UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Hans Dietrich Hermann Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik des UKE der Universität Hamburg

Direktor Prof. Dr. M. Westphal

VEGF, HGF/SF, bFGF und PLGF in humanen Meningeomen und ihr Zusammenhang mit der Angioneogenese und Malignität

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ulrike Lengler

aus Lüneburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 03.09.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. Katrin Lamszus
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:	Prof. Dr. Christian Hagel
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:	PD Dr. Nils O. Schmidt

Inhaltsangabe

1. Einleitung7
1.1. Meningeome
1.1.1. Inzidenz
1.1.2. Lokalisation und Ursprung7
1.1.3. Ätiologie
1.1.4. Klinisches Erscheinungsbild
1.1.5. Bildgebung
1.1.6. Makroskopische Pathologie 11
1.1.7. Mikroskopische Pathologie 11
1.1.8. Immunhistochemie und Proliferationsindex
1.1.9. Genetik von Meningeomen 15
1.1.10. Therapie und Prognose 15
1.2. Angiogenese
1.2.1. Allgemeine Grundlagen 17
1.2.1.1 Embryogenese17
1.2.1.2 Vaskulogenese
1.2.1.3 Tubulogenese
1.2.1.4 Physiologische Angiogenese 19
1.2.1.5 Pathopysiologische Angiogenese 19
1.2.1.6 Pathologische Angiogenese, Angio <i>neo</i> genese
1.2.1.7 Angioneogenese in Tumoren des ZNS
1.3. Vaskularisation von Meningeomen21
1.3.1. Allgemeine Zusammenhänge 21
1.3.2. Das VEGF System 22
1.3.3. Das HGF/SF System
1.3.4. Das bFGF System25
1.3.5. Das PLGF System
1.4. Ziele der vorliegenden Studie 27
2. Material und Methoden
2.1. Tumorgewebe
2.1.1. Tumorgewebeextrakte
2.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

	2.1.3. Bestimmung der Wachstumsfaktoren	33
	2.1.3.1. Antikörper	33
	2.1.3.2. HGF/SF ELISA	33
	2.1.3.3. VEGF, PLGF, bFGF ELISA	35
	2.2. Quantifizierung der Tumorgefäße	36
	2.2.1. Vorbereitung der Schnitte	36
	2.2.2. Immunhistochemische Färbung	37
	2.2.3. Auszählung der Endothelzellen	37
	2.3. Proliferationsindex	37
	2.3.1. Vorbereitung der Schnitte	38
	2.3.2. Immunfärbung mit ABC Kit	38
	2.3.3. Bestimmung des Proliferationsindex	38
	2.4. Zellkultur Assays	38
	2.4.1. Humane Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC)	38
	2.4.2. Chemotaxis Assay	39
	2.4.3. Bovine mikrovaskuläre Endothelzellen (BME)	41
	2.4.4. In-vitro Angiogenese Assay	41
	2.5. Statistische Methoden	42
3.	Resultate	44
	3.1 Ergebnisse Extraktion	44
	3.1.1 Resultate der Protein Extraktionen	44
	3.1.2 Konzentration von HGF/SF	47
	3.1.3 Konzentration von VEGF	50
	3.1.4 Konzentration von bFGF	53
	3.1.5 Konzentration von PLGF	55
	3.2 Resultate der Bestimmung des Mib1 Proliferationsindex	58
	3.4 Resultate der mikroskopischen Bestimmung der Blutgefäßzahl	61
	3.5 Invasives Wachstum und WHO Graduierung	64
	3.6 Resultate der Chemotaxis Analyse	64
	3.7 Induktion kapillarähnlicher Strukturen durch Tumor-Extrakte	67
4.	Diskussion	69
	4.1 Erreichte Ziele der vorliegenden Studie	69
	4.1.1 WHO Grad und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression	69

4.1.2 Histologische Varianten und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression	69
4.1.3 Intratumorale Gefäße und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression	70
4.1.4 Proliferationsrate und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression	71
4.1.5 Tumorinvasion und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression	72
4.1.6 In-vitro Modell der endothelialen Chemotaxis	73
4.1.7 <i>In-vitro</i> Modell der Kapillar-Äquivalentbildung	73
4.2 Technische Diskussion	74
4.2.1 Limitationen der verwendeten Expressionsbestimmung	74
4.2.2 Mitose- und Proliferationsrate in Meningeomen	75
4.2.3 Histologische Bestimmung der Gefäßzahl	76
4.2.4 Vor- und Nachteile der Bestimmung der endothelialen Chemotaxis	77
4.2.5 Bestimmung der Kapillar-Äquivalentbildung	78
4.3 Konsequenzen	78
4.3.1 VEGF Resultate im Kontext der wissenschaftlichen Literatur	78
4.3.1.1 VEGF und Meningeome in der Literatur	78
4.3.1.2 VEGF und Gefäßdichte in der Literatur	79
4.3.1.3 VEGF und WHO Grad I Meningeomvarianten in der Literatur	79
4.3.2 PLGF im Kontext der Literatur	80
4.3.3 HGF/SF im Kontext der Literatur	80
4.3.4 bFGF im Kontext der Literatur	81
4.3.5 Hypothesen zum Malignisierungsgrad und der Angiogenese	81
4.3.6 Histologische Varianten im Kontext der Angiogenese	82
4.3.6.1 Anatomischer Aufbau und Funktion der Arachnoidea	82
4.3.6.2 Morphologie - Arachnoidea und Meningeom Subvarianten	84
4.3.6.3 Molekulargenetische Differenzen zwischen Subvarianten	85
4.3.6.4 Hypothese zur differenten VEGF Expression in Subgruppen	85
4.3.7 Therapeutische Implikationen	86
4.3.7.1 Grundsätzliche Überlegungen	86
4.3.7.2 VEGF-System Inhibition und etablierte Chemotherapie	86
4.3.7.3 VEGF-System Inhibition und Meningeome	87
5. Zusammenfassung	88
6. Abkürzungsverzeichnis	89
7. Literaturverzeichnis	92

8. Danksagung	105
9. Lebenslauf	106
10. Eidesstattliche Versicherung	107

1. Einleitung

1.1. Meningeome

1.1.1. Inzidenz

Meningeome sind mit einem Anteil von 13 bis 19% aller primären Hirntumore häufige primäre intrakranielle Tumore (Graham und Lantos 1997). Die jährliche Inzidenz von Meningeomen liegt etwa bei 6/100.000 (Kleihues und Cavenee 2000). Am häufigsten werden Meningeome in der sechsten und siebten Lebensdekade beobachtet. Allerdings kommen selten auch Meningeome im Kindesalter vor (Kleihues und Cavenee 2000). Wahrscheinlich liegt die tatsächliche Inzidenz jedoch höher, da sich oft auch klinisch nicht bekannte Meningeome im Autopsiegut finden (Graham und Lantos 1997). Bei zunehmendem Alter der Bevölkerung und verbesserter Diagnostik wird die klinische Inzidenz von Meningeomen in Zukunft steigen. Meningeome gehören zu den wenigen Tumoren, welche häufiger bei Frauen als bei Männern auftreten. Insgesamt beträgt das Verhältnis von Frauen zu Männern etwa 1,8 : 1,0 (Graham und Lantos 1997), bei sekretorischen Meningeomen liegt dieses Verhältnis sogar bei 9 : 1 (Probst-Cousin et al. 1997).

1.1.2. Lokalisation und Ursprung

Meningeome werden im gesamten Bereich der Neuraxis beobachtet, d.h. intrakraniell, spinal und intraventrikulär (Graham und Lantos 1997). Von den intrakraniellen Meningeomen kommen 40% im Bereich der Konvexität der Hemisphären vor. Oft sind sie mit der Falx verbunden und es kann zum bilateralen Befall der Hemisphären mit spiegelbildlichem Tumorwachstum kommen. Parasagittal finden sich Meningeome zumeist im mittleren und vorderen Drittel. Weitere Lokalisationen sind Keilbeinflügel, paraselläre Region, Nervus opticus, Tentorium cerebelli und Fossa posterior. Tumorwachstum in den Sinusoiden und intraventrikuläres Wachstum kommen nur selten vor. Teils finden sich dabei intrazerebrale Meningeome ohne jede ersichtliche Verbindung zu den Hirnhäuten. Intraspinale Meningeome finden sich gehäuft im thorakalen Bereich, wobei sie bevorzugt anterior und lateral lokalisiert sind und machen etwa 12% aller Meningeome aus (Graham und Lantos 1997; Kleihues und Cavenee 2000).

Aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten mit arachnoidalen Deckzellen wird der Ursprung von Meningeomen aus der Arachnoidea angenommen (Graham und Lantos 1997). Ein befriedigender Beweis steht allerdings weiterhin aus. Da die Meningen embryonal vom Mesoderm ausgehen, sind auch Meningeome wahrscheinlich mesodermalen Ursprungs (Graham und Lantos 1997).

Meningeome infiltrieren häufig angrenzende Abschnitte der Dura und z.T. auch angrenzende Knochen und Weichteilstrukturen. Eine Invasion von Hirnparenchym kommt dagegen seltener vor. In der Regel liegt ein verdrängendes Wachstum unter Einhaltung der pialen Grenze vor. Im Bereich der angrenzenden Kalotte kann eine Hyperossifikation und Spicula-Bildung auftreten. Eine Infiltration der Galea wird ebenfalls beschrieben. Solche Meningeome zeigen in der Regel keine Malignitätsmerkmale. Häufig breiten sich die Meningeome der Schädelbasis entlang anatomischer Strukturen aus, sie können dabei einzelne Hirnnerven oder Gefäße ummauern. Metastasen, insbesondere in Lunge, Pleura, Knochen oder Leber werden nur bei höher malignen Meningeomen beobachtet. Multiple Meningeome im Sinne gleichzeitigen Auftretens mehrerer Tumore, die keine Metastasen voneinander darstellen, sind beschrieben. Meningeome können ein rundliches oder flächenhaftes - sogenannte "en plaque" - Wachstum aufweisen.

1.1.3. Ätiologie

Endogene und exogene Ursachen konnten z.T. für Meningeome beschrieben werden. So entwickelt die Mehrheit der Patienten, welche an einer Neurofibromatose Typ II leiden, Meningeome (DeVita et al. 1997). Sehr selten wurden auch Meningeome bei Patienten mit einem Gorlin Syndrom (Albrecht et al. 1994) oder Cowden Syndrom (Lyons et al. 1993) beschrieben. An exogenen Noxen steht radioaktive Strahlung im Vordergrund (Shibata et al. 1994). So kommt es nach einer Latenz von 19,5 bis 35,2 Jahren, je nach erhaltener Strahlendosis, zum gehäuften Auftreten von Meningeomen. Hierbei wird eine höhere Inzidenz atypischer Meningeome sowie eine höhere Rezidivrate beobachtet (Soffer et al. 1983; Soffer et al. 1989; Harrison et al. 1991). Ein Zusammenhang mit Schädeltraumata, Virusinfektionen und der Applikation von Sexualhormonen wurde diskutiert (Graham und Lantos 1997; Kleihues und Cavenee 2000). Bei den meisten sporadischen Meningeomen ist die Ätiologie jedoch unklar.

1.1.4. Klinisches Erscheinungsbild

Da Meningeome an nahezu allen intrakraniellen und intraspinalen Lokalisationen vorkommen, sind die klinischen Symptome vielseitig. Das verdrängende Wachstum äußert sich bei intrakraniellen Tumoren mit Kopfschmerzen, fokalen epileptischen Anfällen und neurologischen Ausfällen. Entsprechend der Lokalisation können neben motorischer und sensorischer Symptomatik, hirnorganischen Veränderungen, Inkontinenz oder der Verlust des Sehvermögens beobachtet werden. Durch Verlegung der Liquorabflusswege können Hirndruckzeichen bei Hydrocephalus entstehen. Oftmals bleiben Meningeome lange symptomlos und erreichen dabei beachtliche Größen (Graham und Lantos 1997; Kleihues und Cavenee 2000).

Meningeome können Hirnödeme induzieren, die dann in der Symptomatik oft aggressiver als der Tumor sind. Ein Assoziation mit einer erhöhten Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wurde dabei beobachtet (Goldman et al. 1997).

Besonders seltene Subtypen von Meningeomen können mit paraneoplastischen Symptomen einhergehen. So sind chordoide Meningeome mit hämatogenen Veränderungen, wie Hypergammaglobinämie und Anämie, assoziiert (Kepes et al. 1988). Bei sekretorischen Varianten wurden erhöhte Werte des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) nachgewiesen (Louis et al. 1991). Auch Meningeome, welche Erythropoetin produzieren, wurden dokumentiert (Bruneval et al. 1993).

1.1.5. Bildgebung

Bei Verdacht auf eine intrakranielle Raumforderung sollte eine cerebrale Computertomografie (CCT) mit Kontrastmittel bzw. eine cerebrale Kernspintomographie (cMRT), ebenfalls mit Kontrastmittel, durchgeführt werden. Aufgrund von Hyperostosen oder Kalzifikationen fallen bis zu 60% aller Meningeome bereits auf einer nativen Röntgenaufnahme auf (DeVita 1997). Im CCT erscheinen Meningeome als isodense oder hyperdense Raumforderungen, welche teils hyperdense Kalzifikationen aufweisen und aufgrund einer starken Vaskularisierung eine deutliche Kontrastmittelanreicherung zeigen (Abb.1.1).





Abbildung 1.1: Typisches Meningeom der Konvexität, welches verdrängend gegen das Gehirn wachsend dieses komprimiert. Als Folge erkennt man eine kortikale Atrophie.

Abbildung 1.2: Typisches Meningeom der Konvexität in einer T1-gewichteten cMRT Aufnahme mit Gadolinum-Kontrastmittel.

Im T1-gewichteten MRT erscheinen Meningeome isointens im Vergleich zur weißen Substanz (Abb. 1.2), im T2-gewichteten MRT können sie sich hypo- oder hyperintens darstellen. Sie reichern homogen Gadolinium-Kontrastmittel an. Die cMRT erlaubt eine wesentlich bessere Beurteilung der Lage des Meningeoms zu den Nachbarstrukturen. In der cMRT kann ebenfalls ein so genanntes Meningealzeichen beobachtet werden, das eine Mitreaktion der umliegenden Dura bezeichnet. Dieses Phänomen kann auf Grund von Tumorinfiltration, peripherer Granulationsgewebsbildung oder einer starken lymphozytären Reaktion der angrenzenden Gewebe entstehen. Häufig findet sich ein teilweise auch ausgeprägtes Ödem im angrenzenden Hirn.

Bei spinalen Tumoren bietet die MRT eine deutlich bessere Beurteilbarkeit der Weichteilverhältnisse als die CT, da hier keine Knochenartefakte auftreten und der Spinalkanal in Längsrichtung dargestellt werden kann.

Zur Operationsplanung werden zusätzlich häufig eine cerebrale Angiographie bzw. eine nicht-invasive MR-Angiographie durchgeführt. Sie dokumentieren zumeist eine Blutversorgung aus meningealen Arterien. Die konventionelle Angiographie bietet den Vorteil, dass zeitgleich größere zuführende Tumor-Gefäße embolisiert werden können.

1.1.6. Makroskopische Pathologie

Konvexitätsmeningeome bestehen zumeist aus einem rundlichen, teilweise gelappten, gut zum Hirngewebe abgegrenzten nicht umkapselten Tumor von derber Konsistenz. Sie wachsen breitbasig von der Dura ausgehend gegen das Gehirn. In der Regel weisen sie eine homogen gelbliche Schnittfläche auf. Abhängig vom Grad der Verkalkung kann die Schnittfläche auch feinkörnig granuliert erscheinen. Höhergradige Meningeome zeigen oft Einblutungen und Nekrosen. Meningeome komprimieren angrenzendes, dann häufig atroph erscheinendes Hirngewebe (Abb. 1.1). Wie bereits erwähnt kommt eine Invasion des Hirngewebes nur selten vor im Gegensatz zur Infiltration angrenzender duraler Abschnitte (Graham und Lantos 1997; Kleihues und Cavenee 2000).

1.1.7. Mikroskopische Pathologie

Meningeome zeigen histologisch ein breites Bild an Erscheinungsformen, welche z.T. in einem Tumor ineinander übergehen. In der 3. Ausgabe der WHO Klassifikation von Hirntumoren werden fibrilläre, meningotheliomatöse, transitionale, psammomatöse, angiomatöse, sekretorische, mikrozystische, lymphoplasmazellreiche, metaplastische, klarzellige, chordoide, papilläre, rhabdoide, atypische und anaplastische Subvarianten von Meningeome unterschieden (Kleihues und Cavenee 2000). Als häufige Meningeomsubvarianten werden die fibrillären, meningotheliomatösen, transitionalen, psammomatösen und angiomatösen, und als seltene Subvarianten die sekretorischen, mikrozystischen, lymphoplasmazellreichen, metaplastischen, klarzelligen, chordoiden, papillären und rhabdoiden Meningeome bezeichnet (Kleihues und Cavenee 2000).

Meningotheliomatöse Meningeome sind isomorphe Tumore, welche von gefäßführenden Bindegewebssepten durchzogene Läppchen ausbilden. Zellgrenzen sind nicht zu differenzieren, die rundlich-ovalen isomorphen Kerne haben einen moderaten Chromatingehalt und weisen oft Zytoplasmainvaginationen im Sinne von Lochkernen auf (Abb. 1.5). Fibrilläre oder fibroblastische Meningeome bestehen aus spindelförmigen, isomorphen Tumorzellen, welche in Strängen und Zügen wachsen und fokal Wirbel ausbilden. Diese können zentral im Sinne von Psammomkörpern verkalken. Teils werden diese fibrillären Meningeome von dicken Kollagenbündeln durchzogen (Abb. 1.6). Transitionale Meningeome stellen eine Mischform aus meningotheliomatösen und fibrillären Meningeomen dar. Da keine exakten Anteile beider Subvarianten für die Diagnose eines transitionalen Meningeoms definiert sind, schwankt die Inzidenz dieser Variante deutlich zwischen verschiedenen diagnostischen Zentren (Abb. 1.3). Psammomatöse Meningeome zeichnen sich durch sehr viele verkalkende Wirbel (Psammomkörper) aus. Das Tumorgewebe an sich bietet einen transitionalen Aspekt. Eine genaue Zahl an obligaten Psammomkörpern ist auch hier nicht definiert (Abb. 1.4).



Abbildung 1.3: Transitionales Meningeom mit fibrillären und meningotheliomatösen Anteilen.



Abbildung 1.4: Psammomatöses Meningeom mit vielen wirbelförmig angeordneten Tumorzellen mit zentralen Verkalkungen (Psammomkörper).

Um das biologische Verhalten von Meningeomen vorherzusagen, werden sie in 3 Gruppen graduiert: WHO Grad I (benigne), Grad II (atypisch) und Grad III (anaplastisch). Die histologischen Varianten haben eine spezifische WHO Graduierung. Fibrilläre, meningotheliomatöse, transitionale, psammomatöse, angiomatöse, sekretorische, mikrozystische, lymphoplasmazellreiche und metaplastische Meningeome werden dem WHO Grad I zugeteilt. Klarzellige und chordoide Meningeome werden als atypische WHO Grad II Tumore, rhabdoide und papilläre als anaplastische Meningeome WHO Grad III eingestuft (Kleihues und Cavenee 2000). Unabhängig von der histologischen Subvariante werden verschiedene morphologische Kriterien zur Graduierung entsprechend der WHO Klassifizierung heran gezogen (Kleihues und Cavenee 2000). Als Atypie-Kennzeichen ist eine Mitoserate von mind. 4 Mitosen auf 10 Gesichtsfelder von je 0,031 mm² (auch High Power Fields, HPF) definiert. Alternativ können mehrere der folgenden Kriterien zur Atypiegraduierung heran gezogen werden: erhöhte Zellularität, hohe Kern/Plasma- Relation, Verlust der Gewebearchitektur hin zu einem "sheet-like growth pattern" und erhöhte Pleomorphie. Eindeutiges Anaplasie Kriterium ist eine Mitosezahl von mind. 20 Mitosen auf 10 HPF. Als Alternative können eindeutige histologische Maliginitätskriterien heran gezogen werden. Nekrosen, thrombosierte Gefäße und Hirninfiltration stellen einen Hinweis auf Malignisierung dar, sind jedoch keine Atypie oder Anaplasie Kriterien entsprechend der aktuellen WHO Einteilung (Kleihues und Cavenee 2000).



Abbildung 1.5: Meningotheliomatöses Meningeom mit lobulärer Wachstumsform.



Abbildung 1.6: Fibrilläres Meningeom mit in Strängen und Zügen wachsenden Tumorzellen

1.1.8. Immunhistochemie und Proliferationsindex

Das wichtigste diagnostische Epitop bei der immunhistochemischen Charakterisierung von Meningeomen ist das "epithelial membrane antigen" (EMA), welches von etwa 94% aller Meningeome exprimiert wird (Schnitt und Vogel 1986) (Abb. 1.7). Mittels EMA-spezifischer

Antikörper können Meningeome gegen andere hirneigene Tumore differenziert werden, nicht jedoch gegen Metastasen epithelialer Tumore.



Abbildung 1.7: Immunhistochemische Untersuchung eines transitionalen Meningeoms mit EMAspezifischen Antikörpern.

Meningeome binden zudem Antikörper gegen Vimentin. Da zumeist jedoch eine Abgrenzung zu anderen neuroektodermalen Tumoren erforderlich ist, bietet dieser Antikörper keinen wichtigen diagnostischen Gewinn (Kleihues und Cavenee 2000). Meningeome zeigen oft eine schwache positive S100 Protein Immunreaktion und sind in seltenen Fällen GFAPpositiv (glial fibrillary acidic protein) (Graham und Lantos 1997). Die sekretorischen Granula oder Pseudopsammonkörper von sekretorischen Meningeomen binden CEA-spezifische Antikörper (Kleihues und Cavenee 2000).

Nicht diagnostisch, aber pathogenetisch relevant ist die oft anzutreffende Positivität von Meningeomen hinsichtlich Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wie "platelet derived growth factor" (PDGF), "epidermal growth factor" (EGF) und "insulin-like growth factor" (IGF) (Black et al. 1994; Black et al. 1996; Nordqvist et al. 1997).

Der monoklonale Antikörper Mib1 bindet an das Antigen Ki67. Der Mib1 Proliferationsindex in Meningeomen steigt mit dem Malignitätsgrad (Graham und Lantos 1997). Meningeome WHO Grad I weisen einen Mib1 Index von 3,8% (+/- 3,09), atypische Meningeome WHO Grad II einen Index von 7,17% (+/- 5,78) und anaplastische Meningeome WHO Grad III einen Index von 14,71% (+/- 9,76) auf (Maier et al. 1997). Eine andere Studie zeigte, dass bei anaplastischen Meningeomen WHO Grad III der Mib1 Proliferationsindex von 1,3% zu 24,2% bei einem Mittelwert von 11,7% variiert (Prayson 1996). Es wurde beschrieben, dass der Mib1 Index bei männlichen Patienten höher als bei weiblichen ist (Matsuno et al. 1996) und dass der Mib1 Index von Meningeomen bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 (NF2) höher als bei sporadischen Meningeomen ist (Antinheimo et al. 1997). Mit einem höheren Mib1 Proliferationsindex steigt die Wahrscheinlichkeit von Rezidiven (Nakaguchi et al. 1999), ein Mib1 Index >5% geht mit einer 10% Rezidivwahrscheinlichkeit einher (Shibuya et al. 1992).

1.1.9. Genetik von Meningeomen

Eine Vielzahl an strukturellen chromosomalen Veränderungen wurde in Meningeomen beschrieben. Diese sind z.T. bereits in Meningeomen WHO Grad I nachweisbar, teils sind diese chromosomalen Veränderungen Progressions-assoziiert. Erst teilweise konnten die Gene identifiziert werden, welche offenbar durch diese chromosomalen Veränderungen betroffen sind.

Die häufigste Veränderung in Meningeomen ist die Monosomie 22q (Zankl und Zang 1972; Zang 1982). Es gelang der Nachweis von Mutationen in dem Tumorsuppressorgen *NF2*, welches in 30-60% aller Meningeome verändert ist (Lekanne Deprez et al. 1994; Ruttledge et al. 1994; Merel et al. 1995; Papi et al. 1995; De Vitis et al. 1996; Harada et al. 1996). Da die Frequenz an *NF2* Mutationen zwischen Meningeomen WHO Grad I und höheren Graden nicht wesentlich schwankt, ist anzunehmen, dass *NF2* Mutationen ein initiierendes Ereignis sind (Wellenreuther et al. 1995).

1.1.10. Therapie und Prognose

Bei einem symptomatischen Meningeom sollte bereits präoperativ eine entsprechende symptomatische Therapie eingeleitet werden. So ist eine Therapie mit Antikonvulsiva indiziert, nachdem es zu einem ersten epileptischen Anfall gekommen ist. Bei einem perifokalen Hirnödem mit oder ohne neurologische Ausfälle, das bei 50% aller Patienten auftritt, sollten parenteral bzw. oral Kortikosteroide unter Ulkusprophylaxe gegeben werden. Bei einer Verlegung der Liquorabflusswege kann es nötig sein, operative Maßnahmen zur Entlastung einzuleiten. Primäres therapeutisches Ziel ist die totale Resektion des Meningeoms mit kurativer Intention (Jaaskelainen 1986). Hierdurch kann auch Tumormaterial zur histologischen Aufarbeitung und Einschätzung der Prognose gewonnen werden. Im Falle von Konvexitätsmeningeomen ist die Resektion zumeist problemfrei möglich, wenn es sich histologisch um benigne Varianten handelt und keine Sinus Infiltration vorliegt. Die Resektion von Keilbeinflügel-Meningeomen oder anderen Meningeomen der Schädelbasis gelingt oft nur subtotal aufgrund des flächigen Wachstums mit Ummauerung präexistenter anatomischer Strukturen wie Hirnnerven und Blutgefäße. Hier sind Rezidive häufig (Perry et al. 1997). Aufgrund der starken Vaskularisation von Meningeomen wird oft eine präoperative Embolisation angestrebt, um die Tumorresektion zu erleichtern (Nelson et al. 1994). Bei maligneren Meningeomen wird zur Verbesserung der Prognose möglichst radikal operiert unter Beachtung der eloquenten Areale. Die operative Morbidität richtet sich nach dem Zustand des Patienten und liegt unter 5%.

Im Falle einer subtotalen Tumorresektion sollte eine Bestrahlung durchgeführt werden. So konnte gezeigt werden, das die Rezidivquote subtotal resizierter Meningeome mittels Radiatio von 60% auf 32% reduziert werden konnte (Barbaro et al. 1987). Alternative Behandlungsmethoden sind u.a. Gamma-Knife, Seeds oder Linearbeschleuniger. Zudem werden alle Meningeome WHO Grade II oder III unabhängig vom Ausmaß der Resektion bestrahlt (Milosevic et al. 1996). Eine Chemotherapie für Meningeome WHO Grad II und III ist optional. V.a. Therapieschemata aus der Behandlung von Sarkomen finden hierbei Verwendung (DeVita 1997).

Bei älteren, eventuell auch multimorbiden Patienten kann diskutiert werden, ein asymptomatisches Meningeom nicht operativ zu entfernen, sondern dieses engmaschig zu kontrollieren, um die Risiken eines operativen Eingriffs zu vermeiden. Dieses Vorgehen empfiehlt sich v.a. bei Meningeomen in schwieriger Lokalisation. Gerade bei älteren Patienten finden sich überwiegend gutartige, sehr langsam wachsende Meningeome (Graham und Lantos 1997).

Ein großes Problem stellen die Rezidive dar, welche in etwa 7 - 20% der Meningeome WHO Grad I innerhalb von 20 Jahren auftreten. Rezidive kommen auch bei solchen Tumoren vor, bei denen intraoperativ eine Totalresektion angenommen wurde. Bei atypischen Meningeomen liegt die Rezidivrate bei 29 - 40% und bei anaplastischen Meningeomen bei 50 – 78% (Jaaskelainen 1986; Maier et al. 1992; Kolles et al. 1995). Die mittlere Zeit bis zum Rezidiv korreliert mit dem histologischen Grad: 7,5 Jahre bei Meningeomen WHO Grad I, 3,5 Jahre bei atypischen Meningeomen und 2,4 Jahre bei anaplastischen Meningeomen (Jaaskelainen 1986; Maier 1992). Je maligner die Histologie, desto schlechter ist die Prognose. Beim malignen Meningeom liegt die mediane Überlebensrate unter 2 Jahren. Auch mit operativer Resektion und anschließender adjuvanter Strahlentherapie kann nur für die Hälfte der Patienten mit einem malignen Meningeom eine längerfristige Tumorkontrolle erreicht werden. Eine möglichst vollständige operative Resektion erweist sich auch hier als prognostisch günstig. Das Auftreten von Metastasen ist ein ungünstiger prognostischer Faktor (Enam et al. 1996; Perry et al. 1999).

Ein weiterer prognostisch ungünstiger Faktor ist die Infiltration des Gehirnparenchyms. Hier liegt die Rezidivrate auch von benignen Meningeomen im Bereich der von atypischen Meningeomen (Perry 1999). Ebenso gehen ein erhöhter Mib1 Index über 5 bis 10% mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit einher (Marks et al. 1986). Allerdings ist dieses ein sehr unsicheres und uneinheitliches Kriterium, das wesentlich von der Untersuchungstechnik abhängt, so wie im Gewebe unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Für einen erhöhten BudR Index ist ebenfalls eine erhöhte Rezidivrate beschrieben (Cho et al. 1986; Kakinuma et al. 1998). Ebenfalls mit häufigeren Rezidiven und der Größe des Meningeoms ist invers die Anzahl der Progesteronrezeptoren des Meningeoms korreliert, wobei diese mit zunehmender Malignität abnehmen und bei malignen Meningeomen kaum noch nachweisbar sind (Brandis et al. 1993; Rubinstein et al. 1994; Hsu et al. 1997).

