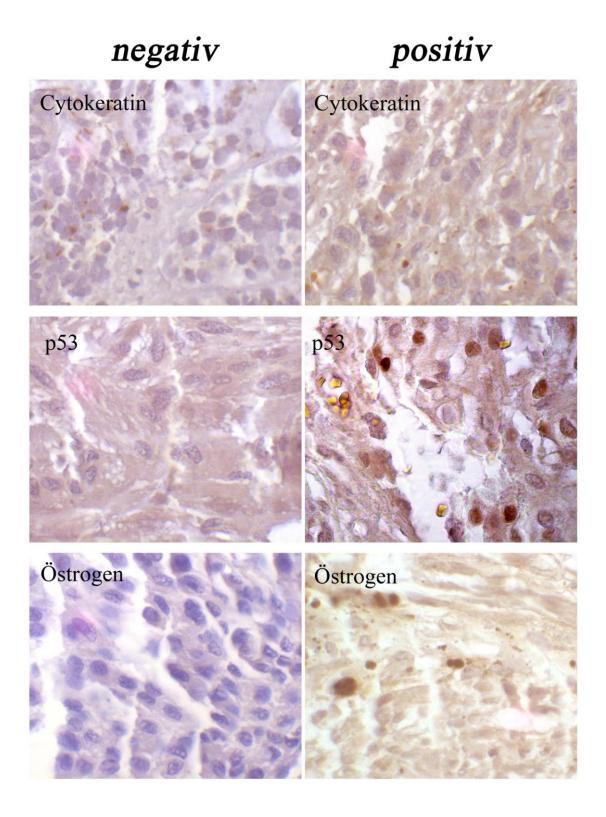


Abbildung 5b: Repräsentative immunhistologische Färbungen für Cytokeratin, p53 und Östrogen mit einem positiven und einem negativen Färbebeispiel. Balken entspricht 20 µm.

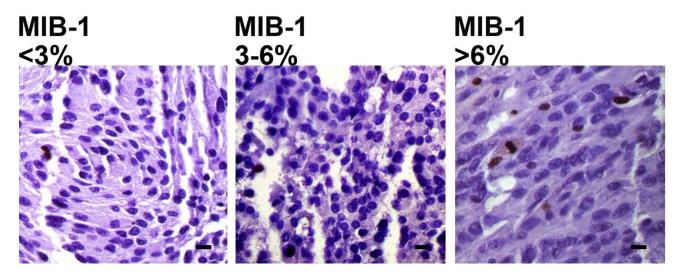


Abbildung 6: Dargestellte MIB-Färbungen mit unterschiedlichen Indices. Balken entspricht 20 μm

3.4 Ergebnisse

3.4.1 EMA

				G	esamt						NRM			
		Ge	Gesamt Alter			Gesch	lecht	Ges	samt	Alt	ter	Geschlecht		
⊴		%	n =	DS	SA	m	w	%	n =	DS	SA	m	w	
EMA	neg.	13	47	46,28	15,46	9	38	1	1	=	-	0	1	
	pos.	87	302	55,20	14,08	98	204	99	103	57,82	12,92	20	71	
	Σ	-	349	52,34	15,08	107	242	-	104	57,82	12,64	20	72	

				R	М					MIB	-1		
		Gesamt Alter				Gesch	lecht	< 3	%	3% <=	= x < 6%	>= 6%	
₫		%	n =	DS	SA	m	w	%	n =	%	n =	%	n =
ЕМА	neg.	19	46	45,01	17,88	9	37	18	42	33	4	11	1
	pos.	81	198	53,84	14,45	77	121	82	187	67	8	89	8
	Σ	-	244	53,85	15,01	86	158	-	229	-	12	-	9

Tabellen 5 und 5a: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung EMA

Es wurden 349 Tumorgewebeproben ausgewertet. Die dazugehörigen Patienten hatten ein Durchschnittsalter von $52,34 \pm 15,01$ Jahren. Die Mehrheit der Gewebe ist EMA-positiv (87%) (siehe Tabellen 5 und 5a). Bei einer Differenzierung zwischen Rezidiv- (RM) und

Nichtrezidiv-Meningeomen (NRM) fällt auf, dass deutlich mehr Nichtrezidiv-Meningeome auf EMA positiv reagieren (NRM 99%; RM 81%) (statistisch signifikant, students t-test, p=5,1446E-13).

3.4.2 MIB-1

				G	esamt					ı	NRM		
		Ge	Gesam t				nlecht	Ge	sam t	Alt	ter	Geschlecht	
B-1		%	n =	DS	SA	m	w	%	n =	DS	SA	m	w
-index (M	8 ×	90	315	53,83	14,89	92	223	93	97	58,43	12,96	19	77
Proliferation-index (MIB-1)	3-6	7	25	55,29	15,10	14	11	6	6	47,80	12,40	2	4
	9<	3	10	48,90	19,99	1	9	1	1	46,00	-	-	1
	Σ	-	350	52,80	15,40	107	243	-	104	57,79	13,07	21	82

					RM		
		Ge	sam t	Alt	ter	Gesc	hlecht
3-1)		%	n=	DS	SA	m	W
index (MII	۶>	89	218	51,80	15,26	73	145
Proliferation-index (MIB-1)	9-8	8	19	57,26	15,41	12	7
Ā	9<	4	9	49,22	21,18	1	8
	Σ	•	246	52,13	15,52	86	160

Tabellen 6 und 6a: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung MIB-1

Die Proliferationsindexergebnisse sind in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasst alle Proben mit einem MIB-1-Index unter 3%, die zweite alle mit einem zwischen 3 und kleiner 6% und die dritte alle mit einem Wert, der größer oder gleich 6% ist. Es konnten

350 Gewebeproben von Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 52,80 \pm 15,40 Jahren ausgewertet werden.

Hierbei fällt vor allem auf, dass der Großteil der Proben einen MIB-1-Index unter 3% hat (9%). Ein Unterschied zwischen RM / NRM ergibt sich nicht. Beide weisen ähnliche Ergebnisse auf (statistisch nicht signifikant, students t-test, p=0,19227).

Auffällig ist der geringe Anteil von stark positiven Proben (4%) sowohl in Gesamtbetrachtung als auch im RM-/ NRM-Vergleich.

