

Aus der Neurochirurgischen Klinik
der Universitätskliniken Hamburg- Eppendorf
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. M. Westphal (Komm.)

**Allelverluste bei
Neurofibromatose Typ 2 (NF2)-
assoziierten Meningeomen**

Dissertationsschrift
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

vorgelegt
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

von

Kai-Felix Vahldiek

aus Hamburg

2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 27. November 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. Wagner

Referent: Prof. Dr. Westphal

KOREFERENT: -

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	7
2.1. Materialien.....	7
2.1.1 Tumor- und Blutproben.....	7
2.1.2. Oligonukleotidprimer.....	8
2.1.2.1. Oligonukleotidprimer für die Mikrosatellitenanalyse.....	8
2.1.2.2. Oligonukleotidprimer für die TGGE – Analyse.....	10
2.2. Methoden.....	12
2.2.1. DNA Isolation.....	12
2.2.2. Polymerasekettenreaktion mit den Mikrosatellitenprimern.....	13
2.2.3. Fragmentanalyse.....	14
2.2.4. Färbung mit dem Antikörper Mib-1 gegen das Ki67 – Antigen.....	14
2.2.5. Mutationsanalyse.....	15
2.2.6. Methoden der Datenanalyse.....	16
3. Ergebnisse.....	17
3.1. Klinische Daten.....	17
3.2. Mib-1 Index.....	22
3.2.1. Mib-1 Index in 10 Gesichtsfeldern.....	24
3.2.2. Mib-1 Index in 3 Gesichtsfeldern.....	24

3.3. NF2 Mutationsanalyse.....	26
3.3.1. NF2 Mutationen.....	26
3.3.2. Tabelle der NF2 Mutationsanalyse.....	28
3.4. Allelverluste.....	29
3.4.1. Überblick.....	29
3.4.2. Tabelle der Allelverluste bei NF2-assoziierten Meningeomen.....	29
3.4.3. Allelverluste bei NF2-assoziierten Meningeomen.....	31
3.4.2.1. <i>Allelverluste bei den gesamten NF2-assoziierten Meningeomen.....</i>	<i>31</i>
3.4.2.2. <i>Allelverluste bei atypischen und benignen NF2-assoziierten Meningeomen im Vergleich.....</i>	<i>32</i>
3.4.2.3. <i>Vergleich der Allelverlusthäufigkeit bei den Subtypen des benignen WHO Grad I Meningeoms.....</i>	<i>34</i>
3.4.2.4. <i>Partielle Allelverluste.....</i>	<i>35</i>
4. Diskussion.....	38
5. Zusammenfassung.....	51
6. Literatur.....	52
7. Danksagung.....	62
8. Lebenslauf.....	63
9. Erklärung.....	64
10. Publikationen.....	65

1. Einleitung

Neurofibromatose 2 (NF2) ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, deren Träger eine Disposition für verschiedene Tumore des zentralen und peripheren Nervensystems haben (60). Bilaterale vestibuläre Schwannome sind ein Hauptmerkmal der NF2, das sich bei mehr als 90% der betroffenen Erwachsenen findet. Typisch für die NF2 sind außerdem spinale Tumore (Schwannome, Meningeome, Ependymome und Astrozytome) sowie ophthalmologische Abnormalitäten (61,78). Mehr als die Hälfte der NF2 Patienten entwickeln Meningeome die intrakraniell oder spinal lokalisiert sein können (62,78).

Bei der NF2 geht man derzeit von einer Erkrankungshäufigkeit von etwa 1: 40 000 aus. Bis zum Alter von 60 Jahren ist die klinische Manifestation der Erkrankung fast 100% (19). Ein Drittel bis die Hälfte aller Fälle entstehen durch Neumutationen (2). Das *NF2* Gen findet sich auf dem langen Arm des Chromosomen 22 (22q12) (86,99). Es ist ein fast ubiquitär exprimiertes Gen, das 110 Kilobasen (kb) umfaßt und aus 16 konstitutiven Exons sowie einem alternativ gespleißten Exon besteht. Das *NF2* Gen codiert für das Protein Merlin (Schwannomin), dessen vermutliche Funktion darin besteht, Plasmamembranproteine mit dem Zytoskelett zu verknüpfen. Ein Defekt im NF2-Protein führt möglicherweise zur Beeinträchtigung der Zellstruktur, was die Zell-zu-Zell Kommunikation verändern könnte und somit zu einem übermäßigen Zellwachstum führen könnte (53).

Untersuchungen an verschiedenen Tumortypen, sowohl bei NF2 Patienten, als auch bei sporadischen Tumoren, zeigten, daß das *NF2* Gen als Tumorsuppressorgen fungiert (23,52). So fand man bei sporadischen Schwannomen und Meningeomen vor allem dann Mutationen im *NF2* Gen, wenn auch das zweite Allel verloren war (13,15,25,66,89,94,103). Dies ist im Einklang mit der „two hit“ Hypothese von Knudson, (39) nach der erst die Inaktivierung von beiden Allelen zu einer Tumorentstehung führt. Der Verlust des ersten Allels ist bei der NF2 Folge einer Keimbahnmutation, es ist der erste „hit“. Das zweite Allel geht sowohl bei NF2-assoziierten Tumoren als auch bei sporadischen Tumoren in der Regel durch eine größere Deletion verloren, die man als „loss of heterozygosity“ (LOH) bezeichnet. Dies ist der zweite „hit“ in der Tumorgenese, und erst diese beiden „hits“ zusammen führen zur Tumorentstehung.

Für die Entstehung von sporadischen Meningeomen und Schwannomen gilt die Inaktivierung des *NF2* Gens als ein wichtiger Schritt in der Tumorgenese (15,16,27,43,48,49). Sporadische Meningeome gehören zu den häufigsten primären Neoplasien des zentralen Nervensystems im Erwachsenenalter (42,105), und machen etwa 18 % aller primären intrakraniellen und 25% aller primären intraspinalen Tumore aus (31,51,85). Die Inzidenz des Meningeoms in der allgemeinen Bevölkerung beträgt 2,3 pro 100.000 Personen (85). Meningeome sind Tumore die von meningoethelialen (arachnoidalen) Deckzellen ausgehen. Sie haben histologisch eine große Bandbreite und werden nach der WHO-Klassifikation der Hirntumore in drei Malignitäts-„Grade“ eingeteilt (34).

Etwa 90 % der Meningeome sind gutartige, langsam wachsende Tumore die als WHO Grad I Meningeome klassifiziert werden. Histologisch gehören in diese Gruppe eine Vielzahl von Subtypen. Die häufigsten sind fibrilläre, meningoetheliale und transitionale Meningeome. Weitere Subtypen, die zur Gruppe der WHO Grad I Meningeome gehören, sind die psammomatösen, angiomatösen, mikrozystischen, sekretorischen, klarzelligen und die lymphoplasmazellreichen Meningeome (34). In einer neueren klinischen Studie wurden etwa 15% der Meningeome als atypisch WHO Grad II klassifiziert (76). Sie zeichnen sich histologisch durch eine vermehrte mitotische Aktivität, hier definiert als mindestens vier Mitosen pro 10 „high-powerfields“ (definiert als 0.16 mm² Gesichtsfelder), oder durch mindestens drei der folgenden histologischen Charakteristika aus: Erhöhte Zelldichte, kleine Zellen mit hoher Kern- Zytoplasma- Relation, prominente Nukleoli, unstrukturiertes Wachstumsmuster oder rasenartiges Wachstum und Areale mit „spontanen“ oder „geographischen“ Nekrosen (34). Atypische Meningeome zeigen eine Tendenz für lokale Tumorrezidive auch nach kompletter Resektion (56). Zirka 2-3 % der Meningeome sind anaplastische (maligne) Meningeome WHO Grad III. Diese Tumore zeigen offensichtliche Malignitätszeichen, die weit über die atypischen Veränderungen der Meningeome des WHO Grades II hinausgehen (34).

Sporadische Meningeome wurden extensiv zytogenetisch untersucht. Schon 1967 wurden chromosomale Aberrationen bei Meningeomen entdeckt (106) und die Monosomie von Chromosom 22 als häufigste zytogenetische Veränderung, die bei 40-70% aller Meningeome vorkommt (16,22,48,93,104), nachgewiesen. Neuere Untersuchungen zeigten, daß bei den meisten sporadischen Meningeomen, bei denen der lange Arm von Chromosom 22 (22q) komplett oder partiell deletiert war, Mutationen im *NF2* Gen (22q12) vorlagen (103) und daß

die Expression von Merlin (Schwannomin) bei diesen Tumoren vermindert war (46). Mutationen im *NF2* Gen sowie der Verlust dieses Gens, wurden in Meningeomen aller Malignitätsgrade gefunden, was darauf hinweist, daß die Inaktivierung dieses Gens einen frühen Schritt in der Pathogenese des Meningeoms darstellt (102,103).

Nach dem Konzept der klonalen Entwicklung geht die Entstehung eines Tumors von der klonalen Expansion einer Zelle aus, die eine Mutation trägt, die dieser Zelle einen Wachstumsvorteil gibt (72). Jede Zelle, die aus diesem Klon entspringt, kann weitere genetische Veränderungen erfahren, woraus wiederum schneller wachsende Subklone entstehen können. Die Tumorprogression ist somit ein vielschrittiger Prozeß, der durch eine Anhäufung genetischer Veränderungen gekennzeichnet ist (72,102).

Während mit dem *NF2* Gen ein Tumorsuppressorgen identifiziert werden konnte, dessen Funktionsverlust offenbar ein frühes Ereignis in der Meningeomentstehung ist (102,103), sind Suppressorgene, die in die Progression von Meningeomen involviert sind, noch weitgehend unbekannt. Lediglich eine homozygote Deletion des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* (28,71) auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p) konnte bei 25% maligner (anaplastischer) Meningeome identifiziert werden (102). Hinweise auf die Lokalisation progressionsrelevanter Suppressorgene in Meningeomen geben zytogenetische Studien und LOH- Analysen.

Zytogenetische Studien deuten darauf hin, daß bei Meningeomen der WHO Grade II und III mehr numerische und strukturelle chromosomale Abnormalitäten auftreten, als in WHO Grad I Meningeomen (49,64,92,100). Durch LOH Analysen wurden drei chromosomale Regionen gefunden, die selten bei WHO Grad I Meningeomen aber häufig bei WHO Grad II und III Meningeomen verloren sind. Sie liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p), dem langen Arm von Chromosom 10 (10q) und dem langen Arm von Chromosom 14 (14q) (43,50,84,96,97,98).

Weber et al. (102) entwickelten ein Modell, das bestimmte Zugewinne und Verluste von Chromosomenabschnitten mit der Entstehung und Progression von Meningeomen in Verbindung bringt (Abb.1).

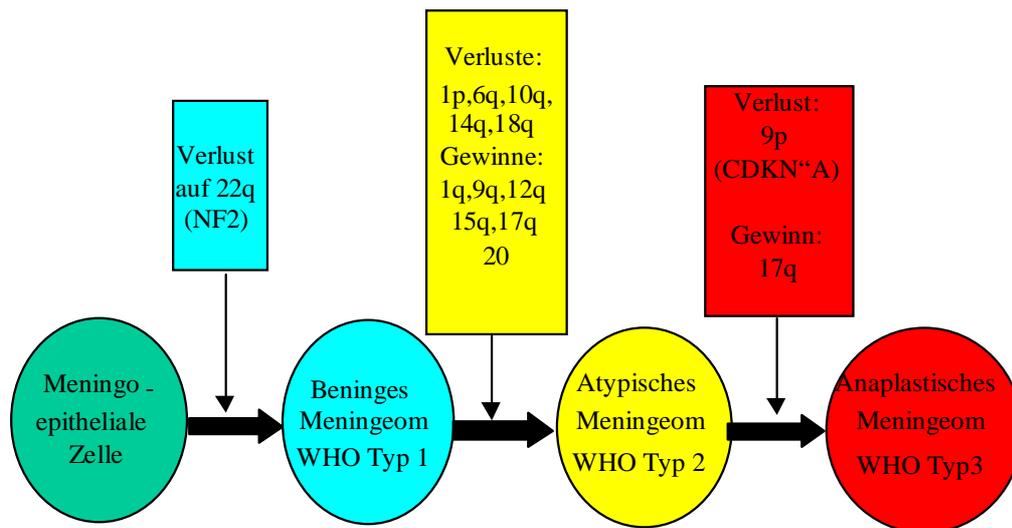


Abb. 1: Modell der genetischen Veränderungen die zur Progression des Meningeoms führen. Gewinne und Verluste sind vor dem Tumorgrad angegeben, in dem sie in einer Häufigkeit von mehr als 30 % gefunden wurden, allerdings können diese genetischen Veränderungen auch in einem kleineren Teil der niedrig maligneren Tumore schon aufgetreten sein [modifiziert nach Weber et al. (102)].

Das dargestellte Modell basiert auf einer großen Querschnittsanalyse von verschiedenen Patienten mit Meningeomen unterschiedlicher Malignitätsgrade. Es ist somit ein hypothetisches Modell des Meningeomprogresses, da nicht wirklich Tumore von Patienten untersucht wurden, bei denen es zu einem malignen Progreß des Tumors gekommen ist. Erst kürzlich konnte dieses Modell an einzelnen Patienten mit bis zu 10 Meningeomrezidiven bestätigt werden (43). Dabei wurde gezeigt, daß ein Meningeomprogreß zu höheren Malignitätsgraden tatsächlich mit einer Zunahme von Allelverlusten auf 1p, 10q und 14q assoziiert ist.

Im Gegensatz zu sporadischen Meningeomen, gibt es bisher keine genetische Analyse, die das Spektrum und die Häufigkeit von Allelverlusten bei NF2-assoziierten Meningeomen untersucht. Eine solche Studie wird zwar seit längerem gefordert (52), ist jedoch schwer durchzuführen, da nur in wenigen Zentren die Möglichkeit besteht, eine ausreichende Anzahl von Tumor- und Blutproben zu gewinnen.