1.2. Angiogenese

1.2.1. Allgemeine Grundlagen

1.2.1.1 Embryogenese

Für ein funktionierendes physiologisches Gefäßsystem ist die Ausbildung miteinander vernetzter Gefäße aus Endothelzellen mit unterschiedlichem Lumen und einer den späteren physiologischen und funktionellen Bedingungen angepassten Wandmuskulatur nötig, so dass alle Gewebe eines Körpers z.B. mit Sauerstoff, Metaboliten oder Zellen des Immunsystems versorgt werden und Abbauprodukte fort transportiert werden können. Die Diffusionskapazität für Gase und Nährstoffe in normalen Geweben beträgt etwa 1 mm. Diese Distanz variiert abhängig vom metabolischen Umsatz eines Gewebes. D.h., Organe größer Dicke oder Ausdehnung erfordern einen aktiven Transportprozess. Als solchen gibt es u.a. die Bewegung Oberflächen-benetzender Flüssigkeiten, wie z.B. die den Gelenkknorpel-ernährende Gelenkflüssigkeit und v.a. das Blutgefäßsystem. Deshalb müssen die Gefäße sich abhängig von dem jeweiligen Gewebe oder Organsystem auf dieses spezialisieren. Dieses alles geschieht im Embryo in der Vaskulogenese, Tubulogenese und schließlich Angiogenese, die durch ein komplexes System verschiedener Liganden und Rezeptoren, Interaktionen auf zellulären Ebene oder mit der extrazellulären Matrix in den unterschiedlichen Stadien regu-

liert werden (Flamme et al. 1997; Risau 1998). Der Begriff Angiogenese bezeichnet somit einen physiologischen Prozess, bei welchem mesenchymale Endothelprogenitoren auf äußere Reize zielgerichtet proliferieren und neue Gefäße ausbilden.

Angiogenese wird beobachtet in Geweben, welche einen Auf- oder Umbau durchmachen. Im adulten Menschen findet physiologische Angiogenese demnach nur noch in wenigen Organen statt.

1.2.1.2 Vaskulogenese

Bereits in der frühen Ontogenese bildet sich ein primitiver vaskulärer Plexus, aus dem sich während der Embryogenese das Gefäßsystem entwickelt. Die Entwicklung des ersten primitiven Gefäßplexus und des späteren vaskularisierten Organsystems unterscheiden sich deutlich. Der Gefäßplexus entsteht aus angioblastischen und hämatopoetischen (hämangioblastischen) Vorläuferzellen aus dem Epiblast über Invagination, Migration und Differenzierung. Diese *de-novo* und *in-situ* Entwicklung von Gefäßen wird als Vaskulogenese bezeichnet. Aus den hämatopoetischen Stammzellen entwickelt sich das spätere hämatopoetische System.

Für die Vaskulogenese spielt der Fibroblast growth factor (FGF) eine entscheidende Rolle, ebenso wie der Vascular endothelial growth factor (VEGF). FGF führte im Tierversuch zu einer Differenzierung von hämangioblastischen Zellen, die unter weiterem Einfluss von FGF einen primitiven Gefäßplexus bildeten. Auf diesen hämangioblastischen Vorläuferzellen konnte der VEGF Rezeptor FLK1 (VEGFR2) nachgewiesen werden. In "FLK1- knock out" und "VEGF-knock out" Mäusen fand sich eine fehlerhafte Differenzierung von endothelialen und hämatopoetischen Zellen bzw. ein abnormes Gefäßsystem, weshalb die Tiere teilweise nicht lebensfähig waren, sowie ein streng VEGF- dosisabhängiger Effekt bei heterozygoten Mäusen. Somit kommt VEGF eine wesentliche Rolle in der weiteren Entwicklung eines Blutund Gefäßsystems zu. VEGF selber scheint von verschiedenen endodermalen Zellen gebildet werden zu können (Flamme 1997).

1.2.1.3 Tubulogenese

Tubulogenese wird die Ausbildung der verschiedenen Gefäße in Bezug auf ihr Lumen, insbesondere Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venen, Venolen usw., genannt. Durch den Zusammenschluss mehrerer primitiver Gefäße mit kleinem Lumen bildet sich ein einzelnes Gefäß mit deutlich größerem Lumen. Insbesondere bei der Entstehung der Aorta spielt dieser Mechanismus eine entscheidende Rolle. Gleichzeitig kommt es zu einer Differenzierung und Anpassung der Gefäßendothelien und Muskulatur an die Druckverhältnisse.

1.2.1.4 Physiologische Angiogenese

Physiologische Angiogenese findet erstmalig während der Embryogenese statt. Das Blutund Gefäßsystem ist das erste funktionsfähige Organsystem des Embryos. Angiogenese meint die Entstehung neuer Gefäße aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem mittels Rekrutierung und Aussprossung von Endothelzellen. Sie findet im Embryo im Anschluss an die Vaskulogenese statt (Flamme 1997; Risau 1998).

In der Angiogenese scheint VEGF eine besondere Stellung einzunehmen, was in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden konnte. Bereits in der Entwicklung des Gefäßsystems im Embryo kommt es auf ein ausgeglichenes und entsprechend moduliertes Gleichgewicht von Angiogenese-aktivierenden und -inhibierenden Faktoren an. Hierbei scheint Hypoxie in einem Gewebe ein besonders starker Anreiz für die Exprimierung von VEGF bzw. seiner Rezeptoren zu sein und damit für eine Angiogenese in diesem Gewebe. Die verschiedenen Organsysteme unterscheiden sich nicht nur in ihrer embryonalen Abstammung, sondern auch in ihren Mechanismen der Entwicklung eines Gefäßsystems. Das Gehirn ist neuroektodermalen Ursprungs und von diesem Ursprung her ein weniger vaskularisiertes Gewebe verglichen mit Gewebe mesenchymalen Ursprungs. Während der Angiogenese können sehr viel höhere VEGF Werte im Gehirn gemessen werden als beim ausgewachsenen Individuum. Da VEGF auch eine Wirkung auf die Gefäßpermeabilität aufweist, spielt es bei der Entwicklung einer funktionierenden Blut-Gehirn-Schranke eine wichtige Rolle. In anderen Organen wie zum Beispiel in der Niere, deren Kapillaren auch beim entwickelten Individuum eine hohe Permeabilität aufweisen, werden dauerhaft erhöhte VEGF Werte gefunden.

Im entwickelten Individuum findet eine physiologische Angiogenese nur noch in weiblichen reproduktiven Organsystemen (z.B. Uterus, Milchdrüsen), während der Wund- oder Knochenheilung und bei Entzündungprozessen statt (Risau 1997).

1.2.1.5 Pathopysiologische Angiogenese

Auch bei pathologischen Prozessen kommt es zur Angiogenese. Reparative Prozesse wie Wundheilung und die Bildung von Granulationsgewebe als Folge entzündlicher Reize induzieren die Bildung neuer Gefäße. Z.T. werden diese neu sich bildenden Gefäße das eigentliche Problem der sich chronifizierenden Erkrankung, wie z.B. bei der diabetischen Retinopathie, der rheumatoiden Arthritis und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen. Bei diesen Erkrankungen bieten sich Möglichkeiten für Therapieansätze durch Inhibition der Angiogenese an (Flamme 1997; Risau 1997; Risau 1998).

1.2.1.6 Pathologische Angiogenese, Angio*neo*genese

Bereits sehr früh wurde eine Rolle der Angiogenese bei malignen Erkrankungen angenommen (Folkman 1972) und es konnte gezeigt werden, dass auch neoplastische Prozesse essentiell auf eine Angioneogenese angewiesen sind, um weiteres Tumorwachstum und Metastasierung zu ermöglichen. Inzwischen gibt es zahlreiche Studien, die sich mit diesem Mechanismus bei verschiedenen Tumoren beschäftigen. Für diese pathologische Angiogenese wurde der Begriff der Angioneogenese geprägt, da es zu einer Neubildung von Gefäßen über Mechanismen der Angiogenese in den Tumoren kommt. Hierbei scheint es erneut je nach Organsystem Unterschiede zu geben. Vor allem bei malignen Gliomen konnte die entscheidende Rolle der Angiogenese bei Tumorwachstum und Malignisierung gezeigt werden. So gilt eine vorhandene Angioneogenese als Kriterium für ein höher malignes Gliom, ihre Ausprägung korreliert zudem mit dem peritumorösem Ödem und verschiedenen molekularbiochemischen Befunden (Kleihues und Cavenee 2000).

1.2.1.7 Angioneogenese in Tumoren des ZNS

Die Induktion der Angioneogenese erfolgt durch eine Vielzahl von Mediatoren. Während bei der physiologischen Angiogenese die Endothelien aufgrund nicht überschießender Konzentrationen der Mediatoren es schaffen, eine abhängig von der Gefäßgröße (Arterie, Arteriole, Kapillare) und Funktion (arteriell, venös) regelhafte Wandstruktur zu formieren, so kommt es bei pathologischen Mediator-Konzentrationen zu irregulären Gefäßproliferaten. Solche sind in der Zahl und in der Wandstruktur apyhsiologisch. Als Konsequenz werden unterschiedliche Morphologien beobachtet. So sieht man z.B. bei eher langsam wachsenden Tumoren wie bei pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I eine Vielzahl von Gefäßproliferaten, welche v.a. durch eine verquollene Adventitia imponieren (Kleihues und Cavenee 2000). Bei Prozessen wie Abszessen oder malignen Tumoren hingegen bestehen die Wände der Gefäßproliferate aus mehrschichtigen Endothelien, eine anatomische Wandstruktur ist nicht zu beobachten. Als Folge dieser endothelialen Proliferate können diese Gefäße oft ihren physiologischen Funktionen nicht mehr ausreichend nachkommen und es kommt über Störungen des Gleichgewichtes des Gerinnungsystems an den Gefäßoberflächen zur Ausbildung von okkludierenden Thromben. Als Folge dessen können dann zumindest in neoplastischen Prozessen konsekutive Nekrosen der abhängigen Stromgebiete beobachtet werden.

In neoplastischen Tumoren sind die Zellen der Blutgefäße im Gegensatz zu denen des Tumors nicht transformiert und demzufolge auch durch exogene physiologische Signale steuerbar. Bereits Anfangs der 1970iger Jahre stellte der Bostoner Kinderchirurg Judah Folkman die Hypothese auf, dass aufgrund der physiologischen Integrität der Gefäße diese ein attraktives Ziel einer alternativen Tumortherapie darstellen. Die Idee war es, über eine Inhibierung von Angiogenese-Mediatoren die Neubildung von Gefäßen in wachsenden Tumoren zu blocken (Folkman et al. 1971; Folkman 1972). Über längere Zeiträume fand dieses alternative Konzept in der wissenschaftlichen Gemeinschaft kein sonderliches Interesse, bis in den 1990iger Jahren Studien durchgeführt wurden, welche grundsätzlich die Korrektheit dieser Hypothese dokumentierten. So konnte gezeigt werden, dass die physiologischen Angiogeneseinhibitoren AGM-1470 (Ingber 1990), Angiostatin (O'Reilly et al. 1994; O'Reilly et al. 1994) und Endostatin (O'Reilly et al. 1997) das Wachstum von in-vivo Neoplasien blocken. Ebenfalls konnte das Tumorwachstum durch Applikation monoklonaler Antikörper gegen VEGF (Kim et al. 1993) und $a_v \beta_3$ Integrine (Brooks et al. 1994) gehemmt werden. Weiterhin wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass ein genetisch defekter FLK1 Rezeptor (VEGFR2) das Wachstum von Glioblastomen hemmt (Millauer et al. 1993). In der Zwischenzeit wurden eine Vielzahl klinischer Studien an Menschen bis hin zur Phase III mit verschiedenen Angioneogenese Inhibitoren durchgeführt.

1.3. Vaskularisation von Meningeomen

1.3.1. Allgemeine Zusammenhänge

Meningeome weisen einen unterschiedlichen Grad an versorgenden Blutgefäßen auf. So zeigen angiomatöse Meningeome eine z.T. extreme Dichte an Blutgefäßen mit teils atypischer Gefäßwandkonfiguration, während andere WHO Grad I Meningeome z.T. nur wenige intratumorale Gefäße haben. Meningeome werden zumeist aus meningealen Gefäßen, d.h. aus dem Stromgebiet der A. carotis externa, gespeist. Allerdings kann in etwa 60% der Meningeome auch eine piale Blutversorgung aus dem Stromgebiet der A. carotis interna nach-gewiesen werden (Bitzer et al. 1997).

Neben den oben im Detail beschriebenen angiogenen Wachstumsfaktoren wurde Endothelin von verschiedenen Autoren intensiv untersucht. Es konnte dabei ein Zusammenhang zwischen dem Grad an Endothelin Expression und dem Malignitätsgrad der Meningeome aufgezeigt werden (Kitagawa et al. 1994; Kitagawa et al. 1994; Harland et al. 1995; Pagotto et al. 1995; Yamaga et al. 1995; Harland et al. 1998).

1.3.2. Das VEGF System

Das VEGF Protein wurde 1989 erstmalig identifiziert (Ferrara und Henzel 1989) und im gleichen Jahr noch kloniert (Leung et al. 1989). Vier alternativ gesplicte VEGF Transkripte werden von dem 8 Exon Gen abgelesen (Tischer et al. 1991; Poltorak et al. 1997). VEGF bindet an die Tyrosin Kinase Rezeptoren FLT1 (VEGFR1) und KDR/FLK1 (VEGFR2), welche fast ausschließlich nur von Endothelien exprimiert werden, was die nahezu exklusive VEGF Wirkung auf diese Zellen erklärt (Ferrara und Henzel 1989). Die Funktion von VEGF ist die Induktion der Angiogenese mittels Permeabilitätsänderung, Proliferation, Chemotaxis und räumlicher Ausrichtung von Endothelien (Ferrara und Henzel 1989; Leung 1989; Millauer 1993).

Nach extrazellulärer Bindung von VEGF an die VEGFR1 und VEGFR2 Rezeptoren der Endothelzelle kommt es zu einer intrazellulären Phosphorylierung der Tyrosinkinasen. Eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege werden aktiviert: über die PI3Ks kommt es zu einer Aktivierung des Akt Signalwegs und so zur Proliferationsinduktion. Über FAK und Paxillin wird die zytoskeletale Zellmigration gestartet. Mittels des Adapter Moleküls shc wird der RAS und MAPK Signalweg und damit die Proliferation induziert. Über PLCγ und die second messengers DAG und IP3 aktiviert dann VEGF den PKC und NOS Signalweg (Abb. 1.9) (Gnarra et al. 1996; Ema et al. 1997).

VEGF wurde bereits gut in einigen vorangegangenen Studien in Gliomen untersucht (Plate et al. 1994; Folkman 1995; Plate und Risau 1995). Hierbei wurde VEGF als zentraler Faktor der peritumoralen Ödembildung identifiziert. Für astrozytäre Tumore entwickelten die Autoren der letztgenannten Studie ein Modell des "angiogenetic switch", in dem es zu einer Entwicklung und Malignisierung astrozytärer Tumore durch Hochregulation von bereits vorhandenem VEGF in den Tumorzellen und dem Rezeptor FLT1 auf den Endothelzellen kommt. In einer weiteren Arbeit zur Angiogenese in Gliomen aus demselben Labor wie die vorliegende Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe der VEGF Konzentration, dem WHO Grad und der Tumorvaskularisierung gezeigt werden (Schmidt et al. 1999).

Als einer der meist untersuchten angiogenetischen Wachstumsfaktoren wurde VEGF bereits in einigen dieser Arbeit vorausgegangenen Studien auch an Meningeomen untersucht. Die Resultate ergaben ein z.T. widersprüchliches Bild und erforderten weitere detailliertere Studien. Die meisten Studien analysierten das peritumorale Ödem im Zusammenhang mit VEGF. In einer Kombination aus einer Evaluation bildgebender Daten hinsichtlich des Ausmaßes des peritumoralen Ödems mit einer *in-situ* Hybridisierung gegen VEGF mRNA bzw. immunhistochemischer Analyse konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen VEGF Expression und Vorhandensein und Größe eines Hirnödems gibt. Die Autoren verschiedener Studien kamen zu dem Schluss, dass VEGF eine erhöhte Neovaskularisation des Tumors und eine erhöhte Permeabilität der Gefäße zur Folge hat (Zang 1982; Kalkanis et al. 1996; Goldman 1997; Provias et al. 1997; Yoshioka et al. 1999). Eine weitere Studie analysierte immunhistochemisch die Expression von VEGF in Korrelation zu Angiographie und CCT. Die Autoren konnten zeigen, dass VEGF-exprimierende Meningeome zumeist durch zerebrale Arterien versorgt werden und – in Konsistenz mit den zuvor genannten Studien - ein peritumorales Ödem induzieren (Bitzer et al. 1998).



Abbildung 1.7: Intrazelluläre Signalwege induziert durch extrazelluläres VEGF. Für weitere Details siehe Text.

Andere Studien gingen darüber hinaus und versuchten mehr oder weniger erfolgreich, detailliertere Zusammenhänge bezüglich VEGF und der Malignisierung und/oder der histologischen Subvarianten aufzuzeigen. So fand sich kein Zusammenhang zwischen VEGF Expression, Endothelproliferation und Malignitätsgrad in Meningeomen (Pietsch et al. 1997). In einer anderen Studie konnte immunhistochemisch nicht aufgezeigt werden, dass die Tumorzellen von angiomatösen und atypischen Meningeomen VEGF exprimieren. Nur Endothelien im Tumorgewebe zeigten eine Positivität. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass VEGF in Meningeomen keine wesentliche Bedeutung für die Angioneogenese spielen würde, wobei nicht diskutiert wurde, dass Endothelzellen VEGF nicht selbst produzieren, sondern nur binden (Dietzmann et al. 1997).

Weiterhin wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen VEGF und der Vaskularisation in Meningeomen gibt. Tatsächlich konnte ein Zusammenhang zwischen der VEGF mRNA Konzentration und Anzahl an kleinen Gefäßen dokumentiert werden (Samoto et al. 1995).

Ebenfalls wurde geprüft, welche Faktoren die VEGF Konzentration determinieren. Mittels der CH-157MN Meningeom Zelllinie konnte gezeigt werden, dass EGF und bFGF die Expression von VEGF verstärken, PDGF-BB, Estradiol, Progesteron und Testosteron keine Wirkung auf VEGF haben und dass Dexamethason die VEGF Konzentration senkt (Tsai et al. 1999). Weiterhin wurde nach Embolisation von Meningeomen beschrieben, dass solche hypoxischen Tumore vermehrt VEFG exprimieren (Park et al. 2000).

1.3.3. Das HGF/SF System

Aus Plasma von Patienten mit schwerem Leberversagen wurde 1988 der HGF (Hepatocyte Growth Factor) Faktor isoliert (Gohda et al. 1988). In der Quartärstruktur liegt HGF als Dimer aus einer leichten und einer schweren Kette vor, die beide von der gleichen mRNA abgelesen werden (Miyazawa et al. 1989; Nakamura et al. 1989). Daneben wurde ein Protein beschrieben, welches epitheliale Zellen in Kultur auseinander wandern lässt und welches deshalb "scatter factor" genannt wurde (Gherardi und Stoker 1990). Später wurde festgestellt, das HGF und SF identisch sind. Die Gene für den Liganden HGF/SF und für dessen Rezeptor *met*, der von dem Protoonkogen *c-met* kodiert wird, liegen nahe beieinander auf 7q und sind in verschiedenen Tumoren amplifiziert (Weidner et al. 1991). HGF/SF ist ein Mitogen, welches u.a. Endothelien, neuronale Progenitorzellen, Epithelien und Melanozyten stimuliert (Rubin et al. 1991). In unterschiedlichen Geweben konnte HGF eine Rolle bei Morphogenese, Proliferation, Migration sowie Interaktion von mesenchymalen und epithelialen Zellen zugewiesen werden (Rosen et al. 1994). In weiteren Studien konnte HGF/SF zudem als angiogenetischer Wachstumsfaktor identifiziert werden (Bussolino et al. 1992; Grant et al. 1993).

Die Rolle von HGF/SF wurde bereits in einigen Studien in Gliomen untersucht. Hierbei fand sich eine Korrelation von HGF/SF Konzentraion und dem WHO Grad (Rosen et al. 1996) und es konnte ein Zusammenhang zwischen der HGF/SF Konzentration und Tumorwachstum und Invasivität gezeigt werden, wobei *in-vitro* sowohl Tumorzellen als auch Endothelzellen eine höhere Migration und Proliferation durch HGF/SF aufwiesen (Lamszus et al. 1998). In einer weiteren Studie konnte eine signifikante Korrelation der Vaskularisation von Gliomen und der HGF/SF Konzentration nachgewiesen werden (Schmidt 1999). Hierbei zeigte sich, dass die Korrelation der HGF/SF Konzentration zwar unabhängig, aber schwächer war als die ebenfalls signifikante Korrelation von Tumorvaskularisation und VEGF Konzentration. Es wurde somit vermutet, dass HGF/SF neben der Wirkung als eigenständig regulierter angiogenetischer Wachstumsfaktor auch durch andere Mechanismen, insbesondere durch Beeinflussung der Tumorzellmotilität bei der Malignisierung von Gliomen eine Rolle spielt.

Zum Zeitpunkt der Umsetzung des laborexperimentellen Teiles der hier vorliegenden Dissertation gab es keine Publikationen hinsichtlich des HGF/SF Systems in Meningeomen.

1.3.4. Das bFGF System

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) oder FGF2 wurde 1986 erstmalig kloniert und als Protein charakterisiert (Abraham et al. 1986). bFGF ist ein Wachstumsfaktor, welcher für die Angioneogenese, ZNS Entwicklung, Wundheilung und das Tumorwachstum wichtig ist. Es konnte gezeigt werden, dass bFGF und PDGF-BB die Bildung von Gefäßnetzwerken induzieren können, welche noch lange nach Entzug dieser Substanzen stabil bleiben.

bFGF konnte in vorangegangenen Studien auch in Gliomen nachgewiesen werden. Hierbei fanden sich keine einheitlichen Ergebnisse. Zwei Studien zeigten keine Korrelation der bFGF Konzentration mit der Tumormalignität oder der Vaskularisation (Samoto 1995; Schmidt 1999), eine immunhistochemische Studie beschrieb im Gegensatz eine stärke Immunreaktivität in höhermalignen Gliomen (Zagzag et al. 1990), eine weitere Studie zeigte eine Korrelation der zellulären bFGF Konzentration zur Vaskularisation (Takahashi et al. 1992). In einem *in- vivo* Tiermodell für Gliome konnte durch einen Antikörper gegen bFGF ein vermindertes Tumorwachstums sowie eine niedrigere Vaskularisation beobachtet werden (Stan et al. 1995). Es wird somit angenommen, dass bFGF bei der Entwicklung maligner Gliome bzw. deren Angiogenese eine Rolle spielt, die genauen Mechanismen und Abläufe erscheinen hier weiterhin unklar.

Einige publizierte Studien liegen hinsichtlich bFGF und Meningeomen vor. Gleich den Daten von VEGF zeigen diese Arbeiten teils widersprüchliche Resultate. In einer frühen kleinen Studie wurde aufgezeigt, dass alle untersuchten Meningeome bFGF exprimieren (Akutsu et al. 1991). Hingegen konnte in einer anderen Studie bFGF nur in einzelnen Endothelien, nicht aber in den Tumorzellen gefunden werden (Dietzmann 1997). In einer Fallstudie wurde zwar eine Hochregulation von VEGF, nicht aber von bFGF in einem malignen Meningeom beschrieben (Shono et al. 2000). In einem Zellkulturexperiment an Meningeomen wurde dargelegt, dass bFGF keine stimulierende oder inhibierende Wirkung in Bezug auf eine Phototherapie mit 5-Amino-Levulin Säure hat (Tsai et al. 1999). Die gleiche Autorengruppe konnte aber mittels einer Meningeom Zelllinie aufzeigen, dass bFGF einen Anstieg von VEGF induziert (Tsai 1999).

1.3.5. Das PLGF System

Der placentare Wachstumsfaktor PLGF (Placenta Growth Factor) gehört in die gleiche Proteinfamilie wie VEGF (Mattei et al. 1996) und bindet ebenso an die Rezeptoren FLT1 (VEGFR1) und KDR/FLK1 (VEGFR2), welche vorwiegend nur von Endothelien exprimiert werden (Ferrara und Henzel 1989).

Die Rolle von PLGF bei der Angiogenese von Hirntumoren ist bisher kaum erforscht. In einer kleinen Studie konnte PLGF bei einer Ratten-Gliom-Zelllinie nachgewiesen werden (DiSalvo et al. 1995). In einer anderen Studie mit 36 unterschiedlichen Hirntumoren wurde PIGF mRNA in 64,1% der Hirntumore exprimiert, unter Hypoxiebedingungen wurde diese in einer humanen Gliomzelllinie hochreguliert. Eine Rolle von PLGF bei der Pathogenese von Hirntumor-Angiogenese wurde daraus abgeleitet (Nomura et al. 1998).

Nur wenige Daten liegen gegenwärtig zu dem angiogenen Wachstumsfaktor PLGF und Meningeomen vor. In einer Studie mittels *in-situ* Hybridisierung konnte aufgezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen PLGF Expression und dem Malignitätsgrad von Meningeomen gibt (Hatva et al. 1995). In einer weiteren Studie wurden nur einige Meningeome beschrieben, in denen PLGF hochreguliert ist (Donnini et al. 1999).

1.4. Ziele der vorliegenden Studie

Meningeome sind therapeutisch z.T. nur sehr unbefriedigend behandelbar. Weitere therapeutische Optionen sind deshalb zwingend erforderlich. Das Verständnis der Mechanismen und Zusammenhänge der Angiogenese und Identifikation der hierfür verantwortlichen Faktoren könnte eventuell den Angriffspunkt für eine anti-angiogene Therapie bieten.

Aus diesem Grund sollte die Expression von VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF mittels enzyme-linked immunosorbent (ELISA) Assays in Meningeomen untersucht werden. Die gleichen Tumore sollten dann bezüglich der Dichte kleiner Gefäße, der Proliferationsaktivität und dem Grad der Tumorinfiltration beurteilt werden. Zudem sollte die endotheliale Chemotaxis und die Bildung von Kapillar-Äquivalenten *in-vitro* hinsichtlich der Inhibition der VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Systeme mittels blockierender Antikörper funktionell untersucht werden.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es einen Zusammenhang zwischen VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Expression und dem WHO Grad der untersuchten Meningeome? Bezüglich VEGF deuteten einige vorangegangene Publikationen nicht auf einen solchen Zusammenhang hin (Pietsch 1997). Für PLGF, HGF/SF und bFGF gab es keine vorangegangenen Daten.
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Expression und häufigen histologischen Subvarianten? Bisher gab es keine eindeutigen Daten zu dieser Fragestellung (Dietzmann 1997).
- 3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Expression und der Dichte kleinerer intratumoraler Gefäße? In einer kleinen Studie zu VEGF wurde bereits ein solcher Zusammenhang beobachtet (Samoto 1995). Nun sollte an einer deutlich größeren Zahl an Tumoren diese initiale Beobachtung verifiziert oder falsifiziert und auf PLGF, HGF/SF und bFGF erweitert werden.
- 4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Expression und der Proliferationsaktivität von Meningeomen?
- 5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Expression und der intraoperativen Einschätzung an Tumorinfiltration in Meningeomen? Nachdem in der ersten Fassung der WHO Klassifikation von 1993 die Gehirninfiltration ein Malignitätskriterium war (Kleihues et al. 1993) (Kleihues et al. 1997), so wurde diese Tumoreigenschaft in der WHO Klassifikation von 2000 wieder zurück genommen (Kleihues und Cavenee 2000). Diese Zurücknahme ist weiterhin umstritten.
- 6. Lässt sich funktionell die endotheliale Chemotaxis in einem *in-vitro* Modell beeinflussen, wenn man Proteinextrakte aus Meningeomen zusammen mit Anti-VEGF, Anti-HGF/SF und Anti- bFGF Antikörper appliziert?

7. Lässt sich funktionell die Bildung von Kapillar-Äquivalenten in einem *in-vitro* Modell beeinflussen, wenn man Anti-VEGF, Anti-HGF/SF und Anti-bFGF Antikörper zusammen mit Proteinextrakte aus Meningeomen appliziert?

Aus der Beantwortung dieser Fragen sollte eine Hypothese hinsichtlich des zu erwartenden Potentials einer anti-angiogenen Therapie in Meningeomen abgeleitet und im Kontext der aktuellen Studienlage und der verfügbaren Therapeutika diskutiert werden.

2. Material und Methoden

i

2.1. Tumorgewebe

i

Das in dieser Arbeit untersuchte Tumorgewebe stammte von Patienten der Neurochirurgischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf. Es wurde intraoperativ Meningeomgewebe gewonnen, wovon der für die neuropathologische Diagnostik bestimmte Anteil in Paraffinblöcke eingebettet wurde. Zusätzliches Meningeomgewebe, das makroskopisch keine Spuren von Nicht-Tumorgewebe aufwies, wurde sofort bei -80 °C tiefgefroren. Die Patienten gaben zuvor ihr Einverständnis ab.