3.4.3 C-Kit

				Ge	esamt			NRM								
		Ges	amt	Alt	ter	Gesc	hlecht	Ge	samt	Alt	ter	Geschlecht				
₹		%	n =	DS	SA	m	w	%	n =	DS	SA	m	w			
ਹੋ	neg.	16	56	51,00	14,85	10	46	14	15	63,33	15,66	2	13			
	pos.	84	290	54,30	14,85	95	195	86	90	56,92	12,38	19	71			
	Σ	-	346	53,67	14,85	105	241	-	105	57,68	12,92	21	84			

					RM			MIB-1							
		Ges	samt	Al	ter	Geschlecht		<	3%	3% <=	= x < 6%	>= 6%			
Α̈́		%	n =	DS	SA	m	w	%	n =	%	n =	%	n =		
نَ	neg.	17	41	46,49	15,87	8	33	14	43	32	8	20	2		
	pos.	83	200	53,52	14,68	76	124	86	264	68	17	80	8		
	Σ	•	241	52,08	15,40	84	157	-	307	•	25	-	10		

Tabellen 7 und 8: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung C-KIT

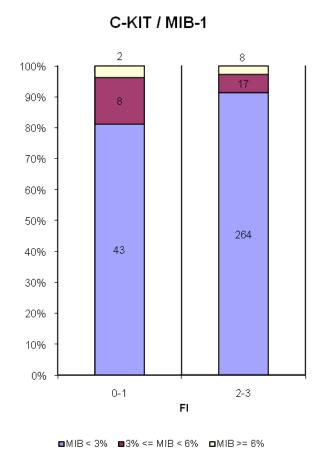
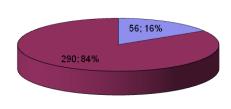


Abbildung 7a: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Färbung C-KIT abhängig vom MIB-1-Index



■0-1 ■2-3

Anzahl insgesamt

Abbildung 7b: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Färbung C-KIT unter Betrachtung aller Gewebeproben und ihrer prozentualen Verteilung auf negative und positive Färbeergebnisse

Es wurden insgesamt 346 Proben ausgewertet. Von diesen 346 reagieren 84% positiv auf C-KIT (siehe Abbildung 7b). Ein Unterschied in der Positivität ist bei einem Vergleich zwischen NRM und RM nicht feststellbar: 86% aller NRM reagieren positiv, wohingegen 83% aller RM positiv sind. Die Positivität ist geschlechtsunabhängig (statistisch nicht signifikant, students t-test, p=0,146417).

Gewebeproben, deren MIB-1-Indices unter 3% liegen, zeigen einen ähnlich hohen Prozentsatz an C-KIT- exprimierenden Tumoren auf (86%) auf. Auffällig ist der Rückgang

der Positivität bei einem erhöhten MIB-1-Wert. Tumorproben mit MIB-1-Indices zwischen 3 und 6% exprimieren deutlich weniger C-KIT. Die Anzahl der positiven Gewebeproben beträgt hier lediglich 68%. Bei einem MIB-1-Index von größer oder gleich 6% ist der Rückgang der positiven Proben nicht so deutlich. Hier liegt der Anteil der negativen Proben bei 20%.

			,	WHO-	Klass	e	
		WH	0 1	WHO	2	WHO	3
		%	n =	%	n =	%	n =
	Neg.	17	42	0,09	7	0,42	5
С-КІТ	Pos.	83	211	0,91	72	0,58	7
	Σ	-	253	-	79	-	12

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung C-KIT abhängig von der WHO-Klassifizierung

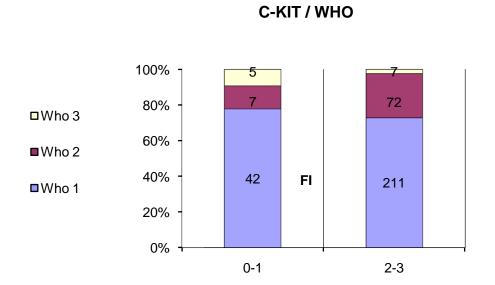


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Färbung C-KIT abhängig von der WHO-Klassifizierung

In der Tabelle 9 und Abbildung 8 sind die Ergebnisse der C-KIT-Färbung in Abhängigkeit von der WHO-Klassifizierung dargestellt. Insgesamt wurden 253 Gewebeproben von

Tumoren des WHO-Grades I analysiert. Hierbei reagieren 83% der Proben positiv. Von 79 Tumorproben mit WHO-Grad II sind 91% positiv. Ein deutlicher Unterschied ist bei Tumoren des WHO-Grades III zu erkennen. Von den 12 ausgewerteten Proben sind 7 (58%) positiv. Somit ist bei Tumoren mit WHO-Grad III der Anteil von negativen Meningeomen signifikant höher als bei den anderen beiden Klassen.

				C-KI	T neg.							C-KI	T pos.			
₫	Gesa	amt		R	М		Gesc	hlecht	Ges	amt		F	RM		Gesc	hlecht
ЕМА	%	n =	Nei	n	Ja	ì	m	w	%	n =	Nei	n	J	a	m	w
	,,	"-	%	n =	%	n =	'''		70		%	n =	%	n =]	
neg.	23	12	0	0	31	12	2	10	11	32	1	1	16	31	7	25
pos.	77	41	100	14	69	27	8	33	89	256	99	89	84	167	87	169
Σ	-	53	•	14	•	39	10	43	•	288	•	90	•	198	94	194

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung C-KIT abhängig von der EMA-Färbung

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der C-KIT Färbereihe in Abhängigkeit der EMA-Färbung zu entnehmen. Hierbei wird deutlich, dass Proben, die positiv auf C-KIT reagieren, in der Regel EMA exprimieren. Der Anteil an C-KIT und EMA exprimierenden Proben beträgt 89%, wohingegen sich der Anteil an C-KIT negativen und EMA positiven Proben auf 77% beläuft. Ähnlich verhält sich diese Verteilung unter Berücksichtigung des Rezidivs. Der Anteil an Tumoren, die sowohl C-KIT als auch EMA exprimieren und zusätzlich rezidivieren, beträgt 84%. Bei der gleichen Gruppe, die nicht C-KIT aber EMA exprimieren und rezidivieren, beläuft sich der Anteil auf 69%.

3.4.4 Vimentin

			G	esamt					ı	NRM		
Vimentin	Gesam		Alter		Gescl	hlecht	Ge	sam t	Alt	ter	Gescl	nlecht
	%	n =	DS	SA	m	m w % n = DS		DS	SA	m	w	
neg.	3	11	52,64	18,33	3	8	2	2	59,00	4,24	-	2
pos.	97	337	53,90	14,94	103	235	98	103	58,00	13,13	21	82
Σ	-	348	53,86	15,03	106	243	-	105	57,82	13,01	21	84

				RM			
Vimentin	Ges	samt	Al	ter	Geschlecht		
	%	n =	DS	SA	m	w	
neg.	4	9	51,22	20,13	3	6	
pos.	96	234	52,23	15,38	82	153	
Σ	•	243	52,19	15,53	85	159	

Tabellen 11 und 11a: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung Vimentin

Es konnten 348 Gewebeproben mit Vimentin untersucht werden. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt $53,86 \pm 15,03$ Jahre. Die Mehrzahl der untersuchten Proben exprimiert Vimentin. Somit sind 337 (97%) der Proben positiv, wobei eine geschlechtsspezifische Unterscheidung nicht auszumachen ist (statistisch nicht signifikant, students t-test, p=0,60363).

