

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Institut für Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Immunhistochemische, genetische und biochemische
Untersuchungen zur Expression von c-Kit in
Meningeomen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

unter der Leitung von Prof. Dr. med. Markus Glatzel

vorgelegt von

Alina Boberg aus Oldenburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 18.07.2011

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. M. Glatzel

Prüfungsausschuss: 2.Gutachter: PD Dr. T. Magnus

Prüfungsausschuss: 3.Gutachterin: Prof. Dr. C. Hagel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1. Meningeome	6
1.1.1 Definition und Vorkommen	6
1.1.2 Ätiologie und molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen	7
1.1.3 WHO-Klassifikation und histopathologische Subtypen von Meningeomen	8
1.1.4 Meningeome - Klinik	10
1.1.5 Meningeome - Therapie	10
1.2 c-Kit - eine transmembrane Tyrosinkinase	12
1.2.1. Definition und Funktion.....	12
1.2.2 Die molekulare Struktur von c-Kit	13
1.2.3 c-Kit und seine pathologische Bedeutung.....	14
1.3 GIST - Antitumorale Therapie.....	16
1.4 MCTS - Multizelluläre Tumorsphäroide	17
1.4.1 MCTS - Aufgaben und Anwendung in der Tumorforschung.....	17
1.5 Fragestellung und Ziel der Untersuchungen	18
2 Materialien und Methoden.....	19
2.1 Labormaterialien und Chemikalien.....	19
2.2 Selektion der Patienten	23
2.2.1 Selektion der Patienten für die Immunhistochemie	23
2.2.2 Selektion der Patienten zur biochemischen Untersuchung von Meningeomen mittels Western Blot	23
2.2.3 Selektion der Patienten zur Sphäroidkultivierung von Meningeomen	24
2.2.4 Selektion der Patienten zur genetischen Untersuchung von Meningeomen.....	24
2.3 Herstellung histologischer Präparate	26
2.4 Western Blot - biochemische Analyse von Meningeomen.....	27
2.4.1 Vorbereitung der Proben.....	27

2.4.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	28
2.4.3 Blotten und Detektion	30
2.5 Untersuchung der Expression von c-Kit anhand von Sphäroid Modellen.....	32
2.5.1 Sphäroidkultivierung.....	32
2.5.2 Western Blot - biochemische Analyse	32
2.5.3 Vorbereitung der Proben.....	32
2.6 Genetische Untersuchungen von Meningeomen - DNA Sequenzierung.....	34
2.6.1 PCR - Mutationsanalyse des c-Kit Gens.....	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Ergebnisse der IHC für c-Kit in Meningeomen.....	36
3.2 Ergebnisse der Western Blots	40
3.2.1 Expression von c-Kit in Meningeomen	40
3.2.2 Expression von c-Kit in Meningeomsphäroiden.....	41
3.3 Ergebnisse der DNA Sequenzierung	43
4 Diskussion.....	44
5 Zusammenfassung.....	50
6 Literaturverzeichnis	51
7 Abkürzungen.....	61
8 Danksagung.....	64
9 Lebenslauf.....	65
10 Erklärung.....	66

1 Einleitung

Basierend auf den Erkenntnissen einer aktuellen Arbeit aus dem Institut der Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, in der Biomarker zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen untersucht worden sind, soll diese Arbeit anknüpfen. Da wir in vorhergehenden Untersuchungen eine hohe Positivität (84% aller untersuchten Meningeome) der Expression von c-Kit in immunhistologischen Färbungen feststellen konnten, soll die Expression von c-Kit in Meningeomen zusätzlich genetisch und biochemisch untersucht werden. C-Kit ist eine transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase aus der Familie der PDGF (platelet-derived growth factor)- und CSF-1 (colony stimulating factor-1)-Rezeptoren und ist als Proto-Onkogen wirksam [Qui et al. 1988].

In unseren Untersuchungen galt es nun zu klären, ob die c-Kit Expression in Meningeomen, welche immunhistochemisch im Tissue Micro Array-Format nachgewiesen wurden [Kreher 2008], auch auf Großschnitten von Meningeomen nachvollziehbar ist. Weiterhin wurde die c-Kit Expression biochemisch untersucht und untersucht, ob spezifische c-Kit Mutationen vorliegen.

1.1. Meningeome

1.1.1 Definition und Vorkommen

Meningeome (Hirnhauttumore) sind die häufigsten gutartigen Tumore neuroektodermaler Herkunft. Sie leiten sich von den Deckzellen der weichen Hirn- und Rückenmarkshäute, dem sog. Meningothel und Arachnothel, ab. Sie liegen der Dura mater, der harten Hirnhaut, an und wachsen verdrängend.

Meningeome gehören zu den häufigsten Tumoren des zentralen Nervensystems im Erwachsenenalter [Burger et al. 1994, Kujas 1993] und machen etwa 20-30% der zur histologischen Untersuchung eingesandten Tumorresektate von Neurochirurgischen Kliniken aus.

Die Inzidenz von Meningeomen liegt bei etwa 6 auf 100.000 Einwohner pro Jahr. Am häufigsten kommen Meningeome im höheren Alter, zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr vor. Selten jedoch können Meningeome auch bei Kindern beobachtet werden [Kleihues et al. 2000]. Insgesamt sind Frauen etwa dreimal häufiger betroffen als Männer. In einer 10-Jahres Serie von 679 Fällen des UK Hamburg Eppendorf beträgt die Ratio 2,9:1. In unselektierten Autopsieserien haben 6,2% der Frauen über 80 Jahre ein Meningeom.

Die intrakraniellen Meningeome nehmen ihren Ursprung am häufigsten parasagittal bzw. im Bereich der Falx (ca.30%), an der Konvexität (ca.20%), am Keilbeinflügel (18%) und in der Olfaktoriusrinne (9%). Weitere Lokalisationen sind Tentorium, Sellaregion und der kraniozervikale Übergang. Optikusscheidenmeningeome und Ventrikelmeningeome kommen selten vor. Neben der Einteilung der parasagittalen Meningeome in 6 verschiedene Typen ist deren Einteilung in sagittaler Richtung wichtig. Am häufigsten kommen Meningeome im mittleren Sinusdrittel, in unmittelbarer Nähe der Zentralregion, vor [Schlegel et al. 2009]. Intraspinale Meningeome finden sich gehäuft im thorakalen Bereich und machen etwa 12% aller Meningeome aus. Meningeome infiltrieren überwiegend anliegende Abschnitte der Dura mater und nur selten das angrenzende Gehirn.

Neben den benignen Meningeomen treten in einigen Fällen auch maligne Formen auf, die sogenannten anaplastischen Meningeome. Bei dieser Form werden auch Fernmetastasen beobachtet [Graham et al. 1997, Ironside et al. 2002, Kleihues 2000]. Zusätzlich gibt es eine Zwischenform, welche sich durch schnelleres Wachstum von den benignen Formen unterscheidet. Diese als intermediär oder als atypisch

bezeichneten Meningeome zeigen nach operativer Entfernung ein hohes Potential zur raschen Ausbildung von Lokalrezidiven [Scheithauer 1990].

1.1.2 Ätiologie und molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen

Gene können aktiv an der Entstehung bzw. an der Progression eines Tumors beteiligt sein. Diese als Onkogene bezeichneten Gene entstehen durch Mutationen oder Fehlregulation aus sogenannten Protoonkogenen und wurden zuerst in Retroviren gefunden. Weiterhin führt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, auch Antionkogene genannt, zu unkontrolliertem Zellwachstum. Ihre physiologische Funktion liegt in der Regulierung von Zellwachstum und Differenzierung. Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle in der Unterdrückung unkontrollierter Zellproliferation. Meningeome entstehen meist spontan. Selten kann auch eine familiäre Disposition beobachtet werden. In beiden Fällen können genetische Veränderungen nachgewiesen werden [Kleihues 2000]. Molekulargenetisch zeigen die Hälfte aller Meningeome Mutationen im erblichen Neurofibromatose 2 (NF2) Tumorsuppressorgen auf 22q12 [Schlegel et al. 2009]. Auch die Gruppe um Simon konnte diese Erkenntnis in Ihren Untersuchungen bestätigen [Simon et al. 2007]. Wellenreuther et al. entdeckten hingegen in ihren Untersuchungen, dass die Mutation oder Deletion von NF2 besonders häufig (mehr als 70%) bei höhergradigen Meningeomen, WHO II und III, auftritt. Bei den WHO I Meningeomen fanden sie diese jedoch nur in 25% der Fälle [Wellenreuther et al. 1995].

Der Verlust eines Chromosoms 22q [Collins et al. 1990, Zang et al. 1967] gehört zu den typischen zytogenetischen Veränderungen bei spontan entstandenen Meningeomen. Die Monosomie 22 oder Teildeletion eines Chromosoms 22 (LOH, loss of heterogosity) ist die häufigste genetische Anomalie bei Meningeomen und wurde in den letzten Jahren in zytogenetischen Untersuchungen bestätigt. Molekulargenetische Untersuchungen mit polymorphen DNA-Markern entdeckten in Übereinstimmung mit den vorhergehenden zytogenetischen Studien Deletionen des langen Arms von Chromosom 22 in mehr als 60% aller Meningeome [Seizinger et al. 1987, Meese et al. 1987, Dumanski et al. 1990]. Eine weitere Studie identifizierte bei 12 Meningeomen zwar in der Hälfte der Fälle eine LOH, allerdings lag bei diesen Meningeomen keine

NF2 Mutation vor [Lamszus 2004]. Von diesen Chromosom 22-Veränderungen sind benigne Tumorvarianten ebenso betroffen wie maligne, eine Korrelation mit Tumorprogression ist nicht erkennbar.

In niedriggradigen Meningeomen wurden selten Mutationen im PTCH Gen beschrieben [Xie et al. 1997]. Atypische und anaplastische Meningeome sind mit multiplen genetischen und chromosomalen Veränderungen assoziiert [Riemenschneider et al. 2006]. In anaplastischen Meningeomen sind häufig homozygote Deletionen des CDKN2A Tumorsuppressorgens sowie eine Amplifikation auf dem Chromosomenarm 17q nachweisbar [Schlegel et al. 2009]. Weiterhin wurden für diese Tumore Deletionen der chromosomalen Arme 1p, 6q, 9q, 10q, 14q, 17p und 18q beschrieben [Ironsides et al. 2002]. Deletionen von 1p oder 14q wurden mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und CDKN2A-Deletionen mit einer schlechten Prognose assoziiert [Schlegel et al. 2009].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Proliferationsrate von Meningeomen mit dem Verlust des distalen Abschnitts eines Chromosoms 1 sowie dem Verlust der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Tumorgewebe einhergeht [Niedermayer et al. 1998].

Die Pathogenese von Meningeomen ist bis heute nicht eindeutig und Gegenstand aktueller Untersuchungen.

1.1.3 WHO-Klassifikation und histopathologische Subtypen von Meningeomen

Die aktuelle WHO (Weltgesundheitsorganisation) Klassifikation von 2007 basiert auf dem Konsens einer internationalen Arbeitsgruppe von 25 Pathologen und Genetikern und der Mitarbeit von über 70 internationalen Experten. Sie gilt als Standard für die Definition von Hirntumoren in der klinischen Onkologie und in Tumorforschungsgemeinschaften weltweit [Louis et al. 2007]. Dieses sogenannte „Grading“ liefert eine Aussage zur biologischen Wertigkeit der Tumore, dient der Abschätzung des Krankheitsverlaufes [Schlegel et al. 2009] und ist gleichzeitig ein wichtiger Faktor für die Wahl der Therapie [Louis et al. 2007].

Für Meningeome wurden drei Tumor-Grade formuliert. Dabei orientiert sich die WHO-Klassifikation der intrakraniellen Tumore an zellulärer Differenzierung, zellulärer

und nukleärer Pleomorphie, Tumorzelldichte, mitotischer Aktivität, pathologischer Gefäßproliferation und Tumorgewebsnekrosen.

WHO Grad I bezeichnet ein gutartiges, langsames Tumorwachstum mit sehr guter Prognose für den Patienten [Vetter 2006]. Histologisch findet sich eine geringe Zelldichte mit gleichförmigen Zellen ohne atypische Mitosen und ohne Gefäßwandproliferation [Prados et al. 1998]. Zu dieser Gruppe zählen laut aktueller WHO die häufig vorkommenden fibroblastischen, meningotheiomatösen, transitionalen, psammomatösen, angiomatösen, sekretorischen, mikrozystischen, lymphoplasmazellreichen und metaplastischen Meningeome [Louis et al. 2007]. WHO-Grad II klassifiziert ebenfalls einen gutartigen Tumor, jedoch mit erhöhter Neigung zur Rezidivbildung und möglichem Übergang in einen malignen Tumor. Im Unterschied zu WHO Grad I zeigt sich hier ein erhöhter Proliferationsindex, eine erhöhte Zelldichte mit geringgradigen Unregelmäßigkeiten in Größe, Form und Chromatingehalt der Kerne, spontane Tumorgewebsnekrosen und wenig (≥ 4 Mitosen pro zehn Gesichtsfelder) Mitosen [Prados et al. 1998, Schlegel et al. 2009]. Zu dieser Gruppe zählen die seltener vorkommenden atypischen, chordoiden und klarzelligen Meningeome. Patienten mit einem WHO Grad II Tumor haben eine Überlebensrate von über 5 Jahren. Der WHO-Grad III bezeichnet anaplastische, papilläre und rhabdoide Meningeome [Louis et al. 2007]. Zur Diagnose eines anaplastischen Meningeoms müssen ≥ 20 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder unter starker Vergrößerung nachgewiesen werden. Diese Tumore bedürfen nach der Operation einer zusätzlichen Strahlen- und/oder Chemotherapie um das Rezidivrisiko zu senken [Vetter 2006]. Diese Patienten haben eine Überlebensrate von 2-3 Jahren [Louis et al. 2007].

Die WHO Klassifikation ist eine Komponente einer Vielzahl von Kriterien, die sowohl über Therapie als auch über den Krankheitsverlauf Auskunft geben. Klinische Befunde, wie Alter des Patienten, Tumorlokalisierung, Ausmaß der operativen Resektion, Proliferationsindizes und genetische Veränderungen spielen bei der Beurteilung der Prognose zusätzlich eine wichtige Rolle. Somit ist das Auftreten von Lokalrezidiven abhängig von der Tumorlokalisierung, der Tumorklassifikation und der Vollständigkeit der neurochirurgischen Tumorsektion.

