

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Analyse der Loss of Heterozygosity des Chromosoms 1p sowie der Untereinheiten
BAF47, BAF45c und BAF250a des ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplexes
SWI/SNF in Meningeomen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021

vorgelegt von:
Katrin Bartelmei
geb. am: 18.10.1996 in Viersen

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Tag der Promotion: 22.03.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Schulz-Schaeffer

Dr. Nicole Ludwig

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	6
1.1	Zusammenfassung	6
1.2	Summary	8
2	Einleitung	10
2.1	Meningeome	10
2.1.1	Ätiologie und Epidemiologie	10
2.1.2	Klassifikation und WHO-Grading.....	12
2.1.3	Klinik.....	14
2.1.4	Diagnostik	15
2.1.5	Therapie und Prävention.....	17
2.1.6	Prognose	19
2.2	Molekularzytogenetik von Meningeomen.....	20
2.2.1	Chromosomenaberrationen.....	20
2.2.2	ATP-abhängiges Chromatin-Remodeling	26
2.3	Fragestellung dieser Arbeit.....	36
3	Materialien	37
3.1	Substanzen und Lösungen	37
3.1.1	Antikörper	37
3.1.2	Mikrosatelliten.....	38
3.1.3	Materialienliste	38
3.1.4	Puffer und Lösungen	40
3.1.5	Geräte und Software	43
3.2	Proben.....	44
4	Methodik	46
4.1	Loss of Heterozygosity-Analyse (LOH)	46
4.2	Western-Blot	48
4.2.1	Probenbehandlung und Lysatherstellung.....	48
4.2.2	Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.2.3	Western Blot.....	50
4.3	Immunohistochemie	51

4.4	Statistik.....	53
4.5	Fremdleistungen.....	53
5	Ergebnisse	54
5.1	Klinische Datenanalyse.....	55
5.1.1	Alters- und Geschlechtsverteilung.....	55
5.1.2	Histopathologische Einteilung nach WHO.....	56
5.1.3	Lokalisation.....	58
5.1.4	Rezidivaufreten.....	59
5.2	Loss of Heterozygosity-Analyse des Chromosoms 1p.....	59
5.2.1	Klassifikation und Überblick über 1p-Verluste.....	60
5.2.2	Analyse der einzelnen Sonden.....	61
5.2.3	Loss of Heterozygosity-Analyse des <i>ARID1A</i>	64
5.2.4	Auftrennung nach Gruppen.....	65
5.3	Western Blot.....	68
5.3.1	Analyse der Banden bei Anfärbung von <i>ARID1A</i>	68
5.3.2	Analyse der Intensität bei Anfärbung von <i>ARID1A</i>	71
5.3.3	Weitere untersuchte Proteine.....	73
5.4	Histologische Untersuchungen.....	76
5.4.1	Immunhistochemische <i>ARID1A</i> Färbung.....	77
5.4.2	Alkalische Phosphatase Färbung.....	78
5.4.3	Ki67.....	80
6	Diskussion.....	81
6.1	Aussage und Eignung der Stichprobe.....	81
6.2	Loss of Heterozygosity des Chromosoms 1p bei Meningeomen.....	82
6.2.1	Optimierung der Analyse des Chromosoms 1p für Meningeome.....	82
6.2.2	Chromosomenarmverluste statt Teilverluste.....	84
6.2.3	Der Einfluss des Status von Chromosom 1p auf die Klinik.....	85
6.3	Nachweisbarkeit der Untereinheiten DPF3 und SNF5 des SWI/SNF-Komplexes in Meningeomproben mittels Western Blot Analyse.....	88
6.4	Die Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes <i>ARID1A</i>	88
6.4.1	Nachweis der Proteinexpression des <i>ARID1A</i> im Western Blot.....	89
6.4.2	Nachweis der Proteinexpression des <i>ARID1A</i> in der Immunhistochemie.....	91
6.4.3	Färbung der Alkalischen Phosphatase.....	91

6.5	Fokus vieler Tumorentitäten und Genlokus des <i>ARID1A</i> – 1p36.....	92
6.6	Polyklonalität von Meningeomen.....	94
6.7	Reevaluation der aktuellen Gradierung von Meningeomen nach WHO.....	94
6.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	96
7	Literaturverzeichnis.....	98
8	Anhang	106
8.1	Probenmaterial.....	106
8.2	Ergebnistabellen	107
8.2.1	LOH.....	107
8.2.2	Western Blot Ergebnisse	108
8.2.3	Regressionsanalysen.....	109
8.3	Abbildungsverzeichnis	112
8.4	Tabellenverzeichnis.....	114
8.5	Abkürzungsverzeichnis	115
9	Publikationen.....	117
10	Dank.....	118
11	Lebenslauf	120

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 ZUSAMMENFASSUNG

Nach der überarbeiteten „WHO classification of tumours of the central nervous system“ der Weltgesundheitsorganisation von 2016 wurde der 1p/19q-Status bei Oligodendrogliomen und die IDH-Mutationsanalyse bei Oligodendrogliomen und Glioblastomen zur Diagnosesicherung aufgenommen. Eine ähnliche molekulargenetische Diagnostik ist bei den Meningeomen nicht in den Leitlinien verankert, sodass diese Tumore nur nach ihrer Morphologie eingeteilt werden.

Allerdings zeigen diese von den Arachnoidalzellen ausgehenden Tumore mit zunehmender Malignität vermehrt molekulargenetische Alterationen. Bei genetischen Untersuchungen an Meningeomen zeigten sich in etwa 60% der Fälle Chromosomenaberrationen wie (Teil)-Gewinne oder -Verluste. Letzteres wird auch als „Loss of Heterozygotie“ (LOH) bezeichnet und beschreibt den Verlust der physiologischen Heterozygotie der Allele. Dieses Phänomen zeigen am häufigsten die Chromosomen 22q, 1p und 14q in Abhängigkeit vom WHO-Grad. Bei Vorliegen einer LOH auf den genannten Chromosomen weisen die Tumore häufig eine gesteigerte Malignität und ein erhöhtes Rezidivrisiko auf, was die diagnostische Bedeutung dieser molekulargenetischen Aberrationen verdeutlicht. Besonders eine LOH auf dem chromosomalen Abschnitt 1p korreliert dabei mit der klinischen Prognose.

Trotz dieser klar identifizierten betroffenen Chromosomenbereiche ist bisher nur bei dem Chromosom 22q das Kandidatengen *NF2* als Initiator der Kanzerogenese und der Krankheit „Neurofibromatose 2“ beschrieben. In dieser Studie wurden deshalb weitere mögliche Kandidatengene untersucht, die ihren Genlokus auf den beschriebenen Abschnitten aufweisen und besonders der Chromosomenabschnitt 1p näher betrachtet. Die untersuchten Proteine BAF47, BAF45c und BAF250a sind Teil des Chromatin-Remodeling Komplexes SWI/SNF, dessen Beteiligung bereits in vielen anderen humanen neoplastischen Krankheitsbildern nachgewiesen wurde, wobei besonders BAF250a, auch ARID1A genannt, anteilig als häufigstes mutiert beschrieben wurde.

Dadurch ergibt sich einerseits die Frage nach den auslösenden Kandidatengenen der betroffenen Chromosomen, andererseits die Notwendigkeit einer standardisierten molekulargenetischen Diagnostik, die Einfluss auf das Klassifikationssystem der Tumore hat. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit die Chromosomenaberrationen Einfluss auf das Expressionslevel verschiedener Proteine zeigen, aber auch inwieweit das klinische Verhalten der Meningeome verändert auftritt.

Dieser Fragestellung wurde in einer experimentellen Studie nachgegangen, indem auf DNA- und Proteinebene die beschriebenen Komponenten des SWI/SNF-Komplexes untersucht wurden. An 51 Meningeomproben wurde durch eine PCR-gestützte Mikrosatelliten-Analyse das Vorliegen einer LOH überprüft, während mittels Western Blot und Immunhistochemie die Proteinexpression evaluiert wurde.

Durch die sechs angewandten Sonden für Mikrosatelliten konnte ein großer Teil des Chromosoms 1p überprüft werden. Es zeigte sich sehr klar, dass bei einer LOH meist der gesamte überprüfte Chromosomenbereich betroffen ist, sodass die zugrundeliegende Pathogenese komplexer ausfällt, als bisher gedacht. Die Patienten, die eine LOH auf diesem Chromosom aufwiesen, zeigten ein deutlich gesteigertes Risikoprofil. Weiter verdeutlichte es sich, dass der Genlocus des ARID1A häufig bei Meningeomen durch eine LOH auf dem Chromosom 1p betroffen ist. Dieses Phänomen zeigte sich zusätzlich im Western Blot sowie in der Immunhistochemie, in denen ebenfalls Alterationen, wie ein Verlust der spezifischen Bande oder eine reduzierte histologische Expression des Proteins, nachweisbar waren.

Zusammenfassend stellt diese Studie damit ARID1A als ein mögliches Kandidatenprotein in der Kanzerogenese von Meningeomen heraus und eröffnet folgend die Möglichkeit, dies in weiteren Studien, beispielsweise durch Knock-out-Zellkulturen, zu prüfen. Durch die modifizierte und optimierte Methodik dieser Studie zur Prüfung einer LOH auf dem Chromosom 1p wurde eine neue Möglichkeit zur standardisierten Diagnostik an Meningeomen etabliert. Die Erkenntnisse dieser Studie können die Grundlage für weitere Studien stellen und damit den Weg für eine molekulargenetische Analyse als Standarddiagnostik bei Meningeomen eröffnen.

1.2 SUMMARY

Analysis of the loss of the heterozygosity of chromosome 1p as well as of the subunits BAF47, BAF45c und BAF250a of the ATP-dependent chromatin remodeling complex SWI/SNF in meningiomas

When the World Health Organization published the „WHO classification of tumours of the central nervous system” in 2016, the 1p/19q-status for oligodendrogliomas and the IDH-mutation for oligodendrogliomas and glioblastomas became an integral part of the classification system of these tumors. Similar molecular genetic diagnostics for meningiomas are not involved in these guidelines, with the result that these tumors remain to be classified by their morphology.

However, these tumors, originating from the arachnoids, show an increase of molecular genetic alterations with increasing malignity. Recent evidence suggests that about 60% of meningiomas exhibit chromosomal aberrations like (partial)-gain or loss. The latter is also called “Loss of Heterozygosity” (LOH), defining the absence of the physiologic heterozygosity of two alleles. Depending on the WHO-grade, this phenomenon most frequently occurs on chromosomes 22q, 1p and 14q. If an LOH is present on one of the chromosomes mentioned, the tumor often has an increased malignancy and a higher risk of recurrence, which points out the diagnostic importance of these molecular genetic aberrations. Furthermore, an LOH on the chromosomal section 1p correlates with the clinical prognosis.

Despite of the fact that the affected chromosomal regions have been identified clearly, a candidate gene has been found only for chromosome 22q: *NF2* is an initiator of cancerogenesis as well as the cause of “neurofibromatosis type 2”. This paper therefore investigates three possible candidate genes with their respective gene locus found on the sections described. Especially the chromosomal section 1p has been examined in more detail. The examined proteins BAF47, BAF45c and BAF250a are subunits of the chromatin remodeling complex SWI/SNF. Its’ involvement in many other human neoplastic conditions has already been demonstrated, with BAF250a, also called ARID1A, being described as the most frequently mutated.

This indicates a need to understand the initiating candidate genes on the affected chromosomes and further states the necessity for standardized molecular genetic diagnostics concerning the classification of meningiomas. The purpose of this study was not only to explore the relationship between chromosomal aberrations and the expression of different proteins, but also to examine how far the clinical behavior is affected by these changes in the genetics.

This dissertation follows an experimental design, with in-depth analysis of the DNA and the protein expression of the described components of the SWI/SNF-complex. A total of 51 meningiomas were

analyzed in a PCR-based microsatellite analysis regarding LOH status, and moreover in Western blot as well as immunohistochemistry in order to determine the expression of specific proteins.

Utilizing six different microsatellite markers, it was possible to analyze a large region of chromosome 1p. Interestingly, in case of an LOH mostly the complete chromosome is affected, which leads to the assumption that the underlying pathogenesis is more complex than expected. Patients with LOH showed an increased risk profile. Furthermore, this study has clarified that the gene *ARID1A* is frequently affected by chromosomal losses in meningiomas. Additionally, this finding is confirmed by the findings of Western blot and immunohistochemistry, where changes were identified in the protein expression of ARID1A, most significantly a loss of the specific bands and reduced histological expression.

In summary, this study highlights ARID1A as a possible candidate gene and protein in the carcinogenesis of meningiomas and subsequently opens up the possibility for future studies, for example in knock-out cell cultures. Our modified and optimized method to determine an LOH on chromosome 1p could be used for standardized diagnostics and classification of meningiomas. The findings of this study may serve as the basis for further studies concerning the groundwork for a standard molecular genetic examination of meningiomas.

2 EINLEITUNG

2.1 MENINGEOME

Das Meningeom ist eine Neoplasie, die sich aus den Meningothelien ableitet, also den meningothehialen Arachnoidaldeckzellen, die das Gehirn und das Rückenmark bedecken [105]. Die Arachnoidaldeckzellen weisen mesenchymale (zum Beispiel spindelzellartige Zellen, kollagenes Stroma) und epitheliale (zum Beispiel interzelluläre Verbindungen, Expression des „epithelialen Membran Antigens“, sekretorische Funktionen) Eigenschaften auf. Dadurch zeigen die Meningeome ein weites Spektrum an histologischen Erscheinungsbildern [60,66,105]. Sie können je nach Entdifferenzierung und Infiltration der Umgebung in drei Malignitäts-Grade entsprechend der Klassifizierung der Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization, WHO) eingeteilt werden. Bei circa 80% der Meningeome handelt es sich um benigne Tumore, die sich vorwiegend langsam wachsend und verdrängend zeigen und dem WHO-Grad I entsprechen [69,105]. Seltener treten entdifferenzierte Meningeome mit einer erhöhten proliferativen Aktivität auf und werden als höhergradig (WHO-Grad II und III) bezeichnet [69,71,105]. Als therapeutischer Ansatz wird eine möglichst vollständige Resektion vorgenommen, die vor allem bei den benignen Tumoren als alleinige Therapiemaßnahme bereits zu einer sehr guten Prognose mit minimaler Rezidivrate führt [28,85].

2.1.1 ÄTIOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE

Das Meningeom stellt im „Central Brain Tumor Registry of the United States“ (CBTRUS) 2018 einen Anteil von 37,1% in der Gruppe primärer Hirntumore dar [69]. Es wird geschätzt, dass die Inzidenz des Meningeoms bei 8,33 auf 100.000 Einwohner in den USA liegt. In den Untersuchungen des CBTRUS befindet sich der Altersgipfel bei 65 Jahren [69]. Auch im Kindes- und Adoleszenzalter können sich Meningeome bilden, die aber laut dem CBTRUS nur sehr selten mit einem Anteil von 2,7% aller primären Hirntumore in dieser Altersgruppe auftreten [69,74]. Ketter *et al.* stellten zudem heraus, dass die männliche Patientengruppe mit einem Gipfel um das 60. Lebensjahr ein früheres Auftreten zeigt als weibliche Patienten mit einem Gipfel um das 70. Lebensjahr [44]. Die Tumorfrequenz steigt bei beiden Geschlechtern mit zunehmenden Lebensalter. Weiterhin ist in Bezug auf die Geschlechterverteilung auffällig, dass Frauen laut Literatur circa 2-3 mal häufiger benigne Meningeome entwickeln als Männer [71,105]. Dies relativiert sich allerdings im Hinblick auf die höhergradigen Meningeome, bei denen sich die Geschlechterverteilung wieder angleicht [69].

Bisher ist zur Ätiologie von Meningeomen nur wenig bekannt. Bewiesen ist, dass eine Bestrahlung des Schädels im Rahmen einer Radiotherapie das Risiko für das Entstehen eines Meningeoms erhöht, wie sich in einer retrospektiven Studie gezeigt hat [79]. Dieser Effekt zeigt sich ebenfalls bei Überlebenden

der atomaren Explosion von Hiroshima, bei denen in Korrelation zur Nähe des Explosionsortes eine Steigerung der Inzidenz von Meningeomen aufgetreten ist [83].

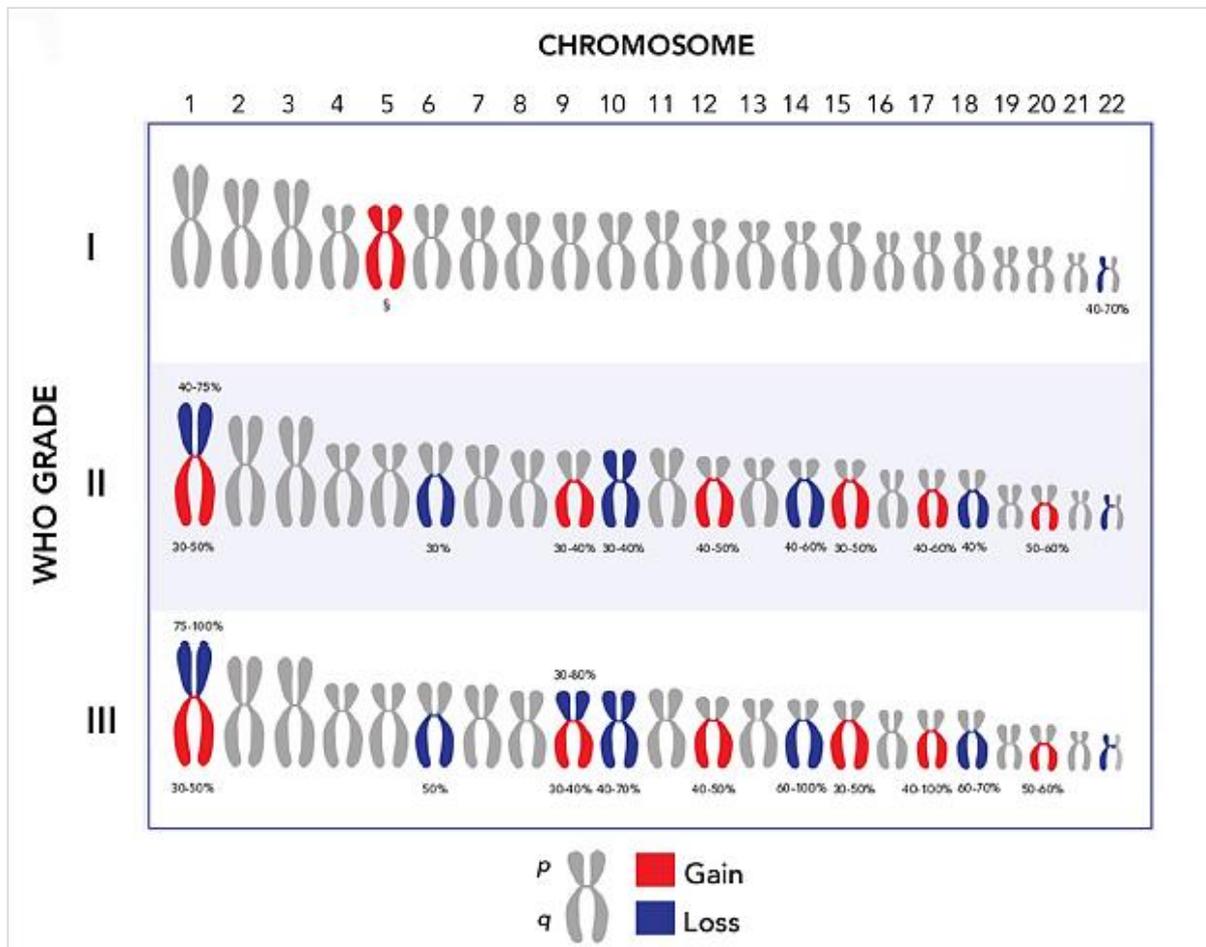


Abbildung 1. Häufig auftretende Chromosomenteilverluste und -Gewinne in Meningeomen nach Bi *et al.* [7]

Ein wichtiger Aspekt in der Tumorgenese des Meningeoms stellt die molekulargenetische Pathogenese dar. So finden sich in der Literatur zunehmend genetische Aberrationen, die auf mögliche Pathogenesen schließen lassen können (vergleiche **Abbildung 1**). Die chromosomalen (Teil-)Verluste stellen eine potentielle Ursache der Meningeomentstehung dar [7,101]. Als Grundlage wird ein „Two-Hit-Mechanismus“ nach Knudson *et al.* vermutet, bei dem mehrere kombinierte Defekte die DNA (deoxyribonucleic acid, deutsch: Desoxyribonukleinsäure, kurz DNS) schädigen müssen, um eine Kanzerogenese zu begünstigen [46,72]. Im Allgemeinen ist dabei entscheidend, dass aufgrund des diploiden Chromosomensatzes jeweils zwei Allele eines Gens verfügbar sind. Liegt eines dieser Allele geschädigt vor (z.B. durch eine Keimbahnmutation, 1. Hit), stellt nur noch das verbleibende Wildtyp-Allel den Genlocus bereit. Somit liegt noch eine unbeschädigte Kopie eines Genlocus vor, womit durch somatische Mutationen, wie Chromosomen(teil)verluste, eine Kanzerogenese leichter ablaufen kann (2.

Hit) [72]. Am häufigsten ist dabei eine Monosomie der Chromosomenarme 22q, 1p und 14q zu beobachten (siehe **Abbildung 1**) [44,60]. Bei den betroffenen Genen handelt es sich vor allem um Tumorsuppressorgene, wie das *ARID1A* oder das *NF2* [14,64]. Bei Ausfall dieser Gene, können maligne Prozesse leichter ungehindert ablaufen. Weitere wichtige Interaktionen dieses Mechanismus stellen die (In)Aktivierungen von Signalwegen dar, wie hormonelle Reaktionswege, oder epigenetische Interaktionen und chromosomale Restrukturierungen, zum Beispiel durch den SWI/SNF-Komplex [31,77,84]. In den Meningeomen sind bisher zwar die chromosomalen Verluste analysiert, weniger aber das molekularbiologische Korrelat, also das Endprotein.

Eine Ausnahme stellt dabei die Krankheit Neurofibromatose des Typ 2 dar, die mit einer erhöhten Prädisposition für Meningeome assoziiert ist [71]. Hier ist das Endprotein, Merlin, als Fokus dieser Erkrankung bekannt. Bei circa 60% der sporadischen Meningeome tritt eine *NF2*-Mutation innerhalb der Tumorzellen aller Malignitätsgrade isoliert auf und gilt als frühe Mutation in der Entwicklung [28,102]. Dazu kommt es bei den Meningeomen oft zu den beschriebenen Chromosomenverlusten und -teilverlusten. Bei gemeinsamem Auftreten mit der *NF2*-Mutationen könnte dies einen gemeinsamen Pathomechanismus implizieren, bei dem ausreichend negative Faktoren für eine Initiation des Tumorwachstums sorgen [14].

Weiter handelt es sich bei der Mehrzahl der Meningeome um monoklonale Tumore. Dies ist, laut Literatur, selbst bei multiplen Läsionen meist der Fall [91,105]. Somit wird davon ausgegangen, dass eine Läsion von einer Ursprungszelle ausgeht und damit ein homogenes molekulargenetisches Profil aufweist.

Ein weiterer Faktor in der Pathogenese der Meningeome stellt die Hormonabhängigkeit dar. So weisen einige dieser Tumore eine Überexpression der Progesteron-, Östrogen-, sowie des luteinisierenden Hormon Releasing-Hormon (LHRH) -Rezeptors auf, was einen möglichen hormonellen Stimulus auf das Meningeom ermöglichen kann [4,34,93]. Es ist bisher unklar, inwiefern dies mit dem molekularen Pathomechanismus zusammenhängt. Allerdings wird dieser Ansatz weiter dadurch unterstützt, dass Meningeome ein gesteigertes Auftreten in weiblichen Patienten finden und darüber hinaus eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit während der Schwangerschaft aufweisen, bei der eine natürliche Steigerung der Progesteronausschüttung durch den Gelbkörper auftritt [4,34,96]. Auch bei Männern zeigte sich dieser Effekt in einem Fallbericht von Tsutsui *et al.* im Zuge von Hormonbehandlungen mit LHRH-Agonisten bei Prostata-Karzinomen [93].

2.1.2 KLASSIFIKATION UND WHO-GRADING

Die Meningeome werden wie andere primäre Hirntumore nach der neuen WHO-Klassifikation von 2016 eingeteilt. Danach unterscheidet man gutartige WHO-Grad I, atypische WHO-Grad II und anaplastische WHO-Grad III Meningeome. Unter diesen drei Gradierungen lassen sich weitere Subtypen einordnen, die nach histologischen Kriterien definiert sind [105]. Der WHO-Grad I nimmt laut der CBTRUS 80,6%

aller diagnostizierten Meningeome ein [69]. Er zeichnet sich vom Verhalten als langsam wachsend und gutartig aus. Weiter identifiziert er sich durch das Fehlen der definierenden Kriterien der höhergradigen Subtypen, wie unter Grad II und Grad III beschrieben, und kann in eine der in Tabelle 1 genannten histologischen Subtypen eingeordnet werden [60,105].

Der WHO-Grad II nimmt 17,6% innerhalb der Gruppe der Meningeome ein und fällt im Allgemeinen durch ein atypisches Erscheinungsbild auf. Dieser Grad neigt vermehrt zu Rezidiven (achtfach erhöht im Vergleich mit niedriggradigen Meningeomen) [60,69]. Er muss als definierende Merkmale mindestens eines der zwei folgenden Hauptkriterien aufweisen: eine erhöhte Mitoserate mit >4 Mitosen auf 10 Hauptgesichtsfelder (HPF) oder eine Hirninvasion. Außerdem müssen drei der folgenden fünf Kriterien erfüllt sein: Sheeting (also ein Verlust der meningeomtypischen Struktur), kleinzelliger Aufbau, eine Hyperzellularität, Makronukleoli oder Nekrosen [60]. Zu dem Grad II Meningeom zählt man die in **Tabelle 1** genannten Subtypen.

Zuletzt grenzt man den WHO-Grad III ab, der als Alleinstellungsmerkmal einen Mitoseindex von >20 Mitosen auf 10 HPF aufweist und von dem histologischen Erscheinungsbild einen der in **Tabelle 1** genannten Subtypen zugeordnet werden kann. Er nimmt den geringsten Anteil aller diagnostizierten Meningeome mit ungefähr 1,7% ein und zeichnet sich als schnell wachsend und anaplastisch im Wachstumsmuster aus [69,105].

Das Verhalten von Meningeomen und die Klinik allein von der WHO-Gradierung vorherzusagen ist allerdings sehr schwierig, da weitere Faktoren wie die Molekulargenetik, Operabilität und der momentane Zustand des Patienten berücksichtigt werden müssen.

WHO-Grad	Häufigkeit	Subtyp
I	80,6%	Meningotheliales Meningeom
		Fibröses Meningeom
		Transitionales Meningeom (Mischtyp)
		Psammomatöses Meningeom
		Angiomatöses Meningeom
		Mikrozystisches Meningeom
		Lymphoplasmozytenreiches Meningeom
		Metaplastisches Meningeom
II	17,6%	Chordoides Meningeom
		Klarzelliges Meningeom
		Atypisches Meningeom
		Hirninvasives Meningeom
III	1,7%	Papilläres Meningeom
		Rhaboides Meningeom
		Anaplastisches Meningeom

Tabelle 1. WHO-Gradierung der histologischen Subtypen von Meningeomen in absteigender Häufigkeit nach dem CBTRUS [69,105]

2.1.3 KLINIK

Im Allgemeinen treten Meningeome intrakranial, intraspinal und intraorbital auf [69,105]. Intrakranielle Erscheinungsbilder verteilen sich vorwiegend auf die Konvexitätsmeningeome, Meningeome an der Falx und den venösen Sinus, weitere entlang des Olfactoriusgebietes, am Sphenoid oder para- und suprasellär (siehe **Abbildung 2**) [105]. Die spinalen Meningeome befinden sich vor allem thorakal (vergleiche **Abbildung 2**) [69,105]. Abgesehen davon können sich Meningeome auch ekto exprimieren, wie in der Lunge oder an den Fingern, was aber sehr selten auftritt [16,23,40]. Dies muss allerdings von Metastasen intrakranialer oder spinaler Meningeome abgegrenzt werden. In seltenen Fällen können hochgradige Meningeome Metastasen systemisch absetzen, die dann ebenfalls in Lunge, Pleura, Knochen und Leber vorkommen können [105].

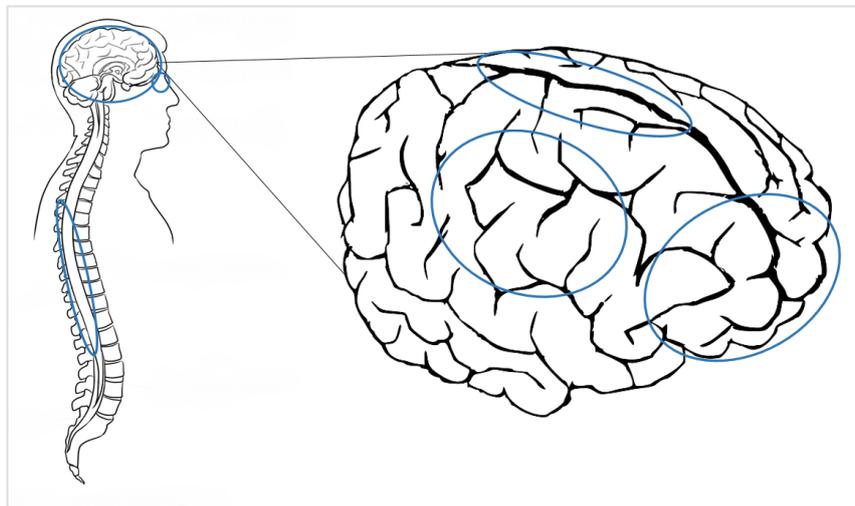


Abbildung 2. Häufige Lokalisationen von Meningeomen: Intrakranial, intraorbital und spinal. Innerhalb der intrakraniellen Verteilung finden sich die Meningeome besonders an der Falx, Konvexität und frontal im Olfactoriusgebiet oder suprasellär. Die Abbildung nach Znayduk wurde weiter modifiziert [108].

Primär gibt es keine Leitsymptomatik des Meningeoms. Einige Meningeome sind symptomlos und werden nur durch Zufall bei radiologischer Diagnostik oder als Autopsiebefund entdeckt [28,65]. Kommt es zu einer Symptomatik, kann diese bei intrakraniellen Auftreten recht unspezifisch in Folge der Verdrängung und Kompression des Hirngewebes ausfallen und sich durch klassische Hirndruckzeichen, wie Nausea oder Zephalgien äußern. Dazu kann es zu Ödembildung und der Entstehung von Liquorzirkulationsstörungen kommen. Ödeme sind dabei vermehrt bei den sekretorischen Meningeomen des Grad I beobachtet worden [9]. Eine speziellere Symptomatik, wie Gesichtsfeldausfälle oder Beeinträchtigungen der Motorik, lässt zusätzlich Rückschlüsse auf die Lokalisation des Tumors zu (siehe **Tabelle 2**).

Grundlegend kann es klinisch neben der Hirndrucksymptomatik zu neurologischen Ausfällen und sekundären Epilepsien kommen. Dies ist von der genauen Lokalisation abhängig und der Beteiligung anatomischer Strukturen. Alle drei WHO-Grade können Strukturen und Gewebe invadieren, obwohl diese Symptomatik vor allem bei Grad III Meningeomen auftritt [105]. So treten neurologische Ausfälle passend zum beschädigten Gebiet auf, wie in **Tabelle 2** dargestellt. Allerdings ist dabei zu beachten, dass in 2-8% multiple Foci existieren, sodass ein diffuser neurologischer Befund auftreten kann [71]. Abschließend ist dabei zu beachten, dass nicht allein die Größe der betreffenden Raumforderung die Klinik bestimmt, sondern weitere Faktoren wie die Wachstumsgeschwindigkeit entscheidend sind. So ist ein geringerer WHO-Grad mit einer langsameren Wachstumsgeschwindigkeit korreliert und gibt dem umgebenden Gewebe somit mehr Zeit, sich an die Raumforderung anzupassen [28,105].

Lokalisation	Mögliche klinische Erscheinung
Konvexitätsmeningeom frontal	Affektive Störungen
Konvexitätsmeningeom parietal	Hemiparese, motorische Ausfälle
Konvexitätsmeningeom temporal	Gedächtnis- und Sprachausfälle
Parasagittal	Motorische und sensorische Ausfälle
Olfactoriusgebiet	Anosmie, affektive Störungen
Tuberculum sellae	Gesichtsfeldausfälle
Opticusgebiet	Anopsie
Orbital	Exophthalmus
Sphenoidal	Gesichtsfeldausfälle, Doppelsichtigkeit, Schizoaffektive Störungen, epileptische Anfälle
Tentoriell	Hydrocephalus, Gesichtsfeldausfälle, Ataxie, epileptische Anfälle
Cerebellär	Ataxie, Schwindel, Hydrocephalus
Spinal	Hemiparesen, motorische und sensible Ausfälle

Tabelle 2. Häufige Lokalisationen und daraus resultierende Klinik von Meningeomen nach Grossmann *et al.* [28]

2.1.4 DIAGNOSTIK

Je nach Symptomatik sind einige der folgenden diagnostischen Schritte angezeigt. Nach der Anamnese und der klinischen Untersuchung ist primär eine Bildgebung indiziert. Für eine schnelle Einschätzung ist dabei die Computertomographie (CT) mit und ohne Kontrastmittel sinnvoll. Schon so kann oft eine Hypothese bestätigt werden. Dabei zeigen sich die Meningeome im Nativ-Computertomogramm des Neurocraniums als scharf begrenzte Raumforderung bei iso- bis hyperdenser Erscheinung. Sie können Kalzifikationen aufweisen, die sich später histologisch bestätigen lassen [4]. Dabei ist auf eine enge Schnittführung zu achten, um die Ausdehnung des Tumors genau zu erfassen. Außerdem ist die Darstellung des Knochenfensters bei der Nativ-CT wichtig, um bei der chirurgischen Therapie eine Kalottenbeteiligung und Invasion von umgebendem Gewebe ausschließen zu können [28]. Bei einer Kontrastmittel-gestützten CT nimmt das Meningeom homogen Kontrastmittel auf und in circa 50% der Fälle zeigt sich ein perifokales Ödem [4,9].

Nach der Bestätigung der Diagnose in der Computertomographie sollte eine Bildgebung in der Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen, da dies eine genauere Aussage über die Gewebestruktur generiert. Diese gilt als Goldstandard in der genauen Darstellung des Meningeoms und dessen Beziehung zu den umgebenden anatomischen Strukturen und kann zusätzlich zu der Computertomographie weitere Erkenntnisse erbringen. Auch dabei kann eine Kontrastmittel-Verabreichung erfolgen, die dann ähnlich wie in dem Computertomogramm eine homogene Anreicherung des Tumors zeigt [28]. Ergänzend zu der Nativ-MRT des Neurocraniums können bei spezielleren Fragestellungen zusätzliche Untersuchungen wie eine Funktions-MRT, eine MRT-Spektroskopie oder eine Subtraktionsangiographie beziehungsweise MR-Angiographie angedacht werden, wobei letztere bei einem Verdacht auf eine Gefäßinvasion indiziert ist oder falls eine Tumorembolisation als Therapieoption erwogen wird [4].

Im Falle eines operativen Vorgehens erfolgt in der Regel eine histologische Probeentnahme. Dadurch kann bei bis dato fraglicher Diagnose eine erste Einschätzung zur Dignität des Tumors erfolgen. Darüber hinaus kann erst durch die histologische Aufarbeitung des operativ entnommenen Probematerials eine Einteilung in die drei WHO-Grade, sowie eine Einschätzung des Verhaltens des Tumors erhoben werden. Es werden je nach untersuchendem Institut unterschiedliche histologische Marker als Standarduntersuchung herangezogen. In dem neuropathologischen Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes erfolgt dabei in der Routinediagnostik für Meningeome die Darstellung des Gewebes in Paraffin eingebettet sowie als geschnittenes Nativgewebe. Für die allgemeine Einschätzung des histologischen Subtyps nach WHO werden die Schnitte in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) evaluiert. Für eine weiterführende klinische Einschätzung des Patienten werden zusätzlich das epitheliale Membranantigen (EMA), die alkalischen Phosphatase (AP), der Progesteronrezeptor (PR) und eine Zählung der Mitoserate auf 10 HPF beurteilt. Zusätzlich dazu können bei weiterer Fragestellung beispielsweise Vimentin, Ki67 oder S100 hilfreich sein. EMA ist ein Marker für die meningotheleale Differenzierung des Meningeoms und verliert sich, je höher der WHO-Grad ist. Trotzdem ist dieser Marker bei Meningeomen am deutlichsten exprimiert und repräsentiert die epithelialen Eigenschaften [2,105]. Im Gegensatz dazu ist Vimentin als Repräsentation der mesenchymalen Natur des Meningeoms positiv und deshalb unspezifisch im Hinblick auf die Differenzierung. Die Mitoserate ist nach WHO hinsichtlich der Gradierung definierend, wie im Kapitel „Klassifikation und WHO-Grading“ beschrieben [105].

Abschließend ist die molekulargenetische Charakterisierung eine neue, wenn auch bisher nur unterstützende Methode der Diagnostik, die in den Einteilungen nach WHO noch keine Verwendung gefunden hat, aber durch Chromosomen- und Proteinanalysen eine neue Möglichkeit der Einschätzung des Meningeoms in Hinsicht auf Gradierung und klinisches Erscheinungsbild werden könnte.

2.1.5 THERAPIE UND PRÄVENTION

Die Heilung eines Meningeoms ist nur durch die Entfernung des entarteten Materials gegeben. Dabei kann chirurgisch, radiologisch-interventionell oder interdisziplinär vorgegangen werden. Allerdings ist es wichtig, individuell abzuwägen, welches der genannten Verfahren gewählt wird oder ob sogar ein konservatives Vorgehen durch Observation möglich ist [28].

Der Goldstandard in der Therapie des Meningeoms ist generell die möglichst vollständige Entfernung des neoplastischen Gewebes. Dabei ist eine radikalere Operation trotz der Risiken hinsichtlich der Langzeitprognose günstiger, um Rezidive zu vermeiden. Trotzdem sollte ein Therapievorgehen hinsichtlich der individuellen Risiken des jeweiligen Patienten gewählt werden, denn die Lokalisation, die Größe der Raumforderung und die endgültige Klassifikation nach WHO können dieses wesentlich beeinflussen [28]. Generell ist es zu empfehlen, eine R0-Resektion anzustreben, also eine vollständige Entnahme der Raumforderung. In diesen Fällen kann auch eine Exzision der anhängenden Dura und bei Knochenbeteiligung der Kalotte mitsamt des Periosts notwendig werden. Die Radikalität und das Ausmaß der Entfernung des Gewebes verbunden mit der damit korrelierten Rezidivrate werden nach Simpson *et al.* in 5 Grade eingeteilt (siehe **Tabelle 3**) [85].

Simpson Grad	Definition	Rezidivrate nach Simpson <i>et al.</i>
1	Makroskopisch komplett entfernter Tumor mitsamt anheftender Dura, sowie anheftenden Knochen	9%
2	Makroskopisch komplett entfernter Tumor mitsamt anheftender Dura	16%
3	Makroskopisch komplett entfernter Tumor	29%
4	Teilresektion	39%
5	Dekompression	/

Tabelle 3. Einteilung nach Simpson der Rezidivrate von Meningeomen nach operativer Entfernung [85]

Es ist auffällig, dass bei Simpson Grad 1 mit radikalstem Vorgehen trotzdem eine Rezidivrate von 9% auftritt. Dieser Effekt könnte durch anteilige höhergradige Meningeome entstanden sein. Die Rezidivrate steigt mit zunehmendem Simpson Grad. Wichtig ist, dass ohne Kalottenentfernung auch einige Zeit nach der chirurgischen Explantation noch Nester von Tumorzellen im Knochen gefunden werden können [85].

In der Praxis erfolgt neben der kompletten Entfernung, nach histologischer Begutachtung, bei höhergradigen Meningeomen gegebenenfalls eine Folgetherapie. Bei den höhergradigen Meningeomen zeigt es sich hinsichtlich der Überlebenszeit und des Auftretens von Rezidiven als vorteilhaft, eine adjuvante Strahlentherapie durchzuführen [20,22]. Dies gilt, unabhängig ihres histologischen WHO-Grades, ebenfalls für Meningeome die nur partial oder gar nicht entfernt werden können. Für diese Patientengruppen zeigten Glaholm *et al.* eine signifikante Steigerung der Überlebenszeit, besonders im

Hinblick auf das Langzeitüberleben [25]. Bei der durchgeführten Strahlentherapie (stereotaktische Radiotherapie) werden abhängig vom WHO-Grad Bestrahlungsmengen von 54 bis 60 Gy Gesamtherddosis empfohlen, die über eine mehrtägige Behandlungsdauer fraktioniert werden [22].

Radiologisch-Interventionelle Methoden umfassen den Bereich der Tumorembolisation. Dies hat bisher keinen prognostischen Vorteil gegenüber dem chirurgischem Verfahren gezeigt. Es stellt eher ein Problem dar, dass der Tumor nach erfolgter Embolisation nekrotisch zerfällt und eine weiterführende Diagnostik wie im oben beschriebenen Rahmen erschwert [28]. Bei chirurgisch ungünstig zu erreichenden Raumforderungen oder bei präoperativ erwartetem erhöhten Blutungsrisiko des Patienten ist das interventionelle Vorgehen jedoch eine Alternative [6]. Eine Ausnahme stellt die Kombination der beiden Fachdisziplinen als sogenannte Radio-Chirurgie dar, die in Einzelfällen bei einem erhöhten Morbiditätsrisiko bei singulärer Chirurgie erwogen werden kann [28,47].