3.4.5 Östrogen und p53

Östrogen	Gesamt		NRM	RM	Alter		Geschlecht	
	%	n =			DS	SA	m	w
< 1%	99	345	103	242	53,85	15,06	240	105
>= 1%	1	4	2	2	52,75	17,04	4	-
Σ	-	349	105	244	61,82	13,52	244	105

Tabelle 12: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung Östrogen

p53	Gesamt		NRM	RM	Alter		Geschlecht	
	%	n =			DS	SA	m	W
< 1%	99	342	103	242	53,79	14,87	240	102
>= 1%	1	4	2	2	53,14	24,46	4	-
Σ	-	346	105	244	53,78	15,06	244	102

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung p53

In der Färbereihe Östrogen wurden 349 Proben untersucht. Die entsprechenden Patienten dieser haben ein durchschnittliches Alter von 61,82 ±13,52 Jahren. Die Auswertung zeigt, dass bei lediglich 4 Proben Östrogenrezeptor von mehr als 1% der Zellen exprimiert wird (statistisch nicht signifikant, students t-test, p=0,4504).

Ein ähnliches Ergebnis zeigt die p53-Färbung auf, bei der 346 Proben ausgewertet wurden. Die Patienten haben ein Durchschnittsalter von 53,78 ±15,06 Jahren. In dieser Reihe sind ebenfalls bei 4 Proben mehr als 0,9% aller Zellen positiv. In beiden Versuchsreihen verteilen sich die Gewebeproben, die einen Wert <= 1% haben, paarig auf Tumore von NRM und RM (statistisch nicht signifikant, students t-test, p=0,82724).

3.4.6 Cytokeratin (PAN CK)

PAN-CK	Gesamt		NRM	RM	Alter		Geschlecht	
	%	n =]		DS	SA	m	W
neg.	12	43	1	42	47,77	18,58	15	28
pos.	88	306	102	204	59,09	12,56	92	214
Σ		349	103	246	53,80	15,07	107	242

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Färbung Cytokeratin

Eine Auswertung von Cytokeratin erfolgte bei 349 Tumorproben. Die Patienten weisen ein Durchschnittsalter von 53,80 ±15,07 Jahren. Bei der Auswertung dieser Färbereihe ist die Bewertung so, dass die Proben als positiv gezählt werden, wenn sie einen Mittelwert von 1

oder 2 haben. Die Proben mit der Bewertung 0 sind negativ. Somit sind 88% der Proben positiv. Auffällig ist, dass rund 83% der RM Cytokeratin exprimieren, wohingegen es bei den NRM rund 99% Cytokeratin exprimieren. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied ergibt sich nicht (statistisch signifikant, students t-test, p=1,3088E-06).

3.5 Immunhistochemische Färbungen im Zeitverlauf

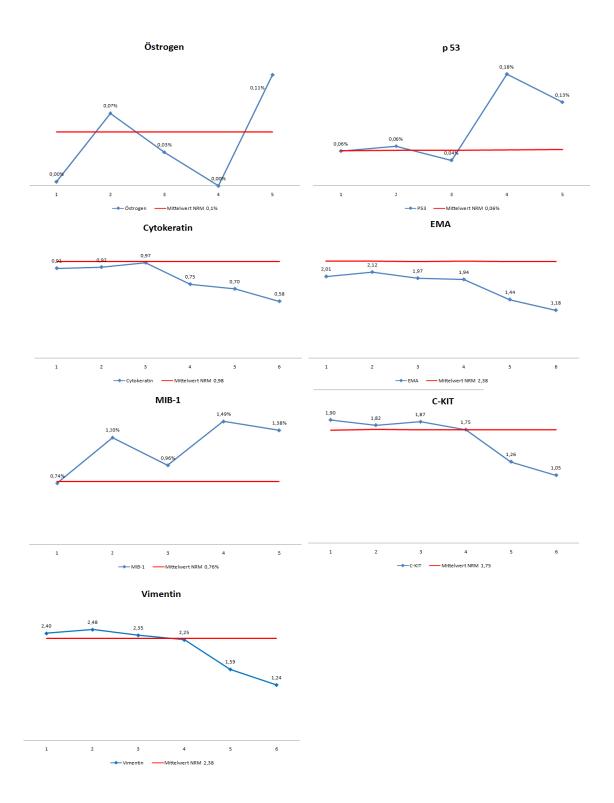


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Expression von Östrogen-Rezeptor, P53, PAN-CK, EMA, MIB-1, C-KIT, Vimentin (y-Achse) in Bezug auf die Operationsanzahl (X-Achse)

In der Abbildung 10 (siehe auch Tabelle 15) sind die einzelnen Färbewerte der RM in Bezug zur Operationsanzahl gesetzt. Außerdem ist der Mittelwert aller NRM zur besseren Vergleichbarkeit angezeigt (rote Linie). Somit sind hier die Mittelwerte der Färbewerte pro Operation dargestellt. Auffällig ist, dass bei den immunhistochemischen Färbungen für EMA, C-KIT, Vimentin und Cytokeratin mit jedem Rezidiv die Expression der jeweiligen Proteine abnimmt.

Der MI stellt sich nicht eindeutig dar. Tendenziell steigt der MI aller RM mit jedem Rezidiv an.

Bei Östrogen und p53 sind Fluktuationen zu erkennen. Die Werte für Östrogen und p53 schwanken zwischen 0 und 0,2%.

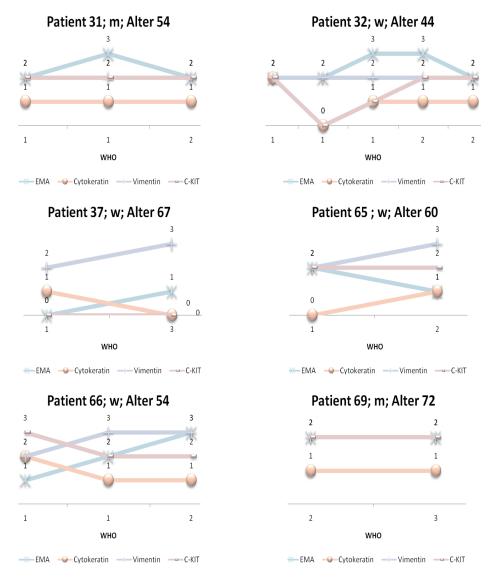
OP-		Immunhistochemische Färbungen in %/ Intensität										
Anzahl		Östrogen	p53	EMA	PAN-CK	Vimentin	C-KIT	MIB-1				
	DS	0,0%	0,1%	2,0	0,9	2,4	1,9	0,74%				
1	SA	0,00030	0,00245	0,70	0,51	0,55	0,42	1,66%				
	n=	102	102	102	102	101	99	102				
2	DS	0,1%	0,1%	2,12	0,92	2,48	1,82	1,3%				
	SA	0,00	0,00	0,71	0,45	0,55	0,53	0,02				
	n=	77	79	76	78	77	77	78				
3	DS	0,0%	0,0%	1,97	0,97	2,35	1,87	1,0%				
	SA	0,00174	0,00091	0,66	0,41	0,55	0,50	0,01473				
	n=	30	31	31	31	31	31	31				
	DS	0,0%	0,2%	1,94	0,75	2,25	1,75	1,5%				
4	SA	0	0,00377	0,68	0,45	0,58	0,68	0,02621				
	n=	16	16	16	16	16	16	16				
	DS	0,0%	0,1%	1,75	0,63	2,13	1,75	1,6%				
5	SA	0	0,00201	0,71	0,52	0,64	0,46	0,01827				
	n=	8	8	8	8	8	8	8				
	DS	-	-	1,33	0,67	1,67	1,67	-				
6	SA	-	-	0,58	0,58	1,15	0,58	-				
	n=	-	-	3	3	3	3	-				