1.1.4 Meningeome - Klinik

Meningeome können sich, je nachdem, wo sie lokalisiert sind und von welchen Strukturen sie ausgehen, mit unterschiedlichen Beschwerden bemerkbar machen. Oft kommt es zunächst zu neurologischen Ausfallerscheinungen, Lähmungen und Gefühlsstörungen. Weiterhin kann es zu Sprachstörungen sowie epileptischen Anfällen und Persönlichkeitsveränderungen kommen. Schwindel, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen als akute Beschwerden können ein Zeichen eines erhöhten Hirndrucks sein und stellen sich meist erst in fortgeschrittenen Stadien ein. Bei Tumoren im Bereich der hinteren Schädelgrube bzw. dem Foramen magnum treten diese Symptome allerdings schon früher auf [Vetter 2006, Moskopp et al. 2005]. Meningeome des mittleren Sinusdrittels sind meist mit einem charakteristischen klinischen Syndrom mit Störungen der motorischen Funktionen verbunden. Diese Symptome werden auch bei den parasagittalen Meningeomen des vorderen Sinusdrittels beobachtet. Konvexitätsmeningeome und die lateralen Keilbeinflügelmeningeome gehen hingegen meist mit fokalen Anfällen, Paresen und Sprachstörungen einher [Moskopp et al. 2005]. Ein großer Teil der Meningeome bleibt zeitlebens unbemerkt und wird zufällig in einer Autopsie oder als inzidenteller Befund in einer zerebralen Bildgebung nachgewiesen [Schlegel et al. 2009].

1.1.5 Meningeome - Therapie

Die gutartigen und langsam wachsenden Meningeome sind meist sehr gut therapierbar. Erste Wahl bei der Therapie von Meningeomen ist die vollständige mikrochirurgische Resektion. Zusätzlich hat sich die supraselektive präoperative Embolisation von Feedergefäßen bewährt [Engelhard 2001]. Eine etablierte medikamentöse Therapie für progrediente nicht resektable Meningeome gibt es bis heute nicht. Der Einsatz von Medikamenten, wie Hydroxyharnstoff, führte in einigen Fällen lediglich zur Stabilisierung und Symptomkontrolle [Schlegel et al. 2009].

Auch wenn moderne bildgebende Verfahren wie CT, MRT und PET inzwischen meist eine recht sichere Diagnose zulassen, wird die weitere Behandlung von dem Ergebnis der histologischen Aufarbeitung der Biopsie abhängig gemacht. Bei kleinen, ungünstig gelegenen Tumoren sowie Tumorresten mit weniger als 3 cm Durchmesser bietet die

stereotaktische Radiochirurgie eine Alternative zur Operation. Eine strahlentherapeutische Behandlung bei nicht vollständig resezierten Meningeomen kann eine Größenprogredienz des Tumors im Vergleich zu nicht bestrahlten Tumoren verhindern oder aufhalten. So soll bei progredienten Optikusscheidenmeningeomen oder bei schlecht resezierbaren Schädelbasistumoren eine Bestrahlung unter Schonung strahlensensibler Nachbarschaftsstrukturen erwogen werden [Tonn 2004]. Mit der fraktionierten, stereotaktischen, konformalen Zielbestrahlung bestehen umfassende Erfahrungen und sehr gute Langzeitverläufe in Deutschland mit 10-Jahres-Kontrollraten von über 90% [Debus et al. 2001]. Anaplastische Meningeome müssen nach operativer Resektion mit einer Bestrahlung der erweiterten Tumorregion nachbehandelt werden.

Die Prognose und damit die Rezidivrate der Meningeome ist von der Lage des Tumors, vom WHO Grad und dem Ausmaß der Resektion abhängig [Schlegel et al. 2009]. Die Resektion wird in einer Skala nach Simpson eingeteilt. Eine Resektion Grad I bedeutet die Entfernung des Tumors samt Ansatz, während Grad II nur eine Verschorfung des Ansatzes beinhaltet [Simpson 1957]. Bei Grad I geht man von der niedrigsten Rezidivquote, für Konvexitätsmeningeome (WHO I) unter 5%, aus. Da infiltrierende Meningeome nur unvollständig reseziert werden können, rezidivieren diese mit 50% Wahrscheinlichkeit [Schlegel et al. 2009].

Die atypischen Meningeome (WHO II) haben eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit zu rezidivieren. WHO III Tumore sind fast nie kurativ behandelbar und neigen zur Metastasierung [Modha et al. 2005]. Diese Meningeome rezidivieren innerhalb kurzer Zeit, die mediane Überlebensrate liegt hier bei 2-3 Jahren [Louis et al. 2007].

1.2 c-Kit - eine transmembrane Tyrosinkinase

1.2.1. Definition und Funktion

C-Kit ist eine transmembrane Typ 3 Rezeptor-Tyrosinkinase aus der Familie der PDGF (platelet-derived growth factor)- und CSF-1 (colony stimulating factor-1)-Rezeptoren und ist als Proto-Onkogen bei der Pathogenese von Tumoren wirksam [Qui et al. 1988, Yarden et al. 1987]. Der c-Kit-Rezeptor weist eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität auf [Majumder et al. 1988, Yarden et al. 1987]. Das Produkt von c-Kit, das CD 117, gilt als hochspezifischer immunhistochemischer Diagnostikmarker für GISTs [Cetin et al. 2005].

Das c-Kit-Protein wurde in diversen Zellen, wie den Mastzellen und Epithelzellen der Brustdrüse, der Speicheldrüsen, der Schweißdrüsen sowie dem Drüsengewebe der Speiseröhre nachgewiesen. Disseminiert wurde das c-Kit-Protein desweiteren im Interstitium von Testis und Ovarien gefunden. Außerdem ist es in Teilen des zentralen Nervensystems wie dem Cerebellum, Hippocampus und Hinterhorn des Rückenmarks zu finden [Galli et al. 1993, Hamann et al. 1994, Strohmeyer et al. 1995]. Defekte im c-Kit-Protein führen zu Fehlfunktionen wie Mastozytose und assoziierten hämatologischen Fehlfunktionen, wie z.B. den myelodysplastischen oder myeloproliferativen Erkrankungen. Zusätzlich entwickeln diese Patienten verstärkt chronisch myeloische Leukämien (CML).

Eine hohe c-Kit Expression ist mit soliden Tumoren wie beispielsweise den kleinzelligen Bronchialkarzinomen, gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), Keimzelltumoren, Mammakarzinomen, Neuroblastomen, Ewing-Sarkomen, sowie papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen assoziiert. Zusätzlich spielt c-Kit bei der Metastasenbildung beim Ewing-Sarkom eine wichtige Rolle [Tsuura et al. 1994, Hines et al. 1995, Kindblom et al. 1998, Huizinga et al. 1995, Miettinen et al. 2000, Ricotti et al. 1998, Landuzzi et al. 2000].

Studien zeigen in 80 bis 90% aller GISTs eine „gain-of-function“ KIT-Mutation [Antonescu et al. 2004, Heinrich et al. 2003]. Der Nachweis für den Zusammenhang zwischen der Entstehung von GISTs und der KIT-Mutation wurde in transgenen Mäusen erbracht [Sommer et al. 2003].

1.2.2 Die molekulare Struktur von c-Kit

C-Kit, eine transmembrane Tyrosinkinase, besteht aus einem extrazellulären und einem intrazellulären Anteil. Der extrazelluläre Anteil beinhaltet fünf immunoglobulin-ähnliche Domänen, wovon die äußeren drei für die Bindung mit dem natürlichen Stimulus SCF (stem cell factor) oder KL (kit ligand) verantwortlich sind [Papayannopoulou et al. 1991]. SCF wird von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten produziert und reguliert die Entwicklung sowie funktionelle Prozesse bei hämatopoetischen Stammzellen und Mastzellen [Grabbe et al. 1994]. Durch die SCF-getriggerte Stimulation des c-Kit-Rezeptors werden desweiteren diverse Signalwege aktiviert. Ein Zielgen eines SCF/c-Kit-induzierten Signalweges ist der anti-apoptische Faktor Bcl-2 [Gross et al. 1999, Reed 1998, Van der Heiden et al. 1999]. Da der extrazelluläre Bereich unterschiedlich stark glykosyliert vorliegt, ergibt sich ein unterschiedliches Molekulargewicht des Moleküls. Typischerweise lässt sich im Western Blot eine Doppelbande bei 145 und 125 kDa beobachten. KIT hat eine Größe von 145 kDa. KIT wird durch das Gen c-Kit kodiert, das auf dem langen Arm des Chromosom 4 liegt [Qui et al. 1988].

Die vierte Domäne des extrazellulären Anteils ist für die Rezeptordimerisierung zuständig. Der fünften Domäne kann keine spezifische Funktion zugeordnet werden. Der intrazelluläre Anteil des Rezeptors, der auch die Tyrosinkinase enthält, ist für die Signaltransduktion entscheidend. In der Reihenfolge von der Zellmembran in Richtung Zellinnerem folgt eine Juxtamembrandomäne, welche eine hohe Zahl an Signalmolekülen bindet. Es folgt die Tyrosinkinase, die von einem Kinaseinsert unterbrochen d.h. zweigeteilt ist. Die Kinase selbst weist eine hohe Homologie zur Abl-Kinase auf [Joensuu et al. 2001]. Die intrazelluläre Kinasedomäne ist ohne die Bindung des Liganden SCF inaktiv. Die Bindung von SCF resultiert in der Autophosphorylierung der Kinasedomäne und Aktivierung einer nachfolgenden Signalkaskade [Bauer 2003].

Der Rezeptor ist durch eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Diese 23 Aminosäuren lange Domäne verfügt über einen Anteil von hydrophoben Aminosäuren, welche die Verankerung in der Membran bewirken [Yarden et al. 1988].

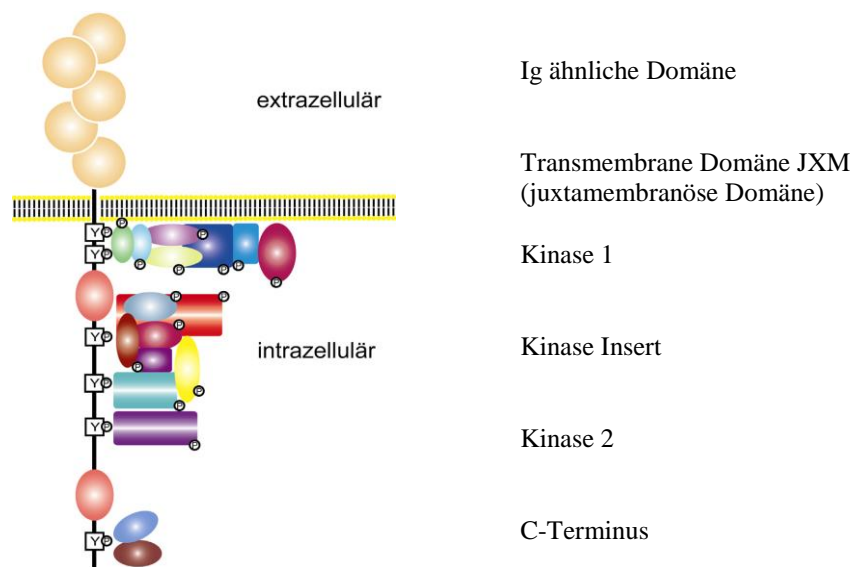


Abbildung 1: Aufbau der intra- und extrazellulären funktionellen Untereinheiten der Tyrosinkinase c-KIT - verändert nach Scheijen und Griffin (2002)

1.2.3 c-Kit und seine pathologische Bedeutung

Studien von Mayer et al. haben gezeigt, dass der c-Kit-Rezeptor bei der Differenzierung von Melanozyten und zu einem geringeren Teil bei der Proliferation embryonaler Melanoblasten eine zentrale Rolle spielt [Mayer et al. 1968, Mintz et al. 1957].

Vergleichbar dazu wurden Mutationen des c-Kit-Rezeptors bei Patienten mit Piebaldismus identifiziert, einer Erkrankung, die mit der lokalen Reduktion der Melanozytenzahl einhergeht [Fleishman 1996, Giebel et al. 1991]. Dies lässt vermuten, dass c-Kit für die Melanozytenentwicklung essentiell ist.

Weiterhin führen Defekte von c-Kit zu Fehlfunktionen wie etwa Mastozytose und assoziierten hämatologischen Fehlfunktionen, die von myelodysplastischen bis hin zu myeloproliferativen Erkrankungen reichen. Diese Patienten weisen verstärkt myeloische Leukämien auf.

Im nachfolgenden Kapitel wird auf die Funktion von c-Kit bei der Entstehung bzw. der Therapie von Gastrointestinalen Stromatumoren eingegangen. Dabei spielen Mutationen des c-Kit kodierenden Gens eine entscheidende Rolle in der Therapie mittels STI571. Bereits andere Studien von Simon et al. haben sich mit der Möglichkeit

Immunhistochemische, genetische und biochemische Untersuchungen zur Expression von c-Kit in Meningeomen

der Therapie von Mammakarzinomen mit diesem Wirkstoff beschäftigt. Ähnlich wie in unseren Untersuchungen wurden immunhistochemische und biochemische Verfahren angewandt, um die Expression von c-Kit bzw. c-Kit Mutationen in Mammakarzinomen zu ermitteln [Simon et al. 2004]

1.3 GIST - Antitumorale Therapie

Bis zum Jahr 2000 bestand die einzige Behandlungsmöglichkeit der GIST in der chirurgischen Entfernung bzw. Resektion. Da diese Tumore sich gegen Chemo- und Strahlentherapie als resistent erwiesen haben, machten sie eine erfolgreiche Behandlung bisher problematisch.