Es gibt einige Merkmale, die NF2-assoziierte Meningeome von sporadischen Meningeomen unterscheiden (19,58,95). NF2-assoziierte Meningeome treten in jüngeren Jahren auf, vorwiegend in der dritten und vierten Lebensdecade, während sporadische Meningeome meist

in der Mitte der sechsten Lebensdecade entstehen (1). Dies kann, in Einklang mit der Knudson-Hypothese, darauf zurückgeführt werden, daß durch die Keimbahnmutation bei NF2 Patienten schon der erste „hit“ seit Geburt vorliegt. Außerdem entstehen NF2-assoziierte Meningeome häufig an multiplen Stellen, während sporadische Meningeome meist solitär sind (1,52). NF2-assoziierte Meningeome sind, wie sporadische Meningeome auch, üblicherweise gutartige Tumore und entsprechen dem WHO Grad I. Auch atypische und maligne Meningeome treten bei NF2 Patienten nicht vermehrt auf (33), aber NF2-assoziierte Meningeome haben anscheinend häufiger eine fibrilläre Struktur als sporadische Meningeome (1,62). Obwohl NF2-assoziierte Meningeome üblicherweise histologisch gutartig sind, fanden sich in einer Studie von 35 NF2 Meningeomen, eine erhöhte Proliferationsrate, Zellpleomorphie und mehr Mitosefiguren bei diesen Tumoren im Vergleich zu sporadischen Meningeomen (1).

Es stellt sich die Frage, ob diesen klinischen und histologischen Unterschiede zwischen sporadischen und NF2-assoziierten Meningeomen molekularbiologische Unterschiede zu Grunde liegen, bzw. ob diese Unterschiede auf molekularbiologischer Ebenen reflektiert werden. Derartige molekularbiologische Unterschiede könnten sich auf die verschiedenen putativen Tumorsuppressorgenorte beziehen (1). Diesbezüglich ist zu untersuchen, ob sich die Allelverluste bei sporadischen und NF2-assoziierten Meningeomen unterscheiden. Es ist zu klären, ob sich bei NF2-assoziierten Meningeomen ebenfalls das für sporadische Formen typische Muster von Allelverlusten, mit Deletionen auf den Chromosomenarmen 22q und weiteren LOHs auf den Chromosomenarmen 1p, 9p, 10q und 14q, finden läßt.

Alternativ oder zugleich könnten auch Unterschiede im Mutationsspektrum des *NF2*-Gens zwischen sporadischen und NF2-assoziierten Meningeomen bestehen (1). Interessanterweise gibt es innerhalb der NF2 zwei phänotypisch unterschiedliche Verlaufsformen. Die schwere Form („Wishart“) ist gekennzeichnet durch einen frühen Beginn und multiple, schnell wachsende Schwannome und Meningeome. Bei der leichten Form („Gardner“) sind ein später Beginn und langsam wachsende vestibuläre Schwannome charakteristisch (19,78). Diese unterschiedlichen Phänotypen können mit genotypischen Veränderungen korreliert werden. Aus zwei neueren Studien geht hervor, daß Patienten mit einem milderen Verlauf der NF2 („Gardner“-Typ) und langsam wachsenden Tumoren, meist Mutationen im *NF2* Gen haben, die das Carboxylende des NF2-Proteins unberührt lassen, während Mutationen, die das NF2-Protein stärker verändern häufig zu einem schwereren Verlauf („Wishart“-Typ) führen

(65,87). Beachtenswert ist auch, daß Patienten mit Spleißmutationen im Exon 14 und 15 des *NF2* Gens bei einer Studie keine Meningeome entwickeln, während Patienten mit Mutationen in den Exons 1-7 häufig Meningeome entwickeln (36). In fünf separaten Studien, die insgesamt 128 sporadische Meningeome auf den Mutationsort im *NF2* Gen hin untersuchten, wurden fast zwei Drittel der Mutationen in den Exons 1–7 gefunden, etwa ein Drittel der Mutationen in den Exons 8-13 und keine Mutation in den Exons 14 und 15 (13,65,75,88,103).

Um die genetischen Veränderungen bei *NF2*-assoziierten Meningeomen zu erkennen, und um mögliche Unterschiede zu sporadischen Meningeomen festzustellen, wurden in der vorliegenden Studie 30 Meningeome von *NF2* Patienten auf molekulargenetische Veränderungen der Chromosomenarme, die bei sporadischen Meningeomen häufig Allelverluste zeigen, hin untersucht. Zusätzlich wurde eine Mutationsanalyse des *NF2* Gens durchgeführt und die proliferative Aktivität der Tumore bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Tumor- und Blutproben

Tumor- und Blutproben wurden von Patienten gewonnen, die im Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf in der Abteilung für Neurochirurgie, im Universitätskrankenhaus Würzburg, Abteilung für Neurochirurgie und im Nordstadt Krankenhaus Hannover, Abteilung für Neurochirurgie behandelt wurden.

Alle Tumore stammen von Patienten mit klinisch gesicherter Neurofibromatose Typ 2. Als diagnostische Kriterien für den Nachweis einer NF2 gelten (24,69):

1. Bilaterale Akustikusschwannome.
2. Ein Angehöriger ersten Grades mit gesicherter NF2 und entweder ein unilaterales Akustikusschwannom bei dem Patienten, oder zwei der folgenden Manifestationen bei dem Patienten: Meningiom, Schwannom, Gliom, posteriorer subkapsulärer Katarakt
3. Zwei der folgenden Manifestationen bei dem Patienten:
 - A. Ein unilaterales vestibuläres Schwannom,
 - B. multiple Meningeome,
 - C. entweder ein Schwannom, Gliom, Neurofibrom, posteriorer subkapsulärer Katarakt oder eine cerebrale Kalzifizierung

Die Tumorproben wurden nach Entnahme schockgefroren und ebenso wie die mit EDTA oder Citrat versetzten Blutproben bei – 80°C gelagert. Um sicherzugehen, daß die Gewebstücke, die für die molekulargenetischen Analysen verwendet wurden eine ausreichende Anzahl an Tumorzellen enthielten, wurde repräsentative Teile des Tumors histologisch untersucht. Nur Proben mit einem Anteil von mehr als 80 % Tumorzellen in dem histologischen Schnitt wurden in diese Studie aufgenommen. In den Fällen, in denen kein eingefrorener Tumorblock

zur Verfügung stand wurde, nach histologischer Überprüfung des Tumorzellanteiles, DNA aus in Paraffin eingebetteten Tumoren extrahiert.

Bei dem Fall Nr. 10 (1-3), bei dem keine Blutprobe vorhanden war, und bei den Fällen Nr. 2 und 15 , bei denen nur teilweise Blut zur Verfügung stand wurde aus tumorfreier Dura oder aus tumorfreiem Fettgewebe DNA isoliert und als Kontrolle verwendet.

Von allen Tumoren wurden Paraffinschnitte angefertigt, die nach konventioneller und immunhistochemischer Färbung histologisch von einem Facharzt für Neuropathologie betrachtet und nach den zu dem Zeitpunkt der Untersuchung gültigen Kriterien der WHO für Hirntumore (33), unter Berücksichtigung der Spezifikationen von Perry et al. (76) klassifiziert wurden.

2.1.2. Oligonucleotid Primer

2.1.2.1. Oligonukleotid Primer für die Mikrosatellitenanalyse

Die mit den Fluoreszenzfarbstoffen TAMRA, 6-FAM, ROX oder JOE markierten Dinucleotid repeat Primer wurden von Biometra (Göttingen, Deutschland) und von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) geliefert. Genetische Karten, und Lokalisationen der Primer wurden von der Datenbank der „National Institutes of Health“ (NIH), der Genome Data Base und aus angegebener Literatur bezogen. Die Primerpaare sind spezifisch für die in der folgenden Tabelle-1 dargestellten Sequenzen:

Tabelle-1: Primer für die Mikrosatellitenanalyse

<u>Lokus</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Max. Het.</u>	<u>Label- ing</u>	<u>Fragment- Länge(Bp)</u>
FGR	1p36.2-p36.1	5-TATGTGGGTCCATGTCACCG	0.687	Tamra	135-143
		5-GCTAGCATGCACAAATGCGG			
D1S162	1p36-pter	5-GGGGGAAGAAGTCCGAGTAG	0.8600	Joe	134 -
		5-ATAAGGGGAACAGGTCTGGG			
D1S507	1p35-p36	5-AGGGGATCTTGCACTTGG	0.7900	Joe	194-
		5-CTCTAGGGTTTCTGGAAAATGCTG			
D1S188	1p21-p13	5-AACCAATCAAGGTGCCTGCA	0.8600	Fam	149-173
		5-TCCCCTAGTGTCTGGCAG			
D6S262	6q21-q22	5-ATTCTTACTGCTGGAAAACCAT	0.8445	Fam	167-183
		5-GGAGCATAGTTACCCTTAAAATC			
D6S292	6q22-q23	5-AATTCACAAGACACAATCTCAG	0.8343	Joe	141-161
		5-AGAACTAAAGTTGCTGTCNTGTA			

<u>Lokus</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Max. Het.</u>	<u>Labeling</u>	<u>Fragment-Länge(Bp)</u>
D6S305	6q27-q27	5-CACCAGCGTTAGAGACTGC 5-GCAAATGGAGCATGTCCT	0.8414	Joe	204-230
D9S168	9p24-p22	5-GGTTTGTGGTCTTTGTAAGG 5-TGGTTTGTTTGTATAACTATCATTG	0.7588	Fam	227-247
D9S157	9p21	5-AGCAAGGCAAGCCACATTC 5-TGGGGATGCCAGATAACTATATC	0.8494	Fam	133-149
D9S171	9p21	5-AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT 5-ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT	0.8043	Tamra	159-177
D10S209	10q25-q26	5-CAAATGTGCTCATATCCTGC 5-CCCATCAGTAGTAAAGGGGC	0.7450	Tamra	181-216
D10S187	10q24-q25	5-CCCTGATAGGCACTCATGTG 5-TTCCTCATAACCTCCGCTTC	0.8420	Tamra	92-114
D10S169	10q26	5-GATCTGTGACTGCCTTCT 5-AAGAGGAGGAGTCCATTCAG	0.7190	Fam	99-117
D10S1758	10pter-qter	5-ATAATGCACACGCTGCC 5-AATTCCCGTGGAGGTTTT	0.7840	Tamra	na ¹
D14S80	14q12	5-CATCTACCTGCCGCAA 5-TAGCCAATTTATGGATACTT	0.8395	Tamra	132-156
D14S59	14q23-q31	5-CTTTTGTCTTCCAGGAGG 5-GTGCTGATGCAAGAAGGTGA	0.8800	Joe	107-
D14S81	14q31	5-CAGAGAAATGAGTTGAGTATGGTT 5-CAACAGAGCAGGACCCTTTC	0.8242	Fam	175-209
D14S51	14q32.1-q32.2	5-GATTCTGCACCCTAAATCC 5-ATGCTCAATGAACAGCCTGA	na	Fam	131-149
D17S796	17p12-p13	5-CAATGGAACCAAATGTGGTC 5-AGTCCGATAATGCCAGGATG	0.8244	Fam	144-174
D17S1176	17p13.1	5-ACTTCATATACATACACGTGC 5-TCAATGGAGAATTACGATAGTG	0.8600	Fam	95-109
D17S520	17p12	5-GGAGAAAGTGATACAAGGGA 5-TAGTTAGATTAATACCCACC	0.8540	Joe	130-144
D17S804	17p13-p11.2	5-GCCTGTGCTGCTGATAACC 5-CACTGTGATGAGATGTCATTCC	0.6243	Fam	156-170
D18S57	18q12.2-q12.3	5-TTCAGGGTCTTTTGAAGAGG 5-AGAAGGCATTAATTTTGCA	0.8755	Fam	88-110
D18S69	18q21.1-q21.3	5-CATTAGCAGTCTGGAAATCCTC 5-CGCTATTGTAAGTAAAACCTGA	0.7921	Fam	194-210
D18S61	18q22.3	5-ATTTCTAAGAGGACTCCAAACT 5-ATATTTTGAAACTCAGGAGCAT	0.8785	Joe	157-183
D19S222	19q12	5-GAAATGTCCTATTTGAAACTGTGC 5-CTGTTGAAATGTATCCAGTAAATCG	0.6652	Fam	233-241
D19S217	19q13.2	5-GGGGTTGATTGAAGTTGGTT 5-CAAGACCATACCCATGA	0.7676	Joe	219-233
D19S210	19q13.4	5-TCACACTACTGGTCTCTCTCA 5-GGTGTGCCCTGTGTGTGTAAG	0.7480	Tamra	165-177
CRYB2	22q11.2	5-CCATGCTACCTTGAAAGTT 5-CCGTATGACTTGTATTCACTAC	0.7620	Fam	200-212
D22S275	22q12.1	5-CTCCAGCCTGTGCAACAGAG 5-GGCTCAACCCATCCTCCT	0.8252	Joe	160-174
D22S193	22q12	5-GATCGCCGGCATCTATATATG 5-CCCAAATTCATCTTTCCTTG	na	Joe	110-136
NF2CA3	22q12	5-CTGCAGATCACAACCTCCTTG	0.833	Rox	130-146

<u>Lokus</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Max. Het.</u>	<u>Labeling</u>	<u>Fragment-Länge(Bp)</u>
		5-GCATTATGGAGTATCCACAG			
D22S268	22q12	5-TACGTCCTCACAATCCAGCGT	0.7050	Fam	244-254
		5-CTGAGGTGGGAGGATTAC			
D22S430	22q12	5- GGACTCACCTGTGCATGCGT	0.6832	Fam	84-98
		5- GATCTTGGCTTTTCCTCCCG			

¹na = nicht angegeben

2.1.2.2. Oligonukleotid Primer für die TGGE- Analyse

Die für die TGGE- Analyse benutzten Primer wurden teils von Jacoby et al. (25) und teils durch Kluwe et al. (37) beschrieben. Sie sind in der folgenden Tabelle-2 aufgeführt.