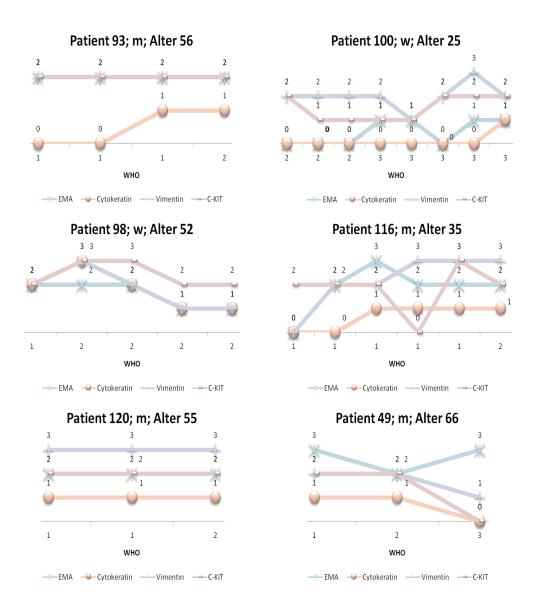
Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der einzelnen Operationsbefunde (DS: Durchschnitt SA: Standartabweichung)

3.6 Immunhistochemische Profile einzelner Patienten

Unsere Untersuchungen konzentrieren sich auf Patienten, deren Tumore sich progredient entwickelt haben, was bedeutet, dass die Tumore bzw. ihre Rezidive ihre WHO-Klassifizierung zu einem aggressiveren WHO-Grad hin änderten. Dies beinhaltet sowohl eine Änderung von Grad I zum Grad II als auch direkt zum Grad III.

In den nachfolgenden Illustrationen sind die Entwicklungen der jeweiligen Tumore und ihrer Rezidive dargestellt. Die Abbildungen präsentieren das Alter zur Zeit der 1. OP, das Geschlecht und die Patientennummer. Die Kurven zeigen die einzelnen Färbereihen (ausgenommen die Werte von Östrogen, MIB-1 und p53).





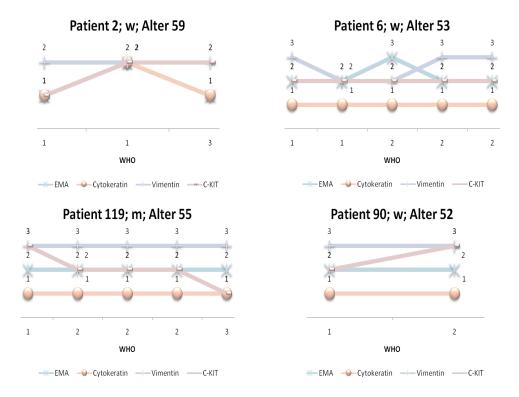


Abbildung 11: Graphische Darstellung einzelner Tumorentwicklungen (Erklärung siehe Text). Auf der horizontalen Achse ist der WHO-Grad des Tumors bzw. der Rezidive dargestellt.

Die in Abbildung 11 demonstrierten Fälle stammen von Patienten, die unterschiedlich häufig operiert worden sind. Daraus resultiert die unterschiedliche Gewebeprobenanzahl. Der Fokus wurde auf diese Patienten gelegt, welche eine Progression zu höheren WHO-Graden aufwiesen.

4 Diskussion

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keinen eindeutigen immunhistochemischen Marker mit dessen Hilfe Rückschlüsse auf das Rezidivverhalten von Meningeomen möglich sind, obwohl diverse Antikörper in Studien über Biomarker bei RM untersucht wurden.

Wir haben uns zum Ziel gesetzt immunhistochemische Marker zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit bei Meningeomen zu finden. Wir haben im Vergleich zu früheren Studien eine deutlich größere Anzahl von Tumoren verwendet. Somit stellen wir sicher, dass einzelne fallabhängige Schwankungen nicht zum Tragen kommen wie bei einer kleinen Anzahl von Proben. So weisen die Studien von Hitchcock und Morris (50 Meningeome) oder Theaker et al. (13 Meningeome) geringere Fallzahlen auf.

Ein weiterer Faktor, der unsere Studie von anderen unterscheidet, ist die große Summe von verwendeten Antikörpern. Dadurch können wir auch Kombinationen von Färbeergebnissen verschiedener Antikörper auf gleichem Gewebe prüfen. Somit wäre beispielsweise eine hohe Affinität zum Östrogenrezeptor mit einem niedrigen EMA-Färbewert eine denkbare Kombination, die für eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit sprechen könnte. Natürlich sind auch andere Kombinationen denkbar. Das Ziel dieser Markerkombinationen ist es eindeutige Ergebnisse bezüglich der Rezidivwahrscheinlichkeit zu treffen.

Weiter nutzen wir den TMA als Mittel zur Standardisierung unserer Ergebnisse. Die dafür sprechenden Gründe sind vorrausgehend schon genannt worden. Das Verfahren garantiert gleichbleibend hohe Qualität bei hohem Durchsatz.

Somit haben wir in dieser Studie eine große Anzahl von Neuerungen bzw. Qualitäts- und Vergleichbarkeitsstandards eingeführt mit deren Hilfe wir eine zielsichere und stichhaltige Voraussage erwarten.

Im Folgenden werden die einzelnen Antikörper isoliert betrachtet.

Unsere Ergebnisse in Hinblick auf die Antikörper gegen Östrogenrezeptor und p53 zeigen, dass die überwiegende Mehrzahl der Meningeome weder Östrogenrezeptor exprimieren noch p53 akkumulieren.