Mit dem Wirkstoff Imatinib mesylat (STI571, Glivec®), der bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) bereits erfolgreich eingesetzt wurde, können seit 2001 gute Ergebnisse auch in der Behandlung von GISTs erzielt werden [Reichardt et al. 2005], da diese Tumore den Tyrosinkinase Rezeptor KIT besonders stark exprimieren. Nur Patienten mit spezifischen KIT-Mutationen sprechen auf eine Therapie mit diesem Wirkstoff an. Imatinib ist ein kompetitiver Inhibitor der Tyrosinkinasen, die mit dem KIT-Protein (stem cell factor [SCF] receptor), dem ABL-Protein und dem Plättchen-abhängigen Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor, PDGF) assoziiert sind. STI571 konkurriert mit ATP an der Kinase von c-KIT und inhibiert die deregulierte Kinase [Joensuu et al. 2001] (siehe Abb. 2). Die Tyrosinkinasen katalysieren die Phosphatübertragung von ATP auf Tyrosin in Proteinen, die für Signaltransduktionswege der Zellteilung und den Zelltod entscheidend sind. Werden Tyrosinkinasen gehemmt, kann die für diese Prozesse notwendige Signalübertragung nicht funktionieren und die Zellproliferation wird gestoppt oder verlangsamt [Croom et al. 2003].

In einer Studie, welche das Ansprechen von GIST auf STI571 (Glivec®) untersucht hat, konnte gezeigt werden, dass bei 38% aller in dieser Studie eingeschlossenen Patienten eine partielle Remission erreicht werden konnte. Dies ist ein signifikanter Fortschritt zu den vorher bestehenden Therapiemöglichkeiten [Dagher et al. 2002].

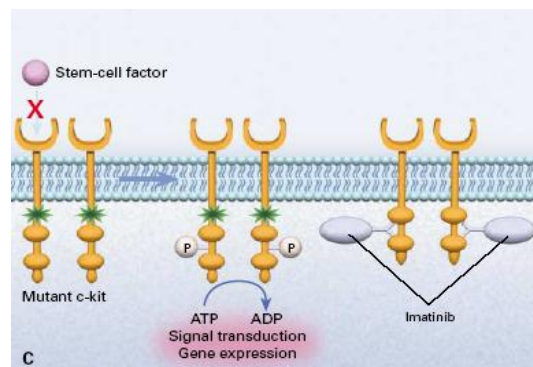


Abbildung 2: Schematische Darstellung der konstitutiven Kit-Rezeptoraktivierung durch aktivierende c-Kit-Mutationen sowie Hemmung durch Imatinib (aus Savage and Antman 2002).

1.4 MCTS - Multizelluläre Tumorsphäroide

Multizelluläre Sphäroide sind dreidimensional strukturierte Zellaggregate, welche einer in vivo Situation, z.B. einem soliden Tumor, sehr viel näher kommen als die Monolayerkulturen. Somit können die MCTS verlässlichere Ergebnisse bringen. Dies wird besonders in der Erforschung der Auswirkung verschiedener Pharmaka zu Nutzen gemacht [Kunz-Schughart 1999, Kunz-Schughart et al. 2000].

Bereits in den 70er Jahren konnten Arbeiten von Sutherland zeigen, dass starke Ähnlichkeiten zwischen Sphäroiden und soliden Tumoren in vivo bestehen, was das Potenzial für die Forschung mit dieser dreidimensionalen Zellkultur aufzeigt [Sutherland et al. 1971].

Ein weiterer Vorteil des dreidimensionalen Wachstums sind Differenzierungsprozesse. Zellen, die im Verbund gezüchtet werden, differenzieren sich in der Regel und erhalten dadurch sowohl morphologische als auch funktionelle Charakteristika des Ursprungsgewebes, die häufig bei der Kultivierung als Einzelzellen verloren gehen [Kunz-Schughart 1999, Jianmin et al. 2002].

1.4.1 MCTS - Aufgaben und Anwendung in der Tumorforschung

Sphäroide haben eine besondere Bedeutung für die Tumorforschung, da Tumorzellen in Sphäroiden über eine spezifische Wachstums-, Zell- und Stoffwechselkinetik verfügen und komplexe Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen entwickeln, die auch in Tumorgeweben ausgebildet sind [Mueller-Klieser 1987]. Aus diesem Grund stellen die Sphäroide in der experimentellen Tumorforschung geeignete Zellsysteme zur Untersuchung der Wirkung von zytotoxischen Agenzien oder Strahlung auf Tumore dar. Durch eine Gradientenentwicklung innerhalb der Sphäroide hinsichtlich der Proliferations- und Stoffwechselaktivität, Nekrosen und Differenzierungen, wird die Untersuchung der Viabilität von Sphäroiden nach Zytostatikabehandlungen in vitro ermöglicht [Zoli et al. 2001]. Multizelluläre Tumorsphäroide von Meningeomen könnten als Modelle dienen, mit deren Hilfe die Wirkung von spezifischen Zytostatika untersucht werden kann.

Um Sphäroide als Modelle zur Untersuchung der Wirkung von Zytostatika wie z.B. Glivec® auf Meningeomzellen in vitro benutzen zu können, muss zunächst geklärt werden, ob c-Kit in Meningeom Sphäroiden in Langzeit Kulturen exprimiert wird.

1.5 Fragestellung und Ziel der Untersuchungen

Der c-Kit-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen und ist an Signalkaskaden beteiligt, die zum Zellüberleben beitragen. Weiterhin ist er als Protoonkogen bekannt.

Hinsichtlich der Erkenntnis, dass in einer Tissue Microarray basierten immunhistochemischen Studie eine erhöhte Expression von c-Kit in Meningeomen auftrat, lag unser Interesse darin, dies näher zu untersuchen. Hierfür wurden weitere immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Ferner wurde die Expression von c-Kit biochemisch an Meningeomen untersucht. Ergänzend wurden in Zusammenarbeit mit der Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf Sphäroide von Meningeomen biochemisch auf KIT Expressionen im zeitlichen Verlauf untersucht. Zur Identifikation von möglichen Mutationen im c-Kit kodierenden Gen wurden zusätzlich genetische Untersuchungen an Meningeomen durchgeführt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Labormaterialien und Chemikalien

Labormaterialien:

Tubes 15ml und 50ml - greiner

Tubes zum Homogenisieren - peqlab

Pipetten 0,1µl-1ml - eppendorf®

Pipetten 10-50ml - Falcon Advantage

Laborglas - SIMAX

Glasplatten – Biorad

PVDF Membran 0,2µm – Biorad

Whatman® Papier

Mikrotiterplatten zur Proteinbestimmung (Bradford) - Roth

Geräte:

Shandon Coverplate Cassette - Thermo

Shandon Coverplate - Thermo

Thermomixer compact - eppendorf®

pH-Meter CG 840 - Schott

Mikro-Dismembrator U - B. Braun Biotechnologie International

Schüttler - Heidolph Instruments Polymax 1040

Zentrifuge - centrifuge 5415R eppendorf®

Blot-Lesegerät - Chemidoc Biorad

PC Programm - Quantity One

Blot-Transfergerät - Amersham Biosciences TE70 ECL Semi-Dry Transfer Unit

Mit Electrophoresis Power Supply EPS600 von Biotechnologie

Elektrophorese-Kammer - C.B.S. Scientific Co. Model DCX-700

PCR Gerät - My cycler Biorad

Chemikalien/Reagenzien:

Triton X100 – Serva und ROTH

TBS-Pufferfertigmischung - DAKO

H₂O₂ (Perhydrol) - Merck

Mayers Haemalaun - Merck

Ziegenserum - DAKO

Antibody-Diluent Reagent Solution - Zymed

Histofine Simple Stain Max PO - Nichirei Bioscience

Chromogen DAB (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) - Sigma

Ethanol 50, 70, 96, 100% - Apotheke UKE

Xylol - SDS

Eukitt - Kindler

Meerrettich-Peroxidase (HRP)

APS - Sigma

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic) arid disodium salt dihydrate 99% - Sigma

Glycine, for electrophoresis Minimum 99% - Sigma

Instant-Magermilchpulver - frema Reform

TEMED - Sigma

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Puffersubstanz (Trometamol) - MERCK

Trizma hydrochloride - SIGMA Ultra pH 3.5-5.0

Tween 20 - Carl Roth GmbH

Complete, Mini - Roche Applied Science 30 Tabl.

Marker Page Ruler - Fermentas

Detection Reagenz - 1 Peroxide Solution

2 Luminol Enhancer Solution v. Pierce

BSA (Bovine Serum Albumin) Standard für Bradford Proteinbestimmung - Biorad

Quickstart Bradford Dye Reagenz - Bio Rad

Tag Polymerase - eppendorf®

Homogenisierungspuffer (50ml):

50mM Tris	= 0,303g
150mM NaCl	= 0,443g
5mM EDTA	= 0,093g
1% SDS	= 0,5 (w/v)
2% Triton	= 1ml (v/v)

Mit destilliertem Wasser auf 50ml auffüllen.

+ 1 Complete mini Tablette auf 10ml

Basic 2X Laemmli Puffer:

4% SDS
20% glycerol
10% 2-mercaptoethanol
0.004% Bromphenol blue
0.125 M Tris HCl
pH-Wert 6,8

SDS-PAGE Gel 10% (10ml):

H ₂ O	4,0ml
30% acrylamide mix	3,3ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5ml
10% SDS	0,1ml
10% APS	0,1ml
TEMED	0,004ml

Sammelgel (Kammgel):

3ml H₂O

1,25ml 0.5M Tris HCL pH 6.8

650µl Bis Acrylamid 30%

250µl SDS 10%

100µl APS 10%

10µl TEMED

Elektrophoresepuffer (1000ml):

25mM Tris = 3,03g

250mM Glycin = 18,77g

0,1% (w/v) SDS = 1g

900ml aqua dest.

Puffer:

A 7,5ml Methanol
15ml 1M Tris pH 10,4
Mit destilliertem Wasser auf 50ml auffüllen

B 7,5ml Methanol
1,25ml 1M Tris pH 10,4
Mit destilliertem Wasser auf 50ml auffüllen

C 25mM Tris pH 9,4

Antikörper:

c-Kit (IHC) – DAKO A 4502

Primärer AK (Western Blots): c-kit sc 13508, antimouse, monoclonal - Santa Cruz
Biotechnologie

Sekundärer AK: antimouse, monoclonal - Fermentas

Anti-β-actin: antirabbit, polyclonal - Sigma

α-RHRP anti-rabbit

Marker

Page ruler, Protein ladder - Fermentas SM 0671

2.2 Selektion der Patienten

2.2.1 Selektion der Patienten für die Immunhistochemie

Im Zeitraum von 2006-2007 wurden in der Neuropathologie Hamburg Meningeomproben gesammelt und immunhistochemisch auf ihre c-Kit Expression untersucht. Insgesamt wurden 80 Tumorproben untersucht. Dabei handelt es sich um 56 Proben von weiblichen und 24 Proben von männlichen Patienten. Die Patienten waren zwischen 11 und 86 Jahre alt (siehe Tabelle 3).

2.2.2 Selektion der Patienten zur biochemischen Untersuchung von Meningeomen mittels Western Blot

Von 73 Meningeomproben aus den Jahren 1994 bis 2003, von denen zusätzliche Gewebeproben bei -80°C kryokonserviert vorlagen, wurde die Expression von c-Kit immunhistochemisch untersucht und nach Färbungsintensität 0-3 eingestuft. Für die Western Blot Untersuchungen wurden Meningeome mit einer hohen c-Kit Expression und einer fehlenden c-Kit Expression verwendet. Ausgewählt wurden Tumorproben von 9 Patienten.

Gewebe, welches mittels Western Blot analysiert wurde, stammt aus der Neuropathologie des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg.

Folgendes Gefriermaterial (-80°C) von Meningeomen stand uns für die Western Blots zur Verfügung.

Erhöhte c-Kit Expression:

Diese Gewebeproben stammen von drei weiblichen und drei männlichen Patienten aus den Jahren 1997-2001. Bei den Meningeomen handelt es sich sowohl um fibroblastische, meningotheleale, transitionale mit dem WHO Grad I als auch um zwei atypische Meningeome des WHO Grades II. Es handelt sich sowohl um rezidivierende Meningeome (RM) als auch um nicht-rezidivierende-Meningeome (NRM).

Keine c-Kit Expression:

Diese Gewebeproben stammen von vier weiblichen Patienten und gehören zum fibroblastischen, meningothehialen und transitionalen Typ. Die Gewebeproben der rekurrenten Meningeome (RM) stammen aus dem Jahr 1998, die Proben der nicht rekurrenten Meningeome (NRM) aus dem Jahr 2000. Weitere Proben für den Western Blot, welche als Kontrolle verwendet wurden, stammen aus Sektionsfällen (Arachnoidea).

2.2.3 Selektion der Patienten zur Sphäroidkultivierung von Meningeomen

Ergänzend zu den Untersuchungen der Gewebeproben der Meningeome wurden in Zusammenarbeit mit der Neurochirurgie (UKE), unter der Leitung von PD Dr. Oliver Heese, Sphäroide von Meningeomen aus Frischgewebe gewonnen und mittels Western Blot biochemisch analysiert.

Aus drei Originaltumoren wurden in zeitlichen Abständen von 2, 4 und 6 Wochen Sphäroide in Zellkulturen gehalten und kryokonserviert. Bei den Originaltumoren handelt es sich um folgende Patienten:

Patient	WHO	Alter	Geschlecht
1	I	78J.	f
2	II	48J.	m
3	I	60J.	f

Tabelle 1: Auswahl der Patienten zur Sphäroidkultivierung von Meningeomen

2.2.4 Selektion der Patienten zur genetischen Untersuchung von Meningeomen

Für die DNA Sequenzierung wurden insgesamt 24 Proben (siehe Tabelle 2) ausgewählt. Dazu wurden 15 Patienten mit hoher c-Kit Expression und 9 Meningeome mit fehlender c-Kit Expression gemäß immunhistochemischer Untersuchung ausgewählt und untersucht. Es wurden sowohl RM als auch NRM in die Untersuchung

mit einbezogen.

Da Mutationen in GISTs häufig in Exon 9, 11 und 13 liegen, wurden spezifisch diese untersucht.