Tabelle-2: Primer für die TGGE- Analyse:

<i>Exon</i>	<i>Primer/ sense strand (5'-3')</i>	<i>Primer/ antisense strand (5'-3')</i>	<i>Fragmentgröße (bp)</i>
1	GCTAAAGGGCTCAGAGTGCAG	Ps ³ -M13rev TCGACTGTCACCGCAG	232
2	GTCCTTCCCATTGGTTTGT	Gcclamp-M13rev- CGTCAGCCCCACCAAGTTT	248
3	Gcclamp ¹ -M13rev ² - GCTTCTTTGAGGGTAGCACA	GGTCAACTCTGAGGCCAACT	332
4	GCclamp-M13rev- CCTCACTTCCCCTCACAGAG	CCCATGACCCAAATTAACGC	245
5	TGGCAGTTATCTTAGAATCTC	GCclamp-M13rev- TCCTTCAAGTCCTTTGGTTAGC	257
6	CATGTGTAGGTTTTTATTTTGC	GCclamp- CATAAAGGAATGTAAACC	197
7	GCclamp-M13rev- CCATCTCACTTAGCTCCAATG	CTCACTCAGTCTCTGTCTAC	231
8	GAAGGTTGAATAAAATTTTGAGC CTC	GCclamp-M13rev- GACAGGGAAAGATCTGCTGGACC	305
9	GCclamp-M13rev- GACTTGGTGTCCCTAATTCCC	CCATTATCAGTAATGAAAACCAGG	357
10	TGCTACCTGCAAGAGCTCAA	GCclamp-M13rev- CTGACCACACAGTGACATC	317
11	Ps-M13rev- TCTTTGGCCCTTGTGGCAC	CAGGAGACCAAGCTCCAGAA	286
12	TTCAGCTAAGAGCACTGTGC	Ps-M13rev- CTTGAGGACAACCTGCTGTAG	369

<i>Exon</i>	<i>Primer/ sense strand (5'-3')</i>	<i>Primer/ antisense strand (5'-3')</i>	Fragment- größe (bp)
13	Ps-M13rev- GGTGTCTTTTCCTGCTACCT	GGGAGGAAAGAGAACATCAC	245
14	GCclamp-M13rev- TGTGCCATTGCCTCTGTG	AGGGCACAGGGGGCTACA	310
15	GCclamp- TCTGCCCAAGCCCTGATGC	TGGTCCTGATCAGCAAATAC	283

¹GCclamp = 5'-CCC CGC CCC CGC CCC CCC CGC CGC CCC CGC-3', ²M13rev = 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3', ³Ps = Psoralengruppe an den 5'-Terminus befestigt

2.2. Methoden

2.2.1. DNA Isolation

Die genomische Tumor-DNA, sowie die tumorfreie Dura- bzw. Fettgewebs-DNA wurde aus eingefrorenem Tumormaterial oder aus in Paraffin eingebetteten Gewebstücken mit dem „QIAamp Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Ca. 25 mg des eingefrorenen Tumors wurden zur Auflösung des Gewebes mit 180µl Puffer ATL (Qiagen), 20µl Proteinase K (Qiagen) in ein 2-ml Eppendorfgefäß gegeben, vermischt und bei 55°C für mehrere Stunden inkubiert, bis alles Gewebe aufgelöst war. Danach wurden 200µl Puffer AL (Qiagen) zugesetzt, gründlich gemischt und das Lysat bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 210µl 96-100% Ethanol zupipettiert und die gesamte Flüssigkeit in eine „QIAamp spin Säule“ gegeben und mit 8000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute zentrifugiert. Die „QIAamp spin Säule“ mit dem DNA enthaltenen Filter wurde dann in ein sauberes 2-ml Gefäß gesteckt und es wurde mehrmals 500µl Puffer AW (Qiagen) auf den Filter der „QIAamp spin Säule“ gegeben und zentrifugiert. Zur Gewinnung der DNA wurde die „QIAamp spin Säule“ mit 200µl auf 70°C angewärmten Wasser für eine Minute bei Raumtemperatur in einem neuen 2-ml Gefäß inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation wurde die DNA dann aus dem Filter eluiert.

Bei den in Paraffin eingebetteten Tumoren oder dem in Paraffin eingebetteten Dura- oder Fettgewebe wurde ca. 25 mg des Gewebes in ein 2-ml Eppendorfgefäß gegeben und das Paraffin durch die Zugabe von 1200 µl Xylol mit anschließendem starkem Schütteln, Zentrifugation und Abpipettieren der zentrifugierten Flüssigkeit entfernt. Das verbleibende Tumorgewebe wurde mit absolutem Ethanol gereinigt. Die nicht abzupipettierenden Reste des Ethanols wurden durch Inkubation bei 37°C verdampft. Mit dem Geweberest wurde weiter wie mit den eingefrorenen Tumoren verfahren.

Blut-DNA wurde mit dem „QIAamp Blood Kit“ (Qiagen) gewonnen. 200µl Blut wurden mit 25µl Protease (Qiagen) und 200µl Puffer AL (Qiagen) in ein 2-ml Eppendorfgefäß gegeben, vermischt und bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Der weitere Verlauf der DNA Isolation aus dem Blut ist mit dem der DNA Gewinnung aus dem Gewebe identisch und oben beschrieben.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Mikrosatelliten Primern

Zum Ansetzen der PCR wurden ca. 20 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 10µl Flüssigkeit eingesetzt. Die Reaktionslösung enthielt 0.25 U *Taq-Gold* Polymerase (Perkin Elmer, Foster City, California, USA), 2.5 µM fluoreszenzmarkierten und nicht markierten Oligonukleotidprimer, 200µl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% w/v gelatin) und 200µl dNTPs (200 µM).

Vor den Zyklen zur DNA Vermehrung fand eine 4 Minuten lange Phase der Aktivierung der *Taq Gold* Polymerase bei 94°C in einem DNA-Thermocycler (Biometra) statt. Direkt nach diesem Vorgang folgten 40 Zyklen der DNA Amplifikation in der gleichen Maschine: 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute Primeranlagerung (annealing) bei 55°C, 2 Minuten DNA-Synthese (extension) bei 72°C.

Von dem PCR-Produkt wurden 2µl mit 3µl DNA-Probenpuffer auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und zusammen mit 2.5 µg DNA eines Längenstandards (Marker VI, Böhlinger, Mannheim) für 30 Minuten bei 100 V in einer Elektrophoresekammer (Mini Gel Migration Trough, Cosmo Bio CO, USA) aufgetrennt. Das Gel wurde dann zur Anfärbung der DNA für 30 Minuten in eine Nukleinsäuren färbende Lösung (SYBR GOLD, Molecular Probes, Oregon, USA) gegeben und unter UV-Licht auf einen Polaroidfilm (Polapan 663, Polaroid Company, Cambridge, MA, USA) abgelichtet. Waren auf dem Gel DNA-Banden der erwarteten Größe zu sehen, so wurden die Proben für die Fragmentanalyse vorbereitet.

2.2.3. Fragmentanalyse

Auf einen Dialysefilter (Millipore, Millipore Cooperation, Bedford, MA, USA) wurde je 1µl von bis zu 6 PCR-Produkten von unterschiedlicher Größe oder Markierung eines Patienten aufgetragen und für eine Stunde gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde dann mit 12µl Formamid, 4µl destilliertem Wasser und 0,4µl Genescan-500 ROX Standard (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) vermischt, und bei 95°C für 2 Minuten denaturiert.

Die Auswertung der Fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte erfolgte in einem automatisierten „ABI genetic analyzer“ (Applied Biosystems). Zeigte sich dort bei dem kürzeren Allel der Tumorprobe eine Signalreduktion unter die Höhe des längeren Allels so wurde dies als Allelverlust interpretiert. Bei einer Signalreduzierung des längeren Allels des Tumors um mehr als 50% im Vergleich zum kürzerem Allel wurde ebenfalls einen Allelverlust angenommen (siehe Beispiel Seite 29) .

2.2.4. Färbung mit dem Antikörper Mib-1 gegen das Ki 67- Antigen

Der monoklonale Antikörper Mib-1 (Dianova, Hamburg, Deutschland) detektiert das nukleäre, zellproliferationsassoziierte Antigen Ki 67, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, daß heißt in allen Phasen außer G₀, exprimiert wird. Der Mib-1 Antikörper wird in einer Konzentration von 0,2 mg/ml Maus IgG1 in PBS mit 2% BSA und 0,05% Natriumazid geliefert. Der Antikörper wurde in PBS-BSA auf 10 µg/ml verdünnt und für 60 Minuten mit den entwachsten Paraffinschnitten inkubiert. Gebundener Antikörper wurde durch einen zweiten, mit Biotin markierten Sekundärantikörper (1:60, „goat anti-mouse“, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und durch Peroxidase markiertes Streptavidin (Dako, Hamburg, Deutschland) nachgewiesen, dabei wurde DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Substrat verwendet. Zur Auswertung wurden die gefärbten Zellkerne bei einer Vergrößerung von 1:1000 mit einem Immersionsölobjektiv gezählt.

Der Mib-1 Index wurde nun nach zwei Methoden bestimmt:

Die eine Methode entspricht dem in der Neuropathologie der Universität Hamburg eingesetztem Routineverfahren. 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 mm². 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}). Der Mib-1 Index läßt sich also in folgender Formel ausdrücken: $K_{pos}/K_{ges} \times 100 = \text{Mib-1 Index}$. Darüberhinaus wurden, wie z.B. in einer größeren Studie von sporadischen Meningeomen (68), mindestens 10 willkürliche Gesichtsfelder mit mindestens 2000 Zellkernen, bei einer identischen Gesichtsfeldgröße ausgezählt, um den Mib-1 Index (Mib 10 GF) zu bestimmen.

2.2.5. Mutationsanalyse

Zur Identifikation von Mutationen im *NF2* Gen wurden die Proben mit der Methode der „temperature gradient gel electrophoresis“ (TGGE) untersucht. Die TGGE- Analyse wurde mit einem TGGE- System von Qiagen unter Berücksichtigung des Herstellerprotokolls und den Spezifikationen von Kluwe et al. (36) ausgeführt. Die benutzten Primer für die Amplifikation der Exons durch TGGE sind in der Tabelle- 2 (Kapitel 2.1.2.2.) aufgeführt. Die Amplifikation der Fragmente fand in einem DNA-Thermocycler (Biometra) statt. Vor den Schritten zur DNA Vermehrung fand ein vier Minuten langer Schritt der Denaturierung und Aktivierung der *Taq Gold* Polymerase bei 94°C statt. 35 bis 40 Zyklen von 30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C folgten. Die PCR für die TGGE enthielt, bis auf die Primer, dieselben Bestandteile und Konzentrationen die schon bei der PCR für die Mikrosatellitenprimer beschrieben wurden. Von den Primern wurden je 2.5 pmol zugegeben. Die PCR Produkte wurden mit einem Puffer zur Denaturierung (8 M Urea, 40 mM MOPS, 2mM EDTA, pH 8.0, 0.01 % Bromphenolblau und Xylol Cyanol FF) vermischt und auf 95°C für 5 min aufgeheizt und dann für weitere 15 min bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden dann auf ein Gel (8 % Polyacrylamid, 8 M Urea, 20 mM MOPS (pH 8.0), 1 mM EDTA und 2 % Glycerol) aufgetragen und auf dem TGGE Gel aufgetrennt. Für jedes analysierte Exon wurde mindestens eine Probe mit einer bekannten Mutation als Positivkontrolle mit aufgetragen.

Zeigten sich veränderte Banden in einem Exon eines Patienten, so wurde die entsprechende PCR so wiederholt, daß ein Volumen von ca. 50µl PCR-Produkt zur Aufreinigung (QIAquick-spin PCR purification Kit, Qiagen) vorhanden war. 2µl des gereinigten PCR-Produktes wurden in ein 10µl Volumen für die Sequenzierreaktion eingesetzt. Die Reaktionslösung enthielt außerdem 1µl Primer (10µM), sowie 1µl eines Fertigansatzes für die Sequenzierreaktion (Big Dye Sequencing Kit, Perkin Elmer) und 6µl Wasser. Die Sequenzierreaktion fand in einem DNA-Thermocycler (Biometra) statt, und bestand aus 25 Zyklen von 10 s bei 96°C, 5 s bei 55°C und 4 min bei 60°C. Nach einer erneuten Reinigung der Proben mit zuerst 10µl 3M Natriumacetat und 250µl eines Ethanol-Dextranblaugemisches und dann 70%igem Ethanol wurden die Proben zentrifugiert und das Ethanol entfernt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der Proben mit einem automatischen Sequenziergerät (ABI373 Applied Biosystems).

2.2.6. Methoden der Datenanalyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SigmaStat (Version 2.0). Für die graphische Darstellung diente das Programm Excel (Version 7.0).

Für die biomathematisch- statistische Auswertung dienten die Mittelwerte der Stichprobe (\bar{x}) und die Standardabweichung (s) als Ausgangsbasis zur Überprüfung der Grundgesamtheit.

Der Kolmogoroff- Smirnow- Test wurde zur Prüfung auf die Normalverteilung der Daten angewendet. Zum Vergleich zweier unabhängiger, normalverteilter Stichproben (Mib-1 10 GF, WHO Grad I und II) wurde der „t- Test“ zur Evaluation benutzt. Bei nicht normalverteilten Stichproben (Mib-1 3 GF , WHO Grad I und II) wurde der „Mann-Whitney Rank Sum Test“ angewendet. Zum Vergleich mehrere unabhängiger, normalverteilter Stichproben (Mib-1 10 GF, WHO Grad I Subtypen) wurde die „One Way Analysis of Variance“ (ANOVA) verwendet, bei nicht normalverteilten Stichproben (Mib-1 3 GF, WHO Grad I Subtypen) kam die „Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks“ Methode zum Einsatz. Wurden die Proportionen zweier unabhängigen Stichproben untersucht (Allelverluste bei WHO Grad I und II Meningeomen), so wurde der „z- Test“ angewendet; wurden mehr als zwei Gruppen untersucht (Allelverluste bei WHO Grad I Subtypen), so wurde die „Chi- Quadrat“ Methode benutzt.

Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde ein Niveau von $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$) festgelegt. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung folgender Signifikanzniveaus:

$P > 0,05\%$ = Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha > 5\%$ = nicht signifikant

$P < 0,05\%$ = Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha < 5\%$ = signifikant

$P < 0,01\%$ = Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha < 1\%$ = sehr signifikant

$P < 0,001\%$ = Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha < 0,1\%$ = hoch signifikant

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

Es wurden 30 Meningeome von 22 verschiedenen Patienten untersucht. Die Patienten hatten zum Zeitpunkt der Operation ein durchschnittliches Alter von $28,37 \pm 11,94$ Jahren. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei einigen Patienten aufgrund multipler Operationen verschiedene Altersstufen Eingang in die Berechnungen fanden. Von den 22 Patienten waren 17 weiblich und 5 männlich.

Die klinischen und histologischen Daten sind in Tabelle-3 zusammengefaßt, die darüberhinaus einen Überblick über die Lokalisation der untersuchten Meningeome gibt. Faßt man die einzelnen Lokalisationen der Tumore in übergeordnete Kategorien zusammen, so ergibt sich, daß 12 der Meningeome (40%) supratentoriell, und weitere 12 Meningeome (40%) infratentoriell lokalisiert waren; 4 der Tumore (13%) hatten einen Bezug zur Schädelbasis und weitere 2 der Meningeome (7%) waren am Tentorium lokalisiert.