Dies war in Hinblick auf p53 zu erwarten. Frühere Studien haben gezeigt, dass nur wenige bzw. gar keine Meningeome auf dem Genort (TP53) von p53 Mutationen aufweisen. ^{36 39 38} ⁴⁷ Dieser Genort befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 und ist eines der meist mutierten Gene in der menschlichen Tumorentwicklung. Wie wir aufzeigen konnten, scheint dieses für Meningeome nicht treffend zu sein. Dennoch zeigen einige Studien im Hinblick auf die Akkumulation von p53 einen substantiellen Unterschied zwischen einzelnen WHO-Graden. 41 Einer solchen Annahme können wir uns nicht anschließen. Da die Anzahl der p53 akkumulierenden Zellen zu gering ist, können wir p53 nicht sicher im Zusammenhang zur Malignität von Meningeomen stellen. Weitere Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Antikörpern, im Hinblick auf die Voraussage der Rezidivwahrscheinlichkeit, sind somit wenig erfolgversprechend.

Unseren Erwartungen entsprechend haben wir im Hinblick auf Östrogenrezeptor ein ähnliches Ergebnis erzielt. Auch hier ist keine Differenzierung zwischen NRM und RM möglich.

Vorangegangene Studien zeigten, dass lediglich 10% aller Meningeome Östrogenrezeptoren exprimieren.⁸ Unser Ergebnis liegt deutlich unter diesem Resultat. Dies könnte zum einem im TMA-Verfahren begründet sein, da der auswertbare Gewebebereiche klein ist, zum anderen können Unterschiede in Qualität des Markers im Vergleich zu anderen Studien vorliegen. Von beidem gehen wir nicht aus, da wir das TMA-Verfahren als geeignet ansehen (siehe unten) und der jeweilige Marker mit adäquaten Kontrollreaktionen überprüft wurde.

Somit folgern wir, dass die Expression des Östrogenrezeptors per se nur eine limitierte Relevanz für die Voraussage der Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen hat.

Die Schlüsse, die wir bezüglich des Antikörpers Vimentin ziehen konnten, unterscheiden sich von denen der vorangegangenen Antikörper. Der Großteil der Meningeome exprimiert Vimentin (siehe Tabellen 11a und b). Dieses Ergebnis wurde erwartet. Das 57 Kd Intermediärfilament Vimentin ist hauptsächlich in mesenchymalen Zellen exprimiert. Außerdem zeigt es sich in Meningeomen und fetalen meningealen Zellen. Somit belegt die Expression von Vimentin, dass Meningeome aus meningealen Zellen entstehen. Ein ähnlicher Schluss kann aus unseren Untersuchungen gezogen werden.

Ein weiterer potentieller Marker ist Cytokeratin. Dieser wird auch als spezifischer Marker von Arachnoidalzellen verwandt. Nagele et al. und Yung et al. fanden in geringer Anzahl (bei ein und in fünf Meningeomen) Cytokeratinexpression in Meningeomen. Hitchcock und Morris entdeckten in 28 von 50 Meningeomen eine Expression, Theaker et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris entdeckten in 28 von 50 Meningeomen eine Expression, Theaker et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris entdeckten in 28 von 50 Meningeomen eine Expression, Theaker et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris entdeckten in 28 von 50 Meningeomen eine Expression, Theaker et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris entdeckten in 28 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Resemblie et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 13 von 13 Fällen. Hitchcock und Morris et al. sogar in 1

In der EMA-Färbereihe sind ebenfalls die meisten Proben positiv (87%). Dieses Ergebnis wurde erwartet, denn EMA ist einer der zuverlässigsten Marker zum Nachweis von Tumoren meningeothelialem Ursprung.⁵⁷ Diverse Studien haben eine Expression von EMA in Meningeomen nachgewiesen.^{58 59} Studien zeigen, dass die Reaktivität bei atypischen und anaplastischen Meningeomen abnimmt.³ Dieses Ergebnis kann nicht von allen Studien getragen werden.⁶⁰ Keine der Studien macht eine Unterscheidung zwischen NRM und RM. Gerade dieser Gedanke steht bei unserer Untersuchung im Mittelpunkt. Wir können einen statistischen Unterschied zwischen RM (81% positiv) und NRM (99% positiv) nachweisen. Somit bietet sich die Expression als möglicher Marker für die Untersuchung zwischen RM und NRM an. Eine Abnahme der EMA-Expression konnte in diesem Zusammenhang auch Ikeda et al. nachweisen.⁶⁰

Problematisch ist die große Bandbreite der positiven Meningeome, die von 50 bis 100% reicht. Meis et al. wiesen 50% EMA-positiver Meningeome nach. Deren Untersuchungen von 50 Meningeomen umfasst sowohl RM als auch NRM. Der Wert der RM aus unserer Untersuchung liegt deutlich über dem Wert von Meis et al.. Perry et al. führen diese große

Bandbreite und somit die relativ geringen positiven Werte auf eine zu geringe Konzentration vom EMA-Antikörper zurück.⁶⁰ Diese Überlegung lässt sich dadurch bestätigen, dass in heutigen Studien deutlich höhere EMA-positiv-Werte erzielt werden, da die EMA-Färbung zu einem Standard in der Meningeomforschung geworden ist.

Infolgedessen muss man zu dem Schluss kommen, dass EMA nicht nur als Marker zum Nachweis eines Meningeoms geeignet ist sondern zusätzlich als Rezidivmarker eingesetzt werden kann.

Zusätzlich kommen auch wir ähnlich wie Theaker et al. zu dem Ergebnis, dass Meningeome mit sowohl mesenchymalen als auch epithelialen Markern reagieren. 46

Der Antikörper MIB-1 sollte unter mehreren Gesichtspunkten betrachtet werden. Zum einen sollte er auf seine Vorhersagefähigkeit in Bezug auf die Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen untersucht werden zum anderen sollte zusätzlich eine Aussage zu der Verwendbarkeit dieses Proliferationsmarkers bei einer TMA-Untersuchung gemacht werden können. Die Verwendung von MIB-1 steht bei einer solchen Analyse zur Diskussion, weil der in den TMA-Block übertragene Gewebeanteil oftmals sehr klein ist. Selbst wenn schon vorab eine Vorauswahl des Areals erfolgte, um ein jenes Gewebe mit hoher mitotischer Aktivität bzw. hohen MIB-1-Werten auszuwählen, ist durch das Stanzverfahren nicht gewährleistet, dass auch ein solch bestimmtes Areal getroffen bzw. übertragen wird. Zur Bestimmung eines MIB-1-Indexes (MI) werden zwei Methoden verwandt. Zum einen das Gezieltverfahren (GV). Hier wird der Teil zum Zählen ausgewählt, in dem eine große Zahl von positiv reagierenden Zellen vorliegt. Zum anderen das Zufallsverfahren (ZV). Hier wird das zu zählende Areale zufällig ausgewählt. Somit müsste das GV höhere MIs erzielen als das ZV, da der MI bei Tumoren heterogen ist.