Patient	Subtyp	WHO	Alter	Geschlecht	c-KIT
1	Atypisch	II	60	W	3+
2	Atypisch	II	30	W	2+
3	Atypisch	II	76	W	2+
4	microzystisch	I	56	W	1+
5	meningothelial	I	32	M	3+
6	fibroblastisch	I	67	W	3+
7	anaplastisch	II	68	M	0
8	Atypisch	II	28	W	1+
9	anaplastisch	II	28	W	0
10	Atypisch	II	53	W	3+
11	meningothelial	I	52	M	3+
12	fibroblastisch	I	56	M	3+
13	meningothelial	I	64	M	3+
14	transitional	I	55	W	3+
15	Atypisch	II	53	W	3+
16	fibroblastisch	I	23	W	3+
17	fibroblastisch	I	27	W	3+
18	meningothelial	I	59	M	3+
19	microcystisch	I	43	M	0
20	fibroblastisch	I	78	W	0
21	meningothelial	I	50	W	0
22	transitional	I	62	W	0
23	fibroblastisch	I	43	W	1+
24	psammomatös	I	57	W	1+

Tabelle 2: Patientendaten der Meningeomresektate, die zur DNA Sequenzierung ausgewählt wurden.

2.3 Herstellung histologischer Präparate

Als erstes erfolgt der *Zuschnitt* der eingehenden Biopsien bzw. des Untersuchungsmaterials in kleine Stücke. Anschliessend wird das Gewebe zur Erhaltung fixiert. Dazu kommt Formalin (10%iges konzentriertes gepuffertes Formaldehyd) zum Einsatz, welches die Eiweiße untereinander vernetzt und das Gewebestück somit haltbar macht. Dabei ist das Verhältnis von Flüssigkeit zum Gewebe von mindestens 20:1 einzuhalten. Die Dauer der *Fixierung* ist abhängig von der Größe des zu fixierenden Materials.

Da Fixierungsflüssigkeiten die Einbettung ungünstig beeinflussen können, wird das formalinfixierte Gewebe für längere Zeit *gewässert*.

Nach dem Auswaschen erfolgt die *Entwässerung* des Gewebes, um dieses für die anschließende Einbettung in Paraffin zugänglich zu machen. Die Entwässerung wird mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Anschließend wird der Alkohol durch Methylsalicylat und Xylol ersetzt.

Für das nachfolgende *Gießverfahren* kommen Ausgießrähmchen oder kleine Metallwannen, die mit warmem und flüssigem Paraffin gefüllt sind, zum Einsatz.

Nach Erkalten und Herauslösen des Paraffinblockes aus dem Gießrahmen werden Paraffinschnitte von 4µm Dicke mit Hilfe eines Rotations- oder Schlittenmikrotoms angefertigt. Der *Schnitt* wird mit Hilfe eines angefeuchteten Pinsels vom Messer abgehoben und in ein kaltes Wasserbad gebracht. Anschließend werden die Schnitte auf saubere und fettfreie Objektträger aufgezogen bevor diese in einem 56°C warmen Wasserbad gestreckt und danach mit feuchtem Filterpapier fest auf den Objektträger gedrückt werden. Die Objektträger werden in Färbewiegen sortiert und bis zum Färben in einem 37°C warmen Brutschrank aufbewahrt, damit sich das Paraffin am Tag der Färbung besser herauslösen lässt.

Vor dem Färben müssen die Paraffinschnitte 2x10 Minuten in Xylol *entparaffiniert* werden, um das Eindringen des Farbstoffes zu ermöglichen. Zusätzlich werden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe gebracht (100%iges Ethanol – 50%iges Ethanol jeweils 30-60 Sekunden spülen).

Für die immunhistochemische Untersuchung der Meningeomschnitte ist eine standardisierte, indirekte Immunoperoxidase-Methode verwendet worden. Dabei bindet ein unkonjugierter Primärantikörper (AK, c-Kit A4502 DAKO 1:50) an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter enzymgekoppelter AK (Histofine Simple Stain Max PO,

Nichirei Bioscience), der gegen das Fc-Fragment des Primär-AK, welches jetzt als Antigen wirkt, 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).

Bei den Tumorgewebspräparaten mit c-Kit wurde die Färbeintensität (Skala von 0-3) oder die Zahl der positiven Zellen unter stetig gleichen Bedingungen gezählt. Nach Färbeintensität ergaben sich damit positive (Färbeintensität 2-3) und negative IHC-Auswertungen (Färbeintensität 0-1). Nach Testen verschiedener Verdünnungen von c-Kit (1:30; 1:50; 1:100) stellte sich die 1:100-Verdünnung als optimal heraus.

Auf Grund dieser Färbeergebnisse wurden die Tumore nach festgelegten Kriterien in Kategorien eingeteilt. Als Negativkontrolle dienten Präparate, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde.

2.4 Western Blot - biochemische Analyse von Meningeomen

Mit Hilfe von Western Blots wurde die Expression von c-Kit in Meningeomen untersucht.

Western Blotting ist eine Methode, bei der Proteine elektrophoretisch aus einem Gel aufgetrennt werden und anschließend über Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose oder, wie in diesem Fall, auf eine PVDF Membran übertragen werden. Diese "Übertragung" wird als Blotting bezeichnet [Lottspeich et al. 1998].

2.4.1 Vorbereitung der Proben

Die kryokonservierten Tumorproben wurden bei ständiger Kühlung auf Eis abgewogen und jeweils 60µg Gewebe mit einer Metallkugel und Homogenisierungspuffer in kleine Röhrchen (peqlab) gefüllt. Im Mikro-Dismembrator (B. Braun Biotechnologie International) wurden die Proben 3-6mal für 25-50 Sekunden bei 2000 RMM homogenisiert. Die Homogenisierungspuffermenge wurde entsprechend des Gewichtes der Gewebeproben gewählt, so dass ein 10% - Homogenat entsteht.

Nach ausreichender Zerkleinerung der Gewebeproben wurde das Homogenat bei 10000U/min zentrifugiert und anschließend eine Proteinkonzentrationsbestimmung

nach Bradford vom Überstand durchgeführt. Erst die Kenntnis der genauen Proteinkonzentration ermöglicht es im Rahmen der biochemischen Analyse eine einheitliche Gesamtproteinmenge auf das Polyacrylamidgel aufzutragen. Die Proteinmenge pro Probe betrug 20µg. Über die Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradford Methode erhielten wir eine exakte Angabe über die Proteinkonzentration der einzelnen Proben.

Dazu wurden jeweils einmal 2,5µl Probe mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:2 und einmal 1µl Probe im Verhältnis 1:5 auf eine Mikrotiterplatte (Roth) aufgetragen und der Standard hinzugefügt. Anschließend wurde zu jeder Probe 250µl Quickstart Bradford (Dye Reagent, Biorad) aufpipettiert und die Platte 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Mikrotiterplatte konnte anschließend photometrisch mit Hilfe des Programmes „µQuant“ ausgelesen werden.

Als Standard zur Berechnung des Bradfordfaktors bzw. zur Erstellung der Eichkurve wurde bovines Serum Albumin (BSA) verwendet.

Auf diese Weise erhielten wir exakte Proteinkonzentrationen. Zum Schluss wurde SDS PAGE Puffer (Lämmli) hinzugefügt und die Probenröhrchen 15 Minuten zum inkubieren auf den Thermomixer (Eppendorf) bei 550rpm und 96°C gestellt.

Das β-2-mercaptoethanol reduziert sowohl intra- als auch inter-molekulare Disulfidbrückenbindungen der Proteine, um eine Separation nach Größe und nicht der Form nach zu erhalten.

Das SDS bindet an positiv geladene Proteine, welche in einem regelmäßigen Intervall auftreten, überdeckt die Eigenladung und gibt somit jedem Protein die gleiche negative Ladung. Zusätzlich zerstört das SDS die Sekundär- und Tertiärstruktur und unterstützt damit die Auftrennung der Größe nach [Laemmli 1970].

Bis zum Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel wurden die Proben auf Eis gekühlt.

2.4.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Nach der Vorbereitung der Proben wurden die Gele gegossen. In eine spezielle Vorrichtung zum Gießen zweier Gele wurden jeweils 2 mit Ethanol gereinigte Glasplatten in einen Gelhalter eingespannt. Zunächst wurde das SDS PAGE Gel (10ml Trenngel) auf beide Glasplattenpaare verteilt. Auf das noch flüssige Gel wurden 100µl Propanol pipettiert, um Blasenbildung zu vermeiden, einen geraden

Oberflächenabschluss des Gels zwischen den Glasplatten zu erzielen und um Kapillar-Effekten und Verdunstung entgegenzuwirken.

Nach Polymerisation des Gels wurde das Propanol mit destilliertem Wasser abgespült und der Überstand zwischen den Glasplatten mit Whatman® Papier getrocknet. Danach wurde das Sammelgel zwischen den Platten aufgetragen. Zuvor wurde ein Plastikamm zur Bildung von zehn Taschen für die Proben zwischen die Glasplatten geschoben. Während der Polymerisationszeit des Sammelgels konnte der Elektrophoresepuffer für die Elektrophoresekammer vorbereitet werden. Mit Hilfe des pH-Meters wurde ein pH von 8,3 eingestellt und anschließend der gesamte Puffer in die Elektrophoresekammer gefüllt. Anschließend wurden die Proben auf die Taschen verteilt. Neben den Proben der Meningeome wurden jeweils eine Negativkontrolle (Gehirn), eine Positivkontrolle (c-Kit exprimierendes Tumorgewebe) und ein Marker (34-170kDa) zur Kontrolle der Auftrennung aufgetragen. Zusätzlich wurden auf ein Gel Proben von Sektionsfällen mit Arachnoidea aufgetragen.

Die beladenen Gele wurden in die Elektrophoresekammer gestellt und bei 100V 1 ½ Stunden laufen gelassen.

Abbildung 3 zeigt Schemata nach denen Proben auf SDS PAGE-Gele aufgetragen wurden.

1.Gel

Marker	Negativ Kontr.	Positiv Kontr.	M c-kit +	M c-kit +	M c-kit +	M c-kit +	M c-kit -	M c-kit -	M c-kit -
--------	-------------------	-------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

2.Gel

Marker	Positiv Kontr.	Negativ Kontr.	Arachn.	Arachn.	Arachn.	M c-kit -	M c-kit +	M c-kit -	
--------	-------------------	-------------------	---------	---------	---------	-----------------	-----------------	-----------------	--

Abbildung 3: Schemata der Meningeom- und Arachnoideaprobe für die SDS PAGE-Gele

(M = Meningeom)

(A= Arachnoidea)

2.4.3 Blotten und Detektion

Nach 1 ½ Stunden Laufzeit wurde eine PVDF Membran von Biorad mit 0,2µm Porendurchmesser der Größe der Gele entsprechend zugeschnitten. PVDF Membranen haben den Vorteil, dass sie Proteine hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen sehr stark fixieren und sich ansonsten chemisch neutral verhalten. Das Sammelgel wurde nach Abtrennung mit Hilfe eines Gelschneiders verworfen.

In 5 Gefäßen wurde einmal reines destilliertes Wasser, in einem weiteren Gefäß Methanol und in die letzten 3 Gefäßen Puffer A-C (siehe 2.1) gefüllt. Die Membranen wurden daraufhin für jeweils 1 Minute in Methanol, dann in destilliertes Wasser und zum Schluss in Puffer B gelegt.

Zusätzlich wurden jeweils 1 bzw. 2 Whatman® Papiere in Puffer A, B und C gelegt.

Die Membran, das Gel und das Whatman® Papier wurden in folgender Schichtung auf das Semi-Dry Blot Transfergerät aufgelegt.

Unten: Whatman® Papier aus Puffer C

Membran aus Puffer B

Gel

Whatman® Papier aus Puffer B

Oben: Whatman® Papier aus Puffer A

Die Blotkammer wurde geschlossen, leicht angedrückt und die aufgetrennten Proteine aus dem Gel 45 Minuten bei 250mA, 14Volt und 3Watt elektronisch auf die Membran „geblottet“.

Nach 45 Minuten konnten die Membranen vorsichtig mit einer Pinzette entnommen werden und über Nacht in 8%iger Milch geblockt werden, um spezifische Bindungsstellen für die nachfolgende Immundetektion abzudecken. Dazu wurden die Membranen in einem Gefäß mit dem Block Puffer im 5°C Kühlraum auf einem Schüttler positioniert.

Nach 24 Stunden wurden die Blots aus den Gefäßen entnommen und mit der Oberseite nach unten mit dem spezifischen primären anti-c-Kit Antikörper im Verhältnis 1:1000 für eine Stunde inkubiert (Santa Cruz Biotec, antimouse, monoclonal). Dazu wurden die Blots in ein Plastikgefäß auf einen Schüttler gestellt. Zur Ladungskontrolle der

Proteinkonzentrationen pro Bande wurden die Blots zuvor an der 55kDa Bande in zwei Teile zerschnitten. Der obere Teil der Membran wurde mit dem proteinspezifischen Antikörper für c-Kit inkubiert, der untere mit anti β -actin (Sigma). So konnte kontrolliert werden, ob eine gleiche Proteinkonzentration auf jede Spur aufgetragen wurde.

1. Antikörper (c-Kit) 1:1000: 20ml PBS-T + 10 μ l Antikörper

Der untere Teil der Membran wurde mit anti- β -actin im Verhältnis 1:1000 für eine Stunde inkubiert.

1. Antikörper (anti β -actin) 1:1000: 20ml PBS-T + 1g Milchpulver + 10 μ l AK

Anschließend wurden die Blots 3x10 Minuten in PBS-T gewaschen. Der obere Membrananteil wurde danach in einem sekundären AK (antimouse, Fermentas) im Verhältnis 1:2500 ebenfalls für eine Stunde inkubiert.

2. Antikörper 1:2500: 20ml PBS-T + 8 μ l Antikörper

Der untere Teil wurde mit einem α RHRP (Horse-Radish-Peroxidase, antirabbit) 1:10000 inkubiert.

2. Antikörper 1:10000: 20ml PBS-T + 1g Milchpulver + 2 μ l AK

Auch hier wurden die Blots nach einer Inkubationszeit von einer Stunde anschließend 3x10 Minuten in PBS-T gewaschen.

Danach konnten die Blots detektiert werden. Dazu wurde 1ml ECL Detection Reagenz 1 und 1ml Detection Reagenz 2, Luminol Enhancer Solution, (jeweils von Pierce) vermennt und die ECL-Reagenzien mit dem Blot blasenfrei zwischen 2 mit Ethanol gereinigte Folien aufgelegt und inkubiert. Visualisiert wurden die Blots mittels Chemidoc (Biorad). Durch Chemilumineszenz übertragene Signale konnten die Proteine nach erforderlicher Expositionszeit detektiert werden (siehe Abbildung 7 und 8).