Nr.	Alter	Geschlecht	Subtyp	Infiltration in Umgebung	Infiltration in Knochen
2	49	m	transitional	nein	ja
12	59	w	fibrillär	nein	nein
20	61	w	angiomatös	nein	nein
26	60	w	meningotheliomatös	nein	nein
27	25	w	meningotheliomatös	nein	nein
30	77	w	transitional	ja	ja
35	41	w	transitional	nein	nein
36	60	w	meningotheliomatös	ja, Basis	nein
37	47	m	angiomatös	nein	nein
38	94	m	meningotheliomatös	ja	nein
40	60	w	meningotheliomatös	(ja)	nein
42	71	w	angiomatös	ja, Basis	nein
44	61	w	meningotheliomatös	nein	nein
51	21	w	transitional	nein	nein
52	50	w	fibrillär	ja	nein
53	47	m	fibrillär	fibrillär ja	
62	27	w	meningotheliomatös nein		nein
67	57	m	transitional nein r		nein
68	55	w	meningotheliomatös ja, Basis n [,]		nein
73	72	w	transitional k.A. n		nein
78	31	w	meningotheliomatös ja, Basis ne		nein
79	11	m	transitional	ja, Basis	nein
80	71	w	fibrillär	nein	nein
82	54	m	meningotheliomatös	ja	nein
83	46	w	fibrillär	ja	nein
97	71	w	fibrillär	ja	nein
100	50	w	transitional	k. A	nein
118	58	w	meningotheliomatös	nein	nein
119	46	m	fibrillär	ja	ја
121	68	w	fibrillär	ja	ja
122	62	m	meningotheliomatös	ja	nein
123	44	w	transitional	ja	nein
124	65	w	mikrozystisch	ja	nein
129	38	w	meningotheliomatös	ja	nein

Tabelle 2.1 Klinische Angaben zu verwendeten benignen Meningeomen WHO Grad I

131	53	w	fibrillär	nein	nein
133	44	w	meningotheliomatös	ja	nein
134	51	w	fibrillär	ја	nein
135	42	w	meningotheliomatös	ја	nein
136	59	w	meningotheliomatös	nein	nein
137	71	w	transitional	nein	nein

Klinische Angaben aller 40 Meningeome WHO Grad I mit Alter und Geschlecht, histologischem Subtyp, Angabe über Infiltration in umgebende Strukturen wie Dura, ZNS und Bindegewebe und Infiltration in knöcherne Strukturen. Die Angaben über die Infiltration beziehen sich auf den makroskopischen intraoperativen Befund. w = weiblich, m = männlich, k.A. = keine Angabe, Basis = Schädelbasis.

Alle Meningeome wurden nach den zur Zeit der Studiendurchführung gültigen WHO 1993 Kriterien vom Instituts für Neuropathologie des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf histologisch klassifiziert (Kleihues 1997). Es wurden Meningeome aller WHO Grade eingeschlossen. Die Umgebungsinfiltration der Meningeome wurde anhand des makroskopischen intraoperativen Befundes beurteilt. Als invasiv galten Tumore, die in benachbarte Strukturen wie die duralen Sinus, Knochen oder Schädelbasis-Strukturen eingewachsen waren. Eine Invasivität in angrenzende Hirnstrukturen wurde nicht beobachtet. Einzelheiten zu den verwendeten Meningeomen siehe Tabelle 2-1 bis 2-3.

Nr.	Alter	Geschlecht	Subtyp	Infiltration in Umgebung	Infiltration in Knochen
3	49	w	atypisch	nein	nein
5	74	m	atypisch	ja	ja
6	40	m	atypisch	nein	nein
8	34	w	atypisch	nein	nein
15	61	w	atypisch	nein	nein
16	74	w	atypisch	nein	nein
25	43	w	atypisch	ја	ja
34	60	w	atypisch	nein	nein
45	36	w	atypisch	nein	nein
77	72	w	atypisch	nein	nein
98	26	w	atypisch	nein	nein
108	33	w	atypisch	nein	nein
109	40	w	atypisch	nein	nein
112	55	m	atypisch	k. A	nein
113	57	w	atypisch	ja, Basis	nein
117	31	w	atypisch	ja	nein
120	62	m	atypisch	ja	nein
126	85	w	atypisch	nein	nein
127	69	w	atypisch	nein	nein
130	53	w	atypisch	nein	nein
132	37	w	atypisch	nein	nein

 Tabelle 2.2 Klinische Angaben zu verwendeten atypischen Meningeomen WHO Grad II

Klinische Angaben aller 21 Meningeome WHO Grad II mit Alter und Geschlecht, histologischem Subtyp, Angabe über Infiltration in umgebende Strukturen wie Dura, ZNS und Bindegewebe und Infiltration in knöcherne Strukturen. Die Angaben über die Infiltration beziehen sich auf den makroskopischen intraoperativen Befund. w = weiblich, m = männlich, k.A. = keine Angabe, Basis = Schädelbasis.

Nr.	Alter	Geschlecht	Subtyp	Infiltration in Umgebung	Infiltration in Knochen
9	27	w	anaplastisch	nein	nein
14	60	w	anaplastisch	nein	nein
17	70	w	anaplastisch	nein	nein
32	28	w	anaplastisch	nein	nein
39	15	w	anaplastisch	ja	ja
81	55	w	anaplastisch	nein	nein
111	52	m	anaplastisch	ja	nein
128	57	m	anaplastisch	k. A.	ja

Tabelle 2.3 Klinische Angaben zu verwendeten anaplastischen Meningeomen WHO Grad III

Klinische Angaben aller 8 Meningeome WHO Grad III mit Alter und Geschlecht, histologischem Subtyp, Angabe über Infiltration in umgebende Strukturen wie Dura, ZNS und Bindegewebe und Infiltration in knöcherne Strukturen. Die Angaben über die Infiltration beziehen sich auf den makroskopischen intraoperativen Befund. w = weiblich, m = männlich, k.A. = keine Angabe.





2.1.1. Tumorgewebeextrakte

Reagenzien:

Puffer 1:	20 mM Tris, pH = 7,5	Puffer 2:	20 mM Tris, pH = 7,5
	0,5 M NaCl		1 M NaCl
	0,1 mM PMSF		0,1 mM PMSF
	10 µg/ml Leupeptin		10 Mg/ml Leupeptin
Dialyse-Puffer:	20 mM Tris, pH = 7,5		
	0,15 M NaCl		

Zur Herstellung der Proteinextrakte wurde ein ca. 1 cm³ großes Gewebestück abgeteilt, drei bis vier Mal mit kaltem Dialyse-Puffer gespült, um das Präparat von äußerem Blut zu reinigen und mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde zu dem Gewebe eiskalter Puffer 1 in einer Menge von 3 ml/g, Minimum 100 µl, hinzugegeben. Das Leupeptin in Puffer 1 und 2 dient der Hemmung der Gewebeproteasen. Unter ständigem Kühlen mit Eis wurde das Gewebe sechs bis acht Mal für jeweils fünf Sekunden mittels Ultraschall zerkleinert und danach 30 min bei 4 °C mit 15000 rpm zentrifugiert. Nach Abtragen des fettigen Überstandes wurde die obere Fraktion in ein neues Gefäß gegeben und weiterhin kontinuierlich mit Eis gekühlt. Der restliche Bodensatz wurde mit dem höher konzentrierten Puffer 2 in einer Menge von 3 bis 5 ml/g versetzt und unter gleichen Bedingungen erneut ultrabeschallt und zentrifugiert. Die höhere NaCl Konzentration des Puffers 2 diente der Extraktion der über Heparansulfatproteoglykane an Zellen und Matrix gebundenen Wachstumsfaktoren. Die jetzt entstandene Fraktion wurde mit der ersten vereinigt und in Dialyseschläuche umgefüllt. Im Anschluss wurden die Extrakte drei Tage gegen kalten Dialyse-Puffer dialysiert und der Puffer einmal täglich gewechselt. Vier Liter Puffer reichten für 15 bis 20 Extrakte. Die Extrakte wurden aliquotiert und bei -80 °C in einzelnen Tubes eingefroren.

2.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Tumorgewebeextrakte wurden mit dem Bicinchoninic acid Assay, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA, bestimmt.

Geräte:

- Spektrophotometer, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA
- Auswertungssoftware, Mikrotek

Reagenzien:

Stocklösung: Albumin 2 mg/ml = BSA

- Lösung A: 100 μl BSA + 150 μl dest. Wasser = 0,8 mg/ml
 - Lösung B: 60 µl BSA + 140 µl dest. Wasser = 0,6 mg/ml
- Working Reagenz: 20 ml Reagenz A + 0,4 ml Reagenz B

Hierbei handelt es sich um einen gekoppelten optischen Test, bei dem die Proteine in alkalischem Medium im Rahmen einer Biuret-Reaktion mit Cu²⁺ unter Bildung von Cu¹⁺ reagieren. Je zwei Bicinchoninat Moleküle bilden mit Cu¹⁺ Ionen farbige Chelatkomplexe mit einem Lichtwellenlängen-Absorbtionsmaximum bei 562 nm. In alle Vertiefungen einer 96-Well Platte wurde nach Standardprotokoll 50µl destiliertes Wasser gegeben. Aus Lösung A und B wurde eine Standardreihe hergestellt, als Leerwert diente destilliertes Wasser. Von den Tumorextrakten wurden jeweils sechs Verdünnungen angefertigt, wobei in die erste Well 10 µl Tumorextrakt und 40 µl destiliertes Wasser pipettiert wurde, welche dann seriell 1:2 herunter verdünnt wurden. Die letzten 50 µl wurden verworfen. In der ersten Well befanden sich somit 5 µl Extrakt. Im nächsten Schritt wurden pro Well 200 µl Working Reagenz zugesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde bei 562 nm photometrisch die Extinktion mit dem Spektrophotometer gemessen.

Die Proteinkonzentration jedes einzelnen Tumorextraktes wurde mit Hilfe einer Auswertesoftware durch die Regression der Extinktionswerte der zwei Standardreihen zurückgerechnet und in mg pro eingesetzte Menge angegeben. Von den sechs Messwerten jedes Tumorextraktes wurde ein Mittelwert berechnet, indem alle Werte addiert und durch ihre Anzahl geteilt wurden. Die endgültige Proteinkonzentration wurde nach Korrektur für die eingesetzte Menge in mg/ml angegeben.

2.1.3. Bestimmung der Wachstumsfaktoren

2.1.3.1. Antikörper

Für die Bestimmung der Wachstumsfaktoren HGF/SF, VEGF, bFGF und PLGF wurden Sandwich- Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt. Die Bestimmung der Faktoren VEGF, bFGF und PLGF erfolgte mit kommerziellen Kits und wird unter 2.1.3.3 beschrieben.

2.1.3.2. HGF/SF ELISA

Geräte:

Spektrophotometer, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA

Auswertungssoftware, Mikrotek

Reagenzien, Puffer:

Waschpuffer	20 mM Tris Puffer, pH = 7,5	Substratpuffer:	48,5 Diethanolamin
(TBS):	150 mM NaCl		100 μ l Natriumacid NaN ₃
Blockpuffer:	0,5% Gelatine in TBS		200 mg MgCl ₂
Bindungspuffer:	0,25% Gelatine in TBS		H_2O ad 400 ml; pH = 9,8 mit
			HCI einstellen
			auf 500 ml auffüllen, bei 4 °C
			aufbewahren
A A (11 11			

1. Antikörper:	monoklonales Anti-Human HGF/SF, MAB 294, R&D Systems, Minneapolis, MN
2. Antikörper:	Schaf anti- HGF/SF Serum, Genentech, Inc., South San Francisco, CA
3. Antikörper:	anti-Schaf IgG, alkalische Phosphatase markiert, A-5187, Sigma, St. Louis, MO
Standard:	16 ng/ml rhHGF/SF (Genentech, San Francisco, CA, USA)

Um die Konzentration von HGF/SF in den einzelnen Tumorproteinextrakten zu bestimmen, wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Eine 96-Well ELISA Platte wurde mit 100 μ l pro Well mit monoklonalem Antikörper gegen HGF/SF in einer Konzentration von 0,75 mg/ml beschichtet, ca. 15 μ l Antikörper-Lösung auf 10 ml 0,1 M Natriumcarbonatlösung, pH = 9,5 und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Anschließend wurde die Platte mit Waschpuffer gewaschen und mit 100 μ l Blockpuffer pro Well für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach einem erneuten Waschgang wurde in die Wells B1 bis H1 und B2 bis H2 jeweils 100 μ l Bindungspuffer gegeben. In die Wells A1 und A2 wurde 200 μ l Standardlösung pipetiert und bis G1 und G2 seriell herunterverdünnt. In die Wells H1 und H2 kam keine Standardösung, da sie den Leerwert darstellten.

Von den Tumorextrakten wurden 4 Verdünnungsstufen angelegt. Dabei wurde 200 μ l unverdünntes Tumorextrakt in die erste Well gegeben und dieses nach unten jeweils 1:2 verdünnt. Die letzten 100 μ l wurden verworfen, sodass sich schließlich in jeder Well 100 μ l befanden. Nach einer erneuten einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte wieder ein Waschgang.

Im nächsten Schritt wurde in jede Well 100 µl des 1:2000 verdünnten polyklonale Antikörpers gegeben, 5 µl Antikörper auf 10 ml Bindungspuffer, Schaf anti-HGF/SF, Genentech, Inc. Anschließend wurde wieder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und mit Waschpuffer gewaschen. Jetzt wurde jeweils 100 µl des mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörpers zugesetzt, Sigma Anti-Schaf IgG A-5187, in einer Verdünnung von 1:2000, 5 µl Antikörper auf 10 ml Bindungspuffer. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte ein gründlicher Waschgang und die Farbentwicklung mit 100 µl pro Well mit einer zuvor unter Lichtschutz hergestellten Lösung aus einer Tablette p-Nitrophenylphosphat, Sigma, in 20 ml Substratpuffer. Direkt im Anschluss wurde die Extinktion bei 410 nm im Plate-Reader alle 5 min gemessen, bis die Werte für den höchsten Standard zwischen 1,9 und 2,1 OD (optische Dichte) lagen.

Die HGF/SF-Konzentration jedes einzelnen Tumorextraktes wurde mit Hilfe einer Auswertesoftware durch die Regression der Extinktionswerte der zwei Standardreihen zurückgerechnet und in ng/ml angegeben. Von den vier Messwerten jedes Tumorextraktes wurde ein Mittelwert berechnet, indem alle Werte addiert und durch ihre Anzahl geteilt wurden. Anschließend wurde die HGF/SF-Konzentration durch die jeweilige Proteinkonzentration des Tumorextraktes geteilt, um die Konzentration von HGF/SF in ng / mg Protein anzugeben.

2.1.3.3. VEGF, PLGF, bFGF ELISA

Zur Bestimmung der Wachstumsfaktorkonzentrationen von VEGF, bFGF und PLGF wurden kommerzielle Kits, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet, siehe Tab. 2.4. Die Auswertung erfolgte wie für den HGF/SF ELISA, wobei die Zwischenergebnisse für bFGF und PLGF in pg/ml angegeben wurden.

	VEGF	PLGF	bFGF
Katalog Nummer	DVE00	DPG00	DFB00
1. Antikörper	Assay Dilutent RD1W	Assay Dilutent RD1-22	Assay Dilutent RD1J
2. Antikörper	polyklonaler AK gegen VEGF, konjugiert mit Meerrettich Peroxidase	polyklonaler AK gegen PLGF, konjugiert mit Meerrettich Peroxidase	polyklonaler AK gegen bFGF, konjugiert mit Meerrettich Peroxidase
Inkubationszeit des 2. AK	25 min	30 min	20 min
Wellenlänge	450 nm	450 nm	450 nm
Sensitivität	< 9 pg/ml VEGF	< 7 pg/ml PLGF	< 1 pg/ml bFGF

Tabelle 2.4 ELISA Kits R&D Systems für VEGF, PLGF, bFGF

Details zu den verwendeten kommerziellen ELISA Kits für die Bestimmung von VEGF, PLGF und bFGF mit Angaben des Herstellers zu den eingesetzten Antikörpern und deren Sensitivität sowie über Inkubationszeiten und geeignete Wellenlängen für die photometrische Bestimmung. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. AK = Antikörper

Geräte:

- Spektrophotometer, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA
- Auswertungssoftware, Mikrotek

2.2. Quantifizierung der Tumorgefäße

Um den Vaskularisierungsgrad der einzelnen Meningeome bestimmen zu können, wurden von Paraffinblöcken der untersuchten Tumore Schnitte angefertigt, auf denen dann immunhistochemisch die Endothelzellen mittels eines Antikörpers gegen von Willebrandt-Faktor (vWF) angefärbt wurden. Da vWF nur in Endothelzellen und nicht in glatten Muskelzellen oder Fibroblasten vorkommt, kann es zur Identifizierung bzw. als spezifischer Marker für Endothelzellen herangezogen werden.

Reagenzien:

Tris-Triton-	Tris-Lösung 0,2 M 1225 ml	Natriumacid:	NaN3 26 mg auf 20 ml Aqua
Puffer:	auf 2 I Aqua bidest		bidest
	HCI 1N 207 ml auf 1 l	DAB:	200 mg auf 40 ml Tris-BSS,
	Aqua bidest		filtrieren
	NaCl 42,5 g auf 2 l Aqua		100 µl H ₂ O ₂ + 1 ml Puffer
	bidest		
	ergibt 5 I 0,05 M Tris-BSS-		300 μl + 9 ml 4 °C kalten Puffer
	Puffer		+ 1 ml-Portion DAB
	pH = 7,6 einstellen		
	Zugabe von 5 ml Triton-X- 100		
Stammlösung A:	21,01 g Zitronensäure 0,1	Stammlösung B:	29,41 g Natriumcitrat 0,1 M auf
	M auf 1 I Aqua iniectabilia		1 I Aqua iniectabilia

2.2.1. Vorbereitung der Schnitte

Von den bei 4 °C gekühlten Paraffinblöcken wurden 2 bis 4 µm dünne Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt, auf beschichtete Objektträger, Fa. Menzel, im warmen Wasserbad, Aqua dest. bei 56 °C, aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Zum Entparaffinieren der Schnitte wurden diese zweimal für 5 min in Xylol eingetaucht, anschließend jeweils 2 min in eine in der Konzentration absteigende Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50% Alkohol) und zum Schluss in Aqua dest gestellt.

Um das Gewebe für die folgenden Schritte aufzuweichen, wurden die Schnitte in einem Gemisch aus 9 ml Stammlösung A, 41 ml Stammlösung B und 450 ml Aqua ad iniectionem für 20 bis 25 min bei maximaler Leistung in einer Mikrowelle behandelt. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte für 5 bis 10 min in Puffer gestellt. Im nächsten Schritt wurde für 7 min mit 0,01% Protease, Typ XXIV, Sigma, angedaut, 25 mg auf 250 ml 37 °C warmen Tris-Triton. Zur Inaktivierung der Andaureaktion wurden die Schnitte zweimal für 10 min in 4 °C
kalten Tris-Triton gegeben. Die endogene Peroxidase wurde mit 200 ml Tris-Triton, 1 ml Natriumacid, 1ml 30% H_2O_2 über 30 min auf einem Schüttler blockiert. Nach einem erneuten Waschgang wurde um die Schnitte trocken gewischt und diese mit Wachsmaler umrandet.

2.2.2. Immunhistochemische Färbung

Jeder Schnitt wurde nun mit 1:10 verdünntem Schweineserum (Dako, Glostrup, Dänemark) für 30 min inkubiert (200 µl Serum auf 1800 µl Tris-Triton). Anschließend wurde nach Ablaufenlassen des Schweineserums auf die Schnitte ein polyklonaler Kaninchen Anti-Human vWF Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:200 gegeben. Über Nacht schloss sich ein gründlicher Waschgang mit Puffer an, dem die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, Schwein Anti-Kaninchen Ig (Dako), 1:30 verdünnt, mit 20 µl Human IgG (Sigma), für 40 min folgte. Wieder wurden die Schnitte gewaschen, um dann mit PAP-Kaninchen (Dako) in einer Verdünnung von 1:100 versetzt zu werden. Erneut wurde nach 40 min gewaschen. Die Schnitte wurden jetzt mit der DAB-Reaktion 7 bis 10 min angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde unter fließendem Leitungswasser abgespült.

Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun (Merck), 100 ml/ 100 ml Aqua dest. für 30 sec, im Anschluss wurde in Leitungswasser 2 min lang gebläut. Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte für jeweils 2 min in Aqua dest. und in eine aufsteigende Alkoholreihe, 50% bis 100%, gestellt, um nach einem 10minütigen Xylolbad mit Eukitt (Kindler GmbH) mit Deckgläsern eingedeckelt zu werden.

2.2.3. Auszählung der Endothelzellen

In jedem Schnitt wurde mikroskopisch (10x Objektiv) der Bereich mit der größten Gefäßdichte (Hot spot) bestimmt und dort in fünf Feldern mit einem 40x Objektiv die Gefäße ausgezählt. Die Gefäßdichte wurde dann pro 0.95 mm² (5 x 0.19 mm²) angegeben. Nur braun markierte intratumorale Gefäße fanden Berücksichtigung. Einzelne oder gruppierte Endothelzellen ohne erkennbares Lumen wurden ebenfalls als einzelne Gefäße betrachtet. Die anderen Parameter wie Tumorgrad oder Konzentration der Wachstumsfaktoren waren während des Zählvorganges nicht bekannt.

2.3. Proliferationsindex

Zur Bestimmung des Proliferationsindex der einzelnen Meningeome wurde der monoklonale Antikörper Mib1 gegen das Ki-67 Epitop verwendet. Damit lassen sich selektiv die Zellkerne der Zellen markieren, die sich im Mitosezyklus befinden. Diese Immunfärbung wurde mit dem Vector ABC Kit durchgeführt.

2.3.1. Vorbereitung der Schnitte

Die Schnitte wurden wie unter 2.2.1 beschrieben behandelt, nur die Andauung mit 0,01% iger Protease und die anschließende Inaktivierung entfielen.

2.3.2. Immunfärbung mit ABC Kit

Zum Blocken wurde auf die Schnitte Blockserum, 3 Tropfen Blocking Serum Stammlösung auf 10 ml PBS, gegeben und nach einer Stunde wieder ablaufen gelassen. Im nächsten Schritt wurde mit in PBS 1:10 verdünntem Antikörper Mib1 (Dianova, Hamburg) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach einem Waschgang der biotinylierte Schaf Anti-Maus Ig Antikörper (Sigma) in einer Konzentration von 1:200. Nach einer Stunde und einem erneuten Waschgang wurden die Schnitte mit dem ABC Reagenz, 2 Tropfen Reagenz A + 10 ml PBS + 2 Tropfen Reagenz B, für 30 min inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen und dann zur Farbentwicklung mit DAB Lösung versetzt, auf 5 ml dest. Wasser 2 Tropfen Buffer Stock Solution, 4 Tropfen DAB Stock Solution und 2 Tropfen Hydrogen Peroxyde Solution (Dako). Nach 10 min wurde der Überschuss unter Leitungswasser abgespült.

Die Schnitte wurden gegengefärbt und eingedeckelt wie unter 2.2.2 beschrieben.

2.3.3. Bestimmung des Proliferationsindex

Im Bereich mit der höchsten Proliferationsaktivität wurden unter dem Mikroskop (100x Objektiv) alle Zellkerne von Tumorzellen in fünf Gesichtsfeldern (je 0,031 mm²) ausgezählt. Anschließend wurden lediglich die markierten Kerne gezählt. Die durch Antikörper angefärbten, sich im Mitosezyklus befindlichen Zellkerne wurden prozentual zu den übrigen in Beziehung gesetzt.

2.4. Zellkultur Assays

2.4.1. Humane Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC)

HUVEC Kulturmedium:	M199 Medium, Gibco, Paisley, UK
	20% Kälberserum, Biochrom, Berlin

200 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 90 μg/ml Endothelzell-Wachtumsfaktor (ECGS), Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA 40 U/ml Heparin 100 U/ml Penicillin 100 μg/ml Streptomycin 0,25 μg/ml Fungizone (Amphotericin B)

Für den Chemotaxis Assay wurden humane Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC) verwendet. Diese stammten aus frischen Nabelschnüren aus der Klinik für Gynäkologie des Universitätsklinikum Eppendorf und wurden nach der Methode von Jaffe isoliert (Jaffe et al. 1973). Es wurden unter sterilen Bedingungen die Enden der Nabelschnur abgeschnitten und dann die Umbilikalvene dargestellt. So konnte auf beiden Seiten ein kleiner, ca. 2 cm langer Schlauch (Butterfly) in die Vene gelegt werden. Dieser wurde dicht mit chirurgischem Nahtmaterial angenäht. Weiterhin unter sterilen Bedingungen wurde die Umbilikalvene über 3-Wege Hähne an den Butterfly-Enden mit PBS durchspült und gewaschen, bis die Flüssigkeit nicht mehr blutig erschien. Die Umbilikalvene wurde dann mit 1 mg/ml Kollagenlösung (Biochrom) in PBS kurz gespült und schließlich aufgefüllt, dass sie prall gespannt war. Die Vene wurde in 37 °C warmer PBS Lösung 15 min inkubiert und die Kollagenlösung aus der Umbilikalvene anschließend in ein steriles Behältnis ablaufen gelassen. Hierbei wurde die Inkubationszeit genau eingehalten, da sonst eine Kontamination mit anderen Zellen, wie Perizyten oder Fibroblasten entstehen könnte. Um noch verbliebene Endothelzellen auszuwaschen, wurde die Vene erneut mit serumfreiem HUVEC Kulturmedium durchgespült, das ebenfalls in das sterile Behältnis überführt wurde. Die gewonnene Lösung wurde zentrifugiert, 5 min bei 600 g, und die gewonnene Endothelzellsuspension mit 7 ml HUVEC Kulturmedium versetzt. Abschließend wurde die Endothelzellsuspension in einer mit 1% Gelatine beschichteten T25 Zellkulturflasche kultiviert.

2.4.2. Chemotaxis Assay

Assay Medium: M199 Medium 0,1% Rinder-Serumalbumin, BSA, Sigma 200 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat Um die chemotaktische Aktivität der Tumorextrakte zu testen, wurde ein modifizierter Boyden Chamber Assay verwendet. Hierfür wurden Nabelschnurvenen - Endothelzellen (HUVEC) aus gerade unterbundener menschlicher Nabelschnur verwendet (siehe 2.4.1). Die Zellen wurden zwischen der zweiten und fünften Passage eingesetzt. Zuvor wurden die HUVEC trypsiniert, gezählt und mit 10 ml Assay Medium 5 min bei 600 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen 4 x mit Assay Medium gewaschen und in Assay Medium resuspendiert.

Die Tumorextrakte wurden mit Assay Medium auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 400 µg/ml gebracht und in die unteren Wells einer 96-Well modifizierten Boyden Kammer (Neuroprobe, Cabin John, MD) aufgetragen. Die Kammer besteht aus zwei Teilen, einer oberen und unteren Kammer, zwischen die ein Filter eingelegt und die dann fest verschlossen wird. Die Wells wurden so mit einem Nukleopore Filter verschlossen, dessen Porengröße 8 µm beträgt und der am Vortag mit Kollagen I (Vitrogen 100, Fremont, CA, USA) beschichtet worden war. Hierfür wurde der Filter mit 100 µg/ml Kollagen und 0,1% Essigsäure bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Filter mehrmals mit Assay Medium gespült. Die HUVEC wurden in 50 µl Assays Medium resuspendiert, so dass sich in den 50 μ I 1,5 x 10⁴ Zellen befanden. Diese 50 μ I wurden jeweils in die Wells der oberen Kammer gegeben. Die Kammer wurde nun bei 37 °C fünf Stunden lang inkubiert und anschließend wurden die nicht migrierten Zellen von der Oberseite des Filters entfernt. Wenn sich in den Tumorextrakten in den unteren Wells eine Substanz befand, die chemotaktische Aktivität besaß, dann kam es aufgrund des Konzentrationsgefälles von der unteren zur oberen Kammer zu einer gerichteten Migration (Chemotaxis) der HUVEC. Hierfür mussten die HUVEC durch die Poren des Filters hindurch auf die Unterseite des Filters wandern.

Für die Auszählung der migrierten Zellen wurden die Zellkerne auf dem Filter mit Diff-Quick (Dade, Unterschleissheim) angefärbt. Unter dem Mikroskop (40x Objektiv) wurden zehn Felder pro Well ausgezählt, wofür ein kalibriertes optisches Gitter verwendet wurde. Jede Auszählung wurde 3x wiederholt. Bei jedem Versuch wurde in drei Wells der unteren Platte nur Assay Medium geben, was die Quantifizierung der unstimulierten Basismigration der HUVEC erlaubte.

In einigen Versuchsanordnungen wurden neutralisierende monoklonale Antikörper gegen VEGF₁₆₅ (Mab 4.6.1., Genentech, Inc.) HGF/SF (R&D Systems) oder bFGF (Sigma) in einer Konzentration von 20 µg/ml zu den Tumorextrakten hinzugegeben, um selektiv einzelne Wachstumsfaktoren blockieren zu können. Zuvor war die Fähigkeit der oben genannten Antikörper, die Wachstumsfaktoren zu blockieren, in separaten Assays getestet worden. Hierbei wurden die Antikörper gegen verschiedene Konzentrationen rekombinanter Wachstumsfak-

toren, VEGF₁₆₅ (Peprotech), HGF/SF (Genentech), bFGF (R&D Systems), mit HUVEC im oben genannten Versuchsaufbau zusammengebracht und untersucht.

2.4.3. Bovine mikrovaskuläre Endothelzellen (BME)

BME Medium:	Alpha-modified minimal essential Medium, MEM alpha, Gibco
	15% Spender Kälberserum (donor calf serum, DCS), Biochrom
	5 mM L-Glutamin
	1 mM Natriumpyruvat
	100 U/ml Penicillin
	100 μg/ml Streptomycin
	0,25 μg/ml Fungizone (Amphotericin B)

Für die Assays zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen (Tubes) wurden bovine mikrovaskuläre Endothelzellen (BME) verwendet. Diese wurden von Dr. M.B. Furie (Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, The Rockefeller University, New York) (Furie et al. 1984) und Dr. R. Montessano (Department of Morphology, University of Geneva Medical Center, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden aus den Nebennierenrinden von Rindern gewonnen. Für die Zellkultur wurden mit 1,5% Gelatine überzogene Zellkulturflaschen mit BME Medium verwendet.

2.4.4. In-vitro Angiogenese Assay

In einem *in-vitro* Modell sollte die Fähigkeit der Tumorextrakte getestet werden, angioneogenetisch auf Endothelzellen zu wirken. Zu diesem Zweck wurde ein capillary-like tube formation Assay ausgewählt. In diesem Assay invadierten einzelne Endothelzellen in Anwesenheit von Tumorextrakt in ein Kollagengel und schlossen sich darin zu kapillarähnliche Strukturen (Tubes) zusammen.

Als Endothelzellen wurden hierfür Kapillarzellen vom Rind (BME) verwendet.