Wird ein TMA verwendet, so muss eine neue Überlegung angestellt werden. Durch die Auswahl der Stanze ist nicht gesichert, dass die Region mit der größten Anzahl von positiven Zellen in den TMA-Block gelangt, falls man das GV anstrebt. Folglich liegt die Überlegung nahe, dass das TMA-GV zu einem ZV wird. Deshalb steht die Verwendung von MIB-1 in Verbindung mit TMA zur Diskussion. Dieses Problem behandeln unter anderem Ruiz et al.⁶¹ Sie untersuchten mittels TMA, ob der MI an Brustkrebs mit

molekularen und klinischen Daten vergleichbar ist. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass dies der Fall ist. Diese Ergebnisse wurden weiter bestätigt.⁶²

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Größe eines 0,6mm Gewebezylinders ausreichend ist. ⁶³ Ruiz et al. kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass ein Gewebezylinder pro Tumor ausreichend ist. Weitere Autoren ⁶⁴ streben die Verwendung von mehreren Gewebezylindern an. Nocito et al. können dies allerdings nicht bestätigen und fanden heraus, dass ein Zusammenhang zwischen dem MI und den klinisch-pathologischen Daten bei Blasenkrebs existiert, unabhängig von der verwendeten Anzahl der Gewebezylinder.

Ähnlich wie wir gehen Peters et al. davon aus, dass mit Hilfe des zuvor gefertigten HEangefärbten Gewebeüberblicks ein zielsicheres Ausstanzen aus dem gewünschten Gewebe
möglich und die folgende Untersuchung damit auch repräsentativ ist. Wir haben uns für
das GV entschieden, da wir mit diesem Verfahren, das seit Jahren zum Routineverfahren
gehört, Erfahrungen gesammelt haben. Dennoch müssten die MIs durch ein TMA minimal
geringer ausfallen, da die angesprochenen Fehler beim Stanzen nicht zu 100%
ausgeschlossen werden können.

Generell ist der Zusammenhang zwischen einem MI und der Rezidivwahrscheinlichkeit nicht endgültig geklärt. Abramovich und Prayson fanden keinen signifikanten Unterschied im MI bei 32 RM und 27 NRM.⁶⁶ Møller und Brændstrup erzielten ein ähnliches Ergebnis bei untersuchten 26 RM und 17 NRM.⁶⁷ Beide Untersuchungen wurden mittels GV durchgeführt. Im Gegensatz dazu fanden Matsuno et al. einen signifikanten Unterschied im MI bei RM und NRM.⁶⁸ Sie fanden einen Wert von 3% als Trennwert zwischen RM und NRM.

Abschließend ist nicht definitiv geklärt, welche der beiden MI-Analysen die bessere ist. Die oben genannten Autoren haben ihre Ergebnisse mit Hilfe des GVs erzielt. Nakasu et. al haben in einer Untersuchung die beiden Methoden miteinander verglichen,⁶⁹ wobei sie keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Methoden entdeckten. Lediglich der MI scheint bei der GV höher zu sein (GV=3%; ZV=2%).

In unseren Ergebnissen können wir in Hinsicht auf den MI keinen Unterschied zwischen RM und NRM feststellen, somit können wir uns den Ergebnissen sowohl von Møller und Brændstrup als auch von Abramovich und Prayson anschließen. Da wir deutlich mehr Meningeome verwendet haben als in vorangegangenen Untersuchungen, kann man unsere Untersuchung als Bestätigung der Ergebnisse dieser Autoren ansehen.

Als letzter Antikörper ist C-KIT zu nennen. In vorherigen Studien haben 2 von 44 Meningeomen C-KIT exprimiert. In unserer Arbeit sind 84% der Meningeome positiv. Da dennoch keine Differenzierung zwischen RM und NRM möglich ist (RM=83%; NRM=86%), ist dieser Marker isoliert betrachtet nicht zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit geeignet.

Möglicherweise liegt bei Meningeomen eine Mutation im C-Kit kodierenden Gen vor, denn wir konnten eine ähnlich hohe Affinität nachweisen wie GISTs. Studien zeigen in 80 bis 90% aller GISTs eine KIT-Mutation.^{70 71} In transgenen Mäusen wurde der Nachweis für den Zusammenhang zwischen der GIST-Entstehung und der KIT-Mutation erbracht.⁷² Insofern liegt der Schluss nahe, dass Meningeome ebenfalls eine KIT-Mutation innehaben. Die Suche nach KIT-Mutationen bei Meningeomen ist der Schwerpunkt weiterer Forschungstätigkeit.

Eine durch Mutation aktivierte Typ 3 Rezeptor-Tyrosin-Kinase (KIT) könnte mittels Imatinib (ST1571, Gleevec) inhibiert werden. Imatinib wurde ursprünglich zur Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie verwendet. Hierbei setzt es an der Funktion des BCR/ABL Fusionsprotein an.⁷³

Abschließend ist festzuhalten, dass das TMA-Verfahren für die Untersuchung von Meningeomen geeignet ist. Dadurch konnten wir dieses Verfahren erfolgreich in die Meningeomforschung einbringen.

Durch diese Technik konnten wir zwei Antikörper (EMA und Pan-Cytokeratin) hervorheben, die im Hinblick auf eine Rezidivuntersuchung anbieten. Die Kombination aus EMA als Cytokeratin ist somit für die Diagnostik zu empfehlen.

5 Zusammenfassung

Meningeome sind langsam wachsende gutartige Tumore. Ein Teil weist jedoch eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit auf. Bis heute gibt es keinen eindeutigen histologischen Marker, der eine Aussage über die Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen ermöglicht.

Ziel der Arbeit war es nach neuen immunhistochemischen Markern oder Markerkombinationen zu suchen, welche eine Aussage über die Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen ermöglichen.

Hierfür haben wir Gewebearray-Blöcke von Menigeomen aus zwei Patientenkohorten angefertigt. Die erste Kohorte bestand aus Patienten, bei denen kein Meningeomrezidiv aufgetreten ist (n=107). Die zweite Kohorte bestand aus Patienten, bei denen mindestens ein, in der Mehrzahl der Fälle mehrere Meningeomrezidive dokumentiert wurden (n=252).

Durch die standardisierte Auswertung immunhistochemische Färbungen wurde die Expression von verschiedenen relevanten Proteinen bestimmt

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen konnten für Pan-Cytokeratin und für das epitheliale Membran-Antigen ermittelt werden. Bezüglich der Proliferation der Tumorzellen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Relevanz von Pan-Cytokeratin und des epithelialen Membran-Antigens für die Vorhersagekraft von Meningeomrezidiven wurde durch Längsschnittuntersuchungen an ausgewählten Patientengruppen bestätigt.

Die Ergebnisse unserer Arbeit weisen darauf hin, dass die Kombination von zwei immunhistochemischen Markern (Pan-Cytokeratin und das epitheliale Membran-Antigen) einen wichtigen Beitrag zur Vorhersage von Meningeomrezidiven beitragen kann.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die durch ihren Rat und ihre Unterstützung entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Markus Glatzel, für die Überlassung des Themas und die persönliche, unkomplizierte und fachkompetente Betreuung, die immer mit sehr großer Freude begleitet wurde.

Des Weiteren möchte ich Dr. Jakob Matschke danken, der bei komplizierten Fragestellungen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank!