Tabelle-3: Klinische Daten und Histologie

Fall-Nr.	Alter ¹ / Geschlecht	WHO Grad ²	Histologie	Lokalisation
1	39, w	I	fibrillär	spinal
2	20, w	II	atypisch	frontal
3	13, m	II	atypisch	cervical
4.1	28, w	I	fibrillär	orbital
4.2	44, w	I	meningot. ³	orbital
5	33, m	II	atypisch	infratentoriell
6	15, w	I	psammomatös	thorakal
7.1	28, w	II	atypisch	cervical
7.2	28, w	II	atypisch	tentoriell
8	48, m	I	fibrillär	Konvexität
9.1	14, m	I	fibrillär	Konvexität
9.2	15, m	I	fibrillär	Konvexität
10.1	24, w	I	transitional	thorakal
10.2	24, w	I	transitional	temporal
10.3	26, w	I	transitional	Konvexität
11	4, w	I	meningot.	N. Opticus
12.1	21, w	I	psammomatös	KHBW ⁴
12.2	22, w	I	psammomatös	thorakal
12.3	26, w	I	fibrillär	cervicom. ⁵
13	24, w	I	transitional	thorakal
14	21, w	II	atypisch	parietal
15	24, w	I	fibrillär	tentoriell
16	38, w	I	fibrillär	supratentoriell
17	43, w	I	fibrillär	Falx
18	21, w	I	psammomatös	thorakal
19.1	32, w	I	psammomatös	frontal
19.2	34, w	I	psammomatös	thorakal
20	56, w	I	fibrillär	Falx
21	49, m	I	meningot.	N. Olfactorius
22	37, w	II	atypisch	Keilbeinflügel

¹ Alter zum Zeitpunkt der Operation, ² WHO-Klassifikation der Meningeome in Grad I-III (33),
³ meningot. = meningotheliomatös, ⁴ KHBW = Kleinhirnbrückenwinkel, ⁵ cervicom. = cervicomedullär

Von den 30 untersuchten Meningeomen wurden 23 (77%) als benigne, dem WHO Grad I entsprechend klassifiziert. Die weiteren 7 Tumore (23%) waren atypische Meningeome, WHO Grad II. Keiner der untersuchten Tumore gehörte zur Gruppe der anaplastischen (malignen) WHO Grad III Meningeome.

Von den 23 benignen Meningeome waren 10 Tumore von fibrilläre Morphologie (43% der benignen, bzw. 34% der gesamten Meningeome). Charakteristisch für die fibrillären Meningeome sind spindelförmige Zellen, die fibroblastenähnlich aussehen. Parallel

verlaufende Faszikel von fibroblastisch wirkenden Zellen, sowie zahlreiche kollagene Fasern zwischen den langgestreckten Zellen sind ein weiteres histologisches Kriterium dieses Meningeomsubtypes (33) (Abb.3.).

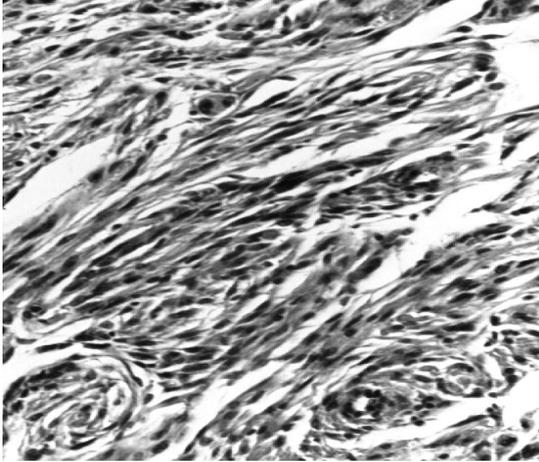


Abb.3. HE-Färbung von Fall-Nr. 16 bei Betrachtung mit dem 20er Objektiv. Zu sehen ist ein fibrilläres Meningeom, das durch die spindelförmige Struktur der Zellen und die parallelen Faszikel von Zellen ein fibroblastenähnliches Wachstumsmuster aufweist.

6 der benignen Tumore waren psammomatöse Meningeome (26% der benignen und 20% der gesamten Meningeome). Typisch für psammomatöse Meningeome ist eine Vielzahl von kalkhaltigen, rundlichen Psammomen (33) (Abb.4.).

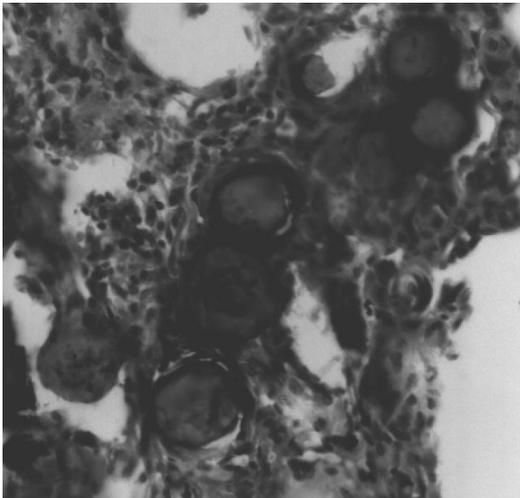


Abb.4. HE-Schnitt des Meningeomes von Fall-Nr. 12.2 mit einer Vergrößerung mit dem 20er Objektiv. Sichtbar sind eine Vielzahl von Psammomen.

Vier transitionale Meningeome waren in der Gruppe der benignen Meningeome enthalten (17% der benignen Tumore, bzw. 13% der Gesamtumore). Dieser Meningeomsubtyp hat histologisch sowohl Anteile des fibrillären als auch des meningotheliomatösen Meningeomes. Eine überwiegend zwiebelschalenförmige Anordnung der Zellen ist typisch für diesen Tumortyp (33) (Abb.5.).

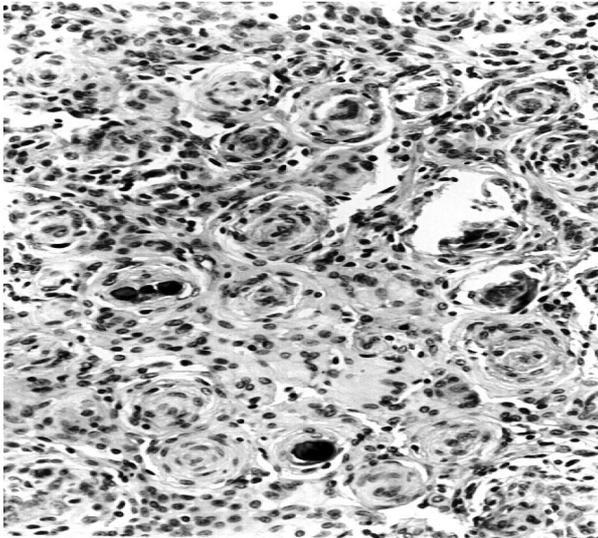


Abb.5. HE-Färbung von Fall-Nr. 13 betrachtet mit dem 40er Objektiv. Die zwiebelartige Anordnung der Zellen ist typisch für die transitionalen Meningeome.

Des weiteren wurden drei meningotheliomatöse Meningeome untersucht (13% der benignen Tumore, bzw. 10% der Gesamtumore). Dieser Subtyp des Meningeoms zeichnet sich durch lobulär angeordnete und von dünnen kollagenen Fasern umgebene Zellen aus (33) (Abb.6.).

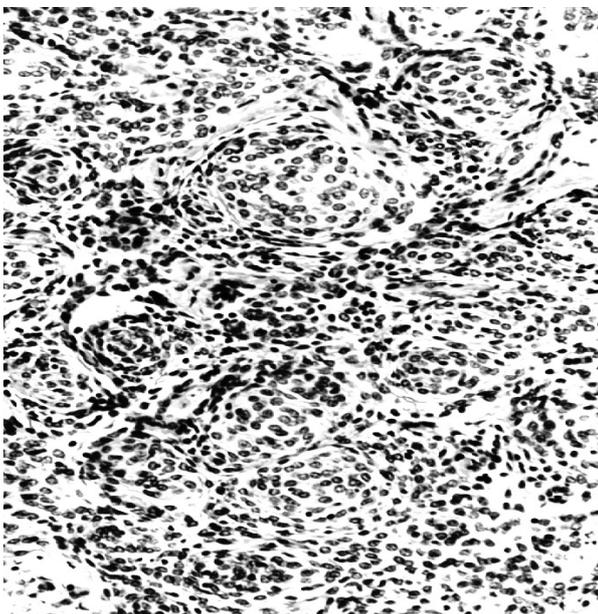


Abb.6. HE-Färbung von Fall-Nr. 4.1 mit dem 20er Objektiv fotografiert. Die lobuläre Struktur zeichnet das meningotheliomatöse Meningeom aus.

Sieben der untersuchten Tumore waren atypische Meningeome, WHO Grad II (23%). Kennzeichnend für die atypischen Meningeome sind unter anderem Mikronekrosen im Tumorgewebe und das gehäufte Vorkommen von Mitosefiguren (33) (Abb.7-8.).

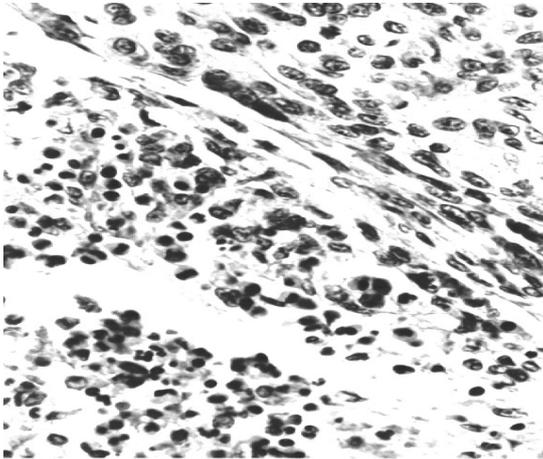


Abb.7. HE-Schnitt des atypischen Meningeomes von Fall-Nr. 2 mit dem 40er Objektiv betrachtet. Zu sehen ist in der Bildhälfte links unten eine Mikronekrose mit pyknotischen Zellkernen.

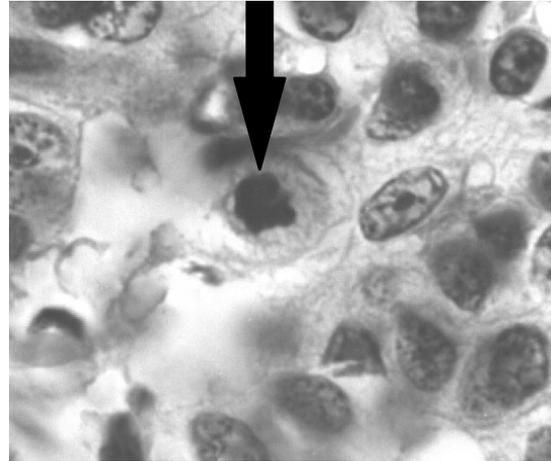


Abb.8. HE-Färbung des atypischen Meningeomes von Fall-Nr. 14, betrachtet mit dem 100er Objektiv in Ölimmersion. Im Zentrum des Bildes ist eine Mitosefigur zu sehen (siehe Pfeil).

3.2. Mib-1 Index

Bei 26 der 30 untersuchten NF2- assoziierten Meningeome konnten Färbungen mit dem Mib-1 Antikörper gegen das Ki-67 Antigen durchgeführt und ausgewertet werden (Tabelle-4). In vier Fällen konnte kein Mib-1 Wert bestimmt werden, da hier entweder nicht genug Tumormaterial für eine Färbung zur Verfügung stand, oder die unebene Schnittbeschaffenheit, aufgrund der zahlreichen kalkhaltigen Psammomkörper, eine Auswertung unmöglich machte. Von 19 benignen Meningeomen (9 fibrilläre, 4 psammomatöse, 4 transitionale und 2 meningotheliomatöse) und von 7 atypischen Meningeomen konnten Mib-1 Färbungen ausgewertet werden.

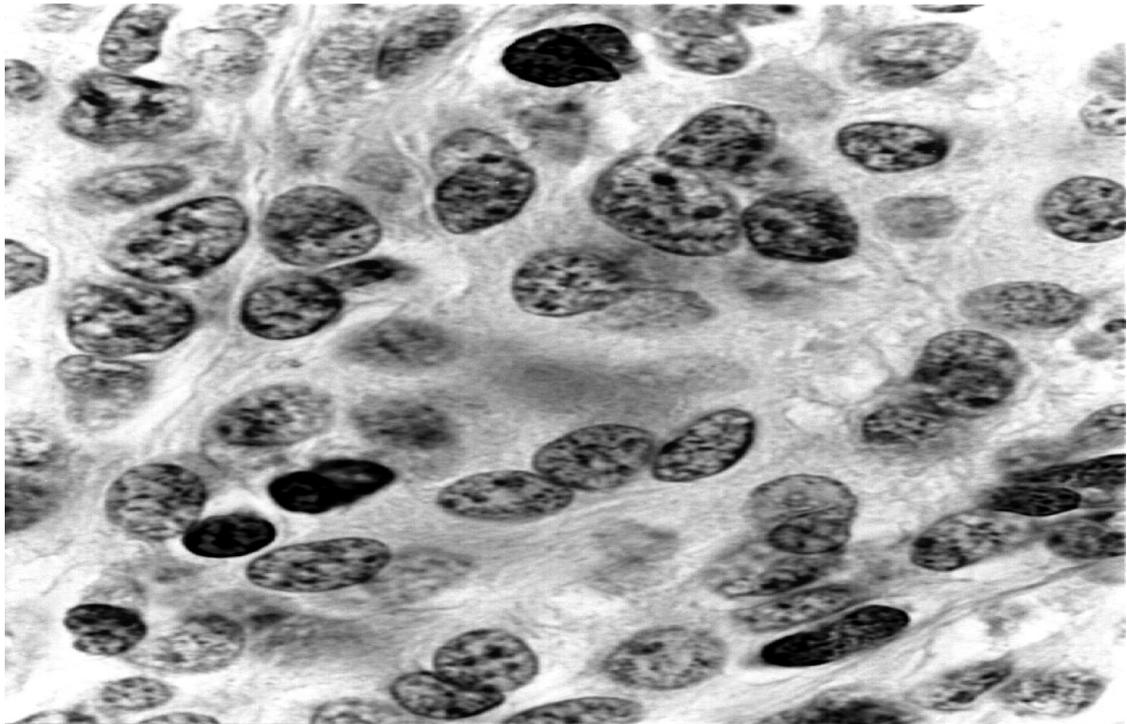


Abb.9. Exemplarische Dargestellung der Mib-1 Immunhistochemie von Fall-Nr. 3 bei Betrachtung mit dem 100er Objektiv in Ölimmersion. Die braun angefärbten Zellkerne sind die Mib-1 positiven Zellkerne, während die blauen Zellkerne Mib-1 negativ sind.

Zum Auswerten der Mib-1 gefärbten Paraffinschnitte kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz (siehe 2.2.4). Um einen Vergleich mit größeren publizierten histopathologischen Studien zu ermöglichen wurden zum einem mindestens 10 zufällig gewählte Gesichtsfelder (GF) mit mindestens 2000 Zellkernen bei einer

Gesichtsfeldgröße von 0,031 mm² ausgezählt, da z.B. Nakasu et al. (68) eine sehr ähnliche Zählmethode anwandte (Mib-1 Index 10 GF).