Kollagengel:3,95 ml steriles Aqua dest.1 ml MEM 10x, Gibco100 µl L-Glutamin100 µl Natriumpyruvat4 ml Kollagen I, Vitrogen 100, Fremont, CA, USA500 µl Natriumbicarbonat 7,5%

→ mit NaOH 0,1 M auf einen pH = 7,4 bis 7,5 einstellen → ergibt 10 ml Kollagengel

Je 400 µl von dem noch flüssigen Gel wurden in die Wells einer 24er Platte gegeben und bei 37°C für 15 min inkubiert und ausgehärtet. Anschließend wurden in die Wells je 4 x 10⁴ Zellen in 500 µl BME Medium (siehe 2.4.3) mit 2% Spender Kälberserum hinzugegeben. Nachdem die Endothelzellen sich auf der Oberfläche des Gels anhefteten, wuchsen sie zunächst auf der Geloberfläche als ein Monolayer. Das Kollagengel wurde dabei von den Zellen zunächst nicht penetriert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Als die Endothelzellen ein subkonfluentes Stadium erreichten, wurde das Medium entfernt und die Wells 3x für jeweils 10 min mit frischem BME Medium mit 0,5% Kälberserum gewaschen. Die Tumorextrakte wurden mit BME Medium auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 400 µl/ml eingestellt und jeweils 500 µl Extrakt zu den Zellen in die Wells pipettiert. Nach drei Tagen wurden die Kulturen mit 5% Glutaraldehyd in-situ fixiert. Mit einem Image Analyzing System (Quantimed 500, Leica, Hamburg) wurde die Länge der kapillarähnlichen Strukturen additiv im Gel ausgemessen. Für jede Versuchsanordnung wurden 3 zufällige Felder ausgemessen, wobei ein Feld 0,64 mm² entsprach und jede Versuchsanordnung in Triplikation durchgeführt worden war. Die fixierten Kulturen wurden schließlich in Epoxydharz eingebettet und es wurden Semidünnschnitte hergestellt.

Um die angiogenetische Aktivität für jeden einzelnen der untersuchten Wachstumsfaktoren in den Extrakten beurteilen zu können, wurden in weiteren Experimenten Antikörper gegen VEGF (Genetech), HGF/SF (R&D Systems) oder bFGF (Sigma) hinzugegeben. Darüber hinaus wurde die antiangiogenetische Aktivität der rekombinanten Wachstumsfaktoren VEGF₁₆₅ (Peprotech), HGF/SF (Genentech) oder bFGF (Sigma) separat untersucht. Im Falle der rekombinanten Wachstumsfaktoren erfolgte zwei Tage nach Hinzugabe zu den Endothelzellen eine Erneuerung des BME Mediums und eine Auswertung nach weiteren zwei Tagen. Als Kontrollbedingung wurden bei jeder Versuchsreihe drei Wells nur mit BME Medium und 0,5% Kälberserum befüllt.

2.5. Statistische Methoden

Alle Werte wurden bei mehrfacher Bestimmung mit Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Mit der Kruskal-Wallis Analyse der Varianz wurden die Unterschiede in den Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren und der *in-vivo* Parameter und die Unterschiede in den *in-vitro* Ergebnissen berechnet. Hierzu wurden auch der Mann-Whitney ranksum Test, der unpaarige t-Test, der paarige t-Test und der χ^2 Test verwendet. Um die Zusammenhänge der *in-vivo* Parametern mit den *in-vitro* Ergebnissen darzustellen, wurden die

Spearman Korrelation oder der Pearson Korrelationstest herangezogen. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Programm SigmaStat, die graphische Aufarbeitung mit dem Programm Systat 13 (Systat, CA).

3. Resultate

3.1 Ergebnisse Extraktion

3.1.1 Resultate der Protein Extraktionen

Aus insgesamt 69 Meningeomen unterschiedlichen WHO Grades wurden Proteinextrakte hergestellt. Wie bereits unter 2.1.2 beschrieben wurde jeweils in 6 verschiedenen Verdünnungsschritten eine Konzentrationsbestimmung der Proteinextraktion mit dem Bicinchoninic acid Assay vorgenommen, die dann genutzt wurde, um einen Mittelwert zu berechnen. Dieser wurde dann herangezogen, um die jeweiligen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren bezogen auf die Proteinkonzentration zu berechnen (siehe Tabelle 3.1 und Auswertung Abb. 3.1).

Bei 41 Extrakten zeigten eine oder mehrere der höheren Verdünnungen eine so niedrige optische Dichte bzw. keine ausreichende Reaktion, dass für diese von der Auswertesoftware keine oder eine negative Konzentration berechnet wurde. Diese Werte wurden deshalb mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet. Hier erfolgte die Berechnung des Mittelwertes mit den vorhandenen Daten. Bei 10 Extrakten kam es in den eingesetzten niedrigen Verdünnungen zu gesättigten Messwerten. Dieses bedeutet, dass die gemessene optische Dichte z.B. aufgrund sehr hoher Proteinkonzentration im Extrakt einen mindestens doppelt so hohen Wert wie der höchste Standard ergab, weshalb keine Berechnung der Konzentration möglich war. Auch hier wurden für die Berechnung des Mittelwertes nur die verbliebenen Werte verwendet.

Nr.	1. Verd. [mg/ml]	2. Verd. [mg/ml]	3. Verd. [mg/250µl]	4. Verd. [mg/ml]	5. Verd. [mg/ml]	6. Verd. [mg/ml]	Mittel- wert [mg/ml] pro 5 µl	Protein [mg/ml]
2	4,553	4,912	5,384	5,168	4,275	n.d.	4,858	0,972
3	14,421	14,967	15,484	16,632	15,476	16,506	15,581	3,116
5	gesätt.	34,329	33,421	31,627	33,816	n.d.	33,298	6,660
6	24,444	22,461	21,836	23,538	23,252	21,950	22,914	4,583
8	17,448	17,776	18,113	17,552	n.d.	n.d.	17,722	3,544
9	15,651	15,256	15,595	16,632	17,304	16,166	16,101	3,220
12	gesätt.	62,081	53,003	52,557	53,247	60,729	56,323	11,265
14	10,827	10,370	10,337	n.d.	n.d.	n.d.	10,511	2,102
15	33,520	30,911	30,637	29,961	28,672	n.d.	30,740	6,148
16	4,656	4,975	4,631	4,988	4,074	4,845	4,695	0,939
17	50,555	51,321	48,744	50,297	50,956	51,435	50,551	10,110

Tabelle 3.1 Ergebnisse der Proteinextraktionen

20	gesätt.	34,881	36,950	37,666	37,903	35,675	36,615	7,323
25	17,545	15,116	16,697	16,129	n.d.	n.d.	16,372	3,274
26	14,35	14,143	14,262	13,266	n.d.	n.d.	14,005	2,801
27	28,658	21,568	23,780	26,309	26,812	28,786	25,986	5,197
30	22,174	22,869	20,261	21,505	20,019	n.d.	21,366	4,273
32	19,574	18,235	19,410	19,752	20,469	19,286	19,454	3,891
34	24,717	23,518	24,754	25,594	24,880	n.d.	24,693	4,939
35	15,765	14,585	16,174	15,838	n.d.	n.d.	15,591	3,118
36	0,137	0,689	0,534	0,291	0,588	0,401	0,440	0,088
37	21,026	19,832	22,076	23,803	26,812	24,770	23,053	4,611
38	11,779	11,304	11,075	10,071	n.d.	n.d.	11,057	2,211
39	26,584	25,403	24,782	25,343	24,176	n.d.	25,258	5,052
40	3,36	3,452	3,301	2,900	2,583	2,964	3,093	0,619
42	gesätt.	13,974	14,079	13,693	14,159	n.d.	13,976	2,795
44	gesätt.	25,130	28,684	26,294	24,482	n.d.	26,148	5,230
45	8,412	8,243	8,416	8,102	6,904	8,570	8,108	1,622
51	gesätt.	68,913	55,676	57,334	66,373	76,103	64,880	12,976
52	24,229	23,534	23,892	23,817	22,462	n.d.	23,587	4,717
53	12,075	12,302	12,562	11,874	n.d.	n.d.	12,203	2,441
62	20,462	20,232	19,934	19,677	19,736	18,837	19,813	3,963
67	2,326	2,398	2,059	1,874	2,080	2,958	2,283	0,457
68	gesätt.	6,429	6,951	5,857	n.d.	n.d.	6,412	1,282
73	39,42	38,374	36,931	36,340	37,900	n.d.	37,793	7,559
77	6,291	6,451	5,582	n.d.	n.d.	n.d.	6,108	1,222
78	31,041	29,295	31,507	37,515	37,943	29,525	32,804	6,561
79	6,771	5,042	4,955	4,221	n.d.	n.d.	5,247	1,049
80	20,092	22,494	25,407	27,877	25,255	25,133	24,376	4,875
81	18,568	20,473	21,022	20,491	20,650	18,903	20,018	4,004
82	36,638	44,942	53,345	64,477	69,663	68,565	56,272	11,254
83	gesatt.	gesätt.	39,669	39,527	40,055	n.a.	39,750	7,950
97	gesatt.	39,785	38,125	38,841	39,408	n.a.	39,040	7,808
98	gesatt.	15,353	14,988	15,934	16,387	15,489	15,630	3,126
100	14,937	18,010	20,405	21,899	18,179	15,373	18,134	3,627
108	42,929	42,975	44,194	n.a.	n.a.	n.a.	43,366	8,673
109	29,118	29,511	30,499	32,604	30,805	31,255	30,632	6,126
111	15,979	16,271	16,844	17,127	n.u.	n.u.	16,555	3,311
112	15,134	15,081	13,347	18,108	17,396	15,506	15,762	3,152
113	16,264	16,202	18,55	17,671	15,238	16,583	16,751	3,350
117	14,005	14,734	15,442	14,965	15,577	n.a.	14,945	2,989
118	14,429	15,974	16,551	16,270	15,838	13,409	15,412	3,082
119	10,958	17,964	19,101	19,010	17,005 n d	15,497 nd	17,709	3,542
120	12,102	13,090	14,137	13,399	n.u.	n.u.	13,347	2,009
121	29,000	20,914 6 255	29,194 5 /6/	51,001 n.d	n d	n d	29,200	1 106
122	2 017	2 404	2,404	1 786	2 700	n d	2,979	0 / / 3
123	2,017	2,404 7 754	2,000	6 745	2,790 6,705	n d	7 2/3	1 //0
124	6/37	6 873	0,200 7.483	6 353	6 705	n d	6 770	1,449
120	13 696	15 354	17 203	17 705	18 970	14 453	16 230	3 246
128	8 481	8 462	7 878	n.d.	n.d.	n.d.	8 274	1 655
129	5.447	4,737	n.d	n.d.	n.d.	n.d.	5.092	1,018
130	12,496	11.652	12.507	n.d.	n.d.	n.d.	12.218	2.444
131	1.565	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.565	0.313
132	7.566	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.566	1.513
133	9,261	8,261	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,761	1,752

134	6,161	5,406	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,784	1,157
135	6,205	5,674	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,940	1,188
136	5,625	5,094	5,190	n.d.	n.d.	n.d.	5,303	1,061
137	5,938	5,584	4,922	n.d.	n.d.	n.d.	5,481	1,096

Nr.: Tumornummer, Verd.: Verdünnung, gesätt.: Messung gesättigt; n.d.: nicht durchgeführt.

Wie unter 2.1.2 beschrieben wurde die Proteinkonzentration jedes einzelnen Tumorextraktes mit Hilfe der Auswertesoftware durch die Regression der Extinktionswerte der zwei Standardreihen zurückgerechnet und in mg pro ml angegeben. Die endgültige Proteinkonzentration wurde nach Korrektur für die eingesetzte Menge in mg/ml angegeben. Da in der ersten Well 5 µl Tumorextrakt eingesetzt wurden, erfolgte eine Division des Mittelwertes durch 5.



Abbildung 3.1: a.) Proteinkonzentration nach Extraktion bezogen auf histologische Subtypen. Es handelt sich um Mittelwerte +/- Standardabweichung der Einzeldaten aus Tabelle 3.1. Man erkennt, dass es –bis auf den mikrozystischen Typ - keine wesentlichen Abweichungen zwischen den verschiedenen Subtypen gab. Da nur ein mikrozystisches Meningeom in die Studie eingeschlossen wurde, sind weiterführende Aussagen problematisch. Allerdings sind mikrozystische Meningeom hinsichtlich der Zellularität eher niedrig einzuschätzen. b.) Proteinkonzentration nach Extraktion bezogen nur auf den WHO Grad. Man erkennt, dass es keine wesentlichen Abweichungen hinsichtlich der Menge extrahierten Proteins zwischen den verschiedenen Malignitätsgraden gab.

Die erhaltenen Proteinkonzentrationen lagen zwischen 0,088 mg/ml und 12,976 mg/ml. Diese große Spannweite zeigt die Wichtigkeit der Bestimmung der Proteinkonzentration. Nur wenn die einzelnen Wachstumsfaktoren in Bezug auf die jeweilige Proteinkonzentration angegeben werden, können sie mit einander sinnvoll in Bezug gesetzt werden. Ein Extrakt mit viel Protein kann z.B. eine hohe Konzentration an einem Wachstumsfaktor aufweisen, der aber pro mg Protein wieder niedrig sein kann.

Die erhaltenen Proteinkonzentrationen zeigten zwischen den einzelnen Malignitätsgraden und den einzelnen histologischen Subgruppen keine signifikanten Unterschiede, siehe Abbildung 3.1. Lediglich die Proteinkonzentration des mikrozystischen, histologischen zellärmeren Meningeoms war erwartungsgemäß deutlich niedriger, wobei es sich hierbei um nur ein Meningeom handelt. Die zellreichen meningotheliomatösen Meningeome hatten wider Erwarten die zweitniedrigste Proteinkonzentration.

3.1.2 Konzentration von HGF/SF

Mittels eines selbst etablierten Sandwich-ELISA Assays wurde die Konzentration von HGF/SF bestimmt, siehe 2.1.3.2. Die HGF/SF-Konzentration jedes einzelnen Tumorextraktes errechnete sich durch die Regression der Extinktionswerte der zwei Standardreihen (Auswertesoftware) und wurde in ng/ml angegeben. Es folgte die Berechnung eines Mittelwertes aus allen vier Messwerten durch Addition aller Werte und Division durch ihre Anzahl. Anschließend wurde die HGF/SF-Konzentration durch die jeweilige Proteinkonzentration des Tumorextraktes (Tabelle 3.1) geteilt, um die Konzentration ng HGF/SF / mg Protein anzugeben.

Bei 8 Tumorextrakten fanden sich in den niedrigen Verdünnungen gesättigte Messwerte, d.h. der Wert der gemessenen optischen Dichte war mindestens doppelt so hoch wie der Wert des höchsten Standards. Eine Berechnung der Konzentration war für diese Verdünnungen deshalb nicht möglich. Die Berechnung des Mittelwertes erfolgte hier mit den vorhandenen Daten. Bei 45 Tumorextrakten zeigten eine oder mehrere der höheren Verdünnungen keine ausreichende Reaktion bzw. so niedrige Werte der optischen Dichte, dass für diese keine oder eine negative Konzentration berechnet wurde. Diese Werte wurden deshalb mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet. Für die Berechnung des Mittelwertes wurde wie oben beschrieben verfahren, es fanden nur die verbliebenen Werte Verwendung.

Bei der Bestimmung von HGF/SF ließ sich lediglich in 3/69 (4%) der Tumorextrakten kein HGF/SF Protein nachweisen. In allen anderen Tumoren war hingegen HGF/SF vorhanden. Alle Meningeome, die negativ für HGF/SF waren, waren Meningeome WHO Grad I, zwei fibrilläre Meningeome und ein meningotheliomatöses Meningeom. Die gemessenen Konzentrationen lagen für HGF/SF zwischen 0 und 3,066 ng/mg Protein (siehe Tabelle 3.2 und Auswertung Abb. 3.2). Die höchste Konzentration fand sich in einem meningotheliomatösem Meningeom.

Tabelle 3.2 Ergebnisse der HGF Bestimmung

Nr.	1. Verd. [ng/ml]	2. Verd. [ng/ml]	3. Verd. [ng/ml]	4. Verd. [ng/ml]	Mittel- wert [ng/ml]	ng HGF/ mg Pro- tein
2	2,322	1,614	1,366	2,674	1,994	0,614
3	1,118	0,895	0,227	n.d.	0,747	0,072
5	5,200	4,530	2,968	2,157	3,714	0,167
6	22,533	17,210	12,490	9,138	15,343	1,002
8	7,525	3,897	11,637	7,640	7,675	0,648
9	6,499	6,907	n.d.	n.d.	6,703	0,623
12	13,095	16,214	15,954	17,594	15,714	0,417
14	1,998	1,821	1,292	1,549	1,665	0,237
15	22,526	17,375	n.d.	n.d.	19,951	0,971
16	0,105	0,275	n.d.	n.d.	0,190	0,061
17	gesätt.	29,449	20,396	n.d.	24,923	0,738
20	2,258	1,708	1,645	1,032	1,661	0,068
25	gesatt	5,646	5,116	n.d.	5,381	0,492
26	gesatt	5,421	4,027	4,083	4,510	0,482
27	8,566	7,524	9,742	n.d.	8,611	0,496
30	1,056	0,830	0,538	0,016	0,610	0,043
32	2,958	2,128	1,572	n.d.	2,219	0,171
34	35,795	32,068	n.d.	n.d.	33,932	2,056
35	13,164	12,421	n.d.	n.d.	12,793	1,228
36	0,064	1,059	1,022	0,959	0,776	2,639
37	6,221	4,530	4,973	5,298	5,256	0,341
38	gesätt	21,268	24,056	n.d.	22,662	3,066
39	8,420	8,771	9,514	9,533	9,060	0,537
40	1,692	1,895	n.d.	n.d.	1,794	0,867
42	6,820	4,709	5,696	n.d.	5,742	0,615
44	6,906	5,533	5,092	6,831	6,091	0,348
45	0,736	0,279	n.d.	n.d.	0,508	0,094
51	16,056	18,306	n.d.	n.d.	17,181	0,396
52	6,780	10,183	6,093	n.d.	7,685	0,487
53	2,362	1,959	1,023	2,324	1,917	0,235
62	3,932	3,214	2,918	2,324	3,097	0,234
67	0,646	0,497	0,800	n.d.	0,648	0,425
68	0,380	0,438	0,075	0,301	0,299	0,070
73	22,324	21,455	n.d.	n.d.	21,890	0,867
77	2,265	2,729	4,629	n.d.	3,208	0,786
78	8,348	9,301	11,207	n.d.	9,619	0,439
79	1,203	0,546	0,214	0,347	0,578	0,165
80	6,607	10,618	6,917	n.d.	8,047	0,494
81	22,019	28,578	17,535	n.d.	22,711	1,697
82	gesätt	11,256	10,240	n.d.	10,748	0,286
83	0,964	0,920	0,257	0,643	0,696	0,026
97	4,789	8,666	4,425	n.d.	5,960	0,228
98	8,175	7,329	n.d.	n.d.	7,752	0,742
100	3,906	2,695	2,840	4,173	3,404	0,281
108	6,404	9,250	7,778	6,088	7,380	0,255
109 111	gesätt 0,255	2,352 0,066	3,350 n.d.	2,134 n.d.	2,612 0,161	0,128 0,015

112	3,171	2,924	2,200	1,490	2,446	0,232
113	1,109	1,358	1,091	n.d.	1,186	0,106
117	20,003	17,354	n.d.	n.d.	18,679	1,870
118	11,475	7,178	5,015	n.d.	7,889	0,766
119	11,644	10,404	6,233	n.d.	9,427	0,796
120	6,229	2,056	n.d.	n.d.	4,143	0,464
121	17,555	15,955	21,666	16,618	17,949	0,918
122	6,105	4,042	6,053	11,203	6,851	1,714
123	gesätt	gesätt	0,051	n.d.	0,051	0,034
124	1,626	gesätt	0,096	n.d.	0,861	0,178
126	0,146	n.d.	n.d.	n.d.	0,146	0,108
127	4,087	3,67	n.d.	n.d.	3,8785	1,195
128	0,47	n.d.	n.d.	n.d.	0,47	0,284
129	1,532	n.d.	n.d.	n.d.	1,532	1,504
130	0,419	n.d.	n.d.	n.d.	0,419	0,171
131	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
132	0,956	0,855	n.d.	n.d.	0,9055	0,598
133	1,224	n.d.	n.d.	n.d.	1,224	0,699
134	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
135	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
136	0,523	n.d.	n.d.	n.d.	0,523	0,493
137	2,014	1,657	n.d.	n.d.	1,8355	1,674

Nr.: Tumor Nummer, Verd.: Verdünnung, gesätt.: Messung gesättigt, n.d.: nicht durchgeführt.



Abbildung 3.2: a.) HGF/SF-Konzentration bezogen auf histologische Subtypen. Es handelt sich um Mittelwerte +/- Standardabweichung der Einzeldaten aus Tabelle 3.2. Die im Mittelwert höchsten Konzentrationen wiesen die meningothelimatösen Meningeome auf, die fibrillären Meningeome lagen um mehr als die Hälfte unter diesem. Der Unterschied war nicht signifikant. b.) HGF/SF-Konzentration bezogen auf die WHO Grade. Es finden sich nahezu keine Differenzen.

Zwischen den einzelnen histologischen Subgruppen und den einzelnen Malignitätsgraden zeigten sich im Mittelwert keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Konzentration von HGF/SF, siehe Abbildung 3.2. Die im Mittelwert höchsten Konzentrationen an HGF/SF wiesen die meningotheliomatösen, histologisch zellreicheren Meningeome auf, die niedrigste das mikrozystische Meningeom, wobei es sich um ein einzelnes, zellärmeres Meningeom handelt, das auch die niedrigste Proteinkonzentration aufwies. Der Mittelwert der HGF/SF Konzentration der fibrillären Meningeome lag mehr als die Hälfte unter dem des meningotheliomatösem Subtyp, wobei auch diese Differenz nicht signifikant war.

3.1.3 Konzentration von VEGF

Die VEGF Konzentration wurde durch einen kommerziellen Sandwich-ELISA untersucht, siehe 2.1.3.3

Die Auswertung erfolgte entsprechend der Konzentrationsbestimmung von HGF/SF, siehe 3.1.2. Die VEGF Konzentration jedes einzelnen Tumorextraktes wurde in ng/ml angegeben. Zuletzt wurde die VEGF Konzentration durch die jeweilige Proteinkonzentration des Tumorextraktes (Tabelle 3.1) dividiert, um die Konzentration ng VEGF / mg Protein zu erhalten.

Gesättigte Messwerte fanden sich bei 3 Tumorextrakten in den niedrigen Verdünnungen. 42 Tumorextrakte zeigten in einer oder mehreren der höheren Verdünnungen keine ausreichende Reaktion bzw. zu niedrige Werte der optischen Dichte, dass keine Berechnung erfolgen konnte, diese Werte wurden mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet. Für die Berechnung des Mittelwertes wurde wie unter 3.1.2 beschrieben verfahren, es fanden nur die verbliebenen Werte Verwendung.

Nr.	1. Verd. [ng/ml]	2. Verd. [ng/ml]	3. Verd. [ng/ml]	4. Verd. [ng/ml]	Mittel- wert [ng/ml]	ng VEGF/ mg Pro- tein
2	91,962	62,997	n.d.	n.d.	77,480	0,080
3	262,419	303,678	343,454	n.d.	303,184	0,097
5	1456,58	1886,61	1803,08	1939,67	1771,485	0,266
6	520,502	555,531	547,914	495,607	529,889	0,116
8	gesätt.	3325,37	4456,41	4425,29	4069,023	1,148
9	19,089	23,662	17,627	n.d.	20,126	0,006
12	89,696	n.d.	n.d.	n.d.	89,696	0,008
14	4482,90	4273,17	4632,64	4445,02	4458,433	2,121
15	117,174	120,291	116,122	n.d.	117,862	0,019
16	495,419	461,719	487,544	537,215	495,474	0,528

Tabelle 3.3	Eraebnisse	der VEGF	Bestimmuna
			_ • • • • · · · · · · · · · · · · · · ·

17	7,225	n.d.	n.d.	n.d.	7,225	0,001
20	434,493	550,883	490,688	n.d.	492,021	0,067
25	1071,29	1182,23	1224,04	1088,77	1141,583	0,349
26	202,297	210,404	182,486	n.d.	198,396	0,071
27	1478,0	1063,0	n.d.	n.d.	1270,500	0,244
30	1149,67	1172,23	1217,95	1041,05	1145,225	0,268
32	1708,59	2118,75	2230,30	2338,64	2099,070	0,539
34	94,457	72,068	n.d.	n.d.	83,263	0,017
35	42,256	50,273	n.d.	n.d.	46,265	0,015
36	7,666	n.d.	n.d.	n.d.	7,666	0,087
37	60,924	92,288	63,091	n.d.	72,101	0,016
38	80,401	67,40	n.d.	n.d.	73,901	0,033
39	6010,84	8926,26	8345,29	7368,24	7662,658	1,517
40	136,096	130,963	n.d.	n.d.	133,530	0,216
42	8,717	n.d.	n.d.	n.d.	8,717	0,003
44	24,437	23,277	n.d.	n.d.	23,857	0,005
51	204,822	n.d.	n.d.	n.d.	204,822	0,016
52	54,007	36,517	n.d.	n.d.	45,262	0,010
53	0	0	n.d.	n.d.	0,000	0
62	1115,87	1193,71	1137,54	1427,71	1218,708	0,308
67	84,162	91,455	n.d.	n.d.	87,809	0,192
68	60,924	56,504	n.d.	n.d.	58,714	0,046
73	1407,15	1678,30	1808,38	2335,11	1807,235	0,239
77	87,859	n.d.	n.d.	n.d.	87,859	0,072
79	38,367	39,357	31,720	n.d.	36,481	0,035
80	84,414	65,520	n.d.	n.d.	74,967	0,015
81	gesätt.	11484,9	11147,5	10824,0	11152,133	2,785
82	4683,92	4975,55	5158,75	4450,39	4817,153	0,428
83	125,816	159,24	81,835	101,136	117,007	0,015
97	566,446	743,332	798,444	/59,/64	/16,99/	0,092
98	53,124	32,103	n.a.	n.a.	42,614	0,014
100	21,786	n.a.	n.u.	n.u.	21,786	0,006
108	0	04.004	n.u.	n.u.	0,00	0 004
109	202,213	94,204	255 400	040 707	140,249	0,024
111	011 120	360,439	300,490	343,707 006 001	303,132	0,107
112	1101 65	1295 65	1000,94	900,001 1455 04	944,932 1227.060	0,300
117	31 508	34 560	n d	n d	33 084	0,390
112	131.056	133 /82	1// 11/	100 251	129 476	0,011
110	30 587	42 478	47 433	25 459	36 489	0,042
120	94 457	86 067	122 350	144 937	111 953	0.042
121	256 756	413 551	402 696	492 013	391 254	0.067
122	313.371	309.011	347.086	323,553	323.255	0.270
123	78.942	64.971	n.d.	n.d.	71.9565	0.162
124	126.716	n.d.	n.d.	n.d.	126.716	0.087
126	462,334	485,377	n.d.	n.d.	473,8555	0,350
127	54,503	63,197	n.d.	n.d.	58,85	0,018
128	gesätt.	2555,00	2108,85	2509,14	2391,00	1,445
129	1,095	1,044	n.d.	n.d.	1,070	1,051
130	0,67	1,067	0,724	n.d.	0,820	0,336
131	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
132	1,101	0,977	n.d.	n.d.	1,039	0,687
133	0,459	0,417	n.d.	n.d.	0,438	0,250
134	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	0

135	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
136	0,004	n.d.	n.d.	n.d.	0,004	0,004
137	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	0

Nr.: Tumor Nummer, Verd.: Verdünnung, gesätt.: Messung gesättigt, n.d.: nicht durchgeführt.

VEGF konnte in 6 von 66 (9%) untersuchten Extrakten nicht detektiert werden. Unter den 6 Meningeomen, die kein VEGF aufwiesen, fanden sich 5 benigne Tumore (2 fibrilläre, jeweils 1 transitionales und meningotheliomatöses Meningeom) und ein atypisches Meningeom. Die gemessenen Konzentrationen lagen für VEGF zwischen 0 und 2,785 ng/mg Protein (siehe Tabelle 3.3 und Auswertung Abb. 3.3). Die höchste Konzentration fand sich in einem anaplastischen Meningeom.



Abbildung 3.3: a.) VEGF-Konzentration bezogen auf histologische Subtypen. Es handelt sich um Mittelwerte +/- Standardabweichung der Einzeldaten aus Tabelle 3.3. Man erkennt zum einen eine deutliche Zunahme der Konzentration von benignen über atypische hin zu anaplastischen Meningeomen. Zum anderen erkennt man, dass es eine deutliche Differenz zwischen fibrillären und meningotheliomatösen Subtypen zugunsten letzterer gibt. b.) VEGF-Konzentration bezogen auf die WHO Grade. Es findet sich das oben beschriebeme Muster wieder, wenn man alle WHO Grad I Subtypen zusammenfasst.

Eine signifikante Korrelation fand sich für die VEGF Konzentration und dem WHO Grad der Meningeome (r = 0,37, P= 0,002, Spearman). Dabei war die durchschnittliche VEGF Konzentration in atypischen Meningeomen 2,7 x so hoch wie in benignen Meningeomen (P = 0,022, MW Test) und 12,4 x höher in malignen als in benignen Meningeomen (P = 0,025, MW Test) (Abb. 3.3).

Innerhalb der Gruppe der Meningeome WHO Grad I zeigten sich folgende Unterschiede zwischen den Subtypen: Meningotheliomatöse Meningeome wiesen eine 8,8 x höhere VEGF

Konzentrationen auf als fibrilläre Meningeome (P = 0,015, MW Test); transitionale Meningeome hatten eine 4,7 x höhere VEGF Konzentration als fibrilläre Meningeome (P = 0,049, MW Test). Damit lag die durchschnittliche VEGF Konzentration der transitionalen Meningeome zwischen den durchschnittlichen Konzentrationen der meningotheliomatösen und fibrillären Meningeome.