2.5 Untersuchung der Expression von c-Kit anhand von Sphäroid Modellen

2.5.1 Sphäroidkultivierung

Mit Hilfe der Agar-Overlayer Technik wurden aus Einzelzellen von Meningeom-Frischgewebe dreidimensionale Zellaggregate herangezüchtet. Parallel dazu wurde Frischgewebe bei -80°C eingefroren.

Zur Kultivierung von Sphäroiden werden die Zellsuspensionen auf nicht adhäsiven Oberflächen, in diesem Fall auf Agarose, bei 37°C inkubiert [Yuhas et al. 1977].

Die Meningeomsphäroide wurden nach 2, 4 und 6 Wochen asserviert.

2.5.2 Western Blot - biochemische Analyse

Zur Überprüfung, ob in den verwendeten Tumorproben c-Kit exprimiert wird, wurden Western Blots sowohl vom Biopsat, als auch von den zugehörigen Sphäroiden unterschiedlichen Alters angefertigt. So wurden Sphäroide nach 2, 4 und 6 Wochen Kultivierungszeit asserviert, um einen möglichen zeitlichen Verlauf in der c-Kit Expression identifizieren zu können.

In der Neurochirurgie wurde je eine Probe zur immunhistochemischen Untersuchung formalinfixiert und eine Probe zur Western Blot Analyse bei -80°C kryokonserviert.

2.5.3 Vorbereitung der Proben

Als erstes wurden die Proben der Meningeome, welche uns bei -80°C konserviert vorlagen, vorbereitet. Unter stetiger Kühlung wurden die Proben abgewogen. Von den drei uns zur Verfügung stehenden Proben konnten zwei Proben auf 0,15g abgewogen werden. Von der dritten Meningeomprobe lagen lediglich 0,08g vor. Anschließend wurden je 50 μl Homogenisierungspuffer hinzugefügt und die Proben bei 2000rpm auf dem Mikro-Dismembrator homogenisiert. Dieses Vorgehen wurde zweimal wiederholt.

Im Anschluss daran wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradford Methode vorgenommen (siehe 2.4.1), um die Proteinbeladung anzugleichen.

Da die Sphäroide der oben genannten Gewebe bereits in verwendbarer Größe vorlagen, konnten diese ohne weitere Homogenisierung zur Proteinkonzentrationsbestimmung

herangezogen werden.

Von Sphäroiden der Tumorprobe 08/07 war keine ausreichende Proteinmenge vorhanden, um diese auf ein Gel aufzutragen. Sphäroide aus der Woche 6 konnten lediglich in der Probe 10/07 eine ausreichende Proteinmenge aufweisen.

Die Western Blots wurden nach dem gleichen Vorgehen, wie bereits in Kapitel 2.4.1-2.4.3 beschrieben, durchgeführt.

Die folgende Abbildung zeigt Schemata nach denen Proben auf SDS PAGE-Gele aufgetragen wurden.

1. Gel („Originaltumorgewebe“):

Marker	Positiv Kontr.	Negativ Kontr.	M 08/07	M 09/07	M 10/07
--------	-------------------	-------------------	------------	------------	------------

2. Gel (Meningeom Sphäroide)

Marker	Positiv Kontr.	Negativ Kontr.	M 2.W. 09/07	M 2.W. 10/07	M 4.W. 09/07	M 4.W. 10/07	M 6.W 09/07
--------	-------------------	-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-------------------

Abbildung 4: Schemata der Meningeomsphäroidproben für die SDS PAGE-Gele

2.6 Genetische Untersuchungen von Meningeomen - DNA Sequenzierung

2.6.1 PCR - Mutationsanalyse des c-Kit Gens

Neben dem Nachweis der c-Kit Expression in Meningeomen auf immunhistologischer und chemischer Ebene erfolgte die Untersuchung auf Mutationen innerhalb des c-Kit-Gens. Zur Amplifikation der DNA wurde eine Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction PCR) durchgeführt.

Die PCR ist eine in der Molekularbiologie häufig angewandte Technik. Die PCR beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten. Als erstes wird die DNA denaturiert. Dazu wird die Reaktionslösung auf 94°C erhitzt. Dadurch werden die beiden komplementären DNA Stränge voneinander getrennt. Durch das anschließende Herabsetzen der Temperatur auf 56°C binden die Primer an den komplementären Stellen der DNA. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Die Polymerase verlängert im dritten Reaktionsschritt den Nukleotidstrang des Primers entsprechend der DNA-Sequenz. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte wird bei jedem Mal die Anzahl an kopierten DNA-Molekülen verdoppelt. Die DNA Vorlage wird exponentiell amplifiziert.

2.6.2 Sequenzierung nach Sanger

Die Didesoxymethode nach Sanger, auch Kettenabbruch-Synthese genannt, stellt eine enzymatische Methode dar. Sie wurde von Sanger um 1975 entwickelt und bereits 1977 mit der ersten vollständigen Sequenzierung eines Genoms (Bakteriophage ϕ X174 [Sanger et al. 1977 a]) vorgestellt [Sanger et al. 1977 b].

Die Methode beruht auf der in-vitro-Synthese eines Komplementärstranges (PCR-Methode, siehe oben) zu einem der beiden Einzelstränge der DNA, die man sequenzieren möchte. Dazu wird zunächst die DNA-Doppelhelix durch Erwärmung denaturiert. Die so entstandene einzelsträngige DNA dient als Matrize, an der mittels eines Primers, der DNA-Polymerase und den vier Desoxyribonukleotiden die Synthese des komplementären Stranges beginnen kann [Wiedmann 2006]. In den vier gleichen Ansätzen, welche alle die vier Nucleotide beinhalten, wird je eine der vier Basen zum Teil als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zugegeben. Diese bewirken die sogenannte Kettenabbruchreaktion. Eine DNA Verlängerung durch die DNA

Polymerase ist nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nucleotids fehlt. Folglich entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Der Primer oder das Kettenabbruch-ddNTP ist durch eine fluoreszierende Gruppe markiert wodurch die Sequenz der vier Ansätze nach der Sequenzierreaktion in der Gelelektrophorese abgelesen werden kann [Sanger et al. 1977 b].

Mit Hilfe der Sequenzierung kann die Abfolge der Nukleotidsequenz ermittelt werden und damit direkt die Erbinformation gelesen werden. Auf diese Weise können genetische Erkrankungen identifiziert werden.

Die Exone 9, 11 und 13 sind „hotspots“ für Mutationen und wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie in der Arbeitsgruppe von PD Dr. R. Simon des Universitätsklinikums Hamburg/Eppendorf untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der IHC für c-Kit in Meningeomen

Insgesamt wurden 80 Meningeome unterschiedlichen Subtyps untersucht (siehe Tabelle 3). Davon wiesen 23 Fälle eine positive c-Kit Färbung auf. Davon 21 vom WHO Grad I und 3 vom WHO Grad II. 43 Meningeome zeigten eine schwache bzw. keine Färbung. Von diesen verteilte sich der WHO Grad I auf 37 und der WHO Grad II auf 6 Fälle an negativen c-Kit Färbungen. Das entspricht einem Anteil von 63% an der negativen und 36% an der positiven Färbung beim WHO I und 33% positiver und 66% negativer Färbung beim WHO Grad II. Im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung mittels TMA, bei der 83% der WHO I Meningeome und 91% der WHO II Meningeome positiv waren, weichen die aktuellen Ergebnisse ab. Es lagen keine WHO III Proben zur Untersuchung vor. Insgesamt waren 13 Meningeomproben nicht auswertbar.

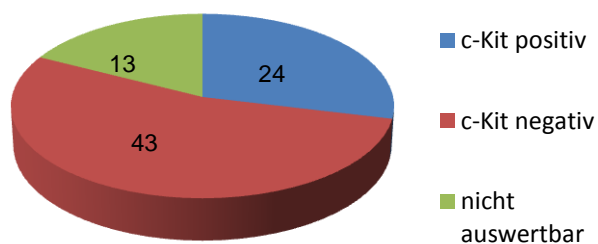


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Ergebnisse der c-Kit Färbungen unter Betrachtung ihrer prozentualen Verteilung auf negative und positive c-Kit Expression in Meningeomen.

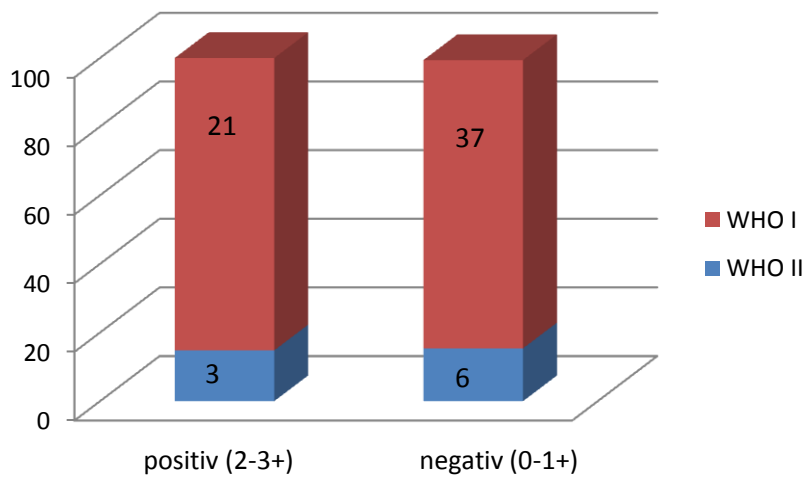


Abbildung 6: Graphische Darstellung der c-Kit Färbung (von 2006-2008) im Zusammenhang mit den WHO Graden I und II. Insgesamt 67 ausgewertete Meningeome.

Immunhistochemische, genetische und biochemische Untersuchungen zur Expression von c-Kit in Meningeomen

Patient	Subtyp	WHO	Alter	Geschlecht	c-KIT
1	transitional	I	70J.	f	n.a.
2	meningotheliomatös	I	44J.	m	1+
3	meningotheliomatös	I	48J.	f	2+
4	meningotheliomatös	I	59J.	f	2+
5	meningotheliomatös	I	47J.	f	1+
6	fibroblastisch	I	68J.	f	0/-
7	meningotheliomatös	I	47J.	f	1+
8	meningotheliomatös	I	66J.	f	1+
9	meningotheliomatös	I	61J.	f	1+
10	meningotheliomatös	I	47J.	m	n.a.
11	meningotheliomatös	I	56J.	f	n.a.
12	fibroblastisch	I	47J.	f	1+
13	meningotheliomatös	I	56J.	f	1+
14	meningotheliomatös	I	11J.	m	2+
15	fibrozytisch/meningothelial	I	73J.	f	2+
16	fibroblastisch	I	73J.	m	2+
17	atypisch	II	69J.	f	2+
18	meningotheliomatös	I	61J.	f	1+
19	meningotheliomatös	I	72J.	f	1+
20	meningotheliomatös	I	39J.	f	2+
21	transitional	I	80J.	m	2+
22	meningotheliomatös	I	63J.	m	n.a.
23	meningotheliomatös	I	58J.	f	3+
24	meningotheliomatös	I	70J.	m	1+
25	transitional	I	86J.	f	0-1+
26	meningotheliomatös	I	67J.	m	1+
27	meningotheliomatös	I	59J.	f	1+
28	meningotheliomatös,angiomatös	I	38J.	f	0-1+
29	transitional	I	65J.	f	1+
30	meningotheliomatös	I	54J.	f	0-1+
31	meningotheliomatös	I	67J.	m	n.a.
32	meningotheliomatös	I	45J.	f	0-1+
33	atypisch	II	64J.	m	0-1+
34	psammomatös	I	62J.	f	n.a.
35	meningotheliomatös	I	47J.	f	1+
36	meningotheliomatös	I	80J.	f	n.a.
37	transitional	I	40J.	m	1-2+
38	atypisch	II	76J.	m	2+
39	meningotheliomatös	I	8J.	f	2+
40	psammomatös	I	79J.	f	2+
41	atypisch	II	49J.	m	3+
42	meningotheliomatös	I	61J.	f	2+
43	meningotheliomatös	I	53J.	f	2+
44	angiomatös	I	69J.	f	1+
45	atypisch	II	69J.	m	1+

Immunhistochemische, genetische und biochemische Untersuchungen zur Expression von c-Kit in Meningeomen

46	atypisch	II	71J.	m	n.a.
47	meningotheliomatös	I	71J	m	n.a.
48	meningotheliomatös	I	73J.	m	n.a.
49	transitional	I	77J.	f	0-1+
50	transitional	I	75J.	m	1+
51	atypisch	II	69J.	f	0/-
52	fibroblastisch	I	49J.	f	n.a.
53	fibroblastisch	I	57J.	f	n.a.
54	fibroblastisch	I	48J.	m	2+
55	chordoid	II	70J.	m	1+
56	transitional	I	66J.	f	n.a.
57	meningotheliomatös	I	55J.	f	0/-
58	meningotheliomatös	I	63J.	f	2+
59	meningotheliomatös	I	44J.	f	2+
60	atypisch	II	31J.	m	1+
61	transitional	I	61J.	f	1+
62	meningotheliomatös	I	69J.	m	1+
63	transitional	I	57J.	m	0/-
64	transitional	I	57J.	m	0-1+
65	angiomatös/mikrozystisch	I	69J.	f	0-1+
66	transitional	I	55J.	f	0/-
67	atypisch	II	65J.	f	0-1+
68	psammomatös	I	54J.	f	3+
69	fibroblastisch	I	44J.	f	1-2+
70	transitional	I	54J.	f	2+
71	meningotheliomatös	I	62J.	f	2+
72	meningotheliomatös	I	62J.	f	0-1+
73	chordoid/atypisch	II	68J.	f	1-2+
74	fibroblastisch	I	58J.	f	n.a.
75	meningotheliomatös	I	49J.	f	2-3+
76	transitional	I	56J.	f	0/-
77	transitional	I	51J.	f	0-1+
78	fibroblastisch	I	59J.	f	1+
79	meningotheliomatös	I	47J.	f	0-1+
80	meningotheliomatös	I	69J.	f	n.a.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der IHC für c-Kit (2006-2008)

n.a. = nicht auswertbar

3.2 Ergebnisse der Western Blots

3.2.1 Expression von c-Kit in Meningeomen

Der Western Blot diente dem biochemischen Nachweis des c-Kit-Proteins. Dazu wurden Gewebeproben diverser Meningeome (starke bzw. fehlende c-Kit Expression laut IHC) untersucht. Als Positivkontrolle dienten Zelllysate von GISTs. Als Negativkontrolle dienten Zelllysate von nicht pathologisch verändertem menschlichem Hirn. Das c-Kit-Protein hat eine Größe von 145 kDa und das β -actin Protein eine Größe von 45 kDa. β -actin ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, welches als Beladungskontrolle diente.