Weiter gilt mein Dank Marco Wagner für seine großartige Unterstützung in allen Lagen.

Ich bedanke mich auch bei allen, die mit konstruktiver Kritik meine Arbeit voran getrieben haben. Speziell sind hier zu erwähnen Luise Herrmann, Magdalena Mermela und mein Bruder Daniel.

Speziell gilt mein Dank auch Johannes Gerhardt, der meine Arbeit im fortgeschrittenen Status von meinem durchgebrannten PC rettete.

Herzlicher und gesonderter Dank gilt meinen Eltern für Ihre lebenslange Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem ganzen Laborteam der Neuropathologie für die Hilfe in praktischen Belangen. Danke!

7 Lebenslauf

Name Tobias Kreher

Geburtsdatum 23. Januar 1983

Eltern Ralf Kreher

Magrid Kreher geb. Haltermann

Nationalität Deutsch

Ausbildungsweg

1989-2002 Grundschule 1989-1993

Gymnasium Elsa-Brändström-Schule Elmshorn 1993-

2002

2003-2008 Studium der Zahnmedizin in Hamburg

8 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tobias Kreher

9 Abkürzungsverzeichnis

WHO World Health Organisation

MI MIB-1-Index

DS Durchschnitt

SA Standartabweichung

M Männlich W Weiblich

N Anzahl

Total Gesamtanzahl
IN Prozent/ 100

GV Gezieltverfahren

ZV Zufallsverfahren

FI Färbeindex

EGFR epidermal growth factor receptor

IGF insulin like growth factor

PDGF platelet-derived growth factor receptor

10 Literatur

¹ P. A. Winkler, E. Uhl, A. L. Grosu, E. U. Walther, K. Seelos, A. M. Frank, M. O. Pinsker, B. Wowra. Meningeome und Meningeomatose. 2004 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.:126-33

² Catala M (1998) Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebro-spinal fluid in a man and other species. Part 1: the ventricular system, meninges and choroid plexuses. Arch Anat Cytol Path 3: 153-169

³ Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ. Meningiomas. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. In: Kleihues P, Cavenee WK, eds. World Health Organisation classification of tumours. Lyon: IARC Press, 2000:176-84

⁴ Cushing H, Eisenhardt L (1938) Meningiomas: Their classification, regional behavior, life history and surgical end results. Charles C. Thomas, Springfield

⁵ Collins VP, Nordenskjold NI, Dumanski JP (1990) The molecular genetics of meningiomas. Brain Pathol 1: 19–24

⁶ Nowell PC: Mechanisms of tumor progression. Cancer Res; 1986;46:2203-2207

⁷ Mack EE, Wilson CB (1993) Meningiomas induced by highdose cranial irradiation. J Neurosurg 79: 28-31

⁸ Sanson M, Cornu P. Biology of meningiomas. Acta Neurochirur (Wien) 2000;142:493-505

⁹ Schoenberg BS, Christine BW, Whisnaht JP (1975) Nervous system neoplasms and the primary malignancies of other sites. The unique association between meningiomas and breast cancer. Neurology 28:705-712

¹⁰ Knudsen AG (1993) Hereditary cancer, ongenes and antioncogenes. Proc Natl Acad Sci USA 90:10914-10921

¹¹ Ruttledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, et al. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. Nat Genet 1994;6:180-84

¹² Wellenreuther R, Kraus JA Lenartz D, et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. Am J Pathol 1995;146:827-32

¹³ Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T. Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. Cancer Res 1999:59:5995-98

¹⁴ Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, et al.: Reduced expression of schwannomin / merlin in human sporadic Meningeomas. Neurosurg; 1997; 40: 1-10

¹⁵ von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR: Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. Cancer Res; 1992;52: 4277-4279

¹⁶ Buschges R, Ichimura K, Weber RG, Reifenberger G, Collins VP: Allelic gain and amplification on the long arm of chromosome 17 in anaplastic meningiomas. Brain Pathol 12: 145-153, 2002

¹⁷ Cai DX, Banerjee R, Scheithauer BW, Lohse CM, Kleinschmidt-Demasters BK, Perry A: Chsomosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologie subsets of meningioma: diagnostic and prognostic implications. J Neuropathol Exp Neurol 60: 628-636, 2001

- ¹⁸ Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M: Allelic losses at 1p, 9q,10q,14q, and 22q in the progression of agressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. Cancer Genet Cytogenet 110: 103-110, 1999
- ¹⁹ Ozaki S, Nishizaki T, Ito H, Sasaki K: Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. J Neuro-Oncol 41: 167-174, 1999
- ²⁰ Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, collins VP, Reifenberger G Lichter P: Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. Proc Natl Acad Sci USA 94: 14719-14724, 1997
- ²¹ Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatry 20:22-39, 1957
- ²² Kleihucs P, Luis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classifikation of tumors of the nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 61:215-25, 2002
- ²³ Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM, Wollan PC. Meningioma grading. An analysis of histologie parameters. Am J Surg Pathol 21:1544-65, 1997
- ²⁴ Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL, Rimm DL: Tissue Microarry analysis of betacatenin in colo-rectal shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis. Clin Cancer Res 7: 4013-4020, 2001
- ²⁵ Jourden F, Sebbagh N, Comperat E, Mourra N, Flahault A, Olschwang S, Duval A, Hamelin R, Flejou JF: Tissue Micoarry technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. Virchow Arch 443: 115-121, 2003
- ²⁶ Jaaskelainen J: Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients A multivariate analysis. Surg Neurol 26: 461–469, 1986
- ²⁷ Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL: Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. J Neurosurg 62: 18–24, 1985
- ²⁸ Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A: Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. Surg Neurol 25: 233–242, 1986
- ²⁹ Artlich A, Schmidt D: Immunohistochemical profile of meningiomas and their histological subtypes. Hum Pathol 21: 843–849, 1990
- ³⁰ Meis JM, Ordonez NG, Bruner JM: Meningiomas. An immunohistochemical study of 50 cases. Arch Pathol Lab Med 110: 934–937, 1986
- ³¹ Schnitt SJ, H: Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. Am J Surg Pathol 10: 640–649, 1986

³² J Gerdes, H Lemke, H Baisch, HH Wacker, U Schwab and H Stein. Epithelial membrane antigen and cytokeratin expression by meningiomas: an immunohistological study. Journal of Immunology1984;133;1710-5