Die zweite Methode entspricht dem in der Abteilung für Neuropathologie des UKE angewandtem Routineverfahren, bei dem der Mib-1 Index in drei GF der Region der größten proliferativen Aktivität gemessen wird (Mib-1 Index 3 GF).

Tabelle-4: Mib-1 Index

Fall-Nr.	WHO Grad ¹	Histologie	Mib-1 Index Mw ² (10 GF ³)	Mib-1 Index Sd ⁴ (10 GF)	Mib-1 Index Mw (3 GF)	Mib-1 Index Sd (3GF)
1	I	fibrillär	2,54	1,72	3,6	1,17
2	II	atypisch	0,90	0,98	6,9	0,74
3	II	atypisch	3,02	1,54	19,6	10,63
4.1	I	fibrillär	0,97	0,60	6,8	2,69
4.2	I	meningot. ⁵	1,11	0,58	6,34	4,08
5	II	atypisch	2,33	0,90	8,8	0,54
6	I	psammom. ⁶	2,04	0,92	8,1	3,13
7.1	II	atypisch	1,10	0,83	2,42	1,25
7.2	II	atypisch	2,66	1,66	7,74	3,72
8	I	fibrillär	0,41	0,44	2,2	0,50
9.1	I	fibrillär	1,20	1,02	7,6	4,45
9.2	I	fibrillär	nu ⁵	-	nu	-
10.1	I	transitional	1,72	1,89	1,0	0,13
10.2	I	transitional	0,24	0,32	< 1	0,39
10.3	I	transitional	2,88	1,70	3,8	0,83
11	I	meningot.	nu ⁷	-	nu	-
12.1	I	psammom.	nz ⁸	-	nz	-
12.2	I	psammom.	1,95	1,37	7,8	2,08
12.3	I	fibrillär	0,85	0,42	2,1	0,35
13	I	transitional	2,07	0,45	3,30	1,35
14	II	atypisch	2,68	0,91	3,8	0,62
15	I	fibrillär	1,65	2,02	1,9	1,40
16	I	fibrillär	1,32	0,54	2,3	1,71
17	I	fibrillär	0,44	0,57	1,82	0,06
18	I	psammom.	2,73	1,48	3,99	0,58
19.1	I	psammom.	1,23	0,68	3,82	1,10
19.2	I	psammom.	nz	-	nz	-
20	I	fibrillär	0,47	0,45	2,31	0,64
21	I	meningot.	0,92	0,62	4,11	1,32
22	II	atypisch	2,19	0,92	7,09	2,50

¹ WHO-Klassifikation der Meningeome in Grade I-III (33), ² GF = Gesichtsfelder, ³ Mw = Mittelwert, ⁴ Sd = Standardabweichung, ⁵ meningot. = meningotheliomatös, ⁶ psammom. = psammomatös, ⁷ nu = nicht untersucht, ⁸ nz = nicht zählbar (aufgrund eines höchst unebenen, sehr psammomkörperreichen Schnittes)

3.2.1. Mib-1 Index 10 Gesichtsfelder (GF)

Der Prozentsatz der Mib-1/Ki-67-positiven Zellen reichte von 0,24% bis zu 3,02%. Dabei betrug der mittlere Mib-1 Wert für die gesamten Meningeome (26 Auswertbare) 1,60% \pm 0,85%. Für die atypischen, WHO Grad II Meningeome (Mib-1 Index: 2,13% \pm 0,82%) war der Mib-1 Index gegenüber den benignen, WHO Grad I Meningeomen (Mib-1 Index: 1,41% \pm 0,80%) grenzwertig erhöht (P = 0.055). Zwischen den verschiedenen Subtypen der benignen WHO Grad I Meningeomen variierte der Mib-1 Wert kaum (Tabelle-5) und bei Mittelwerten von 1,760% – 1,015% zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Subtypen (P = 0.407):

Tabelle-5: Mib-1 Werte der unterschiedlichen Meningeomtypen (10GF):

<i>Meningeom Typ:</i>	<i>Mittelwert Mib-1(10GF):</i>	<i>Standardabweichung:</i>
Fibrillär WHO I	1,125%	0,732%
Psammomatös WHO I	1,760%	0,736%
Transitional WHO I	1,728%	0,552%
Meningotheliomatös WHO I	1,015%	0,095%
Atypisch WHO II	2,126%	0,816%

3.2.2 Mib-1 Index 3 Gesichtsfelder (GF)

Der Prozentsatz der Mib-1/Ki-67-positiven Zellen reichte von < 1% bis zu 19,6%. Dabei betrug der mittlere Mib-1 Wert für die gesamten Meningeome (26 Auswertbare) bei Auszählung der drei Gesichtsfelder im Gebiet mit der höchsten proliferativen Aktivität 4,99% \pm 3,88%. Der Mib-1 Wert für die atypischen Meningeome (8,05% \pm 5,57%) war deutlich höher als der benignen Meningeome (3,86% \pm 2,37%), und ergab mit P = 0,026 einen statistisch signifikanten Unterschied. Statistisch zeigte sich auch bei dieser Zählweise kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen der WHO Grad I Meningeomtypen (P = 0,127) (Tabelle-6):

Tabelle-6: Mib-1 Werte der unterschiedlichen Meningeomtypen (3GF)

<i>Meningeom Typ:</i>	<i>Mittelwert Mib-1 (3 GF):</i>	<i>Standardabweichung:</i>
Fibrillär WHO I	3,566%	2,318%
Psammomatös WHO I	5,162%	2,652%
Transitional WHO I	2,150%	1,642%
Meningotheliomatös WHO I	5,225%	1,577%
Atypisch WHO II	8,050%	5,569%

3.3. NF2 Mutationsanalyse

3.3.1. NF2 Mutationen

Von den 22 Patienten lag bei 4 der Patienten (18%) eine positive Familienanamnese für NF2 vor. Bei den anderen 18 Patienten (82%) war die NF2 Erkrankung vermutlich sporadisch, also eventuell spontan durch Neumutation, aufgetreten.

Zur Identifikation von Mutationen im *NF2* Gen wurden die Proben mit der TGGE-Analyse auf aberrante Banden in den einzelnen Exons untersucht. Zur Bestätigung wurde eine Sequenzierung in beide Leserichtungen durchgeführt (siehe 2.2.5).

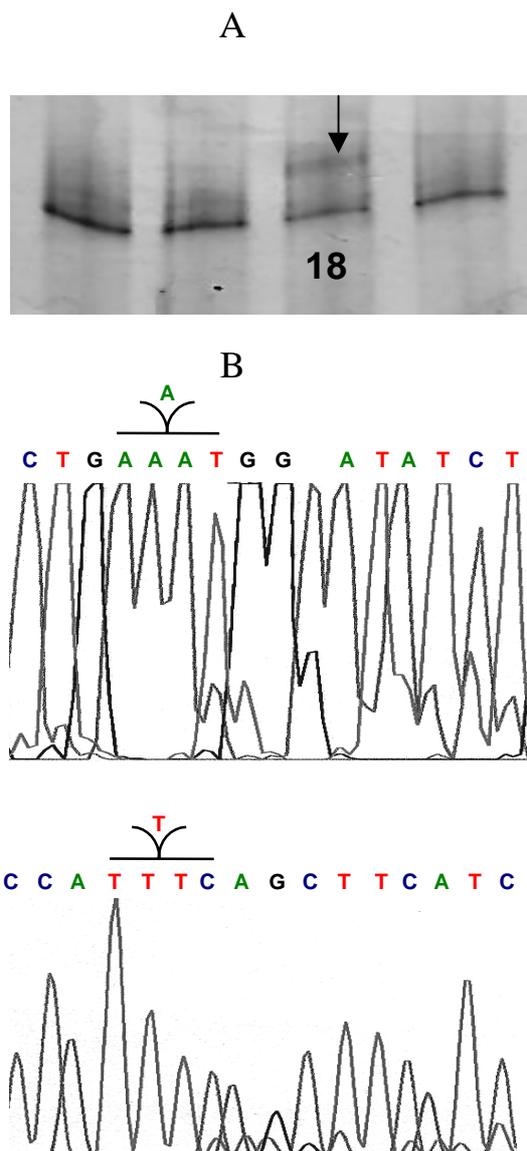


Abbildung 10:

Dargestellt ist ein repräsentativer Fall einer Mutationsanalyse (Fall-Nr. 18).

A: Auf dem TGGE – Gel ist eine aberrante Bande zu sehen (Pfeil).

Diese aberrant Bande zeigt eine „heteroduplex“ Bildung an und ist somit ein Zeichen für eine Mutation des *NF2* Gens.

B: In dem dargestellten Fall ist die aberrante Bande auf eine Insertion eines einzigen A (Adenin) im Bereich der Nukleotide 611-614 des *NF2* Gens zurückzuführen. Diese Mutation bewirkt einen „frameshift“ (Verschiebung des Leserasters), der sich in beide Richtungen bestätigen ließ (oberer, bzw. unterer Teil der Abbildung B).

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Die Analyse der Keimbahnmutationen erfolgte z.T. bereits im Rahmen vorangegangener Studien (35,36,37,38). Von den 22 NF2 Patienten in dieser Studie wurden 15 auf *NF2* Mutationen untersucht (Abbildung 10). Bei 7 von 15 untersuchten Patienten (47%) konnten in der Blut DNA Keimbahnmutationen im *NF2* Gen gefunden werden (Tabelle-7). Bei einem dieser Patienten (Fall-Nr. 1) war nur bei einem Teile der Leukozyten eine Veränderungen des *NF2* Gens nachzuweisen, wie schon bereits publiziert (37), was auf ein genetisches Mosaik hinweist, bei dem nicht in allen Zellen die *NF2* Mutation vorhanden war. Dies ist auf eine postzygotische Mutation zurückzuführen (6). Bei einem anderen Patienten (Fall-Nr. 16) konnte zwar im Tumor eine Mutation des *NF2* Gens nachgewiesen werden, doch in den Blutleukozyten war keine *NF2* Mutation auffindbar. Auch dieser Befund, zusammen mit der klinisch gesicherten Diagnose NF2 legt das Vorhandensein eines genetischen Mosaiks nahe.

Alle *NF2* Mutationen waren in den Exons 2 bis 8 lokalisiert. Die Mutationen betrafen die Exons 2 (dreimal), 5, 6, 7 (zweimal) und 8 (einmal). Im Exon 2 waren die Kodons 46, 75 und 57 von Mutationen betroffen. Im Exon 5 lag eine Spleißmutation vor. Im Exon 6 war das Kodon 196 verändert. Im Exon 7 gab es eine Spleißmutation und eine weitere Mutation im Kodon 205. Im Exon 8 war das Kodon 255 betroffen. Vier der Mutationen bewirkten einen „frameshift“, zwei waren „nonsense“ Mutationen und zwei Mutationen waren „splice site“ alterierende Mutationen, wobei es eine „splice donor“ und eine „splice acceptor“ Mutation gab.

3.3.2 Tabelle der NF2 Mutationen

Die Mutationen des *NF2* Gens und die Art des Auftretens der NF2 Erkrankung sind in der Tabelle-7 wiedergegeben.

Tabelle-7: NF2 Mutationen:

Fall-Nr.	NF2 Auftreten	Exon	Mutation	Kodon	Konsequenz
1	sporadisch	2	137-145del	46	frameshift ¹
2	familiär	2	223 del C	75	frameshift
3	familiär		nicht analysiert		
4.1	sporadisch		keine Mutation gefunden		
4.2	dito		dito		
5	sporadisch		keine Mutation gefunden		
6	sporadisch		keine Mutation gefunden		
7.1	sporadisch		keine Mutation gefunden		
7.2	dito		dito		
8	sporadisch	8	761-766 ins TC	255	frameshift ²
9.1	sporadisch	2	169 C > T	57	nonsense ²
9.2	dito	dito	dito		
10.1	familiär		nicht analysiert		
10.2	dito		dito		
10.3	dito		dito		
11	sporadisch	7	675 +5G > C		splice donor ³
12.1	sporadisch	5	517 G > A		splice acceptor ³
12.2	dito	dito	dito		
12.3	dito	dito	dito		
13	sporadisch		keine Mutation gefunden		
14	sporadisch		keine Mutation gefunden		
15	sporadisch		keine Mutation gefunden		
16	sporadisch	6	586 C > T	196	nonsense ⁴
17	sporadisch		nicht analysiert		
18	sporadisch	7	611-615 ins A	205	frameshift
19.1	sporadisch		nicht analysiert		
19.2	dito		dito		
20	familiär		nicht analysiert		
21	sporadisch		nicht analysiert		
22	sporadisch		nicht analysiert		

¹ Mosaik, *NF2* Mutationen nur in einem Teil der Leukozyten, veröffentlicht in Kluwe et al. 1998 (37)

² Veröffentlicht in Kluwe et al. 1996 (35)

³ Veröffentlicht in Kluwe et al. 1998 (36)

⁴ Mosaik, keine Mutation in den Blut Leukozyten, aber *NF2* Mutation im Tumorgewebe

3.4. Allelverluste

3.4.1. Überblick

Zur Identifikation von Allelverlusten in den NF2-assoziierten Meningeomen, wurde Tumor-DNA und Blut-DNA mit Hilfe von spezifischen Mikrosatellitenprimern (siehe 2.1.2) amplifiziert (siehe 2.2.2) und mit Hilfe eines automatisierten „ABI genetic analyzer“ ausgewertet (siehe 2.2.3).

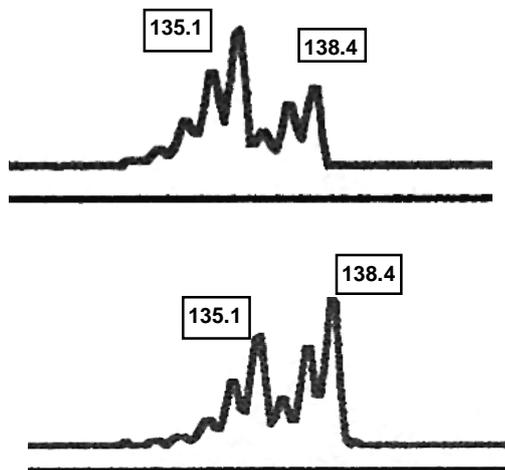


Abbildung 11:

Repräsentatives Beispiel einer LOH- Analyse eines Patienten (Fall-Nr.: 18). Im Vergleich mit dem Blut dieses Patienten (obere Darstellung), ist bei der aus dem Meningeom gewonnen DNA ein Verlust des kürzeren Allels (135.1) des innerhalb des *NF2* Gens gelegenen Mikrosatellitenmarkers NF2CA3 festzustellen

3.4.2. Tabelle der Allelverluste in den Meningeomen der NF2 Patienten

Einen Überblick über den Chromosomenstatus und die gefundenen Allelverluste bei den NF2 Patienten gibt die Tabelle-8 wieder (folgende Seite).