Das c-Kit-Protein konnte in Meningeomen lediglich in einem Fall deutlich nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8). Dabei handelt es sich um ein atypisches Meningeom vom WHO Grad II mit überwiegend transitionalem Wachstumsmuster und einem fokal erhöhten Proliferationsindex. Vereinzelt treten Tumornekrosen und Mitosen auf. Neben dem histologischen Befund des Tumors wurde auch ein infiltriertes Kalottenstück untersucht. Das Restmaterial wurde zur Überprüfung der Diagnose in einer Stufenserie aufgearbeitet. Diese ergab keinen Anhalt auf höhergradige Dedifferenzierung und somit auf eine maligne Transformation.

In den Sektionsfällen mit Arachnoidea konnte das c-Kit Protein nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7)

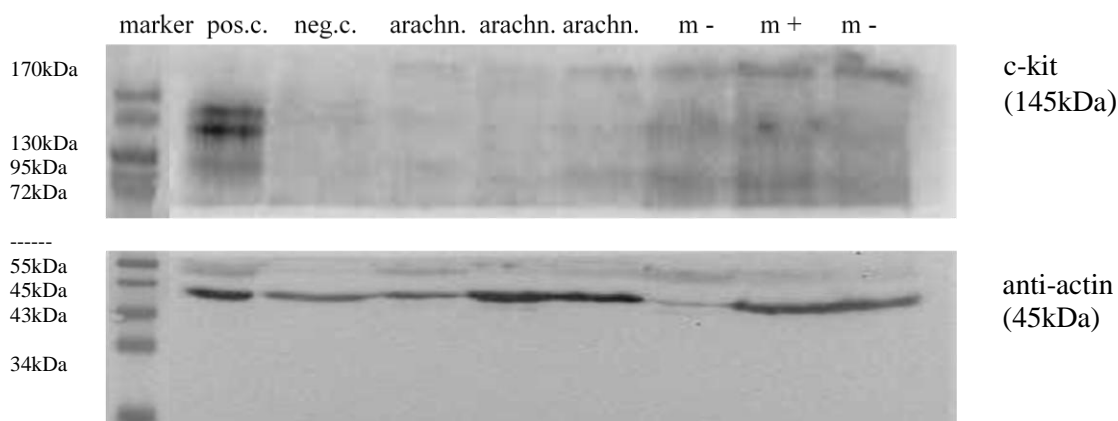


Abbildung 7: Western Blot mit Proben von Meningeomen (c-Kit positiv (m+), c-Kit negativ (m-), Sektionsfälle mit Arachnoidea (arachn.), Negativ- und Positivkontrolle (neg., pos.c.)).

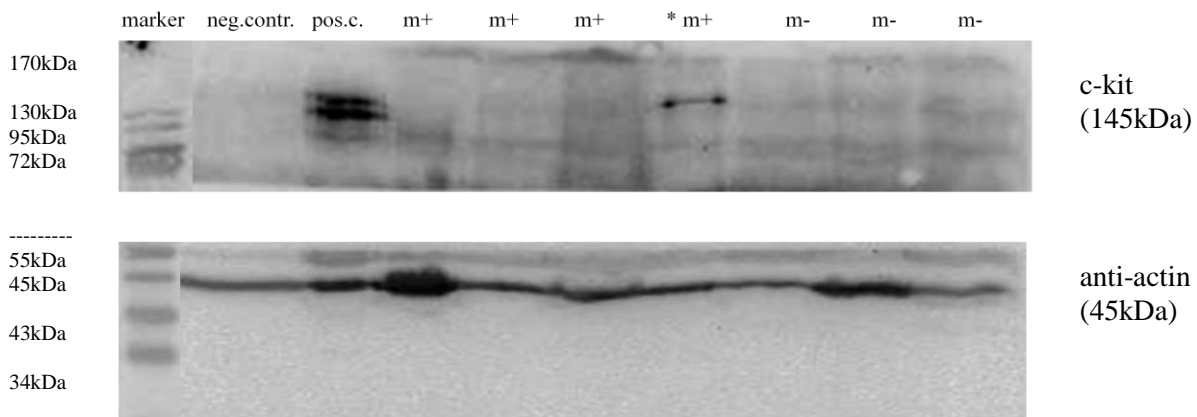


Abbildung 8: Western Blot mit Meningeomproben (c-Kit positiv, c-Kit negativ, Negativ- und Positivkontrolle). Die mit * gekennzeichnete lane zeigt bei 145kDa eine deutliche Bande (* fibroblastisch, atypisch, WHOII).

3.2.2 Expression von c-Kit in Meningeomsphäroiden

Der Western Blot der Meningeomsphäroide sollte zur Darstellung eines möglichen zeitlichen Verlaufes der c-Kit Expression in Meningeomen dienen.

Die Abbildung 9 stellt zunächst den Blot der Originaltumorresektate dar. Diese zeigen keine c-Kit Expression.

In Abbildung 10 ist der Blot der Meningeomsphäroide dargestellt. Aus den Abbildungen 9 und 10 lässt sich schließen, dass weder im Originaltumor noch in den Meningeomsphäroidkulturen eine c-Kit Expression vorliegt.

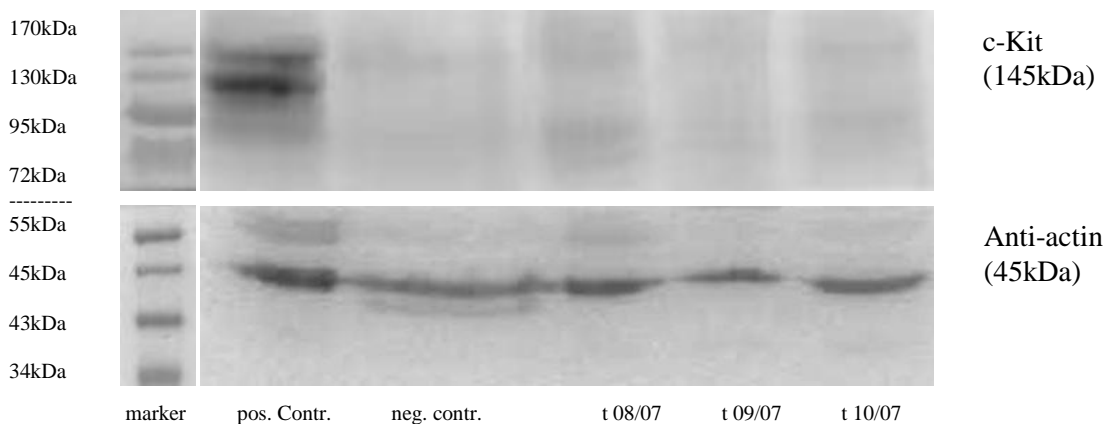


Abbildung 9: Western Blot der Primärtumorgewebe (t08/09/10/-07) (WHO I und II)

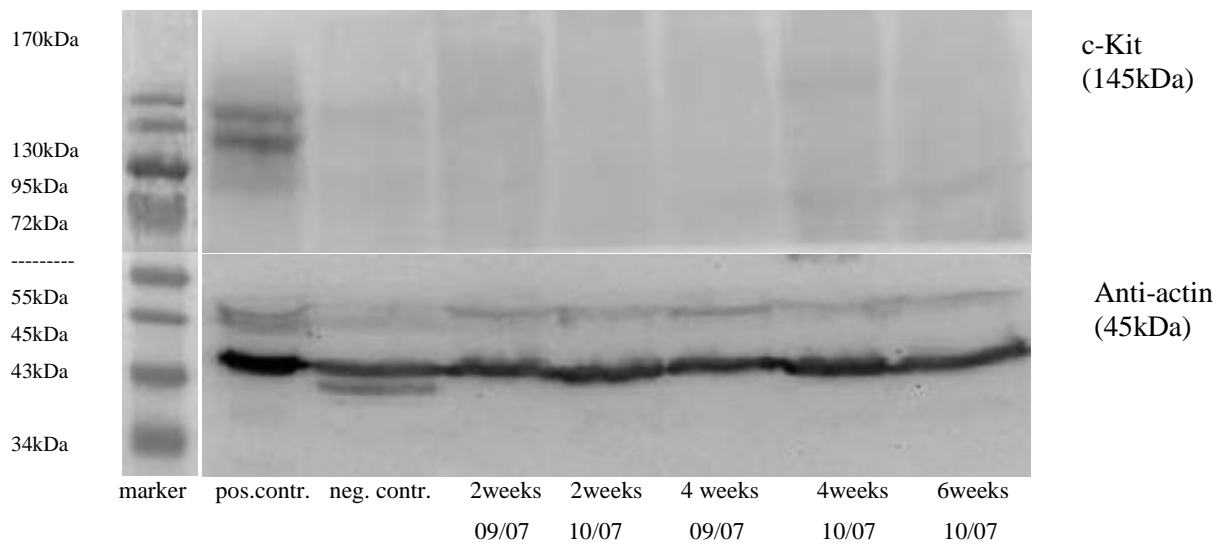


Abbildung 10: Western Blot der Meningeomsphäroide (2, 4 und 6 Wochen alt).

3.3 Ergebnisse der DNA Sequenzierung

Nach der PCR und der Sequenzierung von Exon 9, 11 und 13 von c-Kit konnten keine Mutationen in diesen Regionen festgestellt werden.

Patient	Subtyp	WHO	Alter	Geschlecht	c-KIT	Ergebnis
1	atypisch	II	60	W	3+	wt
2	atypisch	II	30	W	2+	wt
3	atypisch	II	76	W	2+	wt
4	microzystisch	I	56	W	1+	wt
5	meningothelial	I	32	M	3+	wt
6	fibroblastisch	I	67	W	3+	wt
7	anaplastisch	II	68	M	0	wt
8	atypisch	II	28	W	1+	wt
9	anaplastisch	II	28	W	0	wt
10	atypisch	II	53	W	3+	wt
11	meningothelial	I	52	M	3+	wt
12	fibroblastisch	I	56	M	3+	wt
13	meningothelial	I	64	M	3+	wt
14	transitional	I	55	W	3+	wt
15	atypisch	II	53	W	3+	wt
16	fibroblastisch	I	23	W	3+	wt
17	fibroblastisch	I	27	W	3+	wt
18	meningothelial	I	59	M	3+	wt
19	microzystisch	I	43	?	0	wt
20	fibroblastisch	I	78	W	0	wt
21	meningothelial	I	50	W	0	wt
22	transitional	I	62	W	0	wt
23	fibroblastisch	I	43	W	1+	wt
24	psammomatös	I	57	W	1+	wt

4 Diskussion

In einer Tissue Microarray basierten Studie, in der immunhistochemische Marker zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit bei Meningeomen untersucht wurden, konnte eine hohe Expression von c-Kit in Meningeomen beobachtet werden [Kreher 2008]. Daher lag unser Interesse darin, die c-Kit Expression in Grobschnitten von Meningeomen näher zu untersuchen. Ferner wurde die Expression von c-Kit in Meningeomen biochemisch untersucht und anschließend genetische Untersuchungen durchgeführt

Da in einer Dissertation von Kreher [2008] eine große Anzahl an Meningeomen in der IHC positiv für c-Kit erschienen (84%) galt es zu klären, in wie weit c-Kit bzw. dessen Mutation an der Entstehung von Meningeomen beteiligt ist. Bei den Untersuchungen wurden 359 Meningeome von 229 Patienten immunhistologisch mit Hilfe eines TMA ausgewertet. Von diesen 346 reagierten 84% positiv auf c-Kit. Ein Unterschied in der Positivität ist bei einem Vergleich zwischen nicht rekurrenten und rekurrenten Meningeomen nicht feststellbar: 86% aller NRM reagieren positiv, wohingegen 83% aller RM positiv sind [Kreher 2008]. In vorherigen immunhistochemischen Studien haben 2% von 44 untersuchten Meningeomen c-Kit exprimiert [Went et al. 2004]. Eine weitere Studie von Skardelly et al entdeckte immunhistochemisch lediglich in einem WHO III Meningeom eine c-Kit Expression. Das untersuchte WHO Grad I Meningeom wies immunhistochemisch keine c-Kit Expression auf. Insgesamt wurden in der Studie um Skardelly lediglich 2 Meningeome als Kontrollproben immunhistochemisch untersucht [Skardelly et al. 2009]. Unterschiede zu unseren Ergebnissen und denen anderer Studien können in unterschiedlichen Auswertmethoden bzw. unterschiedlichem präanalytischen Probenmanagement, wie z.B. unterschiedlicher Fixationstechniken, begründet sein. Es gibt keine offiziell empfohlene immunhistochemische Methode für c-Kit. Die Anwendung unterschiedlicher c-Kit Antikörper und deren Verdünnung können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Deshalb haben wir im Vorraus verschiedene Verdünnungen des Antikörpers getestet. Mit der 1:100 Verdünnung konnte in unseren Untersuchungen die höchste Sensibilität und der minimalste Hintergrund erzielt werden.

In dieser Arbeit wurden 80 Meningeome unterschiedlichen Subtyps untersucht. Von den auswertbaren Meningeomen erschienen 35% positiv und 65% negativ in der IHC für c-Kit.

Weiterführende Untersuchungen von 10 Meningeomgewebeproben (6 c-Kit +, 4

c-Kit-) mittels Western Blot zeigten eine Diskrepanz zwischen den IHC Ergebnissen und den biochemisch erhobenen Daten. Lediglich in einem Fall konnte biochemisch eine deutliche c-Kit Expression nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass es sich bei diesem Ergebnis nicht um ein Artefakt handelt, wurde der Western Blot mit dem identischen Tumorgewebe mehrfach wiederholt. Das Ergebnis blieb gleich. Dieser Einzelfall ist somit nicht signifikant und lässt sich wahrscheinlich darin begründen, dass die Menge an c-Kit in den Meningeomen generell zu gering ist, und das Western Blot Verfahren eine nicht ausreichend sensitive Methode darstellt. Obwohl die IHC in der Regel weniger sensitiv ist als biochemische Verfahren wie z.B. Western Blotting, scheint es bei Meningeomen so zu sein, dass die IHC sensitiver ist bzw. eine andere Form von c-Kit erkennt [Potti et al. 2005].