3.1.4 Konzentration von bFGF

Zur Bestimmung der Wachstumsfaktorkonzentrationen von bFGF wurde ein kommerzielles Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet, siehe 2.1.3.3. Die Auswertung erfolgte wie für den HGF/SF bzw. VEGF ELISA, wobei die Zwischenergebnisse für bFGF in pg/ml angegeben wurden.

Gesättigte Messwerte fanden sich bei 11 Tumorextrakten in den niedrigen Verdünnungen, bei 3 Tumorextrakte wurden eine oder mehrere der höheren Verdünnungen aufgrund unzureichender Reaktion mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet. Die Berechnung des Mittelwertes erfolgte bei den vorgenannten Werten entsprechend 3.1.2, zusätzlich wurde der Mittelwert noch für die eingesetzte Extraktmenge mit Division durch 4 korrigiert.

In allen Tumorextrakten ließ sich bFGF nachweisen. Die gemessenen Konzentrationen lagen dabei zwischen 0,067 und 8,183 ng/mg bFGF Protein (siehe Tabelle 3.4 und Auswertung Abb. 3.4). Die niedrigste Konzentration fand sich in einem atypischen, die höchste in einem meningotheliomatösen Meningeom.

Nr.	1. Verd. [pg/ml]	2. Verd. [pg/ml]	3. Verd. [pg/ml]	4. Verd. [pg/ml]	Mittel- wert [pg/ml]	ng bFGF/ mg Pro- tein
2	10932,8	169,409	19919,3	19107,0	12532,1273	3,224
3	41655,4	59910,5	63948,5	58903,1	56104,375	4,501
5	41121,7	66710,8	85109,0	99138,3	73019,950	2,741
6	25595,1	23626,9	21924,4	20181,3	22831,925	1,246
8	40819,5	64430,9	73859,2	79777,4	64721,750	4,565
9	1699,86	1589,46	1435,44	1640,68	1591,360	0,124
12	40995,5	69452,8	77918,5	99883,5	72062,575	1,599
14	78068,3	59652	52497,8	48336,2	59638,575	7,092
15	45101,4	31126,0	29462,8	30248,5	33984,675	1,382
16	9647,25	8875,21	9148,73	9494,31	9291,375	2,474
17	gesätt.	174279	156714	108147	146380,000	3,620

Tabelle 3.4 Ergebnisse der bFGF Bestimmung

20	190000	86921,2	76741,2	69968,0	105907,600	3,616
25	66489,6	39659,0	37971,8	32048,3	44042,175	3,363
26	66489,6	45254,0	45380,9	39670,0	49198,625	4,391
27	36821,7	47086,9	50727,0	47856,2	45622,950	2,195
30	56918,5	38010,0	33643,4	28240,9	39203,200	2,294
32	11777,7	10126,9	9586,26	9609,17	10275,0075	0,660
34	153287	73358,3	61065,2	50235,6	84486,525	4,277
35	123788	80393,3	61065,2	55155,3	80100,450	6,422
36	110,172	154,397	288,937	538,421	272,982	0,776
37	30710,3	35141,6	32794,5	34606,4	33313,200	1,806
38	20302,5	18883,8	19128,8	16387,6	18675,675	2,111
39	37657,6	56229,0	63427,4	62678,2	54998,050	2,722
40	5066,08	4307,35	4380,04	4429,45	4545,730	1,837
42	8601,35	7625,79	7985,48	7857,95	8017,643	0,717
44	52260,6	38010	38176,8	33623,7	40517,775	1,937
51	42226,3	75912,6	109807	127665	88902,725	1,713
52	34915,2	47115,2	51382,1	53070,3	46620,700	2,471
53	36312,4	33762,5	31420,5	32048,3	33385,925	3,420
62	gesätt.	63541,9	61065,2	62841,1	62482,7333	3,942
67	4276,57	3906,04	4137,14	4232,24	4137,998	2,266
68	10554,2	8472,32	8614,7	11570,2	9802,855	1,911
73	gesätt.	192954	124629	139621	152401,333	5,041
77	20931,9	20358,6	20358,8	20629,6	20569,725	4,210
78	28810,4	32735,9	33668,8	31692,9	31727,000	1,209
79	1944,63	1919,91	2133,00	2524,61	2130,538	0,508
80	33155,8	45256,4	51624,9	50040,6	45019,425	2,309
81	28967,5	31514,2	29668,2	28146,5	29574,100	1,847
82	39442,5	62869,3	91004,2	83353,8	69167,450	1,537
83	97937,6	54187,3	44688,8	47090,8	60976,125	1,917
97	36378,5	44072,5	48163,7	51475,1	45022,450	1,442
98	28475,0	33213,6	33294,1	28336,3	30829,750	2,466
100	19683,3	18731,9	18684,8	18001,8	18775,450	1,294
108	52337,5	78741,9	109906	150507	97873,100	2,821
109	1525,94	1399,42	1420,89	2242,33	1647,145	0,067
111	35671,4	42279,5	45033,2	46012,3	42249,100	3,190
112	14769,2	13571,0	12604,6	13952,0	13724,200	1,088
113	24444,2	26820,6	31649,3	23708,9	26655,750	1,989
11/	44002,0	30340,5 42646 7	41721,2	30412,7	40119,300	2,000
110	40120,4	43040,7	01070 0	11.U. 22107 6	40514,155	2,029
120	ZS955,0	24031,0 45090 2	21370,3	23107,0	23132,473	2 051
120	gesätt.	40909,0	32702,1	n.u.	39305,700	2,901
121	10722.2	9054 04	020121,0	0159.06	0796 929	0,010
122	5078 50	9074,04 5026 60	9301,21 4705 20	5160 70	9700,020 4005.068	0,103
123	desätt	5701 03	4703,29	1806 65	4995,000 5136 877	0 700
124	gesätt.	29962.6	26261 2	26665 4	27629 733	4 081
120	gesätt.	20002,0	20201,2	20000, 1 81830 5	85644 100	5 277
127	gesätt	905all. 20122 6	23003 2	28305 /	27477 400	J,277 A 151
120	8335 10	7323 75	25305,2 6507 87	70/8 05	7326 440	1 / 30
130	ttesat	43200 7	44536 N	40102 /	42646 033	3 400
131	4603 54	4046 08	3767 71	4138 60	4139 005	2 645
132	8276 18	7724 NR	7735 10	8135 57	7967 755	2,040
133	desätt	19146 7	12683.9	14672 6	15501 067	1 769
134	13022,0	11304,9	10755,7	11144,2	11556,700	1,998

135	3224,72	3143,29	2872,67	2753,42	2998,525	0,505
136	5886,6	6102,52	5963,76	5771,64	5931,130	1,118
137	22704,5	23637,8	19384,8	20738,4	21616,375	3,944

Nr.: Tumor Nummer, Verd.: Verdünnung, gesätt.: Messung gesättigt, n.d.: nicht durchgeführt



Abbildung 3.4: a.) bFGF-Konzentration bezogen auf histologische Subtypen. Es handelt sich um Mittelwerte +/- Standardabweichung der Einzeldaten aus Tabelle 3.4. Die Konzentration von bFGF war in transitionalen mehr als doppelt so hoch wie in meningotheliomatösen Meningeomen. Ansonsten fand sich kein Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Subtyp oder der WHO Graduierung. b.) bFGF-Konzentration bezogen auf die WHO Grade. Man erkennt eine diskret höhere bFGF Konzentration in den atypischen Meningeom im vergleich zu den benignen und anaplastischen Tumoren.

Für bFGF fand sich keine Korrelationen zum WHO Grad. Innerhalb der benignen Meningeome fand sich ein signifikanter Unterschied für die bFGF Konzentration, die in transitionalen Meningeomen 2,5 x so hoch war wie in meningotheliomatösen Meningeomen (P=0,006, MW Test).

3.1.5 Konzentration von PLGF

Die Bestimmung Wachstumsfaktorkonzentrationen von bFGF erfolgte mittels ein kommerzielles Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll, siehe 2.1.3.3. Die Auswertung erfolgte entsprechend dem HGF/SF bzw. bFGF ELISA, wobei die Zwischenergebnisse für PIGF in pg/ml angegeben wurden. 23 Tumorextrakte zeigten in den niedrigen Verdünnungen gesättigte Messwerte, wegen unzureichender Reaktion wurden 22 Tumorextrakte bei einer oder mehreren der höheren Verdünnungen mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet. Die Berechnung des Mittelwertes erfolgte entsprechend 3.1.2.

PIGF ließ sich in allen untersuchten Tumorextrakten nachweisen. Die gemessenen Konzentrationen lagen für PLGF zwischen 0,002 und 1,975 ng/mg Protein (siehe Tabelle 3.5 und Auswertung Abb. 3.5). Die niedrigste Konzentration fand sich in einem meningotheliomatösen, die höchste in einem atypischen Meningeom.



Abbildung 3.5: a.) PLGF-Konzentration bezogen auf histologische Subtypen. Es handelt sich um Mittelwerte +/- Standardabweichung der Einzeldaten aus Tabelle 3.5. Es fand sich weder ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Subtyp noch ein Zusammenhang zwischen der WHO Graduierung (siehe Text). b.) PLGF-Konzentration bezogen auf die WHO Grade. Man erkennt eine diskret höhere bFGF Konzentration in den atypischen Meningeom im vergleich zu den benignen und anaplastischen Tumoren.

Es zeigten sich sich im Mittelwert keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Konzentration von PIGF zwischen den einzelnen histologischen Subgruppen und den einzelnen Malignitätsgraden, siehe Abbildung 3.5. Die im Mittelwert höchsten Konzentrationen an PIGF wiesen die transitionalen Meningeome auf, die niedrigste das mikrozystische Meningeom, gefolgt von den angiomatösen Meningeomen, wobei dieser Subtyp drei Meningeome umfasst. Der Mittelwert der PIGF Konzentration der transitionalen Meningeome lag mehr als die Hälfte über dem der meningotheliomatösen Meningeome, wobei auch diese Differenz nicht signifikant war.

Nr.	1. Verd. [pg/ml]	2. Verd. [pg/ml]	3. Verd. [pg/ml]	4. Verd. [pg/ml]	Mittel- wert [pg/ml]	ng PLGF/ mg Pro- tein
2	519,108	573,017	605,802	615,347	578,319	0,595
3	gesätt.	1095,24	1206,06	1275,63	1192,310	0,383
5	gesätt.	2177,16	2510,69	2744,90	2477,583	0,372
6	863,799	1417,93	1335,57	n.d.	1205,766	0,263
8	gesätt.	911,559	1016,19	1066,93	998,226	0,282
9	1227,41	1576,45	1868,34	1975,93	1662,033	0,516
12	gesätt.	4821,45	5629,67	6396,42	5615,847	0,499
14	226,884	248,029	259,146	247,536	245,399	0,117
15	401,895	423,486	462,213	525,417	453,253	0,074
16	795,974	892,792	734,624	721,107	786,124	0,837
17	790,216	867,917	943,161	1077,62	919,729	0,091
20	667,672	712,077	759,868	847,447	746,766	0,102
25	662,409	713,836	757,907	746,297	720,112	0,220
26	778,638	890,183	907,535	899,488	868,961	0,310
30	gesätt.	2067,61	2430,54	2645,15	2381,100	0,557
32	713,192	766,100	857,910	951,492	822,174	0,211
34	1387,72	1702,20	2086,26	1723,24	1724,855	0,349
35	964,337	1167,17	1265,57	n.d.	1132,359	0,363
36	0,215	n.d.	n.d.	n.d.	0,215	0,002
37	gesätt.	128,682	123,768	n.d.	126,225	0,027
38	628,655	683,064	721,852	707,387	685,240	0,310
39	381,780	442,556	452,402	575,569	463,077	0,092
40	98,928	109,818	109,588	247,189	141,381	0.229
42	186.359	189.246	182.551	183,410	185.392	0.066
44	989,690	1319.73	1672.92	1713.78	1424.030	0.272
51	gesätt.	3548.06	3903.17	n.d.	3725.615	0.287
52	gesätt.	2168.07	2115.56	1840.31	2041.313	0.433
53	454.094	696.537	772.231	n.d.	640.954	0.263
62	gesätt.	1821.82	2129.15	2315.81	2088.927	0.527
67	gesätt.	273.857	246.677	268.912	263,149	0.576
68	152.515	156.292	170.082	176.285	163,794	0.128
73	gesätt.	gesätt.	4367.95	6139.65	5253.800	0.695
77	44.689	n.d.	n.d.	n.d.	44.689	0.037
78	1744.74	2288.89	n.d.	n.d.	2016.815	0.307
79	2.441	5.773	n.d.	n.d.	4.107	0.004
80	96 121	110 170	109 010	94 257	102 390	0.021
81	546 986	517 810	513 546	552 052	532 599	0 133
82	desätt.	2244 51	2293 93	2498 82	2345 753	0 208
83	gesätt.	desätt.	desätt.	8210.61	8210 610	1 033
97	gesätt.	6063 33	5757 63	6449 21	6090 057	0,780
98	gesätt.	1472 59	1665.87	1765 52	1634 660	0 523
100	gesätt.	1456	1553 69	1713 43	1574 373	0 434
108	gesätt.	2167 76	2074 51	2292 50	2178 257	0 251
100	43 777	52 304	n.d.	n.d.	48 041	0.008
111	537,807	549,350	n.d.	n.d.	543,579	0,164

Tabelle 3.5 Ergebnisse der PLGF Bestimmung

112	gesätt.	gesätt.	2640,68	3200,46	2920,570	0,926
113	gesätt.	gesätt.	3102,75	3844,41	3473,580	1,037
117	gesätt.	1447,90	1536,53	1676,16	1553,530	0,520
118	624,591	701,241	798,099	829,550	738,370	0,240
119	477,023	538,975	567,634	646,119	557,438	0,157
120	1190,76	1431,44	1644,70	1784,33	1512,808	0,567
121	gesätt.	2394,45	2726,48	4535,80	3218,910	0,550
122	41,374	36,891	45,561	n.d.	41,275	0,035
123	498,188	611,877	527,656	773,110	602,708	1,362
124	62,539	68,638	59,671	n.d.	63,616	0,044
126	gesätt.	2294,50	2677,09	3049,54	2673,710	1,975
127	582,849	721,230	748,714	914,211	741,751	0,229
128	gesätt.	1686,35	1949,38	2057,06	1897,59667	1,147
129	29,981	30,734	n.d.	n.d.	30,3575	0,030
130	44,297	41,123	n.d.	n.d.	42,71	0,017
131	5,439	n.d.	n.d.	n.d.	5,439	0,017
132	219,832	243,179	n.d.	n.d.	231,5055	0,153
133	694,167	802,410	805,861	n.d.	767,479333	0,438
134	212,295	257,477	222,372	n.d.	230,714667	0,199
135	92,240	100,982	n.d.	n.d.	96,611	0,081
136	82,973	84,425	82,246	n.d.	83,2146667	0,078
137	369,355	385,983	359,234	n.d.	371,524	0,339

Nr.: Tumor Nummer, Verd.: Verdünnung, gesätt.: Messung gesättigt, keine exakte Bestimmung möglich, n.d.: nicht durchgeführt.

3.2 Resultate der Bestimmung des Mib1 Proliferationsindex

Zur Bestimmung des Proliferationsindex der einzelnen Meningeome wurde der monoklonale Antikörper Mib1 in einer immunhistochemischen Färbung verwendet, siehe 2.3 und 2.3.3.

Der Mib1-Proliferationsindex wurde bestimmt, indem unter dem Mikroskop (100x Objektiv) im Bereich mit der höchsten Proliferationsaktivität alle Zellkerne in 5 Gesichtsfeldern (je 0,031 mm²) hinsichtlich der Gesamtzahl an Kernen und der Zahl Mib1-positiver Kerne ausgezählt wurden. Die durch Antikörper angefärbten, Mib1-positiven Zellkerne wurden prozentual zu den übrigen in Beziehung gesetzt.

Die immunhistochemische Bestimmung des Proliferationsindex war bei allen Meningeomen möglich. Zwei Tumore boten jedoch nicht ausreichend Fläche zur Evaluation von 5 Gesichtsfeldern. Hier wurden die verbliebenen mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet. Die Bestimmung erfolgte bei diesen Tumoren entsprechend nur mit den vorhandenen Ergebnissen. Ergebnisse siehe Tabelle 3.6 und Auswertung Abb. 3.6.

Die MiB1-Werte lagen zwischen 45,6 % in einem anaplastischen Meningeom und 0,7 % in einem fibrillären Meningeom. Das zellreichste Meningeom mit insgesamt 1112 pro 0,155

mm² Zellen war ein anaplastisches, das insgesamt zellärmste mit 350 pro 0,155 mm² Zellen ein atypisches Meningeom.

Nr.	1. Feld	2. Feld	3. Feld	4. Feld	5 .Feld	Gesamt	Prozent
2	14/99	14/116	6/93	5/72	15/120	54/500	10,8%
3	5/109	12/82	4/60	4/80	8/98	33/429	7,7%
5	11/145	14/146	12/132	8/166	10/115	55/759	7,2%
6	27/79	33/69	20/132	13/103	21/138	114/521	21,9%
8	30/136	14/101	8/133	8/90	11/153	71/684	10,4%
9	73/164	72/161	70/157	88/193	94/195	397/870	45,6%
12	9/220	5/139	4/151	5/187	5/135	28/832	3,4%
14	22/124	23/133	10/104	13/137	20/135	88/633	13,9%
15	11/135	9/69	9/61	6/59	6/98	41/463	8,9%
16	8/68	4/75	6/56	5/59	3/105	26/367	7,1%
17	20/124	23/133	21/128	20/119	23/123	107/627	17,1%
20	3/125	2/156	1/142	2/135	3/109	11/678	1,6%
25	16/153	4/126	7/127	6/101	7/127	40/674	5,9%
26	5/104	7/125	3/96	9/153	2/42	26/520	5,0%
27	4/106	5/111	7/148	2/81	2/85	20/531	3,8%
30	15/173	6/146	4/119	8/129	8/155	41/763	5,4%
32	13/93	14/119	12/70	11/86	13/98	63/466	13,5%
34	28/79	15/51	13/68	19/101	14/64	89/363	24,5%
35	1/189	3/110	1/111	2/144	1/133	8/687	1,2%
36	4/137	2/82	3/77	2/155	1/81	12/532	2,3%
37	20/173	5/49	1/82	2/66	3/79	13/362	3,6%
38	2/86	4/83	2/91	4/79	1/94	13/433	3,0%
39	39/344	43/356	45/285	n.d.	n.d.	127/1112	11,4%
40	5/169	8/186	4/160	1/101	0/152	18/768	2,3%
42	13/121	3/60	4/73	n.d.	n.d.	20/254	7,9%
44	9/121	5/165	7/130	8/106	1/104	30/626	4,8%
45	4/71	5/78	6/73	2/62	4/66	21/350	6,0%
51	11/60	6/133	5/63	5/181	7/132	34/603	5,6%
52	19/237	12/213	6/169	8/190	5/121	50/930	5,4%
53	15/155	4/160	11/163	8/103	6/102	44/683	6,4%
62	9/162	5/114	14/143	12/155	12/134	52/760	6,8%
67	5/99	8/135	3/101	9/156	2/49	27/540	5,0%
68	2/91	6/100	3/61	8/112	4/117	23/509	4,5%
73	16/136	13/113	24/123	14/143	20/129	87/644	13,5%
77	28/110	30/148	35/179	25/125	21/131	139/832	16,7%
78	4/100	5/109	2/154	4/113	4/130	19/625	3,0%
79	18/74	8/101	17/110	12/94	12/135	67/571	11,7%
80	36/100	25/83	21/97	41/117	35/94	158/491	32,2%
81	10/260	9/208	9/234	7/139	8/163	43/1004	4,3%
82	4/109	2/94	1/55	3/125	1/59	11/453	2,4%
83	1/162	1/103	1/112	0/78	1/131	4/586	0,7%
97	4/83	2/93	1/89	2/80	9/111	18/474	3,8%
98	4/91	8/99	9/166	7/132	9/125	37/613	6,0%
100	6/109	3/90	14/138	5/169	4/113	32/651	4,9%
108	12/112	9/98	7/97	8/87	3/99	39/493	8,0%
109	13/124	14/133	9/115	11/101	9/148	56/621	9,0%

Tabelle 3.6 Ergebnisse der Mib1 Auszählung

111	14/216	8/201	7/150	14/275	7/187	50/1029	4,9%
112	20/98	24/105	21/118	24/132	29/136	118/589	20,0%
113	8/66	4/73	5/56	5/57	3/105	25/361	7,0%
117	17/112	15/132	8/80	7/84	13/119	60/527	11,4%
118	4/113	5/96	3/77	1/55	4/69	17/410	4,1%
119	15/130	11/103	11/149	5/121	8/128	50/678	7,4%
120	16/163	10/160	10/178	11//178	6/188	53/867	6,1%
121	15/198	10/148	6/133	10/140	6/104	47/723	6,5%
122	12/131	14/122	6/110	8/109	6/122	46/594	7,7%
123	3/75	5/87	5/76	3/71	3/67	19/376	5,1%
124	3/125	2/156	1/142	2/135	3/109	11/678	1,6%
126	9/69	12/118	10/83	12/120	11/130	54/520	10,4%
127	7/68	4/97	5/83	8/117	6/116	30/481	6,2%
128	17/138	11/90	12/131	11/144	9/107	60/610	9,8%
129	20/134	11/140	17/133	11/151	17/139	76/697	11,0%
130	17/135	18/145	15/141	19/129	14/139	83/689	12,0%
131	5/99	7/120	3/91	8/148	2/42	24/480	5,0%
132	22/128	15/135	20/130	26/122	16/124	99/639	15,5%
133	7/126	6/130	4/119	2/110	2/107	21/592	3,5%
134	7/101	8/110	8/107	10/113	10/102	43/533	8,0%
135	17/131	13/125	15/127	11/114	9/108	65/605	10,7%
136	3/99	4/103	3/111	4/125	1/163	15/601	3,0%
137	2/98	5/108	4/103	4/101	2/115	17/525	3,2%

Anzahl und Prozentsätze der Mib1-positiven Zellkerne in Prozent. Es wurde pro Tumor 5 Felder ausgezählt. Die erste Zahl in den Tabellenspalten 2 bis 7 gibt die Mib1-positiven Zellkerne an, die zweite Zahl alle Kerne in den Gesichtsfeldern. Abkürzungen – n.d: nicht durchgeführt; Nr.: Nummer des Tumors.

Zwischen dem Mib1 Proliferationsindex und dem WHO Grad fand sich eine signifikante Korrelation (r = 0,59, P < 0,001, Spearman). Der durchschnittliche Mib1 Index war 2,1 x höher in atypischen und 3,0 x höher in anaplastischen Meningeomen als in WHO Grad I Meningeomen (P < 0,001, MW Test, für beide Vergleiche) (Abb. 3.6). Die VEGF Konzentration korrelierte allerdings nicht signifikant mit dem Mib1 Proliferationsindex (r = 0,23, P = 0,073, Spearman).



Abbildung 3.6: a.) Die ausgezählten Werte der Mib1 Proliferationsrate in Prozent basierend auf den Daten der Tabelle 3.6 für die einzelnen histologischen Subtypen und WHO Grade +/- Standardabweichung. Die in größerer Anzahl in die Studie eingegangenen Meningeome vom fibrillären, meningothelimatösen und transitionalen Subtyp liegen hinsichtlich ihrer Proliferationsrate nahe beieinander. b.) Man erkennt eine Zunahme des Proliferationsindex von benignen über atypische hin zu anaplastischen Meningeomen.

3.4 Resultate der mikroskopischen Bestimmung der Blutgefäßzahl

Um die Vaskularisation der Tumore zu untersuchen, wurden mit einer immunhistochemischen Färbung auf Paraffinblock-Schnitten Endothelzellen mittels eines Antikörpers gegen von Willebrandt-Faktor (vWF) angefärbt, siehe 2.2 und 2.2.3. Zunächst erfolgte mikroskopisch (10x Objektiv) die Bestimmung des Bereichs mit der größten Gefäßdichte. Dort wurden in 5 Gesichtsfeldern mit einem 40x Objektiv (je 0,19 mm²) die Gefäße ausgezählt, summiert und als Gefäßdichte pro 0,95 mm² (5 x 0.19 mm²) angegeben. Es ergaben sich die in Tabelle 3.7 gelisteten Ergebnisse. Bei einem Tumor (Nr. 121) gelang die Auszählung nur in 4 Gesichtsfeldern, da das Gewebestück zu klein war. Hier erfolgte die Angabe der Summe über 4 Gesichtsfelder (0,76 mm²) sowie die interpolierte Anzahl auf 5 Gesichtsfelder. Das 5. Gesichtsfeld wurde mit n.d. (nicht durchgeführt) bezeichnet.

Die Gefäßdichte aller untersuchten Tumore lag zwischen 6 pro 0,95 mm² in einem meningotheliomatösem Meningeom und 196 pro 0,95 mm² ebenfalls in einem meningotheliomatösem Subtyp. Ergebnisse siehe Tabelle 3.7 und Auswertung Abb. 3.7.

Tabelle 3.7 Ergebnisse de	r Auszählung zur Gefäßzahl
---------------------------	----------------------------

Nr.	1. Feld	2. Feld	3. Feld	4. Feld	5. Feld	Gefals- dichte / 0,95 mm²	Nr.	1. Feld	2. Feld	3. Feld	4. Feld	5. Feld	Getals- dichte / 0,95 mm ²
2	8	4	5	7	7	31	79	12	8	15	6	8	49
3	29	27	29	22	17	124	80	24	20	7	14	27	92
5	23	16	18	17	22	96	81	21	21	15	7	17	81
6	18	7	12	8	9	54	82	12	5	6	2	4	29
8	7	10	13	7	8	45	83	28	20	11	9	24	92
9	25	22	30	28	23	128	97	7	5	10	6	7	35
12	19	24	18	17	20	98	98	9	5	4	2	5	25
14	3	1	2	1	0	7	100	15	13	14	24	22	88
15	17	15	12	19	16	79	108	11	10	11	11	14	57
16	5	4	10	13	6	38	109	10	7	9	7	10	43
17	20	19	13	14	17	83	111	15	19	11	13	12	70
25	6	11	10	8	10	45	112	10	18	17	10	6	61
26	8	6	4	7	7	32	113	22	14	21	12	21	90
27	1	2	2	0	1	6	117	28	22	15	20	29	114
30	24	15	20	19	14	92	118	31	27	21	22	41	142
32	19	11	11	9	8	58	119	6	7	6	4	8	31
34	2	4	4	2	3	15	120	22	19	24	29	22	116
35	10	10	9	9	13	51	121	32	21	22	16	n.d.	91/114
36	15	10	9	9	2	45	122	27	32	33	29	29	150
37	30	29	17	12	18	106	123	14	9	12	4	9	48
39	20	15	22	18	18	93	124	27	39	20	32	22	140
40	9	8	12	7	9	45	126	8	15	6	14	16	59
42	16	5	14	15	7	57	127	23	19	32	30	24	128
44	47	32	38	42	37	196	128	12	26	22	13	15	88
45	6	4	8	6	9	33	129	24	19	22	25	20	110
51	22	31	28	31	17	129	130	21	18	15	23	18	95
52	20	19	10	14	19	82	131	19	20	18	17	17	91
53	9	8	10	13	14	54	132	19	14	13	17	14	77
62	17	7	9	14	7	54	133	12	11	9	12	10	54
67	8	14	4	11	10	47	134	15	12	15	11	11	64
68	3	4	0	5	4	16	135	22	27	34	38	21	142
73	11	13	9	9	14	56	136	8	12	6	12	8	46
77	3	9	8	5	7	32	137	23	8	10	9	12	62
78	5	4	3	6	3	21							

Anzahl der Gefäße pro Gesichtsfeld. Es wurden pro Tumor 5 Gesichtsfelder ausgezählt. Bei Tumor Nr. 121 wurden bei kleinem Gewebestück nur 4 Gesichtsfelder ausgezählt und die Anzahl auf 5 Felder interpoliert. Die erste Zahl in Spalte 7 gibt die summierte Anzahl über 4 Gesichtsfelder wieder, die zweite die interpolierte Anzahl. Abkürzungen – n.d.: nicht durchgeführt; Nr.: Nummer des Tumors.

Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem WHO Grad, dem Tumorsubtyp oder einem invasiven Tumorwachstum, Abb. 3.7. Gleichfalls fand sich kein statistischer Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der jeweiligen Konzentration von VEGF, HGF/SF, bFGF oder PLGF.



Abbildung 3.7: Die Gefäßdichte als Mittelwert berechnet auf Basis der in Tabelle 3.7 gelisteten Daten. a.) Innerhalb der WHO Grad I Subvarianten finden sich keine signifikante Differenz hinsichtlich der Gefäßdichte. Da nur ein mikrozystisches Meningeom WHO Grad I zur Untersuchung gelangte, ist die Aussage dieses Balkens nur eingeschränkt aussagekräftig. b.) Ebenfalls fand sich keine Zunahme der Gefäßdichte im Rahmen der Malignisierung, benigne WHO Grad I Meningeome zeigen etwa eine gleiche Gefäßdichte wie anaplastische Meningeome WHO Grad III.

3.4.1 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle 3.8 gibt einen zusammenfassenden Überblick über sämtliche Ergebnisse der VEGF, HGF/SF, PLGF und bFGF Messungen sowie der Mib1 und Gefäßdichtenbestimmung aufgeschlüsselt nach den einzelnen histologischen Subgruppen und der WHO Graduierung. Da nur ein mikrozystisches und nur drei angiomatöse Meningeome untersucht wurden, sind die Ergebnisse bei geringer Fallzahl nur eingeschränkt beurteilbar. Zur genauen Beschreibung der Methoden bzw. Ergebnisse im Einzelnen siehe die jeweiligen, vorherigen Kapitel.