Tabelle-8: Allelverluste bei den NF2 Patienten

Chromosomenarm (Allelstatus)

Fall Nr.	1p	6q	9p	10q	14q	17p	18q	19q	22q	Partielle Verluste ¹
1	H ²	LOH ³	H	H	H	LOH	H	H	LOH	17p (2/4) S804, S1176
2	LOH	LOH	LOH	H	H	H	LOH	H	LOH	9p (1/3) S168
3	H	H	LOH	H	H	H	H	H	LOH	
4.1	H	nu ⁴	H	H	nu	H	H	nu	LOH	
4.2	H	LOH	LOH	H	H	H	LOH	LOH	LOH	
5	LOH	H	H	H	LOH	H	H	H	LOH	
6	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
7.1	H	LOH	LOH	LOH	H	H	H	H	LOH	
7.2	H	H	H	LOH	H	LOH	LOH	H	LOH	17p (1/2)S1176
8	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
9.1	LOH	H	H	H	H	H	H	H	LOH	1p (1/2) S162
9.2	LOH	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
10.1	H	H	H	H	LOH	H	H	H	LOH	14q (1/3) S 81
10.2	LOH	LOH	H	LOH	LOH	H	H	H	LOH	10q (1/3) S209, 14q (1/3) S 81
10.3	LOH	LOH	H	H	LOH	H	H	H	LOH	1p (1/2) FGR, 14q (1/3) S 81
11	LOH	H	H	LOH	H	LOH	LOH	LOH	LOH	17p (1/3) S804
12.1	LOH	H	H	LOH	LOH	H	H	H	LOH	14q (1/2) S59
12.2	LOH	H	H	LOH	H	H	H	H	LOH	
12.3	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
13	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
14	LOH	H	H	LOH	LOH	H	LOH	H	LOH	1p (1/2) S162
15	H	H	LOH	H	H	H	LOH	H	LOH	
16	LOH	H	H	H	LOH	H	H	H	LOH	14q (1/4) S51
17	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
18	H	H	ni	LOH	H	H	H	H	LOH	
19.1	H	H	H	H	H	H	H	ni ⁵	LOH	
19.2	H	LOH	H	H	H	H	H	ni	LOH	
20	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
21	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	
22	LOH	H	H	H	H	H	LOH	H	LOH	18q (2/3) S57

¹ Partielle Verluste: Die Spalte gibt bei nicht vollständigem Verlust eines Chromosomenarmes an, wieviel und welche Mikrosatellitenprimer verloren sind

² H: Heterozygot: Es wurde kein Allelverlust gefunden

³ LOH: „loss of heterozygosity“ (Verlust des heterozygoten Zustandes), zeigte sich bei einem der informativen Mikrosatellitenprimer ein Allelverlust, so ist dies in der Tabelle als „LOH“ vermerkt

⁴ nu: nicht untersucht:

⁵ ni: nicht informativ: In den wenigen Fällen, in denen keiner der untersuchten Mikrosatellitenloci informativ war, das heißt bei Homozygotie im Blut bei allen untersuchten Markern, wurde dieser Zustand als nicht informativ in der Tabelle vermerkt. In diesen Fällen läßt sich keine Aussage über den Allelstatus des betroffenen Chromosomenarmes machen

3.4.3. Allelverluste bei NF2-assoziierten Meningeomen

3.4.3.1. Allelverluste bei den gesamten NF2-assoziierten Meningeomen

Durch die Mikrosatellitenanalyse konnte ein Allelverlust bei mindestens einem informativen Marker innerhalb oder in enger chromosomaler Nachbarschaft des *NF2* Gens, das auf dem Chromosomenabschnitt 22q12 lokalisiert ist, in allen 30 untersuchten Tumoren (100 % der Fälle) nachgewiesen werden. Nur bei sechs Tumoren fand sich kein weiterer kompletter oder partieller Chromosomenarmverlust neben der Deletion von Chromosomenabschnitten auf 22q. Am zweithäufigsten waren Allelverluste auf dem Chromosomenarm 1p. Hier war bei 12 der 30 untersuchten Meningeome (40 %) ein LOH festzustellen. Deletionen von Abschnitten des langen Arms von Chromosom 10 (10q) waren am dritthäufigsten und wurden bei 8 von 30 informativen Fällen (27 %) gefunden. Komplette oder partielle Verluste auf den Chromosomenarmen 14q und 6q konnten in 7 von 29 Meningeomen (24% der Fälle) detektiert werden und stellten die am nächst häufigsten beobachteten Allelverluste dar. Verluste auf 18q konnten bei 7 von 30 Tumoren (23% der Fälle) nachgewiesen werden, und auch LOHs auf 9p waren mit 17% (5 von 29 Tumoren) noch relativ häufig.

LOH auf 17p war ein seltenes Ereignis, das in 10 % der Fälle (3 von 30 untersuchten Meningeomen) detektiert wurde. Am seltensten war der Verlust von Chromosomenabschnitten auf 19q. Nur in 7% der Tumore (2 von 27) konnte hier ein Verlust festgestellt werden. Die Häufigkeit der verschiedenen Allelverluste ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

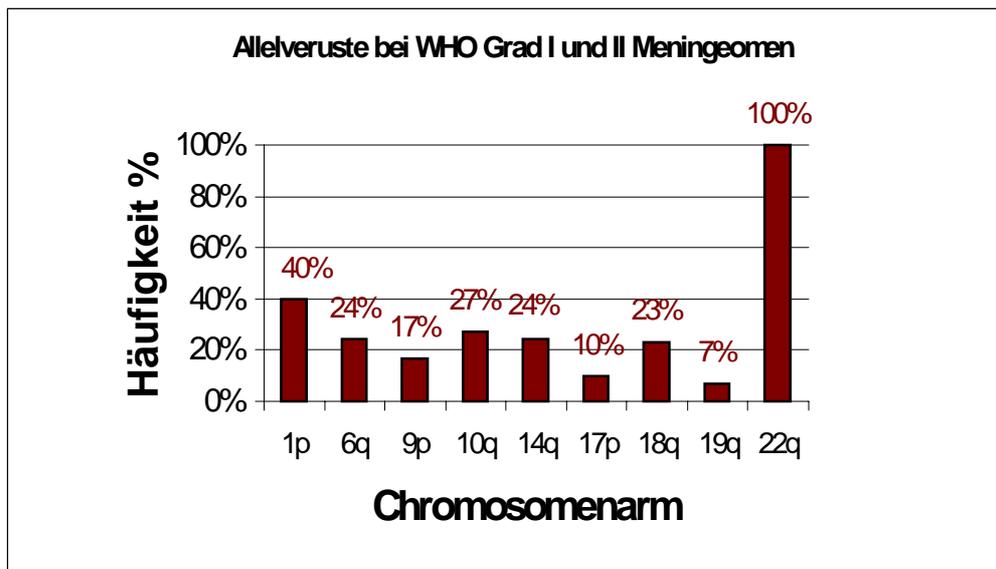


Abb.12. Prozentuale Häufigkeit der Allelverluste auf den verschiedenen untersuchten Chromosomenarmen bei 30 Meningeomen von allen 22 untersuchten NF2 Patienten.

3.4.3.2. Allelverluste bei atypischen und benignen NF2-assoziierten Meningeomen im Vergleich

Vergleicht man die prozentualen Häufigkeiten kompletter oder partieller Allelverluste von WHO Grad I und II Meningeomen, so wiesen die atypischen WHO Grad II Meningeome mehr Allelverluste auf, als die benignen WHO Grad I Meningeome. 41% der untersuchten Chromosomenabschnitte zeigten bei den atypischen Tumoren mindestens Deletionen von einem informativen Mikrosatellitenmarkerlokus, während nur 27% der benignen Tumore einen solchen Verlust aufwiesen. Dieser 14%ige Unterschied erreichte ein grenzwertiges Signifikanzniveau von $P = 0,051$. Einen Überblick über die unterschiedliche Aufteilung und Häufigkeit der Allelverluste zwischen atypischen WHO Grad II Meningeomen und benignen WHO Grad I Meningeomen gibt die Abb.13 wieder.

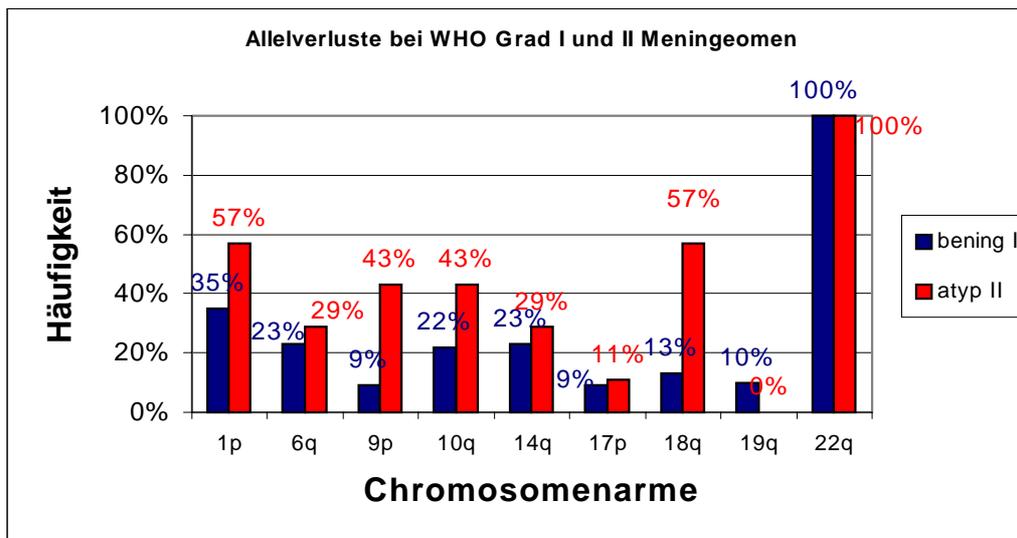


Abb.13. Prozentuale Häufigkeit mit der zumindest ein informativer Locus eines Chromosomenarmes bei den benignen oder atypischen Meningeomen verloren ist. Rot: Atypische WHO Grad II Meningeome, Blau: Benigne WHO Grad I Meningeome

Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) waren bei 57% der atypischen Tumore und bei 35% der benignen Tumore detektierbar. Diese Differenz von 22% ergab keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,549$). Deletionen auf 6q wurden bei beiden Malignitätsgraden mit fast der gleichen Häufigkeit beobachtet. 23% der WHO Grad I Tumore und 29% der WHO Grad II Tumore zeigten diesen statistisch nicht signifikant unterschiedlichen Verlust ($P = 0,855$). Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 (9p) fanden sich bei 43% der atypischen Meningeome aber nur bei 9% der benignen Meningeome. Diese Differenz von 34% ergab bei den gegebenen Gruppengrößen ein Signifikanzniveau von $P = 0,133$. Chromosomale Deletionen auf 10q wurden bei 43% der atypischen aber nur bei 22% der benignen Meningeome detektiert, diese Differenz war jedoch nicht signifikant ($P = 0,542$). Verluste von Chromosomenabschnitten auf 14q wurden bei beiden Malignitätsgraden ähnlich häufig beobachtet (23% benign, 29% atypisch) und waren statistisch nicht signifikant auf beide Gruppen verteilt ($P = 0,855$). Deletionen von Chromosomenmaterial auf 17p waren bei beiden Meningeomgraden ähnlich häufig (9% der benignen Tumore, 11% der atypischen Tumore) und ergaben statistisch keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,563$). In 57% der Fälle waren bei den atypischen Meningeomen Chromosomenabschnitte auf 18q verloren, aber nur in 13% der benignen Meningeome. Diese 44%ige Differenz ergab bei diesen Fallgrößen ein Signifikanzniveau von $P = 0,057$. Deletionen auf 19q fanden sich bei beiden Malignitätsgraden selten (10% benign, 0% atypisch) und ergaben statistisch keinen

signifikanten Unterschied ($P = 0,975$). Bei den benignen WHO Grad I Meningeomen, sowie bei den atypischen WHO Grad II Meningeomen konnten in 100% der Fälle Deletionen auf 22q detektiert werden.

3.4.3.3. Vergleich der Allelverlusthäufigkeit bei den Subtypen des benignen WHO Grad I Meningeoms

Von den benignen WHO Gruppe I Meningeomen waren vier Subtypen in dieser Studie repräsentiert (siehe 3.1.1). Diese Subtypen unterschieden sich nicht bezüglich der Gesamthäufigkeit von Allelverlusten. Bei der Summe der untersuchten Allelverlusten zeigten die vier transitionalen Meningeome, mit 33% Allelverlusten (12 Deletionen bei 36 untersuchten Chromosomenarmen) von zumindest einem für einen Chromosomenarm spezifischen Marker, die meisten Allelverluste. Die drei meningotheliomatösen Meningeome wiesen in 32% der Fälle (8 Deletionen bei 25 untersuchten Chromosomenabschnitten) Verluste auf. Bei den zehn fibrillären Meningeomen fanden sich 24% Allelverluste (22/90), und bei den sechs psammomatösen Meningeomen noch 22% Allelverluste (14/63). Weder bezüglich der Summe der Allelverluste noch für die einzelnen Chromosomenarme konnte, möglicherweise aufgrund z.T. sehr kleiner Fallzahlen, ein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der einzelnen Allelverluste festgestellt werden ($P = 0,761$), obwohl sich bei einigen Chromosomenarmen Unterschiede andeuteten. Die Häufigkeit der Allelverluste ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

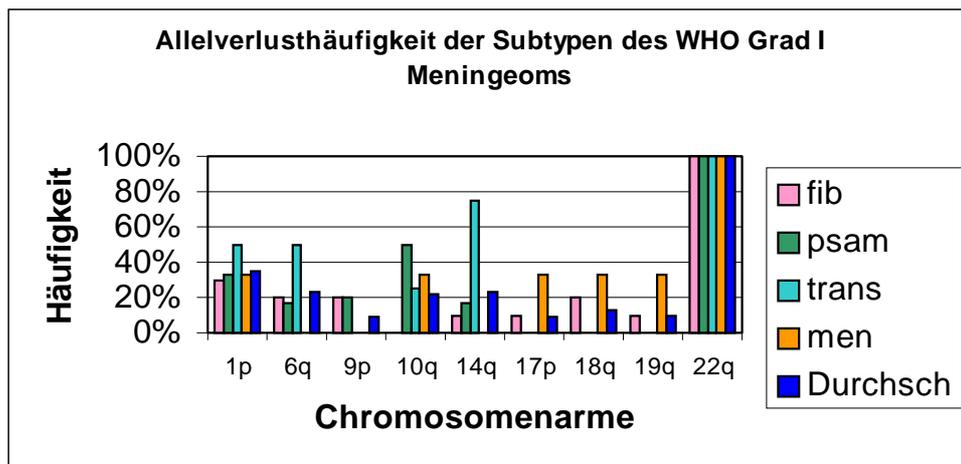


Abb.14. Prozentuale Häufigkeit mit der Allelverluste bei den einzelnen Meningeomsubtypen des benignen WHO Grad I Meningeoms aufgetreten sind. fib = fibrillär, psam = psammomatös, trans = transitional, men = meningotheliomatös, Durchsch = Durchschnittswert der benignen WHO Grad I Meningeome

3.4.2.4. Partielle Allelverluste

In vielen Fällen zeigten nicht alle für einen Chromosomenarm spezifischen Marker ein LOH des entsprechenden Chromosomenabschnittes, sondern es traten partielle Verluste auf. Häufig von partiellen Verlusten betroffen waren die Chromosomenarme 1p (3 Fälle), 14q (5 Fälle) und 17p (3 Fälle). Des weiteren zeigten sich partielle Verluste auf den Chromosomenarmen 9p, 10q und 18q (jeweils 1 Fall).