Die Chemotherapie als weitere Therapieoption stellt bisher keinen wesentlichen Anteil in der Behandlung von Meningeomen dar. In Einzelfällen kann sich die Gabe von Hydroxyurea bei Inoperabilität oder Ausnutzung der Alternativen als hilfreich erweisen, stellt allerdings keine Option für das mehrheitliche Patientengut dar [28]. In der Therapie von Rezidiven und nicht operierbaren Tumoren kann auch nach Ausschöpfung von chirurgischen und radiologischen Optionen eine Immuntherapie durch Interferon-alpha oder einer Hormontherapie bei PR-positiven Tumoren erwogen werden [86]. Diesbezüglich ist es wünschenswert, dass der Pathomechanismus hinter der Entstehung von Meningeomen als Tumorentität weiter untersucht wird und sich darauf basierend möglicherweise Targettherapien entwickeln lassen.

Darüber hinaus hat es sich in einigen Fällen gezeigt, dass auch ein konservatives Vorgehen durch Observation gewählt werden kann, bei der das Meningeom lediglich in zeitlichen Abständen regelmäßig radiologisch kontrolliert wird. Dies ist der Fall bei bestehender Symptombefreiheit und einer bewiesenen Stagnation des Wachstums. Vor allem in der geriatrischen Patientengruppe stellt dieses Vorgehen eine gute, weil nicht-invasive Methode dar, da sich oft bereits kalzifizierte Meningeome in dieser Patientengruppe vorfinden, die einen radiologischen Zufallsbefund darstellen [28].

Wichtig ist die Tertiärprävention durch regelmäßige Kontrollen, um Rezidive rechtzeitig zu erkennen und bestmöglich zu agieren. Diesbezüglich empfiehlt die Literatur MRT-Kontrollen nach sechs Monaten, einem Jahr und darauf folgend zwei Jahren. Bei vorheriger Knochenbeteiligung können dazu weitere CT-Untersuchungen nötig werden. Insgesamt können bis 10 Jahre nach Diagnosestellung Nachkontrollen nötig sein. Danach kann von einer Heilung ausgegangen werden [28].

2.1.6 PROGNOSE

Die Prognose eines Meningeoms ist abhängig von mehreren Faktoren. Am ehesten lässt sie sich über die Gradierung einschätzen. Dabei weisen in der Übersicht der CBTRUS die niedriggradigen Meningeome eine 10-Jahres-Überlebensrate von 81,5% auf, wohingegen höhergradige Meningeome eine 10-Jahres-Überlebensrate von 53,5% zeigen. In beiden Unterteilungen fällt jeweils auf, dass sich mit zunehmendem Alter der untersuchten Patienten die 10-Jahres-Überlebensrate verringert [69]. Damit ist ein höheres Alter bei Diagnosestellung als prognostisch ungünstig zu sehen und ist vermutlich durch höhere Vulnerabilität im Hinblick auf die operative Therapie begründet.

Auch die Rezidivhäufigkeit lässt sich über die Gradierung abschätzen. So haben gutartige Meningeome des WHO-Grad I eine Rezidivhäufigkeit von 7-25%, Meningeome des WHO-Grad II schon eine Rezidivhäufigkeit von 29-52% und die hochgradigen Meningeome des WHO-Grad III ein Maximum einer Rezidivhäufigkeit von 50-94% [105]. Demzufolge entspricht bei gutartigen Meningeomen eine vollständige Entfernung meist einer Heilung, während bei höhergradigen Meningeomen längere Nachkontrollen eher erforderlich sind.

Die WHO-Gradierung beschränkt sich bisher auf die rein histologische Einstufung des Meningeoms, was nicht allein prognostisch entscheidend ist. Zusätzlich ist die Größe und Lokalisation der Raumforderung prognostisch mitbestimmend [28]. Dies zeigt sich zum Beispiel in den Untersuchungen der CBTRUS, in denen spinale Meningeome unabhängig ihres Malignitätsgrades eine höhere 10-Jahres-Überlebensrate aufweisen als bei kranialen Ausprägungen [69]. Ob dies mit der Operabilität oder der unterschiedlichen Symptomatik zusammenhängt, ist fraglich. Es zeigt sich allerdings, je radikaler die Exzision des Meningeoms erfolgt, desto besser ist die Langzeitprognose hinsichtlich Überleben und Rezidivaufreten [85].

Neben der histologischen Beurteilung, kann es durchaus Sinn machen, molekularbiologische Untersuchungen mit in die Prognoseeinschätzung einzubeziehen. So zeigen Linsler *et al.*, dass eine Korrelation zwischen einer Verschlechterung der Prognoseparameter und einer sogenannten „Loss of Heterozygosity“ bestimmter chromosomaler Teilbereiche besteht. Dies wird besonders deutlich bei Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1. Dieser Parameter zeigt sich als Prädiktor für eine kürzere Überlebensrate und erhöht in der zitierten Studie die Rezidivwahrscheinlichkeit um bis 15% [57]. Hinzu kommen weitere Parameter, wie der Mutationszustand der Alkalische Phosphatase, beziehungsweise Mutationen des TERT-Promotors, die sich beide durch eine deutlich ungünstigere Prognose auszeichnen [2,12,26,63]. Besonders bei solchen Patienten wären individuelle Follow-up-Untersuchungen wichtig für den weiteren Krankheitsverlauf.

2.2 MOLEKULARZYTOMETRIK VON MENINGEOMEN

2.2.1 CHROMOSOMENABERRATIONEN

Bei bisherigen Untersuchungen an Meningeomen wurden in etwa 60% der Fälle Chromosomenaberrationen festgestellt [44,57]. Ketter *et al.* konnten basierend auf ihren Untersuchungen ein Fließschema erstellen, in welcher Reihenfolge sich diese Aberrationen am häufigsten entwickeln. Dabei tritt als erstes der Verlust des Chromosoms 22 auf, gefolgt von dem kurzen Arm des Chromosoms 1. Anschließend können unterschiedliche Chromosomenverluste darauf folgend auftreten: Zum einen der Verlust des Chromosoms 14, worauf weitere Abweichungen bis hin zum Verlust der Gonosomen auftreten, zum anderen der Verlust des Chromosoms 6. Evident ist dabei, dass innerhalb der Geschlechter leichte Unterschiede in der Abfolge der Chromosomen 1 und 14 zu finden sind [44]. Das Schema ist in **Abbildung 3** abgebildet und verdeutlicht auch geschlechterspezifische Unterschiede.

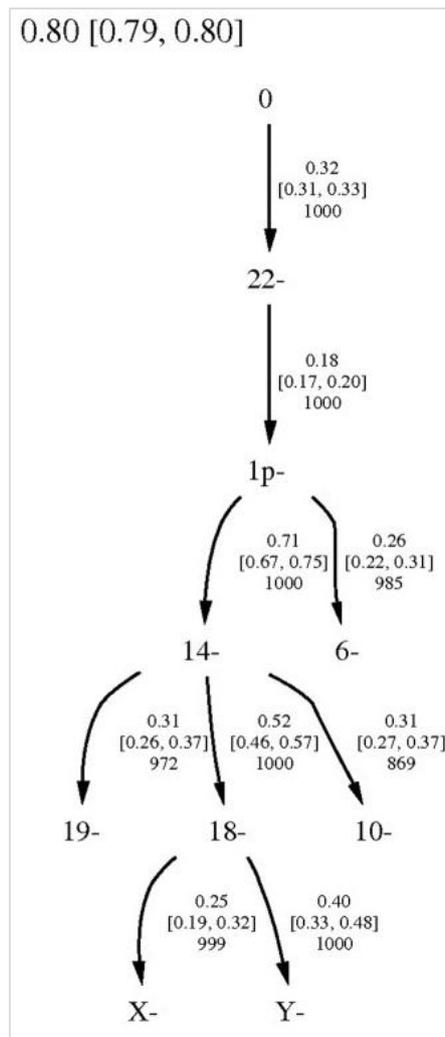


Abbildung 3. Fließschema der Chromosomenaberrationen bei Meningeomen in chronologischer Reihenfolge nach Ketter *et al.* [44]

Der oberste Wert stellt dabei die gesamte konditionale Wahrscheinlichkeit, der mittlere Wert das Konfidenzintervall und der unterste Wert die Häufigkeit dieses Parameters in Tausend Bootstrap-Verfahren dar (übernommen nach Ketter *et al.*).

Nach dem (Teil-)Verlust auf dem Chromosom 22, kommt es am wahrscheinlichsten im Hinblick auf alle Patienten und Tumorgrade zu Verlusten auf dem Chromosom 1p, sofern weitere Veränderungen auftreten. Wenn nur die männliche Patientengruppe analysiert wird, ist auffällig, dass statt des Chromosoms 1 das Chromosom 14 am zweit häufigsten alteriert ist [44]. Da allerdings Frauen mit einem höheren Anteil in den Studien vorkommen, ist es im Durchschnitt an zweiter Stelle in der Grafik zu finden.

Beim Auftreten einer Monosomie fällt ein Allel beider elterlicher Allele komplett weg. Somit kommt es funktionell zu einer Homozygotie des betroffenen Gens. Falls auf dem verbleibenden Allel eine beschädigte Version vorliegt, sei es durch funktionelle Mutation oder Expressionsunterschiede, kann es

zu pathologischen Prozessen kommen, da kein intaktes Allel zum Ausgleich mehr vorliegt. Man bezeichnet dieses Phänomen auch als „Loss of Heterozygosity“ (folgend als „LOH“ bezeichnet), also aus dem Englischen einen Verlust der physiologisch bestehenden Heterozygotie durch zwei Allele, die jeweils von einem Elternteil stammen [72].

In dieser Arbeit wird der Fokus vor allem auf das Chromosom 22, das Chromosom 1 und das Chromosom 14 gelegt, die alle im frühen Verlauf der chromosomalen Änderungen eine Rolle spielen. Auf diesen Hotspots für veränderten Chromosomen finden sich der Genloki der Proteine BAF47 (auch SNF5 oder *SMARCB1*, lokalisiert auf 22q11.23), BAF45c (auch DPF3, lokalisiert auf 14q24.2) und BAF250a (auch ARID1A oder *SMARCF1* lokalisiert auf 1p36.11), die folgend näher erläutert werden und den Kernbereich dieser Arbeit darstellen.

2.2.1.1 CHROMOSOM 22Q

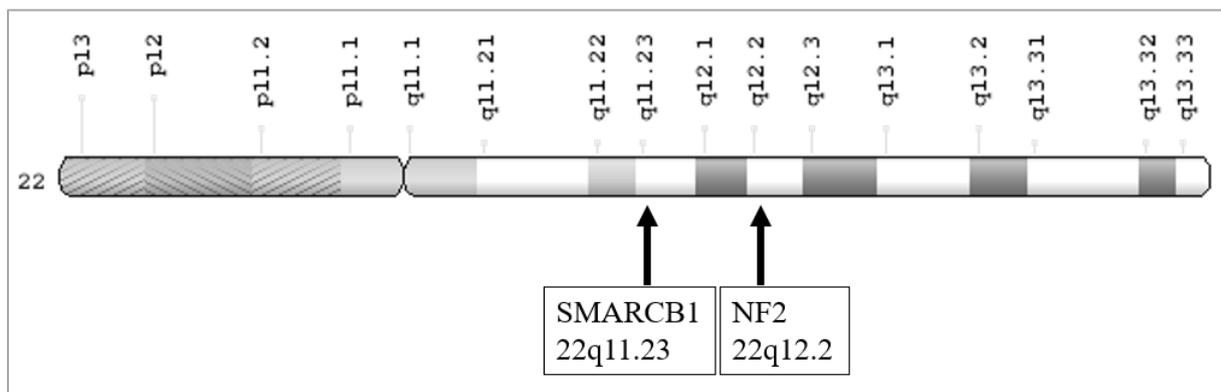


Abbildung 4. Chromosom 22, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].

Als erste auftretende Aberration findet sich am häufigsten die Monosomie 22 [44,60], meist handelt es sich um einen Verlust des langen Arms des Chromosoms 22 [101]. Diese Alteration findet sich laut Linsler *et al.* bei 45% der Meningeome des WHO-Grades I, bei 48% des WHO-Grades II und bei ungefähr 75% des WHO-Grades III, korreliert aber nicht mit der Rezidivwahrscheinlichkeit bei isoliertem Auftreten [44,57]. Trotzdem wird sie vielfach als Initiator der Tumorentstehung vermutet, die weitere genetische Aberrationen zur Folge hat [60,91,101]. Auffallend ist auch, dass verschiedene histologische Subtypen und Lokalisationen Unterschiede in der Ausprägung einer Alteration des Chromosoms 22 aufweisen: So evaluierten Baser und Poussaint in einer Metaanalyse über benigne Meningeome, dass sich dies am häufigsten in fibrösen Meningeomen (86%) und am seltensten in meningoethelialen Meningeomen (46%) findet und darunter am seltensten in der Schädelbasis. In derselben Studie wurde ebenfalls gefolgert, dass mit zunehmendem Patientenalter auch das Auftreten

der Monosomie des Chromosoms 22 zunimmt, was mit abnehmender Potenz der molekularen Reparatursysteme zusammenhängen könnte [5].

Die Funktion des Chromosoms 22 hinsichtlich der Tumorentstehung liegt vor allem in seiner Rolle als Initiator der Kanzerogenese, unabhängig vom WHO-Grad [44,101]. Vermutete Ursache ist das Vorhandensein des Genlokus des Neurofibromatose-2-Gens auf dem Chromosom 22, bei dessen Mutation sich die Krankheit der gleichnamigen Neurofibromatose Typ 2 entwickelt. Das *NF2*-Genprodukt ist das Tumorsuppressorprotein Merlin, das bei den auftretenden Mutationen verkürzt und dadurch eventuell inaktiv vorliegt [60]. Betroffene Patienten dieser Mutation weisen unter anderem ein stark gesteigertes Auftreten von Meningeomen und Schwannomen auf. Folgend auf diese Erkenntnis wurde überprüft und gefunden, dass auch bei sporadisch auftretenden Meningeomen ohne familiäre Vorbelastung eine LOH des Chromosoms 22 bei gleichzeitiger Schädigung des *NF2*-Gens auftritt [60]. Letzteres ist bei 60% der sporadischen Meningeome mutiert [28,102]. *NF2*-Mutationen treten außerdem häufiger bei fibrösen Meningeomen als bei meningoethelialen Meningeomen auf [48,102], was interessanterweise mit der oben beschriebenen Auftrittshäufigkeit der Aberration auf Chromosom 22 bei den unterschiedlichen histologischen Subtypen einhergeht.

Es ist bisher unklar, welche Mechanismen bei den anderen histologischen Subtypen, wie sekretorischen oder psammomatösen Meningeomen eine Rolle spielen und die Tumorentstehung initiieren. Eine Möglichkeit stellt dabei das Gen *SMARCB1* dar, dessen Genlokus sich auf dem chromosomalen Abschnitt 22q11.23 befindet und ebenfalls durch eine LOH betroffen sein kann. Das daraus entstehende Protein BAF47, eine Untereinheit des SWI/SNF Chromatin Remodelierungskomplexes, wird in dieser Arbeit deshalb weiter evaluiert und in dem Kapitel 2.2.2.1 genauer vorgestellt.

2.2.1.2 CHROMOSOM 1P

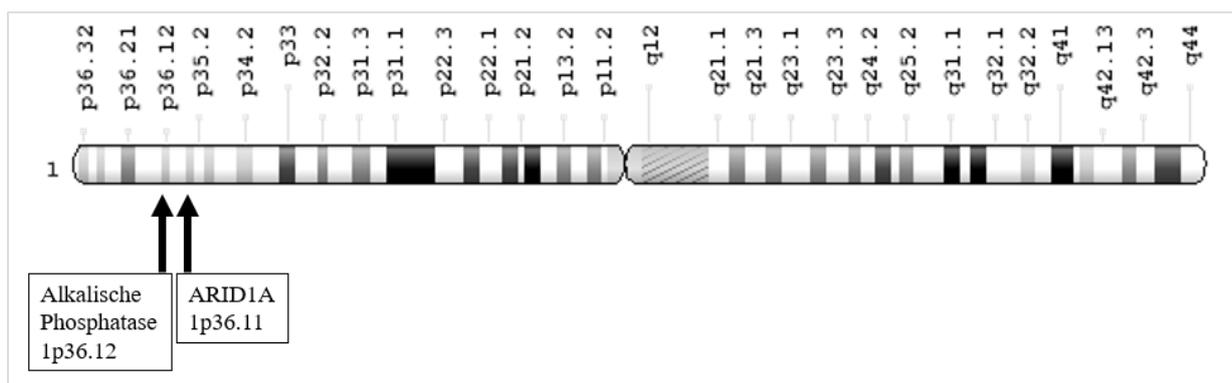


Abbildung 5. Chromosom 1, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].

Linsler *et al.* analysierten das Auftreten von Alterationen auf Chromosom 1p abhängig des WHO-Grades. Bei Meningeomen, die dem WHO-Grad I zugeordnet sind, weisen dabei nach Linsler *et al.* circa 27% eine Alteration auf. Bei Meningeomen des Grad II sind es ebenfalls etwa 27%. Auffällig ist, dass bei der Gruppe von WHO-Grad III Meningeomen 87,5% eine LOH auf dem Chromosom 1p aufweisen [57]. Es eröffnet die Überlegung, ob dies eine Rolle im Pathomechanismus der Entstehung von den höhergradigen Subtypen, beziehungsweise den Übergang von Grad I zu Grad II spielt. Dies bestätigte sich in klinischen Beobachtungen, in denen eine LOH auf 1p unabhängig vom histologischen Subtyp eine schlechtere Prognose für den Patienten darstellt [44,73,105]. Zusätzlich scheint ein erhöhtes Risiko für ein rezidivierendes Auftreten bei 1p-Verlusten vorhanden zu sein, vor allem durch das kombinierte Auftreten mit einem Verlust des Chromosoms 9p [44,57].

Der kurze Arm des Chromosoms 1 weist häufig Alterationen bei den unterschiedlichsten Tumorentitäten auf. Speziell die Region um 1p36 ist häufig mitbetroffen [61]. Ein interessanter Genlokus ist dabei das *ARID1A*, eine weitere Untereinheit des SWI/SNF Chromatin Remodelierungskomplexes, das sich auf 1p36.11 befindet und im Verlauf dieser Arbeit näher betrachtet wird. Zusätzlich wird in der diagnostischen Routine häufig der Status der alkalischen Phosphatase (1p36.12) in der Histologie des Tumors genutzt, um Rückschlüsse über den chromosomalen Status zu erheben. Ein Verlust der Gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase lässt einen 1p-Verlust vermuten [12,63].

2.2.1.3 CHROMOSOM 14Q

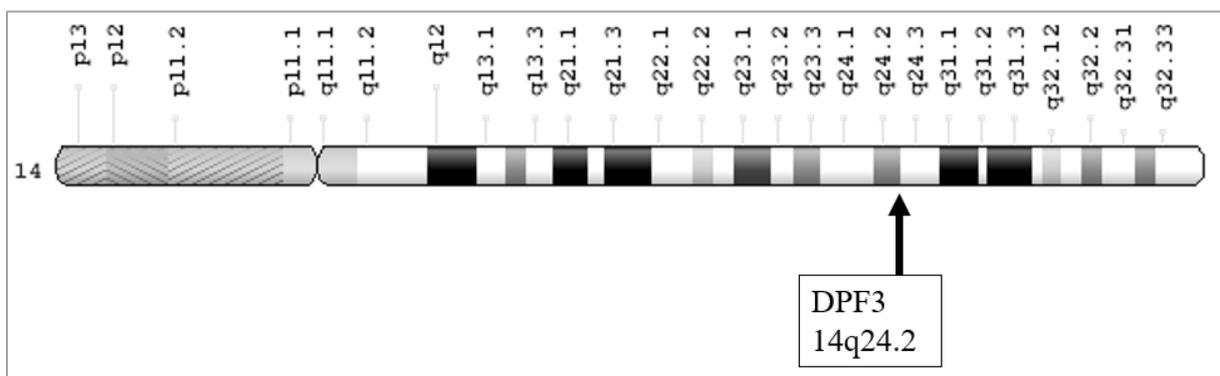


Abbildung 6. Chromosom 14, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].

Wie bereits in **Abbildung 3** veranschaulicht, alteriert das Chromosom 14 nach dem Chromosom 1. Unterteilt man die Analyse nach Geschlechtern, weist dieses bei Männern sogar häufiger eine Deletion auf als Chromosom 1. [44].

Eine Monosomie des Chromosomenarms 14q zeigt sich vor allem bei den höhergradigen Meningeomen. In der Literatur finden sich Werte zwischen 21% bis 30% für die Auftrittshäufigkeit dieses

Chromosomenverlustes bei Grad I Meningeomen, während die höhergradigen Meningeome diese gesamt bei 52,5% bis 62,5% aufweisen [92,101]. Weber *et al.* analysierten dies noch detaillierter und zeigten bei Meningeomen vom WHO-Grad II einen Verlust bei 43% und bei Meningeomen vom Grad III sogar bei 63% der untersuchten Fälle [101]. Im Allgemeinen korreliert diese Deletion mit einem erhöhten Rezidivrisiko für die betreffenden Patienten [44,92].

Auch auf Chromosom 14 ist eine Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes, DPF3 (BAF45c), kodiert, die genauer auf dem Chromosomenabschnitt 14q24.2 lokalisiert ist und in der vorliegenden Arbeit proteinanalytisch wie bereits SNF5 und ARID1A untersucht wurde. In einer Arbeit von Tse *et al.* wurden zwei Regionen analysiert, die am häufigsten alteriert bei einer LOH auftraten, 14q24.3-31 und 14q32.1-32.2 [92]. In diesem Bereich wurde ein weiteres Gen gefunden: *TMEM30B* auf 14q23.1, das kodierend für einen transmembranen Faktor ist, der im Zellzyklus teilnimmt und bei Meningeomen herabreguliert vorlag [73]. Dies sind allerdings bisher nur Vermutungen, welche Gene auf Chromosom 14q an dem Pathomechanismus teilhaben könnten.

2.2.1.4 WEITERE CHROMOSOMENABERRATIONEN

Da sich diese Arbeit vor allem auf die Veränderungen und die daraus resultierenden Pathomechanismen der Chromosomen 1, 14 und 22 fokussiert, werden im Folgenden weitere wichtige Alterationen nur im Allgemeinen behandelt, um die Thematik weiter einzuordnen.

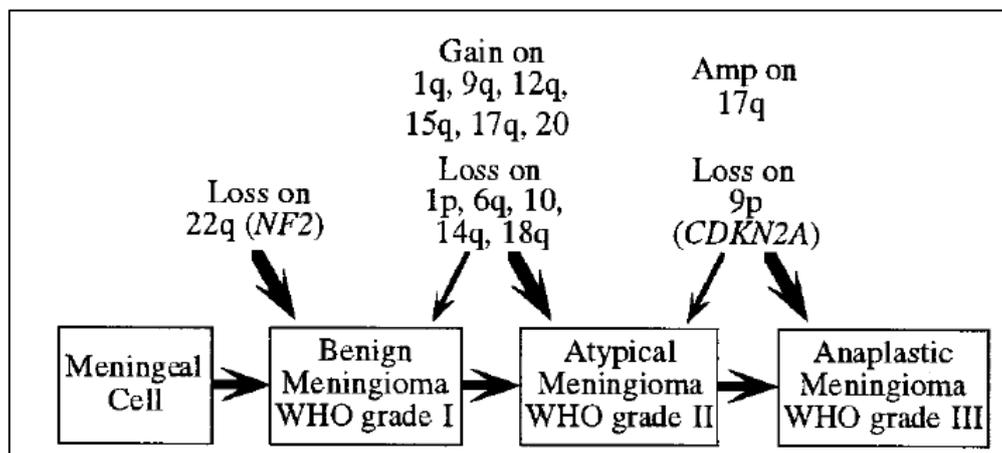


Abbildung 7. Modell über Chromosomenaberrationen in Meningeomen nach Weber *et al.*. Diese wurden hier ab einer Auftrittshäufigkeit von 30% aufgenommen. Die dünneren Pfeile stehen hier für die Alterationen in niedriggradigen Meningeomen mit einer Auftrittshäufigkeit von < 30%.

Im Hinblick auf **Abbildung 3** fällt auf, dass nicht allein die Alteration der drei genannten Chromosomen 1p, 14q und 22q entscheidend auf den Pathomechanismus wirken. Weitere Chromosomenalterationen zeigen sich dort sowie zusätzlich in der **Abbildung 7** von Weber *et al.* [101]. In Letzterer entwerfen die

Autoren ein Schema, inwiefern die unterschiedlichen Chromosomenalterationen mit einer Steigerung der Malignität einhergehen. Sie stellen weiter heraus, dass vor allem bei Meningeomen des WHO-Grades III eine LOH auf Chromosom 9p zu finden ist. Diese findet sich genauer auf 9p21, dem Genlokus von *CDKN2A*, dessen Genprodukt p16 ein Tumorsuppressor ist. Auffällig ist zudem, dass Weber *et al.* zusätzlich die Bedeutung von chromosomalen Zunahmen als weiteren prognostischen Faktor mit einbeziehen und nicht alleinig ein Verlust chromosomaler Abschnitte bei der Pathogenese eine Rolle spielt [101]. Dies ist ebenfalls der **Abbildung 1** zu entnehmen, in der Bi *et al.* bestätigten, dass sich abhängig vom WHO-Grad unterschiedliche Profile an Chromosomenverlusten und –zugewinnen darstellen [7].

2.2.2 ATP-ABHÄNGIGES CHROMATIN-REMODELING

Bei der Regulation des Chromatins, das die DNA zusammen mit ihren Stabilisierungsproteinen, wie den Histonen, umfasst, sind die ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplexe funktionell mitwirkend. Der Proteinkomplex agiert bei der Wicklung der DNA um die Histone mit und hilft kondensierte Bereiche zu transkribieren, replizieren oder reparieren. Nur so ist eine Regulation der Genexpression und normalen Zellfunktion möglich. Dabei werden die biochemischen Prozesse durch Energiegewinnung aus einer ATP-Spaltung initiiert [15]. Dargestellt in **Abbildung 8** findet sich dieser Komplex in seinen Hauptfunktionen.

Insgesamt existieren vier Gruppen von Komplexen: SWI/SNF, ISWI, INO80 und CHD [15,33]. Je nach Quelle wird ebenfalls der SWR1 Komplex dazu gezählt, dieser kommt allerdings nur bei Hefe vor [15,104]. Alle Komplexe zeigen im Allgemeinen die gleichen fünf Funktionen: Nucleosomen- und DNA-Affinität, Untereinheiten zur Erkennung von kovalent modifizierten Histonen, eine DNA-abhängige ATPase, ATPase-regulierende Faktoren und Untereinheiten, die mit weiteren regulatorischen Strukturen und Transkriptionsfaktoren interagieren können [8,15,103]. Untereinander differenzieren sich die Komplexe durch spezifische Funktionen, wie beispielsweise die Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren.

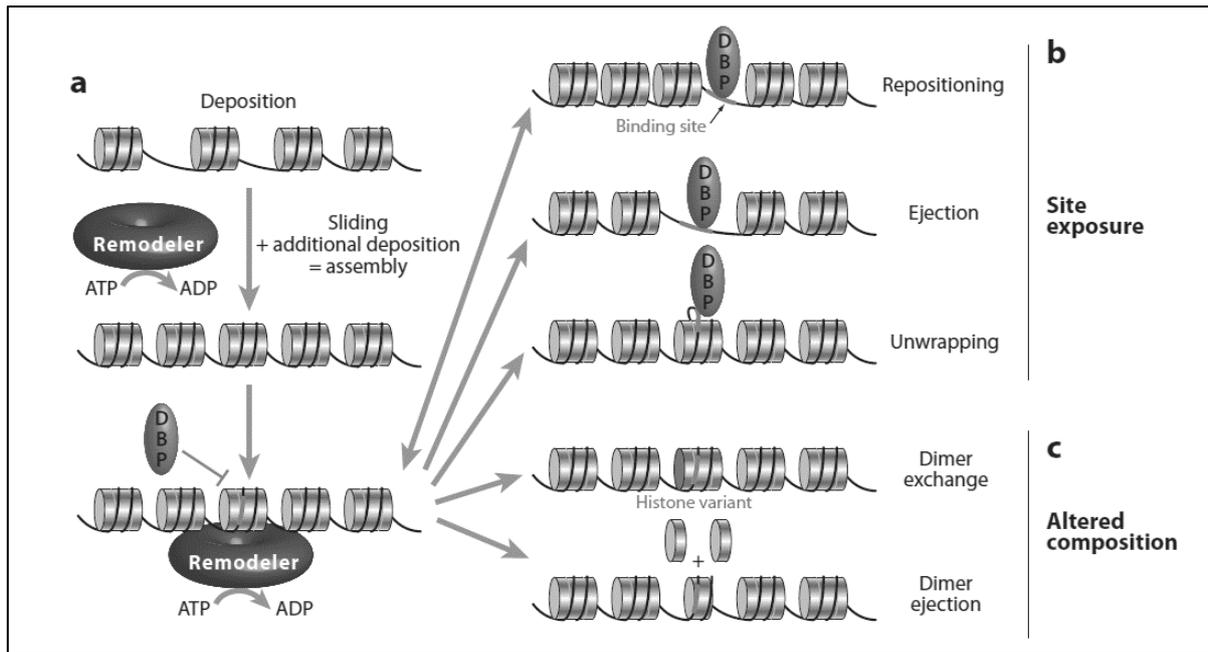


Abbildung 8. Wirkungsweise der ATP-abhängigen Remodeling-Komplexe nach Clapier und Cairns *et al.* [15]

Der Komplex wirkt an der Komposition der Bestandteile des Chromatins. So stellt die Anlagerung des Proteinkomplexes den Ausgangspunkt für verschiedene Chromatininteraktionen dar (siehe **Abbildung 8 a**). Folgend können Abschnitte der DNA zur Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen (DBP) durch Reposition und Ejektion der Histone oder Freilegen der betreffenden DNA-Abschnitte aufgedeckt werden (siehe **Abbildung 8 b**). Eine weitere Funktion stellt die Alteration der Komposition von Histonen dar (siehe **Abbildung 8 c**) [15].

In dieser Arbeit werden einige Untereinheiten des SWI/SNF-Komplex untersucht. Dieser wurde erstmalig in der Hefe „*Saccharomyces cerevisiae*“ entdeckt. Aus den beschriebenen Untereinheiten der Hefe konnten Homologien zu humanen Untereinheiten abgeleitet werden, da sich die Komplexe in funktionellen und morphologischen Aspekten stark ähneln [99]. Der humane Komplex ist Gegenstand intensiver Forschung. Es werden zum jetzigen Zeitpunkt je nach Quelle zwischen 8 und 14 Untereinheiten des Komplexes beschrieben und dieser hat damit eine ungefähre Größe von 2 MDa [15,45,99]. Dabei ist die Gesamtstruktur sehr heterogen und variabel, sodass hunderte verschiedene mögliche Zusammensetzungen des Komplexes aus den Untereinheiten existieren, die scheinbar mit leicht unterschiedlichen Affinitäten und Funktionen einher gehen [82,99]. Zentral steht eine von zwei katalytischen DNA-abhängigen ATPasen: BRM oder BRG1, die jeweils eine sehr ähnliche Struktur aufweisen [99]. Eine feststehende Untereinheit bei allen SWI/SNF-Kombinationen ist BAF47, das Homolog zu der SNF5-Untereinheit der Hefe [42,99]. Weitere wesentliche Untereinheiten sind die Proteine BAF155 und BAF170 [41]. Je nach Zusammensetzung der weiteren Untereinheiten unterscheidet man zwischen einem BAF- (SWI/SNF-A) oder PBAF-Komplex (SWI/SNF-B). Einige

Proteinuntereinheiten sind dabei spezifisch für den jeweiligen Komplex. So sind beispielsweise BAF250a und BAF250b nur im SWI/SNF-A vertreten und BAF180 nur in SWI/SNF-B [99].

Einige dieser Untereinheiten sind dabei von besonderem Interesse im Hinblick auf die physiologische Normalfunktion und pathologische Abweichungen durch Änderungen des kodierenden Genoms oder der daraus resultierenden Produkte. Es wird geschätzt, dass 20% aller humanen Malignome eine Veränderung des SWI/SNF-Komplexes aufweisen [39].

2.2.2.1 *BAF47/INI1/SNF5 (SMARCB1)*

Die Proteinuntereinheit BAF47 ist in beiden Formen des humanen SWI/SNF-Komplexes vorhanden. Der kodierende Genlokus *SMARCB1* liegt auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q11.23) [97]. Für dieses Protein und das zugehörige Gen existieren insgesamt vier synonym verwendete Begriffe. Die gängigsten Bezeichnungen sind BAF47 als die Bezeichnung des humanen Proteins (44kDa) oder *SMARCB1* für das betreffende Gen. Letzterer Begriff wird auch für die Beschreibung des Proteins genutzt. Wie oben aufgeführt, ist BAF47 homolog zum Hefeprotein SNF5p, das in der Hefe dieser Untereinheit entspricht. Trotzdem wird auch SNF5 häufig als Beschreibung der humanen Form genutzt [59,99]. Des Weiteren ist diese Untereinheit im Zuge der Forschung des Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) aufgefallen. Es bindet und stimuliert die HIV-spezifische Integrase und wurde daher als „Integrase-Interactor-1“ (INI-1) benannt [42]. Dies wird auch außerhalb der Untersuchungen bezüglich des HIV-Virus oft synonym genutzt [104]. Zusätzlich existieren einige weitere Termini, die allerdings nicht im generellen Gebrauch üblich sind.

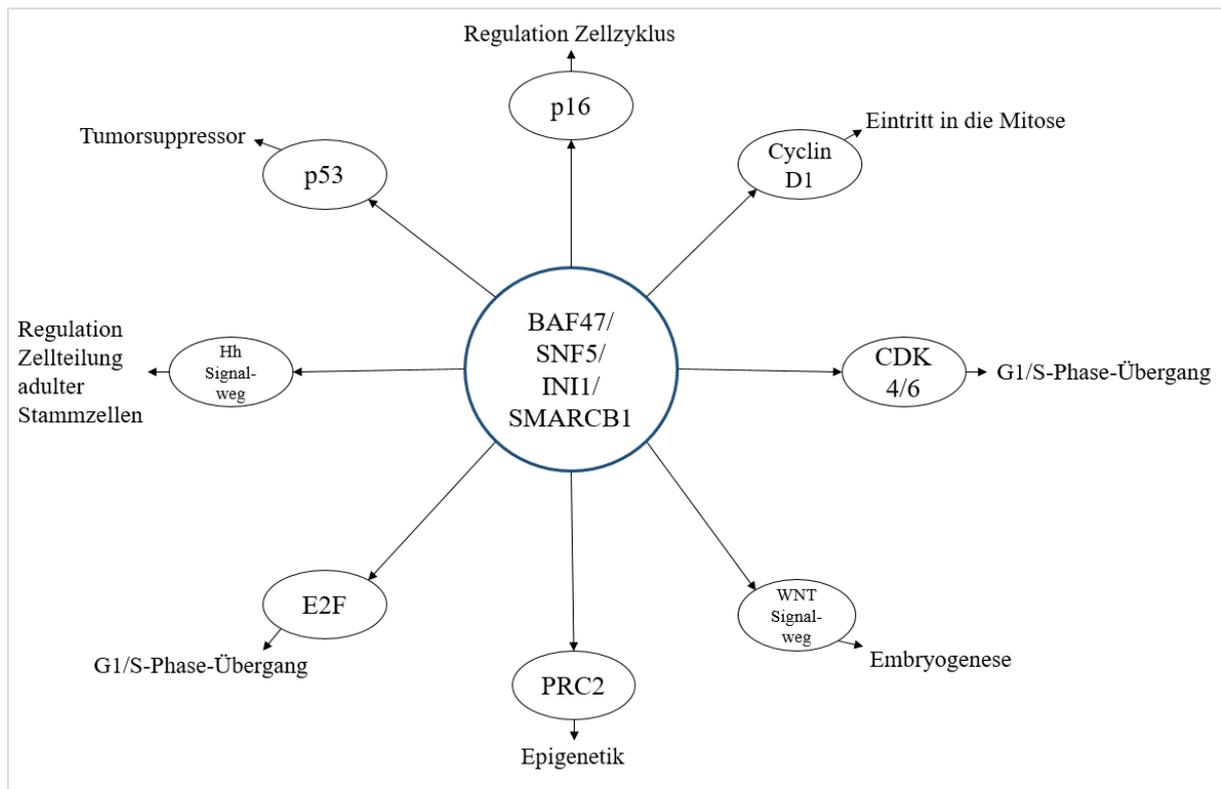


Abbildung 9. Überblick der Funktionen des BAF47/ SNF5/ INI1/ SMARCB1

Zu den physiologischen Funktionen des Proteins gehört die direkte Bindung an die DNA, die Transkription und Expression beziehungsweise Repression bestimmter Signalwege reguliert, aber darüber hinaus auch die direkte Bindung an die Zielproteine [3,42]. Wie der **Abbildung 9** zu entnehmen, gehören dazu unter anderem viele Interaktionen innerhalb des physiologischen Zellzyklus, wie beispielsweise über die Proteine p16, E2F, CDK 4 und 6 oder Cyclin D1 [41,45,98]. Darüber hinaus zeigt diese Untereinheit Einfluss auf die Embryogenese über den WNT-Signalweg und zeigt eine Inhibition von Targetgenen des Hedgehog-Signalwegs, über den, neben embryogenen Funktionen, auch die Zellteilung adulter Stammzellen abläuft [45]. Auch epigenetisch zeigt sich ein Zusammenhang mit der Untereinheit durch den „polycomb repressive complex 2“ (PRC2), der über eine Antagonisierung des *SMARCB1* eine Steigerung der Trimethylierung von Histonen verzeichnet [41,45]. Weitere Interaktionen stellen das Retinoblastom-Protein und p53 dar. Dabei wird durch Untersuchungen impliziert, dass BAF47 als Regulator des normalen Zellzyklus fungiert, indem es den Eintritt in die S-Phase steuert. Um dies auszuführen, muss ein intakter Signalweg des Retinoblastom-Pathways vorliegen. Die Wirkung von BAF47 scheint dabei aber durch eine Überexpression von Cyclin D1 und Cyclin E hemmbar zu sein [98]. Des Weiteren verzeichneten Lee *et al.* eine Modifikation des p53 vermittelt durch BAF47. Die Regulation dieses Signalwegs verläuft dabei einerseits über die Aktivierung von p53-abhängigen Transkriptionen und andererseits über die direkte Wirkung auf p53 innerhalb der Kontrolle des Zellzyklus [54]. Insgesamt agiert das BAF47 somit im Sinne eines

Zellzyklusarrests. Es zeigt sich also, dass die physiologischen Funktionen einen wichtigen Bestandteil in Differenzierung und Zellentwicklung haben, aber auch überschießende Proliferation unterbinden.

Die Rolle als Tumorsuppressor wurde vor allem durch die Deletion des *SMARCB1* bei malignen Rhabdoidtumoren von Kindern entdeckt und konnte seitdem bei vielen weiteren Tumorentitäten gezeigt werden, wie beispielsweise den Meningeomen, Schwannomen, Leiomyomen und einigen Leukämien [14,18,37,67,75,95,97]. Bei einem Verlust des BAF47 wird nicht der komplette Komplex inaktiviert, sondern es entsteht ein veränderter Komplex [82]. Durch diesen veränderten Komplex können unter Umständen oben genannte Signalwege und Transkriptionen pathologisch beeinflusst werden. Bei Untersuchungen von Versteeg *et al.*, die die genannten Malignitäten analysierten, zeigt sich, dass der Funktionsverlust des BAF47 durch die damit erloschene Kontrolle des G1-S-Zellzyklusübergangs kritisch in den BAF47-mutierten Tumoren ist. [98].

Diese Effekte können auch als Keimbahnmutationen des *SMARCB1* vorkommen, was das oftmals familiäre Auftreten von einigen Malignomen erklären könnte. Ein wichtiges Beispiel dafür stellt die familiäre Schwannomatose dar [14]. Aber auch bei den Meningeomen sind familiäre Mutationen von *SMARCB1* analysiert worden, allerdings im Zusammenhang mit einer Mutation im Neurofibromatose-Gen-2. Christiaans *et al.* diskutierten, dass Meningeome und Schwannome einen gemeinsamen Pathomechanismus aufweisen sollen und deshalb auch bei bestimmten Fällen gemeinsam auftreten. Genauer wird von den Autoren impliziert, dass es sich um einen 4-Hit-Mechanismus der Tumorentstehung handelt. Durch die familiär vorliegende Mutation des *SMARCB1* existiert nur eine weitere Kopie des intakten Gens. Durch eine Deletion des Chromosoms 22q fällt gegebenenfalls das verbleibende Allel aus. Da sich das *NF2*-Gen auf einer ähnlichen Region befindet, kann es bei einer großen Deletion oder entstehenden Monosomie des Chromosoms 22 mitbetroffen sein. Falls nun zusätzlich eine Mutation des verbleibenden Allels vorkommt, liegen somit alle beteiligten Genprodukte in geschädigter Form vor [14,95].

Neben den familiär auftretenden Mutationen von *SMARCB1* in Meningeomen und Schwannomen (30-40%) wird bei den sporadischen Meningeomen ein Auftreten von unter 3% geschätzt [14,104]. Bei Letzteren liegt keine familiäre Mutation des *SMARCB1* vor, sodass der Pathomechanismus weniger klar erscheint. Torres-Martín *et al.* untersuchten Gewebe einer Patientin, die solitäre multiple Meningeome aufwies. Dabei stellten sie die LOH des Chromosoms 22 als Initiator der Tumorentstehung heraus, die wiederum gefolgt wird von unterschiedlichen Mutationen wie der Mutation des *NF2* (siehe **Abbildung 10**). Nach diesen häufigen Alterationen können zusätzliche speziellere Mutationen z.B. von *SMARCB1* den Tumor weiter differenzieren und in der Tumorgenese vorantreiben oder sein biologisches Verhalten bestimmen. Diese müssen aber nicht zwingend Teil des malignen Prozesses sein [91]. Alle der genannten Hypothesen sind allerdings nur allgemeine Untersuchungen und der genaue Pathomechanismus ist bisher ungeklärt.