Tumorart	VEGF	HGF/SF	PLGF	bFGF	Mib1	Gefäßdichte
(n)		ng /mg F	Protein		[%]	/0,95 mm²
WHO Grad I (40)	0,11 ± 0,18	0,62 ± 0,68	0,32 ± 0,30	2,48 ± 1,70	5,71 ± 3,73	75,03 ± 44,05
Meningotheliomatös (16) Transitional (10)	0,19 ± 0,26 0,10 ± 0,10	0,88 ± 0,90 0,57 ± 0,54	0,21 ± 0,15 0,52 ± 0,36	2,34 ± 1,86 2,90 ± 1,80	4,99 ± 2,95 6,19 ± 3,57	72,53 ± 59,18 65,30 ± 29,18
Fibromatös (10)	$0,02 \pm 0,03$	0,36 ± 0,32	$0,40 \pm 0,33$	2,57 ± 1,56	$6,62 \pm 5,04$	$74,20 \pm 26,43$
Angiomatös (3)	$0,03 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,27$	$0,07 \pm 0,04$	2,05 ± 1,46	$5,75 \pm 3,04$	101,00 ± 41,73
Mikrozystisch (1)	$0,09 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$	0,71 ± 0,00	$1,60 \pm 0,00$	$140,00 \pm 0,00$
WHO Grad II (21)	10,01 ± 4,10	0,58 ± 0,58	0,45 ± 0,46	2,84 ± 1,41	10,01 ± 4,10	67,71 ± 34,54
WHO Grad III (8)	15,66 ± 12,64	0,54 ± 0,53	0,31 ± 0,37	2,63 ± 2,16	15,66 ± 12,64	76,00 ± 34,50

Tabelle 3.8: Wachstumsfaktorkonzentrationen, Mib1 Proliferationsindex und Gefäßdichte in Meningeomen

Konzentrationen von VEGF, HGF/SF, PLGF und bFGF in den Tumorextrakten wurden mittels ELISA bestimmt. Blutgefäße wurden in der Region der größten Blutgefäßdichte in 5 Gesichtsfeldern (bei 400x Vergrößerung; jedes Feld 0,19 mm²) gezählt. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei dreifacher Bestimmung.

3.5 Invasives Wachstum und WHO Graduierung

Das Kriterium der Invasivität der Meningeome beruht auf der subjektiven Einschätzung des jeweiligen Operateurs und wurde nicht histologisch validiert. Ein invasives Tumorwachstum in die duralen Sinus, Strukturen der Schädelbasis oder Knochen wurde in 29/65 Fällen im OP Bericht verzeichnet. Die meisten dieser invasiven Meningeome (22/29, 76%) entsprachen einem benignen Grad. Von den nicht-invasiven Meningeomen hingegen wurden lediglich 42% (15/36) als benigne, aber 58% als atypisch oder anaplastisch (P < 0,001, χ^2 Test) eingestuft. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem invasivem Wachstum und der Tumorvaskularisation oder der Konzentration der Wachstumsfaktoren VEGF, HGF/SF, PLGF oder bFGF.

3.6 Resultate der Chemotaxis Analyse

Durch ergänzende *in-vitro* Versuche sollte die Bedeutung der Wachstumsfaktoren auf funktioneller Ebene validiert werden. Die chemotaktische Aktivität für mikrovaskuläre Endothelzellen ist ein guter Parameter für die angiogenetische *in-vivo* Aktivität eines Wachstumsfaktors. In einer vorherigen Studie mit Gliomen konnte gezeigt werden, dass die Bioaktivität von VEGF, HGF/SF und bFGF in Tumorextrakten, welche auf dieselbe Weise wie in der

vorliegenden Arbeit hergestellt worden waren, erhalten blieb (Schmidt 1999). Diese Bioaktivität induzierte *in-vitro* eine Chemotaxis von Endothelzellen sowie die Bildung kapillarähnlicher Strukturen. In modifizierte Boyden Chamber Assays wurde nun der Effekt der Meningeom-Extrakte auf die Migration von Endothelzellen untersucht, siehe 2.4.1 und 2.4.2. Für die Auszählung der migrierten Zellen wurden die angefärbten Zellkerne auf dem Filter unter dem Mikroskop (40x Objektiv) pro Well ausgezählt, wofür ein kalibriertes optisches Gitter verwendet wurde. Jede Zählung erfolgte dreimal und wurde als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Von den 27 getesteten Extrakten wiesen hier 14 eine signifikante chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen auf. Drei Extrakte hemmten allerdings die Motilität der Endothelzellen und zehn weitere Extrakte führten zu keinem Effekt. Es fand sich eine signifikante Korrelation (r = 0,57, P = 0,003, Spearman) zwischen der ausgelösten Endothelzellmigration eines einzelnen Extraktes und dessen VEGF-Konzentration. Keine signifikante Korrelation fand sich jedoch zwischen der durchschnittlichen chemotaktischen Aktivität von Meningeomen und deren histologischem Grad (one-way ANOVA, P = 0,500). Mit den anderen in den Extrakten bzw. Tumoren bestimmten Parametern wie HGF, bFGF, PLGF, Proliferationsindex, Gefäßdichte oder Invasivität ließ sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu der chemotaktischen Aktivierung auf Endothelzellen herstellen (Tab. 3.9).

Um zu testen, ob und in welchem Umfang die chemotaktische Wirkung der Tumorextrakte durch die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren ausgelöst wurde, wurden spezifische, neutralisierende Antikörper hinzugegeben. Der Antikörper gegen bFGF erwies sich dabei als am effektivsten, um die induzierte Endothelzellmigration teilweise fast komplett zu hemmen. Die durchschnittliche Hemmung lag hierbei bei 85% für alle getesteten Extrakte (P < 0,001, unpaired t-Test). Der Antikörper gegen VEGF hemmte die Migration in einem Fall ebenfalls fast komplett, bei einer durchschnittlichen Hemmung von 13% für alle Extrakte (P = 0,022). Eine Hemmung bis zu 55% der Migration konnte durch Zugabe des Antikörpers gegen HGF/SF bewirkt werden, wobei die durchschnittliche Hemmung mit 5% sich jedoch als nicht signifikant erwies.

In einem separaten Kontroll-Experiment wurde die neutralisierende Aktivität der Antikörper bei einer Konzentration von 20 µg/ml gegen die jeweiligen rekombinaten humanen Wachstumsfaktoren getestet. Die Wachstumsfaktoren wurden in den zuvor ermittelten Konzentrationen eingesetzt, die zu der maximalen Chemotaxis der Endothelzellen führten. Der VEGF Antikörper inhibierte die durch VEGF induzierte Chemotaxis zu 83%, der HGF/SF Antikörper die Migration durch HGF/SF zu 81% und der bFGF Antikörper die bFGF assoziierte Migration zu 87%. Die Antikörper gegen einen bestimmten Wachstumsfaktor führten zu keiner Inhibitierung der durch andere Wachstumsfaktoren ausgelösten Chemotaxis, was in jeder möglichen Kombination getestet wurde. Es trat auch keine Beeinflussung der Endothelzellmigration durch die einzelnen Antikörper auf, wenn keine Wachstumsfaktoren oder Tumor-Extrakt beigegeben waren.

Nr.	+ AK ge- gen	Migration	SD bei 3facher Zählung	[%] dihih	[%] qnSX	Nr.	+ AK ge- gen	Migration	SD bei 3facher Zählung	Inhib [%]	[%] qnSX
14	Kontr.	269	6			114	Kontr.	167	2		
14	bFGF	203	4	-25	-39	114	bFGF	168	1	1	1
14	VEGF	91	13	-66	-105	114	VEGF	174	7	4	10
14	HGF	275	5	2	4	114	HGF	148	9	-11	-28
25	Kontr.	162	4			116	Kontr.	290	11		
25	bFGF	73	7	-55	-144	116	bFGF	200	8	-31	-49
25	VEGF	168	5	4	10	116	VEGF	152	5	-48	-73
25	HGF	144	5	-11	-29	116	HGF	246	6	-15	-23
38	Kontr.	111	6			117	Kontr.	144	4		
38	bFGF	81	4	-27	-273	117	bFGF	113	4	-22	-70
38	VEGF	129	8	16	164	117	VEGF	131	8	-9	-30
38	HGF	105	8	-5	-55	117	HGF	125	9	-13	-43
39	Kontr.	224	5			122	Kontr.	123	6		
39	bFGF	144	3	-36	-65	122	bFGF	101	6	-18	-96
39	VEGF	116	28	-48	-87	122	VEGF	125	9	2	9
39	HGF	251	8	12	22	122	HGF	125	7	2	9
73	Kontr.	235	11			123	Kontr.	192	3		
73	bFGF	249	9	6	10	123	bFGF	125	2	-35	-73
73	VEGF	215	4	-9	-15	123	VEGF	188	3	-2	-4
73	HGF	246	13	5	8	123	HGF	203	8	6	12
81	Kontr.	239	5			126	Kontr.	163	6		
81	bFGF	171	3	-28	-49	126	bFGF	156	4	-4	-11
81	VEGF	176	6	-26	-45	126	VEGF	135	7	-17	-44
81	HGF	235	6	-2	-3	126	HGF	146	6	-10	-73
111	Kontr.	112	8			128	Kontr.	278	3		
111	bFGF	87	10	-22	-208	128	bFGF	214	8	-23	-36
111	VEGF	124	6	11	100	128	VEGF	194	4	-30	-47
111	HGF	123	2	10	92	128	HGF	292	8	5	8

Tabelle 3.9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Chemotaxis Assays

In Zeile 2 Angabe des Mittelwerts der Anzahl der migrierten Zellen pro Well bei 3facher Auszählung. Nr.: Nummer des Tumors, SD: Standardabweichung bei 3facher Auszählung, + AK: applizierter Antikörper, jeweils in einer Konzentration von 20 µg/ml, Inhib [%]: Inhibition inkl. Kontrolle in [%], KSub [%]: Kontrolle subtrahiert in [%], Kontr.: Kontrolle/kein Antikörper, HGF: HGF/SF.

3.7 Induktion kapillarähnlicher Strukturen durch Tumor-Extrakte

Angiogenese kann *in-vitro* durch Verwendung dreidimensionaler Kollagen-Gele simuliert werden. Bei Zugabe angiogenetisch aktiver Wachstumsfaktoren wachsen Endothelzellen in die Gele ein und bilden in der Tiefe kapillarähnliche Strukturen (Tubes). Wir untersuchten die Fähigkeit der Meningeom-Extrakte, solche kapillarähnlichen Strukturen aus Endothelzellen zu induzieren und versuchten, diese Effekte auf einzelne Wachstumsfaktoren, die in den Extrakten vorhanden waren, zurückzuführen, siehe 2.4.3 und 2.4.4. Die Länge der kapillarähnlichen Strukturen wurde additiv im Gel ausgemessen. Für jede Versuchsanordnung wurden 3 zufällige Felder (jeweils 0,64 mm²) ausgemessen, jede Versuchsanordnung war zudem dreifach durchgeführt worden.

Alle getesteten 8 Tumor-Extrakte führten zu kapillarähnlichen Strukturen der Endothelzellen, wohingegen ohne Zugaben eines Extraktes keine solchen Strukturen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.8). Das Ausmaß der durch die Extrakte induzierten Bildung kapillarähnlicher Strukturen korrelierte statistisch weder mit der Konzentration der Wachstumsfaktoren VEGF, HGF/SF oder bFGF, noch mit der Gefäßdichte, dem histologischen Grad oder dem Proliferationsindex. Es fand sich lediglich ein schwacher und statistisch nicht signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Bildung kapillarähnlicher Strukturen und der im Extrakt enthaltenen Konzentration von PLGF (r = 0,34, P = 0,100, Spearman). Die Angaben beziehen sich jeweils auf eine Kontrolle, wobei als Basiswert die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in Abwesenheit von Tumorextrakten festgelegt wurde.

Durch die Hinzugabe von neutralisierenden Antikörpern konnte die durch die Tumor-Extrakte ausgelöste Bildung kapillarähnlicher Strukturen gehemmt werden. Der Antikörper gegen bFGF erwies sich dabei als am effektivsten, hierbei kam es zu einer maximalen Hemmung von 78% bei einer durchschnittlichen Hemmung um 63% bei allen getesteten Extrakten (P < 0,001, unpaired t-Test). Der Antikörper gegen VEGF hemmte die Kapillarbildung bis maximal 22%, allerdings mit einer nicht signifikanten durchschnittlichen Hemmung von 2% für alle gestesteten Extrakte. Nach Zugabe von Antikörper gegen HGF/SF kam es zu einer maximalen Inhibierung von 24%. Bei einigen Extrakten fanden sich hierbei allerdings leicht stimulierende Effekte, so dass insgesamt für alle Extrakte keine Hemmung der Bildung kapillarähnlicher Strukturen gefunden wurde (Tab. 3.10).

In Kontrollexperimenten wurden die Antikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml auf ihre Fähigkeit untersucht, zuvor ermittelte effektive Konzentrationen der jeweiligen rekombinaten Wachstumsfaktoren zu neutralisieren. Hierbei fand sich, dass der Antikörper gegen bFGF zu einer 77%igen Hemmung der durch bFGF induzierten Bildung kapillarähnlicher Strukturen führte, der Antikörper gegen VEGF die durch VEGF induzierte Hemmung um 81% reduzieren konnte und der Antikörper gegen HGF/SF die durch diesen Wachstumsfaktor induzierte Kapillarbildung um 85% hemmte. Es wurde keine Kreuzreaktivität der einzelnen Antikörper auf die jeweiligen anderen Wachstumsfaktoren in jeder denkbaren Kombination festgestellt.

Nr.	+ AK ge- gen	Kapillar- länge	SD bei 3facher Zählung	[%] dihih	
14	Kontr.	2007	65		
14	bFGF	557	298	-72	
14	VEGF	1563	210	-22	
14	HGF	1674	169	-17	
25	Kontr.	1309	130		
25	bFGF	457	148	-65	
25	VEGF	1593	12	22	
25	HGF	1620	336	24	
38	Kontr.	1143	87		
38	bFGF	400	86	-65	
38	VEGF	1101	49	-4	
38	HGF	1353	28	18	
39	Kontr.	945	78		
39	bFGF	407	25	-57	
39	VEGF	847	120	-10	
39	HGF	920	115	-3	

Tabelle 3.10: Ergebnisse	der Induktion	kapillarähnlicher	Strukturen

Nr.	+ AK ge- gen	Kapillar- länge	SD bei 3facher Zählung	[%] dihn
81	Kontr.	701	45	
81	bFGF	360	102	-49
81	VEGF	743	171	6
81	HGF	1144	225	63
113	Kontr.	1114	276	
113	bFGF	613	159	-45
113	VEGF	1060	199	-5
113	HGF	1690	337	52
117	Kontr.	1233	92	
117	bFGF	322	103	-74
117	VEGF	1360	130	10
117	HGF	1396	192	13
128	Kontr.	1945	168	
128	bFGF	433	136	-78
128	VEGF	1662	84	-15
128	HGF	1469	203	-24

In Zeile 2 Angabe des Mittelwerts der Länge der kappilarähnlichen Strukturen pro 1,92 mm² bei 3facher Auszählung; Nr.: Nummer des Tumors, SD: Standardabweichung, + AK: applizierter Antikörper, Inhib [%]: Inhibition incl. Kontrolle in [%],Kontr: Kontrolle/kein Antikörper, HGF: HGF/SF.

4. Diskussion

4.1 Erreichte Ziele der vorliegenden Studie

4.1.1 WHO Grad und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression

Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Expression und dem WHO Grad der untersuchten Meningeome kann hinsichtlich VEGF deutlich beantwortet werden: Im Vergleich von Meningeomen WHO Grad I zu atypischen Meningeomen WHO Grad II lag die durchschnittliche VEGF Expression um 2,7fach höher, im Vergleich von Meningeomen WHO Grad I zu anaplastischen Meningeomen WHO Grad III war die durchschnittliche VEGF Expression sogar 12,4fach erhöht. Eine solche Zunahme des VEGF Expressionsaktivität war aufgrund des biologischen Verhaltens maligner Tumore zu erwarten (Schmidt 1999).

Für die anderen überprüften Wachstumsfaktoren PLGF, HGF/SF und bFGF konnte keine Verbindung mit dem WHO Grad nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist eine veränderte Expression dieser drei Wachstumsfaktoren für die Malignisierung von Meningeomen irrelevant.

4.1.2 Histologische Varianten und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression

Innerhalb der Gruppe der WHO Grad I Meningeome wurden fünf histologische Varianten bezüglich eines Zusammenhangs mit der VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Expression überprüft. Meningotheliomatöse und fibrilläre Meningeome werden histologisch als zwei deutlich differente Varianten betrachtet (Kleihues und Cavenee 2000). Transitionale Meningeome sind als eine histologische Variante definiert, die Komponenten beider anderen Varianten zeigt. In der Tat konnte dieses histologische Konzept mittels der Bestimmung der VEGF Expression bestätigt werden: Die VEGF Konzentration lag im Vergleich von fibrillären zu transitionalen Meningeomen im Durchschnitt in letzteren um 4,7fach höher, im Vergleich von fibrillären zu meningotheliomatösen Meningeomen in letzteren um 8,8fach höher. D.h., die VEGF Expression ist wahrscheinlich ein Faktor, durch welchen diese Tumorvarianten biologisch charakterisiert werden können.

Die PLGF Konzentration ist im Durchschnitt um 2fach höher in transitionalen als meningotheliomatösen Meningeomen. D.h., anhand dieser Daten könnte man folgern, dass sich die PLGF Expression invers zu der VEGF Expression verhält. Allerdings sollte die PLGF Konzentration dann in fibrillären höher als in transitionalen Meningeomen liegen. Da tatsächlich aber die gemessene PLGF Expression in transitionalen Meningeomen niedriger war, ist diese Hypothese zu verwerfen und anzunehmen, dass die PLGF Expression in keinem Zusammenhang mit den geprüften Meningeomvarianten steht.

Die HGF/SF und bFGF Expression variierte nicht zwischen den verschiedenen Meningeomvarianten. Offensichtlich unterscheiden sich diese Varianten in ihrem biologischen Verhalten nicht bezüglich dieser zwei Wachstumsfaktoren.

Die Zahl der untersuchten angiomatösen (n=3) und mikrozystischen (n=1) Meningeome ist zu klein, um statistische Aussagen zu treffen. Allerdings wäre bei den angiomatösen Meningeomen aufgrund der großen Zahl intratumoraler Gefäße eine überdurchschnittlich hohe Expression der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF zu vermuten gewesen. Tatsächlich aber zeigte keiner dieser Faktoren solch ein Expressionsmuster. Als Konsequenz dieser Daten könnte man zum einen folgern, das angiomatöse Meningeome nicht durch diese untersuchten Wachstumsfaktoren ihre charakteristischen Eigenschaften erhalten. Zum anderen könnte man u.a. von dieser Beobachtung ableiten, dass VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF grundsätzlich keine wesentliche Bedeutung für die Gefäßneubildung in niedriggradigen Meningeomen haben. Allerdings müssten deutlich mehr angiomatöse Meningeome untersucht werden, um hier sichere Aussagen treffen zu können.

4.1.3 Intratumorale Gefäße und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression

Die Gefäßdichte variiert nicht wesentlich zwischen Meningeomen WHO Grad I vom meningotheliomatösen, transitionalen und fibrillären Typ sowie atypischen und anaplastischen Meningeomen. Eine deutlich höhere Dichte an Gefäßen weisen lediglich - und erwartungsgemäß - die wenigen untersuchten angiomatösen Meningeome auf. Das eine untersuchte mikrozystische Meningeom WHO Grad I wies die höchste Gefäßdichte aller Tumoren auf. Wenngleich angiomatöse Meningeome eigentlich mehr Gefäße als mikrozystische Meningeome haben, so ist eine hohe Vaskularisation von letzterer Meningeomvariante nicht ungewöhnlich und beschrieben (Kleihues und Cavenee 2000).

Versucht man eine Verbindung zwischen der Anzahl kleinerer intratumoraler Gefäße und der VEGF, PLGF, HGF/SF oder bFGF Konzentration zu finden, so fällt auf, dass die Tumorgruppen, welche sich durch eine differente VEGF Expression auszeichnen (WHO Grad I zu WHO Grad III, fibrillären zu meningotheliomatösen Meningeome) keine entsprechendes Korrelat auf der Ebene der Gefäßdichte zeigen. Gerade aber dieses wäre zu erwarten gewesen (Takahashi et al. 1997). Als eine Interpretationen ist denkbar, dass offenbar die Angioneogenese in Meningeomen durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Faktoren reguliert wird. Der Versuch, eine direkte Verbindung zwischen einem Wachstumsfaktor und dem Parameter der Gefäßdichte herzustellen, ist für diese Tumorentität wahrscheinlich zu sehr simplifizierend und wird den biologischen Gegebenheiten nicht hinreichend gerecht.

4.1.4 Proliferationsrate und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression

Die ausgezählten Proliferationsraten für die verschiedenen Meningeomevarianten zeigen eine Zunahme der Proliferationsaktivität von Meningeomen WHO Grad I (5,71% ± 3,73) über Meningeome WHO Grad II (10,85% ± 4,10) zu Meningeomen WHO Grad III (15,06% ± 12,64). Dieses entspricht der biologischen Eigenschaft sich schneller teilender maligner Tumorzellen und korrespondiert mit publizierten Daten. In einer größeren Studie wurde ein Mib1-Index von 4% bei Meningeomen WHO Grad I, 7% bei Meningeome WHO Grad II und 15% bei Meningeomen WHO Grad III beschrieben (Maier 1997). Eine andere Studie berichtete von einer Proliferationsrate von 1% bei benignen und einer Rate von 20% bei anaplastischen Meningeomen (Roggendorf et al. 1987). In einer dritten Studie fand sich ein Mib1-Index von 2% in atypischen und 12% in anaplastischen Meningeomen (Prayson 1996). Diese hohe Variabilität der publizierten Proliferationsraten zeigt, dass es zum einen große Unterschiede in den immunhistochemischen Techniken zwischen den verschiedenen Laboratorien und zum anderen große Differenzen in der Interpretation der positiven Kerne seitens der evaluierenden Neuropathologen gibt (Abb. 4.1). Aus diesem Grund wurde seitens der WHO auch die Mitosezahl und nicht die Proliferationsrate als Graduierungskriterium definiert (Kleihues und Cavenee 2000). Da das Ziel der hier vorliegenden Studie jedoch nicht war, Proliferationsraten zwischen dieser und anderen Studien zu vergleichen, sondern lediglich intern zwischen den untersuchten Tumorgruppen Vergleiche herzustellen, ist dieser Parameter zur Evaluation der Teilungsaktivität der Tumorzellen problemfrei verwendbar.

Da sich eine deutlich höhere VEGF Expression bei den höher malignen Meningeomen als bei den benignen Meningeomen fand und ebenfalls eine höhere Proliferationsrate diese Tumorvarianten unterschied, ergab sich erwartungsgemäß ebenfalls die Tendenz einer schwache Assoziation, wenngleich keine Signifikanz, zwischen der VEGF Konzentration und dem Mib1-Index. Die anderen Wachstumsfaktoren PLGF, HGF/SF und bFGF wiesen dagegen keine Verbindung mit der ermittelten Proliferationsrate auf. Da die Konzentration dieser drei Faktoren auch keine Assoziation mit dem Tumorgrad zeigte, war eine fehlende Assoziation mit dem Mib1-Index zu erwarten.



Abbildung 4.1: Beispiel einer immunhistochemische Untersuchung mit Ki67 Antikörpern gegen das Mib1 Antigen. Es werden die Kerne der Zellen mit Antikörpern markiert, welche sich im Zellzyklus befinden. Man erkennt sowohl stark als auch schwach markierte Kerne.

4.1.5 Tumorinvasion und VEGF, PLGF, HGF/SF, bFGF Expression

Eine erhöhte Expression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren sollte bei invasiven Tumoren erwartet werden, da der Prozess der Infiltration die komplette neue Generation eines Gefäßnetzes erfordert. Es fand sich allerdings keine Assoziation zwischen der Konzentration der Wachstumsfaktoren VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF und dem Parameter der Tumorinvasion in durale Sinus, Schädelbasisstrukturen oder Knochen.

Der Parameter der Tumorinfiltration wurde generiert aus der subjektiven Einschätzung des Operateurs. Da eine Vielzahl verschiedener Neurochirurgen mit unterschiedlichem Erfahrungshorizont die hier untersuchten Meningeome resizierte, unterliegt dieser Wert einer deutlichen intersubjektiven Variabilität und mag einer der Gründe sein, dass keine Assoziation mit der gemessenen Konzentration der Wachstumsfaktoren gefunden wurde.

Im Gegensatz zur Invasion von Meningeomen in durale Sinus, Schädelbasisstrukturen oder Knochen, welche oft auch bei WHO Grad I Tumoren gesehen wird und keinen prognostischen Wert hat (Kleihues und Cavenee 2000), ist die Invasion in das ZNS Parenchym mit einer schlechteren Prognose verbunden (Perry 1997). Da allerdings keines der untersuchten 69 Meningeome laut makroskopischem und histologischen Befund eine Invasion in angrenzendes Hirngewebe zeigte, konnte keine Stellung bezogen werden hinsichtlich eines möglichen Zusammenhanges mit der Expression der vier Wachstumsfaktoren.
4.1.6 In-vitro Modell der endothelialen Chemotaxis

In dem verwendeten Chemotaxis Modell erwiesen sich 14 der 27 Proteinextrakte aus Meningeomen als Induktor für Endothelzellen zur Migration. Diese Migration-induzierenden Extrakte waren die mit der erhöhten VEGF Konzentration. Da sich in den Proteinhomogenisaten eine Vielzahl potentiell angiogenetischer Moleküle befinden kann, ist eine spezifische Ausschaltung der zu prüfenden Wachstumsfaktoren erforderlich, um deren Bedeutung für die Endothelmigration nachzuweisen. Um dieses zu erreichen, wurden in einer weiteren Versuchsserie Anti-VEGF, Anti-HGF/SF und Anti-bFGF Antikörper zu den Proteinextrakten hinzugegeben.

Die selektive Ausschaltung von bFGF in den Proteinextrakten durch Anti-bFGF Antikörper zeigte den deutlichsten Effekt. In mehreren Fällen erfolgte nahezu keine endotheliale Migration und die durchschnittliche Inhibition lag bei 85%. Da allerdings kein Zusammenhang zwischen der bFGF Konzentration und dem Grad der Vaskularisation gefunden wurde, stellt sich die Frage, ob man bei diesem Befund von einer funktionellen Bedeutung von bFGF hinsichtlich der Angioneogenese bei Meningeomen *in-vivo* ausgehen kann. Die Applikation des Anti-VEGF Antikörpers bewirkte nur bei einem Proteinextrakt die kompletten Hemmung der Migration und führte nur zu einer durchschnittlichen Inhibition von 13% in allen Extrakten. Die Anwendung von Anti-HGF/SF Antikörper zeigte keine oder nur unbedeutende Effekte. Diese Daten im Kontext der fehlenden Assoziation zwischen den Wachstumsfaktor-Konzentration und der Gefäßdichte untermauern die Hypothese, dass in Meningeomen ein einzelner Wachstumsfaktor isoliert betrachtet für die Angioneogenese eher unbedeutend ist.

4.1.7 *In-vitro* Modell der Kapillar-Äquivalentbildung

In dem zweiten *in-vitro* Modell zur Evaluation der angioneogenen Wachstumsfaktoren VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF wurde versucht, die Wirkung der Meningeom-Proteinextrakte auf die Fähigkeit von Kapillarzellen vom Rind zur Bildung von Kapillar-Äquivalenten zu untersuchen. Auch hier wurde eine selektive Inhibition durch Anti-VEGF, Anti-HGF/SF und Anti-bFGF Antikörper getestet.

Da alle untersuchten Tumorextrakte zur Bildung von kapillarähnlichen Strukturen führten, muss eine induzierende Wirkung durch die Faktoren im Extrakt angenommen werden, da ohne Proteinextrakt-Applikation nahezu keine Kapillar-Äquivalent Bildung nachweisbar war. Es fand sich aber keine signifikante Assoziation zwischen dem Ausmaß der Kapillar-Äquivalent Bildung und Faktoren wie der VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF Konzentration, Tumorgrad, Gefäßdichte oder Proliferationsrate. Zwar bewirkte v.a. die Applikation von AntibFGF, weniger von Anti-VEGF und noch weniger von Anti-HGF/SF eine Inhibition der Bildung von Kapillar-Äquivalenten in den meisten Extrakten. Doch war dieses statistisch nicht signifikant, zumal in wenigen Extrakten auch eine induzierende Wirkung beobachtet werden konnte. Auch hier wurde somit die o.g. Hypothese bestärkt, dass ein einzelnder Wachstumsfaktor unbedeutend ist.

4.2 Technische Diskussion

4.2.1 Limitationen der verwendeten Expressionsbestimmung

Es gibt verschiedene technische Möglichkeiten, Wachstumsfaktoren zu bestimmen. So gibt es den direkten Nachweis des Proteins mittels mono- oder polyklonaler Antikörper. Hier könnte man zum einen immunhistochemisch versuchen, die Zielzellen z.B. in Paraffinfixiertem Gewebe mittels Antikörper zu markieren. Diese Methodik ermöglicht jedoch keine Quantifizierung des nachgewiesenen Proteins. Zum anderen bieten sich Techniken wie z.B. der Western-Blot oder ein ELISA Assay an, welcher in diesem Projekt auch Verwendung fand. Diese Techniken ermöglichen auch quantitative Aussagen.

Als Alternative bei Mangel geeigneter Antikörper kann man versuchen, die mRNA des Zielproteins nachzuweisen. Auch hier kann man z.B. mittels der *In-Situ* Hybridisierung oder der *In-Situ* PCR auf einem Gewebeschnitt das mRNA Zielmolekül visualisieren, ohne eine quantitative Aussage zu erhalten. Alternativ könnte man versuchen, mittels eines Northern-Blots oder einer RT-PCR die Menge vorhandener mRNA nachzuweisen. Allerdings sind sämtliche mRNA-basierten Methoden nur indirekte Nachweisverfahren und nur zu oft wurde im Kontext von cDNA Microarrays beschrieben, dass die mRNA Menge nicht mit der des entsprechenden Proteins korrespondiert (Hegde et al. 2000).