Um die Expression von c-Kit im zeitlichen Verlauf von Meningeomsphäroiden zu untersuchen, wurden im Anschluss Western Blots mit Sphäroiden von Meningeomen durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass keine der untersuchten Meningeom- oder Meningeomsphäroidproben c-Kit exprimiert.

Zusätzlich wurden Sequenzierungen von Kit positiven und Kit negativen Meningeomenproben durchgeführt, um mögliche Kit Mutationen zu identifizieren. Dazu wurden die Exone 9, 11 und 13 sequenziert, da bereits auf diesen Bereichen in vorherigen Untersuchungen von GISTs Mutationen identifiziert werden konnten. Die Auswertung der Sequenzierungen ergab, dass keinerlei Mutationen in den Meningeomproben vorlagen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Verhalten von Meningeomen bezüglich der Expression von c-Kit atypisch ist. Bei der Mehrzahl der immunhistochemischen Proben lässt sich eindeutig c-Kit nachweisen, während der biochemische Nachweis mittels Western Blot nur in Einzelfällen gelingt und keine c-Kit aktivierenden Mutationen gefunden werden können.

Bis heute umfasst die Therapie von Meningeomen lediglich die Resektion und die Therapie mittels Bestrahlung. Obwohl die operative Resektion die Therapie der ersten Wahl für Patienten mit Meningeomen darstellt, können dennoch Lokalisation und biologische Eigenschaften des Tumors eine komplette Resektion unmöglich machen. Eine entscheidende Rolle für die Lebenserwartung dieser Patienten spielt dabei auch die WHO Klassifizierung. Patienten mit einem Meningeom WHO Grad I haben im Falle einer vollständigen Resektion zumeist keine reduzierte Lebenserwartung. Rezidive bei Meningeomen des WHO Grades I werden in 7 bis 20% der Fälle diagnostiziert. Eine Progression wird selten beobachtet. Hingegen kommt es bei atypischen Meningeomen (WHO Grad II) in 30 bis 40% und bei anaplastischen

Meningeomen (WHO Grad III) in 50 bis 78% der Fälle zu Rezidiven [Kleihues et al. 2002]. Die mediane Überlebensrate von Patienten mit einem Meningeomen WHO Grad III liegt unter 2 Jahren [Perry et al. 1999].

Trotz Fortschritten und Verbesserungen der Therapiemöglichkeiten, besteht weiterhin die Schwierigkeit in der Therapie rekurrenter Meningeome. Diese Formen der Meningeome erweisen sich als besonders therapieresistent gegenüber konventionellen Therapiemöglichkeiten. Die Chemotherapie zeigt begrenzten Erfolg und auch die Hormontherapie ist weitestgehend ineffektiv [Norden et al. 2007].

Neuere Methoden für die Therapie der Meningeome basieren auf dem Verständnis der molekularen Eigenschaften dieser Tumore. Die Schwierigkeit im Fortschritt der Therapie von Meningeomen liegt im mangelnden Verständnis der Pathogenese und molekularer Veränderungen, welche das Tumorstadium hervorrufen, begründet. Bis heute gibt es keine signifikanten Erfahrungen mit gezielten molekularen Wirkstoffen für systemische Tumore und maligne Gliome, welche als effektive Therapiestrategien gegen Meningeome eingesetzt werden könnten [Norden et al. 2007]. Dazu müssen in Zukunft klinische Versuchsmodelle erstellt werden, in denen Zelllinien von Meningeomen als Ziel für molekulare Wirkstoffe dienen. Hierzu sind bereits erste Überlegungen für in vitro Versuche in der neurochirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg/Eppendorf unter der Leitung von Dr. Oliver Heese angestellt worden.

Die Expression von c-Kit wurde bereits in einer großen Vielzahl von Tumoren beschrieben. In GISTs ist die c-Kit Positivität besonders hoch (90-95%). Studien zeigen in 80 bis 90% aller GISTs gleichzeitig eine KIT-Mutation [Antonescu et al. 2004, Henrich et al. 2003]. In transgenen Mäusen wurde der Nachweis für den Zusammenhang zwischen der GIST-Entstehung und der KIT-Mutation erbracht [Sommer et al. 2003]. Die Annahme, dass bei Meningeomen eine derartige Mutation im c-Kit kodierenden Gen vorliegt, begründet sich damit, dass c-Kit bei einem Teil der Meningeome hoch exprimiert ist.

Da es sich bei den GISTs um Malignome handelt und in unserer Studie nur benigne Tumore untersucht wurden, liegt die Vermutung nahe, dass keine c-Kit Expression auftritt. Allerdings konnte schon in vorherigen Studien bei benignen und semibenigen Hauttumoren eine c-Kit Expression festgestellt werden [Went et al. 2004].

Kitamura et al. beschrieben eine inaktivierende (Loss-of-function) Mutation in c-Kit, welche zu einem Mastzelldefekt- bzw. mangel führt. In diesen Mutationen sahen sie die Tumorigenese für intestinale ICC-Tumore (interstitielle Cajalzelltumore), den

gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) begründet [Rubin 2006]. Bestätigt wurde diese Theorie bereits 1998 durch Untersuchungen von Hirota et al. Die Expression von c-Kit bzw. dessen Mutation in malignen Tumoren ist von großer Bedeutung, da es als Zielstruktur für den Tyrosinkinaseinhibitor STI571 gilt. Die erste erfolgreiche Behandlung mit einem Tyrosinkinasehemmer erfolgte an einem finnischen Patienten mit einem fortgeschrittenen GIST [Joensuu et al. 2001, Kitamura et al. 2003]. STI571, Gleevec oder Imatinib wird heute erfolgreich bei Patienten mit GISTs angewendet [Demetri et al. 2002, van Oosterom et al. 2001, Hernandez-Boluda et al. 2002]. Dabei wird die durch Mutation aktivierte Typ 3 Rezeptor-Tyrosin-Kinase (KIT) inhibiert. Imatinib kam ursprünglich zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie zum Einsatz. Hierbei setzt es an der Funktion des BCR/ABL Fusionsproteins an [Druker 2001, Kantarjian et al. 2002].

Die Entwicklung von Imatinib (Gleevec®) hat gezeigt, dass die Kenntnis über genetische Defekte, die das Tumorwachstum hervorrufen, zur Entwicklung wirksamer Präparate genutzt werden kann. Dieses Wissen und die Erfolge der Imatinib-Behandlung bei Patienten mit GISTs führten in unseren Untersuchungen zu der Überlegung, das Indikationsgebiet möglicherweise erweitern zu können.

Bereits Went et al. beobachteten in einer Studie eine KIT Positivität bei Meningeomen mittels immunhistochemischen Analysen. Darin exprimierten allerdings nur 2% von 44 getesteten Meningeomen c-Kit. Weiterhin entdeckten diese Autoren, dass Kit Gen Mutationen selten in immunhistochemisch Kit-positiven Tumoren zu finden sind und gingen davon aus, dass eventuell Mutationen in noch nicht identifizierten Tyrosinkinasen auftreten [Went et al. 2004]. Die Gruppe um Went identifizierte Kit Mutationen in GISTs und vereinzelt in Melanomen auf Exon 11. Andere Studien haben ergeben, dass Meningeome kein c-Kit exprimieren. Die Arbeitsgruppe um Willems untersuchte 37 intrakranielle Meningeome unterschiedlicher WHO Grade mittels IHC. Als Positivkontrolle wurde auch hier GIST verwendet. Lediglich ein Meningeom (WHO Grad III) zeigte sich in der IHC positiv. Mutationsanalysen wurden folglich nicht durchgeführt. Sie nahmen an, dass die Kit Expression nicht entscheidend für die Entstehung dieser Tumore sei. Jedoch schlossen sie den Nutzen einer möglichen Therapie mittels Imatinib für Meningeome mit malignem Verhalten nicht aus, da Proteinprodukte anderer Rezeptortyrosinkinasen, wie dem PDGFa, durch diesen Wirkstoff beeinflusst werden könnten [Willems et al. 2007]. Unterschiede unserer Untersuchungen zu den Ergebnissen anderer Studien können mit der Wahl unterschiedlicher Antikörper bei der IHC, anderer Färbekonditionen oder

abweichenden Auswertmethoden begründet werden.

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass der Therapieerfolg durch Imatinib nicht von der c-Kit Expression abhängig ist und dass nicht alle c-Kit positiven Tumorpatienten auch von dieser Therapie profitieren [Johnson et al. 2003]. Vielmehr sind spezifische c-Kit Mutationen mit einer erfolgreichen Wirkung von Imatinib verknüpft [Longley et al. 2001], wobei Tumore mit Mutationen auf Exon 11 besser auf eine derartige Therapie ansprechen, als solche mit Mutationen auf Exon 9 [Heinrich et al. 2003].

Bei den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Medeiros wiesen ca. 4% der getesteten GISTs keine Überexpression von c-Kit auf, woraufhin die Aktivierung eines alternativen Onkoproteins als zugrundeliegender molekularpathogenetischer Mechanismus diskutiert wurde [Medeiros et al. 2004]. Bei den GISTs geht man von einer Subgruppe von 5-10% aller GIST aus, für die weder in c-Kit noch in PDGFRA eine identifizierbare Mutation nachweisbar ist. Die naheliegende Hypothese zur Erklärung der Tumorentstehung besteht darin, dass eine aktivierende Mutation entweder in einem anderen Kit- bzw. PDGFRA-analogen Tyrosinkinase-Rezeptor, oder in einem nachgeschalteten Signalmolekül der Kit-/PDGFRA-vermittelten Signalkaskade lokalisiert ist [Rubin 2006]. Dieser Theorie schließen wir uns hinsichtlich unserer Untersuchungsergebnisse über Meningeome an. Zu untersuchen wäre, ob in diesem Fall eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren Wirkung zeigt. Miettinen et al. untersuchten im Jahre 2000 vier CD117-positive Angiosarkome, bei denen sie weder in Exon 11, noch in Exon 17 eine Mutation bei c-Kit finden konnten [Miettinen et al. 2000]. CD 117 ist ein Synonym für c-Kit. Auch Heinrich und Mitarbeiter erhielten ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung von c-Kit-positiven Erkrankungen. In der Gruppe der Angiosarkome, mit einer c-Kit-Expressionsrate von 56%, konnten auch hier bisher keine Mutationen festgestellt werden [Heinrich et al. 2002]. Die Sequenzanalyse erbrachte keine GIST-typischen genomischen Mutationen in den Protoonkogenen c-Kit und dem PDGFRA. Trotzdem konnte ein positiver Therapieerfolg mit STI571 mit Tumorrückbildung beobachtet werden [Müller et al. 2003]. Der PDGF ist bei der autokrinen Wachstumsstimulation und malignen Transformation vieler Tumore beteiligt. Die Expression von PDGF und seinem Rezeptor PDGFR beta korreliert mit dem WHO Grad und der Proliferation von Meningeomen und wurde mit der Pathogenese von Meningeomen in Zusammenhang gestellt. Der Einfluss von weiteren Wachstumsfaktoren ist bis heute für das Wachstum der Meningeome nicht eindeutig geklärt [Yang et al. 2001, Maxwell et al. 1990]. Die

Kit-Expression in Angiosarkomen stellt vermutlich eine onkofetale Expression dar, vergleichbar mit der Kit-Expression in sich entwickelndem Endothel. Allerdings bleibt offen, ob c-Kit an der Tumorigenese des beschriebenen Imatinib-sensiblen Angiosarkoms beteiligt ist. Ähnliches gilt für die Entstehung von Meningeomen.

Wie in unseren Untersuchungen bereits begonnen, ist die Berücksichtigung der genetischen Profile der Tumore für die gezielte Wirkstoffauswahl in klinischen Versuchen wichtig. Die Hoffnung liegt darin, dass neuartige Therapieansätze die bisherigen Methoden ergänzen und zu einer effektiveren Behandlung von Patienten mit Meningeomen, insbesondere den inoperablen, führen. Speziell die Erkenntnisse über die Expression von c-Kit in Meningeomen sind sowohl für die Differentialdiagnose von anderen mesenchymalen Tumoren, als auch für potentielle neue Behandlungen von atypischen und anaplastischen Meningeomen von großer Bedeutung.

Diese aufgeführten Veränderungen lassen die Komplexität der Pathogenese von Meningeomen erkennen. Für die zukünftige Forschung bedarf es einer genauen Kenntnis dieser einzelnen Faktoren, um in Zukunft inoperable Meningeome erfolgreich therapieren zu können.

5 Zusammenfassung

Meningeome sind die häufigsten gutartigen intrakraniellen Tumore neuroektodermaler Herkunft. Zur Zeit gibt es ein Mangel an prädiktiven Biomarkern, die eine Vorhersage über den Verlauf und eine sichere Prognose zulassen.

In dieser Promotion wird untersucht, ob die Tyrosinrezeptor-Kinase c-Kit in der Initiation sowie Progression von Meningeomen eine Rolle spielt. Hierfür wurden in einem Kollektiv von 80 Patienten mit Meningeomen immunhistochemische, biochemische sowie genetische Untersuchungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass c-Kit immunhistochemisch in einer großen Anzahl von Meningeomen detektiert werden kann, biochemisch war c-Kit jedoch nur in einzelnen Fällen nachzuweisen. Genetisch fanden sich keine Mutationen innerhalb des c-Kit-Gens bei Patienten mit Meningeomen.