- ³³ Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G. Prevalence of KIT expression in human tumors. J Clin Oncol. 2004 15;22:4514-22.
- ³⁴ Osborn M, Weber K: Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. Lab Invest 1983;48:372-394
- ³⁵ Ramaekers FCS, Puts JJG, Moesker O Kant A, Huysmans A, Haag D, Jap PHK, Herman CJ, Vooijis Gp: Antibodies to intermediate filament protein sin the immunohistochemical identification of human tumours: an overview. Hostochem J 1983;15:691-713
- ³⁶ Bostrom j, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, et al. Alterations of tumor suppressor genes CDKN2A (p16[INK4a]), p14(ARF), CDKN2B (p14(INK4b), and CDKN2C (P18[INK4c]) in atypical and anaplastic meningiomas. Am J Pathol 2001;159:661-36
- ³⁷ Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH, et al. Comparative analysis of NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. INT jCancer 2001;94:218-21
- ³⁸ Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the progrnosis of anaplastic meningiomas. Brain Pathol 2002;12:183-90
- ³⁹ Ohgaki H, Eibl RH, SchwabM, et al. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. Mol Carcinog 1993;8:74-80
- ⁴⁰ Vishwa Jeet Amatya, Yukio Takeshima and Kouki Inai. Methylation of p14ARF gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. Modern Pathology 2004;17: 705-710
- ⁴¹ Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, et al. The prognostic significance of MIB-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. Cancer 1998;82:2262–2269.
- ⁴² Lanzafame S, Torrisi A, Barbagallo G, et al. Correlation between histological grade, MIB-1, p53, and recurrencein 69 completely resected primary intracranial meningiomas with a 6 year mean follow-up. Pathol Res Pract 2000;196:483–488.
- ⁴³ Karamitopoulou E, Perentes E, Tolnay M, et al. Prognostic significance of MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. Hum Pathol 1998;29:140–145.
- ⁴⁴ Miettinen M. Keratin 20:Immunohistochemical marker for gastrointestinal, urothelial and Merkel cell carcinomas. Mod Pathol 1995; 8:384-388
- ⁴⁵ Moll R, Lowe A, Laufer J, et al. Cytokeratin 20 in human carcinomas: A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol 1992; 140:427-447
- ⁴⁶ Theaker JM, Gatter KC, Esiri MM, Fleming KA: Epithelial membrane antigen and cytokeratin expression by meningiomas: an immunohistological study. J Clin Pathol. 1986;39(4):435-9.

⁴⁷ Wang JL, Zhang ZJ, Hartman M, et al. Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: A study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. Int J Cancer 1995;64:223–28

- ⁴⁸ Osborn M, Weber K: Tumour diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. Lab Invest 48:372–394, 1983
- ⁴⁹ Ramaekers FCS, Puts JJG, Moesker O, Kant A, Huysmans A, Haag D, Jap PHK, Herman CJ, Vooijs GP: Antibodies to intermediate filament protein sin the immunohistochemical identification of human tumours: an overview. Histochem J 15:691–713, 1983
- ⁵⁰ Frank EH, Burge BW, Liwnicz BH, Lotspeich LJ, White JC, Wechsler SL, Mayfield FH, Keller JT: Cytokeratin provides a specific marker for human arachnoid cells grown *in vitro*. Exp Cell Res 146:371–376, 1983
- ⁵¹ Nagle RB, McDaniel KM, Clark VA, Payne CM: The use of antikeratin antibodies in the diagnosis of human neoplasms. Am J Clin Pathol 79:458–466, 1983
- ⁵² Yung W-KA, Borit A, Dahl D, Wang E: Keratin and vimentin in meningiomas. (Abstract) J Neuropathol Exp Neurol 43:299, 1984
- ⁵³ Hitchcock E, Morris CS. Immunocytochemistry of intracranial meningiomas. J Neurooncol. 1987;5(4):357-68
- ⁵⁴ Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G.Histological classification and molecular genetics of meningiomas. Lancet Neurol. 2006 Dec;5(12):1045-54.
- ⁵⁵ Liu Y, Sturgis CD, Bunker M, Saad RS, Tung M, Raab SS, Silverman JF. Expression of cytokeratin by malignant meningiomas: diagnostic pitfall of cytokeratin to separate malignant meningiomas from metastatic carcinoma. Mod Pathol. 2004 Sep;17(9):1129-33.
- ⁵⁶ Ikeda H, Yoshimoto T. Immunohistochemical study of anaplastic meningioma with special reference to the phenotypic change of intermediate filament protein. Ann Diagn Pathol. 2003 Aug;7(4):214-22. PMID: 12913843
- ⁵⁷ Lusis EA, Chicoine MR, Perry A. High throughput screening of meningioma biomarkers using a tissue microarray. J Neurooncol. 2005 Jul;73(3):219-23.
- ⁵⁸ Rajaram, V, Brat, DJ, Perry, A (2004) "Anaplastic meningioma vs. meningeal hemangiopericytoma: immunohistochemical and genetic markers" Hum Pathol 35: 1413-1418
- ⁵⁹ Artlich, A, Schmidt, D (1990) "Immunohistochemical profile of meningiomas and their histological subtypes" Hum Pathol 21: 843-849
- ⁶⁰ Ikeda H, Yoshimoto T. Immunohistochemical study of anaplastic meningioma with special reference to the phenotypic change of intermediate filament protein. Ann Diagn Pathol. 2003 Aug;7(4):214-22.
- ⁶¹ Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. Int J Cancer. 2006 May 1;118(9):2190-4.

⁶² Nocito A, Bubendorf L, Maria TE, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. J Pathol 2001; 194: 349-57.

⁶³Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. Am J Pathol 2001; 159: 2249-56.

- ⁶⁴ Hoos A, Stojadinovic A, Mastorides S, Urist MJ, Polsky D, Di Como CJ, Brennan MF, Cordon-Cardo C. High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high-risk soft tissue sarcomas. Cancer 2001; 92: 869-74.
- ⁶⁵ Peters S, Hambek M, Gstöttner W, Knecht R. Tissue microarrays. Value of immunohistochemical proliferation markers for serial investigations of head and neck cancer HNO. 2004 May;52(5):409-12. German.
- ⁶⁶ Abramovich CM, Prayson RA. Histopathologic features and MIB-1-labeling indices in recurrent and nonrecurrent meningiomas. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:793–800.
- ⁶⁷ Møller M-L, Brændstrup O. No prediction of recurrence of meningiomas by PCNA and Ki-67 immunohistochemistry. J Neurooncol 1997; 34:241–6.
- ⁶⁸ Matsuno A, Fujimaki T, Sasaki T, et al. Clinical and histopathological analysis of proliferative potentials of recurrent and non-recurrent meningiomas. Acta Neuropathol 1996; 91:504–10.
- ⁶⁹ Nakasu S, Li DH, Okabe H, Nakajima M, Matsuda M. Significance of MIB-1 staining indices in meningiomas: comparison of two counting methods. Am J Surg Pathol. 2001 Apr;25(4):472-8.
- ⁷⁰ Antonescu CR, Viale A, Sarran L, et al. Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. Clin Cancer Res. 2004;10:3282–3290.
- ⁷¹ Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. J Clin Oncol. 2003;21:4342–4349.
- ⁷² Sommer G, Agosti V, Ehlers I, et al. Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:6706–6711.
- ⁷³ Druker B: Signal transduction inhibition: Results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. Semin Hematol 38:9–14, 2001
- ⁷⁴ Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med 346:645–652, 2002