Der fundamentale Nachteil von Methoden, welche einen Zielmolekülnachweis an Gewebeschnitten ermöglichen, besteht in der unzulänglichen Quantifizierbarkeit. Aufgrund der Zielsetzung dieser Studie schieden somit diese Techniken für eine Verwendung aus.

Der grundsätzliche Nachteil der Verwendung von Homogenisaten liegt in der fehlenden zellulären Zuordnung der Resultate begründet: So ist es nicht möglich eine Aussage zu treffen, ob z.B. die Tumorzellen das Zielmolekül exprimieren, oder ob allein oder auch nur z.T. kontaminierende Zellen wie z.B. Endothelien, miterfasstes ortsständiges Gewebe oder Zellen des Immunsystems das Zielmolekül exprimieren. So wurde in einer Studie beobachtet, das entgegen der Erwartung nicht die Meningeomzellen, sondern die Endothelzellen sich als VEGF positiv erwiesen (Christov et al. 1999). Allerdings waren die Resultate dieser Studie zum Zeitpunkt der praktischen Umsetzung dieser Dissertationsarbeit nicht bekannt. Eine morphologische Zuordnung des Exprimates von VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF mittels einer immunhistochemischen Untersuchung könnte in einer späteren Studien erfolgen.

Ein weiterer Grund, welcher zur Verwendung der ELISA Methodik führte, war die bereits erfolgreiche Etablierung der Technik im Labor für Hirntumorbiologie.

Methode	Material	Ziel	Vorteil	Nachteil
Immunhistochemie	Gewebe	Protein	 Morphologische Zu- ordnung 	 Keine Quantifizie- rung
In-Situ Hybridisierung	Gewebe	mRNA	 Morphologische Zu- ordnung 	 Schwere Etablierung unsichere Quantifizierung RNA:Protein Verhältnis nicht immer identisch
In-Situ PCR	Gewebe	mRNA	Morphologische Zu- ordnung	 Schwere Etablierung unsichere Quantifizierung
Western-Blot	Homogenisat	Protein	 Quantifizierung allgemein etablierte Technik 	 abhängig von Selek- tivität Antikörper
ELISA	Homogenisat	Protein	 Quantifizierung keine Radioaktivität	 abhängig von Selek- tivität Antikörper Kreuzreaktionen An- tikörper
Northern-Blot	Homogenisat	mRNA	Quantifizierung	 Viel mRNA erforder- lich indirekte Daten
RT-PCR	Homogenisat	mRNA	 Schnelle Etablierung geringe Menge mRNA erforderlich 	 unsichere Quantifi- zierung indirekte Daten

 Tabelle 4.1: Beispiele verschiedener Nachweistechniken für Wachstumsfaktoren

4.2.2 Mitose- und Proliferationsrate in Meningeomen

Verschiedene technische Schwierigkeiten der Evaluation der Mitose- und Proliferationsrate wurden bereits im Kapitel 4.1.4 abgehandelt. Die Mitoserate beschreibt die Zahl der lichtmikroskopisch gezählten Mitosen in 10 HPF ("high power fiels", 1 HPF = sichtbarer Bereich bei Verwendung eines 40x Objektivs, 0,16 mm²). Die Zählung der Mitosen bietet den Vorteil, dass kein zusätzlicher Bearbeitungsschritt wie z.B. eine immunhistochemische Prozessierung eine Variabilität der Originalbefunde verursachen kann. Allerdings erfordert die Zählung von Mitosen eine gewisse morphologische Erfahrung und sollte nicht von Anfängern durchgeführt werden. Zudem können Tumore mit z.T. chromatindichten Kernen eine sichere Differenzierung erschweren. Gerade Meningeome bereiten diesbezüglich oft Probleme in der Routinediagnostik. Weiterhin berücksichtigt die Mitoserate nicht die Zellularität des Tumors.

Als Alternative bieten sich immunhistochemisch detektierbare Epitope wie Ki67 oder PCNA an, welche von mitotisch aktiven Zellen exprimiert werden. Die Proliferationsrate ist definiert als die Zahl der Zellkerne in Prozent, bei welchen Mib1-Antikörper an das Ki67Antigen gebunden haben. Ein großes Problem der Evaluation ist die Variabilität der Markierungsintensität. So nimmt die Markierungsintensität in früh- und spätmitotischen Kernen ab. In Kombination mit den Labor-spezifischen Färbungsintensitäten können solche Kerne teils als positiv, teils als negativ erscheinen (Abb. 4.1). Somit entsteht eine z.T. hohe Variabilität der Auswertung der Proliferationsrate (Torp 1997), welche gerade auch bei Meningeomen große Differenzen der publizierten Mib1 Indices zur Folge hat (s.o.). Ein weiteres selektiv in mitotisch aktiven Zellen exprimiertes Epitop ist das "Proliferating cell nuclear antigen" (PCNA), das in vielen Tumorstudien Verwendung fand. Allerdings ist die Rate heterogener Markierungsintensitäten bei PCNA höher als beim Ki67-Antigen (Hepburn et al. 1995).

4.2.3 Histologische Bestimmung der Gefäßzahl

Die Zahl an Gefäßen in einem räumlich definierten Areal kann man sowohl lichtmikroskopisch als auch immunhistochemisch evaluieren. Der Vorteil der immunhistochemischen Markierung liegt u.a. in der sehr deutlichen Visualisierung (Abb. 4.2).

Bei der Auszählung von Gefäßen ist zu bedenken, dass man eine Reduktion einer räumlichen Gefäßarchitektur auf eine zweidimensionale Ebene vornimmt. So kann es in dem einen Fall sein, das ein Gefäß über eine längere Distanz in der Schnittebene erfasst ist (Abb. 4.2, links), oder sich (mutmaßlich) durch die Schnittebene "schlängelt" (Abb. 4.2, rechts unten).

Somit würden die verschiedenen Anschnitte des gleichen Gefäßes als mehrere Gefäße gezählt, ohne dass tatsächlich das jeweilige Tumorgewebe stärker vaskularisiert ist. Ein verfälschender Faktor besteht auch im Prozess des Materialzuschnittes: Wenn ein operativ resiziertes Gewebestück unter Spannung eingebettet wird, dann ereignet sich oft ein Auseinanderziehen der Gefäße mit Anordnung in einer Ebene. Somit würde die Zahl der gemessenen Gefäße artifiziell reduziert.

Da eine retrospektive Beurteilung der jeweiligen Materialprozessierung nicht möglich ist, wurde in dieser Studie eine für alle Tumore identische Materialaufarbeitung postuliert.





Abbildung 4.2: Immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen das von Willebrandt-Faktor Epitop. Es werden Endothelzellen markiert. Wie zu erkennen, so finden sich eine Vielzahl größerer und kleinerer Gefäße in Meningeomen.

4.2.4 Vor- und Nachteile der Bestimmung der endothelialen Chemotaxis

Die *in-vitro* Bestimmung der chemotaktischen Aktivität von mikrovaskulären Endothelzellen korrespondiert im Allgemeinen gut mit der angiogenetischen Aktivität *in-vivo* und gilt als etabliertes Modell (Folkman und Klagsbrun 1987; Zetter 1987). Da dieses Technik erfolgreich in einer Angioneogenese Studie im gleichen Labor an Gliomen verschiedener Graduierung angewendet wurde (Schmidt 1999), ist davon auszugehen, dass es keine wesentlichen methodischen Probleme bei ihrer Anwendung an Meningeomen gegeben hat. So konnte in dieser Gliomstudie auch gezeigt werden, das die biologische Aktivität von VEGF, bFGF und HGF/SF durch die Proteinextraktion nicht verändert wurde (Schmidt 1999).

In der hier vorgelegten Arbeit wurden keine wesentlichen Änderungen im Extraktionsprotokoll vorgenommen, so dass auch diese mögliche technisch-verfälschende Komponente ausgeschlossen werden kann.

4.2.5 Bestimmung der Kapillar-Äquivalentbildung

Die *in-vitro* Kapillar-Äquivalentbildung zur Bestimmung der angiogenen Aktivität von Proteinextrakten und einzelnen Wachstumsfaktoren ist ein funktionales Modell höherer Komplexität als die Evaluation der endothelialen Chemotaxis. Dieses *in-vitro* Modell wurde ebenfalls in der oben bereits genannten Gliom-Angioneogenese Studie im gleichen Labor erfolgreich angewendet und wurde unmodifiziert zur Evaluation der Angioneogenese von Meningeomen verwendet.

Somit sollten auch bei diesem funktionalen Assay weniger technische Aspekte als biologische Charakteristika der verschiedenen Hirntumore (Gliome vs. Meningeome) zur Erklärung der Differenzen der Resultate diskutiert werden.

4.3 Konsequenzen

4.3.1 VEGF Resultate im Kontext der wissenschaftlichen Literatur

4.3.1.1 VEGF und Meningeome in der Literatur

Ein der wichtigsten Beobachtungen der vorliegenden Arbeit ist es aufzeigen zu können, dass die VEGF Konzentration mit dem Malignitätsgrad ansteigt. Zwei andere Studien können keinen solchen Zusammenhang dokumentieren (Samoto 1995; Pietsch 1997). In der älteren der Studien wurden 12 Meningeome WHO Grad I, 6 atypische Meningeome und 5 anaplastische Meningeome immunhistochemisch semiquantitativ betrachtet, indem die Markierungsintensität und die Zahl der positiven Tumorzellen subjektiv von zwei Beobachtern evaluiert und in vier Gruppen ("-", "+", "++", "+++") eingeteilt wurde. Die Zahl VEGF-negativer Meningeome stieg, die der VEGF-stark-positiven Tumore sank bei zunehmendem Malignisierungsgrad. Verschiedene Gründen können die Diskrepanz der hier vorgestellten Daten mit denen dieser 1997 publizierten Studie erklären. Zum einen wurden die Schnitte dort subjektiv semiguantitativ evaluiert, in der hier vorliegenden Arbeit aber messtechnisch generiert. Letztere Methodik liefert im Allgemeinen validere Daten. Zum anderen erfasst ein zweidimensionaler Schnitt nur einen kleinen Aspekt des Tumors und es muss postuliert werden, dass diese Ebene repräsentativ für den gesamten Tumor ist. Bei der kleinen Zahl untersuchter höhergradiger Tumore würde jedoch bereits eine kleine Zahl nicht repräsentativer Schnitte die Statistik deutlich verändern. Die hier angewendete Methodik einer Proteinextraktion aus einem drei-dimensionalen Tumorblock sollte hingegen zuverlässiger sein, da es kein Repräsentanzproblem gibt. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine quantitative VEGF Bestimmung insgesamt deutlich niedrigere Konzentrationen bei Meningeomen im Vergleich zu astrozytären Tumoren ergab (Schmidt 1999). Eine zweite Arbeit evaluierte die VEGF mRNA Konzentration aus einem Tumorhomogenisat und zeigte ebenfalls keine VEGF Zunahme bei höheren Meningeom Graden (Samoto 1995). Allerdings wurden nur 13 Meningeome WHO Grad I mit 3 Meningeomen WHO Grad III verglichen, so dass der Schwachpunkt dieser Studie in der zu geringen Fallzahl liegt. Andererseits wurde in vielen Arbeiten gezeigt, dass malignere Tumore aufgrund ihres erhöhten metabolischen Verhaltens in der Tat eine stärkere VEGF-abhängige Vaskularisation erzwingen und somit die beobachtete Zunahme der VEGF Konzentration in höhergradigen Meningeomen zu erwarten ist.

4.3.1.2 VEGF und Gefäßdichte in der Literatur

In der hier vorliegenden Arbeit fand sich kein Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der VEGF Konzentration. Zu einem vergleichbaren Resultat kam eine vorherige Studie, welche CD34-spezifische Antikörper verwendete (Pietsch 1997). Hingegen wurde ein solcher Zusammenhang in einer anderen Publikation beschrieben. Die Experimentatoren der Studie zählten von Willebrand-Faktor-markierte Gefäße und kamen zu dem Ergebnis, dass v.a. die Zahl kleiner Gefäße mit zunehmender VEGF Menge ansteigt (Samoto 1995). Allerdings wurden in der Studie weniger Meningeome als in der vorliegenden Arbeit analysiert (16 Meningeome) (Samoto 1995). Somit könnten die Abweichung auch auf einen "Sampling Error" (Stichprobenfehler) zurückgeführt werden. Da in der hier präsentierten Arbeit die spezifische Gefäßarchitektur nicht weiter differenziert wurde, mag dieses die Abweichung zu dieser Studie erklären. Insgesamt ergibt sich aus den publizierten Daten ein heterogenes Bild, welches eine sichere Schlussfolgerung, ob der Grad der VEGF Expression die Gefäßdichte determiniert, nicht abschließend klären lässt.

4.3.1.3 VEGF und WHO Grad I Meningeomvarianten in der Literatur

Eine weitere wichtige Beobachtung dieser Studie liegt in der Demonstration, dass meningotheliomatöse Meningeome mehr VEGF exprimieren als transitionale Meningeome und dass fibrilläre Meningeome diesbezüglich am untersten Ende der Skala liegen. Ein vergleichbares Muster wurde zuvor auch schon für die VEGF Expression zwischen meningotheliomatösen und transitionalen Meningeomen beschrieben (Goldman 1997). Abweichend zu dieser Beobachtung wurde eine Studie publiziert, die keine Korrelation zur Meningeomvariante zeigte (Provias 1997). Diese Arbeit beschrieb jedoch weitgehend nur transitionale Meningeome, so dass deren Aussagewert hinsichtlich dieser Fragestellung als gering anzusehen sein sollte (Provias 1997). Die Studie bezog sich hinsichtlich der VEGF Quantifizierung auf eine immunhistochemische Evaluation mit o.g. Problemen. Somit ist gegenwärtig eher davon auszugehen, dass in der Tat die WHO Grad I Subvarianten von Meningeomen unterschiedliche VEGF Expression zeigen.

4.3.2 PLGF im Kontext der Literatur

Eine Expression von PLGF wurde in allen untersuchten Meningeomen beobachtet. Allerdings fand sich keine Korrelation zwischen der PLGF Konzentration und anderen evaluierten Parametern. Nur wenige publizierte Daten liegen zu PLGF und Meningeomen vor. So wurde in einer Serie von nur zwei Meningeomen eine hohe Konzentration der PLGF mRNA mittels Northern Blotting ermittelt (Weindel et al. 1994). In einer anderen Serie von drei Meningeomen wurde hingegen keine PLGF Expression mittels *In-situ* Hybridisierung festgestellt (Hatva 1995). Zusammengefasst ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt davon auszugehen, das PLGF zwar von Meningeomen gebildet wird, es aber keine wesentliche Rolle bei der Angioneogenese spielt.

4.3.3 HGF/SF im Kontext der Literatur

Es ist bekannt, dass Meningeome sowohl HGF/SF als auch den korresponiderenden Rezeptor Met exprimieren (Di Renzo et al. 1991; Moriyama et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Konzentration von HGF/SF und dem Malignitätsgrad, dem Vaskularisierunggrad oder der Invasivität des Meningeoms aufgezeigt werden. Letzteres wäre zu erwarten gewesen, da HGF/SF bei anderen Tumorentitäten als Faktor identifiziert wurde, der die Invasivität beeinflusst (Rosen 1994). Da auch in den durchgeführten funktionellen Assays keine signifikanten Daten erhoben werden konnten, ist eher davon auszugehen, dass HGF/SF keine wesentliche Bedeutung bezüglich der Angioneogenese in Meningeomen hat. Ob allerdings HGF/SF und der Rezeptor Met über autokrine Mechanismen andere Tumoreigenschaften beeinflussen, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden.

4.3.4 bFGF im Kontext der Literatur

Nur eine publizierte Studie ist hinsichtlich des Wachstumsfaktors bFGF in Meningeomen durchgeführt worden. In dieser ersten Arbeit zu diesem Thema wurde ausschließlich demonstriert, dass in allen vier untersuchten Meningeomen bFGF exprimiert wurde (Akutsu 1991). Insgesamt scheint bFGF in einer Basiskonzentration zur Angioneogenese notwendig zu sein. Diese Aussage stützt sich auf die erfolgreiche Inhibition der Endothelzellmigration bzw. der Bildung kapillarähnlicher Strukturen in den *in-vitro* Experimenten mittels spezifischer Antikörper (s.o.).

4.3.5 Hypothesen zum Malignisierungsgrad und der Angiogenese

Im Gegensatz zu den untersuchten Wachstumsfaktoren PLGF, HGF/SF und bFGF fand sich in der hier vorliegenden Studie hinsichtlich VEGF eine signifikante Zunahme von Meningeomen WHO Grad I über Meningeome WHO Grad II zu Meningeomen WHO Grad III. Allerdings fand sich weder ein Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen VEGF Konzentration und der Gefäßdichte noch zwischen der Gefäßdichte und Tumorgrad.

In einer dieser Studie vorangegangenen Arbeit an Gliomen konnte hingegen eine Zunahme von VEGF und HGF/SF von niedrig- zu hoch-gradigen Tumoren beobachtet werden, die zudem mit der Gefäßdichte korrelierte (Schmidt 1999).

Verschiedene Konsequenzen ergeben sich hinsichtlich der Meningeome. So erscheint die bereits in niedriggradigen Meningeomen präformierte Gefäßarchitektur suffizient genug, auch schnell wachsende höhergradige Meningeome zu versorgen, so dass diese keine zusätzlichen neu gebildeten Gefäße oder eine stärkere Vaskularisierung benötigen. Diese Beobachtung bildet sich auch in der gegenwärtigen histopathologischen Klassifikation von Meningeomen ab, in der die Gefäßarchitektur im Gegensatz zu Gliomen kein Graduierungskriterium ist (Kleihues und Cavenee 2000).

Eine andere Hypothese bietet sich als Erklärung an, um den offensichtlichen Widerspruch zwischen einer Tumorgrad-abhängigen Zunahme an VEGF ohne gleichzeitige Zunahme der Gefäßdichte zu verstehen: könnte es sein, dass die VEGF Rezeptoren FLT1 (VEGFR1) und/oder KDR/FLK1 (VEGFR2) nicht nur von Endothelien, sondern auch von Tumorzellen exprimiert werden? In Melanomen, AML, Thyroid- und Larnyx-/Pharynx-Karzinomen wurde eine Tumorzell-spezifische Expression dieser Tyrosinkinase Rezeptoren beobachtet (Fiedler et al. 1997; Herold-Mende et al. 1999) und eine funktionelle Stimulation der Tumorzellen auf VEGF Applikation nachgewiesen (Fiedler 1997; Herold-Mende 1999). Somit stellt sich die Frage, ob es nicht in Meningeomen para- und autokrine Schleifen gibt, welche die Tumorzellen selber in ihrer Proliferationsaktivität stimulieren. Das VEGF-Rezeptor System selber würde eine solche Proliferations-Stimulation über Aktivierung des Ras-, Akt- und PKC Pathways suffizient erklären (Abb. 7).

Einige Studien konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen VEGF Konzentration und dem perifokalen Ödem bei Meningeomen besteht (Zang 1982; Kalkanis 1996; Goldman 1997; Provias 1997; Yoshioka 1999). Somit wird angenommen, dass VEGF v.a. bei der Steigerung der Gefäßpermeabilität eine entscheidende Rolle spielt. Hieraus ließe sich die Hypothese ableiten, dass dieses schon ausreicht, um auch höhergradige Meningeome suffizient zu versogen, ohne dass eine Gefäßneubildung notwendig wäre.

4.3.6 Histologische Varianten im Kontext der Angiogenese

Zu den auffälligsten Befunden der hier präsentierten Studie zählt die signifikante Differenz in der VEGF Expression zwischen den häufigsten Meningeom WHO Grad I Subvarianten. Die VEGF Konzentration lag im Vergleich von fibrillären zu transitionale Meningeomen im Durchschnitt in letzteren um 5fach höher, im Vergleich von fibrillären zu meningotheliomatösen Meningeomen in letzteren um 10fach höher.

Aus diesem resultiert nun die Frage, welche Aussagen über v.a. fibrilläre und meningotheliomatösen Meningeome abgeleitet werden können und, letztendlich, wie dieses in einen Zusammenhang mit den beobachteten Befunden dieser Studie gestellt werden kann. Verschiedene Aspekte sollten im Folgenden beleuchtet werden.

4.3.6.1 Anatomischer Aufbau und Funktion der Arachnoidea

Die Arachnoidea wird unterteilt in eine parietale Archnoidea und in die Schicht der leptomeningialen arachnoidalen Trabeculae. Die parietale Archnoidea besteht aus einer Deckzellschicht polygonaler, eng zueinander angeordneter epitheloider Zellen, welche der Dura anliegen. Zwischen den Zellen finden sich Tight junctions, die Zonula occludens, welche eine parazelluläre Diffusionsbarriere für Liquor ausbilden. Unterhalb der parietale Archnoidea befindet sich ein lockeres trabeculäres Gewebe, welches den subarachnoidalen Liquorraum ausbildet und bis zur Pia mater reicht. Hier finden sich mesenchymal-artige, spindelförmige Zellen und ein ausgeprägtes Netzwerk an Kollagenfasern (Abb. 4.3 und 4.4). Innerhalb dieses trabeculären Raums befinden sich die Arterien und Venen des Subarachnoidalraums. Im Gegensatz zur Deckzellschicht finden sich hier v.a. Desomosomen und Gap junctions zwischen den Zellen (Armstrong 2000).



Abbildung 4.3: Normale Leptomeningen. Man erkennt eine abgrenzende obere Deckzellschicht (a) und eine wesentlich dickere Schicht aus lockerem Gewebe, welche den Subarachnoidalraum bildet (b). Interessant ist der morphologische Vergleich zwischen der Deckzellschicht und einem meningotheliomatösen Meningeom (Abb. 1.5) und der lockeren Gewebeschicht und einem fibrillären Meningeom (Abb. 1.6)

Die Funktion der arachnoidalen Granulationen, die sog. Paccionischen Granulationen, besteht in der Liquorresorption in die venösen Sinus der Dura. In ihrem Zentrum bestehen die Granulationen aus einem lockeren trabeculären Geflecht, ähnlich dem des subarachnoidalen Raums. Das Zentrum wird von der Deckzellschicht ausgekleidet, die selber unmittelbar an die venösen Sinus grenzt. Diese arachnoidalen Deckzellen bildet fokal Wirbel und Psammomkörper aus. Experimente an Primaten lassen den Schluss zu, dass der Liquor mittels kleiner Kanäle und großer Vakuolen durch die Deckzellschicht an die venösen Sinus gelangt. Somit ist es die Deckzellschicht, und nicht die trabeculäre Schicht, welche in direkter funktioneller Wechselwirkung zu Gefäßen steht (Armstrong 2000).

4.3.6.2 Morphologie - Arachnoidea und Meningeom Subvarianten

Die häufigsten Meningeome WHO Grad I sind die fibrillären und meningotheliomatösen Meningeome sowie die transitionalen Meningeome, welche histologische Komponenten beider anderen Subvarianten zeigen (Kleihues und Cavenee 2000). Diese beiden häufigsten Subgruppen zeigen in ihrem morphologischen Erscheinungsbild deutliche Überschneidungen mit den beiden Hauptkomponenten der Arachnoidea.



Abbildung 4.4: Modell für den Aufbau der Pachymeninx. Die Meningen setzen sich zusammen aus der oberflächlichen Dura mater (ϵ), der Arachnoidea (γ) und der Pia mater (β), welche dem Kortex (α) anliegt. Die Arachnoidea selber besteht aus zwei Kompartimenten. Zum einen bilden locker angeordnete, zumeist spindelförmig ausgerichtete Zellen den von Liquor durchströmten Subarachnoidalraum (γ), durch welchen kleinere und größere arterielle und venöse Gefäße ziehen. Die Gefäße ziehen z.T. in Form des Virchow-Robin'schen Raum (π) zusammen mit locker angeordneten Arachnoidalkomponenten in den Kortex ein. Zum anderen ist Teil der Arachnoidea eine arachnoidale Deckzellschicht (δ), welche sowohl eine abdichtende Funktion hat, als auch selber Paccionische Granulationen (μ) ausbildet und damit selber unmittelbar an der Liquoresorption an den direkt angrenzenden Venen beteiligt ist. Vergleiche hierzu auch Abb. 4.3.

So ähneln die fibrillären Meningeome in ihrer in Strängen und Zügen ausgerichteten spindelzelligen Tumorzellarchitektur der mesenchymal-artigen, trabeculären, den Liquorraumformenden Arachnoidalkomponente (Abb. 1.6 und Abb. 4.3b). Meningotheliomatöse Meningeome (und ebenso die sekretorischen Meningeome) ähneln der arachnoidalen Deckzellschicht polygonaler, eng zueinander angeordneter epitheloider Zellen (Abb. 4.3a und Abb. 1.5), welche fokal sogar Wirbel und Psammomkörper ausbilden (Graham und Lantos 1997). Aufgrund dieser morphologischen Überschneidungen wurde schon früh der Verdacht geäußert, dass diese beiden häufigsten WHO Grad I Subvarianten in einem entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang zu den beiden arachnoidalen Komponenten stehen (Kepes 1986).

4.3.6.3 Molekulargenetische Differenzen zwischen Subvarianten

Auch molekulargenetische Daten deuten darauf hin, dass es sich bei fibrillären und meningotheliomatösen Meningeomen um verschiedene Subvarianten handelt. So konnte gezeigt werden, dass es NF siginifikant häufiger in fibrillären als in meningotheliomatösen Meningeomen gibt (Wellenreuther 1995).

4.3.6.4 Hypothese zur differenten VEGF Expression in Subgruppen

Es wurde dargelegt, dass es mindestens zwei arachnoidale Kompartimente mit unterschiedlichen Funktionen auch hinsichtlich der Interaktion mit Gefäßen gibt (siehe 4.3.6.1), dass es morphologische Überschneidungen zwischen diesen beiden Kompartimenten und fibrillären und meningotheliomatösen Meningeomen gibt (siehe 4.3.6.2) und dass es sich auf molekulargentischer Ebene um verschiedene Tumorvarianten handelt (siehe 4.3.6.3).

In der vorliegenden Studie (und auch in einer vorangegangenen Studie (Goldman 1997)) wurde eine signifikante VEGF Expressionsdifferenz zwischen fibrillären und meningotheliomatösen Meningeomen nachgewiesen. Allerdings fand sich kein sicherer funktioneller Hinweis, dass die VEGF Expressionsrate mit verschiedenen Gefäßeigenschaften der Tumore assoziiert ist (kein Zusammenhang zwischen VEGF und Zahl kleiner Gefäße, Tumorinfiltration, Kapillar-Äquivalentbildung). Somit kann aus diesem nun zusammenfassend die Hypothese formuliert werden, dass die VEGF Expressionsdifferenz zwischen fibrillären und meningotheliomatösen Meningeomen nicht Ausdruck einer funktionellen Bedeutung für die Meningeom Subvarianten, sondern ein entwicklungsgeschichtlicher Überrest ist, der das arachnoidale Ursprungskompartiment der jeweiligen Subvariante charakterisiert (Aurelius Antonius 180). Zur Validierung dieser Hypothese müssten nun in einem weiteren Schritt die beiden arachnoidalen Kompartimente bezüglich ihrer VEGF Expression und ihrer funktionellen Interaktion mit Gefäßen im physiologisch-anatomischen Kontext untersucht werden.

4.3.7 Therapeutische Implikationen

4.3.7.1 Grundsätzliche Überlegungen

Die bisher in der therapeutischen Routine verwendeten Optionen wie die operative Meningeomresektion und die Bestrahlung finden ihre Limitationen zum einen bei niedriggradigen Tumoren, deren Lokalisation eine komplette Resektion verbietet, zum anderen bei atypischen und anaplastischen Meningeomen, welche oft nicht suffizient behandelt werden können mittels der etablierten therapeutischen Optionen (siehe Kapitel 1.1.10). Aus diesem Grund besteht bei Meningeomen ein großes Bedürfnis alternativer Therapieoptionen.

Ein sehr vielversprechendes Konzept beruht auf der Idee, nicht die durch multiple Mutationen alterierten Tumorzellen, sondern die nicht-neoplastischen Endothelien innerhalb des Tumors zu inhibieren und somit das Tumorwachstum zu kontrollieren (Folkman 1972). Unterdessen wurden eine Vielzahl pro- und antiangene Faktoren identifiziert, welche auch in Tumoren die Gefäßarchitektur modulieren (Cherrington et al. 2000; Fons et al. 2000; Sela 2000). Das wichtigste System ist in jedoch das VEGF System (siehe Kapitel 1.2.2). Bei vielen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF in invasiven Tumoren mit dem Grad an Vaskularisierung und der Tumorproliferation korreliert und ein prognostischer Faktor ist (Takahashi 1997).

4.3.7.2 VEGF-System Inhibition und etablierte Chemotherapie

Basierend auf dem Konzept zweier Kompartments innerhalb eines Tumor (Tumorzellen und Gefäße) (Folkman 1996) sind unterdessen mehrere Substanzen, welche das VEGF-System inhibieren, in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika, welche die Tumorzellen treffen, erfolgreich in die klinische Routinetherapie eingegangen. Zudem ist eine Wechselwirkung beider therapeutischer Modalitäten zu erwarten, da eine Inhibition des VEGF-System mit einer allgemeinen Verbesserung der intratumoralen Gefäßarchitektur einher geht und somit die etablierten Chemotherapeutika auch besser die Tumorzellen erreichen können (Cherrington 2000; Fons 2000; Sela 2000). Erste Hinweise deuten allerdings darauf hin, dass z.B. Glioblastome nach Therapie mit einem Anti-VEGF Antikörper langsamer, dafür aber infiltrierender wachsen (Rubenstein et al. 2000).

4.3.7.3 VEGF-System Inhibition und Meningeome

Inhibitoren des VEGF-Systems bieten, wie oben dargelegt, interessante therapeutische Optionen bei einer Vielzahl maligner Tumore. Welche Aussagen über mögliche Erfolge der Applikation solcher Substanzen können anhand der in dieser Studie präsentierten Daten abgeleitet werden?