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass obschon c-Kit immunhistochemisch auf Meningeomzellen detektiert werden kann, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Gruppen, keine biochemischen oder genetischen Daten erhoben werden konnten, um die Beteiligung von c-Kit an der Pathophysiologie und dem Progress von Meningeomen zu erhärten. Weitere Studien an größeren Kohorten von Meningeompatienten unterschiedlichster Malignität und Verlaufsformen werden darauf zielen den Zusammenhang zwischen c-Kit und Meningeomenentstehung weiter aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

- Antonescu CR, Viale A, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Gonen M, Segal NH, Maki RG, Socci ND, De Matteo RP, Besmer P: Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:3282–3290
- Bauer S: Tyrosinkinase-Inhibition bei soliden Tumoren am Beispiel von Imatinib bei GIST, *Onkologie heute*. Universitätsklinikum Essen; 2003
- Burger PC, Scheithauer BW. *Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Central Nervous System*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1994; 277-286
- Cetin N, Dienel G, Gokden M: CD117 expression in glial tumors, *Clinical Study, Journal of Neuro-Oncology* 2005; 75: 195–202
- Collins VP, Nordenskj M, Dumanski JP: The molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathol* 1990; 1: 19-24
- Croom AF, Perry CM: Imatinib mesylate: in the treatment of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs* 2003; 63(5):513-22
- Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R: Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8, 3034-3038
- Debus J, Wuendrich M, Pirzkall A, Hoess A, Schlegel W, Zuna I, Engenhart-Cabillic R, Wannemacher M: High Efficacy of Fractionated Stereotactic Radiotherapy of Large Base-of-Skull Meningiomas: Long-Term Results; *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19(15): 3547-3553
- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA,

- Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347: 472–480
- Druker B: Signal transduction inhibition: Results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol.* 2001; 38:9–14
 - Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjöld M, Collins VP: Molecular Genetic analysis of Chromosome 22 in 81 Cases of Meningioma. *Cancer Res* 1990; 50: 5863-5867
 - Engelhard HH: Progress in the diagnosis and treatment of patients with meningiomas. Part I: diagnostic imaging, preoperative embolization. *Surg Neurol* 2001; 55: 89–101
 - Fleishman RA: Engraftment of W/c-kit mutant mice is determined by stem cell competition, not by increased marrow 'space'. *Exp. Hematol.* 1996; 24, 209-213
 - Galli SJ, Tsai M, Wershil BK: The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol.*; 1993; 142, 965-974
 - Giebel LB, Spritz RA: Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88, 8696-8699
 - Grabbe J, Welker P, Dippel E, Czarnetzki BM: Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 1994; 287, 78-84
 - Graham DI, Lantos PL: Cellular pathology of the central nervous system; *Greenfield's Neuropathology.* Arnold. 1997; 85-156
 - Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13, 1899-1911

- Hamann K, Grabbe J, Welker P, Haas N, Algermissen B, Czarnetzki BM: Phenotypic evaluation of cultured human mast and basophilic cells and of normal human skin mast cells. *Arch. Dermatol. Res.* 1994; 286, 380-385
- Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL: Inhibition of Kit tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of Kit-positive malignancies. *2002 J Clin Oncol* 20:1692-1703
- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD: Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin Oncol.* 2003; 21:4342–4349
- Hernandez-Boluda JC, Cervantes F: Imatinib mesylate (Gleevec, Glivec): a new therapy for chronic myeloid leukemia and other malignancies. *Drugs Today (Barc.)*.2002; 38: 601–613
- Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, Krystal GW: Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ.* 1995; 6, 769-779
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein AW: kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. 1995; *Nature* 373, 347-349
- Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Well RO: *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours.* Churchill Livingstone. 2002; 88-141
- Jianmin Z, Hongfang W, Meifu F.: Resistance of multicellular aggregates to pharmorubicin observed in human hepatocarcinoma cells. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(2):255-260
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD: Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med.* 2001; 344, 1052-1056

- Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S: Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 9:5880–5887
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta M, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002; 346:645–652
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM: Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* 1998; 152, 1259-1269
- Kitamura Y, Hirota S, Nishida T: Gastrointestinal stromal tumors (GIST): A model for molecule-based diagnosis and treatment of solid tumors. *Cancer Sci.* 2003; 94:315-320
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK: The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Mar;61(3):215-25
- Kleihues P, Cavenee WK: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press: Lyon; 2000
- Kreher T: Untersuchungen von Biomarkern zur Vorhersage der Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen, Dissertation, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Neuropathologie, 2008
- Kujas M: Meningioma. *Curr Opin Neurol;* 1993; 6: 882-887
- Kunz-Schughart LA, Doetsch J, Mueller-Klieser W, Groebe K: Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278(4):765-780

- Kunz-Schughart LA.: Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int.* 1999; 23(3):157-161
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 1970; 680-685
- Lamszus K: Meningioma pathology, genetics and biology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63(4):274-86
- Landuzzi L, De Giovanni C, Nicoletti G, Rossi I, Ricci C, Astolfi A, Scopece L, Scotlandi K, Serra M, Bagnara GP, Nanni P, Lollini PL: The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am. J. Pathol.* 2000; 157, 2123-2131
- Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y: Classes of c-KIT activating mutations: Proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 2001; 25:571-576
- Lottspeich F, Zorbas H: *Bioanalytik, Spektrum Lehrbuch*, 1998; 94
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: The 2007 WHO Classification of tumors of the central nervous system. Review, *Acta Neuropathology* 2007; 114:97–109
- Majumder S, Brown K, Qiu FH, Besmer P: C-kit protein, a transmembrane kinase: Identification in tissues and characterization. *Molec. cell. Biol.* 1988; 8, 4896-4903
- Maxwell M, Galanopoulos T, Hedley-Whyte ET, Black PM, Antoniades HN: Human meningiomas co-express platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes and their protein products. *Int J Cancer.* 1990; 46:16–21
- Mayer TC, Green MC: An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the W and S1 loci in mice. *Dev. Biol.* 1968; 18, 62-75

- Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CDM: Kit-negative gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28:889-894
- Meese E, Blin N, Zang KD: Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet.* 1987; 77: 349-351
- Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M: Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod. Pathol.* 2000; 13:1134-1142
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J: Kit expression in angiosarcomas and fetal endothelial cells: lack of mutations of exon 11 and exon 17 of c-kit. *Mod Pathol* 2000 13:536-541
- Mintz B, Russell ES: Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J. Exp. Zool.* 1957; 134, 207-237
- Modha A, Gutin PH: Diagnosis and treatment of atypical and anaplastic meningiomas; *USA* 2005;57(3):538-50
- Moskopp D, Wassmann H: *Neurochirurgie Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk.* Stuttgart, Schattauer GmbH 2005;474-481
- Mueller-Klieser W: Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*1987; 113 (2), 101-122
- Müller AMS, Schmitt-Gräff AH, Veelken H: Successful treatment of advanced epitheloid angiosarcoma with imatinib mesylate. *Onkologie* 26. 2003; 1-235
- Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, Henn W, Kolles H: Meningeome - Neue Erkenntnisse zur Tumorpheriferation. *magazin forschung*; 1/1998; 49-53
- Norden AD, Drappatz J, Wen PY: Targeted drug therapy for meningiomas. *Neurosurg Focus.* 2007; 23(4):12

- Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM: Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 1991; 78, 1403-1412
- Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC: "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 1999; 85:2046-2056
- Potti A, Ganti AK, Tuchman SA, Sholes K, Langness E, Koka V, Koch M: HER-2/neu and CD117 (c-Kit) overexpression in patients with pesticide exposure and extensive stage small cell lung carcinoma (ESSCLC). *Journal of Carcinogenesis*, 2005; 4: 8
- Prados MD, Berger MS, Wilson CB: Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. *CA Cancer J Clin.* 1998; 48: 331–360, 321
- Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P: Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J.* 1988; 7, 1003-1011
- Reed JC: Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17, 3225-3236
- Reichardt P, Wartenberg M: GIST-Patientenratgeber: Gastrointestinale Stromatumoren; Bezugsquelle: www.daslebenshaus.org; 2005; 1. Auflage
- Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G.: Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol*; 2006; 5(12):1045-54
- Ricotti E, Fagioli F, Garelli E, Linari C, Crescenzo N, Horenstein AL, Pistamiglio P, Vai S, Berger M, di Montezemolo LC, Madon E, Basso G: c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. *Blood.* 1998; 91, 2397-2405.

- Rubin BP: Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology*, 2006 48:83-96
- Sanger F a), Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson A, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M: Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 1977; 265, 687–695
- Sanger, F b), Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74, 5463–5467
- Scheithauer BW: Tumors of the meninges: proposed modifications of the World Health Organization classification. *Acta Neuropathol* 1990; 80: 343-354
- Schlegel U, Weller M, Westphal M: *Neuroonkologische Therapie*. 1. Auflage, Kohlhammer, Stuttgart, 2009; 38-215
- Seizinger BR, De La Monte S, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL: Molecular genetic approach to human meningioma: Loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5419-5423
- Sheehy JP, Crockard HA: Multiple meningiomas: a long-term review. *J. Neurosurg* 1983; 59: 1–5
- Skardelly M, Armbruster FP, Meixensberger J, Hilbig H: Expression of Zonulin, c-Kit and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Gliomas. *Translational Oncology* 2009; Vol. 2, No. 3, 117-120
- Simon M, Boström JP, Hartmann C: Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery*. 2007; 60(5):787-98
- Simon R, Panussis S, Maurer R, Spichtin HP, Glatz K, Tapia C, Mirlacher M, Ruffle A, Torhorst, Sauter G: KIT (CD117)-Positive Breast Cancers Are Infrequent and Lack KIT Gene Mutations. *Clinical Cancer Research*, 2004; Vol. 10, 178-183

- Simpson D: The Recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957; 20(1):22–39
- Sommer G, Agosti V, Ehlers I: 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
- Strohmeyer T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D: Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J. Urol*. 1995; 153, 511-515
- Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR: Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1971; 46:113–120
- Tonn JC: Microneurosurgery and radiosurgery - an attractive combination. *Acta Neurochir Suppl*. 2004; 91:103-8
- Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T, Suzuki T, Seito T: Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch*. 1994; 424, 135-141
- Van der Heiden MG, Thompson CB: Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis. *Nat. Cell Biol*. 1999; 1, 209-216
- Van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Scot R, Van Glabbeke M, Silberman S, Nielsen OS: Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a Phase I study. *Lancet* 2001; 358: 1421–1423
- Vetter C: Repetitorium, Hirntumore, zm 96, No. 13, 2006; 58-60
- Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A: Analysis of the

neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 1995; 146:827-832

- Went PT, Dirnhof 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
- Wiedmann V: Sequenzierungstechniken, Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Med. Dissertation. 2006; Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Willems SM, Szuhai K, Hartgrink H, Bovee JVMG, De Scheppern A, Hogendoorn PCW, The Authors. Journal compilation; Blackwell Publishing Ltd, *Histopathology*, 2007; 51, 405–432
- Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP: Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 1997; 57:2369-2372
- Yang SY, Xu GM: Expression of PDGF and its receptor as well as their relationship to proliferating activity and apoptosis of meningiomas in human meningiomas; *J Clin Neurosci.* 2001; 8 Suppl 1:49-53
- Yarden Y, Ullrich A: Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry* 1988; 27, 3113-3119
- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A: Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. 1987; *Embo J* 6, 3341-3351
- Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ.: A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1977; 37(10):3639-3643

- Zang KD, Singer H.: Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature*. 1967; 216: 84-85
- Zoli W, Ricotti L, Tesei A, Barzanti F, Amadori D: In vitro preclinical models for a rational design of chemotherapy combinations in human tumors. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. 2001; 1 (37):69-82

7 Abkürzungen

APS	Adenosin-5-phosphosulfat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AK	Antikörper
Bp	Basen Paar
BSA	Bovine Serum Albumine
CML	chronisch myeloische Leukämie
CSF-1	colony stimulating factor-1
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMA	epitheliales Membran-Antigen
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HRP	horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
KL	Kit Ligand
kDa	Kilo Dalton
LOH	loss of heterogosity
MCTS	multi cellular tumor spheroids
MERLIN	moesin-ezrin-radixin-like protein
MI	Mitose Index
MRT	Magnetresonanztomographie
NF	Neurofibromatose
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS-T	Phosphate buffered saline-tween
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFRa	platelet-derived growth factor receptor alpha
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
SDS	sodium dodecyl sulfate
STI571	signal transduction inhibitor number 571
TEMED	Tetramethylethyldiamin
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
WHO	WorldsHealthOrganisation

wt

Wildtyp

8 Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung und die Bereitstellung des Themas geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Markus Glatzel. Er war mir stets ein kompetenter Ansprechpartner und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank für die Betreuung während der Promotion.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der Neuropathologie danken, die mich mit ihren Erfahrungen und Anregungen zum Thema immer tatkräftig unterstützt haben. Bedanken möchte ich mich auch bei dem gesamten Laborteam der Neuropathologie, deren Mithilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Besonders möchte ich mich bei Alexander Kellner bedanken, der mit mir mit wertvollen Ratschlägen und viel Geduld an der Etablierung der Methode gefeilt hat.

Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie, der ich diese Arbeit widmen möchte. Meine Familie hat mir das Studium ermöglicht und mich während der Erstellungen dieser Dissertation immer unterstützt und ermutigt. Vielen Dank !

9 Lebenslauf

Name	Alina Johanna Boberg
Geburtsdatum	07.02.1983
Geburtsort	Oldenburg
Eltern	Reinhard Alois Boberg Helga Sofia Boberg geb. Sommerkamp
Nationalität	deutsch

Ausbildungsweg

1989-1993:	Grundschulzeit auf der Grund - u. Hauptschule Bad Bentheim/Gildehaus
1993-2002	Missionsgymnasium St. Antonius Bardel, Bad Bentheim
Abschluss:	Abitur (Leistungskurse: Biologie und Englisch)
Seit Oktober 2002	Studium an der Universität Hamburg Studiengang: Zahnmedizin
Oktober 2005	Physikum (Zahnärztliche Vorprüfung)
Frühjahr/Sommer 2008	Staatsexamen
September bis Dezember 2008	Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin in der Praxis Boberg in Bad Bentheim (Niedersachsen)
Jan 2009 bis Dez 2010	Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin in einer Gemeinschaftspraxis in Hamburg Poppenbüttel
Jan 2011 bis Juli 2011	Tätigkeit als angestellte Zahnärztin in Hamburg Neugraben
Seit August 2011	Tätigkeit als Zahnärztin in einer Gemeinschaftspraxis in Hamburg Poppenbüttel

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Immunhistochemische, genetische und biochemische Untersuchungen zur Expression von c-Kit in Meningeomen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Glatzel selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst habe. Weiterhin habe ich 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. Die Dissertation habe ich keiner anderen Universität zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben.

Alina Boberg

Hamburg, 08.12.2010

Ort, Datum