In den beiden Fällen 9.1 und 14, war auf dem Chromosomenarm 1p nur ein LOH D1S162 festzustellen, während FGR nicht informativ war und der D1S188 heterozygot war. In dem Fall-Nr. 10.3 zeigte sich bei FGR ein LOH, während D1S188 nicht informativ war, und D1S162 heterozygot war. Die Tabelle-9 gibt einen Überblick welche Loci in diesen Fällen informativ, heterozygot oder deletiert waren.

Tabelle-9: Partielle Allelverluste auf 1p:

FallNr.	FGR (1p36.2-p36.1)	DIS162 (1p36-pter)	DIS188 (1p21-13)
9.1	ni	LOH	H
10.3	LOH	H	ni
14	ni	LOH	H

H = Heterozygot, LOH = Loss Of Heterozygosity, ni = nicht informativ

Auf dem Chromosomenarm 14q konnte in allen drei Tumoren eines Patienten (Fall-Nr. 10.1 – 10.3) nur auf dem Chromosomenabschnitt D14S81 ein LOH festgestellt werden, D14S51 war in diesen Fällen nicht informativ. In dem Fall-Nr. 12.1 war D14S59 deletiert, während D14S80 heterozygot war und D14S59 nicht informativ war. Eine Untersuchung des Markers D14S81 konnte, aufgrund eines quantitativen DNA Mangels nicht durchgeführt werden. Bei dem Fall-Nr. 16 konnte ein LOH für D14S51 gefunden werden, während alle drei anderen Loci heterozygot waren. Die Tabelle-10 gibt einen Überblick welche Loci in diesen Fällen informativ, heterozygot oder deletiert waren.

Tabelle-10: Partielle Allelverluste auf 14q:

FallNr.	D14S80 (14q12)	D14S59 (14q23-q31)	D14S81 (14q31)	D14S51 (14q32.1-q32.2)
10.1	H	H	LOH	ni
10.2	H	H	LOH	ni
10.3	H	H	LOH	ni
12.1	H	LOH	nu	ni
16	H	H	H	LOH

H = Heterozygot, LOH = Loss Of Heterozygosity, ni = nicht informativ, nu = nicht untersucht, aufgrund eines quantitativen DNA Mangels

Alle Deletionen die 17p betrafen waren partiell und an unterschiedlichen Lokalisationen. In dem Fall-Nr. 1 waren die Loci D17S1176 und D17S804 deletiert, während D17S520 und D17S796 heterozygot waren. Bei dem Fall-Nr. 7.2 war nur D17S1176 deletiert. D17S804 war in diesem Fall heterozygot, und die anderen Loci nicht informativ. In einem dritten Fall 8 (Fall-Nr.11) fand sich ein LOH bei D17S804, während die Loci von D17S520 und D17S1176 heterozygot waren und D17S796 nicht informativ war. Die Tabelle-11 gibt einen Überblick welche Loci in diesen Fällen informativ, heterozygot oder deletiert waren.

Tabelle-11: Partielle Allelverluste auf 17p:

FallNr.	D17S796 (17p12-p13)	D17S1176 (17p13.1)	D17S804 (17p13-p11.2)	D17S520 (17p12)
1	H	LOH	LOH	H
7.2	ni	LOH	H	ni
11	ni	H	LOH	H

H = Heterozygot, LOH = Loss Of Heterozygosity, ni = nicht informativ

In folgenden Fällen fanden sich weitere partielle Allelverluste:

Auf 9p fand sich bei Fall-Nr. 2 ein LOH bei dem Chromosomenabschnitt D9S168, während die anderen beiden Loci für diesen Chromosomenarm heterozygot waren.

Auf 10q zeigte Fall-Nr. 10.2 ein LOH bei D10S209, während hier ebenfalls die anderen beiden Loci (D10S169 und D10S187) heterozygot waren.

Bei dem Fall-Nr. 22 war der Chromosomenabschnitt D18S57 deletiert, während die anderen beiden Loci (D18S61 und D18S69) heterozygot waren.

5. Zusammenfassung

Mehr als 50% der NF2 Patienten entwickeln in ihrem Leben Meningeome. Kürzlich wurde eine erhöhte proliferative Aktivität, mehr Mitosen und eine vermehrte Kernpleomorphie bei NF2-assoziierten Meningeomen verglichen mit sporadischen Meningeomen beschrieben. Um festzustellen, ob diese histologischen Unterschiede genetische Unterschiede reflektieren, haben wir 30 Meningeome von 22 NF2 Patienten auf komplette oder partielle Allelverluste von Chromosomenarmen, die häufig bei sporadischen Meningeomen von Deletionen betroffen sind untersucht. Zusätzlich bestimmten wir die proliferative Aktivität der Tumore und untersuchten die *NF2* Keimbahnmutationen. 23 der untersuchten Meningeome waren WHO Grad I (9 fibrillär, 6 psammomatös, 4 transitional, 3 meningotheliomatös) und 7 WHO Grad II. Der durchschnittliche Mib-1 Index betrug: Mib-1 10GF: 1.60 ± 0.85 ; Mib-1 3GF: 4.99 ± 3.88 (WHO Grad I: 10GF: 1.41 ± 0.80 ; 3GF: 3.68 ± 2.37 , WHO Grad II: 10GF: 2.13 ± 0.82 ; 3GF: 8.05 ± 5.57). Trotz der relativ großen Proportion von atypischen Meningeomen (23%) konnten wir keine erhöhte proliferative Aktivität bei NF2-assoziierten Meningeomen verglichen mit großen Studien von sporadischen Meningeomen feststellen. *NF2* Genmutationen konnten in 8 von 15 analysierten Patienten nachgewiesen werden und waren in den Exons 2 (3×), 5, 6, 7 (2×) und 8 lokalisiert. Verlust des heterozygoten Zustandes „loss of heterozygosity“ (LOH) in oder um das *NF2* Gen auf 22q12 wurde bei allen Tumoren beobachtet. LOH 1p war die zweit häufigste chromosomale Abnormalität (40%), gefolgt von Verlusten auf 10q (27%), 6q und 14q (24%), 18q (23%), 9p (17%). Deletionen auf 17p und 19q, die bei sporadischen Meningeomen selten sind, wurden bei den NF2-assoziierten Meningeomen ebenfalls kaum beobachtet. Zusammenfassend zeigt sich, daß sporadische und NF2-assoziierte Meningeome ein ähnliches Spektrum und eine ähnliche Häufigkeitsverteilung von Allelverlusten aufweisen, sowie, und dies im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, eine ähnliche proliferative Aktivität.

6. Literatur

1. Antinheimo J, Haapasalo H, Haltia M, et al.: Proliferation potential and histological features in neurofibromatosis 2-associated and sporadic Meningeomas. *J Neurosurg*; 87: 610-614, 1997
2. Barker D, Wright E, Nguyen K, et al: Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosom 17. *Science*; 236: 1100-1102, 1992
3. Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquéro J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA: Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer*; 9: 296-298, 1994
4. Bello MJ, Leone PE, Nebrada P, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Garcia-Miguel P, et al.: Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the nervous system. *Cancer Genet Cytogenet*; 83: 160-164, 1995
5. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA: Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer*; 64: 207-210, 1996
6. Bernards A, Gusella JF: The importance of genetic mosaicism in human disease. *N Engl J Med*; 331: 1447-1449, 1994
7. Bijlma EK, Wallace AF, Evans DGR: Misleading linkage results in an NF2 presymptomatic test owing to mosaicism. *J Med Genet*; 34: 934-936, 1997
8. Boström J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G: Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of Glioblastomas but not in Meningeomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res*; 58: 29-33, 1998
9. Boström J, Mühlbauer A, Reifenberger G: Deletion mapping of the short arm of chromosom 1 identifies a common region of deletion distal to D1S496 in human meningiomas. *Acta Neuropathol*; 94: 479-485, 1997
10. Bourn D, Carter SA, Evans DGR, et al: A mutation in the neurofibromatosis 2 tumor-suppressor gene, giving rise to widely different clinical phenotypes in two unrelated individuals. *Am J Hum Genet*; 55: 69-73, 1994

11. Carlson KM, Bruder C, Nordenskjöld, Dumanski JP: 1p and 3p deletions in Meningeomas without detectable aberrations of chromosom 22 identified by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer*; 20: 419-424, 1997
12. Deen HG, Scheithauer BW, Ebersold MJ: Clinical and pathological study of meningiomas of the first two decades of life. *J Neurosurg*; 56: 317-322, 1982
13. DeVitis LR, Tedde A, Vitelli F, et al.: Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene in sporadic Meningeomas. *Hum Genet*; 97, 632-637, 1996
14. Doney MKHT, Soukoup SW, Rutter JL, Gusella JF, Schneider BF, Gondel WL, Menon AG: Identification of a putative tumor suppressor lokus in 14q24-32 that is involved in formation and progression of meningiomas. *Am J Hum Genet*; 53: 293, 1993
15. Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP, Nordenskjöld M: Deletion mapping of a locus on human chromosom 22 involved in the oncogenese of Meningeoma. *Proc Natl Acad Sci, USA*; 84: 9275-9279, 1987
16. Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjöld M, Collins VP: Molecular genetic analysis of chromosom 22 in 81 cases of Meningeoma. *Cancer Res*; 50: 5863-7, 1990
17. Eagle LR, Yin X, Brothman AR, Williams BJ, Atkin NB, Prochownik EV: Mutations of the MXI1 gene in prostate cancer. *Nat Genet*; 9: 249-255, 1995
18. Ellison DW, Lunec J, Gallagher PJ, Steart PV, Jaros E, Gatter KC: Accumulation of wild-type p53 in meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 21: 136-142, 1995
19. Evans DGR, Huson SM, Donnai D, et al.: A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med.*; 84: 603-618, 1992
20. Evans DGR, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Theare D, Newton V, Strachan T, Ramesden R and Harris R: A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the north west of England and the UK: prevalence, mutation rates, fitness and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet*; 29: 841-846, 1992
21. Evans DGR, Trueman L, Wallace A, Collins S, Strachan T: Genotype/phenotype correlations in type 2 neurofibromatosis (NF2): evidence for more severe disease associated with truncating mutations. *J Med Genet*; 35: 450-455, 1997

22. Griffin CA, Hruban RH, Long PP, Miller N, et al.: Chromosome abnormalities in meningeal neoplasms: do they correlate with Histology? *Cancer Genet Cytogenet*; 78: 46-52, 1994
23. Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB: Neurofibromatosis 2: loss of merlins protective spell. *Curr Opin Genet Dev*; 6: 87-92, 1996
24. Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyertz RE, Rubenstein A, Viskochil D: The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *J Am Med Assoc*; 278: 51-57, 1997
25. Jacoby LB, MacCollin M, Louis DN, Mohny T, Rubio M-P, Pulaski K, Trofatter JA, Kley N, Seizinger B, et al.: Exon scanning for mutations of the *NF2* gene in schwannomas. *Hum Mol Genet*; 3: 413-419, 1994
26. Jiménez-Lara AM, Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Vasquéro J, Kusak ME and Pestana A: Cytogenetics of human meningiomas: an analysis of 125 cases. *Cancer Genet Cytogenet*; 63: 174, 1992
27. Joseph JT, Lisle DK, Jacoby LB, Paulus W, Barone R, Cohen ML, Roggendorf WH, Brunner JM, Gusella JF, Louis DN: *NF2* gene analysis distinguishes hemangiopericytoma from meningioma. *Am J Pathol*; 147: 1450-1455, 1995
28. Kamp A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu y, et al.: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*; 264: 436-440, 1994
29. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T: Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with Mib 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol*; 87: 47-54, 1994
30. Karamitopoulou E, Perentes E, Tolnay M, Probst A: Prognostic significance of Mib-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Hum Pathol*; 29:140-145, 1998
31. Kepes JJ: Meningeomas: Biology, Pathology, Differential Diagnosis. Masson. New York, 1982
32. Khan J, Parsa NZ, Harada T, Meltzer PS and Carter NP: Detections of gains and losses in 18 meningiomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*; 103: 95-100, 1998
33. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: Histological typing of tumors of the central nervous system. ed 2. New York: Springer Verlag; pp33-42, 1993

34. Kleihus P, Cavenee WK: Pathology and genetics of tumors of the nervous system. ed 3, Lyon: IARC Press, 2000
35. Kluwe L, Bayer S, Baser ME, Hazim W, Haase W, Fünsterer C, Mautner VF: Identifikation of NF2 germ-line mutations and comparison with neurofibromatosis 2 phenotypes. Hum Genet; 98: 534-538, 1996
36. Kluwe L, MacCollin M, Tatagiba M, Thomas S, Hazim W, Haase W, Mautner VF: Phenotypic variability associated with 14 splice-site mutations in the *NF2* gene. Am J Med Genetics; 77: 228-233, 1998
37. Kluwe L, Mautner VF: Mosaicism in sporadic neurofibromatosis 2 patients. Hum Molec Genet; 7: 2051-2055, 1998
38. Kluwe L, Pulst SM, Köppen J, Mautner VF: A 163-bp deletion at the C-terminus of the schwannomin gene associated with variable phenotypes of neurofibromatosis type 2. Hum Genet; 95: 443-446, 1995
39. Knudson AG: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA; 68: 820-823, 1971
40. Kolles H, Niedermayer I, Schmitt Ch, Henn W, Feld R, Steudel WI, Zang KD, Feiden W: Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. Acta Neurochir; 137: 174-181, 1995
41. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A: Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastro-cytoma. J Neuropathol Exp Neurol; 54: 91-95, 1995
42. Kujas M: Meningeoma. Curr Opin Neurol; 6: 882-887, 1993
43. 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 aggressive Meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. Cancer Genet Cytogenet; 110: 103-110, 1999
44. Lamszus K, Vahldiek F, Mautner VF, Schichor C, Tonn J, Stavrou D, Fillbrandt R, Westphal M, Kluwe L: Allelic losses in Neurofibromatosis 2-Associated Meningiomas. J Neuropathol Exp Neurol; 59: 504-512, 2000
45. Langford LA: Pathologie of Meningiomas. J Neuro-Onc; 29: 217-221, 1996
46. Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, et al.: Reduced expression of schwannomin / merlin in human sporadic Meningiomas. Neurosurg; 40: 1-10, 1997

47. Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, et al.: Frequent *NF2* gene transcript mutations in sporadic Meningeomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet*; 54: 1022-1029, 1994
48. Lekanne Deprez RH, Groen NA, van Biezen NA, et al.: A t(4:22) in a Meningeoma points to the localisation of a putative tumorsuppressorgene. *Am J Hum Gen*; 48: 783-90, 1991
49. Lekanne Deprez RH, Riegman PH, van Drunen E, et al.: Cytogenetic, molecular genetic and pathological analysis in 126 Meningeomas. *J Neuropath Exp Neur*; 54: 224-235, 1995
50. Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA: *NF2* gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene*; 18: 2231-2239, 1999
51. Longstreth WT, Dennis LK, McGuire VM, et al.: Epidemiology of intracranial Meningeoma. *Cancer*; 72: 639-648, 1993
52. Louis DN, Ramesh V, Gusella JF: Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatose 2 and related tumors. *Brain Path*; 5: 163-172, 1995
53. Lutchman M, Rouleau GA: Neurofibromatosis type 2: a new mechanism of tumor suppression. *Trends Neurosci*; 19: 373-377, 1996
54. MacCollin M, Ramesh V, Jacoby LB, Louis DN, Rubio MP, Pulaski K, Trofatter JA, et al.: Mutational analysis of patients with neurofibromatosis 2. *Am J Hum Genet*; 55: 314-320, 1994
55. Mahmood A, Caccamo DV, Tomecek FJ, Malik GM: Atypical and malignant meningiomas: a clinicopathological review. *Neurosurgery*; 33: 955-963, 1993
56. Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H: Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg*; 77: 616-623, 1992
57. Maier H, Wanschitz J, Sedivy R, Rösslert K, Öfner D, Budka H: Proliferation and DNA fragmentation in meningioma subtypes. *Neuropath Applied Neurobiology*; 23: 496-506, 1997
58. Martuza RL, Eldridge R, et al.: Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *N Engl J Med*; 318: 684-688, 1988
59. Mashiyama S, Murakami Y, Yoshimoto T, Sekiya T, Hayashi K: Deletion of p53 gene mutations in human brain tumors by single-stand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*; 6: 1313-1318, 1991

60. Mautner VF, Lindenau M, Baser ME, et al.: The neuroimaging and clinical spectrum of neurofibromatosis 2. *J Neurosurg*; 38: 880- 886, 1996
61. Mautner VF, Tatagiba M, Guthoff R, Samii M, Pulst SM: Neurofibromatosis in the pediatric age group. *Neurosurgery*; 33:92-96, 1993
62. McLendon RE, Tien RD: Genetic syndroms associated with tumors and/or hamartomas. In: Bigner DD, McLendon RE, Brunner JM, eds. *Russel and Rubinstein's pathology of tumors of the nervous system.*, 6th edition. London; Arnold: 371-418, 1998
63. Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, et al.: Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *proc Natl Acad Sci*; 87: 5435-4439, 1992
64. Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld a, et al.: Frequent loss of chromosom 14 in atypical and malignant Meningeoma: identification of a putative „tumor progression“ locus. *Oncogene*; 14: 611-616, 1997
65. Mérel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, et al.: Screening for germline mutations in the *NF2* gene. *Genes Chromosomes Cancer*; 12: 117-127, 1995
66. Mérel, Hoang-Xuan K, Sanson M, et al.: Predominant occurence of somatic mutations of the *NF2* Gene in Meningiomas and Schwannomas. *Genes Chromosomes and Cancer*; 13: 211-216, 1995
67. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheuerlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Proustka A: DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors. *Nat Genet*; 17: 32-39, 1997
68. Nakasu S, Nakajima M, Matsamura K, Nakasu Y, Handa J: Meningioma: proliferating potential and clinicoradiological features. *Neurosurg*; 37: 1049-1055, 1995
69. National Institute of Health Consensus Development Conference: Neurofibromatosis. *Arch Neurol*; 45: 575-578, 1998
70. Ng H, Lau K, Tse JYM, Lo K, Wong JHC, Poon W, et al.: Combined molecular genetic studies of chromosome 22q and the neurofibromatosis type 2 gene in central nervous system tumors. *Neurosurg*; 37: 764-773, 1995
71. Nobori T, Milura K, Wu DJ, Lois A, et al.: Deletions of the cyclin-dependant kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*; 368: 753-756, 1994
72. Nowell PC: Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*; 46:2203-2207, 1986

73. Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reicel MR, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Höll T, et al.: mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinogen*; 8: 74-80, 1993
74. Ohkoudo M, Sawa H, Shiina Y, Sato H, Kamata K, Iijima J, et al.: Morphometrical analysis of nucleolin immunohistochemistry in meningiomas. *Acta Neuropathol*; 92: 1-7, 1996
75. Papi L, DeVitis LR, Vitelli F, ammannati F, Mennonna P, Montali E, Bigozzi U: Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic Meningeomas. *Hum Genet*; 95: 347-351, 1995
76. Parry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM: Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol*; 12: 1455-65, 1997
77. Parry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM: The prognostic significance of Mib-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. *Cancer*; 82: 2262-69, 1998
78. Parry DM, Eldridge R, Kaiser-Kupfer MI, et al.: Neurofibromatosis 2 (NF2): clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet*; 52: 450-461, 1994
79. Parry DM, MacCollin M, Kaiser-Kupfer MI, Pulaski K, Nicholson HS, Bolesta M, Eldridge R, Gusella, JF: Germ-line mutations in the neurofibromatosis 2 gene: correlation with disease severity and retinal abnormalities. *Am J Hum Genet*; 59: 529-539, 1996
80. Peters N, Wellenreuter R, Rollbrocker B, Hayashi Y, Meyer-Puttlitz B, Duerr EM, Lenartz D, Marsh DJ, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A: analysis of the PTEN gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 24: 3-8, 1998
81. Peyrard M, Fransson I, Xie YG, Han FY, Ruttledge MH, Swahns S, Collins JE, Dunham I, Collins VP, Dumanski JP: Characterization of a new member of β -adaplin gene family from chromosom 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum Mol Genet*; 3: 1393-1399, 1994
82. Prayson RA: Malignant meningioma: a clinicopathologic study of 23 patients including Mib 1 and p53 immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*; 105: 719-726, 1996

83. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP: Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol*; 145: 1175-1190, 1994
84. Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML: Loss of heterozygosity on chromosome 10 is associated with morphologically malignant Meningeoma progression. *Cancer Res*; 53: 2386-2392, 1993
85. Rohringer M, Sutherland GR, Louw DF, Sima AAF: Incidence and clinicopathological features of Meningeoma. *J Neurosurg*; 71: 665-672, 1989
86. Rouleau G, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, et al.: Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organising protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature*; 363: 515-521, 1993
87. Rutledge MH, Andermann AA, Phelan CM, et al.: Type of mutation in the neurofibromatosis 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease. *Am J Hum Genet*; 59: 331-342, 1996
88. Rutledge MH, Sarazin J, Rangaratnam S, et al.: Evidence of complete inactivation of the *NF2* gene
89. Rutledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP: Deletions on chromosome 22 in sporadic Meningeoma. *Genes Chromosomes Cancer*; 10: 122-130, 1994
90. Sainz J, Huynh DP, Figueroa K, Baser ME, Pulst SM: Mutations of the neurofibromatosis type 2 gene and lack of the gene product in vestibular schwannomas. *Hum Mol Genet*; 3:885-891, 1994
91. Sanson M, Richard S, Delattre O, Thomas G, et al.: Allelic loss on chromosome 22 correlates with histopathological predictors of recurrence of Meningeomas. *Int J Cancer*; in the majority of sporadic Meningeoma. *Nat Genet*; 6: 180-184, 1994 50: 391-394, 1992
92. Schneider BF, Shashi V, von Kap-herr C, Golden WL: Loss of chromosomes 22 and 14 in the malignant progression of Meningeomas. *Cancer Genet Cytogenet*; 85: 101-104, 1995
93. Seizinger BR, De La Monte S, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL: Molecular genetic approach to human Meningeoma: Loss of genes on chromosome 22. *Med Science*; 84: 5419-5423, 1987
94. Seizinger BR, Martuza RL, Gusella JF: Losses of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature*; 322: 644-647, 1986

95. Short MP, Martuza RL, Huson SM, et al.: Neurofibromatosis 2: clinical features, genetic counselling and management issues. Huson SM, Hughes RAC, (eds), The neurofibromatosis: a Pathogenetic and clinical overview. pp 414-444 Chapman & Hall Medical, London, 1994
96. Simon M, Kokkino AJ, Warnick RE, Tew Jr JM, von Deimling A, Menon AG: Role of genomic instability in Meningeoma progression. *Genes Chromosomes Cancer*; 16: 265-269, 1996
97. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, et al.: Allelic losses on chromosom 14,10 and 1 in atypical and mlignant Meningeomas: agenetic model of Meningeoma progression. *Cancer Res*; 55: 4696-4701, 1995
98. Sulman EP, Dumanski JP, White, PS, Zhao H, Maris JM, Mathiesen T, Bruder C, Cnaan A, Brodeur GM: Identification of a consistent region of allelic loss on 1p32 in Meningeomas: correlation with increased morbidity. *Cancer Res*; 58: 3226-3230, 1998
99. Trofatter JA, Mac Collin MM, Rutter JL, Murrell RR, Duyao MP, et al.: A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*; 72: 1-20, 1993
100. Tse JYM, Ho-Keung NG, Kin-Mang Lau, et al.: Loss of heterozygosity of chromosom 14q in low- and high-grade Meningeomas. *Hum Patho*; 28: 779-785, 1997
101. 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*; 52: 4277-4279, 1992
102. Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, et al.: Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic Meningeomas: Toward a genetic model of Meningeoma progression. *Med Sci*; 94: 14719-14724,1997
103. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, et al.: Analysis of the neurofibromatose 2 gene reveals molecular variants of Meningeoma. *Am J Patho*; 146: 827-832, 1995
104. Westphal M, Hänsel M, Kunzmann R, Hölzel F, Hermann HD: Specturm of karyotypic aberations in cultured human Meningeomas. *Cytogenetics Cell Genetics*; 52: 45-49, 1989

105. Westphal M, Hermann HD: Tumoren. In: Kunze K (Hrsg.) Lehrbuch der Neurologie, Thieme, Stuttgart: 479-499, 1992
106. Zang KD, Singer H: Chromosomal constitution of Meningeomas. Nature; 216: 84-85, 1967

7. 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 besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Westphal für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie der Arbeitsmöglichkeiten im Labor für Hirntumorbiologie.

Ganz ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Dr. K. Lamszus für die engagierte wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der praktischen Erstellung dieser Arbeit bedanken. Auch für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die hilfreichen Ratschläge bin ich sehr dankbar.

Bei Frau Dr. rer. nat. L. Kluwe möchte ich mich vielmals für die Arbeit am GenScan Gerät und Ihre vielen hilfreichen Tips bedanken.

Im Labor für Hirntumorbiologie möchte ich mich bei Frau Hildegard Meissmer für die freundliche Einarbeitung in die Methodik der Molekularbiologie und Frau Regina Fillbrandt für die freundliche Hilfe bei den praktischen Durchführungen bedanken. Ferner möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Labors für die erhaltene nette Hilfe bedanken.

Mein Dank gilt auch Anke Nachtigahl für Ihre Tips am Computer und den Beistand in den letzten Jahren.

Herzlich Danken möchte ich meinen Eltern für Ihre lebenslange Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kai-Felix Vahldiek
Geburtsdatum: 22.12.1973
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig
Mutter: Ingrid Vahldiek, geb. Volk, Steuerberaterin
Vater: Dr. Georg Vahldiek, Radiologe

Schulbildung:

1980 - 1984 Grundschule Alt-Rahlstedt, Hamburg
1984 - 1990 Gymnasium Tonndorf, Hamburg
1990 - 1991 Albermarle High School, Charlottesville, VA, USA
USA High-School-Graduation
1991 - 1993 Gymnasium Tonndorf, Hamburg
Schulabschluß: *Allgemeine Hochschulreife*

- Leistungsfächer: Englisch, Deutsch
- Prüfungsfächer: Physik, Gemeinschaftskunde

Universitätsausbildung:

1994 - 2001 Universität Hamburg, Fachbereich Humanmedizin

- September 1996 Beendigung des Vorklinikums, *Physikum*
- Juni 1997 Basic Medical Science Examination,
Amerikanisches Staatsexamen Teil 1
- August 1997 Abschluß des ersten klinischen Abschnittes,
Erstes Staatsexamen
- April 2000 Abschluß des zweiten klinischen Abschnittes,
Zweites Staatsexamen
- Oktober 2000 Clinical Science Examination,
Amerikanisches Staatsexamen Teil 2
- Mai 2001 Abschluß des dritten klinischen Abschnittes,
Drittes Staatsexamen

PJ Tertiale April 2000 bis März 2001:

- Internistisches Tertial im Israelitischem Krankenhaus, Hamburg
- Neurologisches Tertial in der Neurologie des Allgemeinen Krankenhauses Barmbek, Hamburg
- Chirurgisches Tertial (erste Hälfte) im Marienkrankenhaus, Hamburg (Unfallchirurgie)
- Chirurgisches Tertial (zweite Hälfte) im Krankenhaus Alte Eichen, Hamburg (Allgemeinchirurgie)

9. 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, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

10. Publikationen

Große Teile der Dissertation sind veröffentlicht in:

Lamszus K, Vahldiek F, Mautner VF, Schichor C, Tonn J, Stavrou D, Fillbrandt R, Westphal M, Kluwe L: Allelic losses in Neurofibromatosis 2-Associated Meningeomas. *J Neuropathol Exp Neurol*; 59: 504-512, 2000