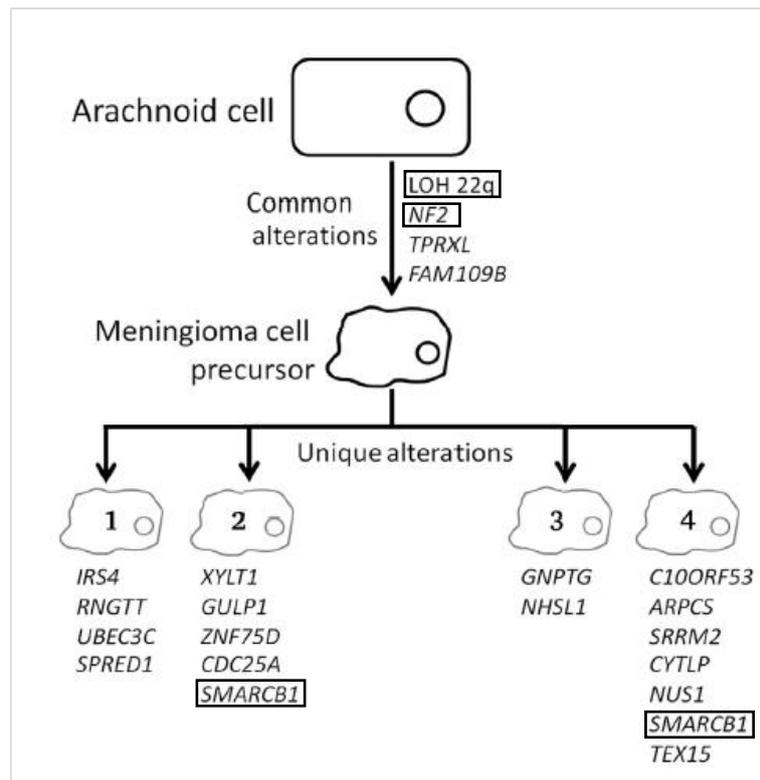


Abbildung 10. Mögliche Pathogenese der Meningeomentstehung nach Torres-Martín *et al.* [91]

2.2.2.2 BAF250A/ P270 (ARID1A/ SMARCF1)

BAF250a ist eine Proteinuntereinheit, die ausschließlich beim BAF-Komplex (SWI/SNF-A) vorkommt. Der Genlocus *ARID1A* gehört zu der Gruppe der ARID-Gene und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p.36.11) [77,87]. Mit circa 242 kDa ist diese die Größte aller humanen Untereinheiten des Komplexes. Ähnlich wie BAF47 besitzt auch BAF250a in der Nomenklatur mehrere Bezeichnungen. Dabei wird als Bezeichnung für das Protein BAF250a verwendet und für das kodierende Gen *ARID1A* oder *SMARCF1*, wobei letztere auch als Proteinbezeichnung genutzt werden [59]. Die Termini der homologen Untereinheiten der Hefe *SWII* oder der Fliege *Drosophila OSA1* werden zwar nicht häufig genutzt, finden sich aber trotzdem in Übersichtsarbeiten [77,103]. Dies trifft auch auf die alternative Bezeichnung p270 zu, die vereinzelt Verwendung findet [64,100]. Daneben existieren weitere Begrifflichkeiten, die allerdings weniger gebräuchlich sind.

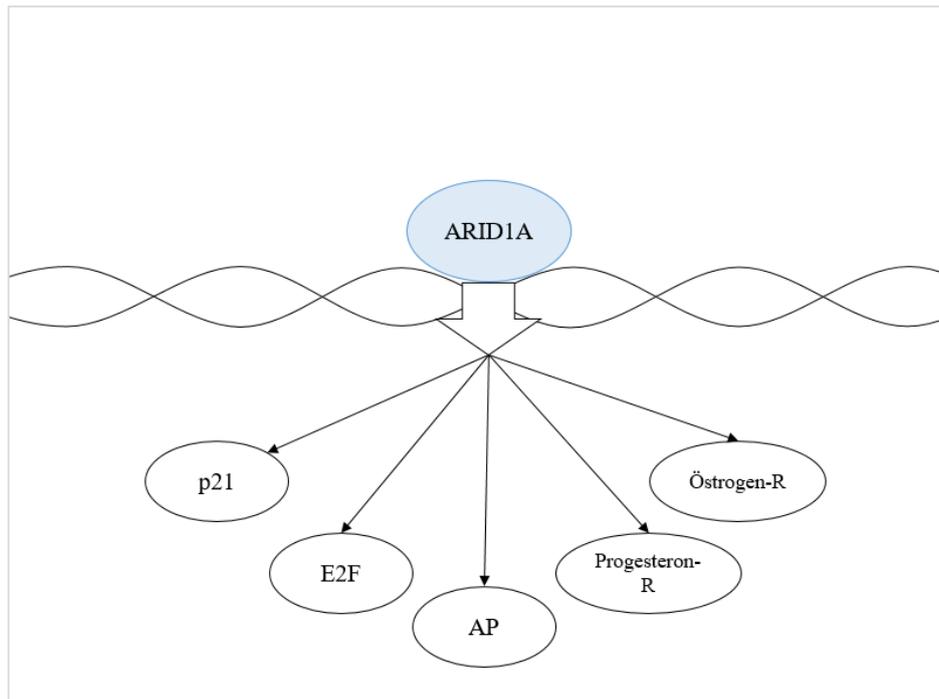


Abbildung 11. Übersicht der Steuerung der Expression verschiedener Proteine und Signalwege über ARID1A

ARID1A (BAF250a) wirkt in verschiedenen allgemeinen Signalwegen und Zellfunktionen mit (vergleiche **Abbildung 11**). So nimmt es innerhalb des gesamten BAF-Komplexes die Rolle der DNA-Bindung ein [59,103]. Dabei ist bedeutsam, dass es sich um eine schnelle, aber Sequenz-unspezifische Bindung an der DNA handelt. Die Länge der Sequenzen ist hierbei der einzige maßgebende Faktor. Wilsker *et al.* zeigten, dass längere Sequenzen in diesen Untersuchungen leicht präferierend gebunden wurden, da diese vermutlich mehr Bindestellen für das Protein aufweisen [103]. Neben den DNA-Bindungsstellen des ARID1A existieren Proteinbindungsstellen, die für die zusätzlichen Funktionen entscheidend sind. Dazu zählen zum Beispiel das Stimulieren der Transkription unterschiedlicher Hormonrezeptoren, wie Androgen- oder Östrogenrezeptoren [38]. Des Weiteren ist diese Untereinheit wichtig für den physiologischen Zellzyklusarrest und dient als Tumorsuppressor [36,64]. Nagl *et al.* untersuchten dabei, dass ARID1A an der Induktion von p21 über dessen Promotor mitwirkt. Das Protein p21 verhindert eine unkontrollierte Zellteilung und führt zur Repression des E2F, der als Transkriptionsfaktor den Übergang der G1-Phase in die S-Phase reguliert. Die Autoren vermuteten weiter, dass ARID1A auch auf E2F-responsive Promotoren (zum Beispiel *CDC2*) wirkt und damit deren Repression bewirkt [64].

Zusammengefasst sind die physiologischen Funktionen des *ARID1A* vorwiegend die Kontrolle und Verlangsamung des Zellzyklus bis zum Arrest und damit eine Reduktion von Schäden der DNA oder unkontrollierter Proliferation.

Bei Ausfall dieser physiologischen Funktionen liegt es nahe, dass eine Kanzerogenese ungebremst fortschreiten kann. Der Zellzyklus wird vermindert an den Kontrollpunkten gehemmt und eine ungehinderte Proliferation somit begünstigt. Zusätzlich wird die Expression von Transkriptionsfaktoren wie E2F weniger unterdrückt, sodass die genannten Effekte stärker in Kraft treten können [64].

Insgesamt ist ARID1A die anteilig häufigste Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes, die in humanen Malignomen mutiert vorliegt [39,59]. Die häufigsten genannten Tumore, die eine *ARID1A*-Mutation aufweisen, sind bisher das klarzellige Ovarialkarzinom, mit einem Anteil von 50% der Fälle, sowie Endometriumkarzinome, mit einem Anteil von 39% der Fälle [59]. Weitere Tumore mit geringerem Anteil sind Nierenzellkarzinome, sowie Mammakarzinome [100]. Masliah-Planchon *et al.* erkannten, dass vermehrt klarzellige Subtypen eine Deletion aufweisen. Sie vermuteten, dass diese Erscheinung mit einer der physiologischen Funktionen des gesamten Komplexes in Hefe als Kohlenhydratverwerter zusammenhängt. Mutierte Hefestämme mit Deletion der *snf*-Gene wiesen einen defizienten Kohlenhydratstoffwechsel auf, der zur Anreicherung von Polysacchariden und Mukopolysacchariden führt. Dies könnte ursächlich für das beschriebene histologische Erscheinungsbild in menschlichen Tumoren sein, da in diesen vermehrt Glykogen beschrieben wird [59].

Bei den Meningeomen wurde bisher kein Zusammenhang zwischen dem klarzelligen Subtyp und dem Pathomechanismus einer *ARID1A*-Deletion hergestellt. Es existieren lediglich allgemeine Fallberichte zu der Entstehung von Meningeomen und dem Genlokus *ARID1A* [2,10]. Abedalthagafi *et al.* analysierten in diesem Zuge einen Fall eines singulären Meningeoms, das Bereiche aller drei WHO-Gradierungen aufwies. Dieser Fallbericht stellte sich als sehr aufschlussreich heraus, da in allen drei WHO-Gradierungen des Tumors eine singuläre 1p-Deletion vorliegt, allerdings nur bei den höhergradigen Meningeombereichen zusätzlich ein Verlust des Genprodukts ARID1A durch eine Frameshift-Deletion auftritt [2]. Daraus folgt die Überlegung, ob dieser Funktionsverlust des *ARID1A* ursächlich zur weiteren Progression und Entdifferenzierung des Tumors ist. Dies sind bisher allerdings nur Mutmaßungen. Es ist nach wie vor fraglich, inwiefern *ARID1A*-Mutationen bei der Gesamtheit der Meningeome eine Rolle in der Pathogenese spielen.

Eingang in die Diagnostik hat der Verlust der Gewebe-unspezifischen Alkalischen Phosphatase (AP) bei einer Deletion von Chromosom 1p gefunden. Dabei wurde zu Beginn bei Meningeomen keine Verbindung zu dem *ARID1A*-Gen hergestellt. Das Nächstliegende scheint der gemeinsame Verlust der Genloki von *ARID1A* und der Alkalischen Phosphatase auf Chromosom 1p zu sein (1p36.11-1p36.12). Bei der Studie von Nagl *et al.* fällt aber auf, dass bei einem Knockdown, also punktuell reduzierter Expression des *ARID1A* im Zellkulturversuch, eine Beeinträchtigung der physiologischen Induktion der alkalischen Phosphatase folgt [64].

2.2.2.3 BAF45C/ CERD4 (DPF3)

Die Proteinuntereinheit BAF45c ist Teil beider SWI/SNF-Komplexe. Das kodierende Gen *DPF3* liegt auf dem Chromosom 14q24.2 [13]. Neben der Bezeichnung bezüglich des Molekulargewichtes BAF45 (42kDa), wird synonym dazu auch *DPF3* respektive DPF3 für Gen und Protein verwendet. Neben der Untereinheit BAF45c existieren noch die Untereinheiten BAF45 a, b und d, die zwar große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, aber auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind [50,59]. Trotzdem gehören diese Proteine alle zu der d4-Proteinfamilie. Dabei handelt es sich um eine Genfamilie, die Proteine mit ähnlichem Plant Homodomain (PHD)-Finger-Motiv einschließen, einer Struktur, über die Histone für epigenetische Prozesse gebunden werden können [8]. Daraus ergeben sich weitere spezifische Termini für diese Proteine: So wird das Gen *DPF3* gleichbedeutend mit Cer-d4 eingesetzt, während auch die weiteren Proteine zusätzliche Bezeichnungen erhalten: Neuro-d4 (*DPF1* = BAF45B), ubi-d4 (*DPF2* = BAF45D) [50]. Weiter liegt DPF3 in fünf Splicing-Varianten vor, DPF3a und DPF3b, die in ihrer Funktion minimal differenziert werden können und drei weiteren Isoformen, die allerdings bisher nicht weiter spezifiziert wurden [50,70].

Das Protein stellt auf molekulargenetischer Ebene unter anderem die Rolle eines integrierten Tandem Plant Homodomain (PHD) Zink-Finger-Proteins dar. Aufgrund der strukturellen Motive kann das Protein direkt mit Histonen interagieren und mit Bromodomain-Regionen anderer Proteine. Zusätzlich zeigen Studien, dass die Histone H3 und H4 in acetylierter Form gebunden werden können (siehe **Abbildung 12**) [107]. Dabei wird das Histon an der Stelle eines acetylierten oder methylierten Lysins gebunden, was ein Sonderstellungsmerkmal dieses PHD Zink-Finger-Protein repräsentiert, da diese Funktion sonst nur die Bromodomänen einnehmen [53].

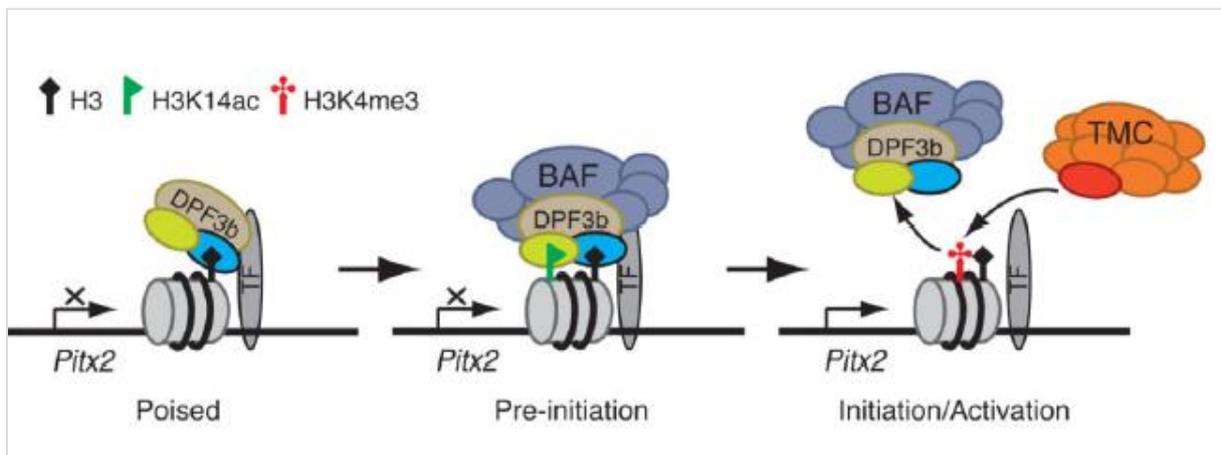


Abbildung 12. Modulation des Histons H3 über eine Acetylierung und Methylierung durch DPF3b nach Zeng *et al.* [107]

H3: Histon H3, H3K14ac: acetylierte Form des Histons, H3K4me3: methylierte Form, TMC: Transkriptionskomplex, TF: genspezifischer Transkriptionsfaktor

Der **Abbildung 12** ist der Mechanismus zu entnehmen, über den DPF3 als Bestandteil des BAF-Komplexes Modulationen an dem Status der Histone vornimmt. Zu erkennen ist, dass durch die dreischrittige Modifikation der Histone über eine Acetylierung und eine folgende Methylierung bestimmte DNA-Abschnitte zur Transkription freigegeben werden, worüber epigenetische Modifikationen möglich werden [107].

DPF3 scheint zudem eine essentielle Rolle in der neuronalen Entwicklung zu spielen, da in der Embryogenese grundlegende Entwicklungsschritte ausgeführt werden, die vor allem bei der Neurogenese und der Entwicklung von Muskel und Herz von Bedeutung sind [53,55]. Bei der Neurogenese ist es relevant, dass ein Wechsel einiger Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes durchlaufen wird. Untersuchungen zeigen, dass ein Ersatz der Untereinheiten BAF45a und BAF53a durch BAF45b, BAF53b und die hier untersuchte Untereinheit BAF45c erfolgt. Durch diesen „Switch“ entwickelt sich aus der neuronalen Progenitorzelle und der neuronalen Stammzelle ein postmitotisches Neuron. BAF45c ist also vorherrschend in den Neuronen in der postmitotischen Form [55]. So zeigt sich, dass das hier behandelte BAF45c vor allem in den Pyramidenzellen und im Cerebellum hoch exprimiert ist [50].

Im Gegensatz zu den oben genannten Untereinheiten BAF47 und BAF250a ist bei BAF45c bisher am wenigsten bekannt, inwiefern diese in der Entstehung von Malignomen beteiligt sein könnte. Allerdings wird bei dem Glioblastom, einem primären Hirntumor von WHO-Grad IV, eine Überexpression der d4-Proteinfamilie vermutet. Hiramatsu *et al.* nehmen an, dass dabei die initialen Auslöserzellen der Pathogenese Stammzeleigenschaften beibehalten und damit das Glioblastom als solches entstehen könnte [32]. Auch Mammakarzinome sind nach Hoyal *et al.* mit BAF45c korreliert. Dessen Einfluss scheint aber nur einen kleinen Anteil der Ätiologie aller Mammakarzinome einzunehmen. In der genannten Studie korreliert diese Beobachtung der Mutation mit einem erhöhten Risiko für das generelle Auftreten des Karzinoms, dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und dem Alter der Erstmanifestation [35]. Des Weiteren wird hinsichtlich der Chronisch Lymphatischen Leukämie eine Assoziation mit dem BAF45c diskutiert. Dieses scheint dabei durch STAT5 reguliert zu werden [90]. Eine Verbindung zu der Kanzerogenese von Meningeomen wurde bisher nicht diskutiert.

2.3 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT

Das Meningeom als häufigste intrakranielle Neoplasie hat einen entscheidenden Anteil an der humanen Onkologie [69]. Bisher gilt die vollständige chirurgische Resektion als einzige Therapiemöglichkeit. Trotz guter Heilungschance bei bestmöglicher Operabilität entsteht bei 9% der Fälle bei kompletter Entfernung ein Rezidiv [85]. Weiter können einige Tumore nicht vollständig entnommen werden, sodass diese Patienten reduzierte Optionen in ihrer Therapierbarkeit aufweisen.

Obwohl das Meningeom als eine humane Neoplasie schon lange bekannt ist, existiert keine vollständige Erklärung zu dessen Pathogenese. So ist zwar durch die Neurofibromatose des Typs 2 ein möglicher betroffener Signalweg bekannt. Dieser bietet allerdings keine Erklärung für die Gesamtheit der Meningeome [102]. Im weiteren Verlauf konnten einige spezifische Chromosomenaberrationen an Meningeomen evaluiert werden [44,57]. Zu der genauen Auswirkung auf die biomolekulare Pathogenese sind im aktuellen wissenschaftlichen Diskurs nur Vermutungen aufgestellt worden.

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass eine Dysregulation des Chromatin-Remodeling Komplexes SWI/SNF eine Rolle in der Pathogenese des Meningeoms spielt. Dieser Proteinkomplex besitzt einige Proteinuntereinheiten, von denen einzelne durch die spezifischen Chromosomenausfällen der Meningeomentwicklung betroffen sein können [13,77,87,97]. Durch Fehlsynthetisierung dieser Proteinuntereinheiten kann der Gesamtkomplex dysreguliert vorliegen oder deren spezifische Funktionen pathologisch ablaufen. Besonders die vorgestellten Proteine *BAF47* (Chromosom 22q, folgend als *SNF5* bezeichnet), *BAF250a* (Chromosom 1p, folgend als *ARID1A* bezeichnet) und *BAF45c* (Chromosom 14q, folgend als *DPF3* bezeichnet) stellten den Fokus dieser Arbeit dar.

Die einzelnen Komplexuntereinheiten werden vorerst auf Proteinebene im Western Blot analysiert und als ergänzende Methodik werden einzelne Genloki auf DNA-Ebene evaluiert. Dadurch sollte die Pathogenese vom Gen bis zum Endprodukt nachempfunden werden. Zusätzlich sollte die Betrachtung der Meningeome in immunhistochemischer Untersuchung weitere Einsicht in das intrazelluläre Verteilungsmuster bringen, um eine qualitative Aussage zu treffen. Bis zum jetzigen Stand stellt diese Studie damit die erste Arbeit dar, die die genannten Untersuchungen kombiniert in diesem Probenumfang an Meningeomen durchgeführt hat.

Das Ziel dieser Arbeit ist folglich, einen Zusammenhang zwischen der Genetik und dem funktionalen Produkt herzustellen und mögliche Mechanismen in der Pathogenese des Meningeoms zu entdecken.

3 MATERIALIEN

Im Folgenden werden alle verwendeten Materialien mitsamt Lösungen und den entsprechenden Verdünnungen aufgeführt.

3.1 SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN

3.1.1 ANTIKÖRPER

Bezeichnung	Verdünnung	Firma, Artikelnummer
Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A] - Loading Control	1:10.000	ab7291, Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-ARIDIA antibody - C-terminal	1:1.000	ab176395, Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-DPF3 antibody	1:1.000	ab85360, Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-SNF5/SMARCB1 antibody [EPR6966]	1:500-1:1.000	ab126734, Abcam plc, Cambridge, UK
ARIDIA (PSG3)	1:100	sc-32761, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse	1:500	K4001, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	1:500	K4003, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
EnVision+ System-HRP Rabbit/Mouse	unverdünnt	K5007, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA

Tabelle 4. Antikörper

Die Antikörper wurden in TBST mit 0,02%igen Casein angesetzt und genutzt (siehe 3.1.3 und 3.1.4).

3.1.2 MIKROSATELLITEN

	D1S1608	D1S548	D1S1592	D1S1161	D1S1184	ARID1A
Binde-region	1p36.32	1p36.23	1p36.13	1p35.2	1p31.3	1p.36.11
GenBank	G07829	G07827	G07790	L18100	L30689	LRG_875
DNA-Sequenz	5'GATGG CTTTGG GGACTAT T3'	5'GAACT CATGGC AAAAGG AA3'	5'GGTGA CAGGTAT TGA CTGC C3'	5'AGAAT GGTGTGA ACCCAGG 3'	5'AGCCA AGATCAT GCCACTG 3'	5'AACCC ACTGTGT TTGGAAG GC3'
	5'CACTG AGCCAA GTGACAC AG3'	5'GCCTCT TTGTTGC AGTGATT 3'	5'TTGAG GGCAGA GATTGTC TC'3	5'AAGGA TTATACA GCAGCTG TT3'	5'CCTCCT GGCAAA ATATCCA T3'	5'TGAGC CAAGATT GCACCAC TG3'
Länge	278bp	163bp	239bp	299bp	258bp	222bp
Annealing	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	56°C
Firma	Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany					

Tabelle 5. Mikrosatelliten Chromosom 1p

3.1.3 MATERIALIENLISTE

Lösung, Chemikalie	Artikelnummer, Firma
Aceton	GH 01001 , Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Germany
Acrylamide/Bis-Acrylamide, 30% solution	1002257089, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Ammonium Persulfat	Cat.#161-0700, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	Art. A512.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany
Chemiluminescence film	Amersham Hyperfilm ECL, 28906836, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
Coverplates	72110017, Shandon Coverplate™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DAB Puffer	Dako REAL™ Substrate Buffer, K5007, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
DAB Subtrat	Dako REAL™ DAB+ Chromogen , K5007, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL Antibody Diluent	S2011, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
Deckgläser	Glasdicke 0,13 – 0,16 mm, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany
Desoxycholic acid sodium salt monohydrate (Sodiumdesoxycholat)	30968, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Desoxycholsäure Natriumsalz Monohydrat	30968, Fluka Analytical, Buchs, Switzerland
Destaining solution (Entfärbelösung)	3037.01, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Detektionsdetergenz	ECL Select Western Blotting Detection Reagent, RPN2235, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
DNase	A3778, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ethanol (99%)	K928.4, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

Filterpapier/ Whatman Gel Blot Paper	GB003, Cat No: 10426892, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
Filterspitzen in 10, 100, 200, 1000 µl Fassungsvermögen	
FlashGel DNA Kasette, 1.2% Agarose, 16+1., zweizeilig	Artikelnummer: 857029, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Glasobjektträger	030060, SuperFrost Plus, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany
Glaspestille	
Glasplatten	Cat# 1653308, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Glycerin wasserfrei	Ch.Bez.: 5110A-01590, Apotheke im Universitätsklinikum des Saarlandes
Glycin	Art.-Nr. 3790.2, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany
Größenmarker DNA-Gelelektrophorese (Flash Gel)	FlashGel™DNA marker 50 bp –1.5 kb 57033 , Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME, USA
Größenmarker DNA-Gelelektrophorese (Spreadex-Gel)	GelPilot 100 bp Ladder (100), Qiagen, Hilden, Germany
Größenmarker Elektrophorese Western Blot	Precision Plus Protein Standards Dual Color, Catalog #161-0394, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
HotStarTaq Master Mix	Cat.Nr. 203445, Quiagen, Hilden, Germany
Human <i>ARID1A</i> / BAF250 Protein (Over-Expression Lysat)	LS-G88844, LifeSpan BioScience, Inc., Seattle, WA, USA
Mayer's Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany
Mikroreaktionsgefäße in 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml und 5 ml Volumen	
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Cat. #161-0800, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
NanoOrange protein quantitation diluent for N6666	2057478, Thermo Fischer Scientific Inc. , Waltham, MA, USA
NanoOrange Protein Quantitation Kit	2057477, Thermo Fischer Scientific Inc. , Waltham, MA, USA
Natriumchlorid reinst	Apotheke im Universitätsklinikum des Saarlandes
Natriumlaurylsulfat/ SDS-Pellets	Art.-Nr. CN30.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Nitrocellulosemembran, 0,45µm	Cat#1620115, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Paraplast Plus	502004, McCormicks Scientific, St. Louis, MO, USA
Probenpuffer LOH	Sample Loading Buffer (5x), 30 34, abc biopply ag, Solothurn, Switzerland
Protease-Inhibitor, cömplete Tablets, Mini EDTA-free	Ref: 04693159001, Roche Applied Science, Penzberg, Germany
Qiamp MiniElute DNA Kit	Cat.no. 55204, Qiagen, Hilden, Germany
RNase-free Water	Cat.Nr. 129112, Quiagen, Hilden, Germany
Röntgen-Fixierlösung (Roentogen Superfix)	103655, TETENAL, Nordstedt, Germany
Röntgen-Rapid-Entwickler (Roentogen)	103482, TETENAL, Nordstedt, Germany
Salzsäure 25%	X897.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Spacer	Cat# #1653312, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Spreadex EL 800 Wide Mini S-2x25	191002, AL-Diagnostic GMBH, Amstetten, Austria
β-Mercaptoethanol	A1108,0100, PanReac by AppliChem, Darmstadt, Germany

SYBR Gold nucleic acid gel stain	S11494, Invitrogen by Thermo Fischer Scientific Inc. , Waltham, MA, USA
TAE-Puffer	42548.01, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Target Retrieval Solution 10X Concentrate, pH 6,1	S1699, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
TE-Puffer (1x)	Cat.Nr. A0386,0500, AppliChem, Darmstadt, Germany
Trichloressigsäure	1.00807.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Trispuffer, TRIZMA Base	Cat.No.: T1503, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Triton X-100	STBH6272, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Tropix I-Block/ Casein	1805103, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Tween-20, Polysorbatum 20	Ch.-B. 43316534, Caesar & Loretz GmbH D-40721 Hilden, Germany
Wasserstoffperoxid	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Germany
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Germany
Zelllysat MGTW3 (Kontrolllysat)	
Zentrifugenröhrchen in 10 ml und 15 ml Volumen	
Ziegenserum	X0907, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA

Tabelle 6. Genutzte Materialien

3.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

10x TBST

- 50 ml 1M Tris HCl, pH 7,8
- 100 ml 5M NaCl
- 2,5 ml 100% Tween 20
- Auffüllen der Lösung auf 500 ml mit Aqua bidest.

Casein 0.2%

- 1 Tablette Desoxycholsäure Natriumsalz Monohydrat auf 200 ml Aqua dest. geben
- 2 g I-Block (Casein)
- Die Lösung auf 1.000 ml mit Aqua bidest. auffüllen
- Unter Rühren bei 50°C lösen
- Tween-20 1 ml auf 1.000 ml der Lösung

Coomassie-Färbelösung

- 1,2 g Coomassie Brilliant Blue
- 300 ml Methanol
- 60 ml Essigsäure
- Auffüllen auf 600 ml mit Aqua bidest.

Coomassie-Entfärbelösung

- 50 ml Methanol
- 50 ml Essigsäure
- 400 ml Aqua bidest.

Probenpuffer (Spaltpuffer)

- 30 ml Glycerin
- 15 ml β -Mercaptoethanol
- 0,03 g Bromphenolblau
- 6 g SDS-Pellets
- 2,278 g/ 49 ml Trispuffer
- Auffüllen auf 100 ml mit Aqua dest.

Tris-HCl 1 Molar, pH 7,8

- 60,57 g Trispuffer
- Auffüllen der Lösung in 500 ml Aqua bidest.

RIPA buffer (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer)

- 150 mM NaCl
- 1% Triton X-100
- 0.5% Sodiumdeoxycholat
- 1% SDS
- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- Ansetzen der Lösung in 50 ml Aqua bidest.
- Protease Inhibitor (EDTA-free)

Der RIPA-Puffer wurde direkt vor der Nutzung mit einem Protease-Inhibitor (Roche, eine Tablette auf 20 ml) versetzt.

Trenngel, 10% Polyacrylamidgel, 1,5 mm Spacer

- 2,475 ml 30% Acrylamid
- 1,875 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,9
- 75 μ l 10% SDS
- 7,5 μ l TEMED
- 3,075 ml Aqua bidest
- 37,5 μ l APS

Sammelgel, 5% Polyacrylamidgel, 1,5 mm Spacer

- 625,5 µl 30% Acrylamid
- 0,9375 µl 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- 37,5 µl 10% SDS
- 7,5 µl TEMED
- 2,272 ml Aqua bidest.
- 195 µl APS

Transfer buffer 10x

- 0,25 M Tris Base pH 8,3
- 1,9 M Glycin
- 10% Methanol von Gesamtlösung direkt vor Nutzung dazugeben.

Laufpuffer 10x

- 30 g TRIS/ HCl pH 8,4
- 144 g Glycin
- 10 g SDS
- Auffüllen der Lösung auf 1 l mit Aqua bidest.

Hot-Star MasterMix

Für 12 Ansätze:

- 150 µl Hot-Star-Taq Master Mix (2X)
- 122,4 µl RNase-free Water

3.1.5 GERÄTE UND SOFTWARE

Gerät	Firma, Artikelnummer
Dampfgarer	HD9140/91, Koninklijke Philips N.V, Amsterdam, Netherlands
Durchlichtmikroskop	BH-2, Olympus, Japan
Einbettautomat	68910051, Shandon, Runcorn, UK
Elektrophoresekammer Western Blot	Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
EOS Utility 2	Canon Inc., Tokio, Japan
Externe Lichtquelle für IHC	LED-DC Regelnetzgerät, BW-Optik, Aschendorf, Germany
FlashGel Camera Pack, FlashGel Doc und Kamera	Artikelnummer: 857065, Hersteller: Biozym Scientific GmbH
FlashGel Capture	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Fluorometer	Quantus Fluorometer, E6150, Promega Corporation, Madison, USA
IBM SPSS Statistics 25	International Business Machines Corporation, New York, USA
ImageJ 1.52a	W. Rasband, National Institutes of Health, USA
Kühlplatte „Blue Cooler“	RWW Medizintechnik, Hallerndorf, Germany
Laufkammer LOH	Elchrom Scientific AG, Zug, Switzerland
Leica Application Suite (LAS) Version 3.8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Manual Mikrotom RM2035	12190861, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Germany
Mastercycler MC nexus X2	Katalog-Nr. 6337FR013445, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
pH-Meter	pH 1100 L, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
Präzisionswaage	ENTRIS6202-1S, Sartorius Corporate Administration GmbH, Göttingen, Germany
R Studio	R-Tools Technology Inc., Boston, MA, USA
Schüttler	Duomax 1030, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG
ThermoMixer C	Katalog-Nr. 5382000015, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
UV-Licht-Kammer	DIAS-III, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Wärmeschrank 56°C	T 6, Heraeus Instruments, Hanau, Germany
Wärmeschrank 80°C	T 12, Heraeus Instruments, Hanau, Germany
Wet Blot	Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Zentrifuge, ungekühlt	Centrifuge MiniSpin, Katalog-Nr. 5452000010, Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Tabelle 7. Genutzte Geräte, Apparaturen und Software

3.2 PROBEN

Nr.	Alter	Sex	Histo. Subtyp	WHO-Grad	Lokalisation	Rezidiv	LOH
1	55	W	MM	I	Frontal		/
2	76	W	MM	I	KH		/
3	85	W	M	I	KBF		LOH
4	53	W	M	I	Parietal		/
5	57	W	M	I	Falx	R	/
6	57	W	PM	I	Multiple		/
7	82	W	M	I	Frontal		/
8	71	M	AM	II	Subokzipital		/
9	53	W	PM	I	Spinal	R	/
10	65	W	PM	I	Frontal		/
11	71	W	M	I	Frontal		/
12	69	M	M	I	KBF		LOH
13	74	W	M	I	KHBW		/
14	46	W	M	I	Frontal		/
15	85	M	M	I	Hypophyse		LOH
16	37	W	M	I	Parietal		/
17	63	M	M	I	Falx		LOH
18	72	M	M	I	Temporal		LOH
19	74	W	M	I	Frontal		LOH
20	54	W	SM	I	Parietal		/
21	59	W	M	I	KBF		/
22	58	W	ANGM	I	Frontal		LOH
23	59	W	MM	I	Olfactoriusmeningiom		/
24	81	W	M	I	Spinal		/
25	61	M	M	I	KBF		/
26	94	W	M	I	Spinal		/
27	57	W	M	I	KBF		LOH
28	32	W	CM	II	KHBW	R	LOH
29	82	M	M	I	Spinal		/
30	41	W	M	I	KBF		LOH
31	75	W	M	I	Frontal		/
32	44	W	M	I	Okzipital	R	LOH
33	79	M	M	I	KBF		/
34	81	W	M	I	KHBW		/
35	56	M	MM	I	Multiple	R	/
36	57	W	MM	I	Multiple		/
37	80	W	M	I	Olfactoriusmeningiom		/
38	44	W	AM	II	Spinal		/
39	80	W	FM	I	Okzipital		/
40	69	W	M	I	Multiple	R	LOH
41	86	W	M	I	Spinal		/
42	62	W	PM	I	Spinal		/
43	56	W	M	I	Spinal		/
44	77	M	ANGM	I	Multiple		LOH

45	77	M	MM	I	Multiple		/
46	82	W	SM	I	Frontal		/
47	54	M	AM	II	Frontal		LOH
48	69	M	AM	II	Frontal		LOH
49	50	W	CM	II	Multiple		LOH
50	43	M	AM	II	Frontal		/
51	75	W	ANAM	III	Temporal	R	LOH

Tabelle 8. Übersicht der Patienten

Alter: Alter bei Operation in Jahren; Sex/ Geschlecht: W: Weiblich, M: Männlich; Histologischer Subtyp: M: klassisches Meningeom, MM: Meningotheliales Meningeom, PM: Psammomatöses Meningeom, SM: Sekretorisches Meningeom, AngM: Angiomatöses Meningeom, FM: Fibröses Meningeom, AM: Atypisches Meningeom, CM: Chordoides Meningeom, ANAM: Anaplastisches Meningeom; KBF: Keilbeinflügel, KHBW: Kleinhirnbrückenwinkel; R: Rezidiv; LOH: Loss of Heterozygosity auf mindestens einer der Sonden auf dem Chromosom 1p.

Bei dem Kollektiv der Patienten handelt es sich um eine konsekutive Stichprobe, die im Zeitraum von 2017 bis 2019 gesammelt wurde. Den größten Anteil stellen dabei die Proben aus dem Jahr 2019. Die Fälle aus dem Jahr 2019 wurden folgend durch höhergradige Meningeome aus den Vorjahren ergänzt, um genauere Aussagen hinsichtlich der Unterschiede zwischen den WHO-Graden zu entdecken. Alle Patienten wurden in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes operiert und die Biopsate als Nativgewebe direkt in das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes geschickt. Die Gewebeproben wurden daraufhin bei -80°C nativ oder in Tragant gelagert. Bei Tragant handelt es sich um ein Medium geeignet zur Ausrichtung der Gefrierproben [62].

Die Gewebeproben wurden sowohl für die Proteinanalyse mittels Western-Blot als auch die DNA-Analyse zur Bestimmung von Chromosomen(teil)verlusten genutzt. Für letztere wurden zusätzlich Blutproben der Patienten in EDTA-Röhrchen oder Nativgewebe der Meningen verwendet, die für die routinemäßige molekulargenetische Analyse bereits vorhanden waren.

Die histologische Beurteilung wurde von den ärztlichen Mitarbeitern am Institut für Neuropathologie der Universität des Saarlandes anhand der histologischen Schnitte nach den Kriterien der 4. Auflage der „WHO classification of tumours of the central nervous system“ erstellt [105].

Die Bearbeitung der Proben wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes unter den Kennnummern 213/20 und 178/07 genehmigt.

4 METHODIK

4.1 LOSS OF HETEROZYGOSITY-ANALYSE (LOH)

Um die genetische Instabilität von Meningeomen zu untersuchen, wurde eine PCR-gestützte Mikrosatelliten-Analyse zur Überprüfung von Allelverlusten, einem „Loss of Heterozygosity“ oder kurz LOH, durchgeführt. (Teil)Verluste von Chromosomenabschnitten sind eine häufige genetische Veränderung bei verschiedenen Tumorarten und führen zu einer funktionellen Homozygotie der betroffenen Genloki [78]. Zur Untersuchung dieser Verluste werden Mikrosatelliten beziehungsweise short tandem repeats (STRs) genutzt, die von Mensch zu Mensch und sogar in den beiden vorliegenden Allelen in der Länge variieren [24,58]. Der Verlust oder schon eine verringerte Signalstärke des PCR-Produktes wurden dabei als positives Ergebnis der Analyse und als Chromosomenteilverlust dieses Abschnitts gewertet.

Die LOH-Analyse wurde in der Molekulardiagnostik routinemäßig für Oligodendrogliome nach Hartmann *et al.* durchgeführt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifiziert [30].

Es wurde jeweils DNA aus Tumorproben, entweder aus nativem Cryo-Gewebe oder aus einem in Paraffin fixierten Schnitt des Tumors gewonnen. Als konstitutive Kontrolle wurde in EDTA-Röhrchen entnommenes venöses Blut der Patienten oder in Paraffin fixierte Teile von nicht Tumor-infiltrierten Meningen genutzt. Die DNA-Extraktion erfolgte im Zuge der routinemäßigen molekulargenetischen Analytik mit Hilfe des Qiap MiniElute DNA Kits (Qiagen) und konnte für die vorliegende Arbeit genutzt werden.

Die DNA-Proben wurden folgend mit dem „Hot-Star Master-Mix“ (Quiagen) versetzt und mit den Primern (Eurofins Genomic) für die entsprechenden Mikrosatelliten kombiniert. Pro Probe wurden 1,3 µl DNA mit 1 µl Primer-Mix (forward und reverse Primer jeweils 20 pmol/µl) für den jeweiligen Mikrosatelliten in 12,5 µl Master-Mix und 10,2 µl Wasser pipettiert.

Zusätzlich wurde jeweils eine No-Template-Control ohne Probenmaterial oder ohne Primer als Negativ-Kontrolle angesetzt, um mögliche Kontamination auszuschließen. Bei der No-Template-Control wurde entweder anstelle der DNA 1,3 µl RNase-freies Wasser oder anstelle der Primer 1 µl RNase-freies Wasser eingesetzt.

Für die unterschiedlichen chromosomalen Abschnitte wurden die in **Tabelle 5** aufgeführten Mikrosatelliten genutzt. Für das Chromosom 1p wurden die bereits publizierten Sonden D1S1608, D1S548, D1S1592, D1S1161, D1S1184 und eine eigens entwickelte Sonde für den Genlokus des *ARID1A* verwendet. In **Abbildung 13** ist aufgeführt, welche Teilbereiche dabei umfasst wurden.

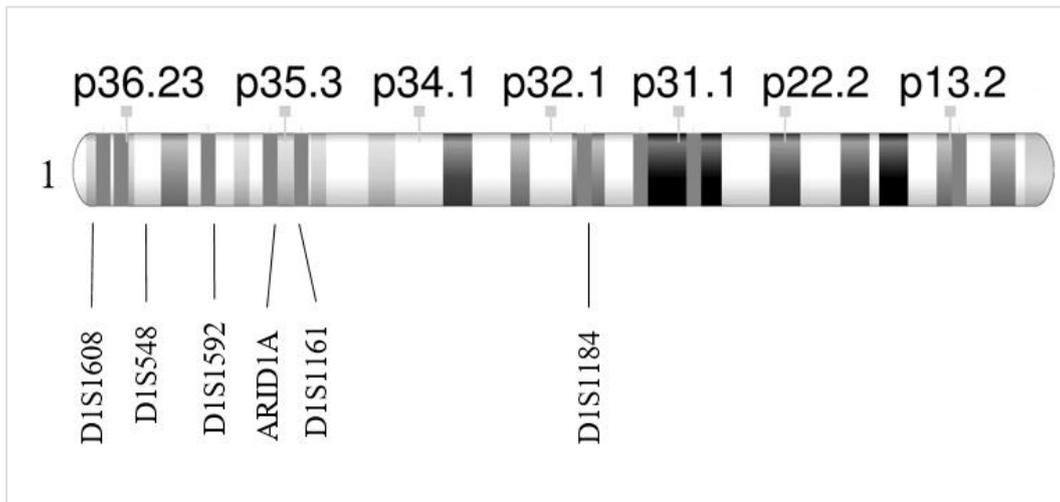


Abbildung 13. Kurzer Arm 1p des Chromosoms 1 - Hervorgehoben sind die Abschnitte, die in der LOH-Analyse nachgewiesen wurden, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].

Die PCR wurde für die bereits vorbestehenden Sonden nach etabliertem Protokoll in dem Mastercycler MC Nexus X2 (Eppendorf) durchgeführt. Für die Sonde des *ARID1A* wurde entsprechend der spezifischen Schmelztemperatur der Primer eine Anpassung der Anlagerungstemperatur vorgenommen (siehe **Tabelle 9**).

Die PCR lässt sich schematisch in drei große Reaktionen aufteilen, die genaue Ausführung ist in **Tabelle 9** dargestellt.

Reaktion	Schritt	Temperatur in °C	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	1	94	15 min	1x
	2	94	30 sec	37x
Anlagerung	3	53 bzw. 56	40 sec	
Elongation	4	72	40 sec	
Ende	5	72	5 min	1x
	6	4	Ende	Bis manuelle Beendigung

Tabelle 9. Ablauf und Zeiten der Polymerase-Kettenreaktion

Den Anfang der Reaktion stellte die Denaturierung der Proben bei 94°C dar. So trennten sich die doppelsträngige DNA und auch bereits angelagerte Primer wurden erneut getrennt [49]. Für die genutzte Taq-Polymerase im Hot-StarTaq Maser-Mix (Quiagen) musste eine längere Denaturierungszeit von 15 Minuten ausgeführt werden, um deren Aktivierung zu sichern. Nachfolgend wurde auf 53°C für die bereits etablierten Sonden und auf 56°C für die spezifische Sonde des *ARID1A* abgekühlt. Die Anpassung dieser Temperatur wurde anhand der spezifischen Schmelztemperaturen der Primer bestimmt. In diesem Schritt kam es zur Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen des

DNA-Strangs. An diese konnte sich in der folgenden Elongation die DNA-Polymerase anlagern und den Strang auffüllen. Dies erfolgte bei 72°C, dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase [49].

Diese Schritte wurden in 37 Zyklen wiederholt und folgend die Proben auf 4°C abgekühlt. Die PCR-Produkte konnten daraufhin direkt weiter analysiert oder bei -20°C zwischengelagert werden.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit 36 µl Probenpuffer (abc biopply) versetzt und in die Taschen des Spreadex® EL 800 Wide Mini (Serva) pipettiert. Die horizontale Gel-Elektrophorese lief für 105 Minuten bei 120V in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) (Serva) bei 54°C. Nachdem die Gele unter Aqua dest. gespült wurden, erfolgte die Anfärbung mit SYBR-Gold (0,8x TAE, 0,8x Destaining solution, 2x Sybr, Gold, Thermo Fisher Scientific) für 30 Minuten. Abschließend wurde drei Mal unter Aqua dest. gespült. Die Dokumentation des angefärbten Gels erfolgte unter UV-Licht mit Zuhilfenahme des Programms „EOS Utility“ von Canon.

Die LOH-Analyse auf den Elchromgelen wurde durch einen direkten bildlichen Vergleich der Tumor- und der Blutbande jedes Patienten durchgeführt. Im Kontrollgewebe (Blut oder Nicht-Tumorgewebe) sollten dabei beide Allele in Form von Banden unterschiedlichen Höhen erkennbar sein. Zwei Banden im Tumorgewebe werden als Heterozygotie gewertet, der Verlust einer der beiden Allel-Banden als Loss of Heterozygosity. Ist im Kontrollgewebe nur eine Bande erkennbar, kann die Probe aufgrund einer Homozygotie nicht ausgewertet werden.

4.2 WESTERN-BLOT

4.2.1 PROBENBEHANDLUNG UND LYSATHERSTELLUNG

Die Mehrzahl der Lysate wurde aus tiefgefrorenem Nativgewebe der Tumorproben hergestellt. Einige Proben waren allerdings in Tragant stabilisiert (siehe Tabelle 15 im Anhang). Die Proben wurden dabei möglichst vollständig aus der Substanz entnommen und wie folgt genannt weiterverarbeitet.

0,03 g bis 0,1 g der Tumorprobe wurden abgewogen und in eiskaltem RIPA-Puffer (neunfache Menge des Materials) zwei bis fünf Minuten inkubiert. In einer Glaspestille wurden die Proben anschließend im kühlen Puffer homogenisiert. Daraufhin wurden die Lysate mit DNase (A3778, AppliChem) versetzt und 30 Minuten bei 37°C im ThermoMixer inkubiert.

Ein Teil der Lysate wurde zusätzlich einer Proteinaufkonzentrierung unterzogen, um gegebenenfalls eine höhere Sensitivität zu erzielen. Dies wurde mit Hilfe der Trichloressigsäure-Proteinfällung vorgenommen. Dabei wurde das Lysat in einem Verhältnis von 4:1 mit Trichloressigsäure versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4°C wurde die Lösung bei 14.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet wurde mit kaltem Aceton gewaschen, erneut bei selbiger Drehzahl für fünf Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach vollständigem Verdunsten des Acetons wurde das Pellet mit dem dreifachen Volumen an Probepuffer

versetzt und darin gelöst. Wenn ein niedriger pH-Wert durch eine Gelbfärbung des Probenpuffers zu erkennen war, wurde mit Natriumhydroxid (NaOH) nachtitriert.

Für die Proteinquantifizierung in den (aufkonzentrierten) Lysaten erfolgte ein Quantifikationsassay mit „NanoOrange Protein Quantitation Kit“ (Thermo Fischer Scientific) mit Hilfe des Quantus™ Fluorometers (Promega) und eines mitgelieferten Proteinstandards nach adaptiertem Herstellerprotokoll.

4.2.2 DISKONTINUIERLICHE GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Zur spezifischen semi-quantitativen Erfassung der Ziel-Proteine in den Meningeomproben wurde die Methode der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli aus dem Jahre 1970 angewandt [52]. Dabei werden die Proteine nach ihrer Größe und Ladung in Bahnen eines Polyacrylamidgels aufgetrennt. Das SDS (Sodiumdodecylsulfat) bewirkt eine anhaltende Denaturierung der Proteine und versetzt diese mit negativer Ladung, was die Wanderung im elektrischen Feld begünstigt. Hier wurde das Mini-Protean Tetra System von Bio-Rad verwendet. Das Gel besteht aus einem 4%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel. Das Sammelgel zeichnet sich durch größere Poren und einen kleineren pH-Wert (pH 6,8) im Vergleich zum Trenngel (pH 8,9) aus. Es ermöglicht eine Konzentration der Proteine. Im Trenngel folgt darauf die Aufspaltung des Proteingemischs in einzelne Fraktionen, bedingt durch die kleineren Poren und den größeren pH-Wert.

Die Gele wurden mit den in Kapitel Puffer und Lösungen aufgeführten Lösungen gegossen und spätestens innerhalb von zwei Tagen genutzt. Das Reaktionsprinzip besteht in einer radikalischen Polymerisation der monomeren Acrylamid-Moleküle. Die Quervernetzung wurde durch Bisacrylamid vermittelt. Den Radikalstarter, der erst direkt vor dem Gießen der Platten zugegeben wird, stellt dabei das Ammoniumperoxodisulfat (APS) dar. Zusätzlich wird die Lösung mit dem Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt, der die Reaktion beschleunigt. Die erzeugte Trenngel-Lösung wird zwischen zwei Glasplatten mit 1,5 mm Abstand gegossen. Zur besseren Kanten-Bildung wurde die Lösung mit Ethanol überschichtet. Sobald das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das verbleibende Ethanol abgenommen und in gleicher Weise das Sammelgel hergestellt und über das Trenngel aufgetragen.

Aufgetragen wurden jeweils 40-45 µl Lysat pro Tasche. Die Kammer wurde zuvor mit Laufpuffer (siehe 3.1.4) gefüllt, zunächst ein Strom von 100 mA und bei Erreichen der Farbfront des Trenngels 70 mA angelegt. Das gesamte System wurde dabei extern gekühlt. Im vertikal orientierten Gel trennten sich dabei die Proteine zwischen 20 und 250 kDa auf. Zur Größenabschätzung in der Auswertung wurde ein Protein-Größenmarker von Bio-Rad, sowie eine Kontrolle aus MGTW3-Zellysate und ein Lysat aus HEK293T-Zellen mit einer Überexpression von *ARID1A* (LifeSpan BioScience) verwendet. Von letzterem wurden jeweils 2 µg pro Tasche gegeben.

4.2.3 WESTERN BLOT

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel mittels des sogenannten „Wet Blots“ auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zunächst wurden die Gele 10 Minuten in den Transferpuffer gelegt, um die Gele im neuen Buffer zu äquilibrieren. Dann wurden die Gele gemäß der Herstellervorgaben vorbereitet, die Kammer mit Transferpuffer (siehe 3.1.4) befüllt, und anschließend die Proteine bei 200 mA elektrophoretisch für zwei (DPF3, SNF5) oder vier (ARID1A) Stunden übertragen. Dieses System wurde dabei kontinuierlich bei 4°C gekühlt.

Nach erfolgter Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde die Membran sofort in 0,2% Casein für 20 Minuten geblockt. Dabei besetzt das Casein die frei gebliebenen Bindungsstellen auf der Membran. Anschließend wurde die Membran mit den gewünschten Antikörpern inkubiert, um die eigentliche Immunfärbung durchzuführen.

Die Primärantikörper Anti-SNF5, Anti-DPF3 und Anti-ARID1A (Abcam) wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Anti-alpha-Tubulin (Abcam), der als Ladekontrolle diente, wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden alle Blots jeweils 3 x 5 Minuten mit TBST gewaschen. Als Sekundär-Antikörper für den Anti-SNF5, Anti-DPF3 und den Anti-ARID1A wurde der Goat-Anti-Rabbit EnVision von Agilent/Dako in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Für die Ladekontrolle wurde der Goat-Anti-Mouse EnVision von Agilent/Dako in einer Verdünnung von 1:500 genutzt. Die Inkubation des Goat-Anti-Rabbit EnVision erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und die des Goat-Anti-Mouse EnVision für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Vor der Entwicklung der Blots wurden diese jeweils 4 x 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Signalentwicklung läuft durch eine Chemilumineszenz-Reaktion ab, die über eine Oxidation der dianionischen Form des Luminols (3-Aminophthalsäurehydrazid) über eine an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert wird. Durch diese Oxidation wird ein Elektron in den erregten Zustand erhoben. Bei Zurückfallen in den Grundzustand gibt dieses Elektron ein Photon im höherenergetischen Teil des sichtbaren Lichtspektrums ab [27].

Dieses Licht kann bei Ablauf der Reaktion einen Chemilumineszenz-Film belichten. Dieser wurde nach 30 (Anti-alpha-Tubulin) bis 60 Minuten (Anti-ARID1A, Anti-DPF3, Anti-SNF5) Inkubation im Dunkeln in einer Entwickler-Lösung (TETENAL) entwickelt und zur Fixation anschließend in die Fixierungs-Lösung gelegt. Der Film wurde daraufhin bei einer minimalen Waschzeit von 10 Minuten in Leitungswasser von den vorherigen Lösungen gesäubert.

Die grafische Auswertung der Western Blots erfolgte durch die Software „ImageJ“ Version 1.52a (W. Rasband, National Institutes of Health, USA) [81]. Aus der farblichen Intensität und Dicke der Protein-Banden wurden Zahlenwerte errechnet. Die ermittelten Werte der jeweiligen 100kDa ARID1A-Bande und der Wert der Bande der Ladekontrolle (alpha-Tubulin) wurde ins Verhältnis gesetzt, um Schwankungen in der Gesamtheit der Proteinkonzentration in den Lysaten zu eliminieren. Zum Vergleich diente das Kontrolllysat, das bei allen Messungen ungefähr denselben Wert bei der Ratio hatte

und konstant ein ähnliches Muster aufwies. Zusätzlich erfolgte eine Analyse des Bandenmusters im Gesamtvergleich. Eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Blots wurde somit qualitativ und semi-quantitativ sichergestellt.

4.3 IMMUNOHISTOCHEMIE

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation und Expression von ARID1A innerhalb des Tumorgewebes, wurde eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Das Gewebe wurde nach Zuschnitt durch einen Neuropathologen in einem Einbettautomaten (Shandon) in Paraplast Plus (McCormicks Scientific) eingebettet.

Die in Paraffin eingebetteten Meningeome wurden an einem Schlittenmikrotom (Leica) auf 1-2 µm Dicke geschnitten und mittels eines Wasserbads auf die Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck GmbH) aufgebracht. Daraufhin wurden die Objektträger in einem Wärmeschrank (Heraeus Instruments) bei 56 °C mindestens 12 Stunden getrocknet und erst im Anschluss weiter behandelt.

Zur Rehydrierung wurde eine absteigende Alkoholreihe durchlaufen (siehe **Tabelle 10**) und folgend in Aqua dest. gespült.

Schritt	Dauer	Wiederholungen
Xylol	10 Minuten	3
100% Ethanol	2 Minuten	2
90% Ethanol	2 Minuten	1
80% Ethanol	2 Minuten	1
70% Ethanol	2 Minuten	1

Tabelle 10. Rehydrierung/ Absteigende Alkoholreihe

Anschließend wurde die endogene Peroxidase 10 Minuten in 1%iger Wasserstoffperoxid-Lösung (siehe 3.1.4) blockiert und in Aqua dest. gespült.

Die Antigen-Demaskierung erfolgte durch Aufkochen der Schnitte in Puffer (pH 6,1, Agilent/ Dako) für 30 Minuten in einem Dampfgerät (Phillips). Danach mussten die Proben 30 Minuten abkühlen, wurden kurz in Aqua dest. gewaschen und dann in TBST (siehe 3.1.4) gestellt.

Für die immunhistochemische Färbung wurden Coverplates (Shandon Coverplate™, Thermo Fisher Scientific Inc) an die Objektträger ohne Lufteinschlüsse angelegt und mit TBST durch hydrostatische Kräfte gehalten. Zur Durchlaufkontrolle wurde auf die Objektträger TBST pipettiert, um den korrekten Sitz der Coverplates zu überprüfen.

Als Primärantikörper wurde der „ARID1A (PSG3)“ von SantaCruz (sc-32761) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Es wurden pro Objektträger 100 µl der Verdünnung für 45 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Spülgängen mit TBST wurde als Sekundärantikörper der „EnVision /HRP Rabbit/Mouse“ (Dako) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von drei Spülgängen mit TBST.

Die Farbentwicklung wurde in einer sogenannten „feuchten Kammer“ durchgeführt. Die Objektträger wurden jeweils mit 200 µl DAB-Lösung (Dako REAL DAB+ Chromogen kombiniert mit Dako REAL Substrate Buffer, Agilent, 1:50, frisch angesetzt) bedeckt und für sieben Minuten inkubiert. Nachdem eine Farbreaktion makroskopisch sichtbar wurde, wurden die Schnitte in Aqua dest. überführt und mehrfach in diesem gespült.

Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger für 20 Sekunden in Mayer's Hämalaunlösung (Merck KGaA) gefärbt, mit Aqua dest. gespült und fünf Minuten unter lauwarmen Leitungswasser gebläut. Der Farbumschlag bewirkt dabei eine intensive Blaufärbung der Zellkerne durch den Anstieg des pH-Wertes im Wasser. Weiter wurden die Objektträger nochmals in Aqua dest. gespült und nun in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (siehe **Tabelle 11**).

Schritt	Dauer	Wiederholungen
70% Ethanol	kurz	1
80% Ethanol	kurz	1
90% Ethanol	kurz	1
100% Ethanol	2 Minuten	2
Xylol	2 Minuten	2

Tabelle 11. Dehydrierung/ Aufsteigende Alkoholreihe

Aus dem Xylol wurden die Schnitte direkt mit Entellan eingedeckt und im Wärmeschrank für 10 Minuten bei 80°C getrocknet.

Die Auswertung der Immunhistochemie wurde an einem Durchlichtmikroskop (BH-2, Olympus) mit externer Lichtquelle (LED-DC Regelnetzgerät, BW-Optik) durchgeführt. Dabei wurden die Proben anhand des Verteilungsmusters des ARID1A-Proteins (Konzentrierung in bestimmten Tumorbereichen, Mosaik-Muster, intrazelluläre Lokalisation des Proteins, etc.) und morphologischer Auffälligkeiten im Zusammenhang mit weiteren Merkmalen des Patienten untersucht. Die Bilder wurden durch das Programm „Leica Application Suite (LAS) Version 3.8“ (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) aufgenommen und digital gespeichert.

4.4 STATISTIK

Die Datenauswertung wurde mit den Programmen „Microsoft Excel 2013“ (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), „IBM SPSS Statistics 25“ (International Business Machines Corporation, New York, USA) und „R Studio“ (R-Tools Technology Inc., Boston, MA, USA) vorgenommen und grafisch dargestellt.

Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von unter 0,05 festgelegt. Dieser wurde im Zusammenhang mit dem Konfidenzintervall betrachtet.

4.5 FREMDLEISTUNGEN

Die DNA-Isolation wurde in der routinemäßigen Diagnostik der Molekulargenetik des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Die Reste der Produkte konnten für diese Studie genutzt werden.

Auch Anteile der LOH-Analyse wurden durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes bearbeitet und sind der **Tabelle 15** im Anhang zu entnehmen.

Des Weiteren erfolgten der Zuschnitt der Paraffinblöcke am Cryostaten, die Färbung der alkalischen Phosphatase und des Ki67 durch das Fachpersonal des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Die Coomassie-Färbelösung und -Entfärbelösung wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Riemschneider der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes bereitgestellt. Weiter wurden der Anti-alpha-Tubulin Antikörper der Firma Abcam, das Kontrolllysate (MGTW3-Zellysate) für den Western Blot, die Schwämme für den Wet-Blot und Trockeneis von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Fassbender der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

5 ERGEBNISSE

In dieser Studie wurden Gewebeproben aus Meningeomen verschiedener WHO-Grade von insgesamt 49 Patienten analysiert (siehe **Tabelle 8**), die in der Zeit von 2017 bis 2019 in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes operiert wurden. Bei zwei Patienten mit einem multiplen Tumorbefall wurden jeweils zwei Proben von Tumoren entnommen, die sich nicht nur in ihrer Lokalisation, sondern auch in ihrer histologischen Charakterisierung unterschieden. Dementsprechend wurden diese Proben jeweils als einzelne Entitäten betrachtet, womit schlussendlich insgesamt 51 Meningeomproben auf unterschiedliche Aspekte hin ausgewertet wurden.

Bei allen Patienten wurde eine LOH-Analyse durchgeführt, um chromosomale Änderungen zu analysieren. Aus dieser Gruppe wurden 40 Patienten (42 Proben) weiter im Western Blot und der Immunhistochemie auf Proteinebene untersucht. Die fehlenden neun Patienten konnten aufgrund fehlenden Materials nicht in die weitere Analyse mit einbezogen werden. Für die LOH-Analyse und epidemiologische Statistik wurden sie dennoch berücksichtigt.

Neben den experimentellen Daten zur Ursachenforschung von Meningeomen wurden die vorhandenen klinischen und epidemiologischen Daten statistisch ausgewertet um sie mit bereits publizierten Werten vergleichen zu können und gegebenenfalls Abweichungen identifizieren zu können.

5.1 KLINISCHE DATENANALYSE

5.1.1 ALTERS- UND GESCHLECHTSVERTEILUNG

Bei Auftrennung der Patienten nach Geschlecht finden sich insgesamt 36 Frauen und 13 Männer. Somit ist die Inzidenz des Meningeoms in dieser Untersuchung bei Frauen mit einem Gesamtanteil von 73,5% in deutlich höherem Umfang als bei dem männlichen Patienten (26,5%) zu finden. Daraus ergibt sich bei Frauen ein um circa 2,8-fach höheres Auftreten an Meningeomen als bei Männern.

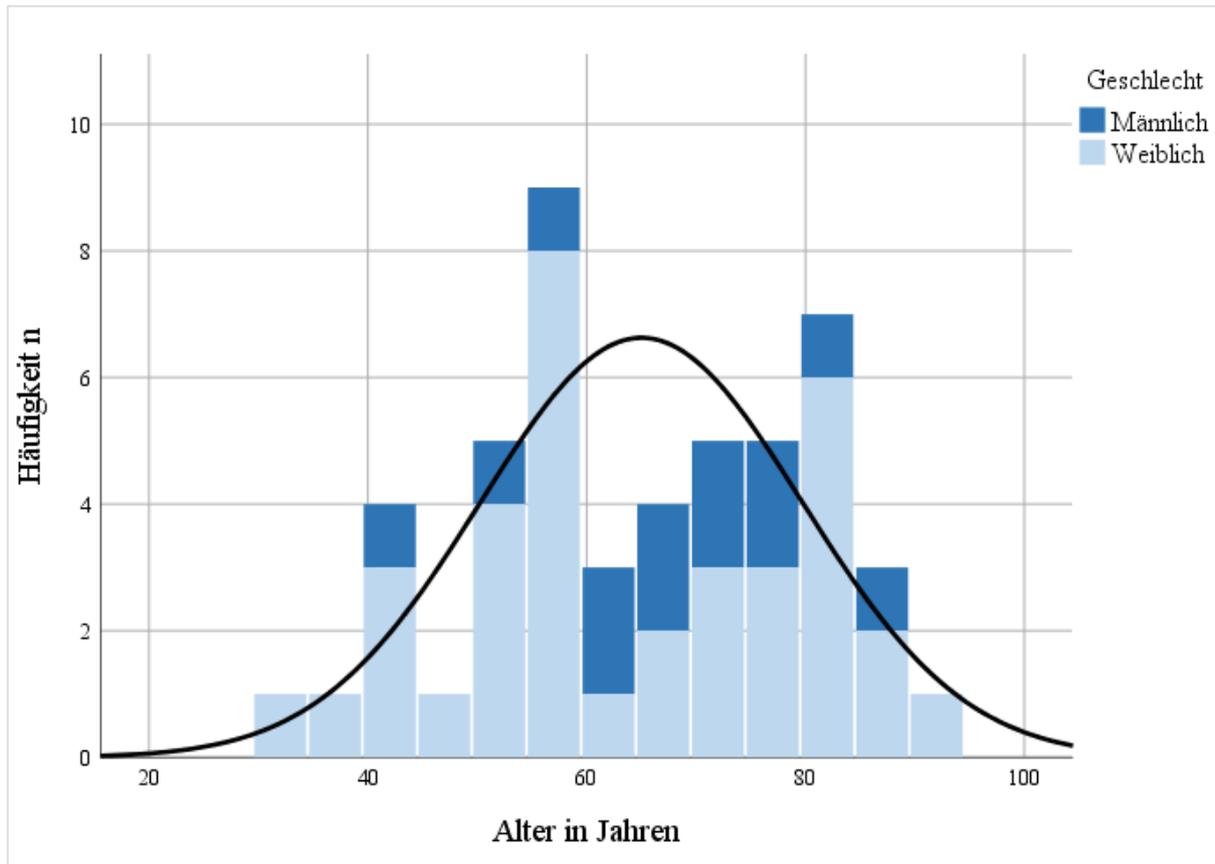


Abbildung 14. Altersverteilung der 49 Meningeompatienten

Insgesamt 49 Patienten (Frauen (hellblau) $n=36$, Männer (dunkelblau) $n=13$), die zwischen 2017 und 2019 ein Meningeom entwickelten und in der Klinik für Neurochirurgie des Uniklinikums des Saarlandes operiert wurden, wurden für die vorliegende Statistik betrachtet. Das mittlere Alter beträgt $65,0 \pm 14,7$ Jahre (Frauen $64,0 \pm 15,63$ Jahre, Männer $67,77 \pm 12,08$ Jahre).

Das Alter wurde am Tag der Operation bestimmt. So liegt das Durchschnittsalter bei 65 Jahren. Die Standardabweichung beträgt 14,75 Jahre. Dabei war die älteste Patientin 94 Jahre alt und die jüngste Patientin 32 Jahre alt. Der Median liegt bei 65 Jahren. Es wurde eine Normalverteilung aufgrund der klassischen Merkmale und auf Basis einer Überprüfung durch ein Q-Q-Diagramm nachgewiesen.

		Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
Geschlecht	Männlich (n= 13)	67,77	12,08	43	85
	Weiblich (n=36)	64,0	15,63	32	94

Tabelle 12. Epidemiologische Analyse der Altersverteilung von 49 Meningeompatienten unter den Geschlechtern in Jahren

Auffallend ist, dass das Alter eine ungleiche Verteilung unter den Geschlechtern zeigt: Wie aus **Tabelle 12** zu entnehmen, liegt innerhalb der weiblichen Gruppe das mittlere Auftretsalter bei 64 Jahren, während die männliche Gruppe mit 68 Jahren einen höheren Durchschnittswert aufweist. Außerdem zeigte die weibliche Patientengruppe eine größere Spannweite von 62 Jahren im Vergleich zu den männlichen Teilnehmern von 42 Jahren.

5.1.2 HISTOPATHOLOGISCHE EINTEILUNG NACH WHO

In diese Studie wurden 43 Meningeome von Grad I (84,31%), 7 Meningeome von Grad II (13,72%), sowie ein Meningeom von Grad III (1,96%) aufgenommen. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der WHO-Grade und Subgruppen aufgetragen. Die prozentualen Anteile im Text beziehen sich auf die Gesamtheit (n = 51 Proben), wenn nicht anders beschrieben. Am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes wurde am häufigsten das klassische Meningeom diagnostiziert, das zwar meningotheleale und psammomatöse Eigenschaften aufwies, aber keine der Untergruppen-spezifischen Merkmale nach WHO in besonderer Weise ausgeprägt hatte.

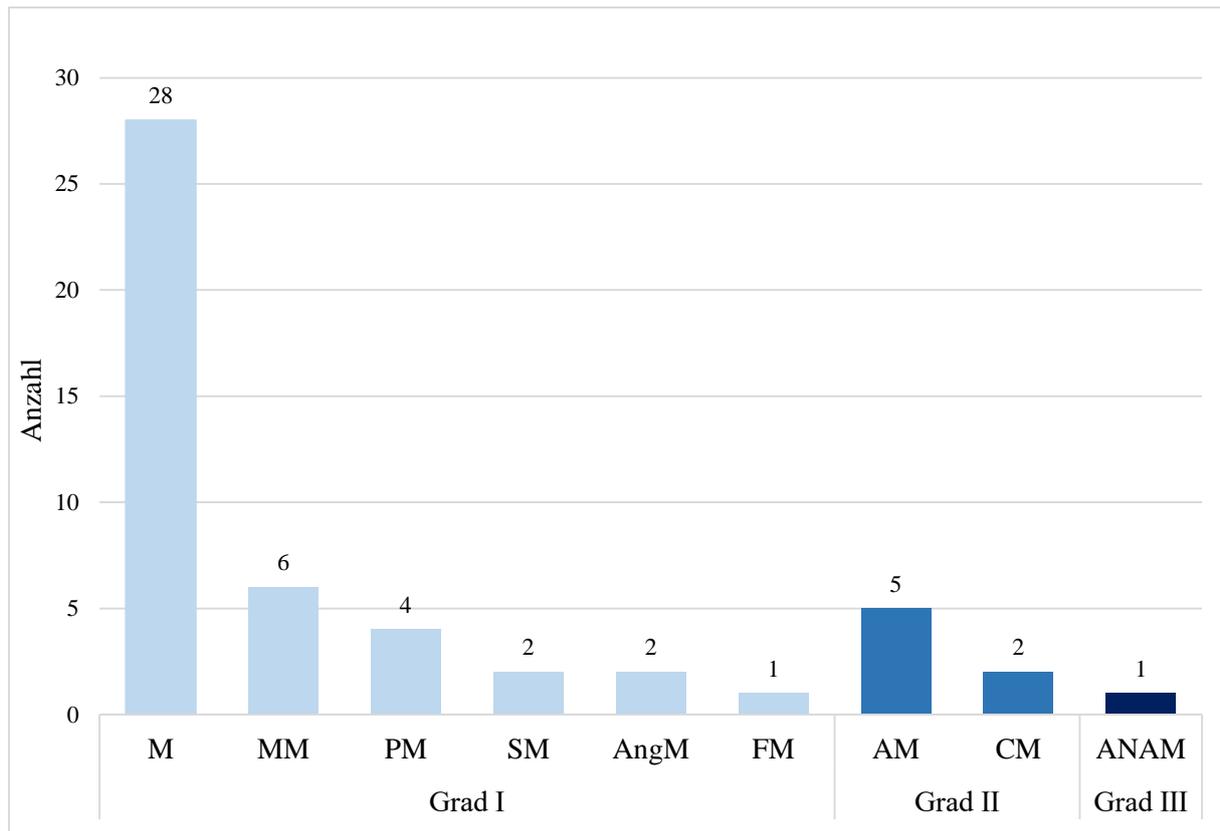


Abbildung 15. Verteilung der untersuchten Meningeome nach WHO-Grad und histopathologischer Untergruppe

M: Klassisches Meningeom, MM: Meningotheliales Meningeom, PM: Psammomatöses Meningeom, SM: Sekretorisches Meningeom, AngM: Angiomatöses Meningeom, FM: Fibröses Meningeom, AM: Atypisches Meningeom, CM: Chordoides Meningeom, ANAM: Anaplastisches Meningeom

Es wurden mit 28 Proben mehr als die Hälfte der untersuchten Proben zu der Gruppe der klassischen Meningeome von Grad I (54,9%) zugeordnet, gefolgt von sechs Proben des meningothelialen Meningeoms (11,8%) und vier Proben des psammomatösen Meningeom (7,8%). Zusätzlich wurden zwei sekretorische Meningeome (3,9%), zwei angiomatöse Meningeome (3,9%) und ein fibröses Meningeom (2%) von Grad I beobachtet. Diese werden ebenfalls zu den erstgradigen Meningeomen gezählt. Innerhalb der Gruppe von Grad II Meningeomen fanden sich fünf atypische Meningeome (9,8%) und zwei chordoide Meningeome (3,9%). Das Meningeom von Grad III ist ein anaplastisches Meningeom und nimmt damit zwei Prozent der Gesamtstichprobe ein.

5.1.3 LOKALISATION

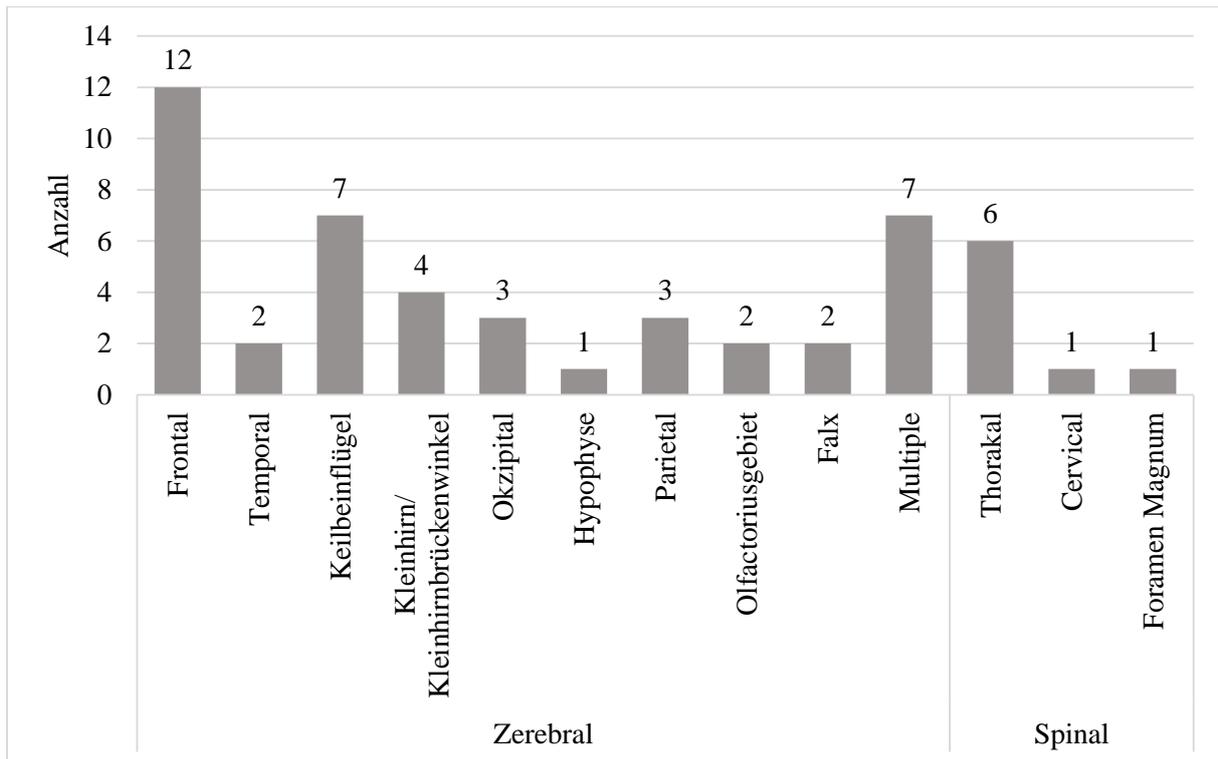


Abbildung 16. Prozentuale Häufigkeit der Lokalisationen, n = 51

Mit einem Anteil von 43 Proben (84,3%) der Gesamtheit befanden sich die meisten Meningeome intrazerebral (siehe **Abbildung 16**). Davon traten zwölf der Meningeome frontal auf. Dies stellte die häufigste Lokalisation in dieser Untersuchung dar. Daneben zeigten sieben Patienten einen Ursprung des Meningeoms innerhalb des Keilbeinflügels. Es fielen vier Patienten mit einem Meningeom im Bereich des Kleinhirns beziehungsweise des Kleinhirnbrückenwinkels auf. Weitere Lokalisationen fanden sich parietal (drei), okzipital (drei), sowie temporal (zwei) und an der Hypophyse (eine).

Nur acht Meningeome lagen spinal, wobei 75% (6/8) im des Bereichs der Brustwirbelsäule lagen. Die anderen beiden Proben fanden sich am Foramen magnum bis C1 (eine) und auf der Höhe C6/C7 (eine). Somit nehmen die spinalen Meningeome 15,7% der Gesamtheit ein.

Fünf Patienten zeigten ein multiples Auftreten. Davon wurden bei zwei Patienten die multiplen Herde separat untersucht. In allen Fällen lagen die Tumorherde intrazerebral. Die Mehrzahl der Herde war dabei temporal (fünf) zu finden, gefolgt von der Mittellinienlokalisation, dem Keilbeinflügel, sowie parietal und frontal (jeweils zwei) und dem Kleinhirnbrückenwinkel (eins). Drei dieser Patienten waren weiblich. Vier der multipel aufgetreten Meningeome wurden als WHO-Grad I klassifiziert, während ein weiteres Meningeom dem WHO-Grad II zugeteilt wurde. Zusätzlich handelte es sich bei zwei Meningeomen dieses Merkmals um ein bekanntes Rezidiv.

5.1.4 REZIDIVAUFRETEN

Fall-nummer	Alter in Jahren	Geschlecht	Histo. Subtyp	WHO-Grad	Anzahl Rezidive	Ätiologie, falls bekannt
5	57	W	M	I	unbekannt	
9	53	W	PM	I	6	NF2
28	32	W	CM	II	4	
32	44	W	M	I	1	
35	56	M	MM	I	1	
40	69	W	M	I	unbekannt	
51	75	W	ANAM	III	unbekannt	NF2

Tabelle 13. Eigenschaften der Meningeompatienten, die mindestens ein Rezidiv zeigten

Alter: Alter bei Operation; Geschlecht: M: Männlich, W: Weiblich; Histologischer Subtyp: M: Klassisches Meningeom, PM: Psammomatöses Meningeom, CM: Chordoides Meningeom, MM: Meningotheliales Meningeom, ANAM: Anaplastisches Meningeom; NF2: Neurofibromatose Typ 2

Innerhalb der untersuchten Patientengruppe zeigten sich sieben Patienten mit mindestens einem bekannten Rezidiv. Fünf dieser Patienten wurden dem WHO-Grad I zugeteilt, während jeweils ein Patient WHO-Grad II und III aufwies. Auch in der histologischen Einteilung fiel die Gruppe durch ihre Heterogenität auf: Die Gruppe zeigte drei klassische Meningeome, ein meningotheliales und ein psammomatöses Meningeom, sowie ein chordoides und ein anaplastisches Meningeom.

Eine Patientin wies dabei bei bekannter Neurofibromatose Typ 2 das insgesamt sechste Rezidiv auf. Eine weitere Patientin zeigte das vierte Rezidiv in einem Alter von 32 Jahren. Des Weiteren enthielt die Patientengruppe zwei Patienten mit dem ersten Rezidiv. Bei den anderen drei Patienten gab es keine Anmerkung zur Rezidivhäufigkeit.

Bei den restlichen Patienten der Studie wurde in der Krankenakte kein Rezidiv vermerkt, was allerdings ein Rezidiv nicht ausschließt.

5.2 LOSS OF HETEROZYGOSITY-ANALYSE DES CHROMOSOMS 1P

Zur Überprüfung des chromosomalen Status von 1p wurde eine PCR-gestützte Mikrosatelliten-Analyse der Meningeomproben auf sechs Sonden vollzogen. Alle Fälle wurden in die LOH-Analyse eingeschlossen (siehe **Tabelle 16** im Anhang). Dabei wurde das schon vorhandene Protokoll der Analyse des Chromosoms 1p nach Hartmann *et al.* durch eine weitere Sonde ergänzt [30]. Zusätzlich zu den schon etablierten Sonden wurde eigens für den Nachweis des *ARID1A* Genlokus auf 1p36.11 eine Sonde eingesetzt. Diese Untersuchung wurde ebenfalls bei allen 51 Proben durchgeführt.

5.2.1 KLASSIFIKATION UND ÜBERBLICK ÜBER 1P-VERLUSTE

Sobald eine der sechs untersuchten Sonden im Vergleich mit der Kontrolle einen Allel-Ausfall im Tumorgewebe zeigte, wurde der Fall als „Loss of Heterozygosity“ gewertet. Die Sonden wurden weitergehend einzeln analysiert.

In der Auswertung ergeben sich fünf mögliche Ergebnisse: Als Normalstatus wurde ein Ergebnis definiert, bei dem keines der Allele im Tumorgewebe ausgefallen war und somit klassisch zwei Allele vorlagen (**Abbildung 17 A**).

Im Kontrast dazu wurde ein Ergebnis als LOH gewertet, wenn ein Allel fehlte. Dabei konnte entweder das kleinere (**Abbildung 17 B**) oder das größere Allel ausgefallen vorliegen (**Abbildung 17 C**).

Neben den klar definierbaren Ergebnissen zeigte eine Vielzahl der Fälle auf einigen Sonden ein homozygotes Vorliegen beider Allele (**Abbildung 17 D**). Dadurch war die Probe nicht zu interpretieren, da nicht klar zwischen den oben genannten Möglichkeiten differenziert werden konnte. Einzelne Proben wiesen auch einen „Shift“ auf. Es handelte sich um eine Art von Verschiebung der Sonden im Vergleich von Kontroll- und Tumorgewebe, möglicherweise bedingt durch eine Größenänderung des Mikrosatelliten (**Abbildung 17 E**).

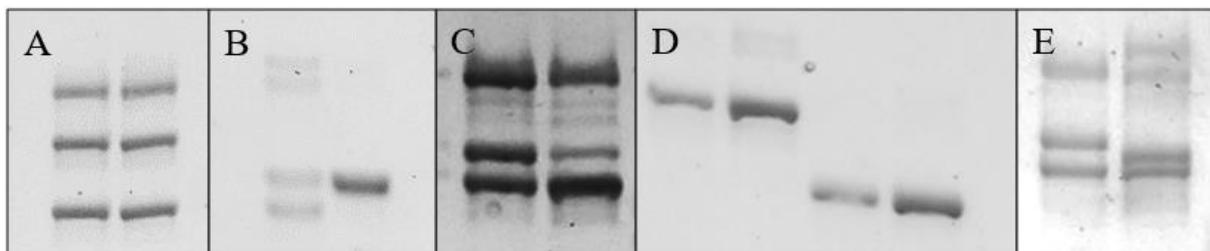


Abbildung 17. Klassifizierung der Ergebnisse der LOH-Analyse

Aufgeführt sind repräsentative Ergebnisse unterschiedlicher Banden und unterschiedlicher Sonden für die PCR-basierte Amplifikation von polymorphen Mikrosatelliten. A: Beispiel für einen Fall ohne Allelverlust bei Fall Nr. 6; B: Beispiel für eine LOH (Verlust des kleineren Allels) bei Fall Nr. 17; C: Beispiel für eine LOH (Verlust des größeren Allels) bei Fall Nr. 25; D: Beispiel für eine als homozygot gewertete Bande bei Fall Nr. 3; E: Beispiel für einen "Shift" bei Fall Nr. 17

In der Analyse der LOH auf Chromosom 1p wiesen 17 Patienten, also 33,3%, mindestens eine LOH auf einer der sechs untersuchten Sonden auf (folgend allgemein als LOH bezeichnet). Innerhalb der Gruppe der Grad I Meningeome wiesen 27,9% (12/43) eine LOH auf. Unter den Grad II Meningeomen zeigten 57,1% (4/7) eine LOH. Das Grad III Meningeom (1/1) wies ebenfalls eine LOH auf.

Der „Shift“ zeigte sich nur auf drei Sonden (*ARIDIA*, D1S1161, D1S1184) des Falls Nummer 17, bei dem zusätzlich eine LOH auf der Sonde D1S548 nachgewiesen werden konnte.

Bei vielen Fällen kam es auf einigen der Sonden zu einer homozygoten Ausprägung des Allels. 74,5% (38/51) der Fälle zeigen auf mindestens einer Sonde diese Eigenschaft.

In den folgenden Regressionsanalysen wurden aus den fünf Klassifikationen zwei Untergruppen gebildet: „LOH“ und „keine LOH“. Fälle, die unter die Kategorie „Shift“ fielen, zählten dabei in die zweite Gruppe, da es zu keinem Allelverlust kam. Die Fälle in homozygoter Ausprägung wurden dabei nicht in die Analyse mit einbezogen, da nicht klar ein Allelverlust auszuschließen war.

5.2.2 ANALYSE DER EINZELNEN SONDEN

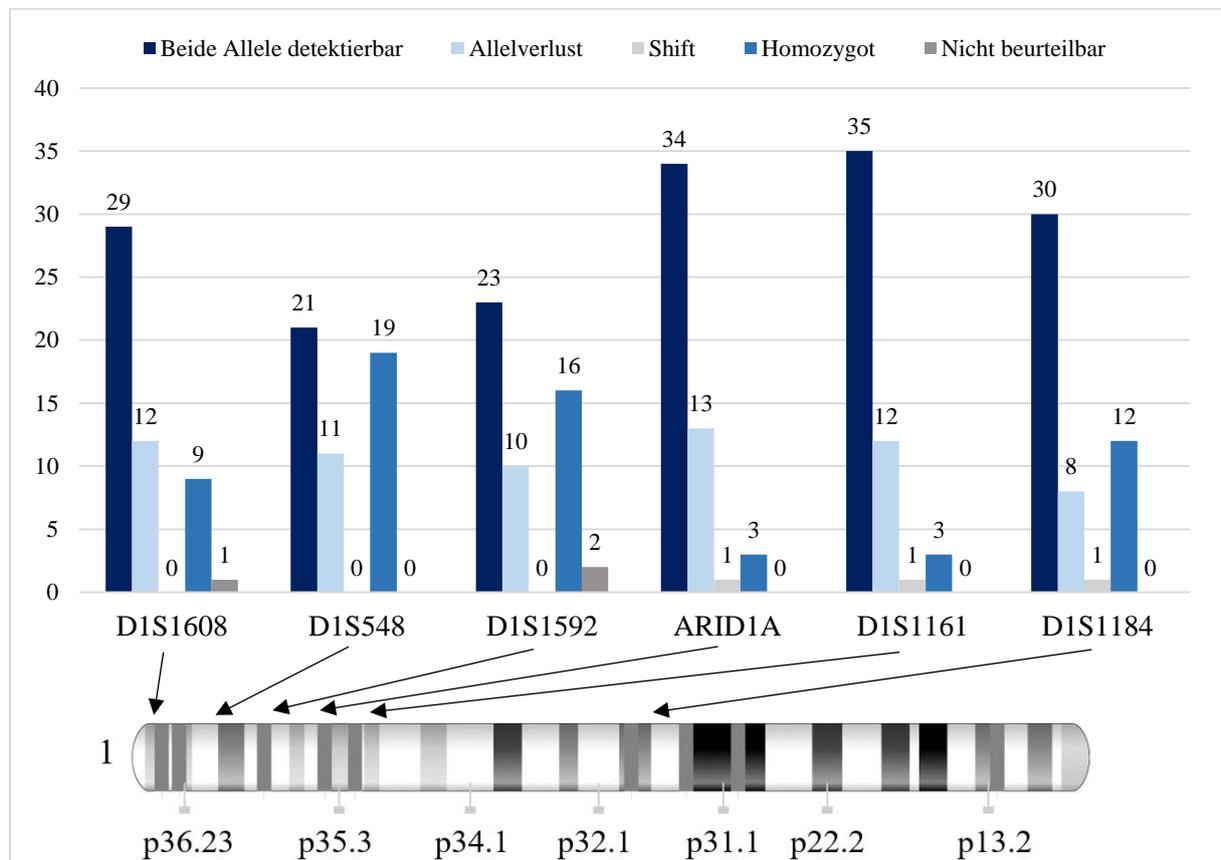


Abbildung 18. Auftrennung der untersuchten Sonden nach den möglichen Ausprägungen

Zur Verdeutlichung der Lage der einzelnen Sonden wurde die Grafik durch die Abbildung des Chromosomenarms 1p ergänzt, die in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine erstellt wurde [88].

Bei Betrachtung der Abbildung 18 fällt auf, dass eine sehr ähnliche Verteilung bei allen Sonden auftritt. Zwischen 41 und 69 % der Fälle auf den Sonden zeigen keinen Allelverlust, wohingegen konstant zwischen 16 und 25 % der Fälle ein Allelverlust zu evaluieren war. Am häufigsten zeigte die Sonde D1S1161 beide Allele detektierbar, während die Sonde des *ARID1A* am häufigsten eine LOH aufwies.

Bei den Sonden D1S1608 und D1S1592 waren insgesamt drei Fälle grundlegend nicht beurteilbar und damit nicht auswertbar. Die Sonden D1S548 und D1S1592 zeichneten sich dadurch aus, dass besonders häufig aufgrund der Homozygotie keine Interpretation möglich war und somit ein im Vergleich mit den anderen Sonden großer Anteil an Fällen nicht in die Auswertung mit eingehen konnte.

Speziell die Analyse der Sonde des Genlokus von *ARIDIA* fiel bedeutend aus (siehe **Abbildung 18**): So lagen zwar 66,7% (34/51) der Fälle ohne Allelverlust vor, aber 25,5% (13/51) der Fälle zeigten einen Verlust auf einem der beiden Allele. Somit ist diese Sonde in dieser Studie im Vergleich mit den weiter untersuchten Sonden am häufigsten durch einen Allelverlust betroffen. Nur 5,9% (3/51) der Fälle stellten sich aufgrund von homozygoten Vorliegens als nicht auswertbar heraus. Abschließend zeigte sich auch hier bei dem Fall Nr. 17 das Phänomen des „Shifts“.

Zusammenfassend lässt sich in dieser Studie sagen, dass die Sonde des *ARIDIA* absolut gesehen am häufigsten durch einen Allelverlust betroffen war, vermutlich dadurch begünstigt, dass bei dieser Sonde die meisten Fälle auswertbar waren. Sie zeigt dadurch ein Alleinstellungsmerkmal im Vergleich mit den anderen untersuchten Sonden. Vor allem die Sonden D1S548 und D1S1592 zeigten einen hohen Anteil an homozygoten Ausprägungen in dieser Stichprobe. Diese konnten folgend nicht ausgewertet werden und reduzierten die Aussagekraft dieser Sonden daher wesentlich (siehe **Abbildung 18**).

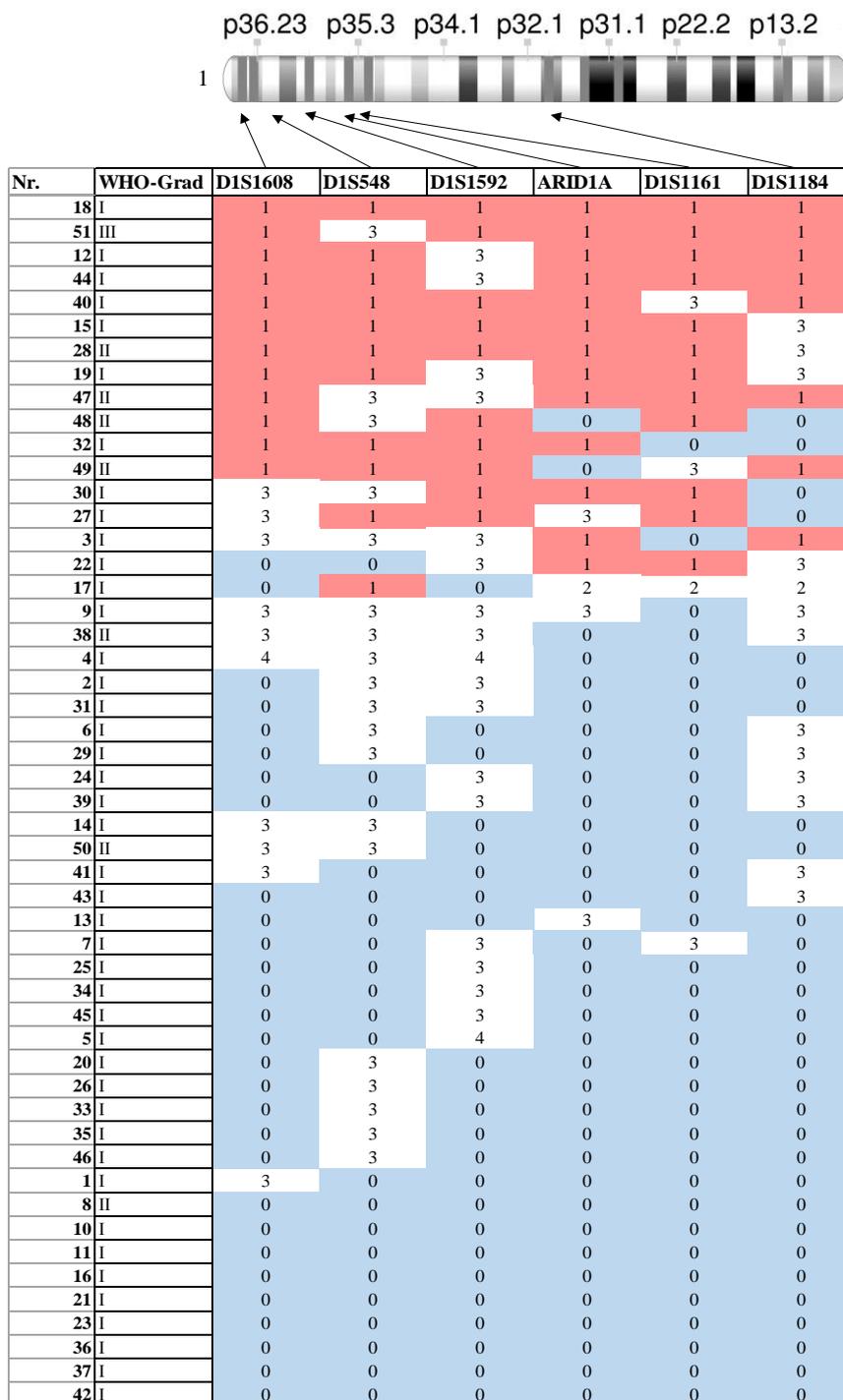


Abbildung 19. Anordnung der Meningeomproben nach Anzahl betroffener Sonden in der LOH-Analyse

Die Fälle sind nach dem Status der einzelnen Sonden angeordnet. 0/ blau = kein Allelverlust, 1/ rot = Allelverlust und damit LOH, 2 = Shift, 3 = homozygotes Vorliegen der Allele, 4 = nicht beurteilbares Ergebnis. Zur Verdeutlichung der Lage der einzelnen Sonden wurde die Grafik durch die Abbildung des Chromosomenarms 1p ergänzt, die in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine erstellt wurde [88].

In **Abbildung 19** ist die Auftrennung der Stichprobe nach betroffenen Sonden durch eine LOH dargestellt. Es zeigte sich, dass die Mehrzahl der Fälle ohne Allelverlust vorlag oder durch homozygotes Vorliegen diesbezüglich nicht interpretierbar war. Wenn es allerdings zu einer Veränderung kam, waren eher mehr als weniger Sonden betroffen. So ist der **Abbildung 19** zu entnehmen, dass am häufigsten fünf Sonden einen Allelverlust zeigten. Im starken Kontrast stehen dazu die Gruppen, in denen weniger Sonden betroffen waren und gleichermaßen einen geringeren Anteil am Gesamtkollektiv darstellten. Die Stichprobe lässt sich klar in zwei Gruppen trennen: eine Gruppe von Meningeomen mit einer LOH, die damit die Mehrheit der untersuchten Sonden betrifft und eine Gruppe, die grundsätzlich ohne einen Verlust des Chromosomenarms 1p vorliegt.

5.2.3 LOSS OF HETEROZYGOSITY-ANALYSE DES *ARID1A*

Bei dem Mikrosatelliten für den Genlokus des *ARID1A* handelt es sich um ein Tetranukleotid der Sequenz „TTTC“ mit 18,8 Kopien auf dem Chromosom 1p36.11 (UCSC Genome Browser, Stand April 2020) [29,43]. Der Mikrosatellit befindet sich in einem Abstand von 22.400 Basenpaaren zu dem Genlokus des *ARID1A* (NCBI, Stand April 2020) [88]. Die Wiederholungen des Mikrosatelliten können individuell variieren und damit unterschiedliche Bandengrößen generieren [11].

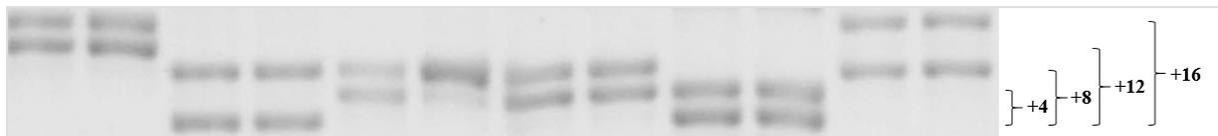


Abbildung 20. Polymorphismen des Mikrosatelliten auf 1p36.11

Repräsentatives Ergebnis der *ARID1A*-Sonde verschiedener Meningeomfälle nebeneinandergestellt mit Kennzeichnung der Zunahme an Basenpaaren. Eine Zunahme an Wiederholungen spiegelt sich dabei in einer schweren Bande wieder, die folglich höher im Gel zu finden ist. Eine weitere Wiederholung der Sequenz entspricht dabei vier Basenpaaren.

Bei der Analyse des *ARID1A* zeigten sich die beschriebenen Polymorphismen. **Abbildung 20** zeigt, inwiefern die Banden variabel in ihrer Größe ausfallen und verdeutlichen den interindividuellen Polymorphismus. Dabei kam es zu Wiederholungen von 4 bis fast 20 Basenpaaren als genetische Diversität der Mikrosatelliten.

Auffallend war, dass die *ARID1A*-Sonde bei der Mehrzahl der Fälle (76,4% = 13/17) betroffen war, sobald mindestens ein weiterer Locus von einer LOH betroffen war. Die vier Fälle, die dieses Kriterium nicht erfüllen, lagen entweder als „Shift“, als detektierbare Bande oder homozygot vor. Bei den

homozygoten Fällen war eine Aussage über das Vorliegen einer LOH nicht möglich, schloss diese aber auch nicht aus.

Um die Auffälligkeit, dass *ARIDIA* im überwiegenden Anteil der Fälle mit einer weiteren Sonde betroffen vorlag, zu bestätigen, wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Dadurch können funktionelle Zusammenhänge aufgedeckt werden.

In dieser Untersuchung war erwähnenswert, dass, bei deutlicher Ausnahme der Sonde D1S1592, die weiteren vier Sonden einen funktionellen Zusammenhang mit der Sonde des *ARIDIA* zeigten. Die vier Sonden ergaben, dass mit einem Faktor von mindestens 14 bis 135 die Chance auf einen Verlust der *ARIDIA*-Sonde bei einem p-Wert $< 0,1$ zunimmt (siehe **Tabelle 18** im Anhang). Im deutlichen Kontrast dazu fand sich die Sonde D1S1592, die zwar einen β -Wert von $565 \cdot 10^7$ aufzeigte, dieser fiel allerdings nicht signifikant aus ($p > 1$). Somit implizierte die Regressionsanalyse einen positiven funktionellen Zusammenhang zwischen den bereits etablierten Sonden und der Sonde des *ARIDIA*.

5.2.4 AUFTRENNUNG NACH GRUPPEN

Nach der Auftrennung der Sonden konnte die Stichprobe in zwei Gruppen unterteilt werden. Patienten, die keine LOH und Patienten, die eine LOH umfassten. Im Anbetracht der obigen Ergebnisse ließen sich die Patienten diesbezüglich sehr differenziert einteilen. Dies wurde wiederum im Hinblick auf eine LOH im Allgemeinen (das heißt, eine LOH auf mindestens einer der sechs getesteten Sonden) und auf eine LOH primär auf *ARIDIA* analysiert, zeigte allerdings, dass diese Ergebnisse meist übereinstimmen (vergleiche **Tabelle 19**).

Die Gruppen unterschieden sich innerhalb der Altersverteilung. So wies die Gruppe von Patienten mit einem Allelverlust ein mittleres Alter von 63 ± 17 Jahren auf, während die Patienten ohne einen Allelverlust ein mittleres Alter von 66 ± 14 Jahren zeigten. Daraus ergibt sich in dieser Studie ein um drei Jahre früheres Auftreten eines Meningeoms bei Patienten mit einer LOH.

Bei Auftrennung nach Geschlecht zeigte sich, dass in der Gruppe von Patienten ohne LOH 79,4% Frauen (27/34) und 20,6% Männer (7/34) befanden. Die Gruppe der Patienten mit einer LOH zeigte sich allerdings leicht ausgeglichener innerhalb der Geschlechtsverteilung: So wiesen 58,8% der Frauen (10/17) und 41,2% der Männer (7/17) eine LOH auf mindestens einer der Sonden auf. Resümierend zeigt sich somit in dieser Studie, dass sich der prozentuale Anteil an Männern verdoppelt, wenn ein Allelverlust vorliegt im Vergleich dazu, wenn kein Allelverlust vorliegt.

Sehr interessant ist die Auftrennung nach Malignitätsgraden und Histologie gemäß der WHO. Unter den WHO-Grad I Meningeomen zeigten 27,9% (31/43) eine LOH, während 57,1% (4/7) der Grad II Meningeome und auch das Grad III Meningeom (1/1) einen Allelverlust zeigten. Der WHO-Grad zeigte sich als positiv prädiktiver Faktor für einen Allelverlust auf dem Chromosom 1p, allerdings ist dieser nicht signifikant ($p = 0,059$). Insgesamt wiesen 25% der Grad I Meningeome einen Allelverlust auf dem

Genlokus von *ARID1A* auf. Anteilig geringfügig mehr zeigten die Grad II Meningeome dieses Ergebnis mit 28,6% der Fälle. Bei dem Grad III Meningeom wurde ebenfalls ein Allelverlust auf *ARID1A* evaluiert.

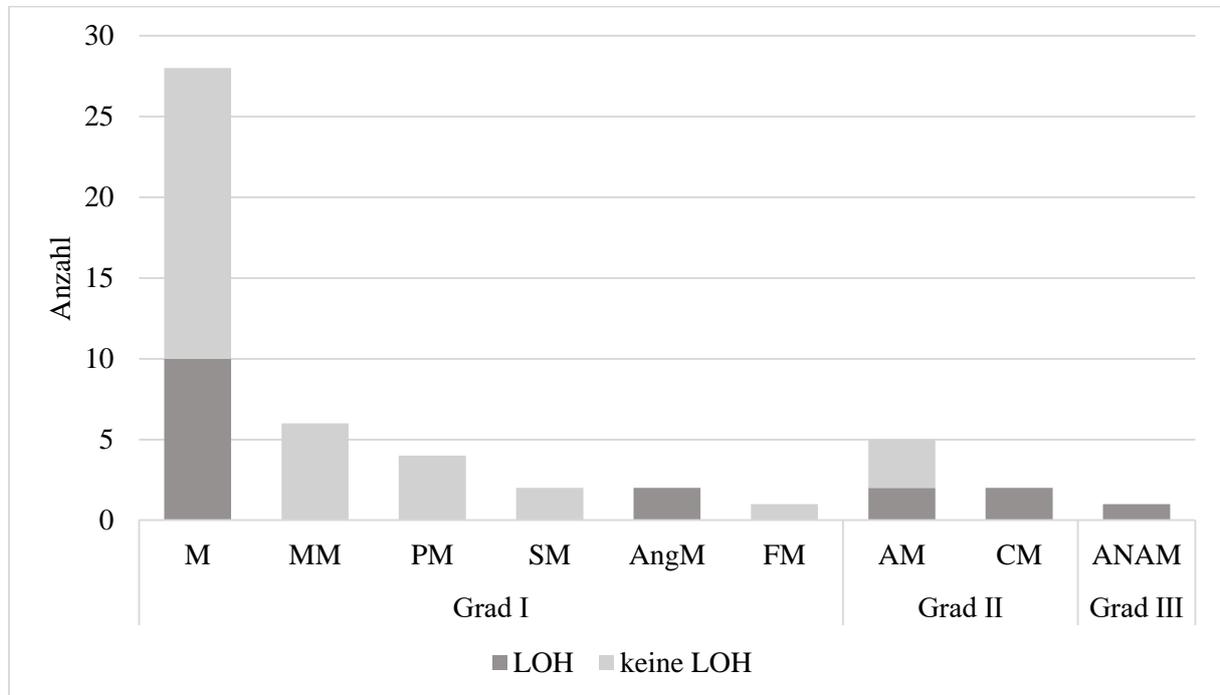


Abbildung 21. Histologische Untergruppen nach WHO-Klassifikation nach anteiligem LOH-Status

In die Gruppe der LOH wird ein Meningeom eingeordnet, wenn mindestens für eine Sonde ein Allelverlust nachweisbar ist. Dabei sind die ersten sechs Untergruppen (Klassisches (M), Meningotheliales (MM), Psammomatöses (PM), Sekretorisches (SM), Angiomatöses (AngM) und Fibröses Meningeom (FM)) dem WHO-Grad I, die folgenden beiden (Atypisches (AM) und Chordoides Meningeom (CM)) dem WHO-Grad II und das anaplastische Meningeom (ANAM) dem WHO-Grad III zugeteilt.

Zusätzlich wurden die Proben innerhalb der WHO-Grade in die Untergruppen unterteilt und betrachtet. Aus der obigen Abbildung ist ersichtlich, dass der überwiegende Anteil in der Gruppe mit LOH von Patienten mit einem klassischen Meningeomen eingenommen wurde, die gleichzeitig auch die größte Gruppe an Meningeomen stellt (vergleiche **Abbildung 15**). So waren allgemein 58,8% (10/17) der evaluierten Fälle mit einer LOH als klassisches Meningeom charakterisiert. Erwähnenswert ist, dass in der Analyse kein einziger LOH-Fall in den Untergruppen des Meningothelialen Meningeoms, Psammomatösen Meningeoms, Sekretorisches Meningeoms und der Untergruppe des Fibrösen Meningeoms zu finden war. Neben dem Typ des klassischen Meningeoms, wurden die weiteren LOH-Fälle in die Gruppen des Angiomatösen Meningeoms, des Atypischen Meningeoms, des Chordoiden Meningeoms und des Anaplastischen Meningeoms zugeordnet (siehe **Abbildung 21**).

So zeigte sich zusammenfassend, dass sich zwar der überwiegende Anteil an Meningeomen mit einer LOH innerhalb des WHO-Grad I befand, darin allerdings weiter aufgeteilt nur in der Gruppe von klassischen und angiomatösen Meningeomen. Der Rest dieser untersuchten Gruppe fand sich folglich in den höhergradigen WHO-Klassen (vergleiche **Abbildung 21**).

Von großem Interesse waren die beiden Patienten, die bei multiplen Läsionen zwei Proben in die Analyse einbrachten. Bei der Patientin der Probennummern 6 und 36 zeigten sich die beiden Läsionen mit unterschiedlichen histologischen Ausprägungen, nämlich psammomatös und meningothehal. Trotzdem zeigten sich die Läsionen in der LOH-Analyse identisch und wiesen beide keine LOH auf (vergleiche **Abbildung 22**). Die Läsionen des zweiten Patienten mit den Probennummern 44 und 45 zeigten sich jedoch heterogener. So unterschieden sie sich nicht nur in der histologischen Klassifikation (angiomatöses und meningothehalies Meningeom), sondern zusätzlich wiesen sie in der LOH-Analyse unterschiedliche Genotypen auf (siehe **Abbildung 22**). So zeigte die angiomatöse Läsion eine LOH auf allen Sonden mit der Ausnahme der Sonde D1S1592, die nicht auswertbar war. Im Kontrast dazu zeigte die meningothehalie Läsion keine LOH auf den analysierbaren Sonden, während die Sonde D1S1592 ebenfalls homozygot vorlag.

Läsion 1: Fall-Nr. 6	Läsion 2: Fall-Nr. 36	Läsion 1: Fall-Nr. 44	Läsion 2: Fall-Nr. 45
Psammomatös WHO-Grad I	Meningothehal WHO-Grad I	Angiomatös WHO-Grad I	Meningothehal WHO-Grad I
Keine LOH	Keine LOH	LOH	Keine LOH

Abbildung 22. Histologie in HE-Färbung und Status der ARID1A-Sonde der Fallnummern 6, 36, 44 und 45, die multiple Läsionen aufwiesen

Gezeigt sind die Meningeomfälle mit multiplen Läsionen in histologischer Darstellung in 220-facher Vergrößerung, sowie das zugehörige Ergebnis der *ARID1A*-Sonde.

Als letzter Punkt wurde die Verteilung der Lokalisation evaluiert. Dabei offenbarte sich, dass kein einziger Patient mit einem nachgewiesenem Allelverlust eine spinale Ausprägung zeigte, während innerhalb der Patienten ohne einen Allelverlust 23,5% eine spinale Lokalisation zeigten. Dieser Effekt erwies sich allerdings nicht als signifikant ($p > 0,05$). Weiter waren bei Patienten mit LOH die häufigsten Lokalisationen mit jeweils 23,5% (4/17) frontal und im Keilbeinflügel gegeben. Im Kontrast dazu stehen die Patienten ohne LOH, deren stärkste Gruppe zusätzlich zur frontalen Ausprägung (23,5%) die spinalen Meningeome (23,5%) darstellten.

5.3 WESTERN BLOT

Neben der genetischen Untersuchung der Tumore erfolgte auch auf Proteinebene eine Untersuchung auf das Vorhandensein verschiedener Untereinheiten des Remodeling Komplexes. Mittels Western Blot Analyse wurden die lysierten Meningeome mit Antikörpern gegen SNF5, DPF3 und ARID1A, sowie alpha-Tubulin als Ladekontrolle untersucht.

5.3.1 ANALYSE DER BANDEN BEI ANFÄRBUNG VON *ARID1A*

Bei der morphologischen Analyse der Proteinbanden mittels des Anti-ARID1A Antikörpers zeigte sich keine einzelne spezifische Bande unter den untersuchten 42 Fällen, sondern mehrere Banden zwischen 25 kDa und 250 kDa. Am stärksten war in der überwiegenden Anzahl der Fälle die Bande um 100 kDa ausgeprägt.

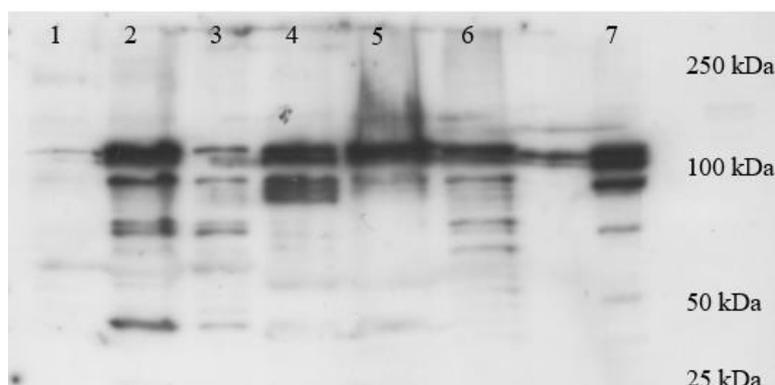


Abbildung 23. Western Blot mit dem Antikörper Anti-ARID1A (ab176395, Abcam, 1:1000)

Man beachte die unterschiedliche Bandenverteilung unter den ersten 6 Proben. Aufgetragen wurden jeweils 45 μ l des Meningeomlysats der Fall-Nummern 3, 7, 11, 10, 16, 21 (Spalte 1 bis 6), sowie 50 μ g MGTW3-Zelllysats als Kontrolle (7). Zur Größenorientierung wurde zusätzlich ein Proteinmarker (Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad) verwendet.

Abbildung 23 verdeutlicht dieses Phänomen, bei dem sechs verschiedene Proben (1 – 6) sowie ein Kontrolllysat aus MGTW3-Zellen (7) untersucht wurde. Letzteres wurde auf jedem Blot mit aufgetragen, um die Schwierigkeiten der Zellyse bei Meningeomen zu umgehen und die spezifischen Banden dort zu identifizieren. Interessanterweise zeigte sich, dass sich die einzelnen Proben zwar in ihrem Bandenmuster teils deutlich unterschieden, aber Banden bestimmter Größen immer wieder auftraten, wenn auch in unterschiedlichen Intensitäten (siehe **Abbildung 23**). Durch ein spezifisches Lysat aus HEK293T-Zellen, die ARID1A überexprimieren (LS-G88844, LifeSpan BioScience), konnte nachgewiesen werden, dass einige dieser Banden, vor allem diejenigen bei 100 kDa, spezifisch für *ARID1A* waren (siehe 4.2.2, **Abbildung 24**). Die Doppelbande bei 100 kDa, eine schwache Bande bei 250 kDa, sowie einige weitere Banden bei kleineren Massen im ARID1A-Kontrolllysat befanden sich auf fast identischer Höhe wie in den übrigen Proben (siehe Pfeile in **Abbildung 24**).

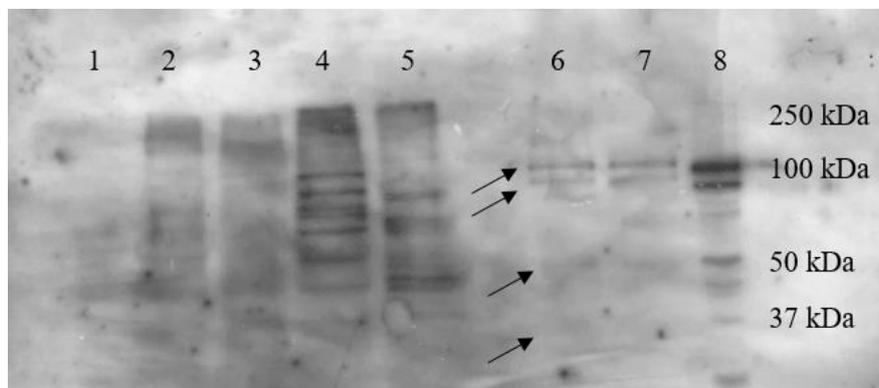


Abbildung 24. Nachweis der Spezifität der ARID1A-Banden durch den Antikörper Anti-ARID1A (ab176395, Abcam, 1:1000)

Analysiert wurden fünf Meningeomproben (1-5), HEK293T-Lysat aus ARID1A-überexprimierenden Zellen (6,7) und das MGTW3-Zellysat (8). Aufgetragen wurden 45 µl Lysat und der Proteinmarker (Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad) zur Größeneinordnung. Die Pfeile markieren die Banden im HEK293T-Lysat. Man beachte dabei die Höhe der markierten Banden im Vergleich mit den Banden der Meningeomproben und des MGTW3-Zellysats.

Für einen qualitativen und (semi-quantitativen) Ansatz wurde die erwartete Bande bei 250 kDa analysiert, da das ARID1A je nach der Isoform eine theoretische Größe von 205,9 (Isoform C), 218 (Isoform B) bis 242 kDa (Isoform A) (Uniprot, Stand April 2020) aufweist [89]. Weitere Quellen geben zusätzlich errechnete Isoformen zwischen 13,5 und 121,7 kDa an [94]. Folgend wurde die Doppelbande bei 100 kDa näher evaluiert, da diese durchgehend das stärkste Signal aufwies und dabei dennoch deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Proben aufzeigte.

Von den 42 untersuchten Fällen im Western Blot zeigten 66,7% (28/42) eine nachweisbare Bande auf Höhe von 250 kDa, während bei 33,3% der Fälle (14/42) dort keine Bande erkennbar war (siehe **Abbildung 25**).

Auf Höhe von 100 kDa war bei 69,0% der Fälle (29/42) eine Bande erkennbar, während 31,0% (13/42) keine Bande zeigten.

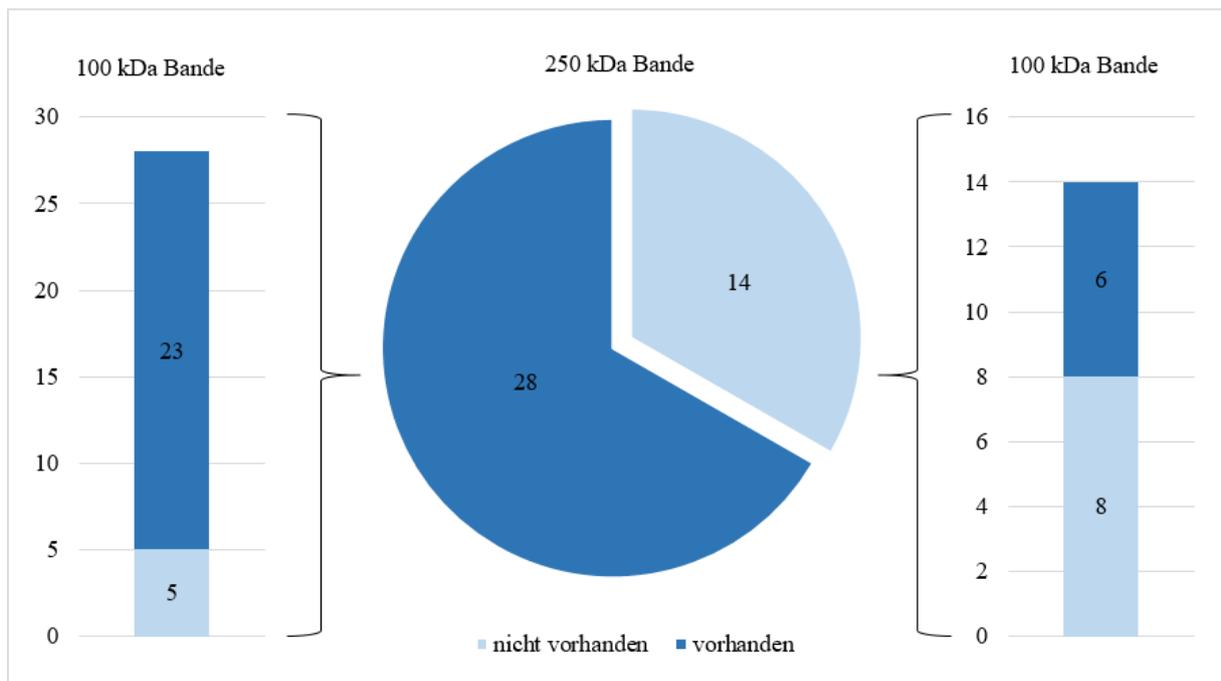


Abbildung 25. Ergebnis der Auswertung der Bande bei 250 kDa, weiter aufgetrennt nach dem Ergebnis der 100 kDa Bande

Weiter ist der **Abbildung 25** zu entnehmen, dass im Falle einer Darstellung der Bande bei 250 kDa in 82,1 % der Fälle (23/28) ebenfalls eine nachweisbare Bande bei 100 kDa zu finden war. Unter den 14 Fällen, die auf Höhe von 250 kDa keine Bande ausprägten, zeigten bei 100 kDa 57,1% der Fälle (8/14) auch keine Bande, während bei 42,9 % (6/14) eine Bande erkennbar war (vergleiche **Abbildung 25**). So erhöhte ein Ausfall der Bande auf 100 kDa die Chance auf einen weiteren Ausfall der 250 kDa Bande um den Faktor 6,13 ($p < 0,05$). Es zeigte sich somit zusätzlich der funktionelle Zusammenhang zwischen den einzelnen untersuchten Banden.

Im Vergleich mit den Messungen der LOH-Analyse zeigte sich, dass bei Nachweis der Bande bei 250 kDa 60,7% der Proben (17/28) keine LOH aufwiesen, während 39,3% (11/28) eine LOH zeigten. Dagegen zeigte die Gruppe von Fällen ohne nachweisbarer Bande auf dieser Höhe sogar 71,4% (10/14) der Fälle keine LOH, wohingegen 28,6% (4/14) eine LOH ausprägten. Im Kontrast dazu stellte sich im Vergleich der LOH-Analyse mit den Evaluationen der Banden auf Höhe von 100 kDa dar, dass bei

positiver Bande im Western Blot auch 72,4% der Proben (21/29) keine LOH aufwiesen. Auffällig war, dass hier bei Ausfall der 100 kDa-Bande eine LOH bei 53,8% der Fälle (7/13) zu sehen war. Diese Funktionalität bestätigte sich allerdings weder signifikant im Vergleich mit der allgemeinen 1p-Analyse noch mit der spezifischen Analyse des *ARIDIA* ($p > 0,05$) (siehe **Tabelle 21** im Anhang).

Auch im Vergleich mit klinischen Daten zeigte sich keine signifikante Funktionalität zwischen den bereits dargestellten Merkmalen und der Chance auf das Auftreten der Banden (siehe **Tabelle 21** im Anhang).

5.3.2 ANALYSE DER INTENSITÄT BEI ANFÄRBUNG VON *ARIDIA*

Die Analyse der Intensität der Banden wurde als Verhältnis mit der jeweiligen Messung der alpha-Tubulin-Färbung vorgenommen. Bei mehrfachen Messungen wurde aus diesen der Mittelwert errechnet und zur weiteren Analyse herangezogen.

Die Messung der Intensität der spezifischen Banden im Western Blot zeigte ein sehr heterogenes Ergebnis. In der Analyse der Bande auf Höhe von 250 kDa fand sich der Mittelwert bei 0,4 und der Median bei $0,14 \pm 1,24$. Dies ist als rechtsschiefe Verteilung definiert. Durch diese Charakteristik und eine Prüfung in einem Q-Q-Diagramm konnte eine Normalverteilung widerlegt werden. Allerdings waren der geringste gemessene Wert bei 0,0027 und der höchste gemessene Wert bei 8,08 zu finden. Damit ergab sich eine Spannweite von 8,0787 und somit eine sehr stark gestreute Messung.

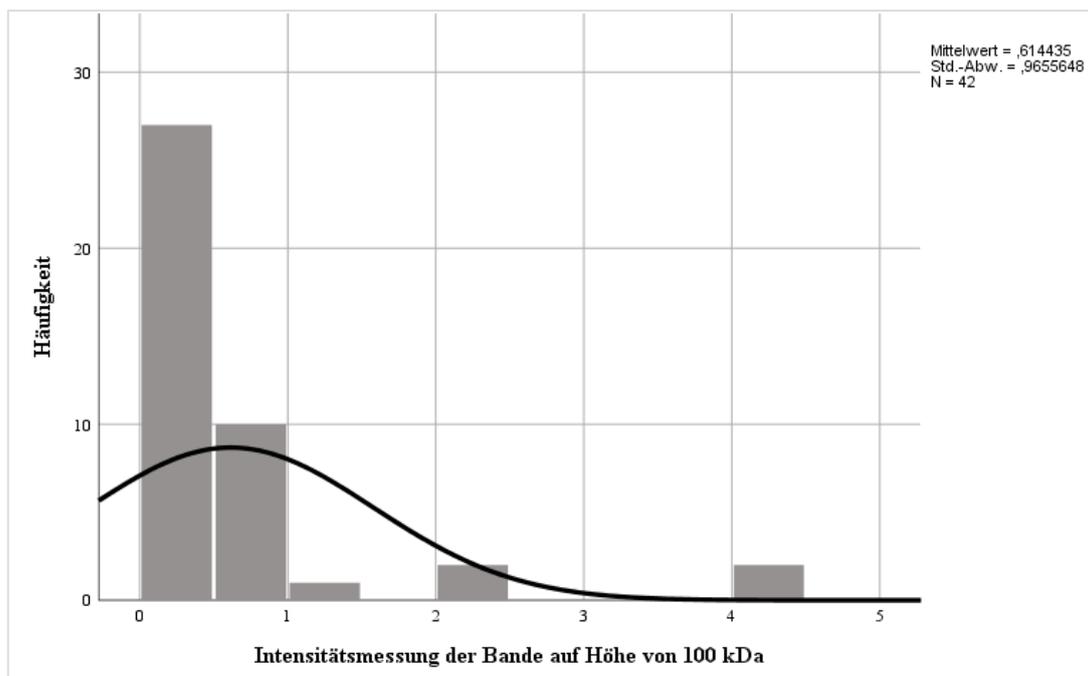


Abbildung 26. Häufigkeitsverteilung der ImageJ-Messung der Bande auf Höhe von 100 kDa

Bei der Analyse der Bande auf Höhe von 100 kDa ergab sich ein ähnliches Bild. So fand sich der Mittelwert bei 0,61 (siehe **Abbildung 26**) und der Median bei $0,25 \pm 0,97$. Wie der **Abbildung 26** zu entnehmen, handelte es sich auch bei dieser Messung um eine rechtsschiefe Verteilung der Daten. Das Minimum war bei 0,012 und das Maximum bei 4,37 zu finden, woraus sich eine Spannweite von 4,36 ergab. Damit zeigte sich auch hier eine starke Streuung bei der Messung. Dies trat allerdings nicht in dem Maße auf, wie bei der oben genannten Analyse der Bande von 250 kDa.

		Messung der 250 kDa Bande			Messung der 100 kDa Bande		
		Mittelwert	Maximum	Minimum	Mittelwert	Maximum	Minimum
ARID1A	Keine LOH	0,1744	0,8769	0,0027	0,5191	4,3727	0,0118
	LOH	1,0666	8,0814	0,0179	0,7195	4,2395	0,0151

Tabelle 14. Vergleich der Messungen der Intensität der Banden nach dem LOH-Status

Aufgetrennt nach der Eigenschaft einer LOH auf *ARID1A* zeigte sich auf beiden Banden ein leichter Unterschied zwischen den Gruppen (siehe **Tabelle 14**). So war auf beiden Höhen ein geringerer Mittelwert in der Gruppe ohne Allelverlust auf *ARID1A* zu finden. Im Kontrast dazu fand sich in der Gruppe von Meningeomen mit LOH ein vergleichsweise höherer Mittelwert. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Allelstatus auf *ARID1A* und dem Messwert der Bande auf 250 kDa ($p < 0,05$). Dies traf allerdings nicht für die Bande auf Höhe von 100 kDa zu ($p > 0,05$).

Die errechneten Werte wurden in den Vergleich mit den Messungen der Kontrolllösung gesetzt. Diese ergab im Durchschnitt einen Wert von $0,37 \pm 0,16$.

Mit weiteren analysierten Merkmalen zeigte sich allerdings kein funktioneller Zusammenhang (siehe **Tabelle 22** im Anhang).

5.3.3 WEITERE UNTERSUCHTE PROTEINE

Zusätzlich zu der umfangreichen Analyse des ARID1A-Proteins wurden auch weitere Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes untersucht. Dazu gehören DPF3 (BAF45c) und SNF5 (BAF47), die beide in einer kleineren Fallzahl im Western Blot mittels Antikörperfärbung untersucht wurden.

5.3.3.1 WESTERN BLOT ANALYSE DES DPF3

Neben ARID1A wurde DPF3 (BAF45c) als ein weiteres Protein des Chromatin Remodeling Komplexes mit dem Genlokus auf Chromosom 14 einbezogen. Dafür wurden vier von 51 Proben mittels Western Blot Analyse und einem DPF3-spezifischen Antikörper getestet.

DPF3					
Alpha-Tubulin					
Fallnummer	3	14	7	16	Kontrolle

Abbildung 27. Western Blot-Analyse mit dem Antikörpern Anti-DPF3 (ab85360, Abcam, 1:1000) und Anti-alpha-Tubulin (ab7291, Abcam, 1:10.000)

Es sind jeweils die Banden bei 50 kDa aufgetragen. Es wurden pro Meningeomprobe 40 µl Lysat aufgetragen. Die Kontrolle stellt das MGTW3-Zellysat bei 50 µg Gesamtprotein dar.

Die **Abbildung 27** zeigt die Banden von DPF3 in den untersuchten Meningeomproben, sowie die Kontrolle mit 50 µg Gesamtprotein pro Ladetasche. Auf der erwarteten Höhe von 43 kDa konnten nur in der Kontrolle Banden gesehen werden (vergleiche **Abbildung 27**). In weiteren Western Blots wurde die Bande auch auf anderen Höhen wie 75 kDa detektiert. Bei den vier Meningeomproben war dies nie der Fall.

Zur Optimierung der angewandten Methodik wurde das angewandte 0,2%ige Casein mit 5%igen Ziegen Serum (Dako) als blockierende Substanz verglichen.

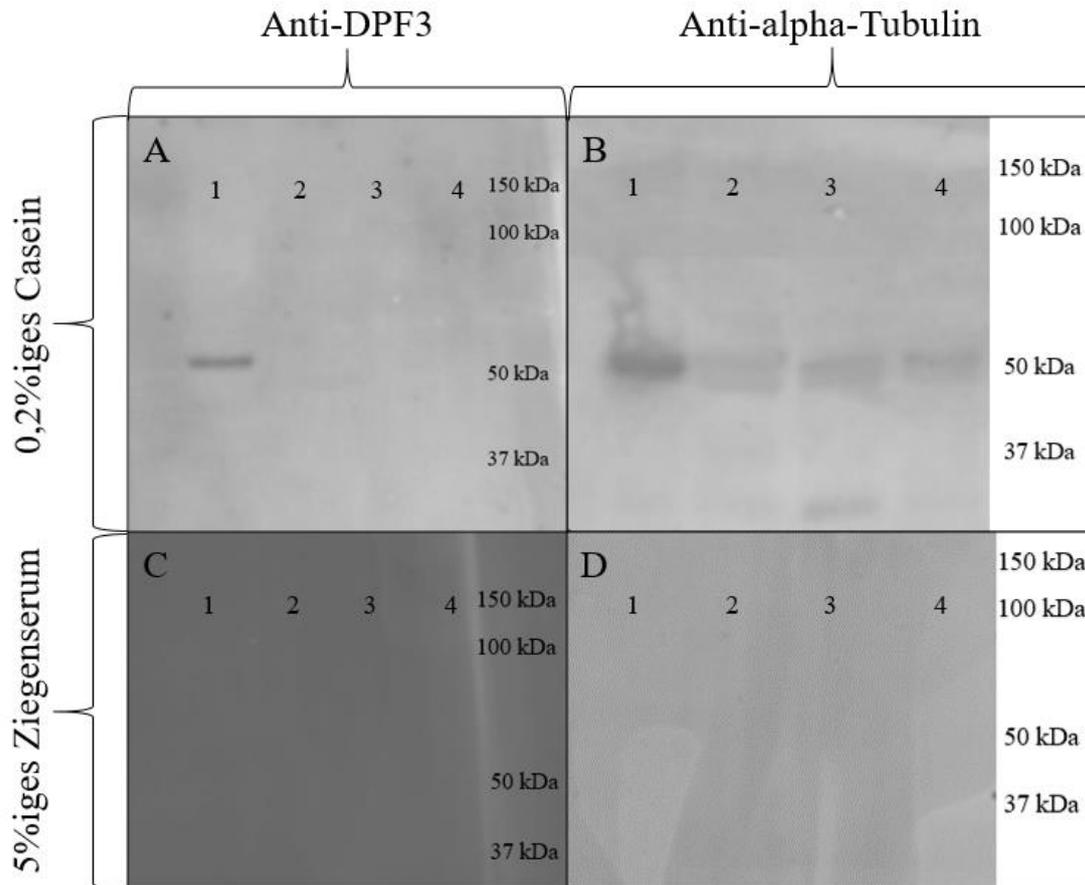


Abbildung 28. Western Blot gefärbt mit den Antikörpern Anti-DPF3 (ab85360, Abcam, 1:1000) (A, C) und Anti-alpha-Tubulin (ab7291, Abcam, 1:10.000) (B, D) an Meningeomproben geblockt in 0,2%igen Casein (A, B) und 5%igen Ziegenserum (X0907, Dako) (C, D)

Abbildung 28 zeigt, dass das Casein als blockierende Substanz deutlich stärkere Ergebnisse hervorbringt, als das angewandte Ziegenserum. Im direkten Vergleich fällt auf, dass sich nur auf der im Casein geblockten Membran (A, B) Banden evaluieren lassen, während diese in der zu vergleichenden Membran (C, D) nicht ausgeprägt sind.

Um eine größere Probenmenge zu ermöglichen und so gegebenenfalls die Sensitivität des Western Blots zu erhöhen, wurden im Anschluss eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure und eine Messung des Gesamtproteins vorgenommen.

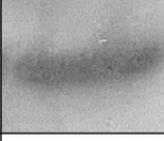
DPF3			
Alpha-Tubulin			
Fall und gemessene Protein-konzentration	Fall-Nr. 7 Lysat 72 µg	Fall-Nr. 7 Lysat nach TCA 579 µg	Kontrolle MGTW3- Lysat 50µg

Abbildung 29. Signale der Färbung mit dem Anti-DPF3-Antikörper (ab85360, Abcam, 1:1000) und Anti-alpha-Tubulin-Antikörper (ab7291, Abcam, 1:10.000) von unbehandelten Zelllysaten und Lysaten nach der Aufkonzentrierung durch eine Trichloressigsäurefällung

Die Aufkonzentrierung der Lysate erfolgte durch eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure. Der Western-Blot ist gezeigt in einer Immunfärbung durch die Antikörper Anti-DPF3 und Anti-alpha Tubulin. Für die doppelte Färbung wurde zuerst durch den Antikörper Anti-DPF3 gefärbt und nach erfolgter Signalentwicklung eine weitere Immunfärbung durch den Anti-alpha-Tubulin vorgenommen.

Abbildung 29 verdeutlicht, wie durch das Aussalzen und die darauf folgende Aufkonzentrierung der Proteine eine Steigerung des Signals bei der Ladekontrolle mit Anti-alpha-Tubulin (ab7291, Abcam) erreicht werden konnte. Trotz dieser Steigerung der Proteinkonzentration in den Meningeomproben um den Faktor acht konnte dennoch keine Bande bei DPF3 nachgewiesen werden. Durch die Limitation des auftragbaren Probenvolumens und des zur Verfügung stehenden Materials wurde diese Untersuchung nach mehrfachen Versuchen eingestellt.

5.3.3.2 WESTERN BLOT ANALYSE DES SNF5

Auch das SNF5 wurde anfangs getestet. Es wurden acht der 51 Proben untersucht. Diese Analyse stellte sich allerdings als diskontinuierlich im Hinblick auf Bandenhöhe und -Anfärbung dar, sodass von einer vollständigen Analyse der Proben abgesehen wurde.

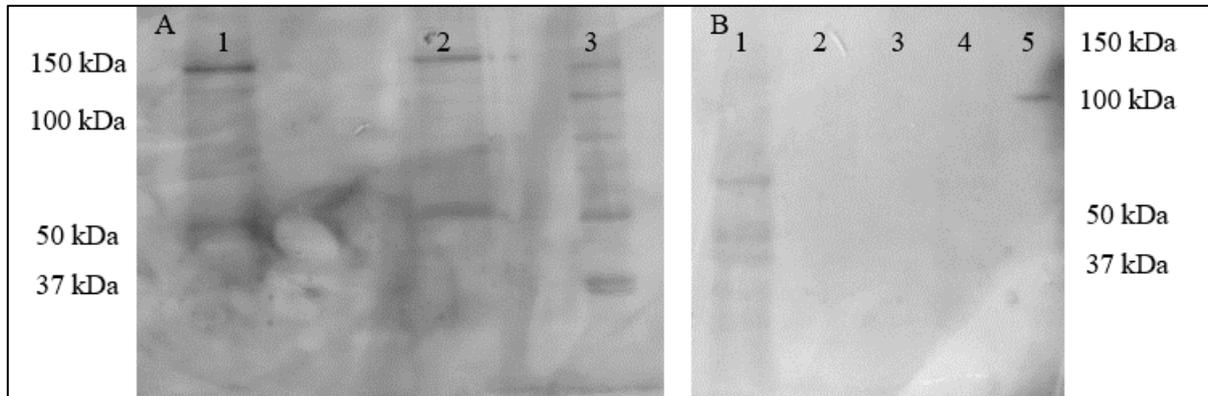


Abbildung 30. Repräsentative Western Blots gefärbt mit Anti-SNF5/SMARCB1 (ab126734, Abcam, 1:1000) an Meningeomproben (A: 1-2, B: 1-3), sowie MGTW3-Zelllysate als Kontrolle (A: 3, B: 4)

Es wurden pro Meningeomprobe jeweils 40 µl Lysat pro Ladetasche aufgetragen, sowie das MGWT3-Zelllysate mit 50 µg Gesamtprotein (A: 3, B: 4) und ein Größenmarker zur Orientierung (B: 5).

Bei Betrachtung von **Abbildung 30** fällt auf, inwiefern sich die Proben unterschiedlich darstellen (vergleiche **Abbildung 30** A und B). Einzelne Fälle zeigen undifferenzierte Banden, während bei gleicher Methodik und Ausführung andere Proben eine Bande knapp über 50 kDa aufweisen. Weiter zeigt sich in der Spalte des Markers (**Abbildung 30** B: 5) eine unspezifische Bande auf der Höhe von 100 kDa.

Durch das gering verfügbare Material und Probenvolumen wurde diese Analyse nach ungenügender Reproduzierbarkeit eingestellt.

5.4 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Histologisch wurden die Proben hinsichtlich ihres Anteils an positiven Zellen mit Anfärbung der Alkalischen Phosphatase, des Proliferationsmarkers Ki67 und schließlich der Untereinheit ARID1A des SWI/SNF-Komplexes beurteilt.

Die immunhistochemische Detektion stellte die Methode mit der geringsten Sensitivität hinsichtlich einer quantitativen Erfassung der *ARID1A*-Expression dar, gibt aber einen guten Überblick über die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle sowie die Verteilung der positiv beziehungsweise negativ angefärbten Zellen des Markers innerhalb des Tumors.

5.4.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE *ARID1A* FÄRBUNG

Um Aussagen über die intrazelluläre Expression des *ARID1A* zu treffen und darüber hinaus die Ergebnisse des Western Blots mit dem histologischen Verteilungsmuster zu vergleichen, wurde eine immunhistochemische Anfärbung an 41 Fällen vorgenommen, die ebenfalls im Western Blot analysiert wurden.

In der Untersuchung zeigte sich ein sehr heterogenes Muster der nukleären Anfärbung in den untersuchten Proben.

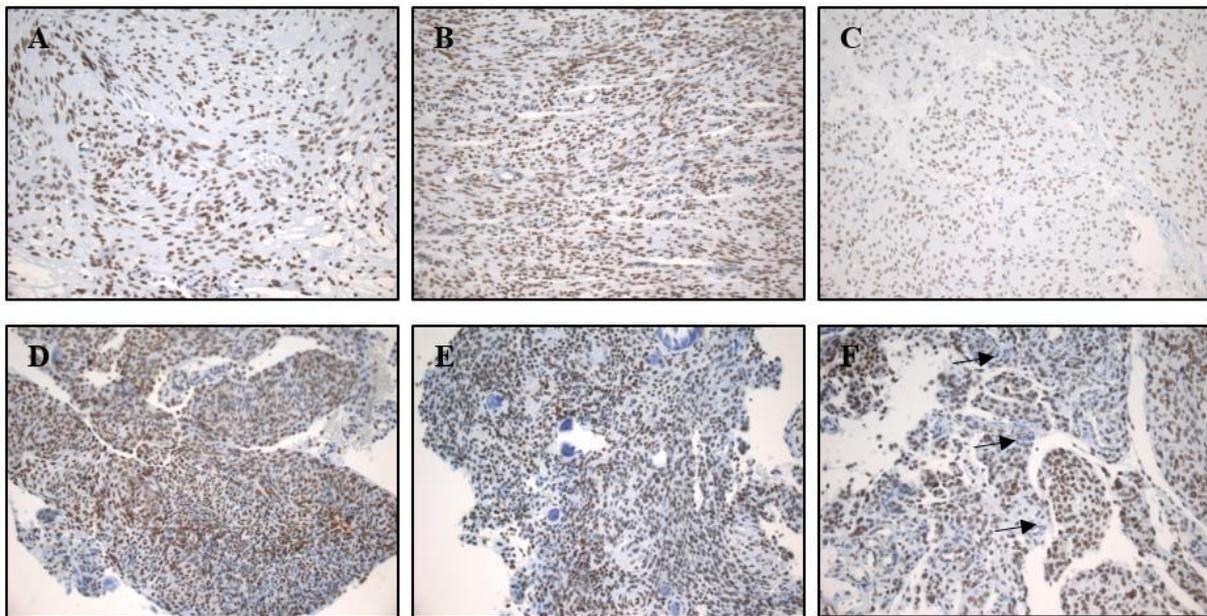


Abbildung 31. Repräsentative Beispiele für die immunhistochemische Färbung von Tumorpräparaten mit einem primären Antikörper „ARID1A (PSG3)“ (sc-32761, SantaCruz, 1:100) und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (K5007, Agilent/ Dako, unverdünnt) in 220-facher Vergrößerung

A: Fall-Nr. 27, anteilig < 1% negative Zellkerne; B: Fall-Nr. 10, anteilig < 25% negative Zellkerne; C: Fall-Nr. 50, anteilig < 25% negative Zellkerne; D: Fall-Nr. 21, Mosaik; E: Fall-Nr. 42, Mosaik; F: Fall-Nr. 51, sehr heterogenes Muster, anteiliges Mosaik (siehe Pfeile), aber auch Bereiche < 25% negative Zellkerne.

Einige Proben wiesen eine Anfärbung der Zellkerne von fast 100% auf (**Abbildung 31 A**) auf, während bei anderen 25% oder mehr Prozent der Zellkerne negativ waren (**Abbildung 31 B** und **C**). Einige Proben zeigten eine Ausprägung entsprechend eines „Mosaik“-Verteilungsmuster, bei dem 50% oder mehr der Zellkerne keine Anfärbung zeigten (siehe **Abbildung 31 D, E** und **F**). Interessanterweise zeigten sich innerhalb dieses Mosaikmusters auch immer wieder Bereiche, die sehr punktuell negativ waren (siehe Pfeile **Abbildung 31 F**).

Bei genauer Betrachtung einzelner Gruppen zeigte sich in der Unterteilung nach LOH-Status keine klare Differenzierung. Zwei Drittel der Fälle, bei denen nachweislich eine LOH vorlag, zeigten nicht zwangsläufig weniger ARID1A-Protein, während im Gegensatz dazu über ein Viertel der Proben, ohne Vorliegen einer LOH, einen erhöhten Anteil an negativen Zellen hatten. In letzteren Fällen müssten also andere Ursachen wie Mutationen oder veränderte Expressionsregulation ursächlich sein für den Proteinmangel.

Insgesamt wiesen 12 Proben (11 Patienten) die Ausprägung eines Mosaiks auf. Vier Fälle dieser Gruppe zeigten zusätzlich eine LOH auf dem Chromosom 1p, wozu auch der Fall mit dem beschriebenen „Shift“ zählt. Bei fünf Fällen handelte es sich um klassische Meningeome. Als weitere histologische Untertypen lagen zwei psammomatöse Meningeome, zwei meningotheleale und ein angiomatöses Meningeom, ein atypisches und ein anaplastisches Meningeom vor. Der Altersdurchschnitt war unter den Patienten mit dieser Eigenschaft bei 59,75 Jahren zu finden und somit circa fünf Jahre früher als bei der Gesamtstichprobe.

Interessant waren die beiden Fälle mit jeweils zwei Proben aus unterschiedlichen Lokalisationen. So zeigte der Fall, der in beiden Proben keine LOH aufwies, in der immunhistochemischen Evaluation in beiden Fällen ein Mosaik. Im Gegensatz dazu wies der Fall mit unterschiedlichem LOH-Status der beiden entnommenen Proben auch in der immunhistochemischen Analyse zwei Ergebnisse auf. So zeigte die Probe mit einer LOH ein Mosaik, während die Probe ohne LOH einen Anteil negativer Zellen von < 25% aufwies.

Weiterführend zeigte sich bei den weiteren klinischen Merkmalen keine klare Gruppierungsmöglichkeit innerhalb dieser immunhistologischen Ausprägung.

5.4.2 ALKALISCHE PHOSPHATASE FÄRBUNG

Die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase wird bei bestimmten Fragestellungen an den Meningeomproben gefärbt. Über den Anteil positiver Zellen kann ein Verlust des Chromosoms 1p und darüber eine möglich gesteigerte Pathogenität abgeschätzt werden.

Die Färbung der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase war bereits durch die routinemäßige Färbung an einigen Meningeomproben vorhanden. Die Bewertung erfolgte dabei anhand der Intensität des angefärbten Zellanteils. Insgesamt wurden 38 Fälle aus der Gesamtstichprobe in dieser histologischen Analyse durch Fachärzte evaluiert.

So zeigten 52,6% (20/38) eine positive oder sehr kräftige Färbung in der Analyse. Dagegen stellten sich 34,2% (13/38) der Fälle schwach bis negativ dar. Als Zwischenstufe wurde bei einigen Fällen eine lediglich fokale Anfärbung beschrieben, die sich bei 13,2% (5/38) der untersuchten Proben zeigte.

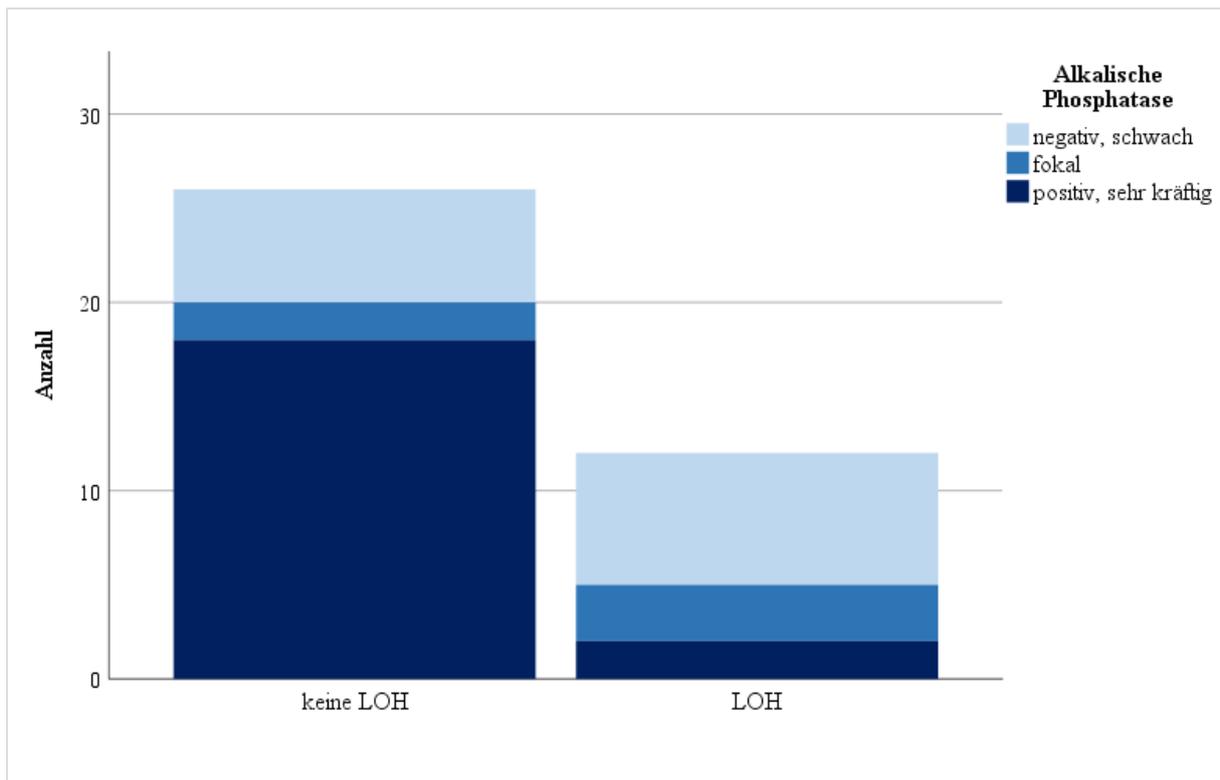


Abbildung 32. Ergebnis der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase Färbung aufgetrennt nach dem LOH-Status auf dem Chromosom 1p

In Zusammenhang mit der LOH-Analyse zeigte sich, dass die Fälle mit Allelverlust zu 58,3% (7/12) in der AP-Färbung schwach bis negativ ausgefallen sind. Weitere 25% (3/12) wurden als fokal positiv eingestuft und 16,7% (2/12) der Proben wurde als positiv bewertet. Im Kontrast dazu waren die Fälle ohne Allelverlust zu circa 2/3 (69,2% = 18/26) positiv in der AP-Färbung ausgefallen (vergleiche **Abbildung 32**).

Es offenbarte sich ein negativer funktioneller Zusammenhang zwischen der Intensität der AP-Färbung und dem Auftreten einer LOH auf dem Genlokus des *ARID1A*. So reduziert eine positive Färbung der alkalischen Phosphatase die Chance auf einen Allelverlust auf *ARID1A* um den Faktor 0,357 ($p < 0,05$). Dieser Effekt verdeutlichte sich auch speziell bei Betrachtung der Sonde D1S1592 und betrug einen Faktor von 0,364, zeigte sich allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). In dieser Studie reduziert zudem eine starke positive Färbung der alkalischen Phosphatase die Chance, generell eine LOH auf dem gesamten Chromosom 1p aufzuweisen, um den Faktor 0,328 ($p < 0,01$).

5.4.3 Ki67

Auch die Anfärbung des Proliferationsmarkers Ki67 war bereits durch die standardmäßige Evaluation einiger Meningeome in der Routinediagnostik vorhanden und konnte hier detaillierter betrachtet werden. In der Beurteilung wird dabei der prozentuale Anteil positiver Zellkerne vom Gesamtpräparat bestimmt. Ein hoher Ki67-Anteil spiegelt dabei eine hohe Proliferationsrate des Tumors wieder und korreliert häufig mit dem WHO-Grad des Meningeoms (vergleiche 2.1.2).

In dieser immunhistochemischen Färbung wurden 36 Meningeome untersucht. Im Mittel waren $4,2\% \pm 2,95\%$ der Zellen des Gesamtpräparats positiv gefärbt. Die geringste Anfärbung zeigte ein Fall mit 1% und die stärkste Färbung ein Grad II Meningeom mit 15% positiven Zellen des Gesamtpräparats.

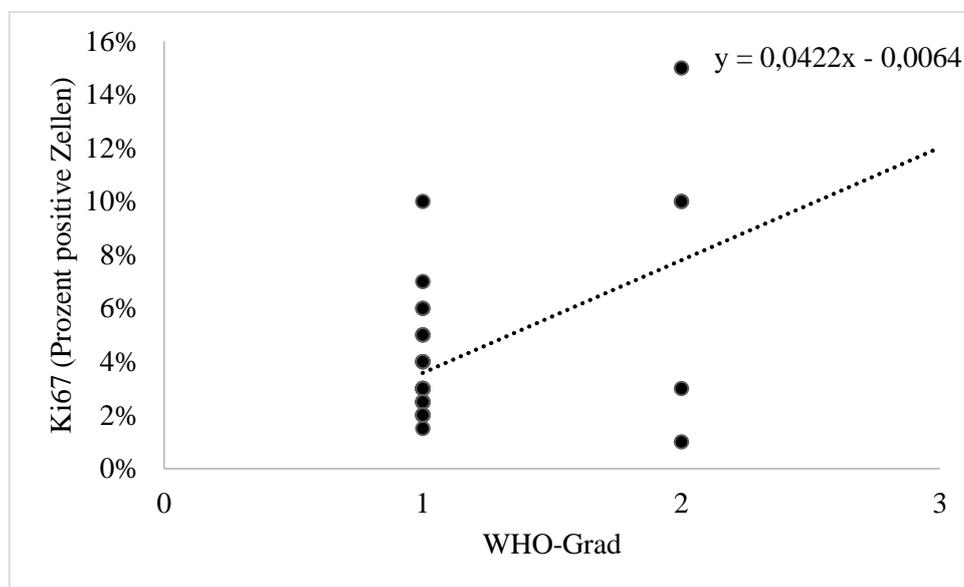


Abbildung 33. Zusammenhang des WHO-Grades und des Proliferationsmarkers Ki67 (n = 36) der Meningeome des WHO-Grades I und II. Verwendet wurde eine lineare Regressionsanalyse ($p < 0,01$).

Unter Verwendung der linearen Regressionsanalyse zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil positiver Zellkerne des Proliferationsmarkers Ki67 und dem WHO-Grad. In **Abbildung 33** ist deutlich eine Steigerung des Ki67 mit zunehmenden WHO-Grad zu entnehmen. Dies bestätigt damit diesen Zusammenhang im vorliegenden Datensatz [105].

Weder in der LOH-Analyse noch im Western Blot zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ki67-Wert und den ausgewerteten Daten.

6 DISKUSSION

6.1 AUSSAGE UND EIGNUNG DER STICHPROBE

Diese Studie wurde nach allgemeingültigen Standards in der Methodik und Auswertung bearbeitet. Trotzdem können Störfaktoren und Verzerrungen Einfluss auf das Endergebnis haben und sollten nicht unerwähnt bleiben. Durch unterschiedliche Einflüsse können Verzerrungen (engl. „Bias“) des Ergebnisses entstehen. Diese Effekte können auch durch die natürliche Variation der Meningeome auftreten. Durch diese zufallsbedingten Streuungen der Messwerte können Zusammenhänge vorgetäuscht werden, die nicht existieren. Andererseits können aber auch Beziehungen, die vorhanden sind, nicht entdeckt werden.

Bei der Auswahl der Patienten wurden über das Jahr 2019 neue Proben gesammelt und vorhandene eingefrorene Proben aus den Vorjahren genutzt. So entspricht die Stichprobe einem Teil der behandelten Patienten, die 2019 an einem Meningeom operiert wurden. Die Stichprobe musste allerdings durch ausgewählte höhergradige Fälle aus den Vorjahren ergänzt werden, um deren Prävalenz der Allgemeinbevölkerung anzupassen und im experimentellen Teil Ergebnisse hinsichtlich möglicher Unterschiede bei verschiedenen WHO-Graden zu detektieren. Dadurch ist die Randomisierung aufgehoben. Diese ergänzenden Fälle wurden hinsichtlich WHO-Grad und klinischen Auffälligkeiten ausgesucht.

Diese Studie ergibt mit einer Stichprobengröße von 49 Patienten primär keine umfassenden epidemiologischen Aussagen. Allerdings wurden Prävalenzen der einzelnen WHO-Grade erreicht, die vergleichbar mit den Analysen des CBTRUS und den Daten der WHO sind (vergleiche 2.1.2 und 5.1.2) [69,105].

Weiter entsprach das hier errechnete mittlere Alter von 65 Jahren der aktuellen Studienlage, beispielsweise der des „CBTRUS“ (66 Jahre) und der der Weltgesundheitsorganisation (65 Jahre) [69,105]. Zusätzlich dazu stellte sich die Altersverteilung normalverteilt dar, was in einem Q-Q-Diagramm weiter überprüft wurde. Auch die Geschlechterverteilung zeigte sich kongruent mit der Literatur [57,69,71]. Es kann somit eine repräsentative Stichprobe angenommen werden.

Die Verteilung in intrazerebrales und spinales Auftreten deckte sich überwiegend mit der gängigen Literatur. So zeigten circa 1/6 der untersuchten Fälle eine spinale Lokalisation. Dies bestätigt sich durch die Daten des „CBTRUS“ [69]. Es ist bekannt, dass sich spinale Meningeome vorwiegend thorakal exprimieren [105]. Dies bestätigt sich in dieser Studie. Dies stärkt die Annahme einer aussagekräftigen Stichprobe somit im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit anderen Studien, trotz der geringen Fallzahl.

Auffallend zeigten sich die Ergebnisse hinsichtlich des Rezidivauftritts. So zeigten 11,6% der untersuchten Grad I Meningeome und 14,2% der Grad II Meningeome ein bekanntes Rezidiv. Somit fällt das Rezidivauftreten der Grad II Meningeome in dieser Studie deutlich niedriger aus, als in den

Daten der WHO (29-52%) [105]. Dies ist allerdings kritisch zu betrachten, da nicht bei allen Fällen die klinischen Daten komplett erfasst wurden und somit bei vielen Patienten keine Aussage hinsichtlich eines Rezidivauftritts gestellt wurde. Somit könnten auch nicht entsprechend klassifizierte Patienten ein bereits rezidiertes Meningeom exprimiert haben. Der Simpson Grad, der einen elementaren Einfluss auf die Rekurrenz dieses Tumors widerspiegelt, wurde ebenfalls nicht standardmäßig angegeben [85]. Allerdings spielen weitere Faktoren hinsichtlich des Rezidivauftritts eine Rolle und werden in der weiteren Diskussion aufgeführt.

6.2 LOSS OF HETEROZYGOSITY DES CHROMOSOMS 1P BEI MENINGEOMEN

Die Monosomie des Chromosomenarms 1p wurde bereits vielfach besonders als ein Charakteristikum der höhergradigen Meningeome beschrieben [7,57,101,105]. Bei Vorliegen dieses Parameters sind verändertes klinisches Verhalten, wie ein erhöhtes Rezidivaufreten, erkannt worden [57,73]. Der methodische Nachweis ist bisher nicht standardisiert und wird bis zum jetzigen Stand mit sehr unterschiedlichen Methoden durchgeführt (zum Beispiel FISH oder Mikrosatellitenanalytik) [30,57].

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Nachweisbarkeit des chromosomalen Verlustes nach dem bestehenden Protokoll von Hartmann *et al.* etabliert [30]. Der chromosomale Abschnitt 1p wurde dabei stichprobenartig durch sechs Sonden für Mikrosatelliten getestet.

6.2.1 OPTIMIERUNG DER ANALYSE DES CHROMOSOMS 1P FÜR MENINGEOME

Die molekulargenetische Analyse des Chromosomenarms 1p wurde nach dem Protokoll von Hartmann *et al.* durchgeführt, das ursprünglich für die 1p/19q-Analyse von Oligodendrogliomen entwickelt wurde. Der Autor stellte bereits in seiner Arbeit dar, dass dieses Protokoll auch auf andere Tumore angepasst und erweitert werden kann [30].

Als Erweiterung wurde in dieser Arbeit eine neue Sonde in Umgebung des Genlokus des *ARID1A* (1p36.11) etabliert. Die Sonde liegt mit einem Abstand von 22.400 Basenpaaren an dem Genlokus des *ARID1A* (1p36.11). Dieser Abstand erscheint sehr nah in Anbetracht der Gesamtgröße des Chromosomenarms 1p, die ungefähr 123,5 Millionen Basenpaaren beträgt (NCBI, Stand April 2020) [88]. Bei diesem neu etablierten Mikrosatelliten handelt es sich um ein Tetranukleotid (TTTC) mit einer Anzahl von 18,8 Kopien und damit einer Länge von 75 Basenpaaren (UCSC Genome Browser, Stand April 2020) [29,43]. Interindividuell zeigten sich in dieser Studie Polymorphismen des Mikrosatelliten, die zwischen 4 bis 20 Basenpaaren lagen. Dieser Effekt kann durch Polymerase-Slippage bedingt sein. Dabei kommt es zu einer ungenauen DNA-Replikation, die zu variablen Wiederholungsfrequenzen führt [11]. Dieses Phänomen verdeutlicht erneut die schon in der Literatur beschriebene Variabilität von Mikrosatelliten im menschlichen Genom [24,58,76].

In dieser Studie wurde diese modifizierte Methodik auf Meningeome angewendet. Trotz der spezifischen Auswahl der Mikrosatelliten durch Hartmann *et al.* verdeutlichten sich doch einige Diskussionspunkte der Sonden. So zeigt sich deutlich in **Abbildung 18**, dass vor allem die Sonden D1S1592 und D1S548 die höchste Quote an nicht auswertbaren Ergebnissen aufwiesen. Dies waren entweder qualitativ nicht beurteilbare Banden oder homozygot vorliegende Allele, aus denen nicht abgelesen werden konnte, ob es sich um eine LOH handelt. Dadurch entfielen bei diesen Analysen mehr als die Hälfte der untersuchten Fälle.

Es ist fraglich, ob dieses Protokoll optimiert werden kann, oder ob die Verwendung sich nur auf die Oligodendrogliome beziehen sollte. Aber bei Betrachtung von selbiger Methodik an glialen Tumoren zeigte sich folgendes Bild: Untersuchte Oligodendrogliome im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in den letzten drei Jahren (Stand April 2020) zeigten auf den diskutierten Sonden um die 40% nicht auswertbarer Banden. Diese Variabilität der Mikrosatelliten im menschlichen Genom wurde bereits häufig beschrieben [24,58,76]. In der Arbeit von Redd *et al.* zeigte sich, dass einige Mikrosatelliten häufiger Variationen aufweisen als andere und zusätzlich global divers ausgeprägt sind [76]. Interessant wäre in diesem Zusammenhang inwiefern die Sonde für den Mikrosatelliten in *ARIDIA* auch ein besseres Ergebnis bei Oligodendrogliomen liefern könnte.

Im Gegensatz zu der D1S1592-Sonde zeigt die *ARIDIA*-Sonde bei den hier untersuchten Meningeom-Fällen nur bei 6% kein auswertbares Ergebnis (vergleiche **Abbildung 18**). Des Weiteren ist die Sonde auf *ARIDIA* (1p36.11) circa 9,6 Millionen Basenpaare (NCBI, Stand April 2020) von der Sonde D1S1592 (1p36.13) entfernt (vergleiche **Abbildung 13**) [88]. Dies stellt einen diskutierbaren Abstand zwischen diesen Mikrosatelliten dar. Wenn die Sonde D1S1592 vollständig aus dem Protokoll entfernt werden würde, wäre der Sprung zu nächster Sonde (D1S548) mit fast 19 Millionen Basenpaaren (NCBI, Stand April 2020) fast 2-mal so groß und nimmt dabei eine Länge von 15% der Gesamtlänge des Chromosoms 1p ein [88]. Somit wäre ein großer Teil des Chromosoms nicht abgedeckt. Letztere Sonde ist aber nicht zuverlässig und bringt nur bei der Hälfte der Fälle ein verwertbares Resultat. Folglich zeigte die Sonde D1S1592 in der Regressionsanalyse kein signifikantes Ergebnis im Zusammenhang mit anderen Faktoren, mit Ausnahme des WHO-Grades (vergleiche **Tabelle 20**). Schließlich zielt diese Methodik grundsätzlich nicht darauf ab, das Chromosom flächig abzudecken, sondern häufig betroffene Bereiche besonders zuverlässig zu identifizieren und stichprobenartig das Chromosom auf Allelausfälle zu testen. Abschließend könnte bei weiteren Arbeiten die Sonde D1S1592 durch die hier etablierte Sonde für *ARIDIA* ersetzt werden, um diese in ihrer Sensitivität und Aussagekraft weiter zu steigern.

Zusammenfassend weist alles darauf hin, dass im Vergleich mit den restlichen Sonden die Sonde D1S1592 als ersetzbar erscheint. Die Sonde für den Genlokus *ARIDIA* stellt eine gute Alternative dar, da sie in über 76% der Fälle eine Aussage über einen vorliegenden Allelverlust erlaubt. Ein weiterer Optimierungsschritt wäre der Ersatz weiterer Sonden beziehungsweise das Weglassen ganzer Sonden. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse aller Mikrosatelliten könnte es möglich sein, nur noch mit drei statt fünf Sonden den chromosomalen Status zu prüfen. Dies wäre eine kostengünstigere Alternative und

würde es zum Beispiel erlauben, im Rahmen der genetischen Analyse alternativ die Verluste anderer Chromosomen mitzutesten. Es ist Aufgabe folgender Studien, dies einerseits für Oligodendrogliome und Meningeome einzuführen und andererseits diese Erkenntnis auch auf weitere Tumorentitäten auszuweiten.

6.2.2 CHROMOSOMENARMVERLUSTE STATT TEILVERLUSTE

Neben dem Einfluss des chromosomalen Status von 1p auf die unterschiedlichen klinischen Faktoren, die im folgenden Kapitel behandelt werden, zeigte sich allgemein eine sehr starke Aufteilung der Meningeomproben in Fälle mit komplettem Verlust der analysierten Sonden oder ohne jeglichen Allelverlust.

Sehr interessant war die stark systematische Aufteilung, sodass meistens der überwiegende Anteil der Sonden betroffen vorlag, falls es zu einem Allelverlust kam (vergleiche **Abbildung 19**). Dieses Bild wird häufig durch die homozygoten und dadurch nicht interpretierbaren Fälle unterbrochen. Doch in diesen Fällen kann angenommen werden, dass beim Vorliegen einer LOH auf den beidseits folgenden Sonden auch bei dem nicht interpretierbaren Fall eine LOH vorliegen müsste. Im Umkehrschluss lässt sich diese Annahme auch auf homozygote Fälle zwischen zwei Sonden ohne Allelverlust anwenden. Somit zeigte sich der überwiegende Anteil der Sonden im Falle einer LOH betroffen, sodass man zumindest innerhalb des überprüften Bereichs von 1p36.32 (D1S1184) bis 1p31.3 (D1S1608) von einem allgemeinen LOH-Status auf dem Chromosomenarm 1p sprechen kann.

Diese Erkenntnis ändert das Verständnis der chromosomalen Verluste an Meningeomen grundsätzlich. Bisher wurden immer Teilbereiche vermutet, die beispielsweise als Genlokus von Tumorsuppressorgen über eine Alteration ein pathogenes Potential aufweisen und daraus die Formation des Meningeoms initiieren können [28]. Diese Studie impliziert aber vielmehr das Vorliegen eines gesamten Chromosomenarmverlustes statt einzelner Teilverluste. Dadurch könnten mehrere Tumorsuppressoren gleichzeitig betroffen sein, was die Komplexität der Tumorgenese deutlich erhöhen würde. Folglich spiegelt der Status der einzelnen Sonden, insbesondere der des *ARID1A* (1p36.11), die eine sehr zuverlässige Aussage in Bezug auf Hetero- und Homozygotie trifft, den Verlust des gesamten Chromosoms wieder und nicht nur des spezifischen Genlokus.

Dadurch steht die Frage im Raum, ob eine Bruchstelle existieren könnte, von der aus die Alterationen entlang des Chromosoms entstehen könnten, und wie dieser Pathomechanismus genau abläuft. Nur wenige Fälle in dieser Studie wiesen ein Muster auf, bei dem einige Sonden einen Allelverlust belegten, während andere Sonden dies gleichzeitig nicht taten (vergleiche Abschnitt 5.2.2 und **Abbildung 19**). Diese Fälle zeigten entweder einen Verlust um die Sonde des *ARID1A* auf oder im Kontrast dazu an den Zentromer-stämmigen Sonden. Die erstgenannte Gruppe könnte eine Bruchstelle am bereits diskutierten Abschnitt 1p36 aufweisen, auf dem auch der Genlokus des *ARID1A* lokalisiert ist. Bisher wurde an diesem Abschnitt dieses Phänomen allerdings vorwiegend an hämatologischen Erkrankungensbildern

beschrieben [19,21]. Interessanterweise waren in der zweiten Gruppe fast immer die Zentromer-stämmigen Sonden heterozygot. Eine weitere Bruchstelle könnte sich damit also im Bereich Richtung Zentromer befinden. Diese Beobachtung kann durch die Arbeit von Sawyer *et al.* bestätigt werden, in der sich früh auftretende chromosomale Instabilitäten vor allem am Zentromer oder am Telomer zeigten [80]. Um dies weiter zu verifizieren sind zusätzliche Analysen mit Sonden entlang des Zentromers nötig.

6.2.3 DER EINFLUSS DES STATUS VON CHROMOSOM 1P AUF DIE KLINIK

Die Analyse des kurzen Arms des Chromosoms 1p ist bereits vermehrt in den Fokus anderer Studien an Meningeomen gerückt. Während die Monosomie des Chromosomenarms 22q bereits zu hohen Anteilen in niedriggradigen Meningeomen beobachtet wurde, teilte man die untersuchten Aberrationen des Chromosomenteilabschnitts 1p eher zu den höhergradigen, als zu den niedriggradigen Meningeomen ein [101]. In dieser Studie zeigte sich ein auffallendes Bild in der Analyse des zytogenetischen Status des kurzen Arms des Chromosoms 1.

Insgesamt wiesen ein Drittel aller untersuchten Fälle eine LOH des Chromosoms 1p auf. Dies entsprach 27,9% der Grad I Meningeome, 57,1% der Grad II Meningeome und 100% der Grad III Meningeome und deckt sich damit nur teilweise mit der aktuellen Studienlage. Während Studien wie Weber *et al.* oder Müller *et al.* die Daten dieser Studie bestätigen, fielen Divergenzen zu der Studie von Linsler *et al.* auf [57,63,101]. So stellten Linsler *et al.* den Status des chromosomalen Abschnitts 1p36 in ihrer Untersuchung durch eine Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) vor. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis von DNA durch fluoreszenzgekoppelte Sonden im zu untersuchenden Gewebe selbst (in situ) [27]. Linsler *et al.* setzten dafür eine Sonde spezifisch auf dem Abschnitt 1p36 ein, um darüber den Verlust des Chromosoms 1p zu beurteilen [57]. Die genannte Studie stimmt zwar mit dem Anteil der Grad I Meningeome (27,42%) überein, widerspricht aber den erhaltenen Werten für die höhergradigen Meningeome. In dieser Studie wiesen mehr als die Hälfte der Grad II Meningeome eine LOH auf, während in der Studie von Linsler *et al.* nur 27,2% dieses Ergebnis aufzeigten. Im Vergleich hatten Linsler *et al.* zwar eine größere Fallzahl, sie untersuchten aber nur einen Abschnitt des ganzen Chromosoms (1p36), während diese Studie mehrere Abschnitte kombiniert betrachtete und dadurch mehr Information erlangte [57]. Bei isolierter Betrachtung der Analyse des untersuchten Mikrosatelliten auf 1p36.11 fällt auf, dass sich dabei die Anteile wieder angleichen und nur 28,6% der ausgewerteten Grad II Meningeome eine LOH auf diesem Abschnitt finden. Unter den sieben Grad II Meningeomen, zeigten zwei eine LOH und fünf Fälle lagen ohne Allelverlust vor. Somit zeigte es sich in diesen Fällen als vorteilhaft, mindestens zwei Sonden untersucht zu haben, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten. Diese Divergenz zu der Literatur verstärkt sich vermutlich weiter durch die geringe Fallzahl der höhergradigen Meningeome in dieser Studie, sodass bereits Einzelergebnisse die prozentualen Anteile erheblich verändern können.

Bei weiterer Unterteilung der WHO-Grade in die Untergruppen war auffällig, dass es eindeutige Gruppen gab, die prädestiniert für eine LOH auf dem Chromosomenarm 1p zu sein schienen (vergleiche Kapitel 5.2.4). Ausgenommen der klassischen Meningeome, die eine sehr heterogene Gruppe darstellten, zeigten innerhalb der Grad I Meningeome nur die angiomatösen Meningeome LOH-Verluste in ihrer Gruppe. Unbetroffen waren hingegen die meningothehialen, psammomatösen, fibrösen und sekretorischen Meningeome. Dies bestätigt sich weiter durch den Fall mit multiplen Läsionen, dessen meningothehiale Läsion keine LOH aufwies, während die angiomatöse Läsion eine LOH zeigte (vergleiche Abbildung 22). In der Studie von Abedalthagafi *et al.* zu angiomatösen Meningeomen fand sich ebenfalls eine chromosomale Polysomie in dieser histologischen Untergruppe. Allerdings wurden in deren Studie vermehrt Chromosomzugewinne, unter anderem der Chromosomen 5 und 13, gefunden und nur bei einem Fall eine LOH auf dem Chromosomenarm 1p [1]. Bei den höhergradigen Meningeomen zeigten sich keine Verteilungen, da alle Untergruppen von einer LOH betroffen waren. Auffallend ist, dass bei Betrachtung der Literatur bereits ähnliche Ergebnisse bei Analyse des *NF2* und dessen Genlokus auf dem Chromosom 22 im Hinblick auf fibröse Meningeome erstellt wurden [48,102]. Möglicherweise könnte die Analyse des Chromosomenarms 1p zu einer ähnlichen Hypothese führen.

Weiter konnte auch in der Stichprobe ein Ausgleichen der Häufigkeiten der Geschlechter erkannt werden. Im Vergleich mit der Gesamtstichprobe (26,5%) war bei der Teilgruppe von Patienten mit LOH eine Steigerung auf insgesamt 41,2% männliche Patienten der Fälle zu verzeichnen, den doppelten Fall des multiplen Meningeoms mit eingeschlossen. Diese Beobachtung findet sich auch in der Literatur [57]. Ähnliche Effekte zeigen sich auch bei Betrachtung der Literatur zu der Geschlechtsverteilung unter den WHO-Graden. Auch dort steigt der Anteil der männlichen Patienten mit zunehmendem WHO-Grad [96,105]. In der oben zitierten Studie zeigten sogar mehr Männer als Frauen ein Meningeom von WHO-Grad III [57]. Dies könnte nahelegen, dass zwischen diesen Parametern ein funktioneller Zusammenhang besteht. So waren männliches Geschlecht und ein erhöhter WHO-Grad beide prädiktiv für eine LOH auf dem Chromosomenarm 1p, aber nicht signifikant ($p > 0,05$). Bisher gibt es jedoch keine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen. In der Literatur wird vermutet, dass Östrogene durch induziertes Tumorwachstum bei prämenopausalen Frauen zu einer schnelleren Diagnose führen und somit eine Progression in höhergradige Meningeome präventiv verhindern könnten [96]. Weiter zeigte sich, dass Meningeome mit einer hohen Konzentration an Progesteronrezeptoren eher einen benignen Charakter zeigen [51]. Da Frauen eine physiologisch höhere Konzentration an Progesteron als Männer aufweisen, könnte auch dieser Parameter einen Einfluss auf die höhere Rate an benignen Meningeomen bei Frauen haben [68].

Auch in der Altersverteilung zeigte sich in Bezug auf einen 1p-Verlust ein Unterschied, wenn auch nicht signifikant. So zeigten Patienten mit Allelverlust ein um 3 Jahre früheres Auftreten des Meningeoms. Dies passt mit den weiteren oben genannten Charakteristiken, wie männliches Geschlecht und ein höherer WHO-Grad der Patienten mit LOH zusammen und unterstreicht das möglicherweise erhöhte pathogene Risiko dieses Merkmals.

Überraschenderweise zeigte sich auch in der Verteilung der Lokalisation eine klare Auftrennung der Gruppen bezüglich des LOH-Ergebnisses. So wiesen alle Patienten mit Allelverlust eine intrakranielle Lokalisation auf und keiner eine spinale Ausprägung. Somit zeigte keins der spinal lokalisierten Meningeome einen Allelverlust auf dem Chromosom 1p. Möglicherweise stellt auch weiterführend die intrakranielle Verteilung einen wichtigen Faktor dar. So stellten Bi *et al.* heraus, dass die Lokalisation des Meningeoms Rückschlüsse auf dessen klinisches Verhalten und molekulargenetischen Status zulassen könnte [7]. In dieser Studie war allerdings unabhängig des Allelstatus die frontale Ausprägung am häufigsten exprimiert und es zeigte sich somit innerhalb der Gruppen kein präferierendes intrakranielles Auftreten.

Zusammenfassend lässt diese Studie die Vermutung zu, dass eine LOH auf dem Chromosom 1p schon früh in der Pathogenese betroffen sein kann. In den höhergradigen Meningeomen nahm die Inzidenz der LOH zu. Dadurch wird die Hypothese erhärtet, dass der Verlust des Chromosomenarms 1p in der Pathogenese von Meningeomen eine Entdifferenzierung (höheres Rezidivaufreten, aggressiveres klinisches Verhalten) begünstigt [57,101]. Dies kann auch in niedriggradigen Meningeomen der Fall sein, die möglicherweise einige der genannten Eigenschaften höhergradiger Meningeome aufweisen, aber trotzdem laut WHO noch in die Gruppe des Grad I eingeordnet werden müssen. Damit ergibt sich die Möglichkeit, über die Überprüfung des Verlustes des Chromosoms 1p, einen Indikator zu erstellen, über den auch niedriggradige Meningeome mit einem wahrscheinlich erhöhten Rezidivrisiko identifiziert werden können. Wie erörtert zeigten die Meningeome mit einer LOH auf dem Chromosom 1p ein erhöhtes Risikoprofil. Über diesen Indikator können folgend postoperative Kontrollen intensiviert werden, um die möglichen Rezidive schneller zu diagnostizieren.

6.3 NACHWEISBARKEIT DER UNTEREINHEITEN DPF3 UND SNF5 DES SWI/SNF-KOMPLEXES IN MENINGEOMPROBEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE

Die Untersuchung der Untereinheiten des Remodeling Komplexes mittels Western Blot an Meningeomproben stellte sich als Herausforderung dar. Zwar handelte es sich um sehr proteinreiche Gewebeproben, doch diese zeigten die gesuchten Proteine in geringerer Konzentration, als man nach Gesamtproteinmessung annehmen würde (vergleiche 4.2.1 und 5.3.3). Es ist anzunehmen, dass vor allem die faserartige Beschaffenheit der Meningeome eine Verzerrung der eigentlichen Proteinmenge durch hohe Konzentrationen an extrazellulären Proteinen wie Kollagen und Fibronectin resultieren ließ, wie bereits bei histologischen Untersuchungen an anderen Meningeomproben gezeigt wurde [66]. Folgend war das DPF3 in Meningeomproben nicht nachweisbar und das SNF5 unter gleichen Bedingungen nicht reproduzierbar darstellbar.

In der Zellkultur-Kontrolle war in der DPF3-Färbung eine schwache Bande analysierbar, die allerdings eine geringere Konzentration an Gesamtprotein zeigte als die Meningeomproben. Somit befand sich dieses Protein unter der Nachweisgrenze dieses Verfahrens. Dieser Effekt könnte einerseits durch hohe Konzentrationen an extrazellulären Proteinen entstanden sein, die die eigentliche Konzentration an intrazellulären Proteinen verfälscht haben könnte [66]. Andererseits könnte es in den Meningeomen zu einer Herabregulation des Proteins gekommen sein. In der Literatur finden sich aktuell wenig Daten hinsichtlich der Rolle des DPF3 in der Kanzerogenese zu Meningeomen und jeglicher anderer Tumorentität [32,35,90]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Protein physiologisch niedrig in den Meningeomen und auch den arachnoidalen Zellen, dem Ursprungsgewebe des Meningeoms, exprimiert vorliegt. Dies erhärtet sich durch die Literatur, in der das DPF3 vor allem in neuronalen Stammzellen vermutet wird [50,55].

6.4 DIE UNTEREINHEIT DES SWI/SNF-KOMPLEXES ARID1A

ARID1A beziehungsweise BAF250a ist die größte bekannte Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes und nimmt entscheidende Funktionen im physiologischen Zellzyklus ein [36,59,64,100]. Zur Untersuchung auf eine Dysregulation des Proteins in Meningeomen wurden der Western Blot und folgend die Immunhistochemie durchgeführt und mit den genetischen Ergebnissen verglichen und diskutiert. Der Fokus dieser Arbeit engte sich auf das ARID1A ein. Bis zum jetzigen Stand stellt diese Studie die erste Arbeit dar, die die beschriebenen Untersuchungen in diesem Probenumfang an Meningeomen vorgenommen hat.

6.4.1 NACHWEIS DER PROTEINEXPRESSION DES ARID1A IM WESTERN BLOT

Dieses Protein stellte insofern eine Komplexität dar, weil es sich um ein vergleichsweise großes Molekül handelte. Bei einer theoretischen Größe von 242 kDa wurde die Bande immer im oberen Bereich des Blots erwartet [89,94].

In den ausgewerteten Western Blots zeigte sich aber, dass nicht die Bande bei 250 kDa am stärksten exprimiert vorlag, sondern auf der Höhe von circa 100 kDa (vergleiche 5.3.1). Dies führte zu der Überlegung, dass es sich womöglich um Spaltprodukte oder Splicing-Varianten des gesuchten Proteins handeln könnte [89,94]. Eine weitere Hypothese war, dass womöglich eine veränderte Laufcharakteristik im Gel zu finden sei. Allerdings erscheint ein Unterschied von fast 150 kDa und damit von fast 60% des Gesamtproteins sehr unwahrscheinlich. Ursächlich für solche Unterschiede könnten beispielsweise posttranslationale Modifikationen oder strukturelle Änderungen des Proteins auch im denaturierten Zustand sein [17,53].

In der Literatur werden mehrere Splicing-Varianten des ARID1A aufgeführt [88,94]. So existieren errechnete Isoformen auch im Bereich von 100 kDa [94]. Auch das spezifische Lysat aus ARID1A-überexprimierten Zellen (LS-G88844, LifeSpan BioScience, Inc.) stellt sich laut Hersteller mit mehreren Banden bis 100 kDa dar [56]. Es zeigte sich aber bei mehrfach genutzten Meningeomproben ein allmähliches Verschieben der Bande in den niedrigmolekularen Bereich. Dies lässt die proteolytischen Spaltprodukte wahrscheinlicher wirken. Diese Beobachtung legt nahe, dass dieses große Protein besonders vulnerabel auf äußere Einflüsse wie mehrfaches Auftauen und Einfrieren, Lagerung bei erhöhten Temperaturen und wiederholtes Aufkochen reagiert. Möglicherweise reicht es bereits aus, dass die Tumorprobe nicht direkt eingefroren, sondern erst der Standarddiagnostik des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes unterzogen wird. All diese Prozesse können Einfluss auf die Proteolyse nehmen und damit den Abbau der 250 kDa Bande.

Es könnte auch ein Detektionsbias in der Markierung der Banden im Western Blot aufgetreten sein. Der Antikörper besetzt nur einen Teil des Proteins, sodass auch die beschriebenen Spaltprodukte oder fehlerhaft geformte Proteine detektiert und als Bande markiert sein können. Dieser Effekt könnte auch aus Framshift-Mutationen resultieren, die bereits am ARID1A an Meningeomen beschrieben wurden [10,106]. Ein weiterer Einflussfaktor auf eine mögliche fehlerhaft markierte ARID1A-Bande ist zudem das Begleitgewebe, das bei den Meningeomproben stark ausgeprägt war.

Trotz dieser Beobachtung ist nicht an der Aussagekraft des Western Blots zu zweifeln, da durch ein kommerzielles spezifisches Lysat aus ARID1A-überexprimierten, immortalisierten Zellen die Bande klar identifiziert werden konnte und auch Spaltprodukte eine Aussage über den Proteinstatus erheben können.

Falls die Bande nicht exprimiert vorlag, kam die Frage auf, ob es sich dann lediglich um ein abgebautes Protein handelte und die spezifische Bande noch tiefer zu finden sei oder ob diese Bande tatsächlich negativ war. In der gemeinsamen Analyse der beiden Banden zeigte sich, dass bei Ausfall der 250 kDa

Bande auch die 100 kDa Bande überwiegend negativ vorlag, was eher gegen die tiefer liegenden Abbauprodukte spricht, sondern vielmehr für ein gesamt ausgefallenes Protein. Dieser Effekt zeigte sich signifikant und stützt zusätzlich die Hypothese, dass ein echter Verlust beziehungsweise eine Reduktion des Proteins unterhalb der Nachweisgrenze mittels Western Blot vorlag.

Weiter war auffällig, dass bei abwesender Bande auf Höhe von 100 kDa die Mehrzahl der Fälle (53,8% = 7/13) eine LOH auf dem Genlocus des untersuchten Proteins *ARID1A* zeigte. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p = 0,497$), sollte aber Erwähnung finden. Der chromosomale Ausfall des Genlocus des *ARID1A* könnte dabei ursächlich sein für das unterexprimierte Protein.

Ein weiteres Problem stellte die Heterogenität der Messung der Intensität der Banden dar. So war die Ratio aus *ARID1A*- und alpha-Tubulin-Bande durch eine starke Streuung gekennzeichnet. Diese zeigte einige Ausreißer, die womöglich die Statistik verfälscht haben (vergleiche Kapitel 5.3.2). Weiter stützt sich die Regressionsanalytik auf die errechneten Mittelwerte, die stark beeinflussbar durch die Streuung sind. Diese gestreuten Werte können aus der schwierigen Messung der Banden vor stark unterschiedlichen Hintergründen der Blots resultieren. So zeigten einige Proben trotz der Behandlung mit DNase eine Art „Schliere“ über die gesamte Laufbahn, welches diese Messung zusätzlich verzerren könnte. Neben den aufgeführten Gründen können zusätzlich weitere undetektierbare Faktoren diese Messung beeinflusst haben. In der Auswertung dieses Ergebnisses war überraschend, dass der Mittelwert der Ratio (Verhältnis zwischen *ARID1A* und der Ladekontrolle) bei denjenigen Fällen, bei denen trotz einer LOH Banden auf Höhe von 100 kDa vorhanden waren, größer ausfiel als der Mittelwert der Patienten ohne LOH. Dies widerspricht der vorherigen Analyse, in der sich die Gruppe der LOH-Fälle eher durch den Ausfall der Bande auszeichneten. Allerdings entsprach der Mittelwert der Fälle ohne LOH eher dem gemessenen Mittelwert der Kontrolle, die nachweislich das *ARID1A* exprimiert. Es ist somit fraglich, ob diese Methodik der Auswertung der Banden sensitiv genug ist, oder ob sich lediglich das deskriptive Vorgehen als aussagekräftig darstellt.

Das führte zu der Fragestellung, inwiefern diese beiden Ergebnisse übereinstimmen können. Insgesamt müssen vor allem die Messungen der Intensität mit Vorsicht betrachtet werden, da es zu einer großen Streuung der Werte kam. Dieser Effekt könnte die Gesamtbewertung stark verschoben haben und somit auch die Regressionsanalyse, auf der diese Aussage basiert. Insofern stellte diese Messmethode einen Schwachpunkt dar und es sollte eher die qualitative Messung der Banden als Ausgangspunkt für weitere Analysen genutzt werden. Diese sollte aber trotzdem immer durch weitere Methoden, wie die Immunhistochemie oder die LOH-Analyse ergänzt werden.

6.4.2 NACHWEIS DER PROTEINEXPRESSION DES ARID1A IN DER IMMUNHISTOCHEMIE

Die Immunhistochemie wurde zur Komplementierung der anderen Methoden angewandt. Es zeigte sich, dass dieses Verfahren nicht sensitiv genug war, um alleinig Alterationen im Genlokus des *ARID1A* zu detektieren. So waren in der immunhistochemischen Färbung Fälle mit LOH nicht klar von Fällen ohne LOH zu differenzieren.

Bisher finden sich überwiegend Fallberichte über das immunhistochemische Expressionslevel des *ARID1A* in Meningeomen [2,10]. Bei diesen Berichten handelt es sich aber um auffällige Meningeome hinsichtlich des Rezidivauftritts und der histologischen Heterogenität. Abedalthagafi et al. zeigten in einem Fallbericht, dass die histologische *ARID1A*-Expression mit Malignitätskriterien in Meningeomen korreliert, indem sie ein singuläres Meningeom mit Bereichen aller drei WHO-Grade analysierten. Sie konnten dabei eine Abnahme des *ARID1A*-Expressionslevels bei zunehmendem WHO-Grad nachweisen [2].

Im Gegensatz dazu finden sich in dieser Studie in klassisch erscheinenden Meningeomproben die in der Literatur beschreibenden Eigenschaften und es zeigte sich keine sichtbare Korrelation mit WHO-Grad, LOH-Ergebnis oder klinischer Daten. Trotzdem ist in der genannten Studie von Abedalthagafi *et al.* ein zu dieser Arbeit ähnliches Mosaik-Färbemuster erkennbar, das ebenfalls durch heterogene Anteile gekennzeichnet ist, wie zum Beispiel beschrieben in **Abbildung 31** D bis F. Somit ist das Färbemuster dieser Arbeit kein Einzelfall und untermauert bereits beschriebene Phänomene [2].

Patienten mit einem Mosaik-Muster zeigten ein um fünf Jahre früheres Auftreten des Meningeoms im Vergleich mit der Gesamtgruppe, allerdings nicht signifikant. Ein ähnliches früheres Altersauftreten fand sich auch in der Literatur von Fallberichten über Patienten, die histologisch ein ähnliches Bild aufwiesen [2,10].

So stellte die Immunhistochemie zwar nicht die Grundlage dieser Aussage dar, aber zeigte umso mehr, dass sie die Ergebnisse des Western Blots erweitern konnte und neue Informationen zu der Proteinexpression ergab. Diese Verfahren dienten folglich als Ergänzung und Bestätigung der vorherigen Methodik und zeigten Einblicke in das intrazelluläre Verteilungsmuster des untersuchten Proteins.

6.4.3 FÄRBUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

Zusätzlich zu der von der WHO empfohlenen HE-Färbung wird oft die Anfärbung der Gewebeunspezifischen alkalischen Phosphatase am Meningeomgewebe vorgenommen, um eine Aussage über den Status des Chromosoms 1 zu stellen. Dabei wird von einem chromosomalen Verlust ausgegangen, wenn die Färbung negativ ausfällt [63].

Bisher stützt sich diese Aussage auf den Genlokus der alkalischen Phosphatase auf 1p36.12, der folglich bei einem vollständigen chromosomalen Verlust ausgefallen ist [12,63]. *ARID1A* befindet sich auf

1p36.11 und liegt somit in vergleichbar räumlicher Nähe zu dem Genlokus des Enzyms (circa fünf Millionen Basenpaare Abstand und damit circa 4% der Gesamtlänge des kurzen Arms von Chromosom 1) (NCBI, Stand April 2020) [77,87,88]. Die Studie von Nagl *et al.* beschrieb, dass auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem *ARID1A* und der alkalischen Phosphatase existiert und das *ARID1A* einen Einfluss auf die physiologische Induktion der alkalischen Phosphatase aufweist [64]. Auch in dieser Studie ließ sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen den beiden Faktoren evaluieren (vergleiche 5.4.2).

Trotzdem zeigte sich in dieser Studie eine Quote der falsch positiv gefärbten Fälle von 20 bis 40% bei Betrachtung der LOH-Analysen des Chromosoms 1p, abhängig davon, ob die fokal gefärbten Anteile als positive Färbung gewertet werden. Bei einer Monosomie des Chromosoms 1p kann das verbleibende intakte Allel ausreichend sein, um die Induktion des Enzyms zu ermöglichen. Bei der spezifischen Betrachtung des Einflusses des *ARID1A* auf AP könnte ebenso ein funktionelles Genprodukt ausreichen, um eine physiologische Induktion zu erreichen.

Deshalb stellt die Analyse der alkalischen Phosphatase zwar eine einfache und kostengünstige Möglichkeit dar, diesen chromosomalen Abschnitt zu bewerten, allerdings hat sie aufgrund ihrer hohen Fehlerquote keine ausreichende Aussagekraft, um eine fundierte Diagnose zu treffen.

6.5 FOKUS VIELER TUMORENTITÄTEN UND GENLOKUS DES *ARID1A* – 1P36

Der chromosomale Abschnitt 1p36 stellt aktuell einen wichtigen Fokus in der Forschung der Onkologie dar. Der Abschnitt hat eine Größe von 27,6 Millionen Basenpaaren (NCBI, Stand April 2020) [88]. Auf dem Abschnitt finden sich die Genloki von über 800 Genen und bei einigen davon handelt es sich um Tumorsuppressorgene, wie *RUNX3* (1p36.11), *TP73* (1p36.32) oder *HSPB7* (1p36.13) (NCBI, Stand April 2020) [88]. Aberrationen dieses Abschnitts wurden in den unterschiedlichsten Tumorentitäten entdeckt und dies erhärtet die Frage nach dem Gen, das diesen chromosomalen Bereich so entscheidend in der Kanzerogenese herausstellt [61].

In dieser Studie wurde der Fokus auf *ARID1A* gesetzt mit dem Genlokus auf 1p36.11 und somit im Hotspot dieses untersuchten Chromosomenteilbereichs. *ARID1A* ist Teil des SWI/SNF-Komplexes und spielt somit eine elementare Rolle in der Physiologie des Chromatin-Remodelings [77]. Dieses Protein zeigt, neben vielen anderen Einbindungen in Signalwege, eine positive Wirkung auf die Induktion von p21, eines Proteins, das eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus hat und kanzerogene Prozesse unterbindet [64]. Diese Rolle als Tumorsuppressor zeigt sich auch in der Evaluation anderer humaner Tumorentitäten, in denen *ARID1A* häufig mutiert vorliegt [36,39,59]. Bisher schließt dies allerdings die Meningeome nicht mit ein.

Ein Bereich in der Nähe des *ARID1A* (22.400 Basenpaare Abstand) zeigte sich in einem Viertel der Proben auf chromosomaler Ebene alteriert und legt damit auch den Verlust des Gens nahe. Dieses

Ergebnis fand sich bei allen WHO-Graden und unterschiedlichen klinischen Eigenschaften. Der Genlokus zeigte sich in einigen Fällen von einer LOH betroffen und das Protein zeigte sich in reduzierter Menge exprimiert, wenn auch nicht in allen Fällen gemeinsam. Der Western Blot und die immunhistochemischen Analysen offenbarten, dass neben der LOH noch ein weiterer Faktor auf Proteinebene hinzukommen muss, um eine histologische Veränderung bei *ARID1A* hervorzurufen.

Zur Erklärung dieses Phänomens wird traditionell die Initiation einer Kanzerogenese durch die „Two-Hit-Hypothese“ nach Knudson *et al.* angeführt, die besagt, dass theoretisch beide Allele oder deren Produkte mutiert vorliegen müssen, um einen pathologischen Prozess zu ermöglichen [46]. Folglich können unterschiedlichste Einflüsse die „Hits“ repräsentieren, wie Chromosomenverluste, aber auch Veränderungen auf Proteinebene. In der Literatur wurden beispielsweise Frameshift-Deletionen des *ARID1A* in Meningeomen detektiert [2,10]. Bujko *et al.* haben in einer Fallbeschreibung eines dreifach rezidierten Meningeoms eine Frameshift-Deletion an der Stelle Tyr551(TACTC>T) des *ARID1A* evaluiert, die mit zunehmender Rekurrenz anteilig am Gewebe zugenommen hat [10,106]. Ähnliche Frameshift-Deletionen könnten möglicherweise undetektiert in der LOH-Analyse aber auch im Western Blot in dieser Studie aufgetreten sein, müssen aber als weiterer Faktor in der Pathogenese bedacht werden. So könnten die Ergebnisse dieser Studie und weitere Einflussfaktoren jeweils einzelne „Hits“ auf DNA- oder Proteinebene darstellen, die allerdings nur in einem Anteil der Gesamtstichprobe die zwei nötigen Schädigungen aufweisen, um die Konsequenz einer Pathogenese zu bewirken. Zusätzlich zu dem Modell nach Knudson *et al.* zeigten einige Studien aber auch bei heterozygoter Alteration die Initiation einer Kanzerogenese. Diese Haploinsuffizienz wurde bei *ARID1A* beschrieben, sowohl in Studien an menschlichen Malignomen, als auch *in vitro* [106]. Dies würde wiederum bedeuten, dass bereits der Verlust eines Allels mitsamt des Genlokus des *ARID1A* ausreichen könnte, um bestimmte pathologische Prozesse zu fördern. Eine Überprüfung mittels einer Sequenzierung des kodierenden Bereiches von *ARID1A* könnte weitere Faktoren aufdecken und ergänzend zu den hier beschriebenen Ergebnissen wirken.

Es gibt verschiedene Hypothesen über das pathogene Potential des *ARID1A*. Zum einen die Funktion als Tumorsuppressor außerhalb des Gesamtkomplexes, dessen proliferationshemmende Wirkung bei Schädigung ausfällt [64,100,106]. Zusätzlich wird vermutet, dass durch eine Fehlfunktion des *ARID1A* der gesamte SWI/SNF-Komplex fehlreguliert vorliegt und folgend dessen Aktivität vermindert wird oder ausfällt [106]. Diese Hypothese stützen Wu und Roberts *et al.* darauf, dass viele verschiedene Untereinheiten des Komplexes in den unterschiedlichsten Tumorentitäten ausgefallen vorliegen und häufig ein kanzerogenes Potenzial zeigen [106].

Zusammenfassend lassen die Untersuchungen die Vermutung zu, dass *ARID1A* schon früh in der Pathogenese des Meningeoms betroffen sein kann. Allerdings stellt es nur bei einem Teil der Fälle eine mögliche Mutation dar und wahrscheinlich nur in einer umschriebenen histologischen Untergruppe an Meningeomen, wie den angiomatösen Meningeomen. Um diese Beobachtung zu erklären sind weitere Untersuchungen, wie eine Sequenzierung oder eine Genexpressionsanalyse notwendig.

6.6 POLYKLONALITÄT VON MENINGEOMEN

Bisher wird im überwiegenden Anteil der gängigen Literatur davon ausgegangen, dass Meningeome monoklonale Tumore darstellen [91,105]. So sollen auch bei multiplen Läsionen der gleiche Genotyp und Phänotyp vorliegen [105].

Im Gegensatz zur gängigen Meinung, fanden sich in dieser Studie zwei Fälle von multiplen Läsionen, die sich als polyklonal darstellten (siehe Kapitel 5.2.4). Bei diesen Fällen war die histologische Einteilung unterschiedlich, sowie auch bei einem Fall der Status des Chromosomenarms 1p. Dies stellt die Aussage über die Monoklonalität von Meningeomen in Frage. Einerseits können unabhängig voneinander multiple Läsionen unterschiedlichen Genotyps entstanden sein. Eine weitere Möglichkeit stellt die Migration vereinzelter Zellen einer primären Läsion dar, aus der durch Entdifferenzierung eine neue Läsion eines anderen Genotyps entstanden ist.

So zeigten Fallberichte, dass vereinzelt Patienten mit polyklonalen Meningeomläsionen auftreten [2,10]. In diesen Studien fanden sich bei den untersuchten Fällen sogar gleichzeitig Läsionen von verschiedenen WHO-Graden und unterschiedlichen „EMA“-Expressionsleveln [2,10]. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Status des Meningeoms als „monoklonaler Tumor“ reevaluiert werden sollte und aufgrund der vorliegenden Fallberichte und den Daten dieser Studie nicht pauschal als solcher angenommen werden kann [2,10].

Diese Erkenntnis stellt nicht nur eine Konsequenz für zukünftige Diagnostik, sondern auch Therapiepläne dar. So sollte von jeder Läsion nicht nur der histologische Status, sondern auch der molekulargenetische Status erhoben werden. Es impliziert zusätzlich, dass größere Läsionen gegebenenfalls geteilt und getrennt voneinander betrachtet und klassifiziert werden müssen.

6.7 REEVALUATION DER AKTUELLEN GRADIERUNG VON MENINGEOMEN NACH WHO

Nach der Ausgabe der „WHO classification of tumours of the central nervous system“ der Weltgesundheitsorganisation aus dem Jahr 2016 wurden einige diagnostische Standards für neuroonkologische Tumore überarbeitet. Unter anderem für gliale Tumore wie das Glioblastom und das Oligodendrogliom wurden zusätzlich zur histologischen Diagnostik molekulargenetische Marker als Standard hinzugefügt. Im Kontrast dazu werden die Meningeome nach den Standards der WHO nach wie vor allein über die histologische Morphologie bewertet und eingeteilt [105].

Folgend dieser Klassifikation der Tumore nach dem Standard der WHO teilten die Fachärzte für Pathologie des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes einen Großteil der Meningeome als klassische Meningeome ein, welche nicht weiter in die Untergruppen spezifiziert werden konnten. Dies zeigt, dass die klare Einteilung nach histologischer Morphologie oft nicht hinreichend gegeben ist und folglich nicht genau bewertet werden kann. Folglich ist eine

Differenzierung innerhalb der klassischen Meningeome hinsichtlich möglichen Risikoverhaltens allein nach der Histologie kaum möglich. Andere Studien zeigten zudem, dass einige niedriggradige Meningeome zwar höhergradige Eigenschaften aufweisen (Hyperzellularität, erhöhte Mitoserate, etc.), allerdings laut Definition nach WHO noch als Grad I eingeteilt sind. Die eher starre Einstufung widerspricht in diesen Fällen dem klinischen Verhalten der Meningeome [1,2].

Folglich sind die Mitoserate und das morphologische Erscheinungsbild in isolierter Betrachtung nicht aussagekräftig genug, um Aussagen über Faktoren wie Rezidivverhalten und Aggressivität des Tumors zu treffen. Es zeigt sich immer deutlicher, dass vor allem der molekulargenetische Status enorme Auswirkungen auf die genannten Faktoren hat. So zeigen mehrere Studien schon seit einigen Jahren, dass das chromosomale Erscheinungsbild unbedingt individuell analysiert werden muss, um eine bestmögliche Behandlung für den Patienten zu ermöglichen [1,7,44,57,60].

Auch in dieser Studie zeigte sich ein bedeutend hoher Anteil an Chromosomenaberrationen unter den niedriggradigen Meningeomen und bestätigt die beschriebenen Divergenzen zwischen WHO-Grad und molekulargenetischem Risikoprofil. Es erhärtet sich damit die dringliche Notwendigkeit einer Reevaluation der Klassifikation von Meningeomen nach WHO, bei der molekulargenetische Faktoren einbezogen werden. So können diese diagnostischen Schritte Auswirkungen auf die postoperative Kontrollhäufigkeit haben, aber auch auf die direkte Therapie im Sinne von adjuvanten Maßnahmen. Doch diese nach individuellem Risikoprofil ausgelegte Betreuung der Patienten ist nur bei entsprechender standardisierter Diagnostik und Einstufung möglich.

6.8 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Um individuelle Therapiepläne und ein abgestimmtes Behandeln eines Patienten zu ermöglichen, wird es immer entscheidender, eine Tumorentität genau zu klassifizieren. Besonders in der Onkologie existieren von operativen Vorgehen bis Target-Therapeutika viele verschiedene Ansatzpunkte zur Therapie verschiedenster Neoplasien. Die Klassifikation und Behandlung von Meningeomen hat sich seit Jahrzehnten sehr einseitig gestaltet. Viele Forschungsansätze der letzten Jahre implizieren jedoch immer mehr, wie wichtig die molekulargenetische Analyse eines Meningeoms ist [7,57,60]. Dabei wurde ein vermehrtes Auftreten von Chromosomenteilverlusten wie den Abschnitten 1p, 6q, 9p und 14q mit einem aggressiveren Verlauf oder erhöhtem Rezidivaufkommen in Verbindung gebracht [1,7,10,57]. Nachdem wichtige chromosomale Bereiche identifiziert wurden, stellt es den nächsten Schritt dar, genauere Kandidatenproteine zu erarbeiten und mögliche Konsequenzen für Diagnostik und Therapie daraus abzuleiten.

In dieser Arbeit wurde die Proteinuntereinheit ARID1A, auch BAF250a genannt, des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF hinsichtlich der Pathogenese von Meningeomen herausgearbeitet. So zeigt diese Studie, dass dieser umgebende Genabschnitt häufig durch eine LOH in Meningeomen betroffen ist und auch auf Proteinebene häufig ausgefallen vorliegt. Damit dient dieser Parameter als zuverlässiger Indikator für den gesamten Verlust des Chromosomenarms 1p.

Als Konsequenz dieses Ergebnisses sollte die Betrachtung des Chromosomenarms 1p in der PCR-gestützte Mikrosatelliten-Analyse in die standardmäßige Evaluation von Meningeomen einbezogen werden. Dabei könnte das bisher gängige Protokoll von Hartmann *et al.* nach den hier beschriebenen Modifikationen angepasst werden [30]. Zusätzlich wäre es hinsichtlich des Chromosoms 1p von Interesse, weitere Sonden in Richtung des Zentromers zu testen, um die Hypothese des gesamten Chromosomenarmverlustes weiter zu stützen. Neben dem Chromosom 1 bieten sich auch andere chromosomale Abschnitte, wie 14q sowie 6q oder 9p an, da diese vielversprechende Resultate in Übersichtsstudien gezeigt haben [7,57,60]. Das Chromosom 22 allerdings zeigte keinen Einfluss auf das klinische Verhalten des Tumors, kann aber Rückschlüsse auf die Pathogenese zulassen [44,57].

Als Schlussfolgerung aus der erschwerten quantitativen Auswertung auf Proteinebene von ARID1A könnten im Anschluss an diese Arbeit weitere Projekte diese These stärken. Dabei würde sich in einem größeren Stichprobenumfang eine Untersuchung des Tumormaterials mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) anbieten, da diese Methodik eine quantitativ bessere Erfassung des Proteins als der Western Blot ermöglicht. Dabei wird das Substrat, ähnlich wie beim Western Blot, über spezifische Antikörper fixiert und folgend an ein Enzym gebunden, das eine Farbreaktion aktivieren kann, durch deren Messung eine sehr genaue Berechnung der Konzentrationen des Substrats möglich wird [27]. Daneben könnte eine mRNA-Analyse Einblicke in die Funktionsabläufe vom Gen zum Protein ARID1A bringen und den Pathomechanismus näher spezifizieren. Zusätzlich würden

(Meningeom)-Zelllinien mit einem Knock-Out des *ARID1A*-Gens neue Erkenntnisse über das Verhalten *in vitro* und physiologische Konsequenzen von *ARID1A*-Verlusten bringen.

Weiter konnte die Klassifizierbarkeit der Meningeome in Untergruppen nach WHO beurteilt werden. So stellte diese Studie klar dar, dass die molekulargenetischen Eigenschaften eines Tumors nicht mit dem Risikoprofil nach WHO-Grad übereinstimmen müssen. Dabei zeigten sich besondere Untergruppen, wie das angiomatöse Meningeom, die besonders dominant diese Hypothese unterstützen. Um diese Beurteilung zu festigen, sollten weitere Studien mit einer größeren Stichprobe und einer Langzeitbetrachtung bezüglich des klinischen Verhaltens der Tumore durchgeführt werden. Besonders die Fälle, die sich in der immunhistochemischen Analyse als Mosaik gezeigt haben, könnten in der Betrachtung über einen längeren Zeitraum neue Erkenntnisse bringen.

Zusammenfassend setzt diese Arbeit durch die Charakterisierung eines viel betroffenen chromosomalen Abschnitts auf 1p36.11 einen neuen Fokus in der Diagnostik von Meningeomen. Sie verdeutlicht das Phänomen eines Chromosomenarmverlustes statt einzelner Teilverluste bei Meningeomen, vor allem bei höhergradigen Meningeomen und bei angiomatösen und klassischen Meningeomen des WHO-Grades I. Die Studie veranschaulicht damit die Notwendigkeit einer Reevaluation bisheriger diagnostischer Standards. Somit werden neue Ansätze in dem Verständnis der Pathogenese und Diagnostik des häufigsten intrazerebralen Tumors eröffnet.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abedalthagafi MS, Merrill PH, Bi WL, Jones RT, Listewnik ML, Ramkissoon SH, Thorner AR, Dunn IF, Beroukhim R, Alexander BM, Brastianos PK, Francis JM, Folkerth RD, Ligon KL, Hummelen PV, Ligon AH, Santagata S (2014) Angiomatous meningiomas have a distinct genetic profile with multiple chromosomal polysomies including polysomy of chromosome 5. *Oncotarget* 5:10596–10606
2. Abedalthagafi MS, Bi WL, Merrill PH, Gibson WJ, Rose MF, Du Z, Francis JM, Du R, Dunn IF, Ligon AH, Beroukhim R, Santagata S (2015) ARID1A and TERT promoter mutations in dedifferentiated meningioma. *Cancer Genet* 208:345–350
3. Allen MD, Freund SMV, Zinzalla G, Bycroft M (2015) The SWI/SNF Subunit INI1 Contains an N-Terminal Winged Helix DNA Binding Domain that Is a Target for Mutations in Schwannomatosis. *Structure* 23:1344–1349
4. Barkhof F, Jager R, Thurnher M, Rovira Cañellas A, Herausgeber (2018) *Clinical Neuroradiology: The ESNR Textbook*. Springer International Publishing, Cham
5. Baser ME, Poussaint TY (2006) Age associated increase in the prevalence of chromosome 22q loss of heterozygosity in histological subsets of benign meningioma. *Journal of Medical Genetics* 43:285
6. Bendszus M, Rao G, Burger R, Schaller C, Scheinemann K, Warmuth-Metz M, Hofmann E, Schramm J, Roosen K, Solymosi L (2000) Is there a benefit of preoperative meningioma embolization? *Neurosurgery* 47:1306–1311; discussion 1311-1312
7. Bi WL, Zhang M, Wu WW, Mei Y, Dunn IF (2016) Meningioma Genomics: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Surg* 3:
8. Boamah D, Lin T, Poppinga FA, Basu S, Rahman S, Essel F, Chakravarty S (2018) The Characteristics of a PHD Finger Subtype. *Biochemistry* 57:525–539
9. Buhl R, Hugo HH, Mehdorn HM (2001) Brain oedema in secretory meningiomas. *J Clin Neurosci* 8 Suppl 1:19–21
10. Bujko M, Machnicki MM, Grecka E, Rusetska N, Matyja E, Kober P, Mandat T, Rydzanicz M, Płoski R, Krajewski R, Bonicki W, Stokłosa T, Siedlecki JA (2017) Mutational Analysis of Recurrent Meningioma Progressing From Atypical to Rhabdoid Subtype. *World Neurosurg* 97:754.e1-754.e6
11. Buselmaier W, Tariverdian G (2007) *Humangenetik: mit 162 Tabellen*. 4., neu bearb. Aufl edition. Springer Medizin, Heidelberg
12. Cerdá-Nicolás M, López-Ginés C, Pérez-Bacete M, Talamantes F, Roldán P (2002) Monosomy 1p and alkaline phosphatase in meningiomas. Citopathological, histochemical and genetical study in 10 tumors. *Med Clin (Barc)* 118:656–658
13. Chestkov AV, Baka ID, Kost MV, Georgiev GP, Buchman VL (1996) The d4 Gene Family in the Human Genome. *Genomics* 36:174–177
14. Christiaans I, Kenter SB, Brink HC, Os TAM van, Baas F, Munckhof P van den, Kidd AMJ, Hulsebos TJM (2011) Germline SMARCB1 mutation and somatic NF2 mutations in familial multiple meningiomas. *Journal of Medical Genetics* 48:93–97
15. Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78:273–304

16. Daugaard S (1983) Ectopic meningioma of a finger: Case report. *Journal of Neurosurgery* 58:778–780
17. Davis PJ, Williams SC (1998) Protein modification by thermal processing. *Allergy* 53:102–105
18. DeCristofaro MF, Betz BL, Wang W, Weissman BE (1999) Alteration of hSNF5/INI1/BAF47 detected in rhabdoid cell lines and primary rhabdomyosarcomas but not Wilms' tumors. *Oncogene* 18:7559–7565
19. Duhoux FP, Ameye G, Lambot V, Herens C, Lambert F, Raynaud S, Wlodarska I, Michaux L, Roche-Lestienne C, Labis E, Taviaux S, Chapiro E, Nguyen-Khac F, Khac FN, Struski S, Dobbstein S, Dastugue N, Lippert E, Speleman F, Van Roy N, De Weer A, Rack K, Talmant P, Richebourg S, Mugneret F, Tigaud I, Mozziconacci M-J, Laibe S, Nadal N, Terré C, Libouton J-M, Decottignies A, Vikkula M, Poirel HA, Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH), Belgian Cytogenetic Group for Hematology and Oncology (BCG-HO) (2011) Refinement of 1p36 alterations not involving PRDM16 in myeloid and lymphoid malignancies. *PLoS ONE* 6:e26311
20. Dziuk TW, Woo S, Butler EB, Thornby J, Grossman R, Dennis WS, Lu H, Carpenter LS, Chiu JK (1998) Malignant meningioma: an indication for initial aggressive surgery and adjuvant radiotherapy. *J Neurooncol* 37:177–188
21. Edelhoff S, Grond-Ginsbach C, Eggeling F von, Körholz D, Göbel U, Senger G (1998) Complex chromosomal rearrangements associated with congenital erythrophagocytotic histiocytosis. *Clinical Genetics* 53:298–302
22. Engenhardt-Cabillic R, Groß MW, Henzel M, Zabel-du Bois A, Milker-Zabel S, Rades D (2013) *Strahlentherapie*. 2. edition. Springer, Berlin, Heidelberg
23. Flynn SD, Yousem SA (1991) Pulmonary meningiomas: A report of two cases. *Human Pathology* 22:469–474
24. Fotsing SF, Margoliash J, Wang C, Saini S, Yanicky R, Shleizer-Burko S, Goren A, Gymrek M (2019) The impact of short tandem repeat variation on gene expression. *Nat Genet* 51:1652–1659
25. Glaholm J, Bloom HJG, Crow JH (1990) The role of radiotherapy in the management of intracranial meningiomas: the royal marsden hospital experience with 186 patients. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 18:755–761
26. Goutagny S, Nault JC, Mallet M, Henin D, Rossi JZ, Kalamarides M (2014) High Incidence of Activating TERT Promoter Mutations in Meningiomas Undergoing Malignant Progression. *Brain Pathology* 24:184–189
27. Gressner AM, Arndt T, Herausgeber (2019) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
28. Grossman S. A, Rutka JT, Tonn J-C, Westphal M (2006) *Neuro-Oncology of CNS Tumors*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York
29. Haeussler M, Zweig AS, Tyner C, Speir ML, Rosenbloom KR, Raney BJ, Lee CM, Lee BT, Hinrichs AS, Gonzalez JN, Gibson D, Diekhans M, Clawson H, Casper J, Barber GP, Haussler D, Kuhn RM, Kent WJ (2019) The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Res* 47:D853–D858
30. Hartmann C, Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S, von Deimling A (2005) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:10–14

31. He S, Pham MH, Pease M, Zada G, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ (2013) A review of epigenetic and gene expression alterations associated with intracranial meningiomas. *Neurosurg Focus* 35:E5
32. Hiramatsu H, Kobayashi K, Kobayashi K, Haraguchi T, Ino Y, Todo T, Iba H (2017) The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells. *Sci Rep* 7:889
33. Hohmann AF, Vakoc CR (2014) A rationale to target the SWI/SNF complex for cancer therapy. *Trends in Genetics* 30:356–363
34. Hortobágyi T, Bencze J, Murnyák B, Kouhsari MC, Bognár L, Marko-Varga G (2017) Pathophysiology of Meningioma Growth in Pregnancy. *Open Med (Wars)* 12:195–200
35. Hoyal CR, Kammerer S, Roth RB, Reneland R, Marnellos G, Kiechle M, Schwarz-Boeger U, Griffiths LR, Ebner F, Rehbock J, Nelson MR, Braun A (2005) Genetic polymorphisms in DPF3 associated with risk of breast cancer and lymph node metastases. *J Carcinog* 4:13
36. Huang J, Zhao Y-L, Li Y, Fletcher JA, Xiao S (2007) Genomic and functional evidence for an ARID1A tumor suppressor role. *Genes, Chromosomes and Cancer* 46:745–750
37. Hulsebos T, Kenter S, Siebers-Renelt U, Hans V, Wesseling P, Flucke U (2014) SMARCB1 Involvement in the Development of Leiomyoma in a Patient With Schwannomatosis. *The American Journal of Surgical Pathology* 38:421–425
38. Inoue H, Furukawa T, Giannakopoulos S, Zhou S, King DS, Tanese N (2002) Largest Subunits of the Human SWI/SNF Chromatin-remodeling Complex Promote Transcriptional Activation by Steroid Hormone Receptors. *J Biol Chem* 277:41674–41685
39. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J, Crabtree GR (2013) Proteomic and Bioinformatic Analysis of mSWI/SNF (BAF) Complexes Reveals Extensive Roles in Human Malignancy. *Nat Genet* 45:592–601
40. Kaleem Z, Fitzpatrick MM, Ritter JH (1997) Primary pulmonary meningioma. Report of a case and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 121:631–636
41. Kalimuthu SN, Chetty R (2016) Gene of the month: SMARCB1. *J Clin Pathol* 69:484–489
42. Kalpana GV, Marmon S, Wang W, Crabtree GR, Goff SP (1994) Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 266:2002–2006
43. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler and D (2002) The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res* 12:996–1006
44. Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, Steudel W-I, Zang KD, Rahnenführer J (2007) Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. *International Journal of Cancer* 121:1473–1480
45. Kim KH, Roberts CWM (2014) Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth. *Cancer Genet* 207:365–372
46. Knudson AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820–823
47. Kondziolka D, Nathoo N, Flickinger JC, Niranjan A, Maitz AH, Lunsford LD (2003) Long-term results after radiosurgery for benign intracranial tumors. *Neurosurgery* 53:815–821; discussion 821–822

48. Kros J, Greve K de, Tilborg A van, Hop W, Pieterman H, Avezaat C, Deprez RL dit, Zwarthoff E (2001) NF2 status of meningiomas is associated with tumour localization and histology. *The Journal of Pathology* 194:367–372
49. Kück U, Herausgeber (2005) *PCR-Analytik*. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/3-540-26469-8_4
50. Kulikova DA, Mertsalov IB, Simonova OB (2013) d4 family genes: Genomic organization and expression. *Russ J Dev Biol* 44:1–6
51. Kuroi Y, Matsumoto K, Shibuya M, Kasuya H (2018) Progesterone Receptor Is Responsible for Benign Biology of Skull Base Meningioma. *World Neurosurgery* 118:e918–e924
52. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680
53. Lange M, Kaynak B, Forster UB, Tönjes M, Fischer JJ, Grimm C, Schlesinger J, Just S, Dunkel I, Krueger T, Mebus S, Lehrach H, Lurz R, Gobom J, Rottbauer W, Abdelilah-Seyfried S, Sperling S (2008) Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev* 22:2370–2384
54. Lee D, Kim JW, Seo T, Hwang SG, Choi E-J, Choe J (2002) SWI/SNF Complex Interacts with Tumor Suppressor p53 and Is Necessary for the Activation of p53-mediated Transcription. *J Biol Chem* 277:22330–22337
55. Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA, Crabtree GR (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55:201–215
56. LifeSpan BioScience (2019) Human ARID1A / BAF250 Protein (Over-Expression Lysate Myc + DDK) (Full Length) - LS-G88844.
57. Linsler S, Kraemer D, Driess C, Oertel J, Kammers K, Rahnenführer J, Ketter R, Urbschat S (2014) Molecular biological determinations of meningioma progression and recurrence. *PLoS ONE* 9:e94987
58. Lu Y, Sun H-J, Zhou J-C, Wu X (2019) Genetic polymorphisms, forensic efficiency and phylogenetic analysis of 17 autosomal STR loci in the Han population of Wuxi, Eastern China. *Ann Hum Biol* 46:601–605
59. Masliah-Planchon J, Bièche I, Guinebretière J-M, Bourdeaut F, Delattre O (2015) SWI/SNF Chromatin Remodeling and Human Malignancies. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 10:145–171
60. Mawrin C, Perry A (2010) Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 99:379–391
61. Mertens F, Johansson B, Höglund M, Mitelman F (1997) Chromosomal Imbalance Maps of Malignant Solid Tumors: A Cytogenetic Survey of 3185 Neoplasms. *Cancer Res* 57:2765–2780
62. Mulisch M, Welsch U, Herausgeber (2015) *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
63. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel W-I, Zang KD, Steilen-Gimbel H (1999) Deletion of Chromosome 1p and Loss of Expression of Alkaline Phosphatase Indicate Progression of Meningiomas. *Clin Cancer Res* 5:3569–3577

64. Nagl NG, Patsialou A, Haines DS, Dallas PB, Beck GR, Moran E (2005) The p270 (ARID1A/SMARCF1) Subunit of Mammalian SWI/SNF-Related Complexes Is Essential for Normal Cell Cycle Arrest. *Cancer Res* 65:9236–9244
65. Nakasu S, Hirano A, Shimura T, Llena JF (1987) Incidental meningiomas in autopsy study. *Surgical Neurology* 27:319–322
66. Ng HK, Wong ATC (1993) Expression of epithelial and extracellular matrix protein markers in meningiomas. *Histopathology* 22:113–126
67. Nie Z, Yan Z, Chen EH, Sechi S, Ling C, Zhou S, Xue Y, Yang D, Murray D, Kanakubo E, Cleary ML, Wang W (2003) Novel SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes Contain a Mixed-Lineage Leukemia Chromosomal Translocation Partner. *Mol Cell Biol* 23:2942–2952
68. Oettel M, Mukhopadhyay A (2004) Progesterone: the forgotten hormone in men? *The Aging Male* 7:236–257
69. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2018) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol* 20:iv1–iv86
70. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahari K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T, Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase T, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wakebe H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Yamazaki M, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Watanabe M, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Nakamura Y, Ohara O, Isogai T, Sugano S (2004) Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36:40–45
71. Paulus W, Klöppel G, Remmele W, Herausgeber (2012) *Neuropathologie*. 3., neubearb. Aufl edition. Springer, Berlin
72. Pecorino L (2012) *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. OUP Oxford
73. Pérez-Magán E, Rodríguez de Lope Á, Ribalta T, Ruano Y, Campos-Martín Y, Pérez-Bautista G, García JF, García-Claver A, Fiaño C, Hernández-Moneo J-L, Mollejo M, Meléndez B (2010) Differential expression profiling analyses identifies downregulation of 1p, 6q, and 14q genes and overexpression of 6p histone cluster 1 genes as markers of recurrence in meningiomas. *Neuro Oncol* 12:1278–1290

74. Perry A, Dehner LP (2003) Meningeal Tumors of Childhood and Infancy. An Update and Literature Review. *Brain Pathology* 13:386–408
75. Perry A, Fuller CE, Judkins AR, Dehner LP, Biegel JA (2005) INI1 expression is retained in composite rhabdoid tumors, including rhabdoid meningiomas. *Modern Pathology* 18:951–958
76. Redd AJ, Agellon AB, Kearney VA, Contreras VA, Karafet T, Park H, de Knijff P, Butler JM, Hammer MF (2002) Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome. *Forensic Science International* 130:97–111
77. Reisman D, Glaros S, Thompson EA (2009) The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 28:1653–1668
78. Ryland GL, Doyle MA, Goode D, Boyle SE, Choong DYH, Rowley SM, Li J, Bowtell DD, Tothill RW, Campbell IG, Goringe KL (2015) Loss of heterozygosity: what is it good for? *BMC Med Genomics* 8:
79. Sadetzki S, Modan B, Chetrit A, Freedman L (2000) An iatrogenic epidemic of benign meningioma. *Am J Epidemiol* 151:266–272
80. Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O (2000) A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer* 88:440–453
81. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
82. Sen P, Luo J, Hada A, Hailu SG, Dechassa ML, Persinger J, Brahma S, Paul S, Ranish J, Bartholomew B (2017) Loss of Snf5 induces formation of an aberrant SWI/SNF complex. *Cell Rep* 18:2135–2147
83. Shintani T, Hayakawa N, Hoshi M, Sumida M, Kurisu K, Oki S, Kodama Y, Kajikawa H, Inai K, Kamada N (1999) High Incidence of Meningioma among Hiroshima Atomic Bomb Survivors. *Journal of Radiation Research* 40:49–57
84. Simone C (2006) SWI/SNF: The crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *Journal of Cellular Physiology* 207:309–314
85. Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22–39
86. Sioka C, Kyritsis AP (2009) Chemotherapy, hormonal therapy, and immunotherapy for recurrent meningiomas. *J Neurooncol* 92:1–6
87. Takeuchi T, Furihata M, Heng HHQ, Hiroshi Sonobe, Ohtsuki Y (1998) Chromosomal mapping and expression of the human B120 gene. *Gene* 213:189–193
88. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2018) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 46:D8–D13
89. The UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47:D506–D515
90. Theodorou M, Speletas M, Mamara A, Papachristopoulou G, Lazou V, Scorilas A, Katsantoni E (2013) Identification of a STAT5 Target Gene, Dpf3, Provides Novel Insights in Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One* 8:

91. Torres-Martín M, Kusak ME, Isla A, Burbano RR, Pinto GR, Melendez B, Castresana JS, Rey JA (2015) Whole exome sequencing in a case of sporadic multiple meningioma reveals shared NF2, FAM109B, and TPRXL mutations, together with unique SMARCB1 alterations in a subset of tumor nodules. *Cancer Genetics* 208:327–332
92. Tse JYM, Ng H-K, Lau K-M, Lo K-W, Poon W-S, Huang DP (1997) Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. *Human Pathology* 28:779–785
93. Tsutsui T, Miyashita K, Sabit H, Fukui I, Hayashi Y, Mizokami A, Ikeda H, Nagatani H, Nakada M (2016) Acute Progression of Recurrent Meningioma during Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist Treatment for Prostate Cancer. *World Neurosurgery* 91:670.e1-670.e6
94. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist P-H, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000117713-ARID1A>
95. van den Munckhof P, Christiaans I, Kenter SB, Baas F, Hulsebos TJM (2012) Germline SMARCB1 mutation predisposes to multiple meningiomas and schwannomas with preferential location of cranial meningiomas at the falx cerebri. *Neurogenetics* 13:1–7
96. Varlotto J, Flickinger J, Pavelic MT, Specht CS, Sheehan JM, Timek DT, Glantz MJ, Sogge S, Dimaio C, Moser R, Yunus S, Fitzgerald TJ, Upadhyay U, Rava P, Tangel M, Yao A, Kanekar S (2015) Distinguishing grade I meningioma from higher grade meningiomas without biopsy. *Oncotarget* 6:38421–38428
97. Versteeg I, Sévenet N, Lange J, Rousseau-Merck M-F, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394:203
98. Versteeg I, Medjkane S, Rouillard D, Delattre O (2002) A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene* 21:6403–6412
99. Wang W, Côté J, Xue Y, Zhou S, Khavari PA, Biggar SR, Muchardt C, Kalpana GV, Goff SP, Yaniv M, Workman JL, Crabtree GR (1996) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *The EMBO Journal* 15:5370–5382
100. Wang X, Nagl NG, Flowers S, Zweitzig D, Dallas PB, Moran E (2004) Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors. *International Journal of Cancer* 112:636–642
101. Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14719–14724
102. 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* 146:827–832
103. Wilsker D, Patsialou A, Zumbun SD, Kim S, Chen Y, Dallas PB, Moran E (2004) The DNA-binding properties of the ARID-containing subunits of yeast and mammalian SWI/SNF complexes. *Nucleic Acids Res* 32:1345–1353

104. Wilson BG, Roberts CWM (2011) SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nature Reviews Cancer* 11:481–492
105. World Health Organization (2016) WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th edition edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon
106. Wu JN, Roberts CWM (2013) ARID1A Mutations in Cancer: Another Epigenetic Tumor Suppressor? *Cancer Discov* 3:35–43
107. Zeng L, Zhang Q, Li S, Plotnikov AN, Walsh MJ, Zhou M-M (2010) Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* 466:258–262
108. Znayduk Y. (2015) Central Nervous System, Super Coloring. URL: <http://www.supercoloring.com/de/ausmalbilder/das-zentrale-nervensystem>

8 ANHANG

8.1 PROBENMATERIAL

Nummer	Material WB	Material LOH	Material Kontrolle LOH
1	/	FFPE	Blut
2	Nativ	Nativ	Blut
3	Nativ	Nativ	Blut
4	Nativ	Nativ	Blut
5	/	Nativ	Blut
6	Nativ	Nativ	Blut
7	Nativ	Nativ	Blut
8	Nativ	Nativ	Blut
9	Nativ	Nativ	Blut
10	Nativ	Nativ	Blut
11	Tragant	Nativ	Blut
12	Nativ	Nativ	Blut
13	Nativ	Nativ	Blut
14	Nativ	Nativ	Blut
15	/	Nativ	Blut
16	Nativ	Nativ	Blut
17	Nativ	Nativ	Blut
18	Tragant	Nativ	Blut
19	Nativ	Nativ	Blut
20	Nativ	Nativ	Blut
21	Nativ	Nativ	Blut
22	Nativ	Nativ	Blut
23	Nativ	Nativ	Blut
24	/	Nativ	Blut
25	/	Nativ	Blut
26	/	Nativ	Blut
27	Nativ	Nativ	Blut
28	Nativ	Nativ	Blut
29	/	Nativ	Blut
30	/	Nativ	Blut
31	/	Nativ	Blut
32	Nativ	Nativ	Blut
33	Tragant	Nativ	Blut
34	Tragant	Nativ	Blut
35	Nativ	Nativ	Blut
36	Nativ	Nativ	Blut
37	Nativ	Nativ	Blut
38	Nativ	Nativ	Blut
39	Nativ	Nativ	Blut
40	Nativ	Nativ	Blut
41	Nativ	FFPE	Blut
42	Nativ	Nativ	Blut

43	Nativ	Nativ	Blut
44	Nativ	Nativ	Blut
45	Nativ	Nativ	Blut
46	Nativ	Nativ	Blut
47	Nativ	Lysat	Pellet
48	Nativ	Lysat	Pellet
49	Nativ	Lysat	FFPE Meningen
50	Nativ	Lysat	Pellet
51	Nativ	Lysat	Pellet

Tabelle 15. Materialangaben der einzelnen Proben.

WB: Western Blot; FFPE: Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe; die grau unterlegten Felder bezeichnen die Proben, die von den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes mit bearbeitet wurden.

8.2 ERGEBNISTABELLEN

8.2.1 LOH

Nr.	D1S1608	D1S548	D1S1592	ARID1A	D1S1161	D1S1184	LOH Allgemein
1	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
2	+/+	ni	ni	+/+	+/+	+/+	/
3	ni	ni	ni	-/+	+/+	-/+	LOH
4	NA	ni	NA	+/+	+/+	+/+	/
5	+/+	+/+	NA	+/+	+/+	+/+	/
6	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	ni	/
7	+/+	+/+	ni	+/+	ni	+/+	/
8	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
9	ni	ni	ni	ni	+/+	ni	/
10	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
11	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
12	+/-	-/+	ni	-/+	-/+	+/-	LOH
13	+/+	+/+	+/+	ni	+/+	+/+	/
14	ni	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	/
15	-/+	+/-	+/-	-/+	-/+	ni	LOH
16	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
17	+/+	-/+	+/+	shift	shift	shift	LOH
18	-/+	+/-	-/+	+/-	+/-	-/+	LOH
19	+/-	-/+	ni	+/-	+/-	ni	LOH
20	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	/
21	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
22	+/+	+/+	ni	-/+	-/+	ni	LOH
23	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
24	+/+	+/+	ni	+/+	+/+	ni	/
25	+/+	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	/
26	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	/

27	ni	-/+	+/-	ni	+/-	+/+	LOH
28	-/+	-/+	-/+	+/-	+/-	ni	LOH
29	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	ni	/
30	ni	ni	-/+	+/-	-/+	+/+	LOH
31	+/+	ni	ni	+/+	+/+	+/+	/
32	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	LOH
33	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	/
34	+/+	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	/
35	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	/
36	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
37	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
38	ni	ni	ni	+/+	+/+	ni	/
39	+/+	+/+	ni	+/+	+/+	ni	/
40	-/+	+/-	+/-	+/-	ni	+/-	LOH
41	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	ni	/
42	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	/
43	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	ni	/
44	-/+	-/+	ni	+/-	+/-	-/+	LOH
45	+/+	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	/
46	+/+	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	/
47	-/+	ni	ni	+/-	+/-	-/+	LOH
48	-/+	ni	+/-	+/+	-/+	+/+	LOH
49	+/-	+/-	+/-	+/+	ni	+/-	LOH
50	ni	ni	+/+	+/+	+/+	+/+	/
51	+/-	ni	-/+	+/-	+/-	-/+	LOH

Tabelle 16. Ergebnisse der PCR-gestützten Mikrosatelliten-Analyse des Chromosoms 1p auf sechs Sonden, sowie eine Aussage zum allgemeinen LOH-Status des Chromosoms

+/+: beide Allele sind detektierbar, -/+: Verlust des kürzeren Allels, +/-: Verlust des größeren Allels, ni: homozygot/ nicht interpretierbar, shift: ein Allel zeigt eine Verschiebung in der Größe, NA: nicht auswertbar, LOH allgemein: Loss of heterozygosity auf mindestens einer der Sonden auf dem Chromosom 1p

8.2.2 WESTERN BLOT ERGEBNISSE

Nr.	2	3	4	6	7	8	9
ARID1A							
alpha-Tubulin							

Nr.	10	11	12	13	14	16	17
ARID1A							

alpha-Tubulin							
---------------	--	--	--	--	--	--	--

Nr.	18	19	20	21	22	23	27
ARID1A							
alpha-Tubulin							

Nr.	28	32	33	34	35	36	37
ARID1A							
alpha-Tubulin							

Nr.	38	39	40	41	42	43	44
ARID1A							
alpha-Tubulin							

Nr.	45	46	47	48	49	50	51
ARID1A							
alpha-Tubulin							

Tabelle 17. Darstellung aller Banden im Western Blot in der Färbung mit Anti-ARID1A (ab176395, Abcam, 1:1000) und Anti-alpha-Tubulin (ab7291, Abcam, 1:10.000).

8.2.3 REGRESSIONSANALYSEN

8.2.3.1 BINÄR LOGISTISCHE REGRESSION

Abhängige Variable	D1S1608	D1S548	D1S1592	D1S1161	D1S1184
ARID1A	135*** [10,99;1657,4]	76,000** [6,002;962,319]	5654161953,815**** [,000,..]	27,133*** [4,662;157,923]	14,670** [2,418;88,988]

Tabelle 18. Binär Logistische Regression der abhängigen Variable ARID1A mit den bereits etablierten Sonden der Chromosenteilanalyse 1p.

*p<.05, **p<.01, ***p<.001, ****n.s.

Abhängige Variable	Alter	Geschlecht	Geschlecht umkodiert	WHO	Lokalisation	Ki67
ARID1A	,993**** [,95;1,04]	,391**** [,144;2,14]	1,806**** [,468;6,97]	2,138**** [,6;8,2]	750042093,115**** [,0;.]	0,019**** [,00;1802051360,28]
LOHallg	,986**** [,947;1,0]	0,37**** [,104;1,32]	2,7**** [,755;9,65]	4,103**** [,95;17,8]	1056272248,756**** * [,0;.]	0,0**** [,000;13267831,93]

Tabelle 19. Binär Logistische Regression der abhängigen Variable ARID1A und LOH allgemein.

Die Lokalisation ist nach zerebral oder spinal definiert. *p<.05, **p<.01, ***p<.001, ****n.s.

Abhängige Variable	Alter	Geschlecht	WHO	Lokalisation
D1S1592	,977**** [,928; 1,027]	,824**** [,159; 4,253]	6,179* [1,014; 37,642]	,918**** [,746; 1,129]

Tabelle 20. Binär Logistische Regression der abhängigen Variable D1S1592 mit klinischen Parametern

Die Lokalisation ist nach zerebral oder spinal definiert. *p<.05, **p<.01, ***p<.001, ****n.s.

Abhängige Variable	WB100	LOHallg	ARID1A	Alter	Geschlecht	WHO	Lokalisation
WB 250	6,133* [1,462; 25,727]	1,618**** [,405;6,47]	1,263**** [,269;5,927]	1,013**** [,967;1,061]	1,200**** [,284;5,069]	4,071**** [,491;33,773]	3,545**** [,518;24,258]
WB 100	/	,327**** [,084;1,27]	,480**** [,113;2,031]	1,005**** [,958;1,053]	4,114**** [,960;17,630]	,557**** [,146;2,129]	1,576**** [,230;10,781]

Tabelle 21. Binär Logistische Regression der qualitativen Analyse der Banden im Western Blot.

Die Lokalisation ist nach zerebral oder spinal definiert. *p<.05, **p<.01, ***p<.001, ****n.s.

8.2.3.2 LINEARE REGRESSION

Abhängige Variable	Bande bei 100 kDa	Bande bei 250 kDa	Alter	Geschlecht	WHO	Lokalisation	Ki67
ImageJ 250	-,092**** [-,74; ,554]	-,522**** [-1,3; ,29]	0,002**** [-,027; ,030]	-,666**** [-1,53; ,19]	-,052**** [-,89; ,79]	,285**** [-,017; ,149]	,575**** [-17,7; 18,8]
ImageJ 100	,048**** [-,61; ,71]	-,682**** [-1,5; ,13]	-,002**** [-,024; ,020]	-0,779* [-1,4; -,132]	,032**** [-,62; ,69]	-,003**** [-,945; ,938]	8,071**** [-2,6; 18,64]

Tabelle 22. Lineare Regression der quantitativen Analyse der Banden des Western Blots.

Die Lokalisation ist nach zerebral oder spinal definiert. *p<.05, **p<.01, ***p<.001, ****n.s.

Abhängige Variable	ARID1A	LOH allgemein
ImageJ 250	0,892* [0,004;1,780]	0,627**** [-,163;1,416]
ImageJ 100	0,2**** [-,501;902]	0,497**** [-,119;1,113]

Tabelle 23. Lineare Regression der quantitativen Analyse der Banden des Western Blots mit den Daten der LOH-Analysen als unabhängige Variable.

*p<.05, **p<.01, ***p<.001, ****n.s.

8.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Häufig auftretende Chromosomenteilverluste und -Gewinne in Meningeomen nach Bi <i>et al.</i> [7].	11
Abbildung 2. Häufige Lokalisationen von Meningeomen: Intrakranial, intraorbital und spinal. Innerhalb der intrakranialen Verteilung finden sich die Meningeome besonders an der Falx, Konvexität und frontal im Olfactoriusgebiet oder suprasellär. Die Abbildung nach Znayduk wurde weiter modifiziert [108].	14
Abbildung 3. Fließschema der Chromosomenaberrationen bei Meningeomen in chronologischer Reihenfolge nach Ketter <i>et al.</i> [44].	21
Abbildung 4. Chromosom 22, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].	22
Abbildung 5. Chromosom 1, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].	23
Abbildung 6. Chromosom 14, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].	24
Abbildung 7. Modell über Chromosomenaberrationen in Meningeomen nach Weber <i>et al.</i> . Diese wurden hier ab einer Auftrittshäufigkeit von 30% aufgenommen. Die dünneren Pfeile stehen hier für die Alterationen in niedriggradigen Meningeomen mit einer Auftrittshäufigkeit von < 30%	25
Abbildung 8. Wirkungsweise der ATP-abhängigen Remodeling-Komplexe nach Clapier und Cairns <i>et al.</i> [15].	27
Abbildung 9. Überblick der Funktionen des BAF47/ SNF5/ INI1/ SMARCB1	29
Abbildung 10. Mögliche Pathogenese der Meningeomentstehung nach Torres-Martín <i>et al.</i> [91]	31
Abbildung 11. Übersicht der Steuerung der Expression verschiedener Proteine und Signalwege über ARID1A.	32
Abbildung 12. Modulation des Histons H3 über eine Acetylierung und Methylierung durch DPF3b nach Zeng <i>et al.</i> [107]	34
Abbildung 13. Kurzer Arm 1p des Chromosoms 1 - Hervorgehoben sind die Abschnitte, die in der LOH-Analyse nachgewiesen wurden, erstellt in der Genome Decoration Page des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [88].	47
Abbildung 14. Altersverteilung der 49 Meningeompatienten.	55
Abbildung 15. Verteilung der untersuchten Meningeome nach WHO-Grad und histopathologischer Untergruppe	57
Abbildung 16. Prozentuale Häufigkeit der Lokalisationen, n = 51.	58
Abbildung 17. Klassifizierung der Ergebnisse der LOH-Analyse	60
Abbildung 18. Auftrennung der untersuchten Sonden nach den möglichen Ausprägungen	61
Abbildung 19. Anordnung der Meningeomproben nach Anzahl betroffener Sonden in der LOH-Analyse	63
Abbildung 20. Polymorphismen des Mikrosatelliten auf 1p36.11	64
Abbildung 21. Histologische Untergruppen nach WHO-Klassifikation nach anteiligem LOH-Status	66
Abbildung 22. Histologie in HE-Färbung und Status der ARID1A-Sonde der Fallnummern 6, 36, 44 und 45, die multiple Läsionen aufwiesen.	67

Abbildung 23. Western Blot mit dem Antikörper Anti-ARID1A (ab176395, Abcam, 1:1000)	68
Abbildung 24. Nachweis der Spezifität der ARID1A-Banden durch den Antikörper Anti-ARID1A (ab176395, Abcam, 1:1000)	69
Abbildung 25. Ergebnis der Auswertung der Bande bei 250 kDa, weiter aufgetrennt nach dem Ergebnis der 100 kDa Bande	70
Abbildung 26. Häufigkeitsverteilung der ImageJ-Messung der Bande auf Höhe von 100 kDa	71
Abbildung 27. Western Blot-Analyse mit dem Antikörpern Anti-DPF3 (ab85360, Abcam, 1:1000) und Anti-alpha-Tubulin (ab7291, Abcam, 1:10.000).	73
Abbildung 28. Western Blot gefärbt mit den Antikörpern Anti-DPF3 (ab85360, Abcam, 1:1000) (A, C) und Anti-alpha-Tubulin (ab7291, Abcam, 1:10.000) (B, D) an Meningeomproben geblockt in 0,2%igen Casein (A, B) und 5%igen Ziegen Serum (X0907, Dako) (C, D)	74
Abbildung 29. Signale der Färbung mit dem Anti-DPF3-Antikörper (ab85360, Abcam, 1:1000) und Anti-alpha-Tubulin-Antikörper (ab7291, Abcam, 1:10.000) von unbehandelten Zelllysaten und Lysaten nach der Aufkonzentrierung durch eine Trichloressigsäurefällung.....	75
Abbildung 30. Repräsentative Western Blots gefärbt mit Anti-SNF5/SMARCB1 (ab126734, Abcam, 1:1000) an Meningeomproben (A: 1-2, B: 1-3), sowie MGTW3-Zelllysate als Kontrolle (A: 3, B: 4).....	76
Abbildung 31. Repräsentative Beispiele für die immunhistochemische Färbung von Tumorpräparaten mit einem primären Antikörper „ARID1A (PSG3)“ (sc-32761, SantaCruz, 1:100) und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (K5007, Agilent/ Dako, unverdünnt) in 220-facher Vergrößerung.	77
Abbildung 32. Ergebnis der gewebeunspecifischen Alkalischen Phosphatase Färbung aufgetrennt nach dem LOH-Status auf dem Chromosom 1p	79
Abbildung 33. Zusammenhang des WHO-Grades und des Proliferationsmarkers Ki67 (n = 36) der Meningeome des WHO-Grades I und II. Verwendet wurde eine lineare Regressionsanalyse (p < 0,01).	80

8.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. WHO-Gradierung der histologischen Subtypen von Meningeomen in absteigender Häufigkeit nach dem CBTRUS [69,105].....	13
Tabelle 2. Häufige Lokalisationen und daraus resultierende Klinik von Meningeomen nach Grossmann <i>et al.</i> [28].....	15
Tabelle 3. Einteilung nach Simpson der Rezidivrate von Meningeomen nach operativer Entfernung [85].....	17
Tabelle 4. Antikörper	37
Tabelle 5. Mikrosatelliten Chromosom 1p	38
Tabelle 6. Genutzte Materialien	40
Tabelle 7. Genutzte Geräte, Apparaturen und Software.....	43
Tabelle 8. Übersicht der Patienten.....	45
Tabelle 9. Ablauf und Zeiten der Polymerase-Kettenreaktion	47
Tabelle 10. Rehydrierung/ Absteigende Alkoholreihe	51
Tabelle 11. Dehydrierung/ Aufsteigende Alkoholreihe	52
Tabelle 12. Epidemiologische Analyse der Altersverteilung von 49 Meningeompatienten unter den Geschlechtern in Jahren	56
Tabelle 13. Eigenschaften der Meningeompatienten, die mindestens ein Rezidiv zeigten.....	59
Tabelle 14. Vergleich der Messungen der Intensität der Banden nach dem LOH-Status	72
Tabelle 15. Materialangaben der einzelnen Proben.....	107
Tabelle 16. Ergebnisse der PCR-gestützten Mikrosatteliten-Analyse des Chromosoms 1p auf sechs Sonden, sowie eine Aussage zum allgemeinen LOH-Status des Chromosoms	108
Tabelle 17. Darstellung aller Banden im Western Blot in der Färbung mit Anti-ARID1A (ab176395, Abcam, 1:1000) und Anti-alpha-Tubulin (ab7291, Abcam, 1:10.000).....	109
Tabelle 18. Binär Logistische Regression der abhängigen Variable ARID1A mit den bereits etablierten Sonden der Chromsomenteilanalyse 1p.....	109
Tabelle 19. Binär Logistische Regression der abhängigen Variable ARID1A und LOH allgemein. .	110
Tabelle 20. Binär Logistische Regression der abhängigen Variable D1S1592 mit klinischen Parametern	110
Tabelle 21. Binär Logistische Regression der qualitativen Analyse der Banden im Western Blot. ...	110
Tabelle 22. Lineare Regression der quantitativen Analyse der Banden des Western Blots	110
Tabelle 23. Lineare Regression der quantitativen Analyse der Banden des Western Blots mit den Daten der LOH-Analysen als unabhängige Variable.....	111

8.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Begriff
AP	Alkalische Phosphatase (Gewebe-unspezifisch)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ARID	AT-rich DNA-interacting domain
ATP	Adenosintriphosphat
BAF	Brahma (gene) (BRM) or BRG1 associated factors
BRG1	BRM/SWI2- related gen 1
BRM	Brahma Homologue
CDK	Cyclin abhängige Kinase
Cer-d4	Cerebellum- d4-Familie
CHD	Chromodomain, helicase, DNA binding
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DBP	DNA-bindendes Protein
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DPF1-3	Double PHD Fingers 3
E2F	Familie von Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten
EMA	Epitheliales Membran Antigen
Gy	Gray
HPF	Hauptgesichtsfeld (High power field)
HSPB7	heat shock protein family B (small) member 7
IDH	Isocitratdehydrogenase
INO80	Inositol requiring 80
ISWI	Imitation switch
Ki67	„Kiel“ 67, Antigen zur Markierung sich teilender Zellen
LOH	Loss of Heterozygosity
Merlin	Moesin-Ezrin-Radixin like protein
MRT	Magnetresonanztomographie
NaOH	Natriumhydroxid
Neuro-d4	Neuronales Gewebe- d4-Familie
<i>NF2</i>	Neurofibromatose-Gen-2
OSA1	Gen der Drosophila, Synonym für <i>ARID1A</i>
p16	Protein mit einem Molekulargewicht von 16 kDa
p21	Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa
p270	Protein mit einem Molekulargewicht von 270 kDa
p53	Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa
PBAF	Polybromo BRG1-associated factor
PCR	Polymerase chain reaction
PHD	Plant Homodomain
PHF10	PHD finger protein 10
PR	Progesteronrezeptor
PRC2	polycomb repressive complex 2
RIPA-Puffer	Radio Immuno Precipitation Assay - Puffer
RUNX3	RUNX family transcription factor 3
S100	Proteinfamilie S100
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>SMARCB1</i>	SWI (mating-type switching)/SNF-related matrix associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1
<i>SMARCF1</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily f, member 1

SNF	Sucrose-Non-Fermenter
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
SWI/SNF	Mating-type switching / Sucrose Non-Fermenter
SWI1	Mating-type switching 1
SWR1	SWi2/sNF2-Related 1
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TP73	tumor protein p73
Ubi-d4	Ubiquitär vorkommendes Protein der d4-Familie
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	Zum Beispiel

9 PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden unter folgendem Titel zeitnah zur Veröffentlichung eingereicht.

Titel:

Microsatellite D1S1096 located on 1p36.11 reliably reflects loss of heterozygosity (LOH) on 1p in meningiomas of various grades

Autoren:

Katrin Bartelmei, Dr. rer. nat. Julia Becker-Kettern, Dr. med. vet. Wiebke Jürgens-Wemheuer, Dr. med. Arne Wrede, Prof. Dr. med. Ralf Ketter, Prof. Dr. med. Walter Schulz-Schaeffer

10 DANK

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer, Chefarzt der Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Überlassung dieses Promotionsthemas und die Bereitstellung der Ressourcen seiner Abteilung. Ich bin sehr dankbar für die fachliche Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge über das gesamte Projekt hinweg.

Ein großer Dank gebührt meinen Mitbetreuerinnen. Ich danke explizit Frau Dr. rer. nat. Julia Kettern für die fachliche und persönliche Unterstützung bei meiner Arbeit. In ihr hatte ich immer eine Ansprechpartnerin. Vielen Dank für die unzähligen Korrekturen, die herausragend waren und mich so viel weiter gebracht haben. Vielen Dank auch an Frau Dr. med. vet. Wiebke Jürgens-Wemheuer, die mich besonders bei den methodischen und organisatorischen Fragestellungen meiner Arbeit stark unterstützt hat.

Ich danke weiter Herrn Dr. med. Arne Wrede, Oberarzt der Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für das Ausleihen seiner Ausgabe der „WHO classification of tumours of the central nervous system“ und darüber hinaus für die vielen wichtigen Gespräche im Institut in dieser Zeit.

Den Mitarbeitern des Labors des Institut für Neuropathologie danke ich herzlich für die fachliche Hilfe und dass ich bereits gefärbte Fälle und bereits isolierte DNA-Proben für meine Studie nutzen durfte. Ich danke besonders Frau Margit Huth für die Hilfe beim Schneiden meiner Meningeomfälle am Mikrotom und dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Erneut danke ich der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Riemschneider der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes für die hilfreichen Ratschläge bezüglich der Durchführung des Western Blots und der Bereitstellung der Coomassie-Färbelösung und Coomassie-Entfärbelösung. Weiter danke ich der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Fassbender der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes für den Anti-alpha-Tubulin Antikörper der Firma Abcam, das Kontrolllysat (MGTW3-Zellysat) für den Western Blot, die Schwämme für den Wet-Blot und Trockeneis und darüber hinaus die Hilfe bei der Fehlersuche bei meinem Western Blot. All dies hat mir sehr viel geholfen.

Ich danke hiermit auch für die Biometrische Beratung des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik des Universitätsklinikums des Saarlandes für die Einarbeitung in die statistische Auswertung medizinischer Daten.

Es sei an alle diejenigen ein Dank ausgesprochen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, hier jedoch namentlich keine Erwähnung finden.

Schlussendlich danke ich meiner Familie von ganzen Herzen für die Hilfe und Unterstützung in dieser Zeit. Ich danke meiner Mutter sehr für die guten Korrekturen und das scheinbar endlose Lesen meiner Texte. Meinem Vater danke ich für die große Unterstützung bei der Statistik und der Darstellung meiner Ergebnisse. Vielen Dank an meine Eltern und meine Schwester Anja, dass ihr immer für mich da seid und ich mich immer an euch wenden konnte. Das bedeutet mir so viel und ich bin so dankbar für euch als meine Familie.

Als letztes möchte ich mich bei meinem Partner Hendrik bedanken. Vielen herzlichen Dank, dass du so eine Bereicherung für mich bist und mir bei dieser Arbeit solch fachliche und gute Hilfe leisten konntest. Ich danke dir von ganzen Herzen für deinen Beistand während dieser Arbeit. Ich bin sehr dankbar, dass ich dich an meiner Seite habe.

11 LEBENSLAUF

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.