

Aus dem Bereich
Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**GEN- UND PROTEINEXPRESSION VON
CYCLIN D1 UND VEGF IN MENINGEOMEN –
KORRELATION MIT DER HISTOPATHOLOGIE**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von LISANNE D. S. WIEDEMANN

Tag der Promotion:

18. April 2024

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Yoo-Jin Kim
Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle
Prof. Dr. rer. nat Steffi Urbschat

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	9
Summary	12
Kapitel 1 Einleitung	15
A. Die Meningen des Menschen	15
B. Meningeome	17
I. Epidemiologie und Ätiologie	17
II. Klinik und Therapie.....	18
III. Histologische Graduierung und immunhistochemische Eigenschaften.....	18
IV. Onkogenese	20
C. Cyclin D1 – der Zellzyklusregulator	22
I. Cyclin D1 und seine Funktionen	22
II. Cyclin D1 und Neoplasie.....	23
III. Cyclin D1 und Angiogenese.....	24
IV. Cyclin D1 und Meningeome	24
D. VEGF – Schlüsselfigur der Angiogenese	25
I. Die VEGF-Familie	25
II. Angiogenese und Funktion von VEGF	25
III. Tumorangiogenese und VEGF.....	27
IV. Antiangiogenetische Therapien	27
V. VEGF und Meningeome.....	28
E. Intratumorale Mikrogefäßdichte (MVD)	30
I. Quantifizierung der Angiogenese in Tumoren	30
II. Intratumorale Mikrogefäßdichte (MVD) in Meningeomen.....	30
F. Ziele der Arbeit	32
Kapitel 2 Material und Methoden	35
A. Material	35
I. Gerätschaften.....	35
II. Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel.....	36
III. Substanzen.....	36
IV. Pufferlösungen.....	37
V. Kits	38
VI. Primer für die Genexpressionsanalyse	38
VII. Antikörper für die Immunhistochemie	39
VIII. Gewebeproben.....	39

B. Methoden.....	42
I. Genexpressionsanalyse mittels Taqman Real-Time PCR	42
1. Prinzip	42
2. Durchführung	43
a) Isolierung der RNA	
Aufreinigung der RNA;	43
b) DNase-Verdau, Ethanol-Fällung und Bestimmung der RNA-Konzentration:	43
c) Synthese von cDNA	44
d) Quantitative Real-Time-PCR mittels Taqman	45
e) Auswahl des Haushaltsgens (<i>housekeeping gene</i>).....	45
f) Auswertung der Taqman Real-Time PCR.....	46
II. Immunhistochemie	47
1. Prinzip	47
2. Durchführung	49
a) Protokoll	49
b) Auswertung der Immunreaktivität von Cyclin D1 und VEGF.....	52
c) Auswertung der MVD	53
III. Statistische Auswertung	53
 Kapitel 3 Ergebnisse.....	 54
 A. Quantitative Genexpressionsanalyse	 54
I. Expression von Cyclin D1	54
II. Expression von VEGF.....	60
 B. Immunhistochemische Untersuchungen	 65
I. Ki67-Index.....	65
II. Expression von Cyclin D1	67
III. Expression von VEGF.....	74
IV. Auswertung der intratumoralen Mikrogefäßdichte (MVD)	83
 Kapitel 4 Diskussion.....	 89
 A. Vorbemerkung.....	 89
 B. Beurteilung der Ergebnisse	 92
I. Cyclin D1	92
II. VEGF.....	94
III. MVD.....	97
 C. Limitationen und methodische Einschränkungen.....	 100
 D. Ausblick.....	 102
 Literaturverzeichnis	 105
Publikationen.....	111
Danksagung.....	112
Lebenslauf	113
Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes vom 9. November 2006.....	114

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Hirnhäute des Menschen, Frontalschnitt auf Höhe des Scheitels. Aquarellzeichnung der Verfasserin
Abbildung 2	Verteilung der Gewebeproben auf die histologischen Subtypen
Abbildung 3	Prinzip der Taqman-Real-Time-PCR
Abbildung 4	Prinzip der indirekten, immunhistochemischen Färbung mithilfe der Polymerkonjugat-Methode
Abbildung 5	Cyclin D1 – gemittelte Ct-Werte und WHO-Grade
Abbildung 6	Cyclin D1 – Δ -Ct-Werte und WHO-Grade
Abbildung 7	Cyclin D1 (Δ -Ct-Werte) und histologische Subtypen der Meningeome
Abbildung 8	VEGF – gemittelte Ct-Werte und WHO-Grade
Abbildung 9	VEGF – Δ -Ct-Werte und WHO-Grade
Abbildung 10	VEGF – Δ -Ct-Werte und histologische Subtypen der Meningeome
Abbildung 11	Ki67-Index und WHO-Grade
Abbildung 12	Ki67-Index und histologische Subtypen der Meningeome
Abbildung 13	Cyclin D1-Färbung mit unterschiedlicher Färbeintensität und unterschiedlicher Anzahl positiver Zellen
Abbildung 14	Cyclin D1-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die verschiedenen WHO-Grade
Abbildung 15	Cyclin D1-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die histologischen Subtypen
Abbildung 16	VEGF-Färbung mit unterschiedlicher Färbeintensität und unterschiedlicher Anzahl positiver Zellen, Vergleich zweier Meningeome des gleichen WHO-Grads
Abbildung 17	VEGF-Färbung eines atypischen Meningeoms (WHO-Grad II)
Abbildung 18	Cytoplasmatische VEGF-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die verschiedenen WHO-Grade
Abbildung 19	Cytoplasmatische VEGF-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die verschiedenen histologischen Subtypen
Abbildung 20	CD31-Färbung mit unterschiedlicher MVD
Abbildung 21	MVD mit Verteilung auf die verschiedenen WHO-Grade
Abbildung 22	MVD mit Verteilung auf die verschiedenen histologischen Subtypen

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Einteilung der Meningeome anhand der WHO-Klassifikation
Tabelle 2	Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper
Tabelle 3	Verteilung der Gewebeprobe bezogen auf die verschiedenen WHO-Grade für die qRT-PCR
Tabelle 4	Charakterisierung der Gewebeprobe bezogen auf die verschiedenen WHO-Grade für die Immunhistochemie
Tabelle 5	IRS – Bewertung der Färbeintensität und des Anteils positiver Zellen
Tabelle 6	Interpretation des IRS
Tabelle 7	Statistische Auswertung der Cyclin D1-Expression bezogen auf die verschiedenen WHO-Grade und weitere Parameter
Tabelle 8	Statistische Auswertung der Cyclin D1-Expression anhand der Δ -Ct-Werte zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen
Tabelle 9	Statistische Auswertung der VEGF-Expression bezogen auf die verschiedenen WHO-Grade und weitere Parameter
Tabelle 10	Statistische Auswertung der VEGF-Expression anhand der Δ -Ct-Werte und histologischen Subtypen
Tabelle 11	Anzahl der positiven Zellen und Färbeintensität für Cyclin D1 bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome
Tabelle 12	Häufigkeiten des IRS für Cyclin D1 bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome
Tabelle 13	Statistische Auswertung der Cyclin D1-Expression anhand des IRS mit Bezug auf die verschiedenen WHO-Grade und weitere Parameter
Tabelle 14	Statistische Auswertung der Cyclin D1-Expression anhand des IRS und der histologischen Subtypen der Meningeome
Tabelle 15	Anzahl der (cytoplasmatisch) positiven Zellen und der cytoplasmatischen Färbeintensität für VEGF bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome
Tabelle 16	Häufigkeiten des IRS für VEGF (cytoplasmatisch) bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome
Tabelle 17	Statistische Auswertung der cytoplasmatischen und nukleären VEGF-Expression anhand des IRS mit Bezug zu den verschiedenen WHO-Graden und weiterer Parameter
Tabelle 18	Statistische Auswertung der cytoplasmatischen VEGF-Expression anhand des IRS und der verschiedenen histologischen Subtypen der Meningeome
Tabelle 19	Statistische Auswertung der MVD mit Bezug zu den verschiedenen WHO-Graden und weiterer Parameter
Tabelle 20	Statistische Auswertung der MVD bezogen auf die verschiedenen histologischen Subtypen von Meningeomen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
bFGF	basic fibroblast growth factor
CCND1	Cyclin D1
CD31	cluster of differentiation 31
CD34	cluster of differentiation 34
CDI	cyclin dependent kinase inhibitor
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
Ct	Threshold cycle
DAB	Diaminobenzidine
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EMA	epithelial membrane antigen
ER α	estrogen receptor alpha
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HPF	high power field
HRP	horseraddish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IgG	Immunglobulin G
IRS	Immunreaktiver Score
min	Minute
MMP-9	Matrix-Metallopeptidase 9
mRNA	messenger RNA
MVD	microvessel density (Mikrogefäßdichte)
NF2	Neurofibromatose Typ 2
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PHH3	Phosphohiston-H3
PIGF	placenta growth factor
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
Rb	Retinoblastom
RNA	ribonucleic acid
sek	Sekunde
TERT	telomerase reverse transcriptase
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TVA	total vascular area
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-R	vascular endothelial growth factor receptor
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organization

ZUSAMMENFASSUNG

Meningeome gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren des Menschen. In der Mehrheit der Fälle sind sie benigne und können durch vollständige chirurgische Resektion geheilt werden. Ein kleiner Anteil jedoch zeigt einen malignen Phänotyp, eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit und schlechtere Prognose. (FATHI, ROELCKE, 2013; WIEMELS et al., 2010)

Die Graduierung der Meningeome erfolgt anhand der dreistufigen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO). Gemeinsam mit der Vollständigkeit der chirurgischen Resektion bildet der WHO-Grad den wichtigsten Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf. (MAWRIN et al., 2015; ROCKHILL et al., 2007)

Die Überexpression von Cyclin D1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung und wurde in einer Reihe von Neoplasien beschrieben. (DONNELLAN, CHETTY, 1998)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) erfüllt eine Schlüsselfunktion in der Tumorangiogenese und damit in der Progression maligner Tumore. Gleichzeitig stellen Cyclin D1- und VEGF-Expression potenzielle Ansatzpunkte für Therapien dar. (HARRIS, 1997; LOCOPO et al., 1998) Beide werden allgemein mit höherem Tumorgrad und schlechter Prognose in Verbindung gebracht. Obgleich ihrer wichtigen Rolle als Stellgrößen in Zellzyklus und Angiogenese ist über ihre nähere Bedeutung in Meningeomen wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war deshalb, anhand der systematischen Evaluation der Expression von Cyclin D1 und VEGF in 112 Meningeomen sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene, Einblick in die Wirkung beider Faktoren auf die Zellzyklusderegulation und Tumorangiogenese bei Meningeomen zu erlangen. Es erfolgte die Erfassung etwaiger Unterschiede zwischen den verschiedenen WHO-Graden und histologischen Subtypen. Besonderes Augenmerk galt dabei den Zusammenhängen von Gen- und Proteinexpression und histologischem Erscheinungsbild. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der qRT-PCR sowie Immunhistochemie und semiquantitativer Auswertung anhand des Immunreaktiven Scores (IRS). (REMMELE, STEGNER, 1987)

Weiterhin sollte analysiert werden, ob die VEGF-Expression in Zusammenhang mit der Mikrovaskularisation der Meningeome steht. Hierzu erfolgte die immunhistochemische Färbung der Endothelien der Mikrogefäße mittels CD31 und darauffolgender lichtmikroskopischer Quantifizierung der intratumoralen Mikrogefäßdichte (MVD). (WEIDNER, 2008)

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Cyclin D1-Expression zwischen den einzelnen WHO-Graden in Meningeomen unterscheidet und eine Korrelation von Malignitätsgrad und Cyclin D1-Expression besteht ($p=0.001$). Höhergradige Meningeome zeigten dabei eine höhere Cyclin D1-Expression ($p=0.0001$). Die Ergebnisse auf mRNA- und Proteinebene waren kongruent ($p=0.0001$), wobei der IRS sich als probates Mittel zur immunhistochemischen Bestimmung der Cyclin D1-Expression erwies. Die VEGF-Expression variierte nicht statistisch signifikant zwischen den WHO-Graden und zeigte eher einen leichten Trend in Richtung geringerer Expression in Meningeomen des WHO-Grads III ($p=0.304$).

Transitionale Meningeome zeigten eine statistisch signifikant niedrigere Expression von Cyclin D1 als atypische Meningeome auf Gen- ($p=0.025$) und Proteinebene ($p=0.0001$). Auf Proteinebene zeigten transitionale Meningeome eine niedrigere Cyclin D1-Expression als fibröse ($p=0.0004$) und meningotheliale Meningeome ($p=0.009$).

Eine Assoziation von Cyclin D1- und VEGF-Expression konnte auf mRNA-Ebene beobachtet werden ($p=0.000004$).

Ein Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und MVD bestand nicht. Auch zeigte die MVD keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den WHO-Graden ($p=0.99$).

Fibröse Meningeome zeigten auf mRNA-Ebene eine niedrigere Expression von VEGF als meningotheliale Meningeome ($p=0.011$). Die Mikrogefäßdichte (Microvessel Density, MVD) war in fibrösen Meningeomen niedriger als in meningothelialen Meningeomen, dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0.027$).

Auf Proteinebene unterschied sich die Expression von VEGF zwischen fibrösen und atypischen Meningeomen statistisch signifikant ($p=0.025$), wobei sie höher in

atypischen war. Auch in Bezug auf die MVD war ein solcher Unterschied zu beobachten ($p=0.010$).

Zusammenfassend tragen die Resultate der vorliegenden Arbeit zu einem besseren Verständnis der Deregulation des Zellzyklus und Tumorangiogenese anhand der Cyclin D1- und VEGF-Expression in Meningeomen sowie der Charakterisierung derselben zwischen den verschiedenen Tumorgraden bei.

Sie erlaubt Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Malignitätsgrad und Cyclin D1-Expression, welche sich in statistischer Signifikanz auf mRNA- und Proteinebene widerspiegeln. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der IRS sich als Werkzeug zur standardisierten Erhebung der Cyclin D1-Expression in Meningeomen eignet. In Hinblick auf die VEGF-Expression und die WHO-Grade konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis beobachtet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt außerdem, dass sich Unterschiede in der Expression von Cyclin D1 und VEGF in den verschiedenen Phänotypen der Meningeome widerspiegeln. Insbesondere fibröse Meningeome scheinen dabei anderen molekularen Grundlagen zu unterliegen als etwa meningotheliale. Ferner zeigte sich, dass Cyclin D1 anhand des IRS Potential besitzt, um in Grenzfällen die nicht immer einfache Diagnosefindung zwischen transitionalen bzw. fibrösen und atypischen Meningeomen, und damit WHO-Grad I und II, zu erleichtern.

Die zudem auf mRNA-Ebene beobachtete Assoziation von Cyclin D1- und VEGF-Expression kann von besonderem Interesse im Hinblick auf targeted therapies sein.

SUMMARY

Meningiomas are among the most common primary intracranial neoplasms in humans. In the majority of cases they are benign and can be cured by surgical resection. However, a small proportion of cases show a malignant phenotype and are linked to high recurrence rates and poorer prognosis. (FATHI, ROELCKE, 2013; WIEMELS et al., 2010)

The grading of meningiomas follows the three-grade World Health Organization (WHO) classification. Together with the extent of surgical resection, the WHO grade is the most essential prognostic factor for patient outcome. (MAWRIN et al., 2015; ROCKHILL et al., 2007)

Overexpression of Cyclin D1 plays an important role in cancer development and has been reported in a variety of neoplasms. (DONNELLAN, CHETTY, 1998)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) has a key function in tumorangiogenesis and thereby in the progression of malignant tumors. At the same time expression of Cyclin D1 and VEGF represents a potential therapeutic target. (HARRIS, 1997; LOCOPO et al., 1998) Furthermore, as important variables in cell cycle and angiogenesis, they are both associated with higher tumor grade and poorer prognosis, however, little is known about their significance in meningioma.

The purpose of this study was therefore to gain insight in the nature of cell cycle deregulation and tumor angiogenesis in meningioma by evaluating the expression of Cyclin D1 and VEGF in 112 meningiomas on mRNA as well as on protein level. Possible differences between the WHO grades and histological subtypes were aimed to be revealed. Special emphasis was directed towards the relationship of gene and protein expression and morphologic appearance. Quantification was performed by qRT-PCR and immunohistochemistry with semiquantitative evaluation by an immunoreactive score (IRS). (REMMELE, STEGNER, 1987)

In addition it was investigated whether there is a correlation between VEGF expression and microvascularisation of meningiomas. For this purpose, microvessel density (MVD) was measured by light microscopy in a single neovascular hotspot after the endothelial cells of microvessels were immunostained for CD31. (WEIDNER, 2008)

In the present study, expression of Cyclin D1 is shown to differ among the WHO grades in meningioma and to correlate with malignancy grade. High grade meningiomas show a higher Cyclin D1 expression ($p=0.001$). The results on mRNA and protein level were consistent ($p=0.0001$) and IRS proved to be an effective tool for the immunohistochemical evaluation of Cyclin D1 expression.

Expression of VEGF showed no statistical significant variation among the WHO grades ($p=0.304$). There was rather a slight tendency towards lower expression in meningiomas of WHO grade III.

In transitional meningioma expression of Cyclin D1 was lower than in atypical meningioma, both on gene ($p=0.025$) and protein level ($p=0.0001$). On protein level Cyclin D1 expression was shown to be lower in transitional meningioma compared to fibrous ($p=0.0004$) and meningothelial meningioma ($p=0.009$).

On mRNA level a relationship of Cyclin D1 and VEGF expression was observed ($p=0.000004$). There was no correlation of VEGF expression and MVD. Furthermore, MVD showed no statistical significant differences among WHO grades ($p=0.99$).

On mRNA level fibrous meningiomas showed lower VEGF expression than meningothelial meningiomas ($p=0.011$). Microvessel density was lower in fibrous meningioma compared to meningothelial ($p=0.027$).

On protein level the VEGF expression was shown to be statistically significant higher in atypical meningioma compared to fibrous meningioma ($p=0.025$). This difference was also reproduced for microvessel density in atypical compared to fibrous meningiomas ($p=0.010$).

In summary, the results of the present thesis contribute to a better understanding of cell cycle deregulation and tumor angiogenesis by means of Cyclin D1 and VEGF expression in meningiomas and their characterization with regard to tumor grades. It sheds light on the correlations between tumor grade and expression of Cyclin D1, which were statistically significant both on mRNA and protein level. Furthermore, the IRS used for the immunohistochemical evaluation of the probes proved to be a reliable tool. No statistical significance could be observed in terms of expression of VEGF.

The present study elucidates how the differences in Cyclin D1 and VEGF expression resonate in the different phenotypes of meningiomas. Fibrous meningiomas particularly seem to be differently triggered on a molecular level compared to meningothelial meningiomas. Furthermore, it was shown that immunohistochemistry for Cyclin D1 could potentially help distinguish between transitional or fibrous and atypical meningiomas in borderline cases.

Nonetheless, there was evidence for an association of expression of Cyclin D1 and VEGF on mRNA level, which could prove to be of specific interest for the development of targeted therapies.

KAPITEL 1

EINLEITUNG

A. DIE MENINGEN DES MENSCHEN

Die Meningen (Singular: Meninx, abgeleitet vom griechischen Wort μῆνιγξ für „Haut“) umgeben Gehirn- und Rückenmark des Menschen. Ihr Aufbau ist dreischichtig und umfasst von außen nach innen: Dura mater, Arachnoidea mater und Pia mater (Abbildung 1).

Die Dura mater wird auch harte Hirnhaut (Pachymeninx) genannt und bildet die äußerste der drei Schichten. Sie ist bindegewebig und besteht aus einem inneren und äußeren Blatt. Das äußere Durablatt fungiert als Periost des Schädelknochens. An umschriebenen Stellen weichen die beiden Blätter auseinander und bilden dabei die Sinus durae matris. Aufeinandertreffende innere Durablätter bilden die Falx cerebri, Falx cerebelli, Tentorium cerebelli und das Diaphragma sellae, vier Duraplatten, die die Schädelhöhle in Kompartimente aufteilen. (BOMMAS-EBERT, 2006)

Arachnoidea und Pia mater werden häufig unter dem Begriff weiche Hirnhaut (Leptomeninges) zusammengefasst. Beide sind durch spinnengewebsartige, Kollagenfaserzüge miteinander verbunden. Die innerste Schicht der Hirn- und Rückenmarkshäute ist die Pia mater. Sie ist eine zarte Bindegewebsschicht, liegt dem Gehirn unmittelbar an und reicht bis in die Sulci und Gyri. (BOMMAS-EBERT, 2006; STERNBERG, 1997)

Die Arachnoidea bildet die mittlere Schicht der Hirn- und Rückenmarkshäute. Sie liegt innen der Dura mater an und bildet mit ihr in vivo eine zusammenhängende Einheit. An der Grenze zur Dura mater liegt das subdurale Neurothel der Arachnoidea auf. Als Granulationes arachnoidales (Pacchioni) oder Arachnoidalzotten bekannte, kleine Ausstülpungen der Arachnoidea buchten sich in die Sinus durae matris hervor und dienen der Liquorresorption.

Fokale, nestförmige Ansammlungen von arachnoidalen Deckzellen können überall im Bereich der Arachnoidea beobachtet werden, finden sich jedoch konzentriert

im Bereich der Arachnoidalzotten. Mit fortschreitendem Alter können diese Arachnothelzellnester eine wirbelige Konfiguration mit einem zentralen Psammomkörper aufweisen. (2002; BOMMAS-EBERT, 2006; STERNBERG, 1997)

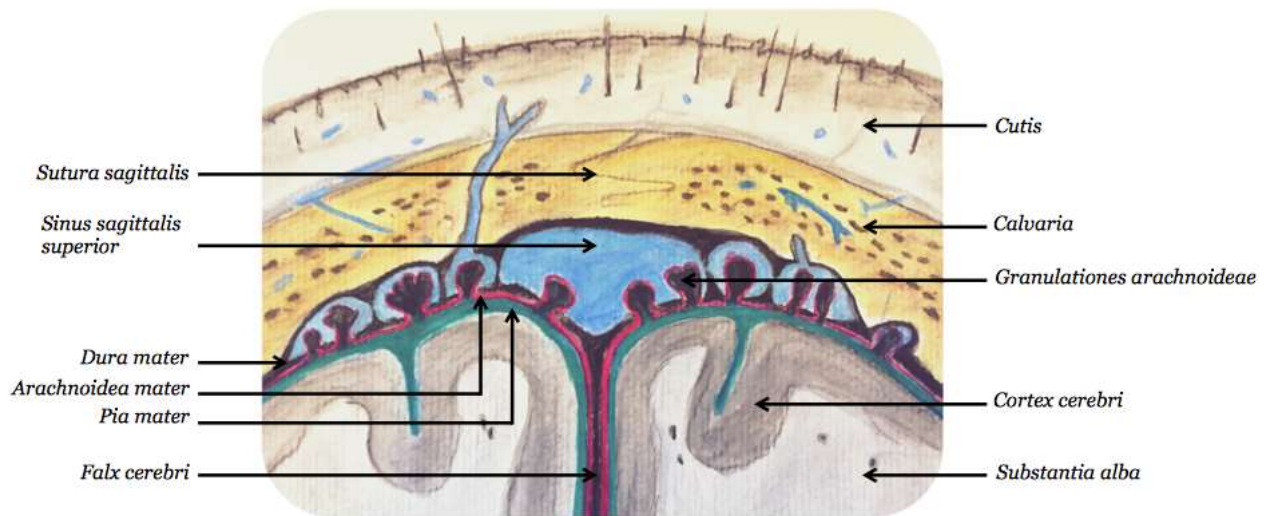


Abbildung 1. **Schematische Darstellung der Hirnhäute des Menschen**, Frontalschnitt auf Höhe des Scheitels. Aquarellzeichnung der Verfasserin

B. MENINGEOME

I. Epidemiologie und Ätiologie

Anders als die hirneigenen Tumoren, die sich vom Hirnparenchym ableiten, entstehen Meningeome aus den arachnothelialen Deckzellen. Damit gehören Meningeome zu den extrazerebralen Tumoren und zählen mit einem Anteil von etwa 30 % zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren des erwachsenen Menschen. Selten treten sie auch bei Kindern und Jugendlichen auf (0,4 %-4,6 %). Meist sind Meningeome benigne Tumore. Ein kleiner Anteil von ihnen zeigt jedoch ein malignes histomorphologisches Bild mit erhöhter biologischer Aggressivität und erhöhter Rezidivneigung. (FATHI, ROELCKE, 2013; KOTECHA et al., 2011; LOUIS et al., 2007; LOUIS et al., 2016)

Frauen sind etwa doppelt so häufig wie Männer von Meningeomen betroffen. Da diese Tumore zudem häufig Hormonrezeptoren (z. B. für Progesteron oder Östrogen) exprimieren, wird immer wieder ein ursächlicher Einfluss endo- oder exogener Hormone auf die Entstehung von Meningeomen diskutiert. (WIEMELS et al., 2010)

Mit dem Lebensalter steigt die Inzidenz für Meningeome kontinuierlich. Für Frauen beträgt sie 2 bis 7/100.000 mit einem Gipfel in der 7. Lebensdekade und für Männer 1 bis 5/100.000 mit einem Gipfel in der 6. Lebensdekade. (DE MONTE, 1995; LONGSTRETH et al., 1993)

Meningeome können überall im Bereich der Hirn- und Rückenmarkshäute entstehen. Bevorzugt treten sie jedoch in parasagittalen Regionen, dem Bereich der Konvexität, der Falx, der Keilbeinflügel und dem Tuberculum sellae auf. Weniger häufige Lokalisationen umfassen u. a. die Olfaktoriusrinne, das Tentorium, die Ventrikel und den Spinalkanal. (FATHI, ROELCKE, 2013)

Zuweilen treten Meningeome an verschiedenen Stellen syn- oder metachron auf. Von diesen Fällen multipler Meningeome sind etwa 1% mit Neurofibromatose Typ 2 assoziiert. (ANTINHEIMO et al., 2000)

II. Klinik und Therapie

Aufgrund ihres in der Regel langsamen und verdrängenden Wachstums sowie ihres meist gutartigen biologischen Verhaltens verursachen Meningeome keine oder nur unspezifische Krankheitszeichen. Zu den häufigsten Symptomen gehört ein neu aufgetretener Kopfschmerz, welcher in aller Regel nicht mit weiteren, für eine Erhöhung des intrakraniellen Drucks suggestiven Symptomen, assoziiert ist. Weitere Symptome stehen häufig mit dem Sitz des Meningeoms in Verbindung. So können etwa bei Meningeomen im Bereich der Konvexität epileptische Anfälle auftreten, während intraspinale Meningeome zu Paraparesen und Paraplegien führen und größere, frontal gelegene Meningeome unter Umständen Persönlichkeitsveränderungen hervorrufen. (ROCKHILL et al., 2007; ROUX et al., 1996)

Therapeutisch steht an erster Stelle die chirurgische Resektion. Diese sollte möglichst vollständig gelingen, da das Resektionsausmaß anhand der Simpson-Grade, neben dem histologischen WHO-Grad, maßgeblich das Rezidivrisiko beeinflusst. Als Therapieoption steht zudem die Strahlentherapie zur Verfügung, die insbesondere bei Rezidiven oder als adjuvante Therapie nach Resektion zum Einsatz kommt. Einen weiteren Therapieansatz bilden systemische Therapien, beispielsweise mit Hydroxyurea oder Angiogenesehemmern wie Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF. Der therapeutische Wert systemischer Ansätze ist jedoch noch nicht vollständig erwiesen. Sie sind in der Regel Patienten vorbehalten, deren lokale Therapieoptionen (Resektion, Strahlentherapie) erschöpft sind. Da Meningeome meist gutartig sind und geringe Wachstumsraten von etwa 1 mm bis 3 mm pro Jahr aufweisen, kann zunächst auch eine abwartende Haltung mit engmaschigen Kontrollen gerechtfertigt sein. (BINDAL et al., 2003; MAWRIN et al., 2015; ROCKHILL et al., 2007)

III. Histologische Graduierung und immunhistochemische Eigenschaften

Gemäß der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) werden Meningeome histomorphologisch in drei Grade eingeteilt (Tabelle 1). Das histologische Bild innerhalb eines WHO-Grades ist jedoch nicht homogen, sondern auch hier können noch einmal verschiedene histologische Subtypen unterschieden werden. (LOUIS DN, 2016)

Meningeome des WHO-Grads I bilden die größte Gruppe. Hierbei handelt es sich um das „klassische“ Meningeom mit umschriebenem Wachstum und gutartigem

Verhalten. Meningeome des WHO-Grades II machen etwa 4,7% bis 7,2% aller Meningeome aus und zeigen in der Regel ein aggressiveres Wachstum sowie eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit.

Die höchste Rezidivrate findet sich bei Meningeomen des WHO-Grades III. Sie umfassen etwa 1% bis 2,8% aller Meningeom-Fälle, zeichnen sich durch ein invasives, destruktives Wachstum aus und erfüllen zytologische Malignitätskriterien. (BARRESI et al., 2016; COMMINS et al., 2007; KIM et al., 2008; LOUIS et al., 2007; LOUIS et al., 2016)

WHO-Grad	Histologische Subtypen	Histologische Eigenschaften
I	meningothelial, fibrös, transitional, angiomatös, psammomatös, mikrozystisch, sekretorisch, lymphoplasmazellreich, metaplastisch	keines der Kriterien für II oder III
II	atypisch, chordoid, klarzellig	4 oder mehr Mitosen/10 HPF und/oder Hirninvasion und/oder 3 oder mehr der folgenden: erhöhte Zelldichte kleinzellige Anteile spontane Nekrosen prominente Nukleolen „sheeting“ (Verlust der wirbeligen oder faszikulären Architektur) und/ oder hoher Proliferationsindex
III	anaplastisch, papillär, rhabdoid	20 oder mehr Mitosen/10 HPF und/oder klar ersichtliche zytologische Malignität

Tabelle 1. Einteilung der Meningeome anhand der WHO-Klassifikation in die Grade I-III sowie ihre entsprechenden histologischen Eigenschaften. HPF (*high-power field*, 400x Vergrößerung)

Zum typischen immunhistochemischen Profil der meisten Meningeome gehört die Positivität für das epitheliale Membran- Antigen (epithelial membrane antigen, EMA), die sie z. B. von Gliomen unterscheidet. In höhergradigen Meningeomen kann dabei die EMA-Expression schwächer oder weniger konsistent sein als in niedriggradigen. (RICHTEROVA et al., 2014)

Daneben beobachtet man eine Expression von Vimentin, welche jedoch keineswegs spezifisch ist und auch in einer Vielzahl anderer, vor allem mesenchymaler Tumore angetroffen werden kann. (COMMINS et al., 2007) Mehr als die Hälfte aller Meningeome exprimiert außerdem Progesteron-, einige auch Östrogenrezeptoren, deren diagnostische und prognostische Relevanz jedoch bisher nicht eindeutig geklärt ist. (FAKHRJOU et al., 2012; IPLIKCIOGLU et al., 2014)

Im Rahmen der klinischen Routinediagnostik wird außerdem häufig zusätzlich der Ki67-Index bestimmt. Dieser korreliert mit dem Tumorgrad und zeigt bei einem erhöhten Ki67-Index ein erhöhtes Rezidivrisiko an. (ABRY et al., 2010; KIM et al., 2008)

Ein weiterer nützlicher Marker ist Phosphohiston-H3 (PHH3), welcher als Mitosemarker zum Grading verwandt werden kann. (KIM et al., 2008)

IV. Onkogenese

Die Entstehung von Meningeomen ist bislang nicht völlig verstanden. Die häufigste Chromosomenaberration in Meningeomen ist die Monosomie 22. Diese konnte bereits 1967 von Zang et al. nachgewiesen werden. (ZANG, SINGER, 1967) 1993 folgte die Identifizierung des Neurofibromatose 2-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 22. Da Patienten mit Neurofibromatose 2 (NF2), deren Erkrankung typischerweise durch bilaterale Vestibularisschwannome charakterisiert ist, auch häufig Meningeome entwickeln, liegt eine Beteiligung des NF2-Gens bei der Entstehung von Meningeomen nahe. Tatsächlich weist etwa die Hälfte aller sporadisch auftretenden Meningeome eine Monosomie 22 auf. Jedoch ist nur in einem Teil der Fälle eine Deletion oder Mutation des NF2-Gens nachweisbar. Mit Malignität und erhöhter Aggressivität verknüpft sind außerdem Verluste weiterer Chromosomen, beispielsweise Monosomien 14, 18, 10 oder 6. Insbesondere mit erhöhter Rezidivneigung ist der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 assoziiert. Selten kommt es zu Hyperploidien, etwa durch ein zusätzliches Chromosom 7. (HENN, URBSCHAT, 1998; MAWRIN et al., 2015; ZANG, 1982, 2001; ZANG, SINGER, 1967)

In Meningeomen des WHO-Grads II und III sind häufiger Mutationen des Promoters der Telomerase-Reverse-Transkriptase (telomerase reverse transcriptase, TERT) anzutreffen, welche dann ebenfalls mit erhöhter Aggressivität und schlechterer Prognose assoziiert sind. (SPIEGL-KREINECKER et al., 2018)

Ionisierende Strahlung ist der bisher einzige, tatsächlich verifizierte Risikofaktor für die Entstehung eines Meningeoms. Als weitere Risikofaktoren werden immer wieder hormonelle Faktoren, Schädel-Hirn-Traumen oder Handy-Nutzung diskutiert. Die Datenlage ist hierzu jedoch noch immer widersprüchlich. (SADETZKI et al., 2002; WIEMELS et al., 2010)

C. CYCLIN D1 – DER ZELLYKLUSREGULATOR

I. Cyclin D1 und seine Funktionen

Cyclin D1 ist ein Gen auf Chromosom 11q13, welches das gleichnamige Cyclin D1-Protein kodiert. Es spielt eine enorme Rolle in der Regulation des Zellzyklus und in der Entstehung von Neoplasien. (DONNELLAN, CHETTY, 1998)

Das Fortschreiten des Zellzyklus einer replizierenden Zelle wird von verschiedenen Cyclinen (D, E, A, B, C, F, G und H) und deren spezifischen Proteinkinasen (cyclin dependent kinase, CDK) gesteuert. Hemmenden Einfluss auf die CDK haben ihre Inhibitoren (cyclin dependent kinase inhibitors, CDI).

Cycline der D-Subgruppe und hier insbesondere Cyclin D1 fördern die Progression der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus. Dies geschieht indem Cyclin D1 die Proteinkinasen CDK4 und CDK6 aktiviert. Diese wiederum phosphorylieren das Genprodukt des Rb-Gens, welches Transkriptionsfaktoren freisetzt, die dann die DNA-Replikation initiieren. (BARTRAM, 2010; DONNELLAN, CHETTY, 1998) Während der G1-Phase erreicht die Konzentration von Cyclin D1 ihren Höhepunkt. Nach dem Passieren des Restriktionspunktes in der späten G1-Phase ist die Zelle refraktär gegenüber extrazellulären, wachstumsregulierenden Faktoren und wird automatisch durch die Zellteilung geführt. (SHERR, 1996)

Die Regulation von Cyclin D1 erfolgt auf translationaler und posttranslationaler Ebene. Dabei kommt es abhängig von Mitogenen zur Aktivierung der Cyclin D1-abhängigen Kinase durch erhöhte Transkription, reduzierten Abbau von Cyclin D1 und vermindertes Ausschleusen von Cyclin D1 aus dem Zellkern. (CALDON et al., 2006; DIEHL, 2002)

Cyclin D1 reguliert zudem auf transkriptionaler Ebene den nukleären Hormonrezeptor ER α und erfüllt daneben eine Reihe weiterer Funktionen. So spielt es beispielsweise auch eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und im mitochondrialen Stoffwechsel. (FU et al., 2004; PESTELL, 2013)

II. Cyclin D1 und Neoplasie

Cyclin D1 ist einer der häufig bei Krebserkrankungen des Menschen betroffenen Zellzyklusregulatoren. Es gehört, gemeinsam mit p53, Rb und p16, zu den wohl kritischsten Angelpunkten innerhalb eines komplexen Netzwerks. Zumindest einer dieser Kardinalpunkte ist bei sämtlichen Krebserkrankungen des Menschen in seiner physiologischen Funktion gestört. (BARTRAM, 2010)

Cyclin D1 betreffende Veränderungen stellen in der Regel ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung dar und sind eindeutig mit einem malignen Phänotyp assoziiert. (BARTRAM, 2010; FU et al., 2004)

In einer Vielzahl menschlicher Tumoren konnte bisher eine Amplifikation und/oder Überexpression von Cyclin D1 nachgewiesen werden. Zunächst in Nebenschilddrüsen-Adenomen entdeckt, folgte der Nachweis amplifizierten und/oder überexprimierten Cyclin D1 auch in Mantelzell-Lymphomen, Kopf-Hals-Tumoren und Mammakarzinomen, hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen, Glioblastomen und vielen mehr. (DONNELLAN, CHETTY, 1998; HSI et al., 1996)

Im Tiermodell und in Zelllinien ist allgemein eine Überexpression der Cycline vom Typ D und speziell von Cyclin D1 als dem am häufigsten Betroffenen, mit einer Verkürzung der G1-Phase, geringerer Zellgröße und geringerer Abhängigkeit von mitogener Stimulation verbunden. (DONNELLAN, CHETTY, 1998; OHTSUBO, ROBERTS, 1993; QUELLE et al., 1993; RESNITZKY et al., 1994)

Seine wichtige Rolle in der Tumorentstehung, sowie die Häufigkeit der Überexpression scheinen Cyclin D1 und seine CDK-Aktivität als therapeutischen Ansatzpunkt zu prädestinieren. So konnte in Zelllinien und Gewebeproben von Mantelzelllymphomen, welche prädominant die Isoform Cyclin D1a exprimieren, mithilfe eines CDK4/6-Inhibitors effektiv die Zellproliferation unterdrückt werden. Direkte Inhibitoren von Cyclin D1 existieren indes noch nicht, allerdings konnten von Shintani et al. und Yasui et al. vielversprechende Experimente mit Antisense Cyclin D1 durchgeführt werden. (KIM, DIEHL, 2009; MARZEC et al., 2006; MUSGROVE et al., 2011; SHINTANI et al., 2002; YASUI et al., 2006)

III. Cyclin D1 und Angiogenese

Die Rolle von Cyclin D1 bei der Tumorprogression ist nicht auf seine Funktion im Zellzyklus beschränkt. In einer 2002 erschienen Studie zeigten Hanai et. al, dass humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) Endostatin-vermittelt in einen G1-Phase-Arrest eintreten und dies durch Hemmung von Cyclin D1 geschieht. Interessanterweise blieb dieser Effekt aus, wenn eine Überexpression von Cyclin D1 vorlag. (HANAI et al., 2002)

Yasui et. al präsentierten in einer 2006 erschienen Studie die These, dass Cyclin D1 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der VEGF-Expression spielt. In ihren Experimenten war es gelungen, mithilfe von Antisense Cyclin D1 die Expression von VEGF und die Bildung von Tumorgefäßen in Kolonkarzinomzelllinien zu hemmen. (YASUI et al., 2006)

Ähnliches gelang Shintani et. al mit einem Antisense Cyclin D1 cDNA Konstrukt in Ösophaguskarzinomzelllinien, wobei die VEGF-Produktion und Kanzerogenität signifikant verringert wurden. (SHINTANI et al., 2002)

IV. Cyclin D1 und Meningeome

Die Expression von Cyclin D1 in Meningeomen wurde erstmals 1996 beschrieben. (MAXWELL et al., 1996; SATO et al., 1996) Heute ist bekannt, dass fast jedes Meningeom Cyclin D1 exprimiert. (ALAMA et al., 2007; MAXWELL et al., 1996; MILENKOVIC et al., 2008) Dabei zeigt sich eine positive Korrelation von histologischem Tumorgrad, Cyclin D1-Expression und Rezidivneigung. Die Überexpression von Cyclin D1 nimmt mit dem Tumorgrad zu. Sie korreliert darüber hinaus auch mit dem Ki67-Index und der Expression des Proliferating-Cell-Nuclear-Antigens (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, PCNA) und kann somit auch als Proliferationsmarker in Meningeomen angesehen werden. (CHENG et al., 2015; KIM et al., 2014; MILENKOVIC et al., 2008)

Ferner konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass ein Knockdown von Cyclin D1 in Meningeomen zu vermehrten Apoptosen und geringerer Proliferation führt. In derselben Studie führte das Ausschalten von Cyclin D1 weiterhin zu geringerer Expression von MMP-9 (Matrix-Metalloproteinase 9) und damit zu geringer Invasivität der Tumorzellen. (CHENG et al., 2015)

D. VEGF – SCHLÜSSELFIGUR DER ANGIOGENESE

I. Die VEGF-Familie

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) bezeichnet eine Glykoproteinfamilie, die mindestens 7 Wachstumsfaktoren umfasst. VEGF (auch VEGF-A genannt), VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D spielen beim Menschen eine wichtige Rolle im Kontext der physiologischen, wie auch pathologischen Angio- und Lymphangiogenese. Weiterhin existieren neben VEGF-E, einem Orfvirushomolog, und dem bisher wenig erforschten, in Schlangengift vorkommenden VEGF-F, noch PlGF-1 und PlGF-2 (*Placenta Growth Factor*). (AUGUSTIN, CHRISTIAN, 2010; CLAUSS, 2000; MCCOLL et al., 2004)

VEGF existiert in verschiedenen Isoformen: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₅₄, VEGF₁₈₉ sowie VEGF₂₀₆ und einigen mehr. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Splicing der prä-mRNA, wodurch Proteine mit einer unterschiedlichen Anzahl von Aminosäuren entstehen.

Die häufigsten Isoformen sind VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁. Funktionell unterscheiden sich die Isoformen kaum. Jedoch sind lediglich die größeren VEGF-Isoformen fähig Heparin zu binden. Darüber hinaus sind die größeren VEGF-Isoformen an die Extrazellulärmatrix gebunden, während die kleineren Isoformen wie beispielsweise VEGF₁₂₁ löslich sind. (HOUCK et al., 1991; LEUNG et al., 1989; PARK et al., 1993; TISCHER et al., 1991)

II. Angiogenese und Funktion von VEGF

Die Neubildung von Blutgefäßen aus Angioblasten, den Vorläuferzellen der Endothelzellen, bezeichnet man als Vaskulogenese. In Abgrenzung dazu bezeichnet der Begriff der Angiogenese die Entstehung von Blutgefäßen durch Sprossung oder Spaltung bereits bestehender Blutgefäße. (AUGUSTIN, CHRISTIAN, 2010)

Bei der Angiogenese handelt es sich um einen streng regulierten Vorgang, welcher physiologischerweise beim Erwachsenen nur bei der Wundheilung und den Abläufen während Schwangerschaft und Menstruationszyklus vorkommt. Die Bildung neuer Blutgefäße ist dabei abhängig von einem komplexen Zusammenspiel von

Stimulation und Inhibition, in dem VEGF einer der Hauptakteure ist. (MCCOLL et al., 2004) Über die Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 vermittelt VEGF seine Wirkung, wobei VEGF-R2 primär für die Blutgefäßbildung von Bedeutung ist. VEGF bindet mit höherer Affinität an VEGF-R1 als an VEGF-R2, woraus eine negative Modulation des VEGF-R2-vermittelten Signalweges resultieren kann.

Die Bindung an den VEGF-Rezeptor setzt den von-Willebrand-Faktor (vWF), Plasminogenaktivatoren und Kollagenasen frei und erhöht die Aktivität des Glucosetransporters Glut-1 in den Endothelzellen. (HEITS et al., 1998; OLSSON et al., 2006)

Neben seiner Funktion als Induktor der Angiogenese, wirkt VEGF proliferationsfördernd und apoptosehemmend auf Endothelzellen und steigert die Gefäßpermeabilität. Weiterhin wirkt es chemotaktisch und migrationsfördernd auf Monozyten. Bereits der Verlust eines VEGF-Allels ist in Mäuseembryonen frühletal. (CARMELIET et al., 1996; CLAUSS, 2000)

Von den proangiogenetischen Faktoren ist VEGF sicherlich der potenteste. Die alleinige Stimulation durch VEGF führt zur Bildung neuer Blutgefäße. Dabei zeigte sich keine Selbstlimitierung dieses Effekts. (DOR et al., 2002)

Die Regulation der VEGF-Expression kann auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene erfolgen. Hierbei spielen verschiedene stimulierende und inhibierende Faktoren eine Rolle, darunter Zytokine, Hormone und Onkogene. Stimulierend auf die VEGF-Expression wirken etwa die inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 α und Interleukin-1 β sowie Prostaglandin E₂. Inhibierend wirken unter anderem Interleukin-4 und Interleukin-10 sowie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). (BIRK et al., 2008; MCCOLL et al., 2004)

Außerdem induzieren Hypoxie und Glukosemangel die Expression von VEGF. (SHWEIKI et al., 1995)

III. Tumorangiogenese und VEGF

Die Bildung neuer Blutgefäße ist von vitaler Bedeutung für das Wachstum von Neoplasien, insbesondere von soliden Tumoren. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Sauerstoff ist eine Versorgung mit Nährstoffen allein über Diffusion lediglich bis zu einer Tumorgöße von 1 bis 2 mm möglich. Wächst ein Tumor über diese Größe hinaus, beginnt er mit der Bildung proangiogener Faktoren. Sobald sich das Gleichgewicht von proangiogenen (z. B. VEGF, bFGF, Angiopoetin-1) und antiangiogenen (z. B. Thrombospondin, Angiostatin, Endostatin) Faktoren zugunsten der proangiogenen Faktoren verschoben hat, kommt es zur Angiogenese (Angiogenic Switch). Erst mit dem Anschluss an das Gefäßsystem erhält ein Tumor die Möglichkeit zu progredientem Wachstum und Metastasierung. (HARRIS, 1997; LOCOPO et al., 1998)

Die Entstehung von Blutgefäßen in Tumoren ist ein „chaotischer“, ungeordneter Vorgang, was größtenteils auf der unbalancierten Sekretion von Wachstumsfaktoren, insbesondere von VEGF, beruht. (CARMELIET, 2005a) Die dabei entstehenden Blutgefäße unterscheiden sich von gewöhnlichen Gefäßen durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität sowie eine irreguläre Struktur. Blutgefäße innerhalb von Tumoren sind häufig dilatiert, irregulär geformt und blind endend. (CARMELIET, 2005a; DVORAK, 2015)

IV. Antiangiogenetische Therapien

Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Tumorprogression wurde die Angiogenese schnell als potentieller Ansatzpunkt für Tumortherapien erkannt. Folkman postulierte bereits 1971, dass das Wachstum solider Tumoren von der Entstehung eines tumorassoziierten Gefäßbetts abhängt und dieses wiederum durch eine antiangiogenetische Therapie hemmbar sei. (FOLKMAN, 1971)

Antiangiogenetische Therapien sollen die physiologischen, sich in einem Ruhezustand befindlichen Gefäße schonen und primär das Wachstum des tumorassoziierten Gefäßbettes behindern, um eine Tumorregression zu induzieren. (CARMELIET, 2005b; FOLKMAN, 1971)

Aufgrund der praktisch ubiquitären Überexpression von VEGF in malignen Tumoren und dessen Schlüsselrolle in der Angiogenese, bot sich zunächst die Erforschung von direkten VEGF-Inhibitoren als Angiogenesehemmer an. (ZHANG et al., 2002)

Eine klinische Zulassung zur Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms erhielt erstmals 2004 in den USA und 2005 in Europa Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF.

Seitdem wurde jedoch nicht nur die klinische Zulassung von Bevacizumab stetig auf weitere Tumorerkrankungen ausgedehnt, sondern auch eine Vielzahl anderer Angiogenesehemmer entwickelt, darunter beispielsweise Sorafenib, Sunitinib oder der neuere VEGFR-2-Inhibitor Apatinib. (JAYSON et al., 2016; WANG et al., 2020; YADAV et al., 2015)

V. VEGF und Meningeome

Auch in Meningeomen wurde die Überexpression von VEGF beschrieben und kann in einer Mehrzahl der Meningeome auf mRNA- oder Proteinebene nachgewiesen werden. (BERKMAN et al., 1993; CHRISTOV et al., 1999; SAMOTO et al., 1995)

Höhergradige Meningeome (WHO-Grad II und III) exprimieren eher die löslichen VEGF-Isoformen 165 und 121, während VEGF₁₈₉ häufiger in Meningeomen des WHO-Grads I angetroffen wird. (PISTOLESI et al., 2004)

Neben der starken Korrelation zwischen VEGF-Expression und Ausmaß beziehungsweise Entwicklung eines peritumoralen Ödems zeigte sich, dass das Tumorgewebe selbst VEGF sezerniert. Somit bedingt das Tumorgewebe die Entwicklung eines peritumoralen Ödems. (DING et al., 2008; RESZEC et al., 2015)

Das Ausmaß dieses peritumoralen Ödems ist mit hirninvasivem Wachstum und anderen Malignitätskriterien assoziiert. (ADELI et al., 2018) Daneben treten jedoch auch bei selteneren Meningeomen des WHO-Grades I VEGF-vermittelt zum Teil ausgeprägte peritumorale Ödeme auf, etwa bei sekretorischen Meningeomen. (OSAWA et al., 2013; TIRAKOTAI et al., 2016)

Die VEGF-Expression in Meningeomen korreliert darüber hinaus positiv mit der Expression der Mettalloproteinase 9 (MMP-9), die in Meningeomen mit Invasivität, höherem Tumorgrad und erhöhtem Rezidivrisiko verbunden ist. Unabhängig davon ist die alleinige Überexpression von VEGF bereits mit einer schlechteren Prognose und höherem Rezidivrisiko vergesellschaftet. (BARRESI et al., 2011; IWADO et al., 2012; LEE et al., 2014)

Die Überexpression von VEGF erreicht eher höhere Level in höhergradigen Meningeomen. Die Unterschiede der VEGF-Expression zwischen den Tumorgraden war jedoch in einer Vielzahl von Veröffentlichungen nicht statistisch signifikant. (LEWY-TRENDA et al., 2003; PIETSCH et al., 1997; PISTOLESI et al., 2004) In einer neueren Studie zeigten Lee et. al dagegen, dass die Überexpression von VEGF in Meningeomen mit einem höheren Tumorgrad assoziiert ist. (LEE et al., 2014)

E. INTRATUMORALE MIKROGEFÄSSDICHTEN (MVD)

I. Quantifizierung der Angiogenese in Tumoren

Um die Angiogenese von Tumoren zu quantifizieren, wurde eine Reihe von Methoden entwickelt. Neben einer Vielzahl von Parametern, welche die Beschaffenheit des tumorassoziierten Gefäßbetts schlicht beschreiben (beispielsweise der Umfang oder Durchmesser der Gefäße) und Verfahren wie der TVA (*Total Vascular Area*), ist die Bestimmung der intratumoralen Mikrogefäßdichte (*Microvessel Density*, MVD) nach Weidner die am weitesten verbreitete Methode. (SHARMA et al., 2005; WEIDNER et al., 1991)

Bei dieser Methode werden in einem bestimmten Areal die vorher immunhistochemisch gefärbten Blutgefäße gezählt. Zur Darstellung der Mikrogefäße können verschiedene Marker verwandt werden, darunter Marker wie Faktor VIII, vWF, CD31 und CD34. Dabei besteht der Nachteil dieser panendothelialen Marker darin, dass sie nicht nur die tumorassoziierten, sondern auch die Endothelien der präexistenten Gefäße anfärben.

Die Auszählung der Mikrogefäße erfolgt dann in der Regel in dem Areal des Tumorgewebes, in dem sich die meisten Mikrogefäße befinden. Dieses Areal wird als neovaskulärer Hotspot bezeichnet. (WEIDNER, 1995)

1991 beschrieben Weidner et. al. erstmalig in Mammakarzinomen den Zusammenhang zwischen MVD, aggressivem biologischen Verhalten und schlechterer Prognose. (WEIDNER et al., 1991) Für eine Vielzahl weiterer Tumoren erfolgten ähnliche Untersuchungen, so dass die intratumorale Mikrogefäßdichte heute als prognostischer Marker für aggressives Tumorstadium, Metastasierung und schlechte Prognose angesehen wird. (WEIDNER, 1993, 2004)

II. Intratumorale Mikrogefäßdichte (MVD) in Meningeomen

Die Mikrogefäßdichte in Meningeomen wurde vielfach untersucht. Dabei zeigten Studien einen Zusammenhang von erhöhter Mikrogefäßdichte, schlechter Prognose und kürzeren rezidivfreien Intervallen. (BARRESI et al., 2007; LEWY-TRENDA et al., 2003; PISTOLESI et al., 2004)

Einige Studien bestätigen diese Zusammenhänge nicht. (LAMSZUS et al., 2000; YOO et al., 2007)

In Meningeomen des WHO-Grads I ist die Mikrogefäßdichte gegenüber dem normalen Hirnparenchym leicht vermindert, das Kaliber der Mikrogefäße vergrößert. (DEB et al., 2012) Höhergradige Meningeome zeigen insgesamt eine höhere Dichte der Mikrogefäße im neovaskulären Hotspot, mit der höchsten Mikrogefäßdichte in anaplastischen Meningeomen. (BARRESI et al., 2015)

Die MVD korrelierte in einer älteren Studie nicht mit der VEGF-Expression, in einer neueren jedoch wurde dieser Zusammenhang aufgezeigt. (BARRESI et al., 2015; LAMSZUS et al., 2000)

Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien sind möglicherweise auf die unterschiedliche methodologische Herangehensweise bei der Bestimmung der MVD sowie die Verwendung unterschiedlicher endothelialer Marker zurückzuführen.

F. ZIELE DER ARBEIT

Meningeome gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren des Menschen. Obwohl die Mehrheit der Meningeome umschrieben wächst und gutartig ist, zeigt ein kleiner Anteil ein aggressives biologisches Verhalten mit ungünstigem klinischen Verlauf. Als wichtigste Prognosefaktoren haben sich der histomorphologische Grad gemäß der WHO-Klassifikation sowie die Vollständigkeit der chirurgischen Resektion bewährt. Dennoch erweist sich das Grading von Meningeomen in einigen Fällen als schwierig und es zeigen sich mitunter Diskordanzen zwischen histologischer Einordnung und biologischem Verhalten.

Cyclin D1 und VEGF spielen eine große Rolle bei der Entstehung und Progression einiger Tumorentitäten und ihre Bedeutung für Zellzyklus und Angiogenese ist enorm. In welcher Form sie in Meningeomen Tumorstromatisierung und Zellzyklus beeinflussen ist allerdings noch nicht hinreichend erforscht.

Meningeome haben mannigfaltige histologische Erscheinungsformen. Allein innerhalb des WHO-Grads I finden sich 9 verschiedene histologische Subtypen. Es ist bisher nicht bekannt, ob und wie sich die Einflüsse von Cyclin D1 und VEGF-Expression im Phänotyp der Meningeome widerspiegeln.

Zwar wurde die Expression von Cyclin D1 und VEGF in Meningeomen sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene bereits in einzelnen Studien untersucht, es wurden jedoch stets nur Teilaspekte beleuchtet. Bisher durchgeführte Studien beschränkten sich auf die Betrachtung der WHO-Grade oder fokussierten sich lediglich auf Cyclin D1 oder VEGF.

Eine systematische Untersuchung mit dem Ziel, die Expression von Cyclin D1 und VEGF nicht nur gleichzeitig auf Gen- und Proteinexpressionsniveau darzustellen, sondern sowohl WHO-Grade als auch histologische Subtypen einzubeziehen, liegt bisher nicht vor.

Auch die Frage, ob in Meningeomen ein Zusammenhang zwischen Deregulation des Zellzyklus und Angiogenese, im Sinne einer Korrelation der Expression von Cyclin D1 und VEGF, besteht, wurde bisher nicht untersucht.

Darüber hinaus handelt es sich bei Cyclin D1 und VEGF um mögliche Ansatzpunkte von *targeted therapies*, die insbesondere bei den häufig nur unzureichend therapierbaren, rekurrenten und/oder höhergradigen Meningeomen, eine vielversprechende Alternative darstellen könnten. *Targeted therapies* stellen eine systemische Behandlungsmöglichkeit mittels Antikörper dar, welche speziell die Tumorzellen angreift und damit bei maximaler Wirkung mutmaßlich möglichst nebenwirkungsarm ist.

Da einige Meningeome ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen, ist es von besonderer Wichtigkeit Patienten zu identifizieren, die von einer solchen systemischen Therapie profitieren könnten.

Um Einblick in die vorgenannten Problemfelder zu erlangen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Cyclin D1 und VEGF in Meningeomen sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene evaluiert und auf Unterschiede zwischen den WHO-Graden sowie den histologischen Subtypen untersucht.

Ferner wurde zur Quantifizierung der Angiogenese in einem weiteren Schritt die intratumorale Mikrogefäßdichte der Meningeome bestimmt und geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und Tumervaskularisation besteht.

Zur Quantifizierung der immunhistochemischen Expression von Cyclin D1 und VEGF existieren darüber hinaus keine standardisierten Verfahren. In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund mit dem IRS nach Remmele und Stegner ein in der Diagnostik des Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms bewährter, semiquantitativer Score gewählt und dessen Eignung geprüft.

Folgende Fragestellungen sollen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

- Unterscheidet sich die Cyclin D1- und VEGF-Expression in Meningeomen *unterschiedlicher WHO-Grade*? Welcher Natur sind diese Unterschiede?
- Unterscheidet sich die Cyclin D1- und VEGF-Expression in Meningeomen *unterschiedlicher histologischer Subtypen* und wie sind diese Unterschiede geartet?

- Sind die Ergebnisse bezüglich der Cyclin D1- und VEGF-Expression auf mRNA- und Proteinebene kongruent?
- Eignet sich der IRS als standardisierte Methode zur Bestimmung der Cyclin D1- bzw. VEGF-Expression in Meningeomen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Cyclin D1- und VEGF-Expression?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen proliferativer Aktivität anhand des Ki67-Index und der Cyclin D1- bzw. VEGF-Expression?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF und der intratumoralen Mikrogefäßdichte (MVD)? Inwiefern beeinflusst VEGF anhand der Mikrogefäßdichte das morphologische Erscheinungsbild der Meningeome?
- Unterscheidet sich die MVD in Meningeomen zwischen den *verschiedenen WHO-Graden*? Unterscheidet sie sich in Bezug auf die *verschiedenen histologischen Subtypen*?

KAPITEL 2

MATERIAL UND METHODEN

A. MATERIAL

I. Gerätschaften

Ausgiessstation	TissueTek®, TEC EC S/N 47150853, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim
Gewebeeinbettautomat	Shandon, Excelsior ES, H24/EG 48289 ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Heizblock	Thriller, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Mikroskop	Olympus Typ BH-2, Japan Leica DM5000B, Wetzlar
Mikrotom	Rotary 3000, pfm medical GmbH, Nonnweiler-Otzenhausen
Paraffinstreckbad	Medax Nagel GmbH, Kiel
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Real-Time-PCR-System	7900HT Fast Real-Time-PCR-System, Software 7900HT Version 2.3, Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Spectrophotometer	NanoDrop ND-1000, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Wasserbad	GFL Typ 1002, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wärmeschrank	B6120, Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	Vibrofix VF1, Janke&Kunkel, IKA-Werke, Staufen
Zentrifugen	Z326K, Hermle, Wehingen, 1K15, Sigma Laborzentrifugen, Osterode

II. Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Coverplates	Shandon Coverplates, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Deckgläser	24x50mm, Glasdicke 0,13 - 0,16mm, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmerdingen
Nitrilhandschuhe	Vasco Nitril white, Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger	SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmerdingen
Pipettenspitzen	MultiGuard Barrier Tips, Sorenson Bioscience, Utah, USA AvantGuard Barrier Tips, Myriad Industries, Kalifornien, USA
Reaktionsgefäße (0,2ml, 1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
96-well-Platten	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Versiegelungsfolie für Platten	MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Kalifornien, USA

III. Substanzen

Alkohole	Ethanol (Ethylalkohol), vergällt, mind 99,9 % Vol, Sorte 642, Berkel Pfälzische Spritfabrik Ludwigshafen; bei 90 %, 80 % und 70 %-Alkoholen, etc. entsprechende Verdünnung mit Aqua dest.
Antikörper-Substrat	DakoREAL™ Antibody Diluent, Ref S2022, LOT 00079334, DakoCytomation, Dänemark
Bläuungsreagenz	Shandon Bläuungsreagenz, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
DAB	DakoREAL™ DAB+ Chromogen (50x), Ref K5007, LOT 00077285, DakoCytomation, Dänemark

DAB-Substrat	DakoREAL™ Substrate Buffer, Ref K5007, LOT 00069263, DakoCytomation, Dänemark
DNase I (RNasefrei)	Ambion by Life Technologies, Kalifornien, USA
Eindeckmedium	Entellan, Merck, Darmstadt
Envision	DakoREAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV), Ref K5007, LOT 00077285, DakoCytomation, Dänemark
Envision Flex	EnVision™ FLEX+ Mouse High pH, Ref K8012, LOT 00072535, DakoCytomation, Dänemark
Formaldehyd-Lösung	4% neutral gepuffert, Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Hämatoxylin	Shandon Harris-Hämatoxylin, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Nukleasefreies Wasser	Ambion by Life Technologies, Kalifornien, USA
Paraffin	56°/58°C, Engelbrecht, Edermünde
Wasserstoffperoxid	Wasserstoffperoxid Lösung 30%, Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Xylol	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken

IV. Pufferlösungen

Die Pufferlösungen wurden jeweils mit der entsprechenden Menge Aqua dest. verdünnt.

Demaskierungspuffer pH 9,0	Target Retrieval Solution pH 9, Ref S2367, LOT 00064588, DakoCytomation, Dänemark
Demaskierungspuffer pH 9,9	Target Retrieval Solution High pH, Ref S3308, LOT 10016894, DakoCytomation, Dänemark
Waschpuffer	Dako Wash Buffer 10x, Ref S3006, LOT 00074146, DakoCytomation, Dänemark

V. Kits

High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Gene Expression Master Mix Kit	Applied Biosystems, Kalifornien, USA

VI. Primer für die Genexpressionsanalyse

Die in der qRT-PCR eingesetzten Primer der Zielgene Cyclin D1, VEGFA sowie des Haushaltgens GAPDH zur endogenen Kontrolle wurden beim Unternehmen Applied Biosystems erworben.

Zielgen CCND1	TaqMan® Gene Expression Assay für CCND1 Hs00765553_m1
Zielgen VEGFA	TaqMan® Gene Expression Assay für VEGFA Hs00900055_m1
Haushaltsgen GAPDH	TaqMan® Gene Expression Assay für GAPDH Hs99999905_m1

Die in den ausgewählten Assays enthaltenen Primer, decken je zwei Exon-Grenzen ab, wodurch die Vervielfältigung spezifischer Transkripte sichergestellt wird. Außerdem sind laut Herstellerangaben Genhomologien nahezu ausgeschlossen. Eine hohe Spezifität der Primer für die ausgewählten Sequenzen ist somit gewährleistet.

VII. Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper gegen	Klonalität	Ig-Klasse	Hersteller
Cyclin D1	monoklonal, Kaninchen	-/-	ThermoFisher Scientific, Kalifornien, USA
VEGF	monoklonal, Maus	IgG1, kappa	DakoCytomation, Dänemark
CD31	monoklonal, Maus	IgG1, kappa	DakoCytomation, Dänemark

Tabelle 2. Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper.

VIII. Gewebeproben

Sämtliche Gewebeproben stammen von Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes. Untersucht wurden ausschließlich Proben aus einem Zeitraum von 1995 bis 2013. Jede der verwendeten Proben wurde von einem Neuropathologen primär untersucht und befundet. Sämtliche Schnittpräparate der in Frage kommenden Fälle wurden von einem Neuropathologen (Prof. Dr. Y.-J. Kim) zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit erneut mikroskopisch begutachtet. Gegebenenfalls wurden zusätzliche Untersuchungen zur Bestätigung der Diagnose (z.B. anti-EMA- und anti-Desmoplakin-Immunhistochemie) durchgeführt und sämtliche Fälle gemäß den aktuellen Kriterien der WHO klassifiziert. Somit erfolgte eine Zuordnung zu einem histologischen Subtyp (Abbildung 2) und einem der drei WHO-Grade.

Im Rahmen der Routinediagnostik und primären histopathologischen Begutachtung durch einen Neuropathologen wurde außerdem von 103 Proben der Ki67-Index bestimmt. Die Bestimmung des Ki67-Index erfolgte durch immunhistochemische Färbung der Proben mit MIB-1, Auszählung von fünf HPF und Bildung eines mittleren prozentualen Anteils positiver Tumorzellen. Diese so im Rahmen der Routinediagnostik gewonnenen Ki67-Indices standen als Teil des Primärbefunds via DC-Pathos für diese Arbeit zur Verfügung.

Das durchschnittliche Alter der Probanden entsprach 62,5 Jahren, dabei war der jüngste Patient 18,33 und der älteste 87,65 Jahre alt.

Für die Genexpressionsanalysen wurde die Gesamt-RNA aus Kryomaterial der 112 Proben isoliert, welches mit Einverständnis der Patienten nach der Tumorresektion entnommen wurde (Tabelle 3). Davon entstammten 68 Proben weiblichen und 44 Proben männlichen Probanden.

Für die Immunhistochemie wurden die am besten geeigneten, tumortragenden Paraffinblöcke der jeweiligen Patienten weiter aufgearbeitet. In zwei Fällen war das Paraffinmaterial für eine immunhistochemische Untersuchung nicht mehr ausreichend, so dass lediglich 110 Paraffinblöcke untersucht wurden (Tabelle 4).

WHO-Grad	insg. 112 Proben
I	67
II	34
III	11

Tabelle 3. Verteilung der Gewebeproben auf die verschiedenen WHO-Grade für die qRT-PCR.

WHO-Grad	CCND1 und VEGF insg. 110 Proben	Ki67 insg. 103 Proben
I	67	61
II	34	33
III	9	9

Tabelle 4. Verteilung der Gewebeproben auf die verschiedenen WHO-Grade für die immunhistochemischen Studien.

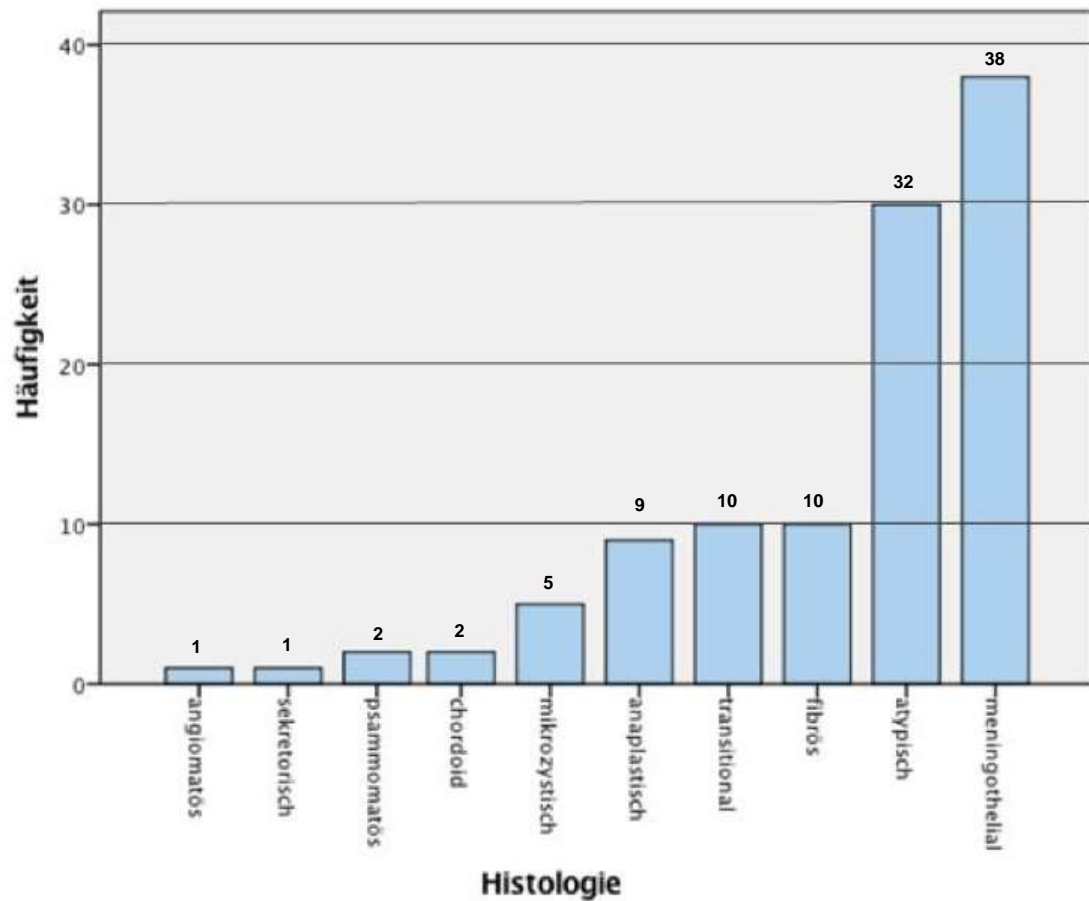


Abbildung 2. **Verteilung der Gewebeproben für die immunhistologischen Studien auf die histologischen Subtypen.**

Für die Genexpressionsanalyse standen zwei weitere anaplastische Meningeome (WHO-Grad III) zur Verfügung.

B. METHODEN

I. Genexpressionsanalyse mittels Taqman Real-Time PCR

1. Prinzip

Die Taqman Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche die natürliche DNA-Replikation imitiert.

Hierbei wird der Reaktionsansatz, bestehend aus der Ausgangs-DNA (template), dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphaten), Primern und der Taq-Polymerase, auf 90-95°C erhitzt, um eine Denaturierung der DNA herbeizuführen. An die entstandenen einzelsträngigen DNA-Moleküle lagern sich im zweiten Schritt bei 55-60°C die Primer an, bei diesem Schritt handelt es sich um das Annealing. Die Elongation der Zielsequenz findet schließlich bei 72°C durch die Taq-Polymerase und die Nukleotide statt. Damit ist der Amplifikationszyklus abgeschlossen – und kann von Neuem beginnen.

Bei der Taqman Real-Time PCR (Abbildung 3) werden dem Reaktionsansatz neben dNTPs, den Primern und der Taq-Polymerase, sog. Taqman-Sonden (Hydrolisierungssonden) zugesetzt. Diese Sonden sind sequenzspezifische Oligonukleotide, die an ihrem 5'-Ende mit einem Reporter und ihrem 3'-Ende mit einem Quencher ausgestattet sind und zwischen beiden Primern das Zielgen binden. Der Reporter besteht aus einem Fluoreszenzfarbstoff, während der Quencher nicht fluoreszierend ist. Durch seine räumliche Nähe zum Reporter wird dessen Fluoreszenzemission unterdrückt. Nachdem die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang hybridisiert hat, trifft nun bei der Elongation die Taq-Polymerase auf sie. Dabei setzt deren 5'-3'-Exonuclease-Aktivität den Reporter frei. Das nun entstehende Fluoreszenz-Signal kann gemessen werden, wobei das proportionale Verhalten von Fluoreszenz zur Menge der PCR-Produkte die Quantifizierung erlaubt.

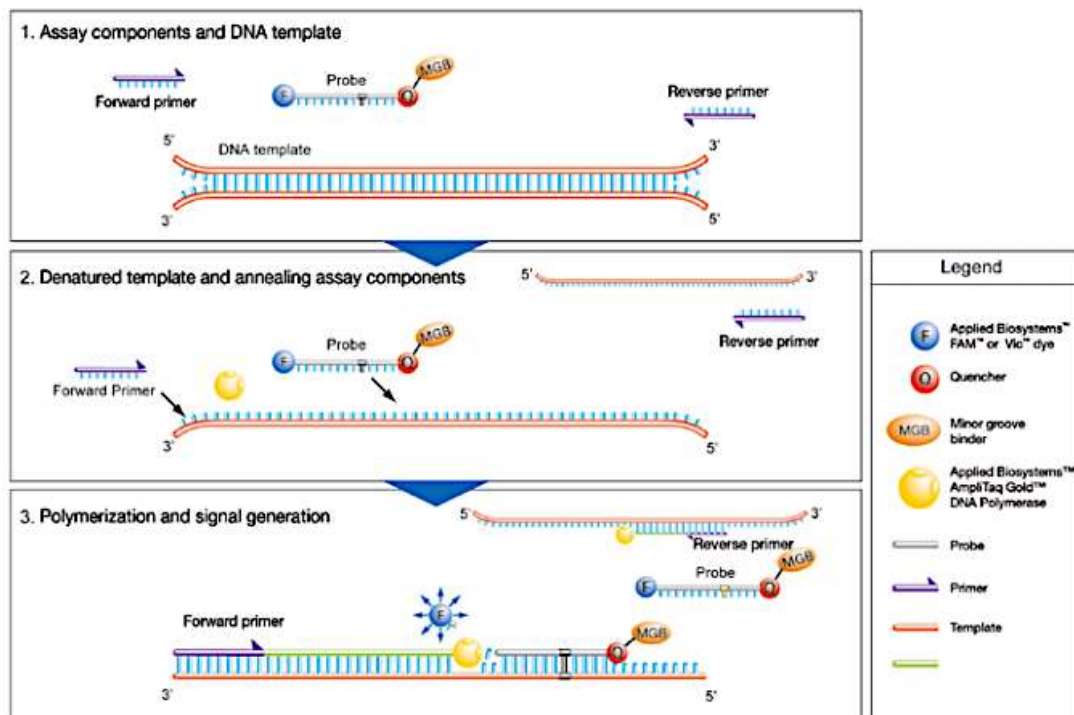


Abbildung 3. **Prinzip der Taqman-Real-Time-PCR.**

Quelle: *TaqMan® Gene Expression Assay solutions, Applied Biosystems*

2. Durchführung

a) RNA-Proben

Freundlicherweise wurden die Proben für die Genexpressionsanalyse vom Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes (Leitung: Prof. Dr. E. Meese) zur Verfügung gestellt. Die Gesamt-RNA wurde dort, mithilfe des RNeasy Kits der Firma Qiagen, Hilden, anhand des beiliegenden Protokolls isoliert.

b) Aufreinigung der vom Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes, erhaltenen kryoasservierten RNA: **DNase-Verdau, Ethanol-Fällung und Bestimmung der RNA-Konzentration:**

Der DNase-Verdau der RNA-Proben sowie die anschließende Ethanol-Fällung dienen der Beseitigung eventuell noch vorhandener DNA sowie der Konzentrierung der RNA.

Hierzu wurde 1 µg RNA mit 1 µl DNase-Puffer sowie 1 µl DNase I versetzt und die erhaltene Menge mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde sodann für 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurde der nukleinsäurehaltigen Lösung je 90 µl nukleasefreies Wasser, weiterhin ein Zehntel Volumen einer 3M Stammlösung Natriumacetat (pH 5,2) sowie das doppelte Volumen eiskalten 100%igen Ethanol zugegeben. Der Fällungsansatz wurde dann über Nacht bei -20 °C inkubiert. Daraufhin wurde der Fällungsansatz für 20 min bei 4 °C und 14000xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Sediment mit 500 µl eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde wiederum der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Sediment 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde das Sediment in 15 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und für 5-15 min auf Eis stehen lassen.

Anschließend erfolgte die Messung der Gesamt-RNA-Konzentration mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spectrophotometers. Hierzu wurde jeweils 1 µl jeder Probe in das Gerät pipettiert, welches dann die Reinheit der RNA sowie deren Konzentration bemaß.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben sodann bei -80 °C gelagert.

c) **Synthese von cDNA**

Für die Real-Time-PCR wurde die zur RNA komplementäre cDNA benötigt, welche mittels reverser Transkription hergestellt wurde.

Es wurden je 200 ng RNA mit dem High Capacity RNA-to-cDNA Kit der Firma Applied Biosystems unter Beachtung des vom Hersteller empfohlenen Protokolls in cDNA umgeschrieben.

Die Gesamt-RNA wurde zunächst auf Eis aufgetaut. Mithilfe der Messung der RNA-Konzentration ließ sich für jede Probe die benötigte Menge in µl errechnen, wobei eine Menge von maximal 9 µl nicht überschritten werden sollte.

Zur benötigten Menge RNA wurden 10 µl RT-Puffer (Mix aus dNTPS) sowie 1 µl Enzym-Mix (reverse Transkriptase und RNase Inhibitor) zugegeben und der Ansatz mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde daraufhin für 60 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen der Ansätze bei 95 °C für 5 min im Heizblock gestoppt.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

d) **Quantitative Real-Time-PCR mittels Taqman**

Für die quantitative Genexpressionsanalyse mittels Taqman-Real-Time-PCR wurden die Proben mit den Primern und dem TaqMan Gene Expression Master Mix in eine 96-well-Platte pipettiert. Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung mit allen drei Primern durchgeführt.

Nach Versiegelung mithilfe einer adhäsiven Folie wurden die befüllten 96-well-Platten kurz abzentrifugiert.

Daraufhin wurde die Platte in das 7900HT Fast Real-Time-PCR-Gerät eingesetzt und mithilfe der Software 7900HT SDS 3.2 gemessen.

Pipettierschema für einen Reaktionsansatz von 20 µl für die TaqMan Real-Time-PCR:

10 µl	TaqMan® Gene Expression Master Mix
1 µl	TaqMan® Gene Expression Assay (CCND1, VEGF oder GAPDH)
1 µl	cDNA
8 µl	nukleasefreies Wasser

Programmeinstellung:

Stufe 1:	95 °C 10 min
Stufe 2: 40 Zyklen:	95 °C 15 sek
	60 °C 1 min

e) **Auswahl des Haushaltsgens (*housekeeping gene*)**

Haushaltsgene kodieren in der Regel Proteine, die für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels unentbehrlich sind. Daher werden diese Gene konstant exprimiert, das heißt ihre Expression ist im Idealfall unabhängig von inneren oder äußeren Einflüssen.

Um Schwankungen im Ausgangsgehalt der cDNA, die zum Beispiel beim Pipettieren entstehen können, auszugleichen, bietet sich die gleichzeitige Quantifizierung eines Haushaltgens an. Das gewählte Haushaltgen fungiert damit als endogene Kontrolle und erlaubt anhand seines Fluoreszenzsignals die Normalisierung der Signale des Zielgens.

Um die passende endogene Kontrolle zu finden, wurde an fünf verschiedenen Meningeomen aus unterschiedlichen Gruppen jeweils eine Taqman Real-Time PCR mit der TaqMan® Array Human Endogenous Control 96well plate der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass GAPDH in den verschiedenen Gruppen das konstanteste Expressionsniveau bot. Somit war GAPDH der ideale Kandidat, um für die folgenden Untersuchungen als endogene Kontrolle zu dienen.

f) **Auswertung der Taqman Real-Time PCR**

Zu Beginn der PCR ist die Menge der Ausgangs-DNA begrenzt, gegen Ende werden Primer und Nukleotide knapp – beides wirkt hemmend auf die PCR. Zwischen dieser Startphase und der späteren Plateauphase liegt eine exponentielle Phase, die bei der Taqman Real-Time-PCR zur Quantifizierung herangezogen wird. Bei dem vom Gerät angegebenen Threshold Cycle (Ct) handelt es sich um den Zyklus, bei dem erstmals die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser Ct-Wert verhält sich umgekehrt proportional zur Menge des zu untersuchenden Zielgens. Das bedeutet, je früher der Threshold Cycle erreicht wird, desto mehr Zielgen enthielt der ursprüngliche Reaktionsansatz.

Zusätzlich zur Expression der Zielgene wurde für jede Probe die Expression des Haushaltgens GAPDH als endogene Kontrolle untersucht. Die erhaltenen Werte des Haushaltgens wurden in Verhältnis zu den Zielgenen der jeweiligen Probe gesetzt, indem der Ct-Wert des Zielgens von demjenigen des Haushaltgens subtrahiert wurde.

Dieser Δ -Ct-Wert ($Ct \text{ Zielgen } CCND1 \text{ oder } VEGF - Ct \text{ GAPDH} = \Delta\text{-Ct}$) entspricht der normalisierten relativen Expression des Zielgens.

II. Immunhistochemie

1. Prinzip

Die Immunhistochemie beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Mit ihrer Hilfe gelingt der Nachweis von spezifischen chemischen Verbindungen, insbesondere von Proteinen wie beispielsweise Cyclin D1, VEGF oder CD 31 in histologischen Schnitten.

Es existieren verschiedene Methoden, um den gewählten Antikörper sichtbar zu machen. Sie alle teilen jedoch das gleiche Prinzip: Ein durch Interaktion eines spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörpers mit dem gesuchten Antigen entstandener Antigen-Antikörper-Komplex wird durch ein Detektionssystem sichtbar gemacht. Die Detektion selbst erfolgt durch eine Markersubstanz (Chromogen), wobei es sich meist um ein Enzym handelt, welches mit dem Antikörper gekoppelt ist. Durch Zugabe eines entsprechenden Substrats entsteht ein farbiges Reaktionsprodukt. Farbige Signale entstehen also demnach nur da, wo auch das gesuchte Antigen sich findet.

Bei der direkten Methode der Immunhistochemie wird der mit einem Chromogen markierte Antikörper unmittelbar mit dem gesuchten Antigen zusammengebracht. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Komplex, welcher durch Zugabe eines Substrats sichtbar wird. Vorteilhaft bei dieser Methode ist ihre hohe Spezifität. Im Vergleich zur indirekten Methode liefert sie jedoch schwächere Signale, was bei Gewebeschnitten mit wenigen Antigenen problematisch sein kann.

In der hier vorliegenden Arbeit fand deshalb die indirekte, zweistufige immunhistochemische Färbung Anwendung. Dabei wird im ersten Schritt ein Primärantikörper auf den Objektträger aufgebracht. Der Primärantikörper ist spezifisch für das zu untersuchende Antigen und bindet an dieses, er ist jedoch unmarkiert. Im zweiten Schritt wird nun der Sekundärantikörper auf den Gewebeschnitt aufgebracht. Dieser ist gekoppelt an ein Enzym, welches eine Farbreaktion katalysiert, wenn es mit dem Substrat in Verbindung gebracht wird. Bindet der Sekundär- an den Primärantikörper wird auf diesem Wege die Antigen-Antikörper-Reaktion detektierbar. Mithilfe des Sekundärantikörpers ist es darüber hinaus möglich, die durch den Primärantikörper erhaltenen Signale zu verstärken. Dies gelingt durch Bindung mehrerer Enzymmoleküle am gesuchten Antigen.

In dieser Untersuchung wurde die indirekte Methode in Verbindung mit der Polymerkonjugat-Methode angewandt. Hier wird im zweiten Schritt ein Dextran-Polymer zugegeben, welches antikörper- und enzymmarkiert ist (EnVision-Polymer, Abbildung 4).

Neben der Polymerkonjugat-Methode existieren noch weitere Techniken wie etwa die APAAP- oder ABC-Methode. Sie werden jedoch an dieser Stelle nicht weiter behandelt, da sie für die vorliegende Arbeit nicht von Relevanz sind.

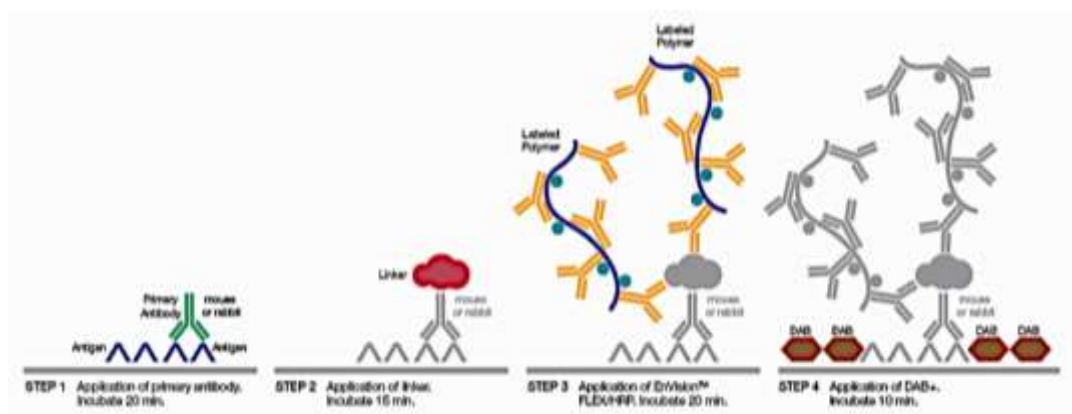


Abbildung 4. **Prinzip der indirekten, immunhistochemischen Färbung mithilfe der Polymerkonjugat-Methode.** Quelle: *EnVision™ FLEX+ system - Manual protocol, DakoCytomation*

2. Durchführung

a) Protokoll

Die immunhistochemischen Färbungen für Cyclin D1, VEGF und CD31 wurden anhand des folgenden Protokolls angefertigt:

Deparaffinieren und Rehydrieren:

Xylol	(5 min)
Xylol	(5 min)
Xylol	(5 min)
Ethanol 100 %	(2 min)
Ethanol 90 %	(2 min)
Ethanol 80 %	(2 min)
Ethanol 70 %	(2 min)
Aqua dest.	

Blockierung der endogenen Peroxidase:

Dieser Schritt dient dem Verhindern einer Reaktion des später verwendeten Chromogens für das Markerenzym mit der natürlicherweise im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase, indem diese blockiert wird.

Hierzu wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur in eine 1%igen Wasserstoffperoxid/Aqua dest.-Lösung überführt und danach in Aqua dest. gewaschen.

Hitzeinduziertes Antigen-Retrieval:

Bei der Formalinfixierung entstehen chemische Querverbindungen, sowohl innerhalb von Proteinen als auch zwischen Proteinen. Hierdurch wird die räumliche Struktur von Antigenen verändert, ihre Immunreaktivität vermindert, sie werden maskiert. Durch Inkubation der Gewebeschnitte in kochender Pufferlösung, können die Antigene zum Teil wieder demaskiert und somit eine Antikörper-Antigen-Reaktion ermöglicht werden.

Hierzu wurde zunächst der Demaskierungspuffer pH 9,0 in einem Wasserbad auf 95 °C erhitzt. Dann wurden die Proben in den heißen Puffer gestellt und für 20 min gekocht.

Danach wurde der Demaskierungspuffer mit den Proben entnommen, um 30 min bei Raumtemperatur abzukühlen. Im Anschluss wurden die Proben drei bis viermal in Aqua dest. gewaschen und in Waschpuffer überführt.

Antikörper-Inkubation:

Die Proben wurden zunächst luftblasenfrei in die Coverplate-Halterung gebracht. Dann wurde alle Coverplates mit Puffer befüllt, um zu überprüfen, ob der Objektträger richtig in der Halterung sitzt und somit der gewünschte Kapillareffekt erzielt wird.

Die Antikörper wurden wie folgt mit dem Antikörper-Substrat verdünnt:

Cyclin D1	1:100
VEGF	1:25
CD 31	1:1000.

Nun wurden jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers in ein Coverplate pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Detektion des Antikörpers:

Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Proben in den Coverplates dreimal mit Waschpuffer gespült.

Dann wurden 100 µl EnVison Flex in die Coverplates pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zugabe eines Linkers, hier der EnVision Flex-Lösung, ist empfehlenswert, denn indem er die Bindung mehrerer Dextranpolymere der später zugegebenen EnVision-Lösung an den Primärantikörper ermöglicht, führt er zu einer Signalverstärkung.

Daraufhin wurden die Proben erneut dreimal mit Waschpuffer gespült.

Anschließend wurden 100 µl Envision in die Coverplates pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Antikörper-Detektion erfolgt durch Zugabe der EnVision-Lösung. Diese enthält, neben dem Sekundäntikörper auch das Markerenzym (Horseradish peroxidase, HRP).

Nach einem erneuten dreimaligen Spülen mit Waschpuffer wurden die Objektträger aus den Coverplates genommen und in eine feuchte Kammer gelegt.

Die DAB-Substrat-Lösung wurde hergestellt. Dazu wurden 1 ml des DAB-Substrat-Puffers mit 25 µl DAB-Chromogen versetzt. 200 µl dieser Lösung wurden auf die Objektträger pipettiert und diese für 7 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch Zugabe der DAB-Substrat-Lösung wird das Substrat durch das Enzym HRP in ein farbiges Signal umgesetzt und damit alle Strukturen, an die der Primäntikörper gebunden hat sichtbar.

Danach wurden die Objektträger ausgiebig in Aqua dest. gespült.

Gegenfärbung mit Hämatoxylin:

Die Gegenfärbung der Gewebsschnitte erlaubt bei der späteren Auswertung eine leichtere Orientierung im Gewebe. Die Zellkerne zeigen dann eine bläuliche Farbe. Diese unterscheidet sich deutlich vom braunen Farbton der immunhistochemisch gefärbten Zellen.

Hierzu wurden die Objektträger zunächst für 1 min in Hämatoxylin-Lösung gestellt. Es folgte ein kurzes Spülen in Aqua dest. und das Überführen in Bläuungsreagenz für 1 min.

Ethanol 70 %	(2 min)
Ethanol 80 %	(2 min)
Ethanol 90 %	(2 min)
Ethanol 100 %	(2 min)
Xylol	(1 min)
Xylol	(1 min)
Xylol	(1 min)

Eindecken der Objektträger:

Ein Tropfen des Eindeckmediums Entellan wurde auf ein Deckgläschen gegeben und der Objektträger damit eingedeckt.

b) Auswertung der Immunreaktivität von Cyclin D1 und VEGF

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte für Cyclin D1 und VEGF mit Hilfe des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner (Tabelle 5 und 6). (REMMELE, STEGNER, 1987)

Beim IRS handelt es sich ursprünglich um eine semiquantitative Methode zum immunhistochemischen Nachweis von Östrogenrezeptoren in Mammakarzinomen. Dabei multipliziert man den Anteil positiv gefärbter Zellen mit der Färbeintensität und erhält somit den IRS ($IRS = \text{Färbeintensität} \times \text{Anteil positiver Zellen}$). Hierbei handelt es sich um eine einheitliche und reproduzierbare Größe, die sich in der Diagnostik des Mammakarzinoms seit Jahrzehnten bewährt hat.

Für Cyclin D1 wurden lediglich nukleäre Signale, für VEGF zunächst nur cytoplasmatische Signale gewertet.

Bei der Auswertung der cytoplasmatischen Signale für VEGF fiel jedoch auf, dass teilweise auch nukleäre Signale für VEGF auftreten. Diese wurden dann ebenfalls gewertet und ein nukleärer IRS für diese Fälle erstellt.

Score	Färbeintensität	Anteil positiver Zellen (alle Intensitäten)
0	keine Färbereaktion	0%
1	schwache Färbereaktion	< 10%
2	mäßige Färbereaktion	10 – 50%
3	starke Färbereaktion	51 – 80%
4	-	> 80%

Tabelle 5. IRS – Bewertung der Färbeintensität und des Anteils positiver Zellen

Interpretation des IRS	
0 – 1	negativ
2 – 3	schwache Expression
4 – 8	mäßige Expression
9 – 12	starke Expression

Tabelle 6. **Interpretation des IRS.****c) Auswertung der MVD**

Die Auswertung der intratumoralen Mikrogefäßdichte (MVD) erfolgte nach Weidner et al. (WEIDNER, 2008) Um die MVD zu bestimmen, wurden zunächst mit CD31 die Endothelien, welche die Gefäße auskleiden, immunhistochemisch angefärbt. Bei CD31 handelt es sich um einen Marker, dessen hohe Sensitivität bei der Darstellung intratumoraler Mikrogefäße, ihn auch unter Abwägung etwaiger Nachteile wie beispielsweise Kreuzreaktionen mit Plasmazellen, günstig erscheinen lässt. (WEIDNER, 2008)

Daraufhin wurde ein neovaskulärer Hotspot aufgesucht, also dasjenige Areal in dem sich lichtmikroskopisch die meisten Mikrogefäße befinden und hier bei einer Vergrößerung von 200x die einzelnen Mikrogefäße gezählt.

III. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms SPSS Statistics 24 von IBM. Als statistische Tests kamen t-Test, einfaktorielle Varianzanalyse sowie der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Anwendung. Ein Testergebnis wurde bei einem p-Wert < 0.05 als statistisch signifikant angenommen.

KAPITEL 3

ERGEBNISSE

A. QUANTITATIVE GENEXPRESSIONSANALYSE

Die Expression von Cyclin D1 und VEGF wurde auf mRNA-Ebene untersucht. Eine positive Expression des Zielgens wurde angenommen, wenn sich bei der jeweils durchgeführten Doppelbestimmung eine positive Expression des Zielgens, des Haushaltgens GAPDH sowie ein Ct-Wert < 40 zeigten.

Eine negative Expression des Zielgens wurde definiert als fehlende Expression des Zielgens bei gleichzeitig gültiger Expression des Haushaltgens. Bei fehlender Expression des Haushaltgens wurde die Probe als ungültig gewertet.

Die Untersuchung lieferte für alle 112 Proben gültige Ergebnisse. Aus den pro Fall durch Doppelbestimmung ermittelten Ct-Werten wurde ein statistischer Mittelwert gebildet. Weiterhin wurde der Δ -Ct-Wert entsprechend der relativen Expression des Zielgens – wie bereits in Kapitel 2 beschrieben – aus dem Mittelwert des Zielgens und dem Mittelwert des Haushaltgens GAPDH gebildet.

Für die folgenden Ergebnisse ist die Betrachtung der relativen Expression der Zielgene von besonderer Wichtigkeit. Die nicht normalisierten, durchschnittlichen Ct-Werte werden aus Gründen der Vollständigkeit jedoch ebenfalls kurz mitangeführt.

I. Expression von Cyclin D1

Die Expression von Cyclin D1 zeigte eine Bandbreite der gemittelten Ct-Werte von minimal 21 bis maximal 31, der durchschnittliche Ct-Wert betrug 25. Höhergradige Meningeome zeigten durchschnittlich einen niedrigeren gemittelten Ct-Wert (Abbildung 5).

Die Δ -Ct-Werte entsprechen der normalisierten, relativen Expression von Cyclin D1 und zeigten Werte zwischen minimal -6,9 und maximal 3,4. Der durchschnittliche Δ -Ct-Wert für Cyclin D1 betrug -0,09.

Es zeigte sich zwischen den WHO-Graden ein statistisch signifikanter Unterschied der Cyclin D1-Expression der WHO-Grade I vs. II ($p=0.0001$, Tabelle 7).

Die Korrelation von WHO-Grad und Δ -Ct-Wert war statistisch signifikant ($p=0.001$).

Auch die Unterschiede zwischen den histologischen Subtypen in der Cyclin D1-Expression wurden analysiert. Was die Δ -Ct-Werte betraf, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Cyclin D1-Expression zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen (Abbildung 6 und Tabelle 8).

Die Δ -Ct-Werte betragen im Mittel maximal 0,986 bei psammomatösen Meningeomen und minimal -2,310 bei chordoiden Meningeomen (Abbildung 7). Der Unterschied in der Cyclin D1-Expression bezogen auf die Δ -Ct-Werte war statistisch signifikant zwischen meningoethelialen und atypischen ($p=0.0003$), zwischen transitionalen und atypischen ($p=0.025$).

Der Δ -Ct-Wert betrug beim weiblichen Geschlecht durchschnittlich 0,198 und beim männlichen Geschlecht -0,549. Die Cyclin D1-Expression korrelierte nicht mit dem Geschlecht bezogen auf die Δ -Ct-Werte ($p=0.082$).

Eine Korrelation zwischen den Δ -Ct-Werten für Cyclin D1 und dem Ki67-Index war statistisch signifikant ($p=0.006$).

	Cyclin D1 gemittelte Ct-Werte	Cyclin D1 Δ-Ct-Werte
Alter	$p = 0.79$	$p = 0.69$
Geschlecht	$p = 0.007$	$p = 0.082$
Ki67-Index	$p = 0.908$	$p = 0.006$
WHO-Grad I vs. II	$p = 0.73$	$p = 0.0001$
WHO-Grad I vs. III	$p = 0.84$	$p = 0.11$
WHO-Grad II vs. III	$p = 0.73$	$p = 0.39$

Tabelle 7. (vorangehende Seite) **Statistische Auswertung der Cyclin D1-Expression in Bezug auf die verschiedenen WHO-Grade und weiterer Parameter.** Es wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression und Alter, Geschlecht sowie Ki67-Index untersucht. Ein statistisch signifikantes Ergebnis besteht bei einem p-Wert < 0.05 .

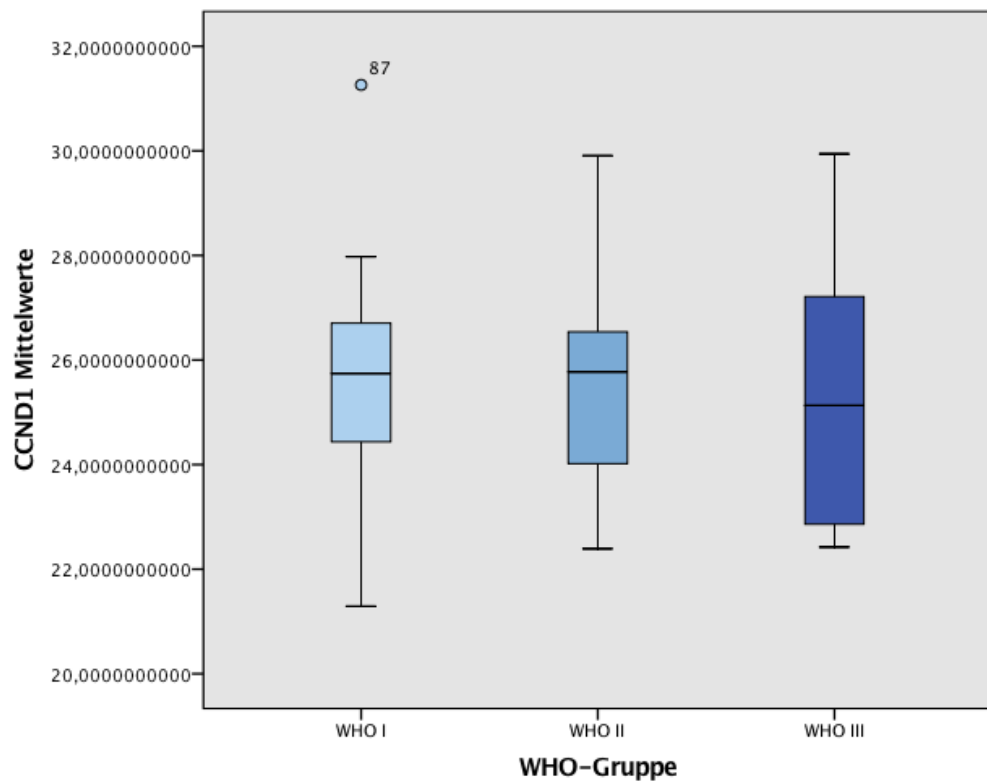


Abbildung 5. **Cyclin D1 - gemittelte Ct-Werte und WHO-Grade.** Die Boxplots zeigen die Bandbreite der gemittelten Ct-Werte bezogen auf CCND1 und deren Verteilung auf die WHO-Grade. In Meningeomen eines höheren WHO-Grades fanden durchschnittlich niedrigere gemittelte Ct-Werte für CCND1.

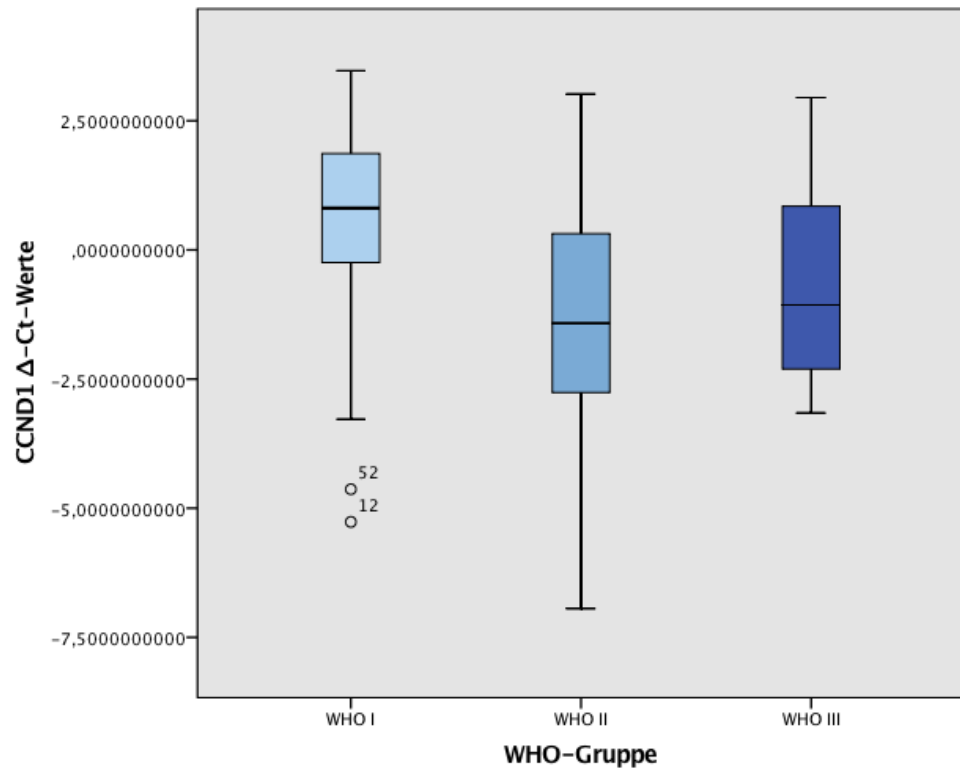


Abbildung 6. **Cyclin D1 – Δ -Ct-Werte und WHO-Grade.** Die Boxplots zeigen die Bandbreite der Δ -Ct-Werte bezogen auf CCND1 und deren Verteilung auf die WHO-Grade. Meningeome der WHO-Gruppen II und III zeigten niedrigere Δ -Ct-Werte als Meningeome der WHO-Gruppe I. Der Unterschied in der CCND1-Expression zwischen WHO-Grad I und II war statistisch signifikant ($p=0.0001$).

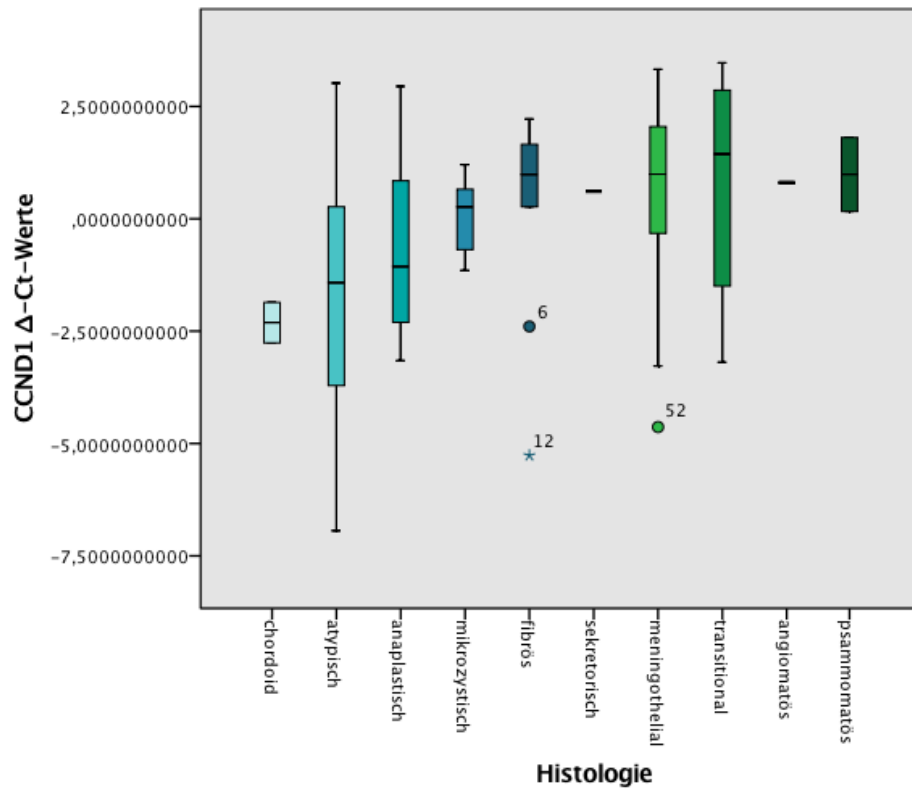


Abbildung 7. **Cyclin D1 (Δ -Ct-Werte) und histologische Subtypen der Meningeome.** Die Abbildung zeigt die Bandbreite der statistisch signifikant unterschiedlichen Cyclin D1-Expression (bezogen auf die Δ -Ct-Werte) zwischen den histologischen Subgruppen. Die niedrigsten Δ -Ct-Werte fanden sich bei chordoiden und atypischen Meningeomen.

vs.	transitional	meningothelial	fibrös	atypisch	anaplastisch
transitional	-	p = 0.906	p = 0.602	p = 0.025	p = 0.180
meningothelial	p = 0.906	-	p = 0.576	p = 0.0003	p = 0.095
fibrös	p = 0.602	p = 0.576	-	p = 0.405	p = 0.82
atypisch	p = 0.025	p = 0.0003	p = 0.405	-	p = 0.359
anaplastisch	p = 0.180	p = 0.095	p = 0.82	p = 0.359	-

Tabelle 8. **Statistische Auswertung (*t-tests*) der Cyclin D1-Expression anhand der Δ -Ct-Werte und der histologischen Subtypen von Meningeomen.** Es wurde der Unterschied in der CCND1-Expression zwischen den histologischen Gruppen auf statistische Signifikanz geprüft. Für die Subtypen angiomatös, chordoid, hirninvasiv, mikrozystisch, psammomatös und sekretorisch konnte aufgrund der geringen Anzahl keine statistisch aussagekräftige Analyse durchgeführt werden. Bei einem p-Wert < 0.05 wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

II. Expression von VEGF

Die Expression von VEGF zeigte eine Bandbreite der gemittelten Ct-Werte von minimal 24 bis maximal 36, der durchschnittliche Ct-Wert betrug 29. Insbesondere in höheren WHO-Graden zeigten die Meningeome durchschnittlich höhere Ct-Werte (Abbildung 8, Tabelle 9).

Mithilfe des Haushaltsgens GAPDH ermittelten, der relativen Expression von VEGF entsprechenden Δ -Ct-Werte zeigten Werte zwischen minimal -3,33 und maximal 8,39. Der durchschnittliche Δ -Ct-Wert betrug 3,51. Die höhergradigen Meningeome zeigten in dieser Analyse höhere Δ -Ct-Werte (Abbildung 9). Zwischen den WHO-Graden zeigte sich in Bezug auf die Δ -Ct-Werte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0.48$). Die Korrelation von WHO-Grad und Δ -Ct-Wert war statistisch nicht signifikant ($p=0.304$).

Im Weiteren wurden die Unterschiede der VEGF-Expression zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen analysiert (Abbildung 10 und Tabelle 10). Die Δ -Ct-Werte für VEGF betragen minimal 1,24 bei mikrozystischen und maximal 5,31 bei fibrösen Meningeomen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression in Bezug auf die Δ -Ct-Werte zeigte sich zwischen meningothelialen und fibrösen Meningeomen ($p=0.011$).

Eine positive Korrelation war zwischen VEGF- und Cyclin D1-Expression bezogen auf die ermittelten Δ -Ct-Werte ($p=0.000004$) festzustellen.

Der Δ -Ct-Wert betrug beim weiblichen Geschlecht durchschnittlich 3,47 und beim männlichen Geschlecht 3,56. Ein statistisch signifikanter Unterschied der VEGF-Expression konnte bezogen auf die Δ -Ct-Werte ($p=0.847$) nicht festgestellt werden.

Der im Rahmen der Routinediagnostik gewonnene Ki67-Index korrelierte nicht mit den Δ -Ct-Werten für VEGF ($p=0.712$).

	VEGF gemittelte Ct-Werte	VEGF Δ -Ct-Werte
Alter	p = 0.85	p = 0.779
Geschlecht	p = 0.678	p = 0.847
Ki67-Index	p = 0.026	p = 0.712
WHO-Grad I vs. II	p = 0.000007	p = 0.83
WHO-Grad I vs. III	p = 0.021	p = 0.20
WHO-Grad II vs. III	p = 0.81	p = 0.29

Tabelle 9. **Statistische Auswertung der VEGF-Expression bezogen auf die verschiedenen WHO-Grade und weiterer Parameter.** Es wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und Alter, Geschlecht sowie Ki67-Index untersucht. Ein statistisch signifikantes Ergebnis besteht bei einem p-Wert < 0.05.

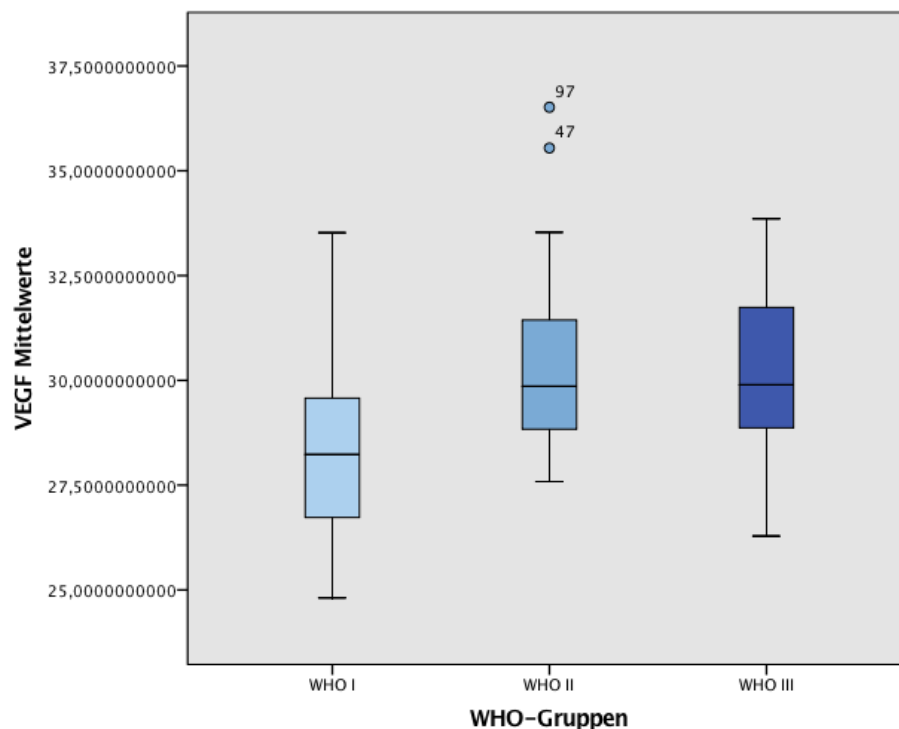


Abbildung 8. **VEGF – gemittelte Ct-Werte und WHO-Grade.** Die Boxplots zeigen die Bandbreite der gemittelten Ct-Werte bezogen auf VEGF und deren Verteilung auf die WHO-Grade. Es zeigten sich durchschnittlich niedrigere gemittelte Ct-Werte in der Gruppe der Meningeome WHO-Grad I.

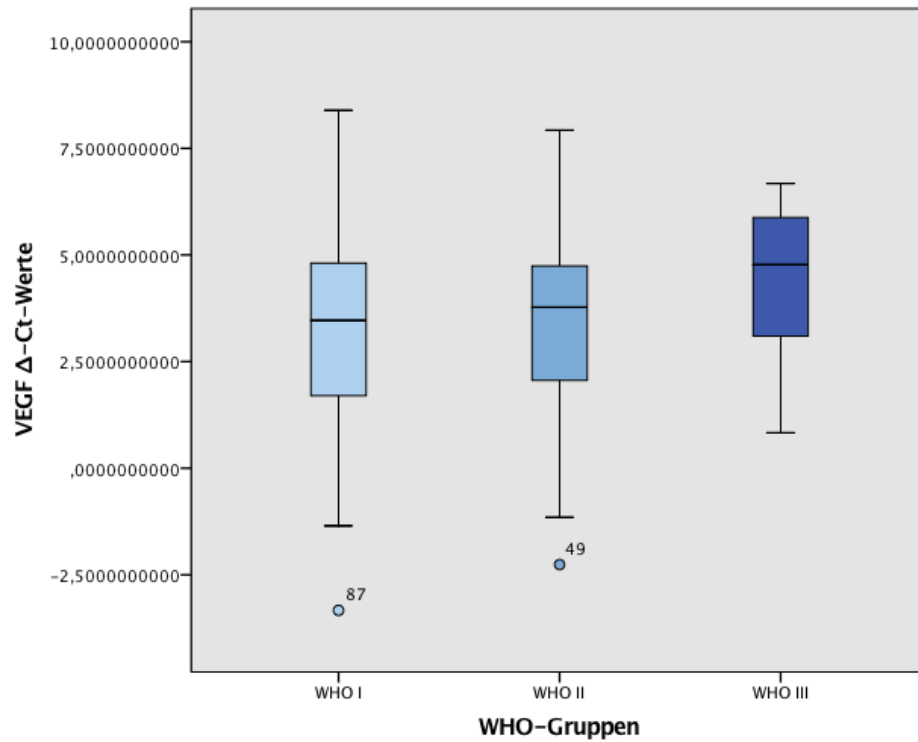


Abbildung 9. **VEGF – Δ -Ct-Werte und WHO-Grade.** Die Boxplots zeigen die Bandbreite der Δ -Ct-Werte bezogen auf VEGF und deren Verteilung auf die WHO-Grade. In WHO-Gruppe I zeigten sich durchschnittlich niedrigere Δ -Ct-Werte als in den WHO-Gruppen II und III (nicht statistisch signifikant)

vs.	transitional	meningothelial	fibrös	atypisch	anaplastisch
transitional	-	p = 0.832	p = 0.103	p = 0.718	p = 0.284
meningothelial	p = 0.832	-	p = 0.011	p = 0.757	p = 0.135
fibrös	p = 0.103	p = 0.011	-	p = 0.051	p = 0.376
atypisch	p = 0.718	p = 0.757	p = 0.051	-	p = 0.301
anaplastisch	p = 0.284	p = 0.135	p = 0.677	p = 0.301	-

Tabelle 10. **Statistische Auswertung (*t-tests*) der VEGF-Expression anhand der Δ -Ct-Werte und der histologischen Subtypen von Meningeomen.** Es wurde der Unterschied in der VEGF-Expression zwischen den histologischen Gruppen auf statistische Signifikanz geprüft. Für die Subtypen angiomatös, chordoid, hirninvasiv, mikrozystisch, psammomatös und sekretorisch konnte aufgrund der geringen Anzahl keine statistisch aussagekräftige Analyse durchgeführt werden. Bei einem p-Wert < 0.05 wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

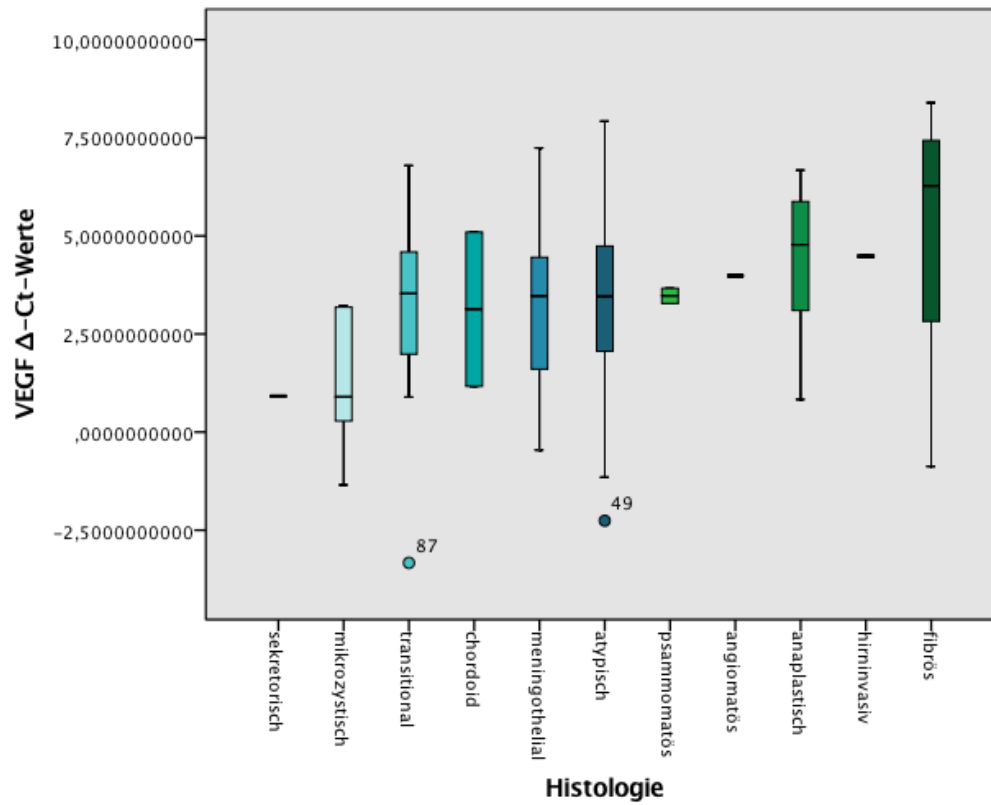


Abbildung 10. **VEGF – Δ -Ct-Werte und histologische Subtypen der Meningeome.** Die Abbildung illustriert die Bandbreite der Δ -Ct-Werte zwischen den histologischen Subgruppen, wobei sich die niedrigsten Δ -Ct-Werte bei mikrozystischen Meningeomen fanden.

B. IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Um die Expression der Zielgene auch auf Proteinebene zu analysieren, sowie die mithilfe der quantitativen Genexpressionsanalyse gewonnenen Ergebnisse zu vergleichen, wurden die Proben immunhistochemisch untersucht.

In einem folgenden Schritt wurde weiterhin die intratumorale Mikrogefäßdichte (MVD) bestimmt und diese mit der VEGF-Expression verglichen. Als weitere Parameter wurden Ki67-Index und Geschlecht untersucht.

I. Ki67-Index

Der Ki67-Index wurde von 103 Proben im Rahmen der Routinediagnostik bestimmt.

Er betrug durchschnittlich 2,95 % bei Meningeomen des WHO-Grads I, 12,33 % bei Meningeomen des WHO-Grads II sowie 25,78 % bei Meningeomen des WHO-Grads III. Dieser Unterschied zwischen den WHO-Graden war statistisch signifikant ($p=0.0001$, Abbildung 11).

Die höchsten Ki67-Indizes zeigten sich mit durchschnittlich 25,78 % bei anaplastischen und 12,69 % bei atypischen Meningeomen, die niedrigsten bei mikrozystischen mit durchschnittlich 2,20 % und psammomatösen mit 2,50 %. Der Unterschied zwischen den histologischen Subgruppen war statistisch signifikant ($p=0.0001$, Abbildung 12).

Bei Frauen betrug der Ki67-Index durchschnittlich 6,61 %, bei Männern 10,15 %. Dieser Unterschied des Ki67-Index zwischen den Geschlechtern war statistisch signifikant ($p=0.046$).

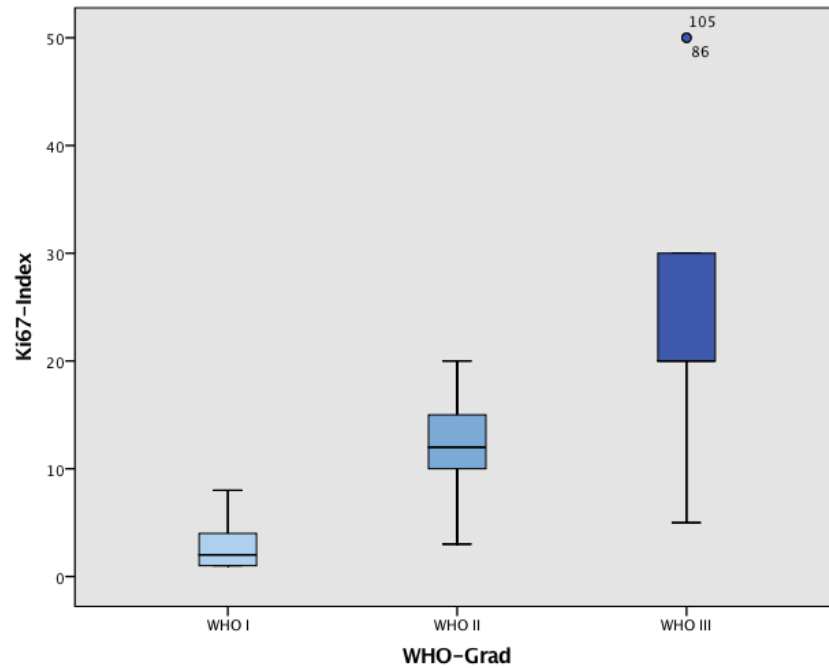


Abbildung 11. **Ki67-Index und WHO-Grade.** Die Abbildung zeigt die Verteilung des Ki67-Index auf die unterschiedlichen WHO-Grade. In Meningeomen eines höheren WHO-Grades zeigt sich ein höherer Ki67-Index.

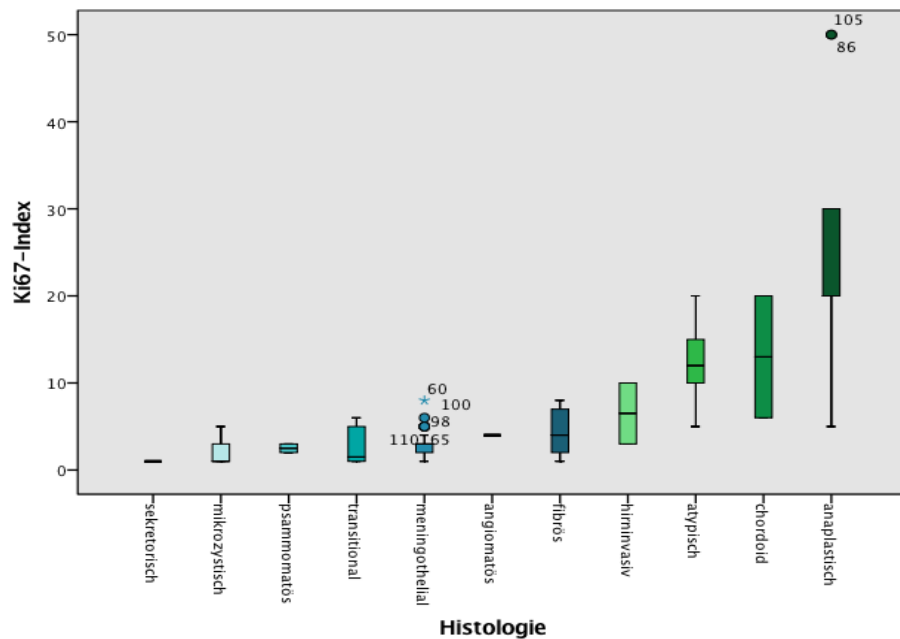


Abbildung 12. **Ki67-Index und histologische Subtypen der Meningeome.** Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Ausprägung des Ki67-Index in den verschiedenen histologischen Gruppen mit höchsten Ki67-Indices bei chordoiden und anaplastischen Meningeomen.

II. Expression von Cyclin D1

Die Expression von Cyclin D1 wurde anhand der nukleären Signale im Tumorgewebe semiquantitativ mithilfe des IRS bestimmt (Abbildung 13).

Von den 110 untersuchten Proben zeigten alle Proben positive Signale für Cyclin D1. 28 Proben waren schwach, 58 mäßig und 24 stark anfärbbar mit Cyclin D1. In 5 Proben waren weniger als 10 Prozent der Zellen, in 57 Proben 10-50 Prozent der Zellen, in 42 Proben 51-80 Prozent der Zellen und in 6 Proben mehr als 80 Prozent der Zellen positiv (Tabelle 11). Werte zwischen minimal 1 und maximal 12 konnten anhand des IRS beobachtet werden. (Tabelle 12).

Cyclin D1-positive Zellen	Häufigkeit	Prozent
< 10%	5	4,5
10 – 50%	57	51,8
51 – 80%	42	38,2
> 80%	6	5,5
negativ	0	0
Cyclin D1 - Färbeintensität	Häufigkeit	Prozent
schwach	28	25,5
mäßig	58	52,7
stark	24	21,8

Tabelle 11. **Anzahl der positiven Zellen und Färbeintensität für Cyclin D1 bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome.** In allen Meningeomen konnte eine Expression von Cyclin D1 nachgewiesen werden.

Cyclin D1 - IRS	Häufigkeit	Prozent
1	5	4,5
2	22	20,0
3	1	0,9
4	28	25,5
6	34	30,9
8	3	2,7
9	14	12,7
12	3	2,7

Tabelle 12. **Häufigkeiten des IRS für Cyclin D1 bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome.** Am häufigsten trat ein IRS von 6 auf, was einer mäßigen Expression von Cyclin D1 entspricht. Bei 5 Meningeomen wurde ein IRS von 1 ermittelt, was einer negativen Expression gleichkommt.

In der Gruppe der Meningeome des WHO-Grads I betrug der IRS im Mittel 4,54, in der Gruppe des WHO-Grads II im Mittel 5,82 und in der Gruppe der Meningeome des WHO-Grads III 5,78. Der Unterschied zwischen den WHO-Graden war statistisch signifikant zwischen den WHO-Graden I und II ($p=0.019$, Abbildung 14). Die Korrelation von Cyclin D1-Expression und IRS war statistisch signifikant ($p=0.022$).

Die Korrelation von Cyclin D1-Expression und Ki67-Index war statistisch signifikant ($p=0.018$, Tabelle 13).

Der durchschnittliche IRS für Cyclin D1 betrug bei Frauen 4,61 und bei Männern 5,92. Die Korrelation zwischen Geschlecht und Cyclin D1-IRS war statistisch signifikant ($p=0.004$).

Der IRS wurde weiterhin in Bezug auf die Histologie analysiert (Abbildung 15, Tabelle 14). Der gemittelte IRS war am höchsten bei chordoiden Meningeomen mit 10,50 und am niedrigsten bei psammomatösen Meningeomen mit 1.

Der Unterschied in der Cyclin D1-Expression zwischen den histologischen Subtypen war statistisch signifikant zwischen transitionalen und meningoethelialen

Meningeomen ($p=0.009$). Weitere signifikante Ergebnisse zeigten sich zwischen transitionalen und fibrösen ($p=0.0003$), zwischen transitionalen und atypischen ($p=0.00001$), zwischen transitionalen und anaplastischen ($p=0.005$).

Außerdem zeigten die Meningeome mit niedrigerem Δ -Ct-Wert in der qRT-PCR höhere IRS. Dieser Zusammenhang erwies sich als statistisch signifikant ($p=0.0001$).

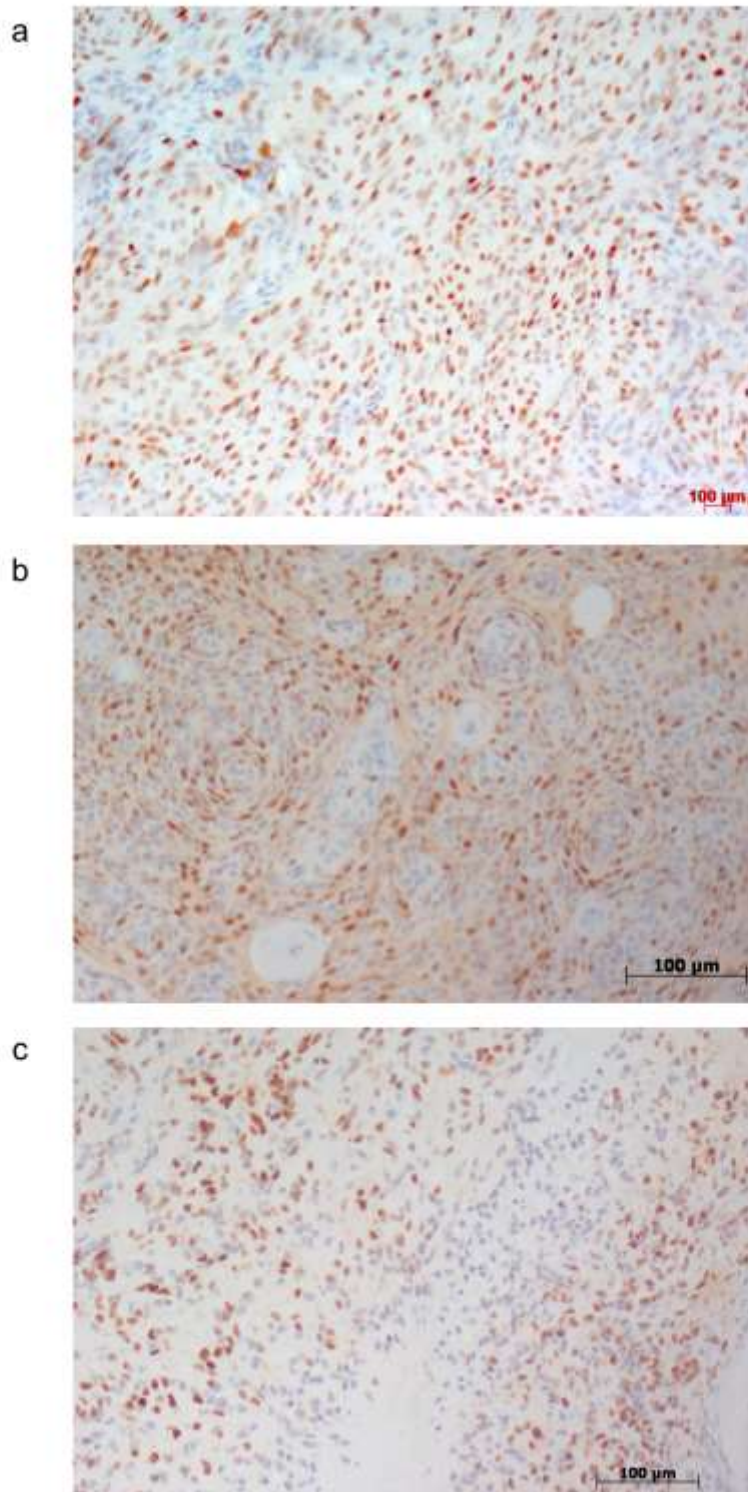


Abbildung 13. **Cyclin D1-Färbung mit unterschiedlicher Färbeintensität und unterschiedlicher Anzahl positiver Zellen.** a zeigt ein meningotheliales Meningeom (WHO-Grad I), IRS: 8; b zeigt ein atypisches Meningeom, IRS: 6; c zeigt ein anaplastisches Meningeom für Cyclin D1, IRS: 9. (orig. obj. 20x)

	Cyclin D1 - IRS
Alter	p = 0.841
Geschlecht	p = 0.004
Ki67-Index	p = 0.018
WHO-Grad I vs. II	p = 0.019
WHO-Grad I vs. III	p = 0.23
WHO-Grad II vs. III	p = 0.96
Δ-Ct-Wert CCND1	p = 0.0001

Tabelle 13: **Statistische Auswertung der Cyclin D1-Expression anhand des IRS mit Bezug auf die verschiedenen WHO-Grade und weitere Parameter.** Es wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen IRS und Alter, Geschlecht, Ki67-Index sowie Δ -Ct-Wert für Cyclin D1 untersucht. Ein statistisch signifikantes Ergebnis besteht bei einem p-Wert < 0.05.

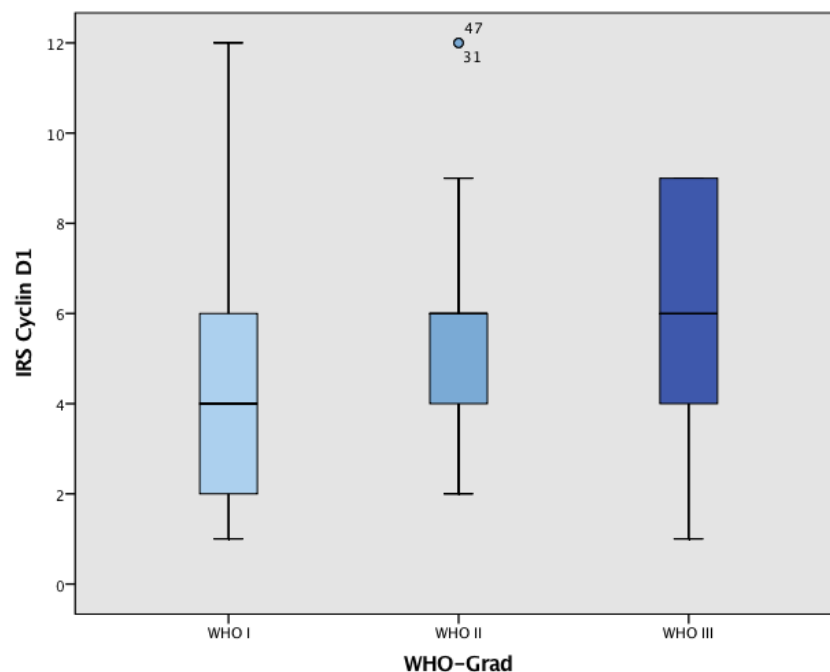


Abbildung 14. **Cyclin D1-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die verschiedenen WHO-Grade.** In höhergradigen Meningeomen fand sich ein durchschnittlich ein höherer IRS.

vs.	transitional	meningothelial	fibrös	atypisch	anaplastisch
transitional	-	p = 0.009	p = 0.0004	p = 0.0001	p = 0.005
meningothelial	p = 0.009	-	p = 0.330	p = 0.311	p = 0.515
fibrös	p = 0.0004	p = 0.330	-	p = 0.427	p = 0.376
atypisch	p = 0.0001	p = 0.311	p = 0.427	-	p = 0.941
anaplastisch	p = 0.005	p = 0.515	p = 0.677	p = 0.941	-

Tabelle 14 **Statistische Auswertung (*t-tests*) der Cyclin D1-Expression anhand des IRS und der histologischen Subtypen von Meningeomen.** Es wurde der Unterschied in der Cyclin D1-Expression zwischen den histologischen Gruppen auf statistische Signifikanz geprüft. Für die Subtypen angiomatös, chordoid, hirninvasiv, mikrozystisch, psammomatös und sekretorisch konnte aufgrund der geringen Anzahl keine statistisch aussagekräftige Analyse durchgeführt werden. Bei einem p-Wert < 0.05 wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

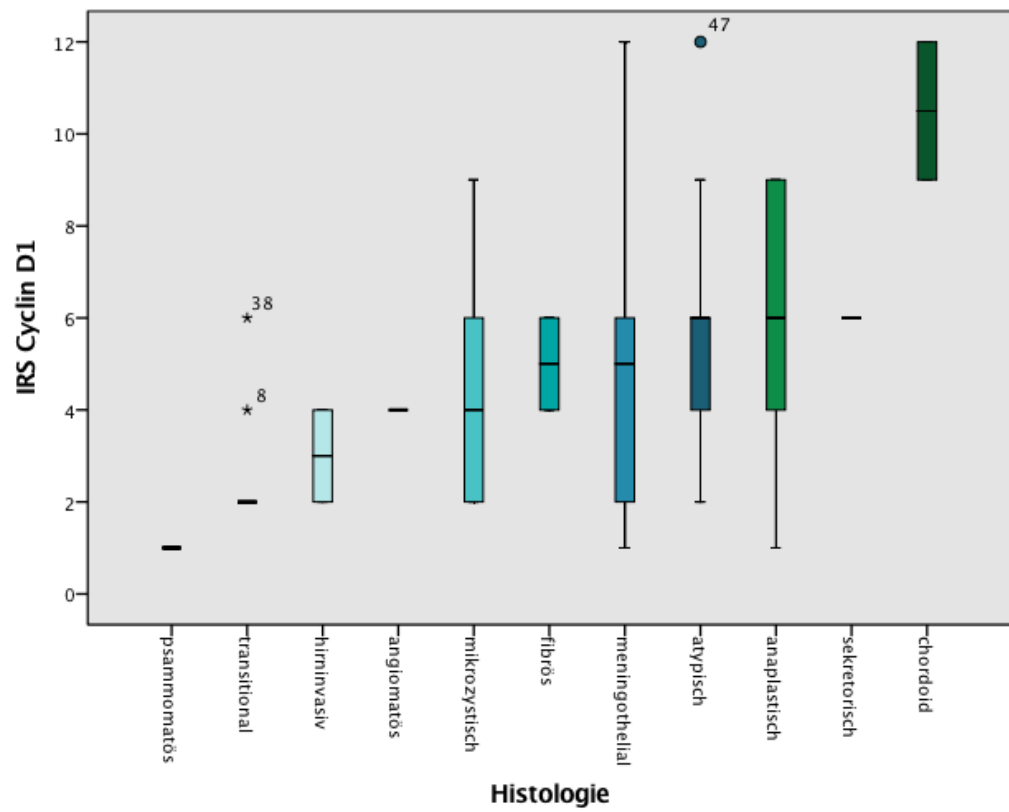


Abbildung 15. Cyclin D1-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die verschiedenen histologischen Subtypen. Die höchsten IRS fanden sich bei chordoiden und anaplastischen Meningeomen.

III. Expression von VEGF

Die Expression von VEGF wurde zunächst anhand der cytoplasmatischen Signale im Tumorgewebe semiquantitativ mithilfe des IRS bestimmt (Abbildungen 16 und 17).

Von den 110 Proben waren 26 negativ und zeigten keine cytoplasmatische Anfärbarkeit für VEGF. Von den 84 cytoplasmatisch VEGF-positiven Proben waren 34 schwach, 35 mäßig und 5 stark positiv anfärbbar. In den 84 cytoplasmatisch VEGF-positiven Proben waren bei 21 Proben weniger als 10 Prozent der Zellen, bei 38 Proben 10-50 Prozent der Zellen, bei 20 Proben 51-80 Prozent der Zellen und bei 5 mehr als 80 Prozent der Zellen positiv (Tabelle 15). Der IRS betrug minimal 1 und maximal 12 (Tabelle 16), in der Gruppe der Meningeome des WHO-Grads I im Mittel 3,34, in der Gruppe des WHO-Grads II im Mittel 3,86 und in der Gruppe des WHO-Grads III im Mittel 2,40. Der Unterschied in der VEGF-Expression zwischen den WHO-Gruppen II und III war statistisch signifikant ($p=0.042$, Tabelle 17, Abbildung 18). Die Korrelation von cytoplasmatischem IRS und WHO-Grad verfehlte jedoch die statistische Signifikanz ($p=0.928$).

VEGF-positive Zellen (cytoplasmatisch)	Häufigkeit	Prozent
< 10%	21	19,1
10 – 50%	38	34,5
51 – 80%	20	18,2
> 80%	5	4,5
negativ	26	23,6
VEGF – Färbeintensität (cytoplasmatisch)		
schwach	44	40
mäßig	35	31,8
stark	5	4,5
negativ	26	23,6

Tabelle 15. Anzahl der (cytoplasmatisch) positiven Zellen und der cytoplasmatischen Färbeintensität für VEGF bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome. In 76,4% der Meningeome konnte ein positives Signal für VEGF nachgewiesen werden.

VEGF – IRS (cytoplasmatisch)	Häufigkeit	Prozent
negativ	26	23,6
1	17	15,5
2	25	22,7
3	5	4,5
4	17	15,5
6	13	11,8
8	3	2,7
9	3	2,7
12	1	0,9

Tabelle 16. **Häufigkeiten des IRS für VEGF (cytoplasmatisch) bezogen auf die Gesamtgruppe der Meningeome.** In 23,6 % der Meningeome konnte gar keine VEGF-Expression nachgewiesen werden. Weitere 15,5 % der Meningeome erhielten einen IRS von 1, was einer negativen Expression gleichkommt. Am häufigsten trat ein IRS von 2 auf, was einer schwachen Expression von VEGF entspricht.

Während der Auswertung der cytoplasmatischen VEGF-Expression fiel auf, dass 59 der Proben zusätzlich zum cytoplasmatischen auch ein nukleäres Signal zeigten. Von diesen 59 zeigten 51 eine schwache und 8 eine mäßige Anfärbbarkeit durch VEGF. In 42 dieser Proben waren weniger als 10 Prozent der Zellen, in 15 Proben 10-50 Prozent der Zellen und in 2 Proben 51-80 Prozent der Zellen positiv.

Auch für diese nukleären Signale wurde der IRS bestimmt. Dieser betrug minimal 1 und maximal 4. In der Gruppe der Meningeome des WHO-Grads I durchschnittlich 1,62, in der Gruppe der Meningeome des WHO-Grads II 1,47 und in der Gruppe der Meningeome des WHO-Grads III 1. Der Unterschied in der nukleären VEGF-Expression zwischen den WHO-Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p=0.70$).

Der cytoplasmatische IRS korrelierte nicht mit dem Ki67-Index ($p=0.65$), ebenso wenig der nukleäre IRS ($p=0.73$).

Beim weiblichen Geschlecht betrug der cytoplasmatische IRS für VEGF durchschnittlich 3,44, beim männlichen Geschlecht durchschnittlich 3,50. Eine Korrelation von Geschlecht und cytoplasmatischem IRS bzw. nukleärem IRS war nicht signifikant ($p=0.547$ bzw. $p=0.804$).

Auch in Bezug auf die unterschiedlichen histologischen Subtypen wurde die cytoplasmatische und nukleäre VEGF-Expression analysiert (Abbildung 19, Tabelle 18). Der cytoplasmatische IRS für VEGF betrug durchschnittlich minimal 2,40 bei anaplastischen und maximal 3,96 bei atypischen Meningeomen. Die VEGF-Expression anhand des cytoplasmatischen IRS war statistisch signifikant unterschiedlich zwischen fibrösen und anaplastischen ($p=0.025$) sowie zwischen atypischen und anaplastischen Meningeomen ($p=0.004$).

Der nukleäre IRS für VEGF betrug durchschnittlich minimal 1,33 bei fibrösen und maximal 2,33 bei mikrozystischen Meningeomen. Der Unterschied in der VEGF-Expression war auf nukleärer ($p=0.53$) Ebene nicht statistisch signifikant.

Ein Zusammenhang zwischen den Δ -Ct-Werten für VEGF und dem cytoplasmatischen oder nukleären IRS konnte nicht beobachtet werden ($p=0.317$ bzw. $p=0.591$).

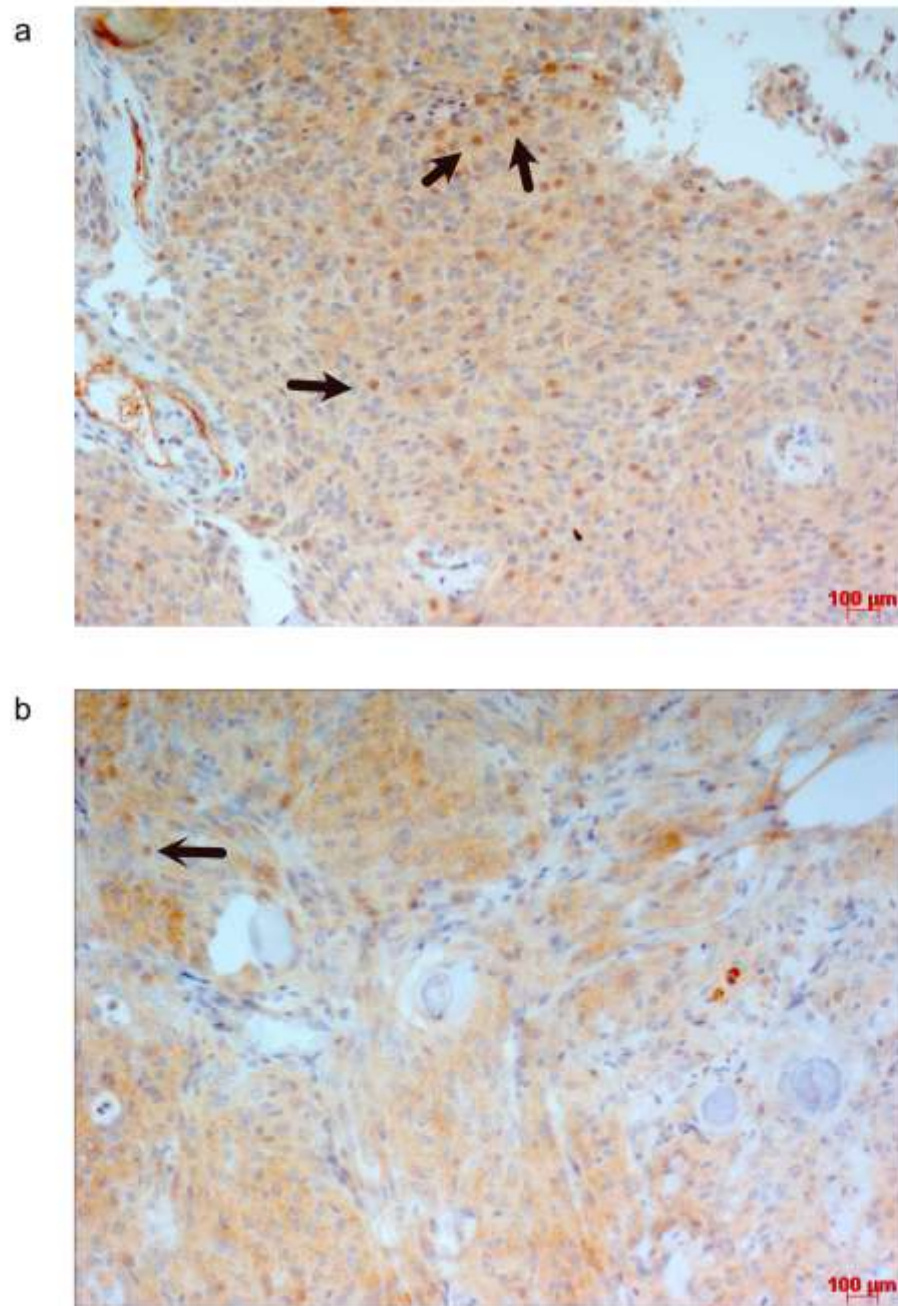


Abbildung 16. **VEGF-Färbung mit unterschiedlicher Färbeintensität und unterschiedlicher Anzahl positiver Zellen, Vergleich zweier Meningeome des gleichen WHO-Grads.** a zeigt ein meningotheliales Meningeom (WHO-Grad I) mit cytoplasmatischen und nukleären Signalen für VEGF, cytopl. IRS: 12, nukl. IRS: 4; b zeigt ein weiteres meningotheliales Meningeom (WHO-Grad I) mit überwiegend cytoplasmatischen Signalen für VEGF, IRS: cytopl. IRS 9, nukl. IRS: 4. Die schwarzen Pfeile zeigen jeweils exemplarisch auf nukleäre Signale für VEGF. (orig. obj. 20x)

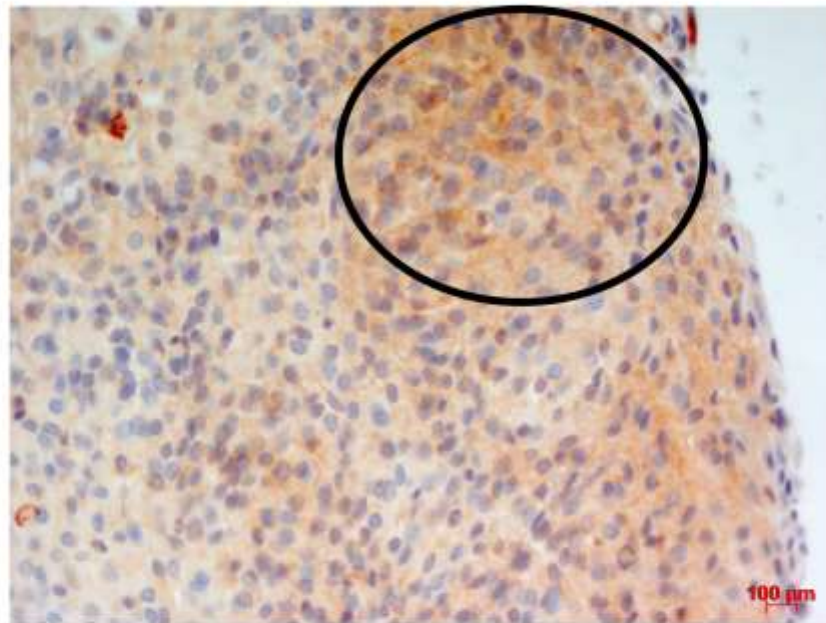


Abbildung 17. **VEGF-Färbung eines atypischen Meningeoms (WHO-Grad II)**. Es zeigen sich überwiegend cytoplasmatische Signale für VEGF, cytopl. IRS: 9, nukl. IRS: 1. Im Oval ein Areal mäßig starker, cytoplasmatischer Färbeintensität, keine nukleäre Signale im Bildausschnitt. (orig. obj. 40x).

	VEGF cytoplasmatischer IRS	VEGF nukleärer IRS
Alter	p = 0.618	p = 0.166
Geschlecht	p = 0.547	p = 0.804
Ki67-Index	p = 0.65	p = 0.73
WHO-Grad I vs. II	p = 0.145	p = 0.99
WHO-Grad I vs. III	p = 0.184	p = 0.293
WHO-Grad II vs. III	p = 0.042	p = 0.221
Δ-Ct-Wert VEGF	p = 0.317	p = 0.591

Tabelle 17. **Statistische Auswertung der cytoplasmatischen und nukleären VEGF-Expression anhand des IRS mit Bezug zu den verschiedenen WHO-Graden und weitere Parameter.** Es wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen IRS und Alter, Geschlecht, Ki67-Index sowie den Δ-Ct-Werten für VEGF untersucht. Ein statistisch signifikantes Ergebnis besteht bei einem p-Wert < 0.05.

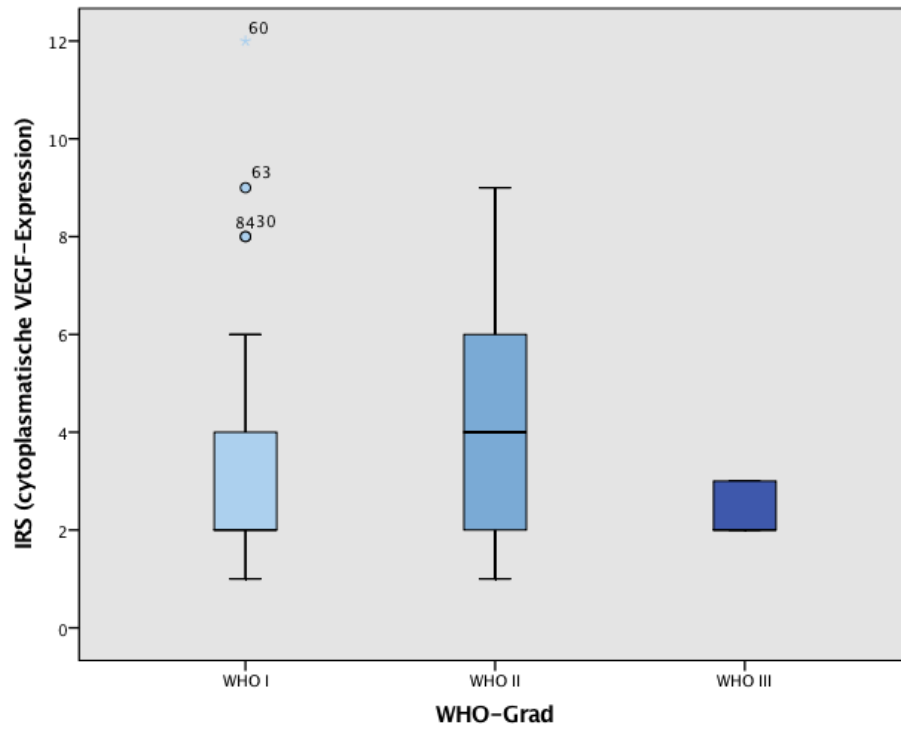


Abbildung 18. **Cytoplasmatische VEGF-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die verschiedenen WHO-Grade.** Die höchsten cytoplasmatischen IRS fanden sich bei Meningeomen des WHO-Grads II.

vs.	transitional	meningothelial	fibrös	atypisch	anaplastisch
transitional	-	p = 0.788	p = 0.149	p = 0.600	p = 0.146
meningothelial	p = 0.788	-	p = 0.155	p = 0.237	p = 0.181
fibrös	p = 0.149	p = 0.155	-	p = 0.025	p = 0.962
atypisch	p = 0.600	p = 0.237	p = 0.025	-	p = 0.004
anaplastisch	p = 0.146	p = 0.181	p = 0.962	p = 0.004	-

Tabelle 18. **Statistische Auswertung (*t*-tests) der VEGF-Expression anhand des cytoplasmatischen IRS und der histologischen Subtypen von Meningeomen.** Es wurde der Unterschied in der VEGF-Expression zwischen den histologischen Gruppen auf statistische Signifikanz geprüft. Für die Subtypen angiomatös, chordoid, hirninvasiv, mikrozystisch, psammomatös und sekretorisch konnte aufgrund der geringen Anzahl keine statistisch aussagekräftige Analyse durchgeführt werden. Bei einem p-Wert < 0.05 wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

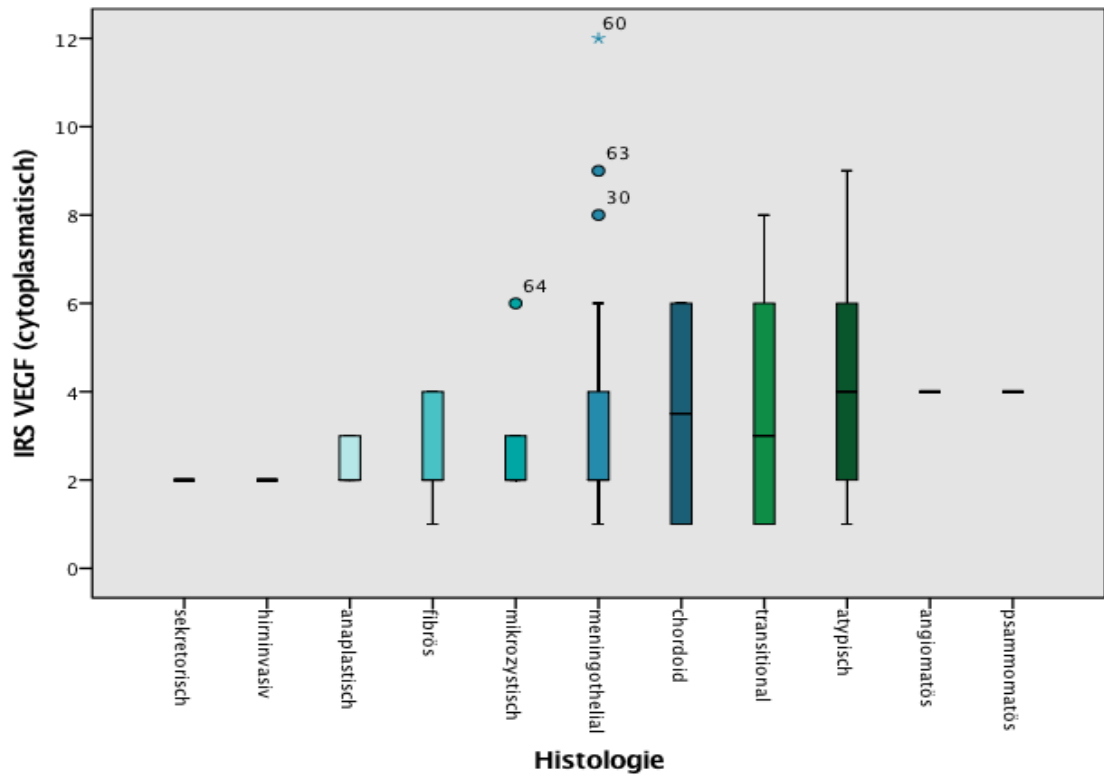


Abbildung 19. Cytoplasmatische VEGF-Expression anhand des IRS mit Verteilung auf die verschiedenen histologischen Subgruppen. Der cytoplasmatische IRS nahm höchste Werte in atypischen, angiomatösen und psammomatösen Meningeomen an.

IV. Auswertung der intratumoralen Mikrogefäßdichte (MVD)

Die MVD wurde durch Aufsuchen eines vaskulären Hotspots bei 200x-Vergrößerung und Auszählen der mit CD31-markierten Mikrogefäße bestimmt (Abbildung 21). Sie betrug minimal 3, maximal 246 und im Mittel 42,19 Mikrogefäße pro vaskulärem Hotspot.

In der Gruppe der Meningeome WHO-Grad I betrug die MVD durchschnittlich 42,15, in der Gruppe der Meningeome WHO-Grad II 42,18 und in der Gruppe der Meningeome WHO-Grad III 42,56. Der Unterschied in der Mikrogefäßdichte zwischen den verschiedenen WHO-Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p=0,99$, Abbildung 20, Tabelle 19).

Bezogen auf die histologischen Subgruppen zeigte die MVD unterschiedliche Ausprägungen (Abbildung 22 und Tabelle 20). Die höchste MVD fand sich bei mikrozystischen Meningeomen mit durchschnittlich 100 Mikrogefäßen und die niedrigste bei fibrösen Meningeomen mit durchschnittlich 24,80 Mikrogefäßen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der intratumoralen Mikrogefäßdichte zeigte sich zwischen meningotheelialen und fibrösen ($p=0,027$), zwischen fibrösen und atypischen ($p=0,01$) Meningeomen (Tabelle 20).

Eine statistisch signifikante Korrelation von MVD und Geschlecht konnte nicht festgestellt werden ($p=0,129$). Bei Frauen betrug die durchschnittliche MVD 38,09, bei Männern durchschnittlich 48,83.

Korrelationen zwischen der VEGF-Expression ($p=0,86$) und der MVD sowie zwischen Cyclin D1-Expression und MVD ($p=0,61$) waren statistisch nicht signifikant.

Eine Korrelation zwischen Ki67-Index und MVD war statistisch nicht signifikant ($p=0,792$, Tabelle 19).

	MVD
Alter	p = 0.751
Geschlecht	p = 0.129
Ki67-Index	p = 0.792
WHO-Grad I vs. II	p = 0.997
WHO-Grad I vs. III	p = 0.978
WHO-Grad II vs. III	p = 0.962

Tabelle 19. **Statistische Auswertung der MVD mit Bezug zu den verschiedenen WHO-Graden und weiterer Parameter.** Es wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen MVD und Alter, Geschlecht sowie Ki67-Index untersucht. Es konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis beobachtet werden.

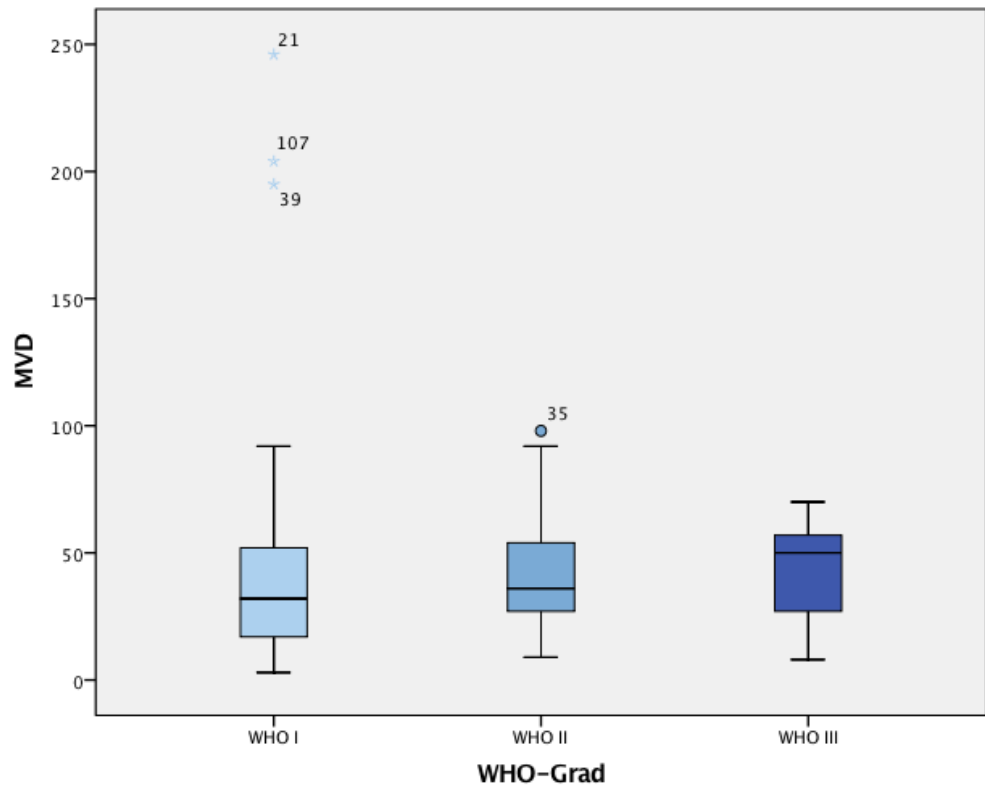


Abbildung 20. **MVD mit Verteilung auf die verschiedenen WHO-Grade.** Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Ausprägung der MVD in den verschiedenen WHO-Graden. In höhergradigen Meningeomen zeigte sich durchschnittlich eine höhere MVD (nicht statistisch signifikant).

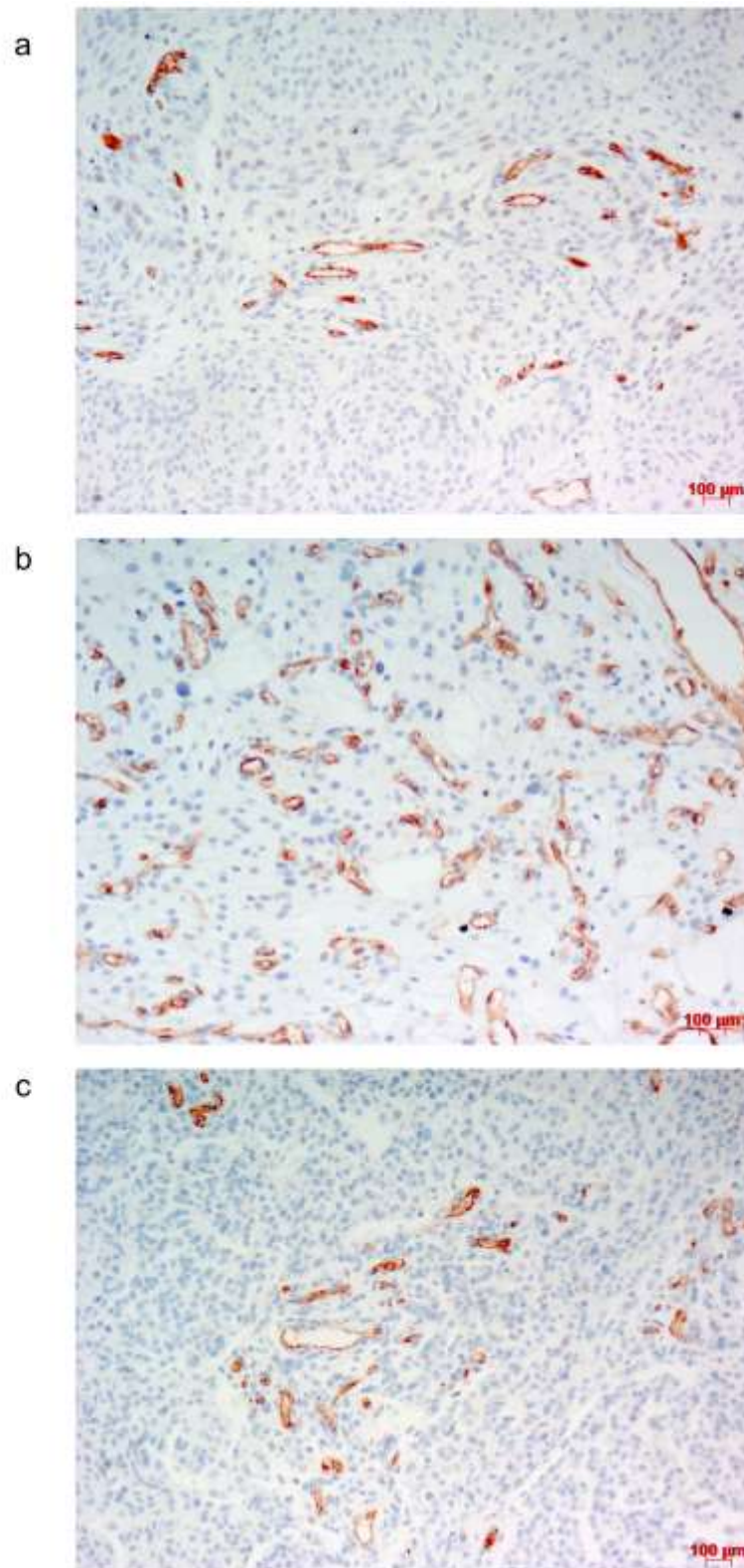


Abbildung 21. **CD31-Färbung mit unterschiedlicher MVD.** a zeigt ein meningotheliales Meningeom (WHO-Grad I), MVD: 54; b zeigt ein mikrozystisches Meningeom (WHO-Grad I), MVD: 204; c zeigt ein anaplastisches Meningeom (WHO-Grad III), MVD: 70. (orig. obj. 20x)

vs.	transitional	meningothelial	fibrös	atypisch	anaplastisch
transitional	-	p = 0.138	p = 0.700	p = 0.053	p = 0.130
meningothelial	p = 0.138	-	p = 0.027	p = 0.621	p = 0.717
fibrös	p = 0.700	p = 0.027	-	p = 0.010	p = 0.060
atypisch	p = 0.053	p = 0.621	p = 0.010	-	p = 0.944
anaplastisch	p = 0.130	p = 0.717	p = 0.060	p = 0.944	-

Tabelle 20 **Statistische Auswertung (*t-tests*) der MVD bezogen auf die verschiedenen histologischen Subtypen von Meningeomen.** Es wurde der Unterschied in der Mikrogefäßdichte (pro neovaskulärem Hotspot) zwischen den histologischen Gruppen auf statistische Signifikanz geprüft. Für die Subtypen angiomatös, chordoid, hirninvasiv, mikrozystisch, psammomatös und sekretorisch konnte aufgrund der geringen Anzahl keine statistisch aussagekräftige Analyse durchgeführt werden. Bei einem p-Wert < 0.05 wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

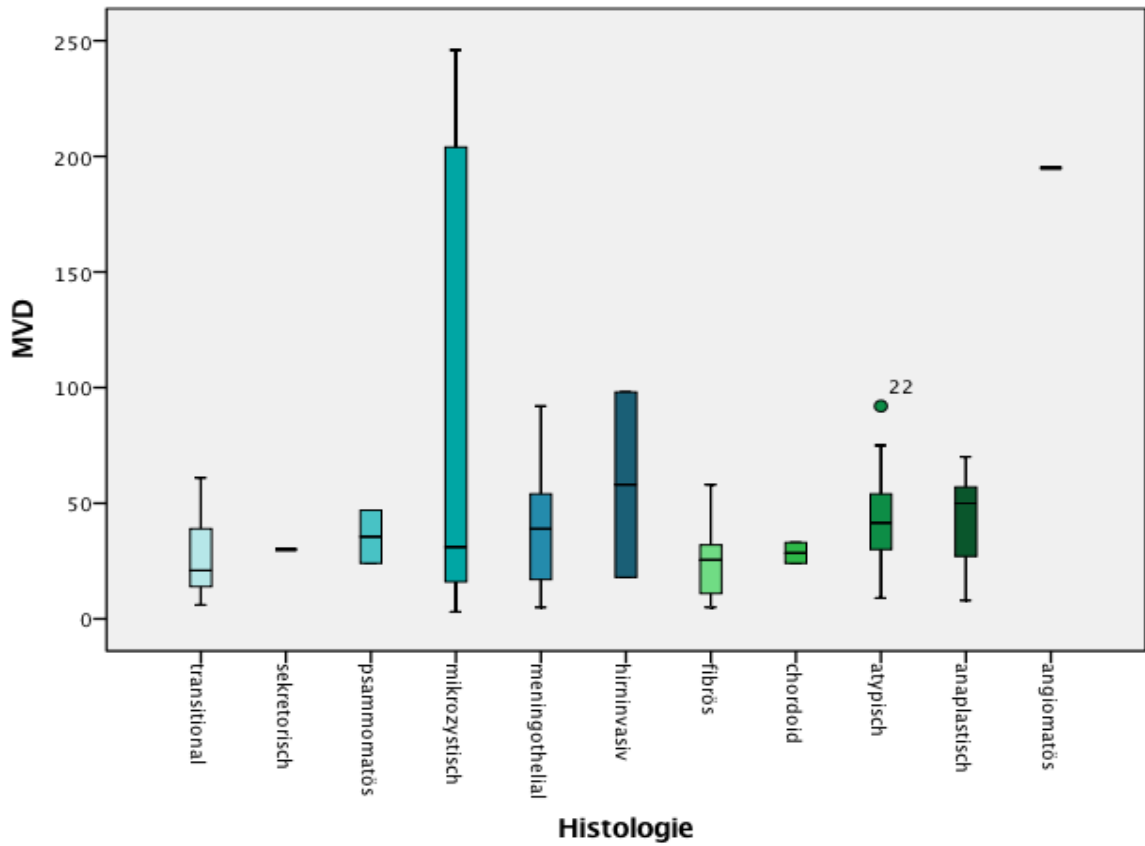


Abbildung 22. **MVD mit Verteilung auf die verschiedenen histologischen Subtypen.** Die höchste MVD fand sich bei mikrozystischen Meningeomen mit durchschnittlich 100 Mikrogefäßen pro neovaskulärem Hotspot.

KAPITEL 4

DISKUSSION

A. VORBEMERKUNG

Meningeome gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren des Menschen. Obwohl die große Mehrheit der Meningeome benigne ist, zeigt ein Teil von ihnen einen malignen Phänotyp, ein aggressives biologisches Verhalten und erhöhtes Rezidivrisiko. Trotz des histomorphologischen Gradings anhand der WHO-Klassifikation und einer Reihe weiterer Prognosefaktoren, wie etwa der Vollständigkeit der chirurgischen Resektion, ist die Einordnung der Meningeome nicht immer einfach und es zeigen sich bisweilen Diskrepanzen zwischen pathomorphologischem Bild und klinischem Verlauf. (KIM et al., 2008; ROCKHILL et al., 2007)

Darüber hinaus stellen insbesondere die aggressiven und/oder rekurrenten Meningeome eine therapeutische Herausforderung dar, der auch heute zum Teil nur unzureichend begegnet werden kann. (MAWRIN et al., 2015)

Cyclin D1 und VEGF sind zwei wichtige Steuergrößen in der Genese und Progression von Tumoren, ihr Studium erweitert das Verständnis von Zellzyklus und Angiogenese, dabei können sie gleichzeitig als Ansatzpunkte für Therapien dienen. (JAYSON et al., 2016; MUSGROVE et al., 2011)

Es ist demnach leicht verständlich, dass sie in den letzten Jahrzehnten mehr und mehr im Blickpunkt der Krebsforschung stehen.

Die vorliegende Arbeit hat den Versuch unternommen, Einblick in Zellzyklusregulation und Angiogenese in Meningeomen und deren wechselseitige Zusammenhänge zu gewinnen. Neben der Betrachtung der WHO-Grade wurde ein besonderer Fokus auf die histologischen Subtypen der Meningeome gelegt, um zu erforschen, ob und wie sich morphologische Unterschiede gegebenenfalls auch in Gen- und Proteinexpression widerspiegeln.

Die Expression von Cyclin D1 als Kardinalpunkt des Zellzyklus wurde bereits in einer Vielzahl von Neoplasien, wie etwa Mantelzell-Lymphomen und Mammakarzinomen, untersucht. Dabei zeigte sich allgemein eine Assoziation mit malignem Phänotyp und dem Schweregrad. (BARTRAM, 2010; CALDON et al., 2006) Auch in Meningeomen wurde die Expression von Cyclin D1 beschrieben und wies einen Zusammenhang mit höherem Malignitätsgrad und erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit auf. (CHENG et al., 2015; MILENKOVIC et al., 2008)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Cyclin D1 sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene evaluiert, um Unterschiede zwischen den verschiedenen WHO-Graden sowie insbesondere den histologischen Subtypen der Meningeome festzustellen.

Als potentester proangiogenetischer Faktor spielt VEGF eine bedeutende Rolle bei der Progression maligner Tumoren. (CARMELIET, 2005a; HARRIS, 1997) Auch in Meningeomen wurde eine Überexpression von VEGF beschrieben und korrelierte insbesondere mit der Entwicklung eines peritumoralen Ödems. (DING et al., 2008; RESZEC et al., 2015)

Ob sich die VEGF-Expression allerdings zwischen den verschiedenen WHO-Graden signifikant unterscheidet, also ein Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und Malignitätsgrad besteht, ist nicht gänzlich klar. Verschiedene Studien gelangten zu unterschiedlichen Ergebnissen und unterschiedlichen Schlüssen. (BAXTER et al., 2014; LEE et al., 2014; LEWY-TRENDA et al., 2003; PIETSCH et al., 1997; PISTOLESI et al., 2004)

Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit eine Analyse der VEGF-Expression auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Untersucht wurde, ob sich die VEGF-Expression zwischen Meningeomen der drei WHO-Grade, beziehungsweise zwischen den histologischen Subtypen unterscheidet.

Um ferner den Einfluss der VEGF-Expression auf die Tumolvaskularisation zu charakterisieren, wurde mit Hilfe einer CD31-Färbung die Mikrogefäßdichte der Meningeome bestimmt.

Bei der Bestimmung der intratumoralen Mikrogefäßdichte (*Microvessel Density*, MVD) nach Weidner et al. handelt es sich um ein bewährtes Mittel zur Quantifizierung der Angiogenese in Neoplasien. (WEIDNER et al., 1991) Zunächst beim Mammakarzinom etabliert, folgte bis heute die Charakterisierung der Vaskularisation einer Vielzahl von Tumoren. Dabei zeigt sich, dass die MVD mit erhöhter Aggressivität, Metastasierung, Rekurrenz und schlechterer Prognose in Verbindung steht. (WEIDNER, 1993, 2004; WEIDNER et al., 1991) Zur Frage, ob VEGF-Expression und MVD in Meningeomen miteinander korrelieren, existieren unterschiedliche Untersuchungen mit diskrepanten Ergebnissen. (BARRESI et al., 2015; LAMSZUS et al., 2000)

Die Annahme, dass in höhergradigen Meningeomen eine höhere Anzahl intratumoraler Mikrogefäße anzutreffen ist, wurde von einigen Studien bestätigt. (BARRESI et al., 2015; BARRESI et al., 2007)

Als weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit muss die semiquantitative Bestimmung der Cyclin D1- bzw. VEGF-Expression anhand des IRS nach Remmele und Stegner genannt werden. (REMMELE, STEGNER, 1987) Der IRS wurde erstmals 1987 als einheitlicher Score zur Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus in Mammakarzinomen beschrieben und hat sich seitdem bewährt.

Bisher folgt die Quantifizierung der Immunreaktivität von Cyclin D1 und VEGF keinem standardisierten Verfahren, so dass praktisch jede Studie ein eigenes Verfahren entwickelte und verwendete. Daher evaluiert die vorliegende Arbeit die Verwendung des IRS zur Bestimmung der Cyclin D1- und VEGF-Expression in Meningeomen.

B. BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE

I. Cyclin D1

Um anhand von Cyclin D1 Einblick in die Regulation des Zellzyklus von Meningeomen zu erlangen, hat die vorliegende Arbeit seine Expression sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene untersucht.

Die Ergebnisse der quantitativen Genexpressionsanalyse und immunhistochemischen Untersuchungen waren kongruent, mit einem statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen niedrigem Δ -Ct-Wert und hohem IRS. Erwartungsgemäß zeigten höhergradige Meningeome durchschnittlich niedrigere Δ -Ct-Werte sowie einen höheren IRS für Cyclin D1. Alle untersuchten Proben zeigten eine Expression von Cyclin D1, was bereits von Milenkovic et al. auf immunhistochemischer Ebene beschrieben wurde. (MILENKOVIC et al., 2008)

Die Expression von Cyclin D1 unterschied sich statistisch signifikant zwischen den WHO-Graden I und II. Ebenso war die Korrelation von WHO-Grad und Cyclin D1-Expression statistisch signifikant. Demnach findet sich eine erhöhte Cyclin D1-Expression in höhergradigen und damit biologisch aggressiveren Meningeomen. Diese Resultate stimmen überein mit den von Cheng et al. 2015 veröffentlichten Ergebnissen, welche ebenfalls sowohl die mRNA- als auch Proteinebene betrachteten. (CHENG et al., 2015)

Bisher publizierte Studien beschränkten sich darauf den Zusammenhang von WHO-Grad und Cyclin D1-Expression zu untersuchen, doch in der vorliegenden Arbeit konnten bezogen auf die unterschiedlichen histologischen Subtypen ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede in der Expression von Cyclin D1 beobachtet werden. Dabei zeigten sich die niedrigsten Δ -Ct-Werte und höchsten IRS bei chordoiden Meningeomen sowie die höchsten Δ -Ct-Werte und niedrigsten IRS bei psammomatösen Meningeomen. Beim chordoiden Meningeom (WHO-Grad II) handelt es sich um eine seltene Variante, die besonders für ihr Auftreten bei jungen Erwachsenen, höhere Rezurrenzzraten und Aggressivität bekannt ist. (TENA-SUCK et al., 2010) Dies unterstreicht den Zusammenhang von Cyclin D1-Expression und histologischem Subtyp.

Bei Betrachtung der Cyclin D1-Expression innerhalb der unterschiedlichen histologischen Subtypen zeigte sich außerdem, dass sie in atypischen Meningeomen

höher ist als in transitionalen Meningeomen. Dieser Unterschied ist sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene statistisch signifikant. Morphologisch sind atypische Meningeome im klinischen Alltag mitunter nicht leicht von zellreichen benignen z. B. transitionalen Varianten zu unterscheiden. Wenn ein ungewöhnliches histomorphologisches Bild vorliegt, ohne dass jedoch sämtliche Kriterien für ein atypisches Meningeom erfüllt sind, könnte die immunhistochemische Färbung für Cyclin D1 als weiterer Surrogatmarker neben dem Ki67-Index die Diagnose erleichtern oder aber bei der Einschätzung des Rezidivrisikos hilfreich sein.

Weiterhin zeigte sich bei transitionalen und fibrösen bzw. transitionalen und meningotheelialen Meningeomen auf Proteinebene eine statistisch signifikant unterschiedliche Expression von Cyclin D1. Transitionale Meningeome exprimierten dabei weniger Cyclin D1 als fibröse oder meningotheleiale Meningeome. Dies legt die Überlegung nahe, dass es sich bei transitionalen Meningeomen nicht nur phänotypisch, sondern in Bezug auf Cyclin D1 auch auf molekularer Ebene um eine eigenständige Einheit handelt und nicht etwa um eine Art „Mischform“ aus meningotheelialen und fibrösen Meningeomen. Hierzu sind jedoch noch weitere Studien mit einer größeren Fallzahl erforderlich.

Der Einsatz des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner als Methode zur Quantifizierung der Cyclin D1-Expression in Meningeomen erscheint unter Berücksichtigung der guten Korrelation von mRNA- und Proteinebene als geeignet. (REMMELE, STEGNER, 1987) Dies ist deshalb von Relevanz, da die Cyclin D1-Expression, wie von Kim et al. oder Cheng et al. beschrieben, nicht nur mit dem Tumorgrad, sondern auch der Rekurrenz korreliert. (CHENG et al., 2015; KIM et al., 2014)

Um als prädiktiver Marker in der Meningeom-Diagnostik routinemäßig eingesetzt zu werden, bedarf es für Cyclin D1 eines standardisierten und gut reproduzierbaren Quantifizierungswerkzeugs. In den vorbezeichneten Studien wurde die Immunreaktivität recht unterschiedlich bestimmt, woraus sich eine nur beschränkte Vergleichbarkeit ergibt. Der IRS ist zweifelsfrei ein solches Werkzeug, wenngleich an dieser Stelle sicherlich weitere Studien bezüglich der Interobservervariabilität und – reliabilität sowie des Nutzens von Cyclin D1 in der Routinediagnostik von Meningeomen erforderlich sind.

Der enge Zusammenhang von Cyclin D1-Expression und Proliferationsaktivität anhand des Ki67-Index wurde u. a. von Milenkovic et. al beschrieben. (MILENKOVIC et al., 2008) Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich ein solcher, statistisch signifikanter Zusammenhang von Cyclin D1-Expression und Ki67-Index sowohl auf der mRNA- als auch Proteinebene.

II. VEGF

Diese Arbeit hat die Angiogenese in Meningeomen anhand der Expression von VEGF auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Dabei zeigte die quantitative Genexpressionsanalyse bezogen auf die Δ -Ct-Werte keinen Unterschied in der VEGF-Expression zwischen den WHO-Graden. Höhergradige Meningeome fielen in der vorliegenden Arbeit zwar durch höhere Δ -Ct-Werte – und damit niedrigere Expression von VEGF – auf, diese Beobachtungen hatten jedoch keine statistische Signifikanz.

Die immunhistochemischen Untersuchungen und die Auswertung anhand des (cytoplasmatischen) IRS zeigten in 60,9 % der Fälle eine positive Expression von VEGF. Dies ist vereinbar mit Ergebnissen aus den Arbeiten von Pistolesi et al, Lee et al. und Iwado et al. Deren Zahlen schwankten zwischen 51 und 80%, was auf die unterschiedliche Herangehensweise bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zurückzuführen sein kann. (IWADO et al., 2012; LEE et al., 2014; PISTOLESI et al., 2004)

Die VEGF-Expression anhand des IRS unterschied sich statistisch signifikant zwischen Meningeomen der Gruppen II und III, wobei in den WHO-Graden I und II durchschnittlich höhere IRS als im WHO-Grad III beobachtet wurden.

Eine ähnliche Beobachtung machten 2013 Baxter et al. als sie in einer immunhistochemischen Studie erfassten, dass Meningeome mit steigendem Malignitätsgrad keine VEGF-Expression mehr aufwiesen. (BAXTER et al., 2014)

Obwohl auch entsprechend der Δ -Ct-Werte für VEGF Meningeome des WHO-Grads III eine eher geringere VEGF-Expression aufwiesen, wurde für den Zusammenhang von (cytoplasmatischem) IRS und den Δ -Ct-Werten für VEGF die statistische Signifikanz verfehlt ($p=0.317$). Die These, dass ein Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und WHO-Grad besteht, konnte somit nicht untermauert werden.

Insgesamt stehen die vorliegenden Ergebnisse aber durchaus im Einklang mit früheren Studien von Pistolesi et al., Lewy-Trenda et al. oder Pietsch et al., welche ebenfalls keinen Zusammenhang von VEGF-Expression und WHO-Grad, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachweisen konnten. (LEWY-TRENDA et al., 2003; PIETSCH et al., 1997; PISTOLESI et al., 2004)

Auch in einer umfangreichen Untersuchung von Nassehi et al. wurden keine Unterschiede in der VEGF-Expression zwischen den WHO-Graden festgestellt. (NASSEHI et al., 2011)

Lediglich Lee et al. zeigten, im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen und zitierten Arbeiten, in einer 2014 veröffentlichten, immunhistochemischen Studie an 88 Meningeomen, dass die VEGF-Expression sich innerhalb der verschiedenen WHO-Grade unterscheidet und der Tumorgrad mit der VEGF-Expression korreliert. (LEE et al., 2014)

Auch die Unterschiede zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen wurden in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, wobei Meningeome mit einem niedrigen Δ -Ct-Wert und entsprechend erhöhter VEGF-Expression (beispielsweise mikrozystische Meningeome) nicht unbedingt einen hohen IRS aufwiesen. Dies wirft die Frage auf, ob der IRS sich grundsätzlich zur Quantifizierung der VEGF-Expression eignet oder ob hier andere Methoden besser geeignet sind.

Fibröse Meningeome zeigten eine niedrigere Expression von VEGF auf mRNA-Ebene als meningotheliale Meningeome. Obwohl beide der WHO-Gruppe I zugeordnet werden, unterschieden sie sich in Bezug auf VEGF statistisch signifikant auf molekularer Ebene. Fibröse Meningeome zeigen wesentlich häufiger eine Monosomie 22 bzw. eine biallelische Inaktivierung von NF2. Dabei sind diese Einflüsse bedeutender für die Entstehung fibröser Phänotypen als meningothelialer Meningeome. (HANSSON et al., 2007; LEE et al., 2019)

Die Expression von VEGF unterschied sich zwischen sekretorischen und hirninvasiven Meningeomen. Dieser Umstand ist interessant, da beide stark mit einem peritumoralen Ödem assoziiert sind und dies, obwohl sie unterschiedlichen WHO-Graden, nämlich WHO-Grad 1 respektive 2, zugeordnet werden. (ADELI et al., 2018; OSAWA et al., 2013) Es ist denkbar, dass die höhere Expression von VEGF in sekretorischen Meningeomen dabei durch das erhöhte Vorkommen VEGF-positiver

Mastzellen, welche mit dem peritumoralem Ödem korrelieren, bedingt ist. (TIRAKOTAI et al., 2016)

Es unterschied sich auch die Expression von VEGF anhand des IRS zwischen fibrösen und atypischen Meningeomen statistisch signifikant. Die atypischen Meningeome zeigten darüber hinaus auch eine ausgeprägtere Tumolvaskularisation, was auf die erhöhte VEGF-Expression zurückzuführen sein könnte.

Ferner wurde in 59 Meningeomen zusätzlich eine nukleäre, schwach bis mäßige Anfärbbarkeit für VEGF nachgewiesen. Dieses Phänomen wurde in ähnlicher Form von Clara et al. beschrieben, die in einer Studie an Glioblastomen ebenfalls für VEGF ein nukleäres Signal beobachteten. In der genannten Studie entpuppte sich die nukleäre Positivität der Glioblastomzellen für VEGF sogar als unabhängiger Prognosefaktor. (CLARA et al., 2014)

In der vorliegenden Arbeit jedoch konnte für die nukleäre Positivität der Meningeomzellen keine Assoziation mit einem anderen der untersuchten Faktoren, wie etwa dem Malignitätsgrad, ermittelt werden. Die nukleäre Anreicherung von VEGF selbst findet, wie von Lejbkovic et al. gezeigt, Hypoxieinduziert statt und ist wahrscheinlich auf Transport und/oder Synthese des VEGF im Zellkern zurückzuführen, wenngleich die Funktion des nukleären VEGF bisher weitestgehend unverstanden ist. (LEJBKOWICZ et al., 2005)

Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene konnte die Annahme bestätigt werden, dass ein Zusammenhang von VEGF-Expression und Ki67-Index besteht. Ein Nachweis dieses Zusammenhangs konnte auch in einer von Baxter et al. vorgelegten, immunhistologischen Studie nicht erbracht werden. (BAXTER et al., 2014) Dennoch widerspricht dies einer Arbeit von Preusser et al. in welcher gezeigt wurde, dass VEGF-Expression auf mRNA-Ebene und höhere Ki67-Indizes signifikant miteinander korrelieren. (PREUSSER et al., 2012) Ebenso konnte diese Korrelation in einer Kohortenstudie von Abdelzaher et al. bestätigt werden. (ABDELZAHER et al., 2013)

Auf mRNA-Ebene zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation von VEGF- und Cyclin D1-Expression. Gegenteiliges war von Lee et al. auf Proteinebene in einer immunhistologischen Studie beobachtet worden, in welcher Cyclin D1 mit keinem weiteren Parameter, darunter auch VEGF-Expression, korrelierte. (LEE et al., 2014) Jedoch wurde von Shintani et al. in Experimenten mit Tumorzelllinien von

Ösophagus-Karzinomen beschrieben, dass das Einbringen eines Antisense Cyclin D1 cDNA Konstrukts in diese Zelllinien zur Verringerung von VEGF-Produktion und Kanzerogenität führt. (SHINTANI et al., 2002) Ähnliche Experimente von Yasui et al. zeigten in Kolonkarzinom-Zelllinien, verursacht durch Antisense Cyclin D1, ebenfalls eine Verringerung der VEGF-Produktion. Weiterhin konnte von ihnen gezeigt werden, dass in Zellkultur-Experimenten an Endothelzellen aus der Nabelschnur (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) VEGF zu einer erhöhten Cyclin D1-Expression und Zellwachstum führte. (YASUI et al., 2006)

Wenngleich nur teilweise übertragbar, legen die genannten Arbeiten und vorliegenden Ergebnisse doch nahe, dass Cyclin D1 die Expression von VEGF beeinflusst und damit, dass Zellzyklus und Angiogenese eng miteinander verknüpft sind. Dies spiegelt sich in dieser Studie in Meningeomen in der positiven Korrelation von VEGF-Expression und Cyclin D1-Expression auf mRNA-Ebene wider. Darüber hinaus bedeutet es, dass Cyclin D1 die Malignität von Tumoren möglicherweise nicht nur durch seine Rolle als Regulator des Zellzyklus, sondern auch durch seine Wirkung auf die VEGF-Produktion, mitbestimmt.

III. MVD

Die Bestimmung der intratumoralen Mikrogefäßdichte (*Microvessel Density*, MVD) zeigte bezogen auf die WHO-Grade keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dies steht im klaren Gegensatz zur Annahme, dass die MVD mit dem Tumordgrad assoziiert ist und widerspricht Arbeiten von Pistolessi et al., Lewy-Trenda et al. und Barresi et al., welche eine Korrelation von MVD und WHO-Grad belegen konnten. (BARRESI et al., 2015; BARRESI et al., 2007; LEWY-TRENDA et al., 2003; PISTOLESI et al., 2004)

Statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch in Bezug auf die verschiedenen histologischen Subtypen ermittelt werden, wobei sich die höchste MVD bei mikrozystischen und die niedrigste MVD bei fibrösen Meningeomen fand. Die höchste MVD fand sich also in Meningeomen, die sich völlig benigne verhalten. Dies steht im Einklang mit zwei Veröffentlichungen von Barresi et al., die ebenfalls höhere intratumorale Mikrogefäßdichten in mikrozystischen Meningeomen im Vergleich zu fibrösen oder transitionalen Meningeomen feststellten. (BARRESI et al., 2015; BARRESI et al., 2007)

Wie schon die Cyclin D1-Expression unterschied sich das Ausmaß der Mikrovaskularisation zwischen fibrösen und atypischen Meningeomen statistisch signifikant. Auch die MVD könnte also bei Grenzfällen in Kombination mit anderen Markern, etwa mit Cyclin D1, zur Entscheidungsfindung zwischen WHO-Grad I und II herangezogen werden.

Ferner unterschied sich das Ausmaß der Tumolvaskularisation zwischen meningotheelialen und fibrösen Meningeomen statistisch signifikant, wobei sie in fibrösen Meningeomen geringer war. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen die Expression von VEGF betreffend. Es ist denkbar, dass sich die unterschiedliche Expression auf mRNA-Ebene in Gestalt einer unterschiedlichen Tumolvaskularisation niederschlägt.

Dennoch konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang von MVD und VEGF-Expression in Meningeomen in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt werden. Die Vaskularisation nahm in Meningeomen mit höherem Malignitätsgrad nicht signifikant zu, zeigte lediglich einen leichten Trend in diese Richtung. Dies widerspricht der These, dass Meningeome mit hohem Malignitätsgrad einem VEGF-abhängigen angiogenen Switch unterliegen. Ähnliches beschrieb Lamszus et al. in einer 2000 veröffentlichten Studie. (LAMSZUS et al., 2000) Dem entgegen fanden Pistolesi et al., Barresi et al. und Salokorpi et al. in vergleichbaren Studien eine deutliche Korrelation von MVD und VEGF-Expression. (BARRESI et al., 2015; PISTOLESI et al., 2004; SALOKORPI et al., 2013)

Trotz der Mehrheit der Autoren, die einen Zusammenhang von Tumolvaskularisation und VEGF-Expression in Meningeomen postulieren, kann in Zusammenschau mit den vorliegenden Ergebnissen, ein solcher nicht als eindeutig erwiesen betrachtet werden.

Es bestand weiterhin kein Zusammenhang von Cyclin D1-Expression und MVD. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Korrelation von Cyclin D1- und VEGF-Expression ist ein solcher Zusammenhang dennoch denkbar. Insbesondere da Yasui et al. in einer Studie an Endothelzellen aus der Nabelschnur (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) in vitro und vivo mittels Antisense Cyclin D1 eine Hemmung der VEGF-vermittelten Angiogenese erreichten und damit gerade einen solchen implizierten. (YASUI et al., 2006)

Die MVD zeigte darüber hinaus keinen statistischen Zusammenhang mit dem Ki67-Index der untersuchten Meningeome, womit die These einer Assoziation von erhöhter Tumorgefäßdichte mit erhöhter Wachstumsfraktion anhand der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden kann. Allerdings wurde ein solcher Zusammenhang von MVD und Ki67-Index in Meningeomen von Pistolessi et al. nachgewiesen und auch Panagopoulos et al. zeigten eine positive Korrelation von MVD und Ki67-Index. (PANAGOPOULOS et al., 2008; PISTOLESI et al., 2004)

C. LIMITATIONEN UND METHODISCHE EINSCHRÄNKUNGEN

Nicht alle Resultate der vorliegenden Arbeit entsprechen dem, was bis dato in der Literatur bekannt ist und als zu erwarten galt. Insbesondere was die VEGF-Expression und MVD angeht, wurden Ergebnisse erzielt, die sich teils als konträr zu bislang publizierten Resultaten entpuppten. Hierfür kommt eine Reihe von Gründen infrage.

Zum einen ist die geringe Fallzahl an Meningeomen des WHO-Grads III zu nennen. Bei lediglich 11 (qRT-PCR) bzw. 9 (IHC) Fällen muss ein Unterschied im Vergleich der WHO-Grade recht groß sein, um eine statistische Signifikanz zu erreichen. Weiterhin sind minimale Pipettierfehler, welche möglicherweise das Ergebnis der qRT-PCR beeinflusst haben könnten, nicht völlig auszuschließen. Um diesen Faktor möglichst zu limitieren wurde jedoch stets eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Da die vorliegende Arbeit sich primär mit den Unterschieden der Cyclin D1- und VEGF-Expression innerhalb der Entität der Meningeome beschäftigt, lässt sie darüber hinaus keine Aussage über das Verhältnis der Zielgen-Expression zum Normalgewebe zu.

Der fehlende Zusammenhang von MVD und Tumorgrad in der vorliegenden Arbeit war sicher unerwartet. Eine Reihe von Studien hatte eben diese Korrelation bereits beschrieben, darunter beispielsweise Pistolesi et al. oder Barresi et al. (BARRESI et al., 2015; BARRESI et al., 2007; LEWY-TRENDA et al., 2003; PISTOLESI et al., 2004)

Es ließ sich zwar ein gewisser Trend in Richtung erhöhter MVD in Meningeomen mit höherem WHO-Grad erkennen, jedoch war dieser weit von der statistischen Signifikanz entfernt. Zum Teil kann dieses abweichende Ergebnis sicherlich auch mit der geringen Größe der Gruppe der Meningeome des WHO-Grads III zusammenhängen. Bei näherer Betrachtung der vorgenannten Arbeiten fällt auf, dass lediglich Lewy-Trenda et al. – wie auch in der vorliegenden Arbeit – einen CD31-Antikörper zur Sichtbarmachung der intratumoralen Mikrogefäße benutzten. Durch den Einsatz verschiedener endothelialer Marker wie CD31, CD34, Faktor VIII oder CD105 zur Bestimmung der Tumervaskularisation entsteht eine Variation der MVD.

Dieser wird noch zusätzlich durch die unterschiedliche Anzahl der ausgezählten Hotspots moduliert. Ferner birgt der Einsatz eines CD31-Antikörpers tatsächlich einige Nachteile. Zum einen kommt es häufig zu einem fixationsbedingten Antigenverlust, zum

anderen kann es zu Kreuzreaktionen insbesondere mit Plasmazellen kommen. (NICO et al., 2008)

Darüber hinaus ist die Spezifität anderer Marker, wie etwa Faktor VIII von Pistolessi et al. verwendet, höher. (PISTOLESSI et al., 2004) Es gelingt weiterhin mit den panendothelialen Marker wie CD31, CD34 und Faktor VIII keine Unterscheidung von ruhendem und proliferierendem Endothel, weshalb Barresi et al. auf CD105 zur Bestimmung zurückgriffen und so eine wesentlich spezifischere MVD mit prognostischer Relevanz bestimmen konnten. (BARRESI et al., 2007) Die gleichen Gründe können auch Einfluss auf den nicht erbrachten Zusammenhang von MVD und VEGF-Expression oder Ki67-Index genommen haben.

Auch bezüglich des Antikörpers gegen VEGF sind einige Nachteile feststellbar, welche möglicherweise die immunhistologischen Ergebnisse beeinflusst haben. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper handelt es sich um einen VG-1-Klon. Dies ist ein Antikörper, der standardmäßig die Isoformen 121, 165 und 189 von VEGF bindet und vielfach mit hoher Spezifität in immunhistochemischen Studien eingesetzt wurde. (TURLEY et al., 1998)

Jedoch wurde eben dieser VG1-Klon in einer Studie an formalinfixiertem und Paraffin-eingebettetem Plazenta- und Kolonkarzinomgewebe von Van der Loos et al. als nur bedingt für Immunhistochemie und Western Blot geeignet identifiziert. In der genannten Arbeit zeigte der VG1-Klon insgesamt eine schwache Immunreaktivität und teils widersprüchliches Färbeverhalten. Darüber hinaus kam es zu einer starken, unspezifischen Färbereaktion mit Fibrinablagerungen. Auch diese Faktoren können die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der VEGF-Expression beeinflusst haben. (VAN DER LOOS et al., 2010)

Zudem stellt sich die Frage, ob die MVD allein sich grundsätzlich als Prognoseparameter bei Meningeomen eignet. Gerade mikrozystische oder angiomatöse Meningeome zeigen eine hohe intratumorale Gefäßdichte bei gleichzeitig benignem biologischen Verhalten. Somit stellt die große histomorphologische Bandbreite der Meningeome selbst eine Limitation der Aussagekraft der MVD dar.

D. AUSBLICK

Seit Harvey Cushing in seiner 1938 erschienen Monographie erstmals eine umfassende Abhandlung über die Klassifikation, das Auftreten und die chirurgische Resektion der Meningeome lieferte, hat sich das Wissen um ihre Entstehung und ihr Verhalten stetig erweitert. (CUSHING, 1938; ROCKHILL et al., 2007)

Neben den in Meningeomen bekannten genetischen Aberrationen, wie beispielweise der Monosomie 22, stehen heute besonders solche Entdeckungen im Fokus der Forschung, welche potenziell therapeutisch genutzt werden können. Als solche therapeutischen Ansatzpunkte bieten sich insbesondere Steuergrößen des Zellzyklus oder der Angiogenese wie Cyclin D1 und VEGF an.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Expression von Cyclin D1 zwischen den verschiedenen WHO-Graden unterscheidet und ein Zusammenhang mit dem Malignitätsgrad besteht.

Innerhalb der unterschiedlichen histologischen Subtypen zeigte sich, dass Cyclin D1 potenziell die Fähigkeit besitzt zwischen den Subtypen des WHO-Grades I insbesondere zwischen fibrösen, transitionalen und meningotheelialen Meningeomen zu unterscheiden.

Weiterhin war die Cyclin D1-Expression in atypischen Meningeomen höher als in transitionalen. Dieser sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene statistisch signifikante Umstand könnte genutzt werden, um bei grenzwertigen histomorphologischen Befunden die diagnostische Entscheidung zu erleichtern. Darüber hinaus kann die niedrigere Expression von Cyclin D1 in transitionalen Meningeomen ein Hinweis darauf sein, dass es sich innerhalb des morphologischen Spektrums der Meningeome auch molekular um eine eigene Entität handelt.

In Verbindung mit der MVD könnte Cyclin D1 anhand des IRS zudem in Fällen außergewöhnlicher Histologie bei der Unterscheidung von fibrösen und atypischen Meningeomen, und damit von WHO-Grad I und II, hilfreich sein.

Da Cyclin D1 bereits in früheren Studien von Milenkovic et al. und Cheng et al. als möglicher Proliferationsmarker bzw. Prognosemarker bezeichnet wurde, könnte sein Einsatz in der Routinediagnostik zukünftig Aussagen über den Krankheitsverlauf

erleichtern und Therapieentscheidungen beeinflussen. (CHENG et al., 2015; MILENKOVIC et al., 2008)

Als Mittel zur immunhistochemischen Auswertung der Cyclin D1-Expression hat sich zudem der IRS nach Remmele und Stegner bewährt und könnte künftig als Standardverfahren eingesetzt werden. Ferner könnten auf diesem Wege jene Patienten identifiziert werden, die – zum Beispiel aufgrund ihres erhöhten Rezidivrisikos – von einer systemischen Therapie profitieren würden. Idealerweise handelt es sich bei Cyclin D1 auch um ein mögliches Ziel künftiger *targeted therapies*. (MUSGROVE et al., 2011)

Der hier dargestellte Zusammenhang von Cyclin D1- und VEGF-Expression sollte ebenfalls noch eingehender analysiert werden. Bisher wurde dieser Zusammenhang von Zellzyklus und Angiogenese lediglich von Shintani et al. und Yasui et al. beleuchtet. Dabei zeigte sich, dass der Einsatz von Antisense Cyclin D1 nicht nur die Krebszelle selbst anvisiert, sondern seine Wirkung auch über eine Verringerung der VEGF-Expression und somit der Beeinflussung der Mikroumgebung des Tumors ausübt. (SHINTANI et al., 2002; YASUI et al., 2006) Daraus ließe sich schlussfolgern, dass durch eine Hemmung der Cyclin D1-Expression die Krebszelle gleich an mehreren Stellen therapeutisch attackiert wird und sich somit ein größtmöglicher Effekt entfaltet. Insbesondere für höhergradige und/oder rezurrenente Meningeome könnte dies ein erfolgversprechender Ansatz sein, da sie auch heute häufig nur unzureichend behandelbar sind.

Der Stellenwert der VEGF-Expression in Meningeomen bedarf sicherlich noch weiterer Forschung. Ob Meningeome eines höheren Malignitätsgrads einen VEGF-vermittelten angiogenen Switch durchlaufen, kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden. Es wäre wünschenswert, hierzu noch einmal eine größere Gruppe von Meningeomen, mit einem größeren Anteil an Meningeomen des WHO-Grads III, zu untersuchen.

Bei der Betrachtung der histologischen Subtypen fiel auf, dass sich die VEGF-Expression zwischen meningoethelialen und fibrösen Meningiomen maßgeblich unterscheidet, so dass es naheliegt, dass diese Subtypen einer unterschiedlichen molekularen Triggerung unterliegen. Welche Mechanismen hier zugrunde liegen muss jedoch Gegenstand weiterer Studien sein. Denkbar ist, dass beispielsweise die im fibrösen Phänotyp häufig vorkommende Deletion des NF2-Gens eine Rolle spielt. Hansson et. al zeigten bereits, dass Veränderungen, die das NF2-Gen betreffen einen größeren Einfluss

auf die Entstehung von fibrösen gegenüber meningotheelialen Meningeomen haben. (HANSSON et al., 2007)

Besonders interessant ist die in dieser Arbeit beschriebene, nukleäre Anfärbbarkeit der Tumorzellen für VEGF. Dieses wenig verstandene Phänomen wurde bisher lediglich von Clara et al. in Glioblastomen beschrieben und konnte dort sogar als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert werden. (CLARA et al., 2014) Wenngleich der in dieser Arbeit bestimmte nukleäre IRS der Meningeome für VEGF nicht mit dem Malignitätsgrad korrelierte, so ist doch denkbar, dass auch in Meningeomen die nukleäre Positivität für VEGF ein Anhaltspunkt für eine schlechtere Prognose ist. Diese Überlegungen bedürfen noch weiterer Untersuchung.

In einigen Studien wurde bereits die Wirksamkeit von Bevacizumab bei Patienten mit bereits ausgeschöpften Therapieoptionen erprobt und gezeigt, dass hierdurch das progressionsfreie Überleben verlängert werden kann. (DASANU et al., 2019; LOU et al., 2012; NAYAK et al., 2012) Ob sich der IRS zur Bestimmung der VEGF-Expression eignet um eben jene Patienten zu erfassen, die in besonderem Maße von dieser Therapie profitieren würden, kann eine lohnenswerte Aufgabe für zukünftige Untersuchungen sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1. (2002) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, Vol 259., de Gruyter).
2. Abdelzaher E, El Deeb NM, Gowil AG, Yehya A (2013) Biological and demographic profile of meningiomas in a cohort of Egyptian patients: impact on tumor recurrence. *ScientificWorldJournal* 2013:375139
3. Abry E, Thomassen IO, Salvesen OO, Torp SH (2010) The significance of Ki-67/MIB-1 labeling index in human meningiomas: a literature study. *Pathol Res Pract* 206:810-815
4. Adeli A, Hess K, Mawrin C, Streckert EMS, Stummer W, Paulus W, Kemmling A, Holling M, Heindel W, Schmidt R, Spille DC, Sporns PB, Brokinkel B (2018) Prediction of brain invasion in patients with meningiomas using preoperative magnetic resonance imaging. *Oncotarget* 9:35974-35982
5. Alama A, Barbieri F, Spaziante R, Bruzzo C, Dadati P, Dorcaratto A, Ravetti JL (2007) Significance of cyclin D1 expression in meningiomas: a preliminary study. *J Clin Neurosci* 14:355-358
6. Antinheimo J, Sankila R, Carpen O, Pukkala E, Sainio M, Jaaskelainen J (2000) Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology* 54:71-76
7. Augustin HG, Christian S (2010). Angiogenese. In *Die Onkologie*, Hiddemann W, RC Bartram, eds. (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg), pp. 291-307.
8. Barresi V, Cerasoli S, Vitarelli E, Tuccari G (2007) Density of microvessels positive for CD105 (endoglin) is related to prognosis in meningiomas. *Acta Neuropathol* 114:147-156
9. Barresi V, Vitarelli E, Tuccari G, Barresi G (2011) MMP-9 expression in meningiomas: a prognostic marker for recurrence risk? *J Neurooncol* 102:189-196
10. Barresi V, Caffo M, Branca G, Vitarelli E, Tuccari G (2015) The density of microvessels positive for Wilms' tumour-1 protein (WT-1) is an independent predictor of recurrence risk in meningiomas. *Brain Tumor Pathol* 32:202-209
11. Barresi V, Caffo M, Tuccari G (2016) Classification of human meningiomas: lights, shadows, and future perspectives. *J Neurosci Res*
12. Bartram CR (2010). Genetische Grundlagen der Kanzerogenese. In *Die Onkologie*, Hiddemann W, RC Bartram, eds. (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg), pp. 67-127.
13. Baxter DS, Orrego A, Rosenfeld JV, Mathiesen T (2014) An audit of immunohistochemical marker patterns in meningioma. *J Clin Neurosci* 21:421-426
14. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH (1993) Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 91:153-159
15. Bindal R, Goodman JM, Kawasaki A, Purvin V, Kuzma B (2003) The natural history of untreated skull base meningiomas. *Surg Neurol* 59:87-92; discussion 92
16. Birk DM, Barbato J, Mureebe L, Chaer RA (2008) Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation. *Vasc Endovascular Surg* 42:517-530
17. Bommas-Ebert UT, P; Voss, R (2006) *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*, Vol 2. Auflage).
18. Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA (2006) Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 97:261-274
19. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439
20. Carmeliet P (2005a) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3:4-10
21. Carmeliet P (2005b) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936

22. Cheng G, Zhang L, Lv W, Dong C, Wang Y, Zhang J (2015) Overexpression of cyclin D1 in meningioma is associated with malignancy grade and causes abnormalities in apoptosis, invasion and cell cycle progression. *Med Oncol* 32:439
23. Christov C, Lechapt-Zalcman E, Adle-Biassette H, Nachev S, Gherardi RK (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptor flt-1 in microcystic meningiomas. *Acta Neuropathol* 98:414-420
24. Clara CA, Marie SK, de Almeida JR, Wakamatsu A, Oba-Shinjo SM, Uno M, Neville M, Rosemberg S (2014) Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1alpha in human glioblastoma. *Neuropathology* 34:343-352
25. Clauss M (2000) Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 26:561-569
26. Commins DL, Atkinson RD, Burnett ME (2007) Review of meningioma histopathology. *Neurosurg Focus* 23:E3
27. Cushing H, Eisenhardt, L (1938) Meningiomas. Their classification, regional behaviour, life history, and surgical end results.
28. Dasanu CA, Alvarez-Argote J, Limonadi FM, Codreanu I (2019) Bevacizumab in refractory higher-grade and atypical meningioma: the current state of affairs. *Expert Opin Biol Ther* 19:99-104
29. De Monte F (1995) Current management of meningiomas. *Oncology (Williston Park)* 9:83-91, 96; discussion 96, 99-101
30. Deb P, Boruah D, Dutta V (2012) Morphometric study of microvessels in primary CNS tumors and its correlation with tumor types and grade. *Microvasc Res* 84:34-43
31. Diehl JA (2002) Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 1:226-231
32. Ding YS, Wang HD, Tang K, Hu ZG, Jin W, Yan W (2008) Expression of vascular endothelial growth factor in human meningiomas and peritumoral brain areas. *Ann Clin Lab Sci* 38:344-351
33. Donnellan R, Chetty R (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 51:1-7
34. Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G, Keshet E (2002) Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *Embo j* 21:1939-1947
35. Dvorak HF (2015) Tumor Stroma, Tumor Blood Vessels, and Antiangiogenesis Therapy. *Cancer J* 21:237-243
36. Fakhrijou A, Meshkini A, Shadravan S (2012) Status of Ki-67, estrogen and progesterone receptors in various subtypes of intracranial meningiomas. *Pak J Biol Sci* 15:530-535
37. Fathi AR, Roelcke U (2013) Meningioma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:337
38. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186
39. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004) Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5439-5447
40. Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP (2002) Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem* 277:16464-16469
41. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellstrom AR, Mantripragada K, Jarbo C, Mathiesen T, Dumanski JP (2007) Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 8:16
42. Harris AL (1997) Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* 349 Suppl 2:Sii13-15
43. Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W (1998) [Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations]. *Dtsch Med Wochenschr* 123:259-265
44. Henn W, Urbschat S (1998) Genetische Grundlagen der Entstehung von Hirntumoren. *Der Radiologe* 38:898-903
45. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5:1806-1814

46. Hsi ED, Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A (1996) Cyclin D1/PRAD1 expression in parathyroid adenomas: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1736-1739
47. Iplikcioglu AC, Hatiboglu MA, Ozek E, Ozcan D (2014) Is progesteron receptor status really a prognostic factor for intracranial meningiomas? *Clin Neurol Neurosurg* 124:119-122
48. Iwado E, Ichikawa T, Kosaka H, Otsuka S, Kambara H, Tamiya T, Kondo S, Date I (2012) Role of VEGF and matrix metalloproteinase-9 in peritumoral brain edema associated with supratentorial benign meningiomas. *Neuropathology* 32:638-646
49. Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL (2016) Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* 388:518-529
50. Kim JK, Diehl JA (2009) Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 220:292-296
51. Kim MS, Kim KH, Lee EH, Lee YM, Lee SH, Kim HD, Kim YZ (2014) Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas. *J Neurosurg* 121:1189-1200
52. Kim Y, Bochem N, Ketter R, Henn W, Feiden W (2008) [Meningiomas: multiparametric approach for risk stratification and grading]. *Pathologie* 29:428-433
53. Kotecha RS, Pascoe EM, Rushing EJ, Rorke-Adams LB, Zwerdling T, Gao X, Li X, Greene S, Amirjamshidi A, Kim SK, Lima MA, Hung PC, Lakhdar F, Mehta N, Liu Y, Devi BI, Sudhir BJ, Lund-Johansen M, Gjerris F, Cole CH, Gottardo NG (2011) Meningiomas in children and adolescents: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 12:1229-1239
54. Lamszus K, Lengler U, Schmidt NO, Stavrou D, Ergun S, Westphal M (2000) Vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor, basic fibroblast growth factor, and placenta growth factor in human meningiomas and their relation to angiogenesis and malignancy. *Neurosurgery* 46:938-947; discussion 947-938
55. Lee S, Karas PJ, Hadley CC, Bayley VJ, Khan AB, Jalali A, Sweeney AD, Klisch TJ, Patel AJ (2019) The Role of Merlin/NF2 Loss in Meningioma Biology. *Cancers (Basel)* 11
56. Lee SH, Lee YS, Hong YG, Kang CS (2014) Significance of COX-2 and VEGF expression in histopathologic grading and invasiveness of meningiomas. *Apmis* 122:16-24
57. Lejbkowitz F, Goldberg-Cohen I, Levy AP (2005) New horizons for VEGF. Is there a role for nuclear localization? *Acta Histochem* 106:405-411
58. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309
59. Lewy-Trenda I, Omulecka A, Janczukowicz J, Papierz W (2003) The morphological analysis of vasculature and angiogenic potential in meningiomas: immunoexpression of CD31 and VEGF antibodies. *Folia Neuropathol* 41:149-153
60. Locopo N, Fanelli M, Gasparini G (1998) Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52:159-173
61. Longstreth WT, Jr., Dennis LK, McGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD (1993) Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer* 72:639-648
62. Lou E, Sumrall AL, Turner S, Peters KB, Desjardins A, Vredenburgh JJ, McLendon RE, Herndon JE, 2nd, McSherry F, Norfleet J, Friedman HS, Reardon DA (2012) Bevacizumab therapy for adults with recurrent/progressive meningioma: a retrospective series. *J Neurooncol* 109:63-70
63. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 114:97-109
64. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803-820
65. Louis DN OH, Wiestler OD, Cavenee WK (2016) World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System (Lyon, France, International Agency for Research on Cancer (IARC)).

66. Marzec M, Kasprzycka M, Lai R, Gladden AB, Wlodarski P, Tomczak E, Nowell P, Deprimo SE, Sadis S, Eck S, Schuster SJ, Diehl JA, Wasik MA (2006) Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood* 108:1744-1750
67. Mawrin C, Chung C, Preusser M (2015) Biology and clinical management challenges in meningioma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*:e106-115
68. Maxwell M, Galanopoulos T, Antoniades H (1996) Expression of cyclin D1 proto-oncogene mRNA in primary meningiomas may contribute to tumorigenesis. *Int J Oncol* 9:1213-1217
69. McColl BK, Stacker SA, Achen MG (2004) Molecular regulation of the VEGF family -- inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Apmis* 112:463-480
70. Milenkovic S, Marinkovic T, Jovanovic MB, Djuricic S, Berisavac, II, Berisavac I (2008) Cyclin D1 immunoreactivity in meningiomas. *Cell Mol Neurobiol* 28:907-913
71. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL (2011) Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 11:558-572
72. Nassehi D, Dyrbye H, Andresen M, Thomsen C, Juhler M, Laursen H, Broholm H (2011) Vascular endothelial growth factor A protein level and gene expression in intracranial meningiomas with brain edema. *Apmis* 119:831-843
73. Nayak L, Iwamoto FM, Rudnick JD, Norden AD, Lee EQ, Drappatz J, Omuro A, Kaley TJ (2012) Atypical and anaplastic meningiomas treated with bevacizumab. *J Neurooncol* 109:187-193
74. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D (2008) Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 23:601-607
75. Ohtsubo M, Roberts JM (1993) Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259:1908-1912
76. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-371
77. Osawa T, Tosaka M, Nagaishi M, Yoshimoto Y (2013) Factors affecting peritumoral brain edema in meningioma: special histological subtypes with prominently extensive edema. *J Neurooncol* 111:49-57
78. Panagopoulos AT, Lancellotti CL, Veiga JC, de Aguiar PH, Colquhoun A (2008) Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol* 89:73-87
79. Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4:1317-1326
80. Pestell RG (2013) New roles of cyclin D1. *Am J Pathol* 183:3-9
81. Pietsch T, Valter MM, Wolf HK, von Deimling A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD (1997) Expression and distribution of vascular endothelial growth factor protein in human brain tumors. *Acta Neuropathol* 93:109-117
82. Pistolesi S, Boldrini L, Gisfredi S, De Ieso K, Camacci T, Caniglia M, Lupi G, Leocata P, Basolo F, Pingitore R, Parenti G, Fontanini G (2004) Angiogenesis in intracranial meningiomas: immunohistochemical and molecular study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:118-125
83. Preusser M, Hassler M, Birner P, Rudas M, Acker T, Plate KH, Widhalm G, Knosp E, Breitschopf H, Berger J, Marosi C (2012) Microvascularization and expression of VEGF and its receptors in recurring meningiomas: pathobiological data in favor of anti-angiogenic therapy approaches. *Clin Neuropathol* 31:352-360
84. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7:1559-1571
85. Remmele W, Stegner HE (1987) [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 8:138-140
86. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14:1669-1679

87. Reszec J, Hermanowicz A, Rutkowski R, Turek G, Mariak Z, Chyczewski L (2015) Expression of MMP-9 and VEGF in meningiomas and their correlation with peritumoral brain edema. *Biomed Res Int* 2015:646853
88. Richterova R, Jurecekova J, Evinova A, Kolarovszki B, Benco M, De Riggo J, Sutovsky J, Mahmood S, Racay P, Dobrota D (2014) Most frequent molecular and immunohistochemical markers present in selected types of brain tumors. *Gen Physiol Biophys* 33:259-279
89. Rockhill J, Mrugala M, Chamberlain MC (2007) Intracranial meningiomas: an overview of diagnosis and treatment. *Neurosurg Focus* 23:E1
90. Roux FX, Nataf F, Pinaudeau M, Borne G, Devaux B, Meder JF (1996) Intraspinal meningiomas: review of 54 cases with discussion of poor prognosis factors and modern therapeutic management. *Surg Neurol* 46:458-463; discussion 463-454
91. Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T, Nass D (2002) Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J Neurosurg* 97:1078-1082
92. Salokorpi N, Yrjana S, Tuominen H, Karttunen A, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Heikkinen E, Koivukangas J (2013) Expression of VEGF and collagen XVIII in meningiomas: correlations with histopathological and MRI characteristics. *Acta Neurochir (Wien)* 155:989-996; discussion 996
93. Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 55:1189-1193
94. Sato K, Schauble B, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Infrequent alterations of the p15, p16, CDK4 and cyclin D1 genes in non-astrocytic human brain tumors. *Int J Cancer* 66:305-308
95. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C (2005) Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 46:481-489
96. Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677
97. Shintani M, Okazaki A, Masuda T, Kawada M, Ishizuka M, Doki Y, Weinstein IB, Imoto M (2002) Overexpression of cyclin D1 contributes to malignant properties of esophageal tumor cells by increasing VEGF production and decreasing Fas expression. *Anticancer Res* 22:639-647
98. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:768-772
99. Spiegl-Kreinecker S, Lotsch D, Neumayer K, Kastler L, Gojo J, Pirker C, Pichler J, Weis S, Kumar R, Webersinke G, Gruber A, Berger W (2018) TERT promoter mutations are associated with poor prognosis and cell immortalization in meningioma. *Neuro Oncol* 20:1584-1593
100. Sternberg SS (1997) *Histology for Pathologists, Second Edition* edn, Lippincott-Raven.
101. Tena-Suck ML, Collado-Ortiz MA, Salinas-Lara C, Garcia-Lopez R, Gelista N, Rembao-Bojorquez D (2010) Chordoid meningioma: a report of ten cases. *J Neurooncol* 99:41-48
102. Tirakotai W, Mennel HD, Lapanich S, Sure U, Bertalanffy H, Celik I (2016) The Possible Role of Mast Cells and VEGF in Peritumoural Oedema of Secretory Meningioma. *J Med Assoc Thai* 99 Suppl 3:S8-115
103. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266:11947-11954
104. Turley H, Scott PA, Watts VM, Bicknell R, Harris AL, Gatter KC (1998) Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. *J Pathol* 186:313-318
105. van der Loos CM, Meijer-Jorna LB, Broekmans ME, Ploegmakers HP, Teeling P, de Boer OJ, van der Wal AC (2010) Anti-human vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody selection for immunohistochemical staining of proliferating blood vessels. *J Histochem Cytochem* 58:109-118
106. Wang Y, Li W, Jing N, Meng X, Zhou S, Zhu Y, Xu J, Tao R (2020) Apatinib in recurrent anaplastic meningioma: a retrospective case series and systematic literature review. *Cancer Biology & Therapy* 21:583-589

107. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8
108. Weidner N (1993) Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 10:302-313
109. Weidner N (1995) Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 36:169-180
110. Weidner N (2004) The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow. *Am J Clin Pathol* 122:675-677
111. Weidner N (2008) Chapter 14. Measuring intratumoral microvessel density. *Methods Enzymol* 444:305-323
112. Wiemels J, Wrensch M, Claus EB (2010) Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol* 99:307-314
113. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V (2015) Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res* 9:Xe01-xe05
114. Yasui M, Yamamoto H, Ngan CY, Damdinsuren B, Sugita Y, Fukunaga H, Gu J, Maeda M, Takemasa I, Ikeda M, Fujio Y, Sekimoto M, Matsuura N, Weinstein IB, Monden M (2006) Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization. *Clin Cancer Res* 12:4720-4729
115. Yoo H, Baia GS, Smith JS, McDermott MW, Bollen AW, Vandenberg SR, Lamborn KR, Lal A (2007) Expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase 9 is associated with anaplastic phenotypes in meningiomas. *Clin Cancer Res* 13:68-75
116. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216:84-85
117. Zang KD (1982) Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 6:249-274
118. Zang KD (2001) Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93:207-220
119. Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe PE (2002) A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis* 5:35-44

PUBLIKATIONEN

Wiedemann LDS, Ebert E, Ludwig N, Kim YJ

**Expression of Cyclin D1 and VEGF in Meningioma: Correlation With
Histopathological Grading**

Meeting Abstract

Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie. 60th Annual Meeting of
the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy (DGNN). Berlin, 26.-
28.08.2015. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015.

doi: 10.3205/15dgnn69

Mein außerordentlicher Dank gilt Prof. Y.J. Kim, der mich in diesem langen Prozess unermüdlich begleitet hat und dessen Wissen und Rat von unschätzbarem Wert für diese Arbeit waren.

Ich danke Dr. E. Ebert (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Leitung: Prof. Dr. R. M. Bohle) für ihre Hilfe beim Erlernen der verschiedenen Techniken molekularbiologischer und anderer Natur, für ihr stets offenes Ohr sowie ihren unerschütterlichen Optimismus.

Dr. N. Ludwig (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum des Saarlandes, Leitung: Prof. Dr. E. Meese) danke ich für ihre hervorragende Unterstützung und Anleitung zu einem Zeitpunkt als diese Arbeit noch ganz am Beginn stand.

Dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter Leitung von Prof. R. M. Bohle und seinen Mitarbeitern gilt mein vorzüglicher Dank für die Unterstützung und Ermöglichung der Experimente, die diese Arbeit ausmachen.

Meiner Familie, speziell meiner Mutter, danke ich für das bedeutende Interesse an dieser Arbeit und ihrer Fertigstellung. Darüber hinaus gilt besonderer Dank meinem Ehemann für seine vortreffliche Unterstützung in allen Dingen, seinem Humor und seine unaufgeregte Beharrlichkeit.

Und zuletzt danke ich Ihnen, dem Leser dieser Dissertation.

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

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Brüssel, im September 2020



Lisanne D. S. Wiedemann