Die Rationale einer VEGF-basierten anti-angiogenetischen Therapie besteht in der Annehme, dass die Expression von VEGF in Tumoren mit dem Grad an Vaskularisierung und der Tumorproliferation korreliert und damit auch ein prognostischer Faktor ist (Takahashi 1997). Gerade diese Grundannahme erscheint jedoch aufgrund der hier präsentierten Daten als nicht gegeben – Meningeome sind mutmaßlich somit nicht besonders gut geeignet für eine Inhibition des VEGF-Systems.

5. Zusammenfassung

Meningeome sind Tumore der Hirnhäute, kommen in verschiedenen histologischen Varianten vor und werden entsprechend ihrem biologischen Verhalten in Meningeome WHO Grad I, atypische WHO Grad II und WHO Grad III Tumore eingeteilt. Therapeutisch werden Meningeome in erster Linie operativ angegangen. Optionale Versuche mit Chemotherapie und Bestrahlung zeigten nur unbefriedigende Resultate. Da eine komplette Tumorresektion oft nicht möglich ist, sind alternative Therapiekonzepte zwingend erforderlich. Dafür jedoch ist ein erweitertes Verständnis der Biologie dieser Tumore erforderlich.

Bei vielen Tumorentitäten wurden in letzter Zeit wesentliche Fortschritte im Verständnis der Angiogenese erreicht. Unmittelbar aus diesen Erkenntnissen wurden therapeutische Strategien abgeleitet, welche gegenwärtig klinisch geprüft werden. Auch Meningeome zeigen histologisch z.T. eine ausgeprägte Vaskularisierung und lassen somit erwarten, dass auch sie sensitiv auf Inhibitoren der Angioneogenese reagieren werden.

Zur grundsätzlichen Abklärung dieser Hypothese wurden 69 Meningeome (40 MI, 21 MII und 8 MIII) hinsichtlich der Expression der Angiogenesefaktoren VEGF, PLGF, HGF/SF und bFGF mittels ELISA untersucht, histologisch die Dichte kleiner Gefäße und die Proliferationsaktivität der Tumorzellen bestimmt und klinisch der Grad der Tumorinfiltration beurteilt. Zudem wurden in den Tumorextrakten die endotheliale Chemotaxis und die Bildung von Kapillar-Äquivalenten *in-vitro* untersucht.

Es wurde eine Korrelation zwischen WHO Grad und VEGF Konzentration sowie zwischen den histologischen Subvarianten "fibrillär", "transitional" und "meningotheliomatös" des WHO Grad I und der VEGF Konzentration beobachtet. Allerdings fand sich keine Verbindung zwischen der VEGF Konzentration und dem Ausmaß der Vaskularisierung und keine Verbindung zwischen dem Malignitätsgrad und der Vaskularisierung. PLGF, HGF/SF und bFGF hingegen zeigten keine Assoziationen mit den untersuchten Parametern. Die Extraktinduzierte endotheliale Chemotaxis und die Bildung von Kapillar-Äquivalenten wurde *in-vitro* am effektivsten durch Antikörper gegen bFGF, weniger durch Anti-VEGF Antikörper inhibiert. Anti-HGF/SF Antikörper zeigten keine Wirkung auf die beobachteten Parameter. Die chemotaktische Aktivität von Meningeom Extrakten korrelierte mit der Konzentration an VEGF.

Die Resultate zeigen, dass in Meningeomen die Angioneogenese nicht wesentlich über solche Mechanismen gesteuert wird, wie sie u.a. in Gliomen beschrieben wurden. Die generierten Daten lassen zunächst nicht erwarten, dass Meningeome sonderlich responsibel auf eine anti-angioneogenetische Therapie sind. Allerdings können eventuell Schlüsse hinsichtlich des Ausgangskompartment der verschiedenen Subvarianten des Meningeoms WHO Grad I von den hier präsentierten Daten abgeleitet werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung		
A. carotis	Arteria carotis		
Abb	Abbildung		
AGM-1470	Name eines Angiogeneseinhibitors		
AK	Antikörper		
Akt	Benannt nach der Thymus Lymphome bildetende Mauszellinie "Ak";		
	identisch mit Protein Kinase B		
AML	Akute myeloische Leukämie		
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor		
BME	Bovine mikrovaskuläre Endothelzellen		
BSA	Bovines Serum Albumin		
BudR	Bromodeoxyuridin		
CCT	Craniele Computertomographie		
CD34	U.a. Oberflächenmarker für Endothelien		
cDNA	complementary DNA		
CEA	Carcinoembryonales Antigen		
c-met	Cellular MNNG HOS Transforming gene; siehe auch Met/HGFR		
cMRT	Craniele Magnetresonanztomographie		
СТ	Computertomographie		
d.h.	das heißt		
DAB	Diaminobenzidin		
DAG	Diglyceride		
dest.	Destilationem		
DNA	Deoxyribonucleic acid		
EGF	Epithelial Growth Factor		
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay		
EMA	Epithelial membrane antigen		
Fa.	Firma		
FAK	Focal Adhesion Kinase		
FGF	Fibroblast Growth Factor		
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2		
FLK1	Fetal Liver Kinase 1; Synonym für KDR		
FLT1	FMS-related Tyrosine Kinase; Identisch mit VEGFR1		
Gesätt.	Gesättigt		
GFAP	Glial fibrillary acidic protein; Marker für gliale Zellen		
HCI	Chlorwasserstoff		
HGF	Hepatocyte Growth Factor		
HGF/SF	Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor		
HPF	High Power Fields		
HUVEC	Humane Umbilikalvenen Endothelzellen		
lg	Immunglobulin		
IGF	Insuline Growth Factor		
lgG	Immunglobulin g		
IP3	Inositol trisphosphate		
k.A.	Keine Angaben		
KDR/FLK1	Kinase insert domain receptor		
Ki67	"Kiel 67" – Antigen; Marker für die Proliferationsrate		

Kontr	Kontrollo		
m	Mänaliah		
	Mitogon-activated protoin kipaso		
	Synonym für Henatocyte Growth Factor Recentor		
	Moningoom WHO Grad I		
Mih1	Antikärpor Marker für die Preliferationerate		
	Attunicobes Moningsom WHO Cred II		
	Anoplasticobos Meningeom WHO Grad II		
mind			
MD	Magnetrosonanz		
	Magnetiesonaliz Magnetiesonaliz		
	Magnetrosonanztemagraphia		
n d	Anzani Nicht durchaoführt		
n.a.			
n.a.	Nicht uurchgelunn		
n.v.	Nicht vorhanden		
	Nathumchiona		
NaN3			
	Neurofibromatose		
	Neuronbromatose Typ 2		
	Silcksionmonooxia		
NUS Nr	Nitrous Oxide; Stickston		
Nr.	Nummer		
0.g.	Oben gennant		
	Peroxidase-Antiperoxidase		
	Proliferating cell nuclear antigene		
	Polymerase kettenreaktion		
	Platelet-derived growth factor		
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor variante BB		
	Phosphalidylinosit		
PLGF	Placenta Growth Factor		
	Phosphatidylinositol 3-kinase		
PKC	Protein Kinase C		
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid		
RAS	Rat sarcoma		
	Ribonucieic acid		
RI-PCR	Real-Time-quantitative Polymerase Chain Reaction		
S.O.	Siene open		
S100	Gruppe Calcium-bindende Proteine; Marker für neuronale Linie		
SF	Scatter Factor		
Shc	Src nomology 2 domain-containing protein		
Tap.			
TBS Taile	I ris-buffered saline		
Iris	tris(nydroxymetnyi)aminometnane		
USW.	und so weiter		
v.a.	Voi alletti Vaaavlar Endathalial Oravith Eastar		
	Vascular Endothelial Growth Easter Description 4		
	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1		
VEGFK2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2		
vera.	veraunnung		

vWF	Von Willebrandt Faktor
W	weiblich
WHO	World Health Organization
z.T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. Embo J 5(10): 2523-2528.

Akutsu Y, Aida T, Nakazawa S, Asano G (1991). Localization of acidic and basic fibroblast growth factor mRNA in human brain tumors. Jpn J Cancer Res 82(9): 1022-1027.

Albrecht S, Goodman JC, Rajagopolan S, Levy M, Cech DA, Cooley LD (1994). Malignant meningioma in Gorlin's syndrome: cytogenetic and p53 gene analysis. Case report. J Neurosurg 81(3): 466-471.

Antinheimo J, Haapasalo H, Haltia M, Tatagiba M, Thomas S, Brandis A, Sainio M, Carpen O, Samii M, Jaaskelainen J (1997). Proliferation potential and histological features in neurofibromatosis 2-associated and sporadic meningiomas. J Neurosurg 87(4): 610-614.

Armstrong R (2000). The Gray's anatomy. London, Serpent's Tail.

Aurelius Antonius M (180). Ta eis heautòn (Ad se ipsum), II., XII. (XV.). Roma.

Barbaro NM, Gutin PH, Wilson CB, Sheline GE, Boldrey EB, Wara WM (1987).

Radiation therapy in the treatment of partially resected meningiomas. Neurosurgery 20(4): 525-528.

Bitzer M, Opitz H, Popp J, Morgalla M, Gruber A, Heiss E, Voigt K (1998).

Angiogenesis and brain oedema in intracranial meningiomas: influence of vascular endothelial growth factor. Acta Neurochir (Wien) 140(4): 333-340.

Bitzer M, Wockel L, Luft AR, Wakhloo AK, Petersen D, Opitz H, Sievert T, Ernemann U, Voigt K (1997). The importance of pial blood supply to the development of peritumoral brain edema in meningiomas. J Neurosurg 87(3): 368-373.

Black P, Carroll R, Zhang J (1996). The molecular biology of hormone and growth factor receptors in meningiomas. Acta Neurochir Suppl 65: 50-53.

Black PM, Carroll R, Glowacka D, Riley K, Dashner K (1994). Platelet-derived growth factor expression and stimulation in human meningiomas. J Neurosurg 81(3): 388-393.

Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter GF, Samii M, Ostertag H (1993). Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. Neurosurgery 33(2): 212-217; discussion 217-218.

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. Science 264(5158): 569-571.

Bruneval P, Sassy C, Mayeux P, Belair MF, Casadevall N, Roux FX, Varet B, Lacombe C (1993). Erythropoietin synthesis by tumor cells in a case of meningioma associated with erythrocytosis. Blood 81(6): 1593-1597.

Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, Comoglio PM (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. J Cell Biol 119(3): 629-641.

Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK (2000). New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. Adv Cancer Res 79: 1-38.

Cho KG, Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Wilson CB (1986). Prediction of tumor doubling time in recurrent meningiomas. Cell kinetics studies with bromodeoxyuridine labeling. J Neurosurg 65(6): 790-794.

Christov C, Lechapt-Zalcman E, Adle-Biassette H, Nachev S, Gherardi RK (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptor flt-1 in microcystic meningiomas. Acta Neuropathol (Berl) 98(4): 414-420. De Vitis LR, Tedde A, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Bigozzi U, Montali E, Papi L (1996). Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene in sporadic meningiomas. Hum Genet 97(5): 632-637.

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, Altorki NK, Alektiar KM, Amols HI, Bajorin DF, Bosl GJ, Brennan MF, Brown HK, Chaganti RSK, Chertkov L, Chui C, Coit DG, Cordon-Cardo C, Dalbagni G, DeAngelis LM, Disa JJ, Foley KM, Fong Y, Fuks ZY, Ginsberg RJ, Gutin PH, Healey JH, Herr HW, Hunt M, Kaner RJ, Karpeh MS, Kelsen D, Kemeny N, Kurtz RC, Leibel SA, Ling CC, LoSasso T, Mageras G, Maki RG, Maslak P, Massie MJ, Minsky BD, Motzer RJ, Petrek JA, Rosenzweig K, Roth AJ, Scheinberg DA, Sheinfeld J, Steinherz LJ, Stover DE, Weiss M, Yahalom J, Zelefsky MJ, Burman CM (1997). Cancer, principles and practice of oncology. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins. Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM (1991). Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. Oncogene 6(11): 1997-2003.

Dietzmann K, von Bossanyi P, Warich-Kirches M, Kirches E, Synowitz HJ, Firsching R (1997). Immunohistochemical detection of vascular growth factors in angiomatous and atypical meningiomas, as well as hemangiopericytomas. Pathol Res Pract 193(7): 503-510.

DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA (1995). Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. J Biol Chem 270(13): 7717-7723.

Donnini S, Machein MR, Plate KH, Weich HA (1999). Expression and localization of placenta growth factor and PIGF receptors in human meningiomas. J Pathol 189(1): 66-71.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A 94(9): 4273-4278.

Enam SA, Abdulrauf S, Mehta B, Malik GM, Mahmood A (1996). Metastasis in meningioma. Acta Neurochir (Wien) 138(10): 1172-1177; discussion 1177-1178. Ferrara N, Henzel WJ (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161(2): 851-858.

Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschlader M, Hossfeld DK (1997). Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. Blood 89(6): 1870-1875.

Flamme I, Frolich T, Risau W (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. J Cell Physiol 173(2): 206-210.

Folkman J (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. Ann Surg 175(3): 409-416.

Folkman J (1995). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med 333(26): 1757-1763. Folkman J (1996). Tumor angiogenesis and tissue factor. Nat Med 2(2): 167-168.

Folkman J, Klagsbrun M (1987). Angiogenic factors. Science 235(4787): 442-447. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med 133(2): 275-288.

Fons P, Malavaud B, Venat L, Plouet J (2000). [Anti-angiogenesis strategies in cancer]. Bull Acad Natl Med 184(3): 579-586; discussion 586-577.

Furie MB, Cramer EB, Naprstek BL, Silverstein SC (1984). Cultured endothelial cell monolayers that restrict the transendothelial passage of macromolecules and electrical current. J Cell Biol 98(3): 1033-1041.

Gherardi E, Stoker M (1990). Hepatocytes and scatter factor. Nature 346(6281): 228. Gnarra JR, Zhou S, Merrill MJ, Wagner JR, Krumm A, Papavassiliou E, Oldfield EH, Klausner RD, Linehan WM (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. Proc Natl Acad Sci U S A 93(20): 10589-10594.

Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y (1988). Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. J Clin Invest 81(2): 414-419.

Goldman CK, Bharara S, Palmer CA, Vitek J, Tsai JC, Weiss HL, Gillespie GY (1997). Brain edema in meningiomas is associated with increased vascular endothelial growth factor expression. Neurosurgery 40(6): 1269-1277. Graham DI, Lantos PL (1997). Greenfield's Neuropathology. London, Arnold.

Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL,

Polverini P, Rosen EM (1993). Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 90(5): 1937-1941.

Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, Maher ER (1996). Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. J Neurosurg 84(5): 847-851.

Harland SP, Kuc RE, Pickard JD, Davenport AP (1995). Characterization of endothelin receptors in human brain cortex, gliomas, and meningiomas. J Cardiovasc Pharmacol 26 Suppl 3: S408-411.

Harland SP, Kuc RE, Pickard JD, Davenport AP (1998). Expression of endothelin(A) receptors in human gliomas and meningiomas, with high affinity for the selective antagonist PD156707. Neurosurgery 43(4): 890-898; discussion 898-899.

Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP (1991). Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. J Neurosurg 75(4): 564-574.

Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, Jaaskelainen J, Paetau A, Haltia M, Alitalo K (1995). Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. Am J Pathol 146(2): 368-378.

Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J (2000). A concise guide to cDNA microarray analysis. Biotechniques 29(3): 548-550, 552-544, 556 passim.

Hepburn PJ, Glynne-Jones E, Goddard L, Gee JM, Harper ME (1995). Cell proliferation in prostatic carcinoma: comparative analysis of Ki-67, MIB-1 and PCNA. Histochem J 27(3): 196-203.

Herold-Mende C, Andl T, Laemmler F, Reisser C, Mueller MM (1999). [Functional expression of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 on squamous cell carcinoma of the head and neck]. Hno 47(8): 706-711.

Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1997). Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. J Neurosurg 86(1): 113-120.

Ingber DE (1990). Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. Proc Natl Acad Sci U S A 87(9): 3579-3583.

Jaaskelainen J (1986). Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. Surg Neurol 26(5): 461-469.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 52(11): 2745-2756.

Kakinuma K, Tanaka R, Onda K, Takahashi H (1998). Proliferative potential of recurrent intracranial meningiomas as evaluated by labelling indices of BUdR and Ki-67, and tumour doubling time. Acta Neurochir (Wien) 140(1): 26-31; discussion 31-22.

Kalkanis SN, Carroll RS, Zhang J, Zamani AA, Black PM (1996). Correlation of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression with peritumoral vasogenic cerebral edema in meningiomas. J Neurosurg 85(6): 1095-1101.

Kepes JJ (1986). Presidential address: the histopathology of meningiomas. A reflection of origins and expected behavior? J Neuropathol Exp Neurol 45(2): 95-107. Kepes JJ, Chen WY, Connors MH, Vogel FS (1988). "Chordoid" meningeal tumors in young individuals with peritumoral lymphoplasmacellular infiltrates causing systemic manifestations of the Castleman syndrome. A report of seven cases. Cancer 62(2): 391-406.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. Nature 362(6423): 841-844.

Kitagawa N, Tsutsumi K, Niwa M, Himeno A, Yamashita K, Shibata S, Taniyama K, Kurihara M, Kawano T, Yasunaga A, et al. (1994). Expression of a functional endothelin (ETA) receptor in human meningiomas. J Neurosurg 80(4): 723-731. Kitagawa N, Tsutsumi K, Niwa M, Yamaga S, Anda T, Khalid H, Himeno A, Taniyama K, Shibata S (1994). A selective endothelin ETA antagonist, BQ-123, inhibits 125I-endothelin-1 (125I-ET-1) binding to human meningiomas and antagonizes ET-1-induced proliferation of meningioma cells. Cell Mol Neurobiol 14(2): 105-118.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993). Histological typing of tumours of the central nervous system. Berlin, Springer Verlag.

Kleihues P, Cavenee WK (2000). Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon, IARC Press.

Kleihues P, International Agency for Research on Cancer., International Society of Neuropathology., Cavenee WK (1997). Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon, International Agency for Research on Cancer.

Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel WI, Zang KD, Feiden W (1995). Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. Acta Neurochir (Wien) 137(3-4): 174-181.

Lamszus K, Schmidt NO, Jin L, Laterra J, Zagzag D, Way D, Witte M, Weinand M, Goldberg ID, Westphal M, Rosen EM (1998). Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. Int J Cancer 75(1): 19-28. Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeijer A, van Drunen E, Bootsma D, Koper JW, Avezaat CJ, Kley N, et al. (1994). Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. Am J Hum Genet 54(6): 1022-1029.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246(4935): 1306-1309.

Louis DN, Hamilton AJ, Sobel RA, Ojemann RG (1991). Pseudopsammomatous meningioma with elevated serum carcinoembryonic antigen: a true secretory meningioma. Case report. J Neurosurg 74(1): 129-132.

Lyons CJ, Wilson CB, Horton JC (1993). Association between meningioma and Cowden's disease. Neurology 43(7): 1436-1437.

Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H (1992). Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. J Neurosurg 77(4): 616-623.

Maier H, Wanschitz J, Sedivy R, Rossler K, Ofner D, Budka H (1997). Proliferation and DNA fragmentation in meningioma subtypes. Neuropathol Appl Neurobiol 23(6): 496-506.

Marks SM, Whitwell HL, Lye RH (1986). Recurrence of meningiomas after operation. Surg Neurol 25(5): 436-440.

Matsuno A, Nagashima T, Matsuura R, Tanaka H, Hirakawa M, Murakami M, Tamura A, Kirino T (1996). Correlation between MIB-1 staining index and the

immunoreactivity of p53 protein in recurrent and non-recurrent meningiomas. Am J Clin Pathol 106(6): 776-781.

Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, Marme D, Birnbaum D (1996). Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. Genomics 32(1): 168-169.

Merel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Moreau-Aubry A, Bijlsma EK, Lazaro C, Moisan JP, Resche F, Nishisho I, Estivill X, et al. (1995). Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. Genes Chromosomes Cancer 13(3): 211-216.

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. Cell 72(6): 835-846.

Milosevic MF, Frost PJ, Laperriere NJ, Wong CS, Simpson WJ (1996). Radiotherapy for atypical or malignant intracranial meningioma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 34(4): 817-822.

Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, et al. (1989). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. Biochem Biophys Res Commun 163(2): 967-973.

Moriyama T, Kataoka H, Kawano H, Yokogami K, Nakano S, Goya T, Uchino H, Koono M, Wakisaka S (1998). Comparative analysis of expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-met, in gliomas, meningiomas and schwannomas in humans. Cancer Lett 124(2): 149-155.

Nakaguchi H, Fujimaki T, Matsuno A, Matsuura R, Asai A, Suzuki I, Sasaki T, Kirino T (1999). Postoperative residual tumor growth of meningioma can be predicted by MIB-1 immunohistochemistry. Cancer 85(10): 2249-2254.

Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature 342(6248): 440-443.

Nelson PK, Setton A, Choi IS, Ransohoff J, Berenstein A (1994). Current status of interventional neuroradiology in the management of meningiomas. Neurosurg Clin N Am 5(2): 235-259.

Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashima T, Yamashita J, Yamamoto H (1998). Placenta growth factor (PIGF) mRNA expression in brain tumors. J Neurooncol 40(2): 123-130.

Nordqvist AC, Peyrard M, Pettersson H, Mathiesen T, Collins VP, Dumanski JP, Schalling M (1997). A high ratio of insulin-like growth factor II/insulin-like growth factor binding protein 2 messenger RNA as a marker for anaplasia in meningiomas. Cancer Res 57(13): 2611-2614.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 88(2): 277-285.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH, Folkman J (1994). Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor

that suppresses angiogenesis and tumor growth. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 59: 471-482.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell 79(2): 315-328.

Pagotto U, Arzberger T, Hopfner U, Sauer J, Renner U, Newton CJ, Lange M, Uhl E, Weindl A, Stalla GK (1995). Expression and localization of endothelin-1 and endothelin receptors in human meningiomas. Evidence for a role in tumoral growth. J Clin Invest 96(4): 2017-2025.

Pagotto U, Arzberger T, Hopfner U, Weindl A, Stalla GK (1995). Cellular localization of endothelin receptor mRNAs (ETA and ETB) in brain tumors and normal human brain. J Cardiovasc Pharmacol 26 Suppl 3: S104-106.

Papi L, De Vitis LR, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, Bigozzi U (1995). Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. Hum Genet 95(3): 347-351.

Park K, Kim JH, Nam DH, Lee JI, Kim JS, Hong SC, Shin HJ, Eoh W (2000). Vascular endothelial growth factor expression under ischemic stress in human meningiomas. Neurosci Lett 283(1): 45-48.

Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC (1999). "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. Cancer 85(9): 2046-2056.

Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM (1997). Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. Am J Surg Pathol 21(12): 1455-1465. Pietsch T, Valter MM, Wolf HK, von Deimling A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD (1997). Expression and distribution of vascular endothelial growth factor protein in human brain tumors. Acta Neuropathol (Berl) 93(2): 109-117.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W (1994). Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. Int J Cancer 59(4): 520-529.

Plate KH, Risau W (1995). Angiogenesis in malignant gliomas. Glia 15(3): 339-347.

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. J Biol Chem 272(11): 7151-7158.

Prayson RA (1996). Malignant meningioma: a clinicopathologic study of 23 patients including MIB1 and p53 immunohistochemistry. Am J Clin Pathol 105(6): 719-726. Probst-Cousin S, Villagran-Lillo R, Lahl R, Bergmann M, Schmid KW, Gullotta F (1997). Secretory meningioma: clinical, histologic, and immunohistochemical findings in 31 cases. Cancer 79(10): 2003-2015.

Provias J, Claffey K, delAguila L, Lau N, Feldkamp M, Guha A (1997). Meningiomas: role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in angiogenesis and peritumoral edema. Neurosurgery 40(5): 1016-1026.

Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. Nature 386(6626): 671-674.

Risau W (1998). Development and differentiation of endothelium. Kidney Int Suppl 67: S3-6.

Roggendorf W, Schuster T, Peiffer J (1987). Proliferative potential of meningiomas determined with the monoclonal antibody Ki-67. Acta Neuropathol (Berl) 73(4): 361-364.

Rosen EM, Laterra J, Joseph A, Jin L, Fuchs A, Way D, Witte M, Weinand M, Goldberg ID (1996). Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. Int J Cancer 67(2): 248-255.

Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID (1994). Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. J Cell Biol 127(6 Pt 2): 1783-1787. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, Zhang M, Westphal M, Deen DF, Shuman MA (2000). Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. Neoplasia 2(4): 306-314.

Rubin JS, Chan AM, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW, et al. (1991). A broad-spectrum human lung fibroblastderived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 88(2): 415-419.

Rubinstein AB, Loven D, Geier A, Reichenthal E, Gadoth N (1994). Hormone receptors in initially excised versus recurrent intracranial meningiomas. J Neurosurg 81(2): 184-187.

Ruttledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP (1994). Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. Genes Chromosomes Cancer 10(2): 122-130.

Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. Cancer Res 55(5): 1189-1193. Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, Ergun S, Stavrou D, Rosen EM, Lamszus K (1999). Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. Int J Cancer 84(1): 10-18.

Schnitt SJ, Vogel H (1986). Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. Am J Surg Pathol 10(9): 640-649. Sela B (2000). [Anti-angiogenesis drugs as a potential approach in cancer therapy]. Harefuah 139(7-8): 283-289.

Shibata S, Sadamori N, Mine M, Sekine I (1994). Intracranial meningiomas among Nagasaki atomic bomb survivors. Lancet 344(8939-8940): 1770.

Shibuya M, Hoshino T, Ito S, Wacker MR, Prados MD, Davis RL, Wilson CB (1992). Meningiomas: clinical implications of a high proliferative potential determined by bromodeoxyuridine labeling. Neurosurgery 30(4): 494-497; discussion 497-498. Shono T, Inamura T, Torisu M, Suzuki SO, Fukui M (2000). Vascular endothelial growth factor and malignant transformation of a meningioma: case report. Neurol Res 22(2): 189-193.

Soffer D, Gomori JM, Siegal T, Shalit MN (1989). Intracranial meningiomas after high-dose irradiation. Cancer 63(8): 1514-1519.

Soffer D, Pittaluga S, Feiner M, Beller AJ (1983). Intracranial meningiomas following low-dose irradiation to the head. J Neurosurg 59(6): 1048-1053.

Stan AC, Nemati MN, Pietsch T, Walter GF, Dietz H (1995). In vivo inhibition of angiogenesis and growth of the human U-87 malignant glial tumor by treatment with an antibody against basic fibroblast growth factor. J Neurosurg 82(6): 1044-1052. Takahashi JA, Fukumoto M, Igarashi K, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M (1992).

Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. J Neurosurg 76(5): 792-798.

Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM (1997). Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. Arch Surg 132(5): 541-546. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem 266(18): 11947-11954.

Torp SH (1997). Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. Mol Pathol 50(4): 198-200.

Tsai JC, Hsiao YY, Teng LJ, Chen CT, Kao MC (1999). Comparative study on the ALA photodynamic effects of human glioma and meningioma cells. Lasers Surg Med 24(4): 296-305.

Tsai JC, Hsiao YY, Teng LJ, Shun CT, Chen CT, Goldman CK, Kao MC (1999). Regulation of vascular endothelial growth factor secretion in human meningioma cells. J Formos Med Assoc 98(2): 111-117.

Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, et al. (1991). Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 88(16): 7001-7005.

Weindel K, Moringlane JR, Marme D, Weich HA (1994). Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in brain tumor tissue and cyst fluid: the key to angiogenesis? Neurosurgery 35(3): 439-448; discussion 448-439.

Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A (1995). Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. Am J Pathol 146(4): 827-832. Yamaga S, Tsutsumi K, Niwa M, Kitagawa N, Anda T, Himeno A, Khalid H,

Taniyama K, Shibata S (1995). Endothelin receptor in microvessels isolated from human meningiomas: quantification with radioluminography. Cell Mol Neurobiol 15(3): 327-340.

Yoshioka H, Hama S, Taniguchi E, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (1999). Peritumoral brain edema associated with meningioma: influence of vascular endothelial growth factor expression and vascular blood supply. Cancer 85(4): 936-944.

Zagzag D, Miller DC, Sato Y, Rifkin DB, Burstein DE (1990). Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in astrocytomas. Cancer Res 50(22): 7393-7398.

Zang KD (1982). Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. Cancer Genet Cytogenet 6(3): 249-274.

Zankl H, Zang KD (1972). Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. Humangenetik 14(2): 167-169.

Zetter BR (1987). Assay of capillary endothelial cell migration. Methods Enzymol 147: 135-144.

8. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle Professor Dr. med. Katrin Lamszus, Leiterin des Hans Dietrich Herrmann Labors für Hirntumorbiologie, und Professor Dr. med. Manfred Westphal, Direktor der neurochirurgischen Klinik des UKE, für die Überlassung des Thematik und für die Bereitstellung der Räumlichkeiten danken. Mindestens ebenso möchte ich mich für Ihre unermüdliche Geduld bedanken – nur so ist der letztendliche Abschluss dieses Projektes möglich gewesen.

Weiterhin schulde ich Hildegard Meissner, Svenja Zapf, Dorothea Zirkel, Kim Platzek und vor allem Regina Fillbrandt sowie Nils-Ole Schmidt großen Dank für die geduldige Einführung und Unterweisung in die technischen Details und Arbeiten sowie für die tatkräftige Unterstützung.

Dr. Laas aus dem neuropathologischen Institut des UKE möchte ich für die freundliche Überlassung etlicher Paraffinschnitte, Blöcke und Befundtexte danken.

Prof. Dr. med. Christian Hartmann, Abteilung für Neuropathologie, Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, möchte in besonderem Maße für die Überlassung der histologischen Bilder sowie für seine konstruktiven und kritischen Anmerkungen zur Thematik und für seine unermüdliche Motivation danken.

9. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Adresse

Ulrike Lengler

Geburtsdatum Geburtsort Familienstand Schulausbildung

Freiwilliges soziales Jahr Studium Ärztliche Prüfung Ärztliche Tätigkeiten

Wissenschaftliche Mitarbeiterin Promotion

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

hele

Unterschrift: