Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen

Abteilung Hirnforschung

Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

Über die Reaktion von Astrozyten auf hirninvasive Meningeome

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Lena Margarete Zeltner

aus

Stuttgart

2010

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Frau Professor Dr. A. Bornemann
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Ruck

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 1
1.1 Meningen und Kortexoberfläche 1
1.1.1 Anatomie der Meningen 1
1.1.2 Die extrazelluläre Matrix der Kortexoberfläche und die pial-gliale Grenzmembran 3
1.2 Pathologie der Meningeome 4
1.2.1 Ätiologie, Epidemiologie, Immunhistologie und Klinik 4
1.2.2 Histolopathologie, Grading und Hirninvasion 7
1.2.3 Therapie und Prognose 11
1.3 Astrozyten an der Tumor-Hirn-Grenze 11
1.3.1 GFAP 12
1.3.2 CD44 14
1.3.3 Osteonektin, SPARC: 15
1.3.4 Osteopontin 16
1.3.5 Kollagen IV 17
1.4 Die Fragestellung 17
2 Material und Methoden 19
2.1 Patientenkollektiv 19
2.1.1 Hirninvasive Meningeome 19
2.1.2 Sektionsfälle 20
2.2 Material 21
2.2.1 Primärantikörper 21
2.2.2 Sekundärantikörper 21
2.2.3 Farbreagenzien 22
2.2.4 Lösungen 22
2.2.5 Chemikalien 23
2.3 Methoden 24
2.3.1 Herstellung der Schnitte 24
2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 24
2.3.3 Immunhistochemische Färbungen mit DAB 24

3 Ergebnisse 29
3.1 GFAP 31
3.2 Osteonektin 36
3.3 CD44 40
3.4 Liganden von CD44 44
3.4.1 Osteopontin 44
3.4.2 Kollagen IV 45
3.5 Sektionsfälle 49
4 Diskussion 51
5 Zusammenfassung 61
6 Literaturverzeichnis 65
7 Anhang 71

LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

bzw.	beziehungsweise
CD44s	CD44 standard
CD44v	CD44 variant
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride Dihydrate
EMA	epithelial membrane antigen
f	female
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
kDA	Kilodalton
m	male
nm	Nanometer
SPARC	secreted protein and rich in cystein
TBS	Trishydrooxymethylaminomethane
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Meningen und Kortexoberfläche

1.1.1 Anatomie der Meningen

Gehirn und Rückenmark sind gemeinsam von den Meningen umgeben. Diese bestehen aus Bindegewebe. Man unterscheidet die äußere harte Hirnhaut, die so genannte Dura mater und die weichen Hirnhäute (Leptomeningen).
Zu den Leptomeningen zählt man Arachnoidea und Pia mater.
Die Meningen erhalten zum einen die physiologische Umgebung und schützen vor dem Eindringen von pathologischen Prozessen in das angrenzende Hirngewebe (Waggener et al., 1967).
Die Dura mater liegt dem Schädelknochen als Periost direkt an. Sie besteht aus Bündeln von straffem kollagenfaserigem Bindegewebe (Peters et al., 1991). In der zweiblättrigen Dura kommen Blutgefäße, Lymphozyten und Nervenfaserbündel vor (Waggener et al., 1967). Die erweiterten Zwischenräume bilden die venösen Sinus. Die Dura mater liegt der Arachnoidea auf.
Die Arachnoidea ist dünn und netzartig. Sie besteht aus mehreren Lagen Arachnoidalzellen. Die Duragrenzschicht (dural border layer) besteht aus mehreren Lagen flacher Zellen, welche mit den duralen Fibroblasten in Verbindung stehen. Die dem Subarachnoidalraum zugewandte Arachnoideagrenzschicht (arachnoid barrier layer) besteht aus irregulär geformten Zellen, welche über Desmosomen, tight junctions und gap junctions miteinander verbunden sind (Alcolado et al., 1988; Peters et al., 1991). Diese Zellen formen Trabekel, welche den Subarachnoidalraum durchziehen und in die Pia mater übergehen (Alcolado et al., 1988).
Die Pia mater liegt dem Hirngewebe direkt an und kleidet als einzige Hirnhaut die Sulci mit aus. Sie besteht aus einer einzelligen Schicht und liegt der pial-glialen Grenzbasalmembran auf, welche in vivo von Astrozyten gebildet wird (Peters et al., 1991). Die Zellen der Pia mater sind mit den aus der Arachnoidea kommenden Zellen und untereinander durch Desmosomen und gap junctions

verbunden (Alcolado et al., 1988). Pia mater und Basalmembran sind durch einen 6 nm breiten subpialen Raum getrennt. Die oberste Schicht der Kortexoberfläche, die Membrana limitans gliae, besteht aus den Astrozytenfortsätzen des angrenzenden Hirngewebes (Lopes et al., 1974) (siehe **Abb. 1**).

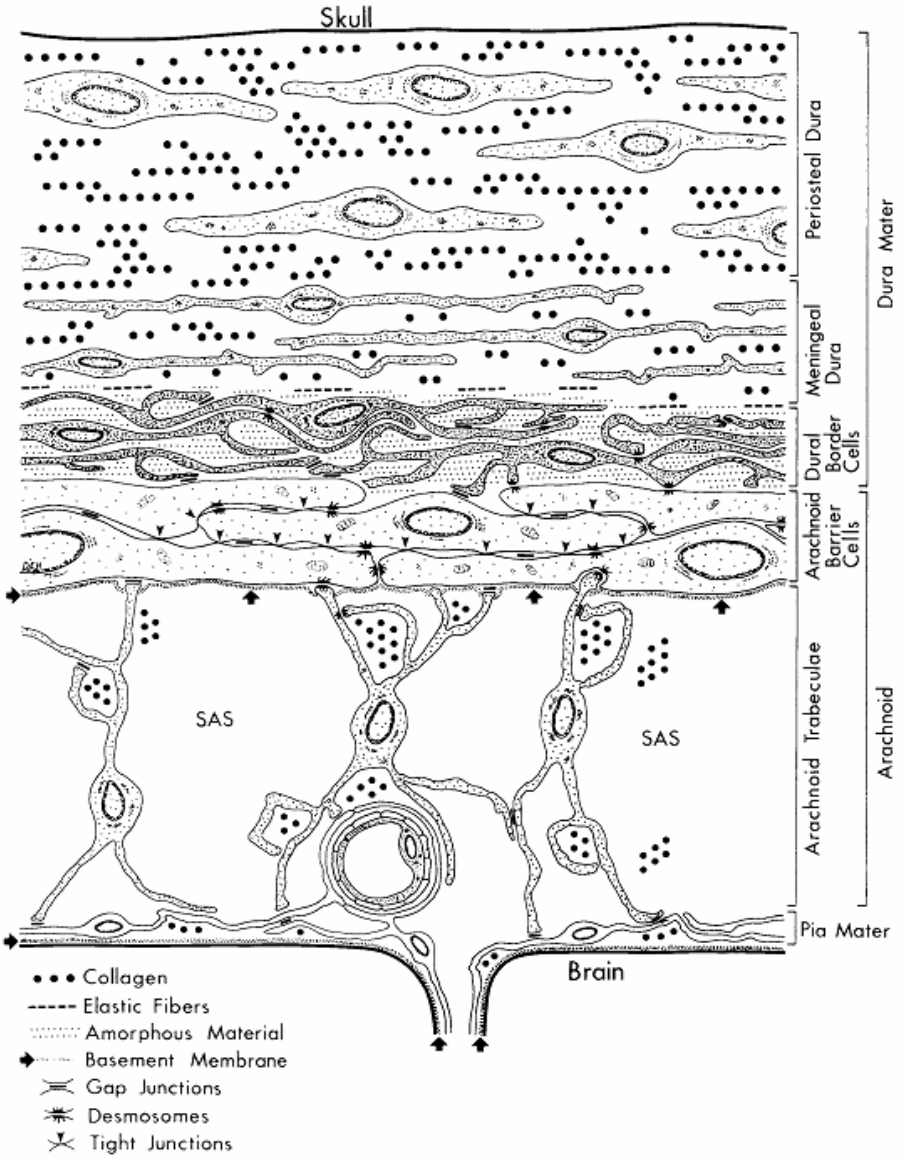


Abb. 1 (Haines, 1991): Schematische Darstellung der Meningen: Dura mater angrenzend an Arachnoidea, welche durch den Subarachnoidalraum (subarachnoidal space, SAS) von der Pia mater getrennt wird.

1.1.2 Die pial-gliale Basalmembran

Invasiv wachsende Meningeome durchdringen die extrazelluläre Matrix, um das anliegende Hirngewebe zu infiltrieren. Die Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix spielt hier eine wichtige Rolle für die Tumorentstehung und –ausbreitung (Rutka et al., 1988).

Die extrazelluläre Matrix kommt in allen Organsystemen vor und besteht aus Makromolekülen, die locker zusammen liegen, oder wie in der Basalmembran eng gepackt sind. Basalmembranen setzten sich aus der Lamina rara und Lamina densa zusammen und sind 40-60 nm dick (Martinez-Hernandez et al., 1983). Zu den Bestandteilen der Basalmembran gehören Kollagen I, III, IV, Fibronektin, Laminin, Heparansulfat und Proteoglykane. Kollagen IV kommt ausschließlich in Basalmembranen vor und ist damit als einer der spezifischen Marker für Basalmembranen verwendbar (Rutka et al., 1988).

Im Zentralnervensystem existiert als begrenzende Basalmembran die pial-gliale Membran. Sie wird von einer einzelnen fenestrierten Zelllage, der Pia mater, überzogen, welche durch einen subpialen Raum von der Basalmembran getrennt wird (Lopes et al., 1974). Bei in vitro-Versuchen konnte festgestellt werden, dass die Komponenten dieser Basalmembran sowohl von Astrozyten der Membrana limitans gliae, als auch von leptomeningealen Zellen hergestellt werden (Rutka et al., 1985; Sievers et al., 1994).

Die pial-gliale Membran ist kontinuierlich und trennt Astrozytenfortsätze von den Zellen der Pia mater (siehe **Abb. 2**). Es wird allgemein angenommen, dass die Grenzmembran unter anderem als Barriere gegen Tumorinvasion in das Hirngewebe dient.

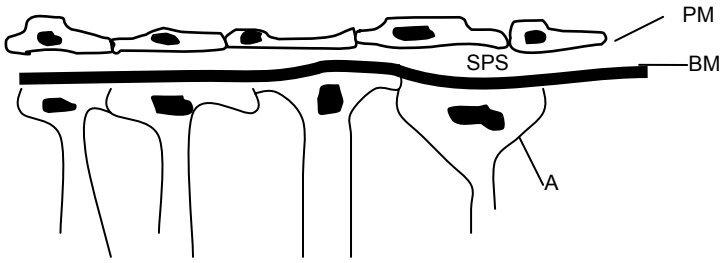


Abb. 2: Pia mater und Kortexoberfläche (modifiziert nach Peters et al., 1991). PM: Pia mater; SPS: Subpialer Raum (Subpial space); BM: pial-gliale Basalmembran; A: Astrozytenfortsätze der Membrana limitans gliae

1.2 Pathologie der Meningeome

1.2.1 Ätiologie, Epidemiologie, Immunhistologie und Klinik

Meningeome sind langsam wachsende, solide aufgebaute, gut abgrenzbare, größtenteils gutartige Tumoren. Sie haften an der Dura mater und gehen von den Arachnoidaldeckzellen aus (Kepes, 1986).
Mit 13-26% der primären intrakraniellen und 25,5% der spinalen Tumoren sind sie häufigster primärer intrakranieller Tumor mit einer jährlichen Inzidenz von 6/100000 (Graham et al., 2002b; Louis et al., 2000). In 1,4 - 2,3% aller Autopsien sind inzidenzielle Meningeome zu finden, welche zu Lebzeiten aufgrund fehlender Symptome unentdeckt bleiben (Louis et al., 2000; Nakasu et al., 1987; Perry, 2006).

Meningeome treten am häufigsten in der sechsten und siebten Lebensdekade auf, beschrieben sind jedoch Fälle in jedem Lebensalter (Louis et al., 2000; Perry et al., 2007). Frauen sind zwei bis drei mal häufiger betroffen als Männer, bei spinalen Meningeomen beträgt dieses Verhältnis sogar 10:1 (Louis et al., 2000; Perry, 2006).
Meningeome können überall da auftreten, wo meningeales Gewebe vorhanden ist, der größte Teil tritt jedoch intrakraniell, intraspinal und orbital auf, wenn

auch einzelne Fälle von Meningeomen in allen Organen beschrieben worden sind (Louis et al., 2000). Intrakraniell kommen 50% der Meningeome im Bereich der Konvexität, parasagittal und in der Falx vor, sowie 30-40% an der Schädelbasis (Perry, 2006). In 5,4% der Fälle treten Meningeome an multiplen Lokalisationen auf (Black, 1993).
Meningeome können Dura und Knochen invadieren und venöse Sinus verschließen. Angrenzendes Hirngewebe wird oft komprimiert und selten findet eine echte Hirninvasion statt (Louis et al., 2000). Die Kriterien für Hirninvasion werden unter 1.2.2 genauer beschrieben.
Obwohl eine Infiltration von venösen Sinus regelmäßig vorkommt, sind Metastasen von Meningeomen mit <0,17 % sehr selten (Black, 1993); sie kommen dann vor allem in Lunge, Abdomen und Knochen vor und können histologisch wie ihr Primarius auch ein benignes Bild aufzeigen (Karasick et al., 1974).

Die klinische Symptomatik der Meningeome hängt von deren Lokalisation ab und entsteht vor allem durch die Kompression des umgebenden Hirngewebes. Es kommt zu lokalen Symptomen, wie zum Beispiel Krampfanfällen, Hemiparese, visuellen Verlusten oder Aphasie (Black, 1993).

Die Ätiologie der Meningeome ist zum Teil noch unklar. Sicher ist ein durch Bestrahlung induziertes gehäuftes Auftreten von Meningeomen. Diese Patienten haben in der Vorgeschichte häufig eine low-dose-Bestrahlung wegen Tinea capitis oder eine high-dose-Bestrahlung wegen eines primären Hirntumors erhalten und nach einer mittleren Latenzzeit von 19-35 Jahren ein Meningeom entwickelt (Harrison et al., 1991; Louis et al., 2000).
Die Überrepräsentation des weiblichen Geschlechts sowie ein schnelleres Tumorwachstum in der Schwangerschaft und ein Zusammenhang mit Brustkrebs lassen auf eine Rolle von Sexualhormonen in der Genese von Meningeomen schließen. In verschieden Studien konnte gezeigt werden, dass 50-100% der Meningeome Progesteron-Rezeptoren und 40-100% Androgen-Rezeptoren bilden (Carroll et al., 1993; McCutcheon, 1996). Der

Zusammenhang zur Tumorentstehung oder –progression ist jedoch noch unklar.

Auch Traumata werden als ätiologische Faktoren diskutiert, da in einer Studie bei 32% der Patienten mit intrakraniellen Meningeomen Hinweise auf vorher stattgefundene Kopfverletzungen vorliegen. Andere Studien konnten hier jedoch keinen Zusammenhang zeigen (Graham et al., 2002b). Auch zu der Frage, ob eine Hypervaskularisierung des Meningeoms die Prognose verschlechtert, gibt es unterschiedlich Studien: De la Monte beschreibt eine höhere Rezidivrate bei hypervaskularisierten Meningeomen, während Skullerud einen solchen Zusammenhang verneint (de la Monte et al., 1986; Skullerud et al., 1974).

Meningeome kommen gehäuft vor bei der Neurofibromatose Typ II (NF2). Bei dieser Erkrankung liegt eine Mutation im Gen 22q12 vor. Deletion oder Monosomie von Chromosom 22 wurde bei Meningeomen von WHO Grad I in 58% der Fälle gefunden. Fast immer ist der Genlokus von NF2 betroffen. Zahlreiche weitere genetische Änderungen gehen mit einer Progression der Meningeome zu einem höherem WHO-Grad einher (siehe **Abb. 3**). Bisher konnten jedoch keine spezifischen genetischen Veränderungen für hirninvasive Meningeome festgestellt werden (Weber GF et al., 1996).

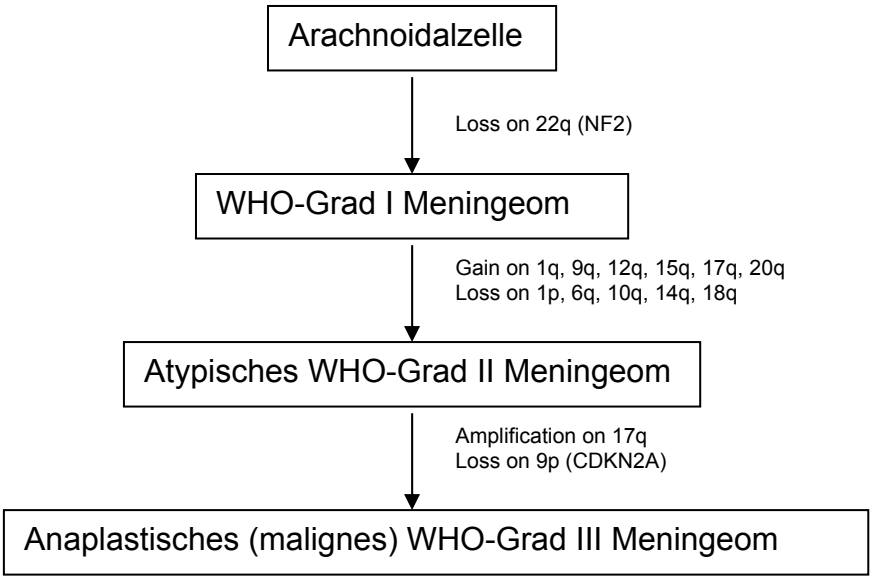


Abb. 3 (nach Weber GF et al., 1996): Genetische Veränderungen bei der Progression von Meningeomen

Die Vielzahl an histologischen Erscheinungsformen der Meningeome wird auch mit ihrer Differenzierung in sowohl mesenchymale als auch epitheliale Gewebebestandteile in Zusammenhang gebracht. Diese Diversität zeigt sich auch in der Immunhistochemie. In einer Studie mit 50 Meningeomen waren 50% positiv für EMA (epithelial membrane antigen), 18% für Vimentin und 8% für S100-Protein (Meis et al., 1986). Eine andere Studie zeigte bei 95% der Meningeome positive Färbung für EMA und bei 33% positive Färbung für Cytokeratin (Langford, 1996). Alle Meningeome dieser Studien waren negativ für GFAP (Meis et al., 1986).

1.2.2 Grading von Meningeomen

Meningeome werden nach der WHO als Malignitätsgrad I, II oder III klassifiziert. Die Klassifizierung und Gradierung erfolgt ausschließlich histologisch. Meningeome vom WHO Grad I sind sehr variabel in ihrem histologischen Erscheinungsbild (siehe **Tabelle 1**); die häufigsten Subtypen sind meningothelial, fibroblastisch und transitional (Perry et al., 2007).

Beim meningothelialen Meningeom sind die Zellen in Wirbeln und Lobuli angeordnet, beim fibroblastischen Subtyp überwiegen in Faszikeln angeordnete spindelförmige Zellen. Beim transitionalen Subtyp kommen sowohl in Faszikeln, als auch in Wirbeln und Lobuli angeordnete Zellen vor.

Meningeome mit niedrigem Rezidiv-Risiko und wenig aggressivem Wachstum:	
Meningotheliomatöses Meningeom	WHO-Grad I
Fibroblastisches Meningeom	WHO-Grad I
Transitionales Meningeom	WHO-Grad I
Psammomatöses Meningeom	WHO-Grad I
Angiomatöses Meningeom	WHO-Grad I
Microzystisches Meningeom	WHO-Grad I
Sekretorisches Meningeom	WHO-Grad I
Lymphoplasmozytenreiches Meningeom	WHO-Grad I
Metaplastisches Meningeom	WHO-Grad I
Meningeome mit größerem Rezidiv-Risiko und aggressiverem Wachstum:	
Atypisches Meningeom	WHO-Grad II
Klar-Zell Meningeom	WHO-Grad II
Chordoides Meningeom	WHO-Grad II
Rhabdoides Meningeom	WHO-Grad III
Papilläres Meningeom	WHO-Grad III
Anaplastisches Meningeom	WHO-Grad III
Alle Meningeome mit hohem Proliferationsindex oder Hirninvasion	

Tabelle 1 (Perry et al., 2007): Einteilung der Meningeome nach Rezidivrate und WHO-Grad

Die WHO unterteilt die Tumoren in benigne (Grad I), atypische (Grad II) und anaplastische (Grad III) Meningeome. Alle Meningeome dieser Studie sind nach der inzwischen aktuellen WHO-Klassifikation von 2007 eingeteilt (siehe **Tabelle 1** und **Tabelle 2**). In der davor verwendeten Klassifikation von 2000 wurde die Einteilung lediglich nach dem histologischen Subtyp vorgenommen, weder Hirninvasion noch Proliferationsindex wurden für die Einteilung herangezogen (Louis et al., 2000). Es wurde lediglich empfohlen den Zusatz „mit Hirninvasion“

beziehungsweise „mit hohem Proliferationsindex“ anzufügen (Lamszus, 2004; Louis et al., 2000).

Obwohl Hirninvasion mit klinischer Malignität assoziiert ist, können sowohl histologisch benigne, als auch atypische und maligne Meningeome Hirninvasion aufweisen (Rempel et al., 1999). Jedoch verhalten sich dem histologischen Bild nach benigne hirninvasive Meningeome (ehemals WHO-Grad I; jetzt WHO-Grad II, otherwise benign) in Bezug auf Überlebens- und Rezidivrate wie atypische Meningeome (WHO-Grad II, otherwise atypical). Nach einer Studie von Perry beträgt die 5-Jahresüberlebensrate für benigne Meningeome mit Hirninvasion 27% und für atypische Meningeome mit Hirninvasion 25% und ist somit nicht signifikant verschieden (Perry et al., 1999). Das morphologisch gutartige Erscheinungsbild widerspricht hier dem klinisch aggressiven Verhalten. Aus diesem Grund wurde in der neuen WHO-Klassifikation von 2007 Hirninvasion als Kriterium für die Enteilung eines Meningeoms in WHO-Grad II (unabhängig vom histologischen Erscheinungsbild) beschlossen (Perry et al., 2007). Bei ansonsten benignem histologischem Bild ist in dieser Arbeit der Zusatz „otherwise benign“ zugefügt. Dadurch wird die Unterscheidung zu WHO-Grad II mit atypischem histologischem Bild möglich (hier Zusatz „otherwise atypical“).

Die genetischen Veränderungen, die für höhergradige Meningeome gefunden wurden, konnten jedoch für benigne Meningeome mit Hirninvasion nicht festgestellt werden (Weber RG et al., 1997).

Hirninvasion allein ist kein Kriterium für die Einteilung eines Meningeoms als maligne (WHO-Grad III) (Kleihues et al., 2002; Perry et al., 2007; Perry et al., 1999).

Nach diesen Kriterien werden 80% der Meningeome dem WHO-Grad I zugeordnet (Perry, 2006).

Dem histologischen Subtyp atypisches Meningeom (WHO-Grad II) werden 15-20% der Meningeome zugeordnet (Perry, 2006). Beurteilt werden hierzu die Anzahl der Mitosen (siehe **Tabelle 2**), histologische Kriterien für Zellatypie, Kernpleomorphie und schnelles Zellwachstum, sowie vorhandene Hirninvasion (Perry et al., 2007; Perry et al., 1999).

Die gleichen Kriterien werden auch für die Einteilung anaplastisches Meningeom (WHO-Grad III) verwendet, welchem Subtyp 1-2% entsprechen.

Die WHO-Klassifikation verwendet lediglich histologische Merkmale für die Einteilung. Obwohl die Lage des Meningeoms entscheidend für die komplette Resezierbarkeit und damit die Prognose ist, fließt diese nicht in die Klassifikation mit ein.

Benigne Meningeome (WHO-Grad I)	• Histologische Variante unterschiedlich von Klar-Zell, Chordoid, Papillär und Rhabdoid • Keine Kriterien für atypisches oder anaplastisches Meningeom vorhanden
Atypische Meningeome (WHO-Grad II)	Eines der drei Kriterien zutreffend: • Mitotischer Index ≥4/10 high power fields • Mindestens 3 der folgenden 5 Kriterien: o Sheeting architecture (Verlust des lobulären Musters) o Kleine Zell-Formationen o Makronukleolen o Hyperzellularität o Spontane Nekrosen • Hirninvasion
Anaplastische Meningeome (WHO-Grad III)	Eines von zwei Kriterien: • Mitotischer Index ≥20/10 high power fields • Deutliche Anaplasie (sarkom-, karzinom-, oder melanomähnliche Histologie)

Tabelle 2 (nach (Perry et al., 2007; Perry et al., 1999): Kriterien für die Einteilung in WHO-Grad I-III bei Meningeomen

1.2.3 Therapie und Prognose

Der wichtigste prognostische Faktor ist der Resektionsgrad des Meningeoms. Des Weiteren entscheidend sind der histologische Subtyp, die Mitoserate, das Vorkommen von fokaler Nekrose sowie das Alter des Patienten (Black, 1993; Marks et al., 1986). Die Gesamtrezidivrate beträgt 15-19% (Jaaskelainen, 1986; Langford, 1996).

Ob die komplette Resektion möglich ist, hängt vor allem von der Lage des Meningeoms und der Infiltration in Dura, Knochen und angrenzendes Hirngewebe ab (Black, 1993). Eine gute Resezierbarkeit ist gegeben, wenn das Meningeom gut vom Hirngewebe abgrenzbar und somit eine hirnschonende Operation möglich ist.

Die Rezidivraten der Meningeome steigen mit ihrem Malignitätsgrad.

Für benigne Meningeome wurde eine Rezidivrate von 7-25% festgestellt. Für atypische Meningeome beträgt die Rezidivrate 29-52% und für anaplastische Meningeome 50-94% (Black, 1993; Jaaskelainen et al., 1986a; Perry et al., 2007). Bei subtotaler Resektion liegen die Rezidivraten höher.

Die 10-Jahresüberlebensrate variiert in verschiedenen Studien von 43% (Simpson, 1957) bis zu 77% (Mirimanoff et al., 1985).

Mehrere Studien haben auch die Wirksamkeit einer adjuvanten Bestrahlungstherapie gezeigt, so zeigte sich eine deutliche Erhöhung der 10-Jahresüberlebensrate bei subtotaler Resektion plus Bestrahlung im Gegensatz zu fehlender Bestrahlung (Taylor et al., 1988). Die Rolle von Sexualhormonen in der Therapie von Meningeomen bleibt nach bisherigen Studien unklar. So zeigte eine Studie von Jaaskelainen keinen Therapieerfolg nach Gabe von Medroxyprogesteron (Jaaskelainen et al., 1986b).

1.3 Astrozyten an der Tumor-Hirn-Grenze

Normale Astrozyten machen im ZNS-Gewebe 40% der Zellpopulation aus. Sie sind sternförmig angeordnet und stehen über ihre Fortsätze untereinander, sowie mit den Basalmembranen von Gefäßen und der Glia limitans in Verbindung. Kommunikation ist dabei über Gap junctions möglich. Das gesamte

menschliche Zentralnervensystem ist folglich von einer Lage Astrozytenfortsätze bedeckt, welche zwischen Hirngewebe und Pia mater liegen (siehe **Abb. 1** und **Abb. 2**) (Graham et al., 2002a; Rutka et al., 1997). Die exakte Funktion der Astrozyten war jahrzehntelang unklar und ist auch heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist jedoch, dass Astrozyten eine wichtige supportive Rolle für Neurone spielen, indem sie Ionenkonzentration und Neurotransmitter in der extrazellulären Matrix beeinflussen und als Schiene für das Wachstum von Axonen dienen (Landis, 1994).
Charakteristisch für Astrozyten ist ihre Antwort auf diverse neurologische Insulte wie z.B. Hypoxie, Neurotoxie, Hypoglykämie, Status epilepticus, mechanische Traumata oder meningeale Carcinomatose (Aschner et al., 1993; Jamshidi et al., 1987; Norenberg, 1994). Diese Antwort auf bestimmte Reize wird als reaktive Astrogliose bezeichnet (Eng et al., 1994). Als initiale Reaktion kommt es dabei zum Anschwellen der Astrozyten, was zu einer Volumenvergrößerung der Hirnmasse und zur Erhöhung des intrakraniellen Druckes führen kann. Durch Kalziumeinstrom in die Zelle kommt es zur Zerstörung der Astrozyten (Landis, 1994).

Astrozyten weisen bestimmte Moleküle auf, die man immunhistochemisch zur Identifizierung dieses Zelltyps darstellen kann. Wir verwendeten Antikörper gegen saures Gliafaserprotein (GFAP), CD44 und Osteonectin (SPARC).

1.3.1 GFAP

GFAP ist ein Intermediärfilament-Protein mit relativem Molekulargewicht von 50 kDa. Es ist Teil des Zytoskelets von Astrozyten und hält dadurch die Zellstruktur aufrecht. GFAP-Antikörper färben spezifisch die Intermediärfilamente von normalen, reaktiven und neoplastischen Astrozyten (Eng et al., 1994; Rutka et al., 1997). Im gesunden Gehirn ohne reaktive Astrogliose ist die Menge an GFAP zu gering, um Astrozyten mikroskopisch erkennbar zu machen. Hier färbt sich lediglich die Glia limitans stark an (siehe **Abb. 4**).
Bei der unter 1.3 beschriebenen reaktiven Astrogliose spielt GFAP jedoch eine wichtige Rolle. Nach der bereits beschriebenen Volumenvergrößerung zeigt

sich im weiteren Verlauf eine auffällig vermehrte Expression von GFAP. Der Regulationsmechanismus und die funktionelle Bedeutung dieser vermehrten Expression von GFAP in reaktiven Astrozyten sind bisher noch nicht geklärt. Als späte Reaktion der Astrozyten kann eine weitere Hypertrophie sowie Proliferation der Zellen beobachtet werden. Außerdem kann es auch zur Migration von Astrozyten kommen (Landis, 1994). Mikroskopisch erscheinen reaktive Astrozyten vergrößert und mit homogenem, eosinophilem Zytoplasma und häufig vergrößerten Kernen („gemästete Astrozyten“, „gemistic astrocytes“, „Gemistozyten“). Die erhöhte GFAP-Expression geht oft weit über den an die Läsion angrenzenden Bereich hinaus, was dafür spricht, dass die Astrozyten über gap junctions kommunizieren (Graham et al., 2002a). GFAP ist damit ein sehr sensitiver und spezifischer Marker für die schnelle Astrozyten-Reaktion auf Verletzungen und Krankheiten (Eng et al., 1994; Mucke et al., 1991).
Ob die reaktive Astrogliose nach Verletzungen und Krankheiten als positiv angesehen werden kann ist umstritten. Einerseits scheinen die Fortsätze von reaktiven Astrozyten eine Barriere für einwachsende Axone zu bilden, andererseits stellen sie neurotropische Faktoren her, welche den Zelltod von Neuronen verhindern (Graham et al., 2002a; Landis, 1994).

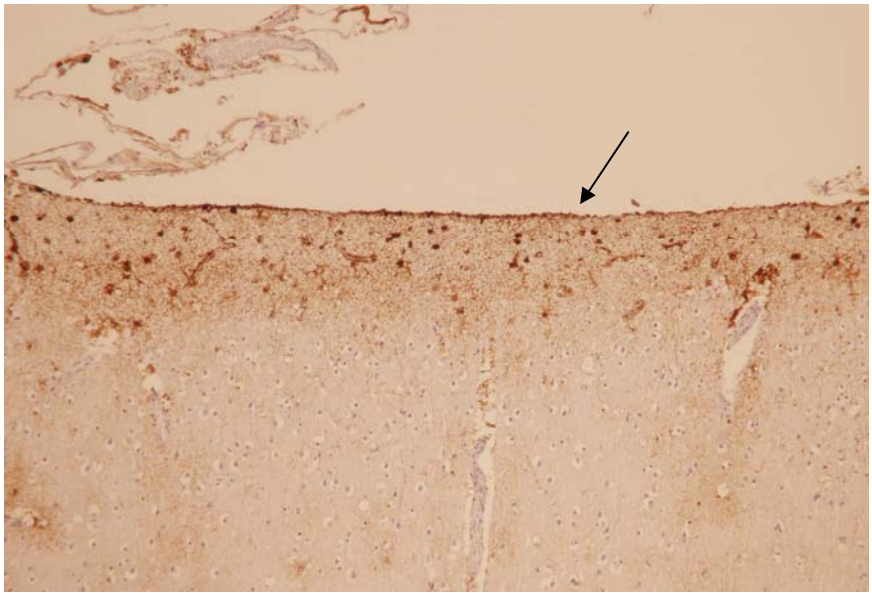


Abb. 4 (GFAP x10): Sektionsfall 1, Hirnoberfläche. Die Glia limitans ist stark gefärbt (Pfeil). Astrozyten in tieferen Abschnitten des Cortex sind nicht erkennbar.

1.3.2 CD44

Ein anderer Marker für Astrozyten ist CD44. Dies ist ein Adhäsionmolekül der Zelloberfläche und ist als solches an zahlreichen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt.

Die DNA von CD44 enthält 20 Exons. Durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikationen, zum Beispiel Glykosylierungen, entstehen zahlreiche Isoformen mit unterschiedlichen relativen Molekulargewichten von 85 kDa bis zu 230 kDa (siehe **Abb. 5**). Das kleinste CD44-Molekül mit einer Größe von 85-95 kDa heißt standard CD44 (CD44s). Es wird von Zellen mit lympho-hämatopoetischer Herkunft exprimiert. Nach immunologischer Aktivierung von Lymphozyten exprimieren diese weitere Isoformen von CD44, die sogenannten CD44 variants (CD44v).

Als Liganden von CD44 kommen zahlreiche Bestandteile der extrazellulären Matrix vor: Hyaluronsäure, Kollagen, Fibronectin, Laminin und Chondroitin-Sulfat. Weitere Liganden sind das Schleimhaut assoziierte Protein Addressin, Serglycin und Osteopontin. Über diese Liganden ist der CD44-Rezeptor an zahlreichen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt, dazu gehören Zellbewegungen (cell traffic), Lymphozyten-homing, Präsentation von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, sowie Übertragung von Wachstumssignalen (Naor et al., 1997).

Durch Doppelfärbungen mit GFAP zeigte sich, dass CD44 auch von reaktiven Astrozyten, nicht jedoch von Oligodendroglia exprimiert wird (Girgrah et al., 1991).

Auch zahlreiche Tumoren und ihre Metastasen exprimieren CD44. Dabei kann CD44 einerseits als Wachstumsfaktor, andererseits als Kofaktor der Tumorsuppression wirken. Welche Funktion ausgeführt wird, hängt sowohl von der CD44-Isoform, als auch von den gebundenen Liganden ab (Herrlich et al., 2000).

Auch Meningeome sind mehrheitlich positiv für CD44, es besteht jedoch eine große Variabilität der Färbemuster. Eine Studie von 1997 beschreibt eine stärkere CD44-Färbung für meningotheliale und transitionale Meningeome (Figarella-Branger et al., 1997) und eine Studie von 1999 zeigt, dass kein

Zusammenhang zwischen Färbeintensität und Tumorgrad besteht (Rooprai et al., 1999).
Eine Studie mit Oligodendrogliomen zeigte jedoch einen Zusammenhang von CD44-Expression mit Tumorgrad und Überlebenszeit (Hagel et al., 1999).

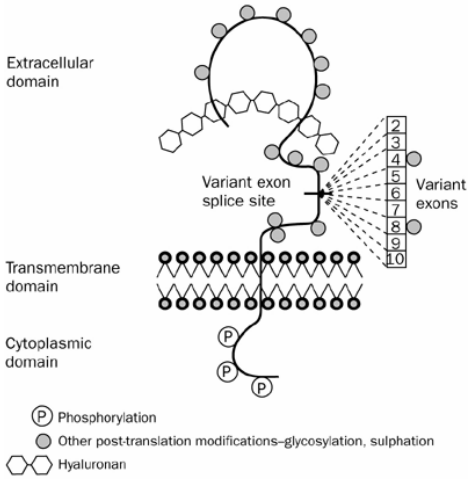


Abb. 5 (Bradbury, 2002): Schematische Darstellung von CD44: Das Molekül besteht aus einer extrazellulären Domäne mit einer variablen Region, sowie einer transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne.

1.3.3 Osteonektin (SPARC)

SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine), auch bekannt als Osteonektin oder BM-40 ist ein matrizelluläres Protein, welches in den Extrazellularraum abgesondert und bei Zelldifferenzierung und Gewebeverletzungen exprimiert wird (siehe **Abb. 6**). Es interagiert mit Bestandteilen der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix, sowie mit Wachstumsfaktoren und ist dadurch beteiligt an Wundheilung, Angiogenese und Tumorinvasion (Bradshaw et al., 2001).
In normalem Gewebe wird SPARC in Fibrozyten und Endothelzellen stark exprimiert, wenn diese an Gewebereparation und Tumorinvasion beteiligt sind (Porter et al., 1995).

In Astrozytomen wird eine vermehrte Expression von SPARC beschrieben. SPARC wird hier sowohl von Tumorzellen exprimiert, von histomorphologisch maligne aussehenden Zellen innerhalb des angrenzenden Hirngewebes, von Endothelien sowie von reaktiven Astrozyten, welche in dem an den Tumor grenzenden Gewebe vorkommen (Rempel et al., 1998).
SPARC wurde als diagnostischer Marker für benigne invasive Meningeome (WHO-Grad II, otherwise benign) empfohlen, da eine Expression von SPARC in 20 benignen, invasiven Meningeomen nachweisbar war, nicht jedoch in 9 benignen, nicht-invasiven Meningeomen (Rempel et al., 1999).
Eine weitere Studie zeigte jedoch, dass die Expression von SPARC in Meningeomen nicht abhängig von der Tumorinvasion ist (Schittenhelm et al., 2006).
In der vorliegenden Arbeit haben wir SPARC vor allem als weiteren Marker für reaktive Astrozyten ausgewählt.

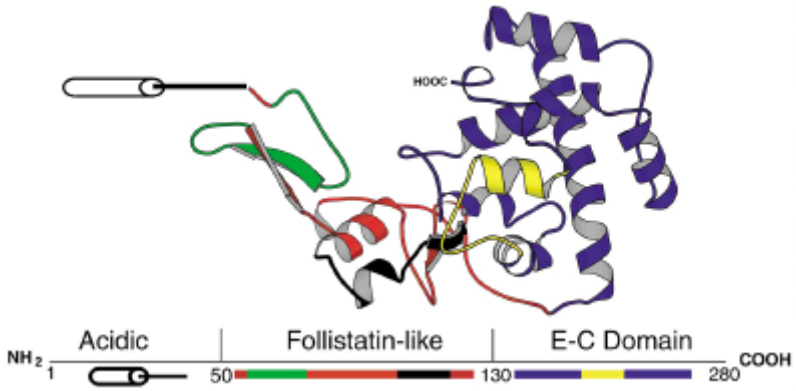


Abb. 6 (modifiziert nach (Bradshaw et al., 2001): Struktur des SPARC-Protein.

1.3.4 Osteopontin

Osteopontin ist ein extrazelluläres Phosphoprotein, welches unter anderem von aktivierten T-Lymphozyten und Osteoblasten aktiviert wird. Wir wählten Osteopontin als Markerprotein aus, da es als Ligand von CD44 fungiert. Osteopontin induziert hierbei Chemotaxis, während der CD44-Ligand Hyaluronsäure eine Zellaggregation bewirkt. Durch diese unterschiedliche

Ligandenwirkung können die verschiedenen Effekte von CD44 auf Zellbewegungen und Zellwachstum erklärt werden (Weber GF et al., 1996). Des Weiteren wird beschrieben, dass Osteopontin von reaktiven Astrozyten in Multiple Sklerose-Geweben exprimiert wird (Sinclair et al., 2005).

1.3.5 Kollagen IV

Kollagene sind Proteine, die aus drei α-Helices bestehen, welche eine Tripelhelix bilden. Kollagen IV ist das einzige Kollagen, welches ausschließlich in Basalmembranen vorkommt und einen Hauptbestandteil dieser ausmacht (Rutka et al., 1988).
In der vorliegenden Studie verwendeten wir Antikörper gegen Kollagen IV als spezifischen Marker für Basalmembranen.

1.4 Die Fragestellung

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Reaktion von Astrozyten auf die Invasion von Meningeomen in das angrenzende Hirngewebe.
2005 wurde bereits beschrieben, dass invasive Grad-I-Meningeome die zum Hirngewebe angrenzende Basalmembran durchbrechen können. In einer Studie von Fritz et al wurde Kollagen IV als Marker für die Basalmembran verwendet. Basalmembran-Unterbrechungen konnten vor allem in Tumorgebieten gefunden werden, die fingerförmig in das Hirngewebe einwachsen (Fritz et al., 2005).
Die Basalmembran steht in engem Zusammenhang mit den Astrozytenfortsätzen der Membrana limitans gliae (siehe 1.1.2). Es wird davon ausgegangen, dass die Basalmembran unter anderem von diesen Astrozyten hergestellt wird (Peters et al., 1991). Es ist jedoch noch nicht bekannt, wie die Astrozyten auf hirninvasive Meningeome reagieren und ob ein Zusammenhang zwischen dem Durchbruch der Meningeome durch die Basalmembran und der Reaktion von Astrozyten besteht.
Um diese Fragestellung zu bearbeiten versuchten wir in hirninvasiven Meningeomen sowohl die Basalmembran, als auch reaktive Astrozyten

darzustellen. Im Gegensatz zu der Studie von Fritz et al schlossen wir hirninvasive Meningeome von jedem WHO-Grad in die Studie ein. Als Marker für die Basalmembran verwendeten wir Antikörper gegen Kollagen IV, welches ein spezifischer Bestandteil der Basalmembran ist (Rutka et al., 1988). GFAP verwendeten wir als Marker für reaktive Astrozyten. Da GFAP als Intermediärfilament vor allem intrazellulär vorkommt und nur 15% des Volumens von Astrozyten färbt (Bushong et al., 2002), verwendeten wir als weiteren Marker für Astrozyten Antikörper gegen Osteonektin und Antikörper gegen CD44. Osteonektin dient hierbei als weiterer intrazellulärer Marker, während CD44 ein Membranprotein ist, das mit der Basalmembran interagiert. Somit konnten wir beurteilen, ob bei Verlust von Astrozyten die gesamte Zelle betroffen ist oder nur der Zusammenhang von Zelle und Basalmembran.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Gewebeproben von 35 hirninvasiven Meningeomen stammen aus den Gewebearchiven des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen (25 Proben), der Neuropathologie Magdeburg (4 Proben) sowie der Neuropathologie Homburg (6 Proben). Die Gewebeproben aus Marburg und Homburg entsprachen anaplastischen hirninvasiven Meningeomen WHO Grad III. Die Verwendung von Gewebeproben anderer Institute war notwendig, weil hirninvasive Meningeome selten vorkommen. Des Weiteren verwendeten wir als Kontrolle der Membrana limitans gliae 16 Gewebeproben von Sektionsfällen ebenfalls aus dem Gewebearchiv des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen.

Alle Proben waren in Paraffin eingebettet. Die Paraffineinbettung wurde mit der Citadel 1000 der Firma Shandon, London durchgeführt. In dieser wurde das Gewebe zuerst in eine aufsteigender Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 100%, 100%) eingebracht, danach in Chloroformgemisch sowie reinem Chloroform geklärt und schließlich in Paraffin eingebettet.

2.1.1 Hirninvasive Meningeome

Die 35 hirninvasiven Meningeome wurden intraoperativ in den neurochirurgischen Abteilungen der Universitätskliniken Tübingen, Magdeburg und Homburg in den Jahren 1994-2005 sowie zwei in den Jahren 1982 und 1985 entnommen. Hirninvasivität überprüften wir anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (siehe Abschnitt 3).

Die Gradeinteilung der Meningeome erfolgte nach WHO-Kriterien aus dem Jahr 2007. Die detaillierten Kriterien für die Gradeinteilung der Meningeome sind unter 1.2.2 beschrieben.

Die Gewebeproben stammen von 16 männlichen Personen im Alter von 47-78 Jahren (mittleres Alter 65 Jahre) und von 19 weiblichen Personen im Alter von 4-80 Jahren (mittleres Alter 58 Jahre).
Durch histopathologische Einteilung der Meningeome in WHO-Grad II und III erhielten wir drei Gruppen:

WHO-Grad II, otherwise benign:

14 Meningeome (44-80 Jahre; mittleres Alter 64 Jahre)
4 männlich (47-78 Jahre; mittleres Alter 67 Jahre)
10 weiblich (44-80 Jahre; mittleres Alter 64 Jahre)
Histopathologische Subtypen: 9 meningothelial, 4 transitional, 1 angiomatös

WHO-Grad II, otherwise atypical:

11 Meningeome (34-70 Jahre; mittleres Alter 62 Jahre)
6 männlich (61-70 Jahre; mittleres Alter 68 Jahre)
5 weiblich (34-66 Jahre; mittleres Alter 54 Jahre)
Histopathologischer Subtyp: atypisch

WHO-Grad III: 10 Meningeome (4-70 Jahre; mittleres Alter 49 Jahre)
6 männlich (51-70 Jahre; mittleres Alter 61 Jahre)
4 weiblich (4-64 Jahre; mittleres Alter 41 Jahre)
Histopathologischer Subtyp: anaplastisch

2.1.2 Sektionsfälle

Als Kontrollgruppe verwendeten wir 16 Gewebeproben aus Sektionsfällen. Die Gewebeproben stammen von 8 männlichen Personen im Alter von 35-94 Jahren (mittleres Alter 65 Jahre) und von 4 weiblichen Personen im Alter von 28-70 Jahren (mittleres Alter 54 Jahre). Die Gehirne der Verstorbenen entsprachen Normalbefunden.

2.2 Material

2.2.1 Primärantikörper

CD44: Monoklonaler (mouse anti-human) CD44-Antikörper, Klon DF1485, Verdünnung 1:200 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

GFAP (glial fibrillary acidic protein): Polyklonaler (rabbit anti-bovine) GFAP-Antikörper, Verdünnung 1:500 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

Kollagen IV: Monoklonaler (mouse anti-human) Kollagen IV-Antikörper, Verdünnung 1:200 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

Osteonektin, SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine): Monoklonaler (mouse anti-bovine) Osteonektin-Antikörper, Verdünnung 1:4000 (CellSystems, St. Katharinen, Deutschland)

Osteopontin: Monoklonaler (mouse anti-bone Sialoprotein) Osteopontin-Antikörper, Verdünnung 1:500 (Chemicon International, Germany)

2.2.2 Sekundärantikörper

Brückenantikörper zur AB-Methode: Polyklonale rabbit anti-mouse Immunoglobuline, biotinyliert F(ab`)^2, Verdünnung 1:400 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

Polyklonale swine anti-rabbit Immunoglobuline, biotinyliert F(ab`)^2, Verdünnung 1:400 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

2.2.3 Farbreagenzien

Avidin-Biotin-Komplex: Reagenzien: Je 5 µl Avidin (Reagenz A) und 5 µl biotinylierte Meerrettichperoxidase (horseradish, Reagenz B) wurden mindestens 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt. (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

DAB: 60 mg DAB (3,3`-Diaminobenzidinetetrahydrochloride Dihydrate, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden in 180 ml destilliertem Wasser gelöst. Dazu wurden 20 ml Substratpuffer sowie 66,6 µl Wasserstoffperoxid 30% (Merck, Darmstadt) gegeben. Die Lösung wurde vor Gebrauch filtriert.

Hämalaun: Merck, Darmstadt

Erythrosin: Erythrosin B; Merck, Darmstadt

2.2.4 Lösungen

TBS-Stammlösung: Für die Stammlösung wurden 60,6 g Tris Base (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 163,6 g NaCl (Sodium Chloride, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) in 1,5 l destilliertem Wasser gelöst und mit 25%iger Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt.

TBS-Gebrauchslösung: Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Citratpuffer: Für den Citratpuffer wurden 42,2 g Zitronensäure Monohydrat (Carl Roth GnbH & Co, Karlsruhe) in 2 l

destilliertem Wasser gelöst und mit 25%iger Salzsäure auf pH 6,0 eingestellt.

Substratpuffer: Für den Substratpuffer wurden 21 g Zitronensäure Monohydrat, 34 g Imidazle (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) und 29,2 g NaCl in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 25%iger Sälzsäure auf pH 7,0 eingestellt.

Schweineserum: Schweineserum (Biochrom (Seromed), Berlin) wurde 1:10 mit TBS-Gebrauchslösung verdünnt.

2.2.5 Chemikalien

Alkohol 100, 96, 70%: Düperthal GmbH, Karlstein/Main

Chloroform: Merck, Darmstadt

Erythrosin B (Eosin): Merck, Darmstadt

Hämatoxylin: Gill 3 Hämatoxylin, Shandon Inc., Pittsburgh, USA

HICO-MIC: Permanentes Mikroskopiereinschlussmittel, Hirtz & Co

Methanol: Merck, Darmstadt

Vectashield: Mikrokopiereinschlussmittel für Fluoreszenz, Vector Laborities, Inc., Burlingame, USA

Xylol: Normapur, Fontenay sous Bois

2.3 Methoden

2.3.1 Herstellung der Schnitte

Mit einem Rotationsmikroskop vom Typ LEICA 2040 wurden die Paraffinblöcke in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und auf silanbeschichtete Objektträger aufgezogen. Danach wurden sie über Nacht in einem Wärmeschrank bei 55°C getrocknet.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Entparaffinieren: Zum Entparaffinieren wurden die Präparate für jeweils 10 Minuten in 3 verschiedene Xylol-Küvetten eingebracht, danach in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (jeweils 2 Minuten 100%- 100%- 96%- 70%) sowie 5 Minuten in Leitungswasser und kurz in destilliertem Wasser gespült.

Färben: Das entparaffinierte Tumorgewebe wurde für eine Minute in Hämalaun belassen, 10 Minuten in Leitungswasser und kurz in destilliertem Wasser gespült, sowie danach für eine Minute in Erythrosin eingebracht.

Fertigstellen: Dehydration der Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 Minuten 70%- 96%- 100%- 100%), danach Einbringen in 3 verschiedene Xylol-Küvetten für je eine Minute. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit dem Einschlussmittel HICO-MIC eingedeckelt.

2.3.3 Immunhistochemische Färbungen mit DAB

2.3.3.1 Vorbehandlung

Entparaffinieren: Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 30 Minuten in Chloroform eingebracht.

Rehydration und Spülen: Zum Rehydrieren wurden die Schnitte jeweils 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) eingebracht und danach kurz in destilliertem Wasser gespült.

Demaskieren: Ein Antigen kann aus einem oder mehreren Epitopen bestehen. Diese werden zum Teil durch die Formalinfixierung maskiert, das heißt die dreidimensionale Struktur wird durch formalininduzierte Bildung chemischer Quervernetzungen verändert.
Um die Epitope wieder freizulegen, d.h. zu demaskieren wurden sie in Citratpuffer pH 6 eingebracht und 20 Minuten in der Mikrowelle erhitzt.

Abkühlen und Spülen: Nach dem Demaskieren wurden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt und jeweils 5 Minuten in destilliertem Wasser und TBS gespült.

Blockieren der endogenen Peroxidase: Um eine Reaktion der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase mit dem Chromogen zu verhindern muss diese blockiert werden. Dazu wurden die Schnitte 15 Minuten in 250 ml Methanol + 6 ml Wasserstoffperoxid (H_2O_2) inkubiert.

Spülen: Die Präparate wurden jeweils 5 Minuten in destilliertem Wasser und TBS gespült.

Blockierung: Um ein unspezifisches Anfärben des Gewebes zu verhindern, müssen die elektrostatischen Ladungen im Gewebe abgesättigt werden. Dazu wurden auf jeden Träger 100µl Blockierungslösung (Schweineserum 1:10 in TBS verdünnt) pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.3.2 Immunhistochemische Färbung

Indirekte Immunhistochemie mit der Avidin-Biotin-Methode (siehe **Abb. 7**). Bei dieser Methode bindet zunächst ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen, welcher spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (Meerrettichperoxidase), dessen freie Avidinbindungsstellen das Biotin des Sekundärantikörpers binden. Avidin, ein Eiweißglykoprotein, hat die Fähigkeit vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden.
Die Peroxidase des AB-Komplexes wird durch den Farbstoff bzw. das Chromogen DAB sichtbar gemacht. Zu jedem Primärantikörper wird eine Positivkontrolle mitgeführt, um die Sensitivität der Methode zu überprüfen. Als Positivkontrollen verwendeten wir für CD44 Tonsille, für GFAP ZNS-Gewebe, für Osteopontin Knochen und für Osteonektin Haut.

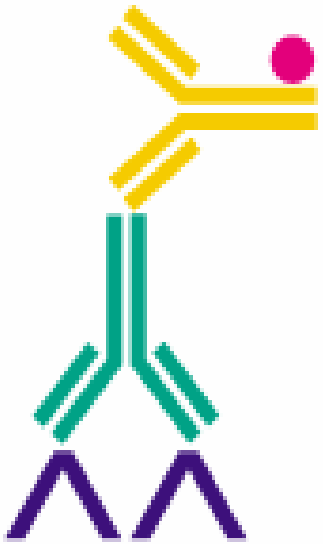


Abb. 7 (Boenisch, 2003): Zwei-Schritt indirekte Methode. Ein enzymmarkierter (Meerrettich-Peroxidase) Sekundärantikörper reagiert mit einem unkonjugierten Primärantikörper, der an eine Gewebeprobe (ein Gewebsantigen) gebunden ist.

Primärantikörper

Verdünnung in TBS:

GFAP:	Verdünnung 1:500
CD44:	Verdünnung 1:200
Kollagen IV:	Verdünnung 1:400
Osteonektin:	Verdünnung 1:4000
Ostepontin:	Verdünnung 1:500

Auftragen: Auf die Objektträger wurden jeweils 100µl der Antikörperlösung pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert.
Spülen: Nach der Inkubation wurden die Schnitte 5 Minuten in TBS gespült, um ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Sekundärantikörper

GFAP: Biotinylierter Brückenantikörper rabbit-anti-mouse 1:400 verdünnt in TBS.
CD44, Kollagen IV, Osteonektin und Osteopontin: Biotinylierter Brückenantikörper swine-anti-rabbit 1:400 verdünnt in TBS.

Auftragen: Auf die Objektträger wurden jeweils 100µl der Antikörperlösung pipettiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.
Spülen: Nach der Inkubation wurden die Schnitte 5 Minuten in TBS gespült.

Avidin-Biotin-Komplex

Auf die Gewebeschnitte wurden jeweils 100µl AB-Komplex-Lösung aufgetragen und diese für 30 Minuten inkubiert.
Spülen: Nach der Inkubation wurden die Schnitte 5 Minuten in TBS gespült.

Färben

DAB (Diaminobenzidin) fungiert als Chromogen (Elektronendonor) und bildet zusammen mit Wasserstoffperoxid und Meerrettichperoxidase einen unlöslichen Farbkomplex.

Die Schnitte wurden in DAB-Substratlösung eingebracht und unter Lichtabschluss 3 Minuten inkubiert, danach 5 Minuten in TBS gespült. Hierbei wurde für alle Primärantikörper dieselbe Entwicklungszeit von 3 Minuten verwendet.

Für die Zellkernfärbung verwendeten wir Hämatoxylin-Eosin, in welches die Schnitte 5 Sekunden eingebracht und danach kurz in Leitungswasser gespült wurden.
Zum Differenzieren wurden die Gewebeproben einige Sekunden in HCl-Alkohol getaucht und danach 5 Minuten in Leitungswasser gespült.

Fertigstellen

Um das Gewebe zu dehydrieren wurde es jeweils für 2 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe eingebracht (70%, 96%, 100%, 100%). Danach wurden die Präparate 2 mal 5 Minuten in Xylol geklärt und zum Schluss mit Mikroskopier-Einschlussmittel HICO-MIC eingedeckelt.

3 Ergebnisse

Unsere Einteilung der Meningeome in die WHO-Grade I-III richtete sich nach den Kriterien der WHO 2007 (genaue Beschreibung unter 1.2.2). Sie erfolgte nach rein histologischen Kriterien.

WHO-Grad II, otherwise benign:	14 Meningeome
WHO-Grad II, otherwise atypical:	11 Meningeome
WHO-Grad III:	10 Meningeome

Invasionsverhalten des Tumors

100% (35/35) der ausgewählten Meningeome weisen histologisch Hirninfiltration auf. Diese ist anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen feststellbar. Kriterium für Hirninvasivität ist nach Perry eine mikroskopisch erkennbare Invasion in angrenzendes Hirngewebe mit Durchbruch der Pia mater (Perry, 2006). Dabei ist das Tumorgewebe irregulär begrenzt und fingerförmige Tumorzapfen ragen in das Gehirngewebe hinein (siehe **Abb. 8**). Auch in ZNS-Gewebe eingeschlossene Inseln von Tumorgewebe können vorkommen (Perry, 2006) (siehe **Abb. 9**). In 97% (34/35) der Tumoren sind solche komplett von ZNS-Gewebe eingeschlossenen Tumorinseln vorhanden (siehe **Abb. 9**).

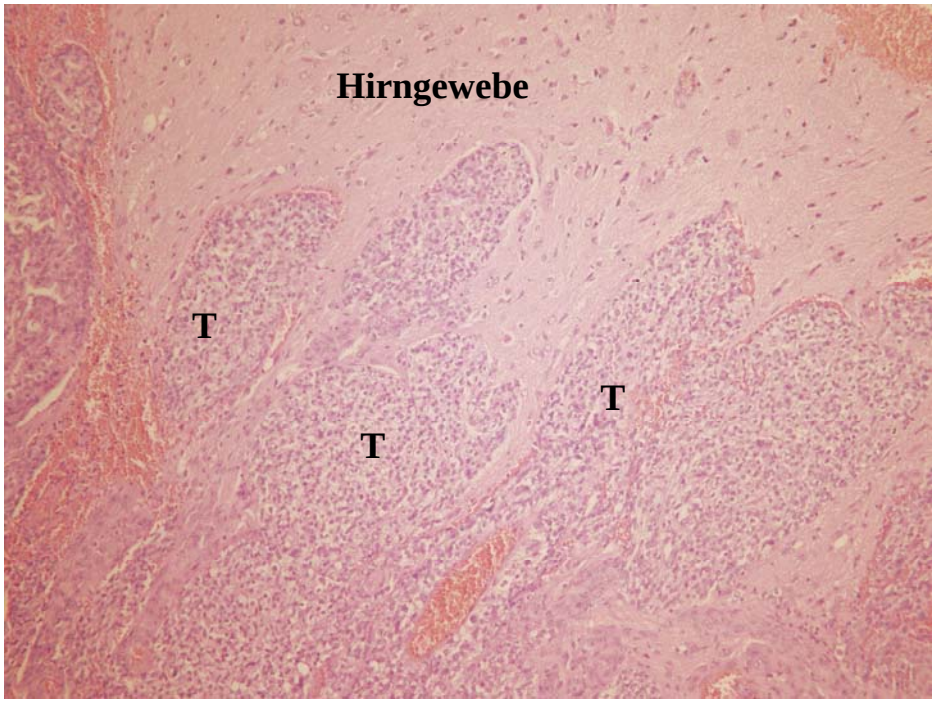


Abb. 8 (Hämatoxylin-Eosin x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Invasives Meningeom: fingerförmige Tumorzapfen (T) ragen in angrenzendes Hirngewebe. T=Tumorgewebe.

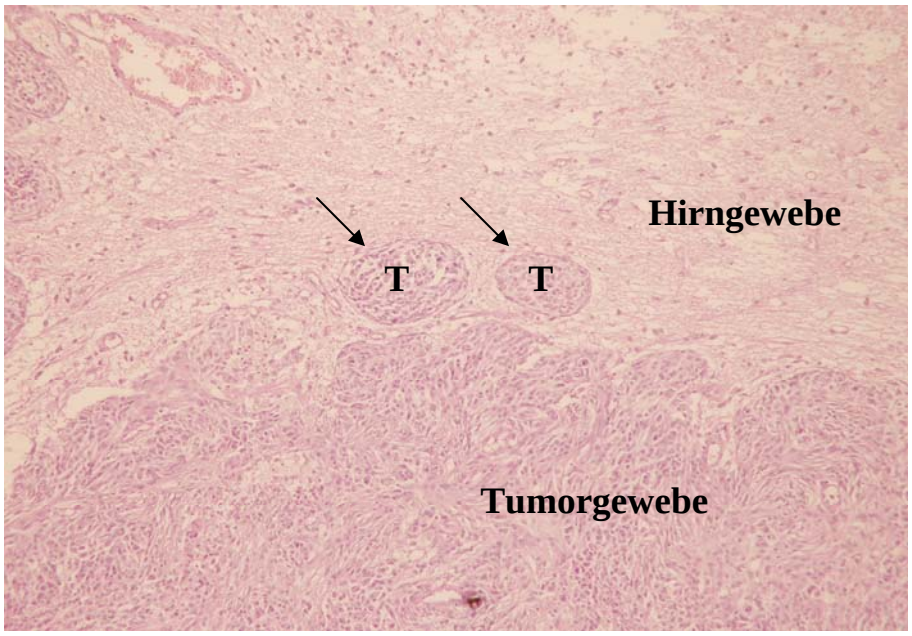


Abb. 9 (Hämatoxylin-Eosin x10): Tumor 16, WHO-Grad II, otherwise atypical. Invasives Meningeom: Tumorinseln sind von Hirngewebe umschlossen (Pfeile). T=Tumorgewebe.

Eingeschlossenes ZNS-Gewebe

Neben Tumoranteilen im ZNS-Gewebe sind auch Hirngewebsinseln, die durch den Invasionsprozess in Tumorgewebe eingeschlossen sind, vorhanden (siehe **Abb. 10**).

Solche Hirngewebsinseln fanden wir in 57% (8/14) bei WHO-Grad II, otherwise benign, in 27% (3/11) bei WHO-Grad II, otherwise atypical und in 80% (8/10) bei WHO-Grad III.

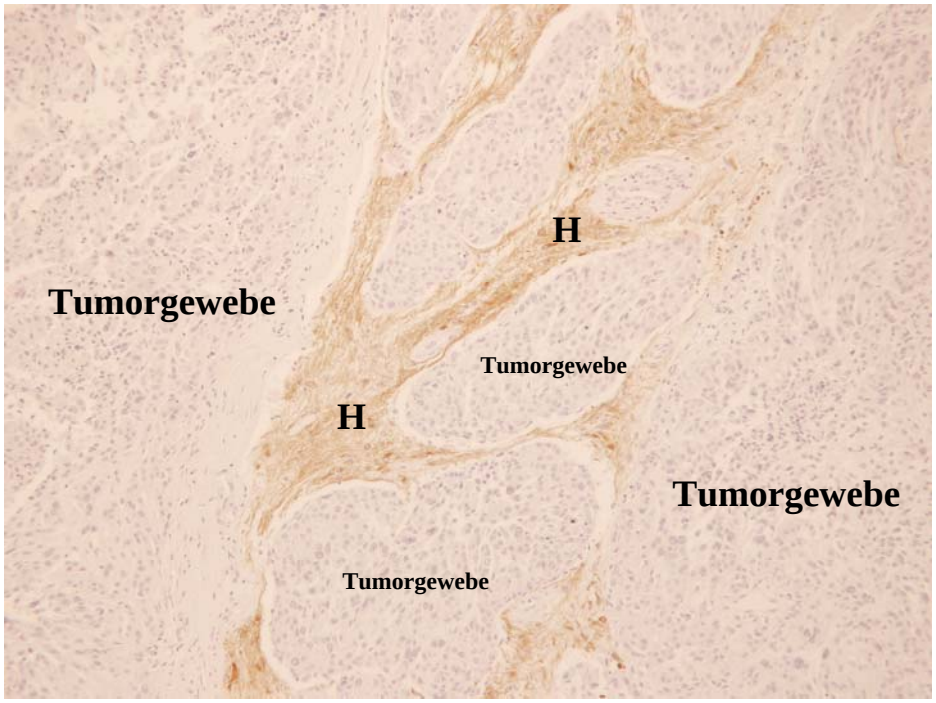


Abb. 10 (GFAP x10): Tumor 28, WHO-Grad III. In Tumorgewebe eingeschlossenes Hirngewebe (H) als Zeichen der Hirninvasion eines Meningeoms. H=Hirngewebe.

3.1 GFAP

Wir verwendeten GFAP-Antikörper als Marker für reaktive Astrozyten und damit für die Darstellung einer Reaktion des umgebenden ZNS-Gewebes auf die Tumorinfiltration. Dabei färben GFAP-Antikörper die Intermediärfilamentproteine der Astrozyten, nicht jedoch die Membranproteine.

Bei der GFAP-Färbung zeigen 100% (35/35) unserer Präparate in dem an den Tumor grenzenden ZNS-Gewebe eine GFAP-Färbung. Bei unseren Präparaten können wir zwei verschiedene Arten von Färbemuster erkennen: Bei Färbemuster 1 ist die Färbung vor allem als dünner Saum zwischen Tumor und Gehirn sichtbar, wobei die Färbeintensität an der zum Tumor grenzenden Kortexoberfläche am stärksten ist (siehe **Abb. 11**).
Färbemuster 2 zeigt einen positiven Faserfilz des umgebenden Gehirngewebes ohne besondere Färbeintensität an der zum Tumor angrenzenden Kortexoberfläche (siehe **Abb. 12**). In einem Präparat kann sowohl nur ein dünner Saum, nur Faserfilz, als auch an verschiedenen Stellen im Präparat beides vorkommen. Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der verschiedenen Färbemuster und dem Tumorgrad, dem Alter oder dem Geschlecht feststellen.

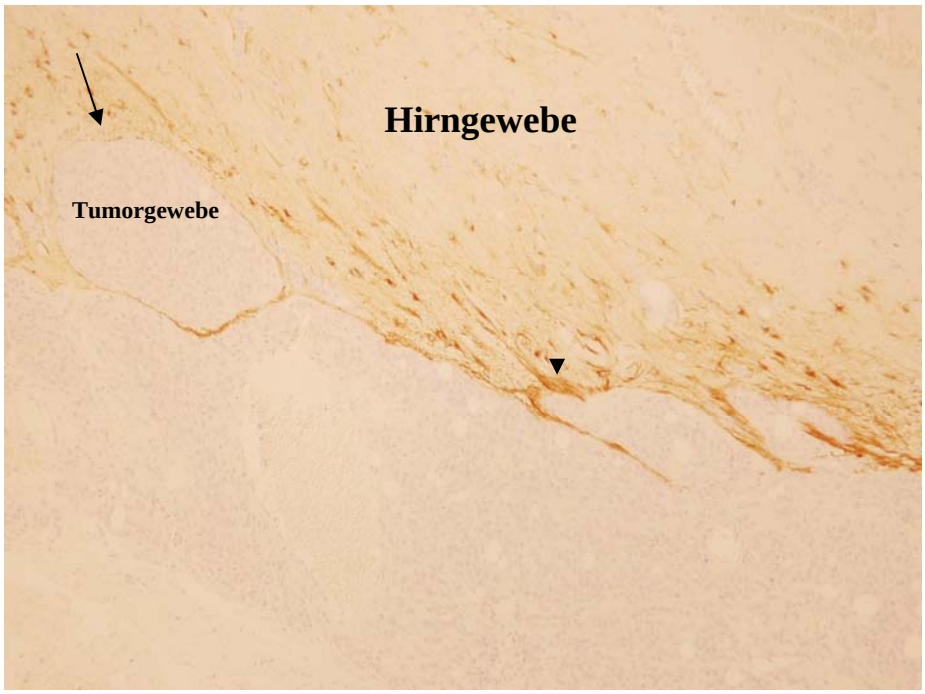


Abb. 11 (GFAP x10): Tumor 34, WHO-Grad III. Färbemuster 1. Positiver GFAP-Saum an Tumor-Hirn-Grenze (Pfeilkopf). Die in das Hirngewebe eindringende Insel besitzt einen schwächeren GFAP-Saum (Pfeil).

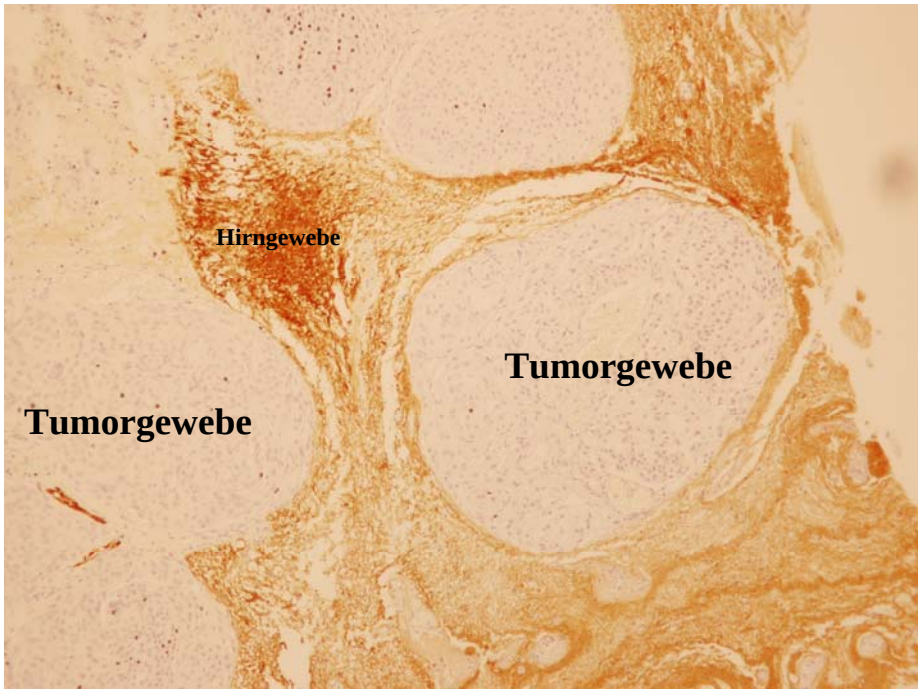


Abb. 12 (GFAP x10): Tumor 22, WHO-Grad II, otherwise atypical. Färbemuster 2. Positiver GFAP-Faserfilz des an das Meningeom angrenzenden Hirngewebes.

Färbemuster 1 ist zu sehen in 66% (23/35) der Präparate (bei WHO-Grad II, otherwise benign 71% (10/14), bei WHO-Grad II, otherwise atypical 72% (8/10) und bei WHO-Grad III 50% (5/10)).
Färbemuster 2 kommt in 71% (25/35) der Präparate vor.
In 26% (9/35) der Fälle ist lediglich ein dünner Saum (Färbemuster 1) erkennbar, jedoch keine flächige Färbung (Färbemuster 2) und in 31% (13/35) der Präparate ist nur eine flächige Färbung erkennbar. Die restlichen 13 Schnitte zeigen beide Färbemuster an unterschiedlichen Stellen.
Der Saum beziehungsweise die flächige Färbung ist jedoch nicht durchgehend an der Tumor-Hirn-Grenze zu beobachten.
Zapfen und Inseln, die in das ZNS-Gewebe hineinragen, können sowohl von GFAP-positivem, als auch -negativem Gewebe umgeben sein. Besonders Inseln, die weit in das angrenzende ZNS eindringen, sind häufig GFAP-negativ (siehe **Abb. 13**).
Auffallend ist auch, dass der dünne Saum oft unterbrochen ist, zum Beispiel durch eindringende Tumorzapfen (siehe **Abb. 14**). Die Tumorzapfen sind

tumornah positiv für GFAP, der Saum umgibt aber nicht den gesamten Zapfen. Weit in das ZNS-Gewebe eindringende Anteile sind von GFAP-negativem ZNS-Gewebe umgeben.
Diese Unterbrechungen des GFAP-Saumes können nur an Tumorzapfen und –inseln beobachtet werden, nicht an Stellen an denen Tumor und ZNS-Gewebe glatt aneinander grenzen.

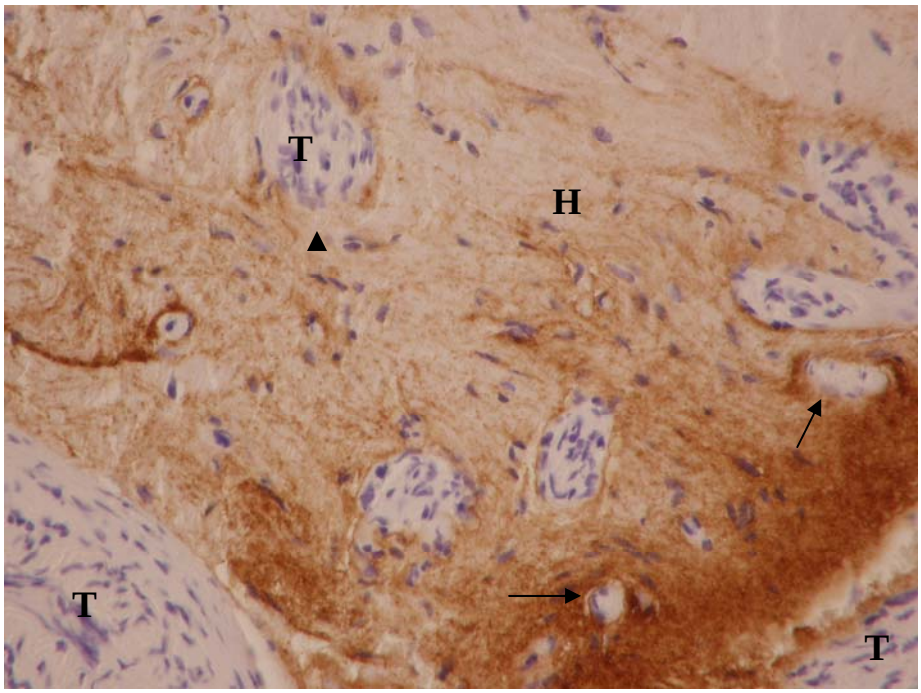


Abb. 13 (GFAP x40): Tumor 31, WHO-Grad III. Tumorinseln in der Nähe des Haupttumors sind von stark positivem Hirngewebe umgeben (Pfeile) und Tumorinseln, die weiter in das Hirngewebe eindringen sind von negativem bzw. schwach positivem Hirngewebe umgeben (Pfeilkopf). T=Tumorgewebe, H=Hirngewebe.

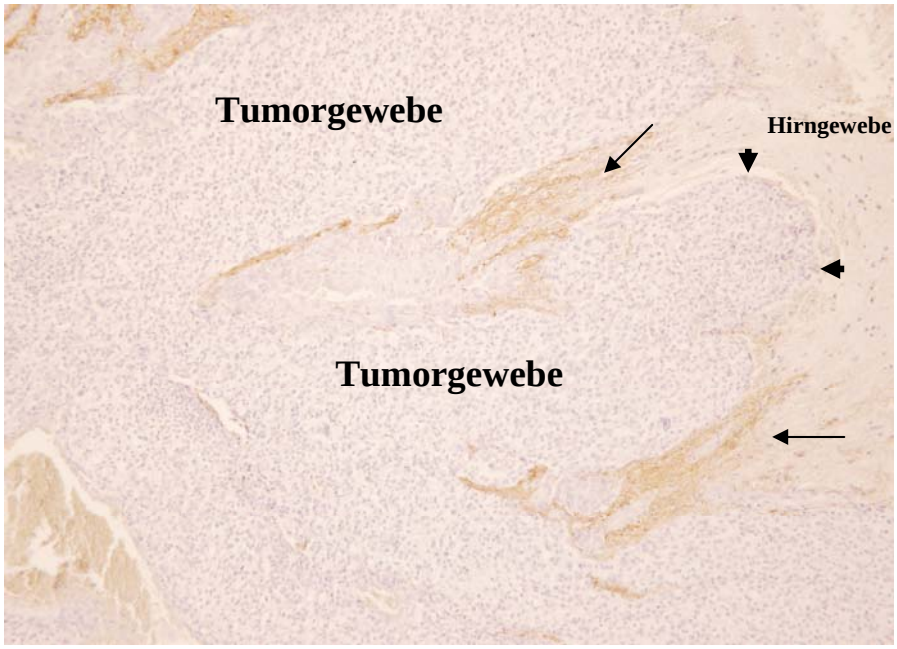


Abb. 14 (GFAP x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Tumorzapfen durchbricht Astrozytensaum. Tumornah ist der Tumorzapfen von GFAP-positivem Gewebe umgeben (Pfeile), die Anteile, die tiefer in das Hirngewebe eindringen sind jedoch nicht von GFAP-positivem Gewebe umgeben (Pfeilköpfe).

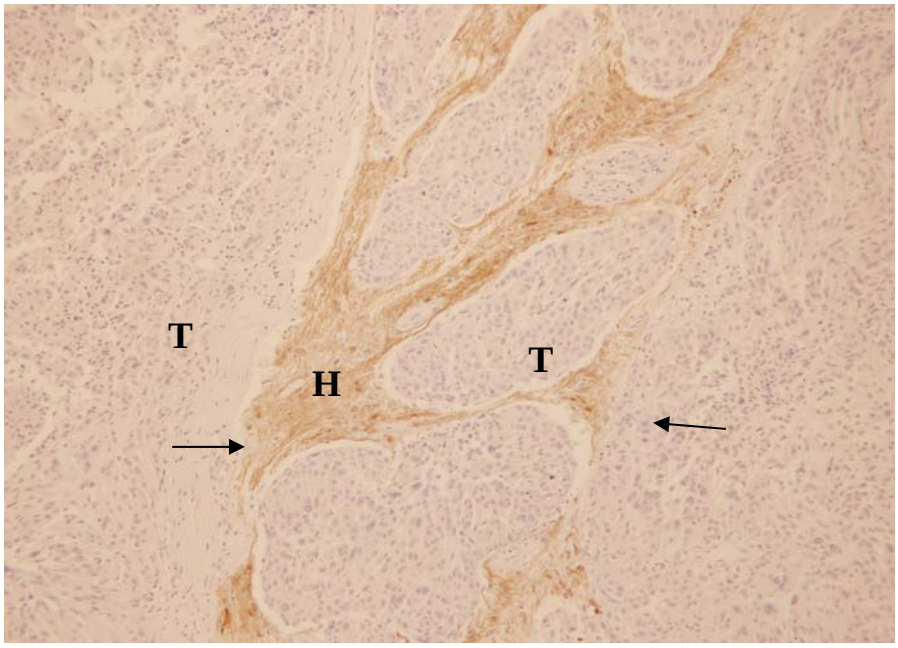


Abb. 15 (GFAP x10): Tumor 28, WHO-Grad III. Quer geschnittene Tumorzapfen (T) sind tumornah von GFAP-positivem Hirngewebe umgeben (Pfeile). H=Hirngewebe, T=Tumorgewebe.

Auch ist zu beobachten, dass angrenzendes Hirngewebe von tief in das ZNS-Gewebe eindringenden Tumoranteilen schwächer positiv oder negativ für GFAP ist (siehe **Abb. 14**).
In Tumorgewebe eingeschlossenes ZNS-Gewebe ist immer positiv für GFAP (siehe **Abb. 15**). Hier sind Tumorzapfen im Anschnitt quer getroffen und da sie tumornah geschnitten wurden von GFAP-positivem ZNS-Gewebe umgeben. Bei einem tumorfernen Querschnitt durch einen Tumorzapfen erscheint dieser als Tumorinsel und kann je nach Entfernung vom Tumor von positivem oder negativem ZNS-Gewebe umgeben sein (vgl. **Abb. 13**).
Wir konnten feststellen, dass die Färbeintensität von GFAP im glialen Gewebe nicht mit dem WHO-Grad zusammenhängt.
Alle untersuchten Tumorzellen waren negativ für GFAP.

Zusammenfassend zeigt sich GFAP als Marker für eine Reaktion der an den Tumor angrenzenden Astrozyten auf das invasive Wachstum des Meningeoms. Auffallend war hierbei, dass diese Reaktion unterschiedlich stark ausfallen kann. Tumorzapfen und –inseln, die tumornah liegen, zeigen eine stärkere Reaktion des umliegenden ZNS-Gewebes, als solche die tumorfern liegen, das heißt, dass die Astrozyten mit größer werdendem Abstand vom Haupttumor nicht mehr nachweisbar sind.

3.2 Osteonektin

Osteonektin verwendeten wir als weiteren Marker, um reaktive Astrozyten zu identifizieren. GFAP schien uns hier als nicht ausreichend, da die Färbung innerhalb einer Biopsie sehr unterschiedlich ist und nur 15% des Astrozytenvolumens mit einer GFAP-Färbung erkannt werden (Bushong et al., 2002).
Bei unseren Färbungen konnten wir feststellen, dass Osteonektin ein Marker ist, der die Zellkörper der Astrozyten färbt, nicht jedoch die Astrozytenfortsätze (siehe **Abb. 16**).

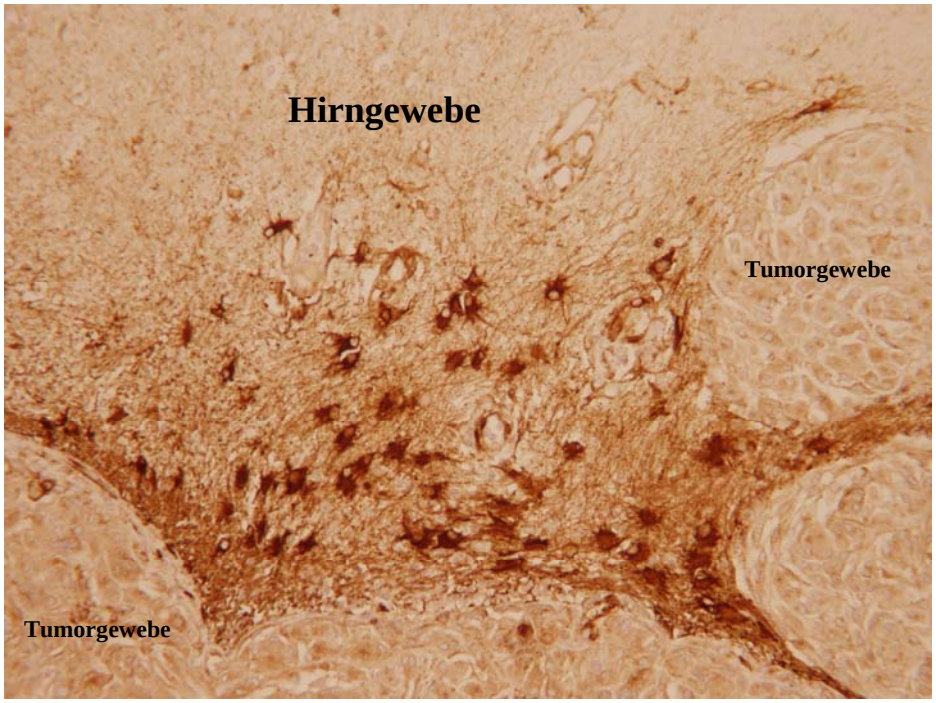


Abb. 16 (Osteonektin x20): Tumor 28, WHO-Grad III. Astrozytenkörper sind positiv für Osteonektin.

An Tumor grenzendes Hirngewebe ist, ebenso wie für GFAP, positiv für Osteonektin, und zwar in 100% (14/14) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise benign, in 100% (11/11) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise atypical und in 90% (9/10) der Fälle bei WHO-Grad III.
Die Morphologie der Färbung ist dabei sehr ähnlich, wie bei der GFAP-Färbung; wieder kamen zwei Färbemuster vor: Osteonektin-positive Bereiche sind entweder als Saum an der zum Tumor grenzenden Kortexoberfläche sichtbar (siehe **Abb. 17**), oder als flächiger Faserfilz. Auch hier ist wieder kein signifikanter Zusammenhang zu Tumorgrad, Alter oder Geschlecht erkennbar. Ein dünner Saum ist zu sehen in 74% (26/35) der Präparate (bei WHO-Grad II, otherwise benign 79% (11/14), bei WHO-Grad II, otherwise atypical 73% (8/11) und bei WHO-Grad III 70% (7/10)). Eine flächige Färbung kommt in 37% (13/35) der Präparate vor (bei WHO-Grad II, otherwise benign 43% (6/10), bei WHO-Grad II, otherwise atypical 27% (3/10) und bei WHO-Grad III 40% (4/10)). In 57% (20/35) der Fälle ist lediglich ein dünner Saum als Färbemuster erkennbar, jedoch keine flächige Färbung und in 23% (8/35) der Präparate ist

nur eine flächige Färbung erkennbar. Die restlichen 7 Schnitte zeigen beide Färbemuster an unterschiedlichen Stellen.
Wie bei GFAP wird auch der Osteonektin-Saum häufig durch Tumorzapfen oder -inseln unterbrochen (siehe **Abb. 17** und **Abb. 18**).
In allen Schnitten sind Tumorzapfen und –inseln zu finden, welche von einem Osteonektinsaum umgeben sind. Dieser Saum ist häufig nicht kontinuierlich, sondern durch Tumoranteile unterbrochen. Auch hier sind die Unterbrechungen nur an Tumorzapfen und –inseln zu beobachten, nicht an Stellen an denen Tumor und ZNS-Gewebe glatt aneinander grenzen. Dabei können wir bei gleichen Schnittebenen beobachten, dass Zapfen, die aus dem GFAP-Saum herausragen auch aus dem Osteonektin-Saum herausragen. Man erkennt hier dieselbe Morphologie der Osteonektinfärbung und GFAP-Färbung (vgl. **Abb. 14** mit **Abb. 18**).

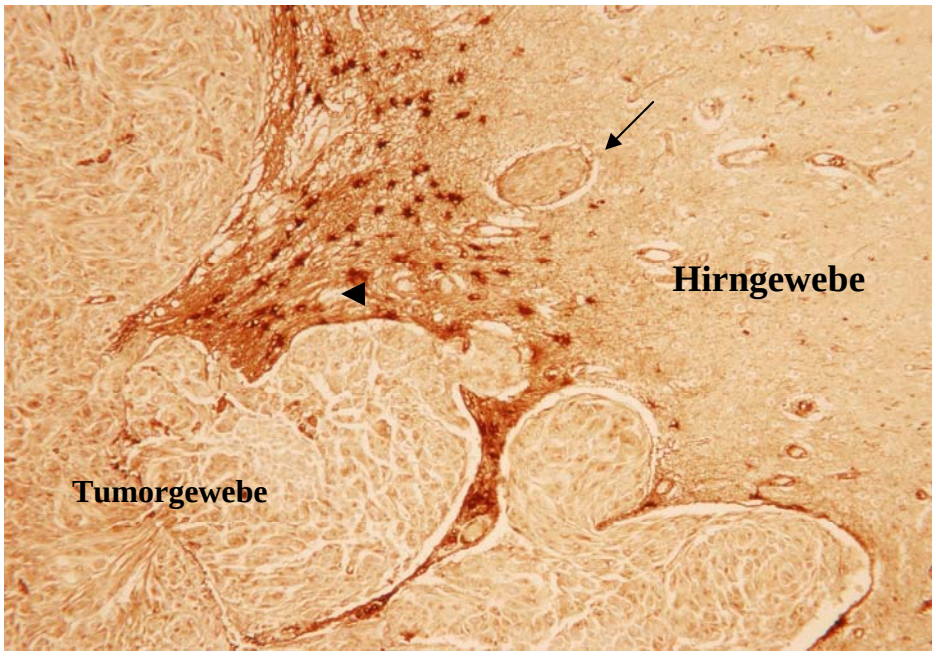


Abb. 17 (Osteonektin x10). Tumor 28, WHO-Grad III. Tumornahe Zapfen sind von einem positiven Osteonektin-Saum umgeben (Pfeilkopf). Eine tumorferne Insel ist von Osteonektin-negativem Hirngewebe umgeben (Pfeil).

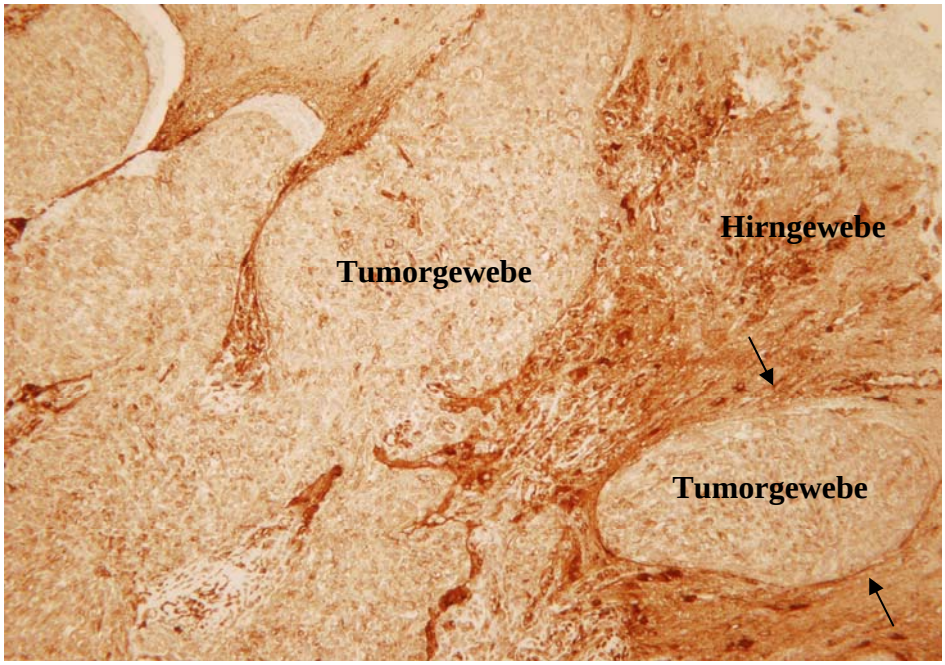


Abb. 18 (Osteonektin x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Gleicher Schnitt wie in Abb. 14. Tumorzapfen durchbricht Astrozytensaum (Pfeil). Man erkennt dieselbe Morphologie von GFAP- und Osteonektinfärbung.

Damit können wir bestätigen, dass an invasives Tumorgewebe angrenzendes ZNS-Gewebe mit reaktiven Astrozyten reagiert, diese jedoch nicht überall vorhanden sind. Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob man den Astrozytenmarker GFAP oder Osteonektin verwendet.
Wie bei GFAP sind auch bei Osteonektin in Hirngewebe eindringende Tumoranteile von schwächer positivem bis negativem ZNS-Gewebe umgeben (siehe **Abb. 17**). In Tumorgewebe eingeschlossenes ZNS-Gewebe ist immer positiv für Osteonektin, da hier immer tumornahe ZNS-Anteile angeschnitten sind.
Auch bei Osteonektin konnten wir keinen Zusammenhang der Färbeintensität mit dem WHO-Grad feststellen.

3.3 CD44

Als weiteren Marker für Astrozyten verwendeten wir Antikörper gegen CD44. CD44 ist ein membrangebundenes Adhäsionsmolekül und wir wollten überprüfen, ob dieses Molekül die gleiche positive Verteilung aufzeigt, wie Osteonektin und GFAP. CD44 färbt vor allem die Fortsätze von Astrozyten und der Antikörper sollte uns damit als weitere Bestätigung für den reaktiven Astrozytensaum an der Hirn-Tumor-Grenze dienen.
Wir erwarteten hierbei ähnliche Ergebnisse, wie bei Osteonektin und GFAP. Diese haben sich bestätigt: Auch bei CD44 ist das an invasives Tumorgewebe angrenzende ZNS-Gewebe positiv (siehe **Abb. 19** und **Abb. 20**). Dies gilt für alle WHO-Grade in 100% der Fälle.

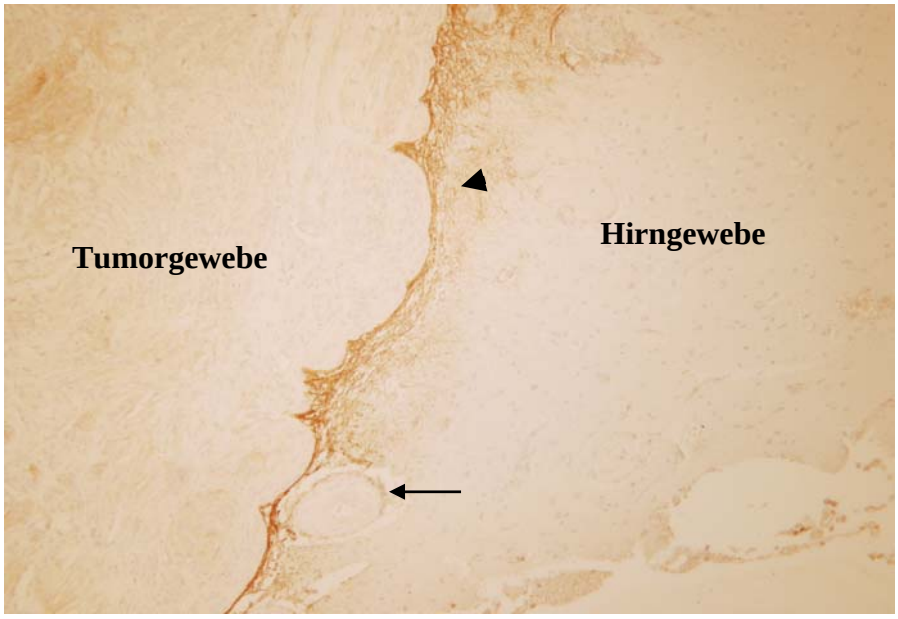


Abb. 19 (CD44 x10): Tumor 14, WHO-Grad II, otherwise benign. CD44-positiver Saum (Pfeilkopf). Von CD44-negativem Hirngewebe umgebene Insel (Pfeil).

Wieder betrifft die Färbung nicht das ganze ZNS-Gewebe, sondern ist als intensiver Saum zur Grenze des Meningeoms (siehe **Abb. 19**) vorhanden (Färbemuster 1). Auch das Färbemuster 2 (Faserfilz) kommt wieder vor. Färbemuster 1 ist in 71% (25/35) aller Meningeome vorhanden (in 79% (11/14) der WHO-Grad II, otherwise benign-Tumoren, in 72% (8/10) der WHO-Grad II,

otherwise atypical-Tumoren und in 60% (6/10) der WHO-Grad III-Tumoren). Färbemuster 2 kommt in 60% (21/35) aller Meningeome vor (in 50% (7/14) der WHO-Grad II, otherwise benign-Tumoren, in 64% (7/10) der WHO-Grad II, otherwise atypical-Tumoren und in 70% (7/10) der WHO-Grad III-Tumoren). Wieder ist kein signifikanter Zusammenhang zu Tumorgrad, Alter und Geschlecht vorhanden.
Hierbei fällt auf, dass beim Vergleich von GFAP, Osteonektin und CD44 Färbemuster 1 und 2 an den gleichen Stellen im Präparat vorkommen.
Auch bei CD44 ist der Saum durch invasive Tumorzapfen und- inseln in vielen Fällen unterbrochen (siehe **Abb. 19** und **Abb. 20**). Auch hier lässt sich im Vergleich mit GFAP und Osteonektin häufig die gleiche Morphologie erkennen. So zeigen Abbildung 14, 18 und 20 denselben Zapfen, der jeweils bei GFAP, Osteonektin und CD44 den positiven Astrozytensaum durchbricht. Unterbrechungen in dem CD44-Saum und in dem Osteonektin-Saum waren in signifikantem Maße vergesellschaftet mit Unterbrechungen in dem GFAP-Saum ($p<0,001$).

Auch hier ist ZNS-Gewebe, welches in Tumorgewebe eingeschlossen und damit tumornah liegt, positiv für CD44 (siehe **Abb. 21**).

Zusammenfassend bestätigt sich, unabhängig von den verwendeten Astrozytenmarkern GFAP, Osteonektin und CD44 das Vorhandensein eines reaktiven Astrozytensaumes an der Tumor-Hirn-Grenze und wir konnten zeigen, dass dieser Saum häufig durch invasive Tumoranteile unterbrochen wird (siehe **Abb. 22**).

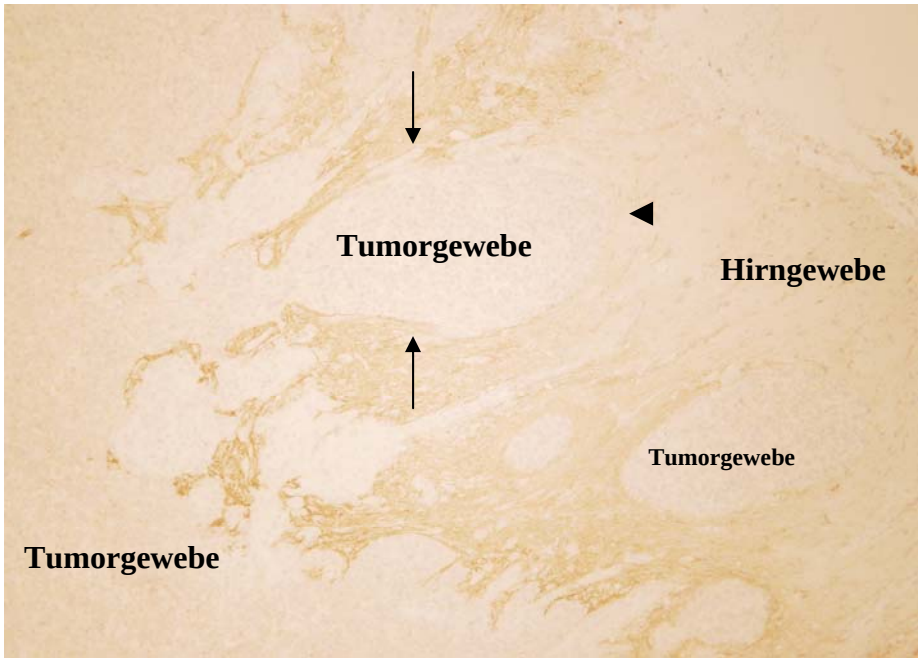


Abb. 20 (CD44 x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Gleicher Schnitt wie in Abb. 14 und 18. Man erkennt dieselbe Morphologie von CD44-, GFAP- und Osteonektinfärbung. Tumornah ist der Tumorzapfen von CD44-positivem Gewebe umgeben (Pfeile). Die Anteile, die tiefer in das Hirngewebe eindringen sind jedoch nicht von CD44-positivem Gewebe umgeben (Pfeilkopf).

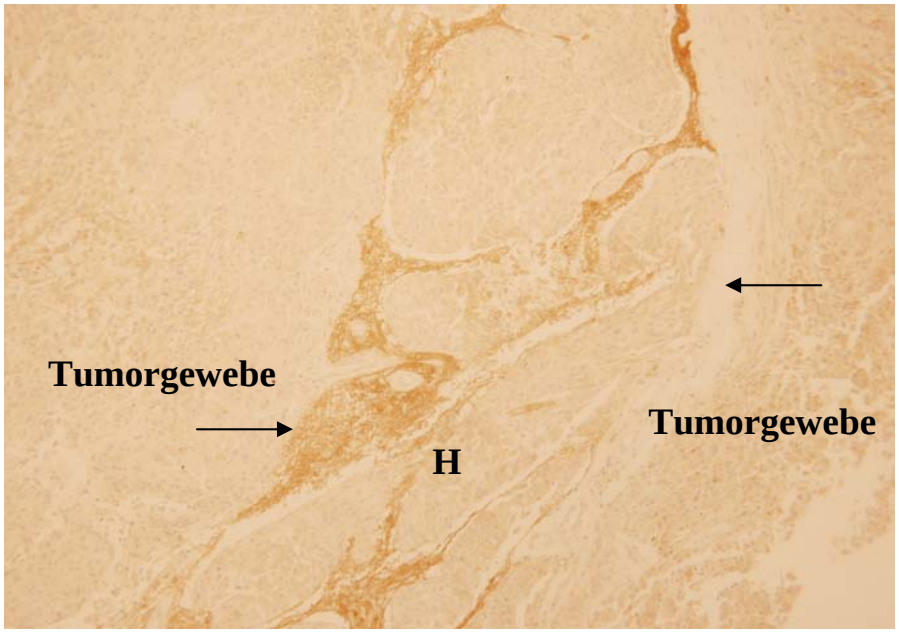


Abb. 21 (CD44 x10):Tumor 28, WHO-Grad III. In Tumorgewebe eingeschlossenes Hirngewebe (Pfeile) ist positiv für CD44. H=Hirngewebe.

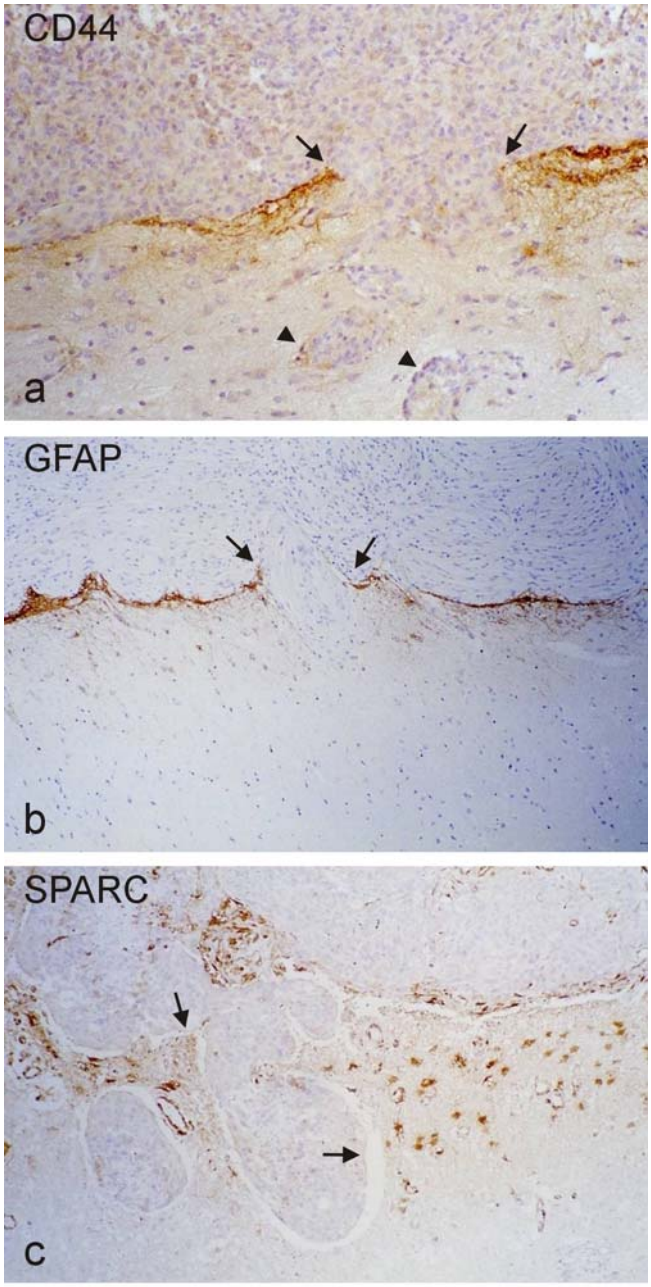


Abb. 22 (Vergleich CD44 x20, GFAP x10, Osteonektin/SPARC x10): Unterbrechung des Randsaumes durch Tumorzapfen (Pfeile).

3.4 Liganden von CD44

3.4.1 Osteopontin

Osteopontin ist als ein Ligand von CD44 beschrieben worden (Weber GF et al., 1996). Um diesen Zusammenhang an der Meningeom-Hirn-Grenze zu untersuchen, haben wir Antikörper gegen Osteopontin verwendet. Von 35 gefärbten Meningeomen sind 35 negativ für Osteopontin. Sowohl das Tumorgewebe, als auch das angrenzende ZNS-Gewebe zeigen keine Färbung für Osteopontin (siehe **Abb. 23**). Die jeweils mitgefärbten Positivkontrollen von Knochenschnitten waren jedoch immer positiv (siehe **Abb. 24**), sodass wir davon ausgehen, dass Osteopontin an der Meningeom-Hirn-Grenze kein Ligand von CD44 ist.

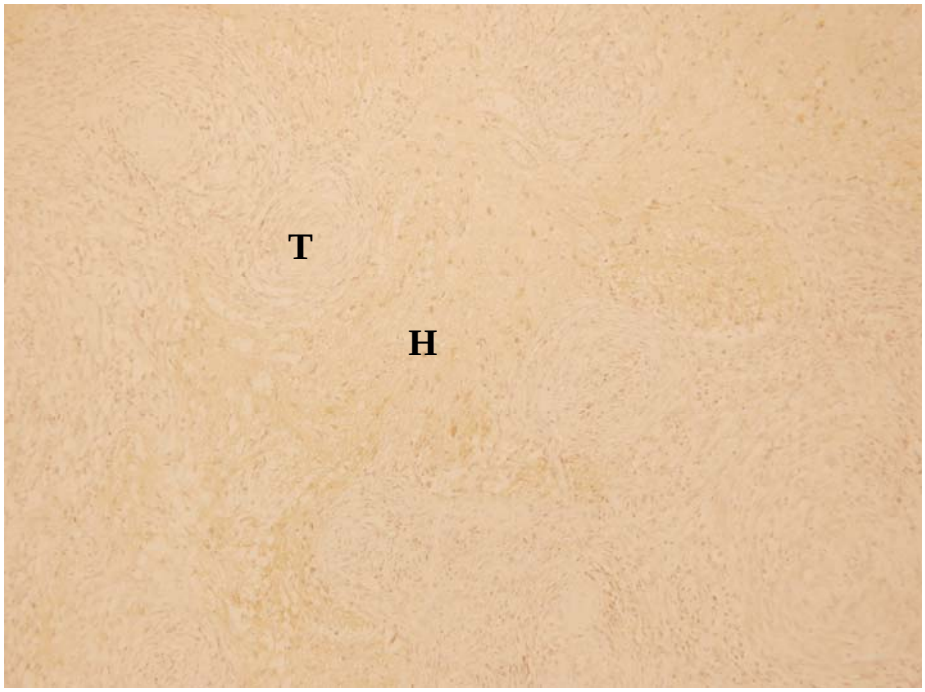


Abb. 23 (Osteopontin x10): Tumor 31, WHO-Grad III. Keine Färbung an der Tumor-Hirn-Grenze. T=Tumorgewebe, H=Hirngewebe.

Abb. 24 (Osteopontin 10x): Knochengewebe als Positivkontrolle für Osteopontin.

3.4.2 Kollagen IV

Kollagen IV ist einer der Hauptbestandteile der Basalmembran. Direkt angrenzend an die pial-gliale Basalmembran befinden sich die Astrozytenfortsätze der Membrana limitans gliae, welche auch die Basalmembran bilden (Rutka et al., 1985). Das Verhalten dieser Astrozyten ist in 3.1 bis 3.3 beschrieben: durch Tumorinvasion entstehen reaktive Astrozyten. Wie wir durch GFAP, Osteonektin und CD44 bestätigen konnten, ist dieser reaktive Astrozytensaum zum Teil unterbrochen. Da die pial-gliale Basalmembran und die Astrozyten dichten Kontakt haben, stellte sich uns die Frage, wie sich die Basalmembran an den Astrozyten-negativen Stellen im Tumor darstellen würde.

Eine pial-gliale Basalmembran, die das invasive Tumorgewebe zum Teil von dem ZNS-Gewebe abgrenzt, war in 79% (11/14) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise benign, in 64% (7/11) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise atypical und in 70% (7/10) der Fälle bei WHO-Grad III vorhanden (siehe **Abb. 25**). Diese pial-gliale Basalmembran ist jedoch nicht überall vorhanden. Sie ist zum Teil

diskontinuierlich oder ausgedünnt und wird genau wie der Astrozytensaum durch Tumorzapfen und –inseln unterbrochen (siehe **Abb. 26** und **Abb. 27**).

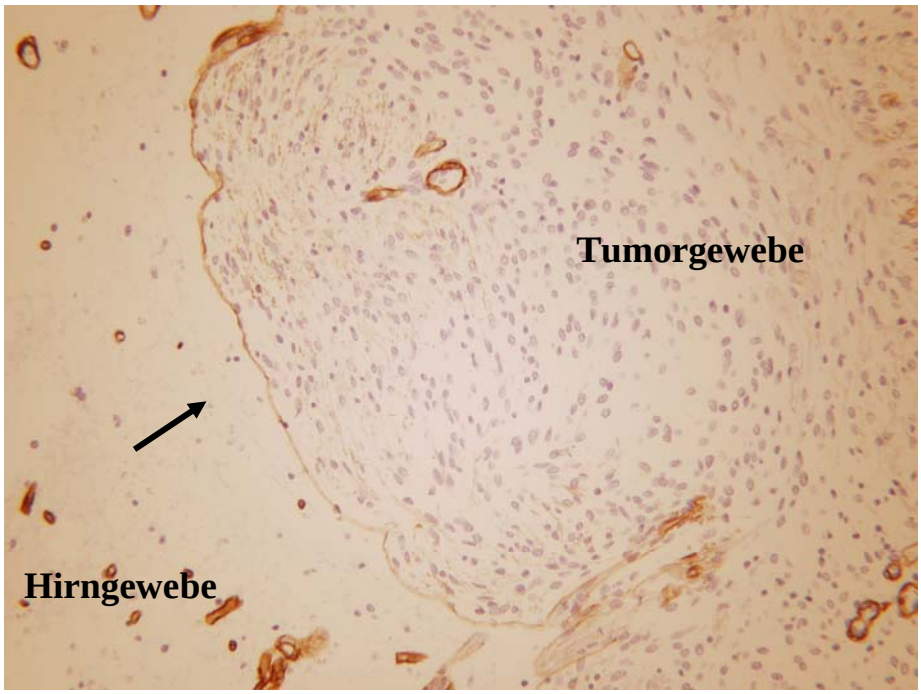
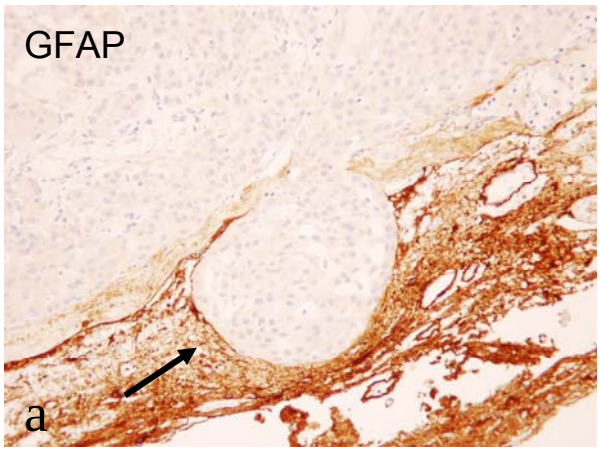
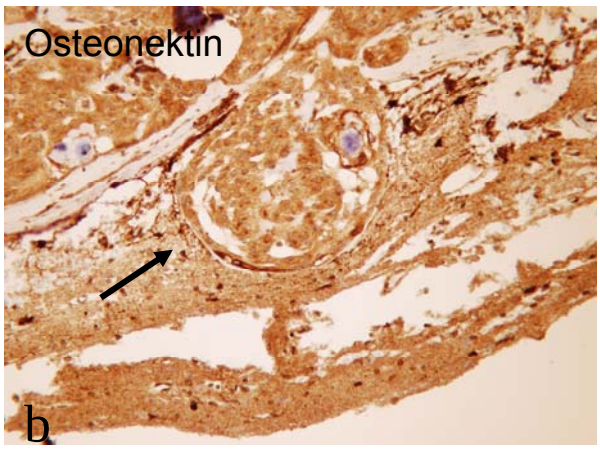


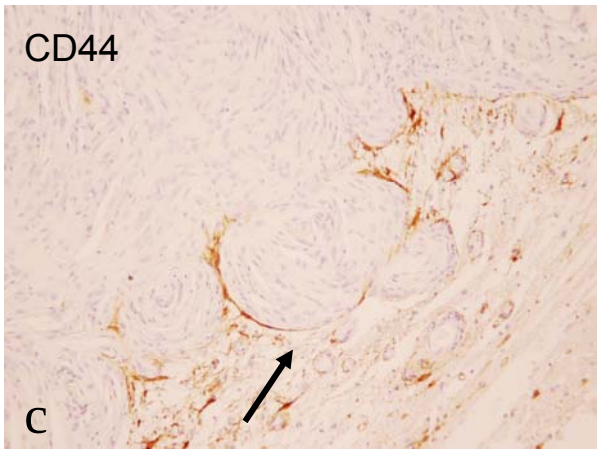
Abb. 25 (Kollagen IV x20): Tumor 11, WHO-Grad II, otherwise benign. Kollagen IV-positive pial-gliale Grenzmembran (Pfeil).

Auffällig ist hierbei ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Astrozytensaumes mit dem Vorhandensein einer Basalmembran: Astrozyten an der Tumor-Hirn-Grenze konnten wir durch GFAP, Osteonektin und CD44 in 100% (14/14) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise benign, in 100% (11/11) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise atypical und in 90% (9/10) der Fälle bei WHO-Grad III nachweisen.
Das Vorkommen von reaktiven Astrozyten korreliert in 79% (11/14) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise benign, in 64% (7/11) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise atypical und in 78% (7/9) der Fälle bei WHO-Grad III mit dem Vorhandensein einer Basalmembran. Die Basalmembran kommt hierbei an denselben Stellen im Tumor vor, an denen auch ein reaktiver Astrozytensaum zu beobachten ist. Stellen im Tumor ohne reaktiven Astrozytensaum haben

häufig auch keine Basalmembran. In Abbildung 26 und 27 ist die gleiche Morphologie von Astrozytensaum und Basalmembran erkennbar.
Der Zusammenhang von Astrozytensaum und Basalmembran wird dadurch bestätigt, dass astrozytensaumfreie Inseln auch keine Basalmembran besitzen (siehe **Abb. 27**).







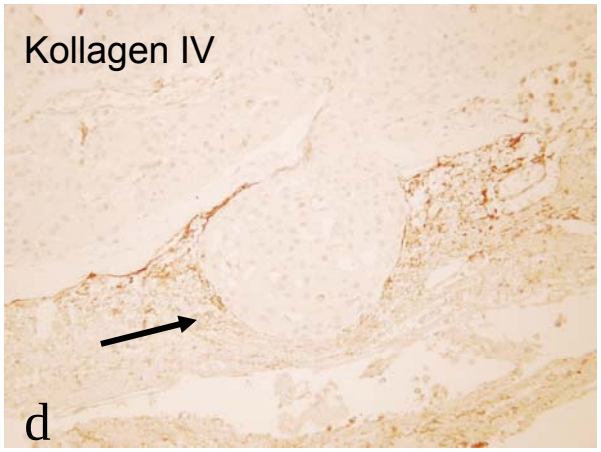


Abb. 26 (GFAP, Osteonektin, CD44, Kollagen IV x20): Tumor 5, WHO-Grad II, otherwise benign. Vergleich von GFAP (a), Osteonektin (b), CD44 (c) und Kollagen IV (d). Der Astrozytensaum (Pfeile in a, b, c) korreliert mit dem Vorhandensein einer Basalmembran (Pfeil in d).

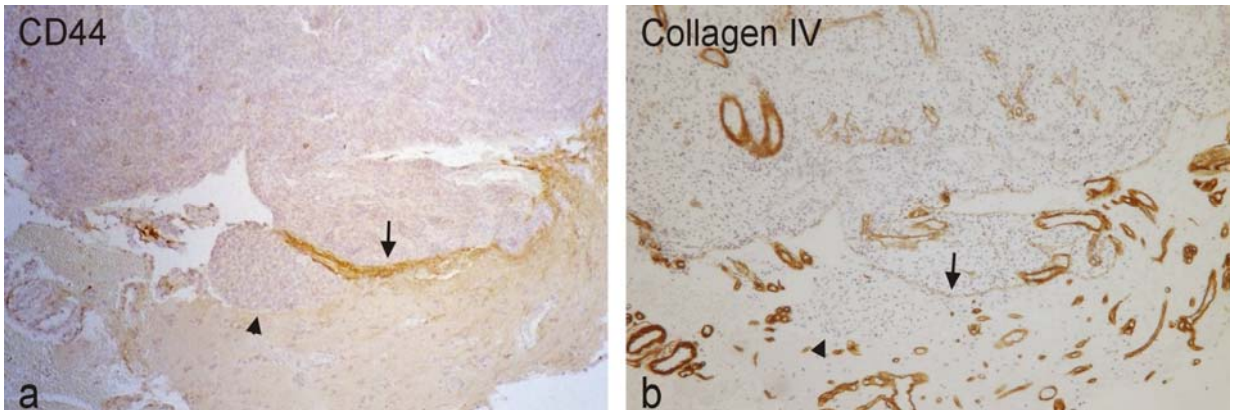


Abb. 27 (CD44, Kollagen IV x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Insel mit vorhandenem Astrozytensaum, positiv für CD44 (Pfeil, Bild a) und mit vorhandener Basalmembran (Pfeil, Bild b). Die Insel daneben (Pfeilkopf) hat weder einen umgebenden Astrozytensaum (negativ für CD44 in Bild a) noch eine begrenzende Basalmembran (negativ für Kollagen IV in Bild b).

Zusammenfassend bestätigt sich unsere Vermutung, dass der enge Kontakt zwischen Basalmembran und Astrozyten auch zu einem gleichzeitigen Verschwinden von Basalmembran und Astrozyten führt. In Astrozytensaum-

negativen Anteilen der Tumor-Hirn-Grenze kommt auch keine Basalmembran mehr vor.

3.5 Sektionsfälle

Da sich unsere Beobachtungen im Bereich der Glia limitans zeigten, wollten wir zum Vergleich das Färbeverhalten unserer Antikörper an der Glia limitans externa in einem nicht pathologischen Gehirn betrachten.
Für GFAP ist bereits bekannt, dass der Antikörper die Glia limitans externa stark anfärbt (siehe **Abb. 4**). Dasselbe kann man für CD44 beobachten: in 3/3 gefärbten Schnitten zeigt sich die Glia limitans externa immer deutlich positiv (siehe **Abb. 28**). Hier färben sich nur die Fortsätze der Astrozyten an, nicht die Astrozytenkörper.

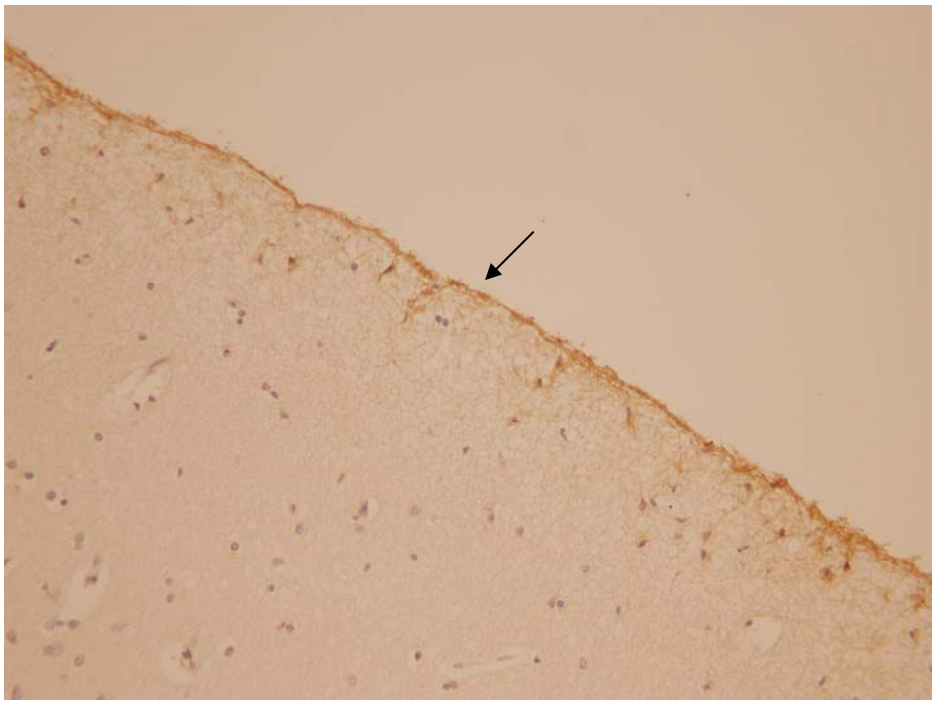


Abb. 28 (CD44 x20): Im Sektionsschnitt sind die Astrozytenfortsätze, welche die Glia limitans (Pfeil) bilden, für CD44 positiv.

Auch bei Osteonektin zeigte sich eine positive Glia limitans externa in 16/16 gefärbten Fällen. Hier ist wieder deutlich zu sehen, dass vor allem die Astrozytenkörper positiv sind (siehe **Abb. 29**).

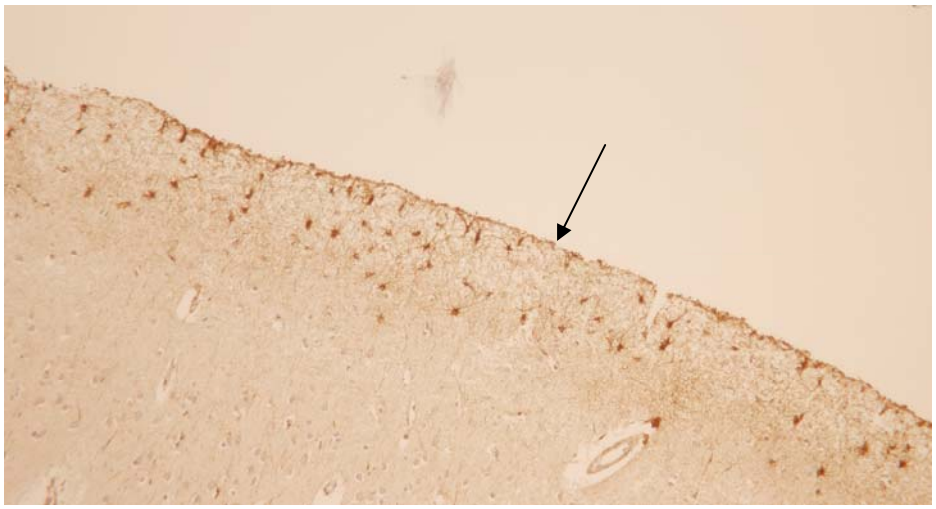


Abb. 29 (Osteonektin x10): Die Astrozytenkörper der Glia limitans externa (Pfeil) sind positiv für Osteonektin.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Reaktion des angrenzenden ZNS-Gewebes auf die Invasion des Meningeoms. Etwa 4% aller Meningeome infiltrieren angrenzendes Hirngewebe (Perry et al., 1997). Diese Tumoren sind prognostisch ungünstig. So verhalten sich hirninvasive Meningeome mit histologisch benignem Erscheinungsbild (WHO-Grad II, otherwise benign) in Bezug auf Überlebens- und Rezidivrate wie atypische Meningeome (WHO-Grad II, otherwise atypical) (Perry et al., 1999).

Ein erster Bericht über hirninvasive Meningeome existiert in einer Fallsammlung mit 5 Fällen von 1937. Hier wird beschrieben, dass Meningeom-Geschwulstzapfen in das Gehirn hineinreichen und bis in das Marklager vordringen können. Auch wird in dieser Arbeit bereits erörtert, ob „die Geschwülste als bösartig zu bezeichnen seien“ (Kalbfleisch et al., 1937). Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass sich in umgebendes Gewebe einwachsende Meningeome wie bösartige Geschwülste verhalten, sich von ihnen aber durch das Fehlen von Metastasenbildung unterscheiden (Kalbfleisch et al., 1937).
Seit dieser Zeit konnte das Wissen über hirninvasive Meningeome durch mehrere Studien erweitert werden. So ist inzwischen bekannt, dass der histologische Tumorgrad bei der Hirninvasion eine untergeordnete Rolle spielt, da sowohl histologisch benigne, atypische, als auch anaplastische Meningeome Hirninvasivität aufweisen können. Immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass Metalloproteinase-9 und IGFBP-6 in hirninvasiven Meningeomen vermehrt exprimiert werden (Nordqvist et al., 2002; Nordqvist et al., 2001; Okuducu et al., 2006).

Der Großteil der bisher durchgeführten Studien beschäftigt sich vor allem mit Veränderungen im Tumor selbst. So soll die Transkription des Insulin like growth factors (IGF) II und seines Bindungsproteins (IGF BP-6) mit Invasion korrelieren (Nordqvist et al., 2001). Allerdings war von den untersuchten

Tumoren nicht die Hirn-Tumor-Grenze untersucht worden. Vielmehr erfolgte die Identifizierung hirninvasiver Meningeome radiologisch (Nordqvist et al., 2001).

Ebenso wurden die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 in hirninvasiven Meningeomen untersucht (Kirches et al., 2001; Mizoue et al., 1999; Nordqvist et al., 2002; Siddique et al., 2003). Diese beiden Enzyme bauen Basalmembran ab. Die Ergebnisse dieser Arbeiten waren widersprüchlich. Es ergab sich kein einheitliches Muster für die Aktivität dieser beiden Metalloproteinasen. Wiederum wurde die Hirninvasion nicht histologisch gesichert, sondern intraoperativ und/ oder radiologisch.

Über die Astrozytenreaktion gegenüber invasiven Meningeomen war bisher Nichts bekannt. Mit dieser Fragestellung beschäftigt sich die vorliegende Studie: zu welchen Reaktionen kommt es im angrenzenden ZNS-Gewebe durch das Eindringen des Meningeoms?

Bei nicht-invasiven Meningeomen wird das Tumorgewebe von einer Basalmembran, der pial-glialen Grenzmembran, vom ZNS-Gewebe getrennt. Fortsätze von Astrozyten liegen dieser glialen Basalmembran direkt an und bilden die Membrana glia limitans (siehe **Abb. 2**). Der enge Zusammenhang zwischen den Astrozyten und der Basalmembran zeigt sich auch dadurch, dass in in-vitro Versuchen nachgewiesen werden konnte, dass diese Astrozytenfortsätze Komponenten der Basalmambran herstellen (Rutka et al., 1985).
Wir haben in der vorliegenden Studie diese beiden ersten Barrieren, die ein invasives Meningeom durchdringen muss, namentlich die Basalmembran sowie die angrenzenden Astrozyten immunhistochemisch untersucht. Wie reagieren die Astrozyten und kommt es durch die Invasion zur Zerstörung der pial-glialen Basalmembran? Des Weiteren interessierte uns der Zusammenhang zwischen der Astrozytenreaktion und der Basalmembran, da diese wie oben erläutert, sowohl anatomisch, als auch funktionell in engem Zusammenhang stehen.

Basalmembranen trennen Gewebe mit Herkunft von unterschiedlichen Keimblättern voneinander. Zum Beispiel wird Schleimhautepithel von der darunter liegenden Submukosa durch eine Basalmembran getrennt. Die intakte Basalmembran ist eine Barriere zwischen Epithelgewebe und Bindegewebe. Tumoren, die vom Epithelgewebe ausgehen, müssen diese Barriere überwinden. Gutartige Tumoren und Carcinomata in situ sind durch die Basalmembran vom umgebenden Bindegewebe getrennt. Carcinomata in situ können jedoch invasiv werden, wobei es zuerst zu Mikroinvasion kommt. Mikroinvasion ist dadurch erkennbar, dass die Basalmembran ausgedünnt, fragmentiert oder unterbrochen wird (Barsky et al., 1983). Bei invasiven Karzinomen wird die Basalmembran komplett durchbrochen. Die unterbrochene Basalmembran ist histologisch wichtig zur Unterscheidung eines Carcinoma in situ von einem invasiven Karzinom. Die Invasion geht mit der Zerstörung der Basalmembran einher.
Karzinomzellen benutzen degradierende Enzyme, von denen zahlreiche gegen Bestandteile der Basalmembran gerichtet sind, zum Beispiel Kollagenasen und andere Proteasen (Liotta et al., 1984). Dieser Mechanismus ist beschrieben für Mamma-Karzinome (Liotta et al., 1983).
Für Meningeome ist ebenfalls bekannt, dass Metalloproteinasen bei invasiven Meningeomen vermehrt exprimiert werden (Okuducu et al., 2006). Metalloproteinasen können zur Degradation von Basalmembran beitragen und sind somit wichtig für Tumorinvasion. Insbesondere Metalloproteinase-9 wird in hirninvasiven Meningeomen vermehrt exprimiert (Nordqvist, 2001).

Für invasive Meningeome vom WHO-Grad II, otherwise benign konnte gezeigt werden, dass hier die Basalmembran zum größten Teil erhalten bleibt und lediglich bei wenigen invasiven Meningeomen vom WHO-Grad II, otherwise benign ausgedünnt, fragmentiert und zum Teil unterbrochen wird (Fritz et al., 2005). Hirninvasive Meningeome vom WHO-Grad II, otherwise benign erscheinen insofern analog zu Carcinomata in situ mit Mikroinvasion.

In unserer Studie wurden hirninvasive Meningeome mit sowohl benignem (WHO-Grad II, otherwise benign), atypischem (WHO-Grad II, otherwise atypical), als auch anaplastischem (WHO-Grad III) histologischen Subtyp verwendet, untersucht wie angrenzende Astrozyten auf die Hirninvasion reagieren und parallel dazu das Vorkommen der pial-glialen Basalmembran beobachtet.

Als Marker für reaktive Astrozyten wurden Antikörper gegen GFAP, Osteonektin und CD44 verwendet. GFAP-Antikörper färben die Intermediärfilamente der Astrozyten. Unter physiologischen Bedingungen exprimieren Astrozyten jedoch zu wenig GFAP, um es immunhistochemisch nachweisen zu können (siehe **Abb. 4**). Erst durch pathologische Reize wie mechanische Traumata, Hirnödem, Hypoglykämien oder meningeale Carcinomatose kommt es zur Reaktion der Astrozyten (reaktive Astrogliose) mit Astrozytenschwellung und vermehrter Expression von GFAP. Der Nachweis ist somit ein Zeichen für Reaktivität der Astrozyten (Eng et al., 1994; Rutka et al., 1997). Mit der GFAP-Färbung werden jedoch nur 15% des Astrozytenvolumens erkannt (Bushong et al., 2002), deshalb verwendeten wir als weitere Marker Osteonektin und CD44. Dies sind zwei Transmembranproteine, die an Kollagen IV binden (Bradshaw et al., 2001; Knutson et al., 1996). In den Färbungen mit Osteonektin ist erkennbar, dass Osteonektin hauptsächlich die Astrozytenkörper färbt (siehe **Abb. 16**). CD44 kommt als Membranprotein vor allem in den Astrozytenfortsätzen vor (siehe **Abb. 28**). Somit konnten verschiedene Anteile der Astrozyten gefärbt werden.

Anti-GFAP und Anti-CD44 zeigten, dass in 100% der untersuchten Tumore eine Astrozytenreaktion vorkam. Anti-Osteonektin war positiv in 100% der Tumoren mit WHO-Grad II, otherwise benign und WHO-Grad II, otherwise atypical, bei WHO-Grad III in 90% (9/10). Die normalerweise an das Hirngewebe grenzende dünne, nur schwach mit GFAP visualisierbare Schicht (siehe **Abb. 4**) von Astrozyten-Fortsätzen (glial endfeet) färbte sich stark mit CD44 an (siehe **Abb.**

19, **Abb. 20**, **Abb. 21**). Auch die Astrozytenkörper wurden nun sichtbar mit GFAP und Osteonektin gefärbt (siehe **Abb. 11** und **Abb. 16**).
Durch das Einwachsen des Meningeoms kommt es folglich zu einer Astrozytenreaktion.
Es konnten zwei verschiede Färbemuster erkannt werden: Färbemuster 1 als dünner Astrozytensaum (siehe **Abb. 11**) und Färbemuster 2 mit positivem Faserfilz (siehe **Abb. 12**). Vorkommen von Färbemuster 1 (bzw. Färbemuster 2) in der GFAP-Färbung war vergesellschaftet mit Vorkommen von Färbemuster 1 (bzw. Färbemuster 2) in der CD44- und Osteonektinfärbung. Für alle unsere Antikörper konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der unterschiedlichen Färbemuster und dem Tumorgrad, dem Alter oder dem Geschlecht feststellen. Es bleibt zu klären, mit welchen Faktoren das Vorkommen der unterschiedlichen Färbemuster zusammenhängt.
Das Vorkommen aller drei Astrozytenmarker an der Hirn-Tumorgrenze zeigte uns, dass ein reaktiver Astrozytensaum in allen untersuchten Schnitten vorhanden war. Dieser reaktive Astrozytensaum war jedoch nicht in allen Schnitten durchgehend, sondern zum Teil ausgedünnt oder unterbrochen. Anwesenheit (und Abwesenheit) des GFAP-positiven Saumes war mit Anwesenheit (und Abwesenheit) eines positiven Saumes bei den beiden anderen Markern vergesellschaftet.

Für tiefer in das Hirngewebe eindringende Tumoranteile hatten wir erwartet eine verstärkte Astrozytenreaktion beobachten zu können. Gerade solche eindringenden Tumorzapfen und –inseln waren jedoch überraschenderweise häufig nicht von dem reaktiven Astrozytensaum umgeben (siehe **Abb. 17**, **Abb. 20** und **Abb. 22**).
Keiner der drei Astrozytenmarker GFAP, Osteonektin und CD44 war an diesen Inseln nachweisbar.

Begonnen wurde die Untersuchung mit Anti-CD44, weil CD44 an Kollagen IV bindet und damit ein direkter Zusammenhang zur Basalmembran besteht. Wir konnten beobachten, dass CD44 bei tiefer eindringenden Tumoranteilen nicht

mehr exprimiert wurde und stellten uns die Frage, ob hier der ganze Astrozyt zugrunde geht, oder ob es sich lediglich um den Verlust von Membranproteinen wie CD44 handelt. Um diese Frage zu beantworten verwendeten wir die zusätzlichen Astrozytenmarker GFAP und Osteonektin.
Der Verlust aller drei Marker spricht dafür, dass es sich um einen Untergang des Astrozyten handelt und nicht um fehlende Expression von einem der Marker.
Es handelt sich folglich nicht um den Verlust bestimmter Membranproteine wie CD44 und Osteonektin, sondern der gesamte Astrozyt ist nicht mehr nachweisbar. Durch mikroskopische Inspektion konnten wir jedoch keine auf Zelltod hindeutende nukleäre Disintegration oder apoptotische Kerne sehen. In einer folgenden Studie untersuchen wir jedoch, ob es in den entsprechenden Hirnanteilen zu einer vermehrten Makrophagenreaktion kommt.

In Tumorgewebe eingeschlossenes ZNS-Gewebe war bei unseren Schnitten immer positiv für GFAP, Osteonektin und CD44 (siehe **Abb. 15** und **Abb. 21**). Nach unserer Studie gehen wir davon aus, dass eingeschlossenes ZNS-Gewebe deshalb positiv ist, weil es nahe am Tumor angeschnitten ist. ZNS-Anteile, die weiter entfernt von dem Meningeom liegen sind nicht GFAP-positiv, da es hier bereits zu einem Verlust der Astrozyten gekommen ist. Wir erweitern dadurch die bereits von Perry beschriebene Tatsache, dass in Tumorgewebe eingeschlossenes ZNS-Gewebe immer positiv für GFAP sei und sich dadurch auch unterscheiden lasse (Perry, 2006). ZNS-Gewebe erscheint vor allem dann als in Tumorgewebe eingeschlossen, wenn es nahe am Tumor angeschnitten ist und auch nur dann ist es positiv für GFAP. Tumorferne Anteile erscheinen negativ für GFAP.

Des Weiteren konnten wir feststellen, dass die Astrozytenreaktion mit der Anwesenheit der Basalmembran korreliert (siehe **Abb. 26** und **Abb. 27**).
Eine pial-gliale Grenzmembran, die das invasive Tumorgewebe zum Teil von dem ZNS-Gewebe abgrenzt, war bei allen WHO-Grad II, otherwise benign-Meningeomen mit Astrozytenreaktion vorhanden. Diese Korrelation war weniger

deutlich für Tumoren mit höherem WHO-Grad. Diese Beobachtung passt zu der bereits von Schittenhelm und Mitarbeitern beschriebenen Tatsache, dass die Zerstörung der Basalmembran mit dem WHO-Grad korreliert (Schittenhelm et al., 2006).
Die Basalmembran – wo vorhanden - war jedoch genau wie der Astrozytensaum nicht kontinuierlich, sondern zum Teil ausgedünnt, fragmentiert oder auch unterbrochen (siehe **Abb. 27**). Wir konnten feststellen, dass Tumorzapfen oder –inseln, die nicht von einem Astrozytensaum umgeben sind, auch keine Basalmembran besitzen (siehe **Abb. 27**). Die Anwesenheit (bzw. die Abwesenheit) eines reaktiven Astrozytensaums ist vergesellschaftet mit der Anwesenheit (bzw. Abwesenheit) einer Basalmembran. Die Astrozytenanwesenheit hängt hier folglich mit der Anwesenheit der Basalmembran zusammen. Vor allem tiefer in das ZNS-Gewebe eindringende Tumoranteile sind weder von einer Basalmembran, noch von einem reaktiven Astrozytensaum umgeben.

Bisher ist noch weitgehend unklar, wie Meningeome auf die Invasion in das Gehirn reagieren. In einer Arbeit von Schittenhelm und Mitarbeitern wurde auch gezeigt, dass Osteonektin (SPARC) nicht nur wie von uns festgestellt in Astrozyten hochreguliert wird, sondern auch in Tumorzellen. An der Tumor-Gehirn-Grenze von invasiven Meningeomen kommen spindelförmige Osteonektin-positive Zellen vor (Schittenhelm et al., 2006). Rempel und Mitarbeiter beschreiben deshalb Osteonektin auch als Marker für invasive Meningeome. Das Vorkommen dieser Zellen ist jedoch unabhängig vom WHO-Grad (Rempel et al., 1999).
Bei invasiven Meningeomen wird Osteonektin also sowohl in Tumorzellen, als auch in den angrenzenden Astrozyten hochreguliert. Dieser Vorgang ist jedoch sowohl für Tumorzellen als auch für Astrozyten unabhängig vom WHO-Grad. Während die Tumorzellen jedoch auch nach Verlust der Basalmembran positiv für Osteonektin bleiben (Schittenhelm et al., 2006), konnten wir zeigen, dass ein Verlust der Basalmembran mit dem Verlust der Osteonektin-positiven Astrozyten korreliert (siehe **Abb. 27**).

Über Osteonektin ist bekannt, dass es über Kollagen IV mit Basalmembranen in Verbindung stehen kann (Bradshaw et al., 2001). Es ist also vorstellbar, dass Osteonektin bei Astrozyten an Kollagen IV bindet und damit in Zusammenhang zu der Basalmembran steht, bei Tumorzellen jedoch an eine andere Komponente der extrazellulären Matrix bindet und somit kein Zusammenhang mit der Basalmembran besteht.

Wir konnten folglich nachweisen, dass die Zerstörung der von Astrozytenfortsätzen gebildeten Membrana glia limitans mit der Zerstörung der pial-gliaen Basalmembran einhergeht.
Bisher ist wenig bekannt über den Zusammenhang der pial-glialen Basalmembran und der Adhäsion von Astrozyten. Die direkt an die Basalmembran anschließende Membrana gliae limitans wird von Fortsätzen der Astrozyten gebildet (siehe **Abb. 2**). Elektronenmikroskopisch lassen sich Punctia adhaerentia als Verbindungen zwischen Basalmembran und Membrana glia limitans feststellen (Peters et al., 1991). Unsere Studie verdeutlicht die Abhängigkeit der Astrozyten von der Intaktheit der Basalmembran beziehungsweise umgekehrt die Abhängigkeit der Basalmembran von dem Vorhandensein der Astrozyten. Es bleibt unklar, ob ein durch die Tumorzellen herbeigeführter Verlust der Basalmembran zu einem Untergang der Astrozyten führt, oder ob umgekehrt der Niedergang von reaktiven Astrozyten den Verlust der Basalmembran herbeiführt. Für ersteres spricht die Fähigkeit von Tumorzellen Basalmembranen durch die Bildung von Metalloproteasen zu zerstören; für letzteres spricht die Tatsache, dass die Komponenten der Basalmembran unter anderem auch von den Astrozytenfortsätzen der Membrana glia limitans gebildet werden (Rutka et al., 1985).

Ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Astrozytenreaktion und Basalmembran ist bereits bekannt: Nach ZNS-Traumata kommt es zu einer Neubildung von Basalmembran im Anschluss an die reaktive Astrogliose (Suzuki et al., 1990). Die Komponenten der Basalmembran, wie Laminin und Kollagen IV, werden hierbei vermehrt von den angrenzenden reaktiven

Astrozyten gebildet, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die reaktiven Astrozyten an der Bildung der neuen Basalmembran beteiligt sind (Liesi et al., 2002).
In unserer Studie ist dieser Mechanismus gegensätzlich zu beobachten: Verlust der Astrozyten der Membrana glia limitans und Verlust der Basalmembran kommen gleichzeitig vor. Ein solcher Zusammenhang zwischen Basalmembran und Astrozyten ist bisher im Gehirn nicht bekannt.

Eine vergleichbare Situation gibt es jedoch in der Epidermis: Hier stehen Keratinozyten über Hemidesmosomen in engem Zusammenhang zur Basalmembran.
Bei Hautkrankheiten, zum Beispiel bei einigen Formen der Epidermiolysis bullosa, verlieren Keratinozyten den Kontakt zur Basalmembran und es kommt zu epidermalen Verletzungen (Presland et al., 2002). Die Keratinozyten werden durch Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden. Diese Subtypen der Epidermiolysis bullosa entstehen durch unterschiedliche Mutationen in Genen der Hemidesmosomen, in Genen für Adhäsionsmoleküle oder in Genen der Basalmembran- Moleküle (Presland et al., 2002; Tidman et al., 1984).

Ein ähnlicher Pathomechanismus ist auch für die Astrozyten und die pial-gliale Basalmembran denkbar: Die Astrozytenfortsätze sind mit der Basalmembran über Punctia adhaerentia verbunden (Peters et al., 1991). Die Moleküle, die diese Befestigung bilden, sind aber bisher unbekannt. Nach unseren Ergebnissen ist denkbar, dass Veränderungen in den Adhäsionsmolekülen zwischen Astrozyten und Basalmembran eine Invasion in das angrenzende Hirngewebe begünstigen könnten. Um diese Vermutung zu überprüfen sind jedoch molekulargenetische Untersuchungen nötig, um eventuelle Veränderungen in den Adhäsionsmolekülen feststellen zu können.

Als Ergebnis unserer Studie können wir festhalten, dass die subpialen Astrozyten, welche die Membrana glia limitans bilden, zusammen mit der Basalmembran durch invasive Meningeome zugrunde gehen. Die

Basalmembran wird hierbei zuerst ausgedünnt und fragmentiert, bis sie schließlich ganz fehlt. Angrenzende Astrozyten reagieren auf das eindringende Meningeom unspezifisch mit Zellschwellung und vermehrter Expression von GFAP, allerdings nur solange die Basalmembran noch vorhanden ist. Es liegt folglich nahe, dass Astrozyten ihre Reaktionsfähigkeit gegenüber invasiven Meningeomen verlieren, wenn die Adhäsion an die Basalmembran verloren geht. Hierzu sind weitere Studien nötig, um die molekularen Zusammenhänge zwischen der pial-glialen Basalmembran und den Astrozyten zu klären.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie untersuchten wir 35 hirninvasive Meningeome (14 WHO-Grad II, otherwise benign, 11 WHO-Grad II, otherwise atypical, 10 WHO-Grad III) und das angrenzende ZNS-Gewebe mittels immunhistochemischer Färbemethoden.
Wir verwendeten Antikörper gegen GFAP, Osteonektin und CD44 zur Darstellung der Astrozyten, sowie Antikörper gegen Kollagen IV zur Darstellung der pial-glialen Basalmembran. Die verschiedenen Antikörper zur Darstellung der Astrozyten färben unterschiedliche Anteile des Astrozyten: GFAP und Osteonektin färben vor allem die Astrozytenkörper, während CD44 lediglich die Astrozytenfortsätze färbt.
In unseren Färbungen konnten wir festellen, dass invasive Meningeome die durch Anti-Kollagen IV-Antikörper dargestellte pial-gliale Basalmembran durchbrechen. Die pial-gliale Basalmembran steht in engem Zusammenhang zu den subpialen Astrozytenfortsätzen, welche die der Basalmembran direkt anliegende Membrana glia limitans bilden. Bisher war nicht bekannt, wie diese angrenzenden Astrozyten auf die Invasion der Meningeome reagieren.

In 100% (35/35) der von uns untersuchten Meningeome konnten wir eine vermehrte Expression von GFAP, Ostenektin und CD44 mit Bildung eines reaktiven Astrozytensaumes beobachten. Der Saum von reaktiven Astrozyten war jedoch nicht durchgehend, sondern durch eindringende Tumorzapfen und –inseln unterbrochen. Bei der Untersuchung der pial-glialen Basalmembran konnten wir feststellen, dass die Astrozytenreaktion mit der Intaktheit der pial-glialen Basalmembran vergesellschaftet war. Eine pial-gliale Grenzmembran konnten wir in 79% (11/14) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise benign, in 64% (7/11) der Fälle bei WHO-Grad II, otherwise atypical und in 70% (7/10) der Fälle bei WHO-Grad III feststellen. Diese pial-gliale Grenzmembran war zum Teil diskontinuierlich oder ausgedünnt und wurde genau wie der Astrozytensaum durch Tumorzapfen und –inseln unterbrochen.

Wir konnten feststellen, dass die Basalmembran an denselben Stellen im Tumor anwesend (bzw. abwesend) war, wie der reaktive Astrozytensaum. Vor allem tiefer in das angrenzende Hirngewebe eindringende Tumoranteile zeigten weder eine angrenzende Basalmembran, noch einen reaktiven Astrozytensaum.

Diese Beobachtung legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Astrozyten der Hirn-Tumor-Grenze durch die Invasion des Meningeoms zugrunde gehen. Der gleichzeitig beobachtete Verlust der pial-glialen Basalmembran legt nahe, dass das Überleben der subpialen Astrozyten mit der Intaktheit der Basalmembran zusammenhängt.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 (Haines, 1991): Schematische Darstellung der Meningen. 2
Abb. 2 (modifiziert nach Peters et al., 1991): Pia mater und Kortexoberfläche. . 4
Abb. 3 (nach Weber GF et al., 1996): Genetische Veränderungen bei der Progression von Meningeomen 7
Abb. 4 (GFAP x10): Sektionsfall 1, Hirnoberfläche. 13
Abb. 5 (Bradbury, 2002): Schematische Darstellung von CD44. 15
Abb. 6 (modifiziert nach Bradshaw et al., 2001): Struktur des SPARC-Protein. 16
Abb. 7 (Boenisch, 2003): Zwei-Schritt indirekte Methode. 26
Abb. 8 (Hämatoxylin-Eosin x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Invasives Meningeom. 30
Abb. 9 (Hämatoxylin-Eosin x10): Tumor 16, WHO-Grad II, otherwise atypical. Invasives Meningeom. 30
Abb. 10 (GFAP x10): Tumor 28, WHO-Grad III. In Tumorgewebe eingeschlossenes ZNS-Gewebe. 31
Abb. 11 (GFAP x10): Tumor 34, WHO-Grad III. Färbemuster 1. 32
Abb. 12 (GFAP x10): Tumor 22, WHO-Grad II, otherwise atypical. Färbemuster 2. 33
Abb. 13 (GFAP x40): Tumor 31, WHO-Grad III. Tumorinseln. 34
Abb. 14 (GFAP x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Tumorzapfen durchbricht Astrozytensaum. 35
Abb. 15 (GFAP x10): Tumor 28, WHO-Grad III. Quer geschnittene Tumorzapfen. 35
Abb. 16 (Osteonektin x20): Tumor 28, WHO-Grad III. Astrozytenkörper sind positiv für Osteonektin. 37
Abb. 17 (Osteonektin x10). Tumor 28, WHO-Grad III. Tumornahe Zapfen und tumorferne Insel. 38
Abb. 18 (Osteonektin x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Gleicher Schnitt wie in Abb. 14. 39

Abb. 19 (CD44 x10): Tumor 14, WHO-Grad II, otherwise benign. 40
Abb. 20 (CD44 x10): Tumor 19, WHO-Grad II, otherwise atypical. Gleicher Schnitt wie in Abb. 14 und 18. 42
Abb. 21 (CD44 x10):Tumor 28, WHO-Grad III. In Tumorgewebe eingeschlossenes ZNS-Gewebe. 42
Abb. 22 (Vergleich CD44 x20, GFAP x10, Osteonektin/SPARC x10): Unterbrechung des Randsaumes durch Tumorzapfen. 43
Abb. 23 (Osteopontin x10): Tumor 31, WHO-Grad III. Keine Färbung an der Tumor-Hirn-Grenze.. 44
Abb. 24 (Osteopontin 10x): Positivkontrolle für Osteopontin..... 45
Abb. 25 (Kollagen IV x20): Tumor 11, WHO-Grad II, otherwise benign. Kollagen IV-positive pial-gliale Grenzmembran..... 46
Abb. 26 (GFAP, Osteonektin, CD44, Kollagen IV x20): Tumor 5, WHO-Grad II, otherwise benign. Vergleich von GFAP, Osteonektin, CD44 und Kollagen IV.. 48
Abb. 27 (CD44, Kollagen IV x10): Tumor 19, WHO-Grad II,otherwise atypical. Vergleich von CD44 und Kollagen IV. 48
Abb. 28 (CD44 x20): Sektionsschnitt mit positiven Astrozytenfortsätzen..... 49
Abb. 29 (Osteonektin x10): Sektionsschnitt mit positiven Astrozytenkörpern. . 50

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 (Perry et al., 2007): Einteilung der Meningeome nach Rezidivrate und WHO-Grad 8
Tabelle 2 (nach Perry et al., 2007; Perry et al., 1999): Kriterien für die Einteilung in WHO-Grad I-III bei Meningeomen 10
Tabelle 3: anonymisierte Patientendaten der hirninvasiven Meningeome 71
Tabelle 4: anonymisierte Patientendaten der Sektionsfälle 72

7 Literaturverzeichnis

Alcolado R, Weller RO, Parrish EP, Garrod D. The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1988; 14: 1-17

Aschner M, LoPachin RM, Jr. Astrocytes: targets and mediators of chemical-induced CNS injury. *J Toxicol Environ Health*, 1993; 38: 329-42

Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest*, 1983; 49: 140-7

Black P. Meningiomas. *Neurosurgery*, 1993; 32(4): 643-57

Boenisch T. Handbuch Immunchemische Färbemethoden, DakoCytomation. 3rd Edition. 2003.
Bradbury J. A therapeutic future for CD44 inflammation? *The Lancet*, 2002; 359: 2008

Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest*, 2001; 107: 1049-54

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 2002; 22: 183-92

Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res*, 1993; 53: 1312-6

de la Monte SM, Flickinger J, Linggood RM. Histopathologic features predicting recurrence of meningiomas following subtotal resection. *Am J Surg Pathol*, 1986; 10: 836-43

Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*, 1994; 4: 229-37

Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N, Pellissier JF. Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1997; 23: 113-22

Fritz J, Roser F, Tatagiba M, Bornemann A. The basement membrane at the tumour-brain interface of brain-invasive grade I meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005; 31: 339-42

Girgrah N, Letarte M, Becker LE, Cruz TF, Theriault E, Moscarello MA. Localization of the CD44 glycoprotein to fibrous astrocytes in normal white matter and to reactive astrocytes in active lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1991; 50: 779-92

Graham DI, Lantos PL. In: *Greenfield`s Neuropathology,* 7th. Edited by: Graham DI and Lantos PL, 2002a; 90-97, 153-57

Graham DI, Lantos PL. Meningiomas. In: *Greenfield`s Neuropathology,* 7th Edition. Edited by: Graham DI and Lantos PL, 2002b; 909-26

Hagel C, Stavrou DK. CD44 expression in primary and recurrent oligodendendrogliomas and in adjacent gliotic brain tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1999; 25: 313-18

Haines DE. On the question of a subdural space. *Anat Rec*, 1991; 230: 3-21

Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP. Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg*, 1991; 75: 564-74

Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, Orian-Rousseau V, Konig H, Weg-Remers S, Ponta H. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 910: 106-18; discussion 18-20

Jaaskelainen J. Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. *Surg Neurol*, 1986; 26: 461-9

Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A. Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol*, 1986a; 25: 233-42

Jaaskelainen J, Laasonen E, Karkkainen J, Haltia M, Troupp H. Hormone treatment of meningiomas: lack of response to medroxyprogesterone acetate (MPA). A pilot study of five cases. *Acta Neurochir (Wien)*, 1986b; 80: 35-41

Jamshidi J, Yoshimine T, Ushio Y, Hayakawa T, Morimoto K, Mogami H. Pathology of brain parenchyma in meningeal carcinomatosis; immunohistochemical study with astroprotein (GFAP) and tubulin. *J Neurooncol*, 1987; 5: 65-71

Kalbfleisch HH, Grebe H. Über das Einwachsen der Schädelmeningeome in das umgebende Gewebe, namentlich in das Gehirn. *Archiv für klinische Chirurgie*, 1937; Bd 188, H. 1: 118-37

Karasick JL, Mullan SF. A survey of metastatic meningiomas. *J Neurosurg*, 1974; 40: 206-12

Kepes JJ. Presidential address: the histopathology of meningiomas. A reflection of origins and expected behavior? *J Neuropathol Exp Neurol*, 1986; 45: 95-107

Kirches E, Grunewald J, von Bossanyi P, Szibor R, Plate I, Kruger S, Warich-Kirches M, Dietzmann K. Expression of matrix metalloproteinases in a series of 12 meningiomas. *Clin Neuropathol*, 2001; 20: 26-30

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002; 61: 215-25; discussion 26-9

Knutson JR, Iida J, Fields GB, McCarthy JB. CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol Biol Cell*, 1996; 7: 383-96

Lamszus K. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004; 63: 275-86

Landis DM. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci*, 1994; 17: 133-51

Langford LA. Pathology of meningiomas. *J Neurooncol*, 1996; 29: 217-21

Liesi P, Kauppila T. Induction of type IV collagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. *Exp Neurol*, 2002; 173: 31-45

Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*, 1983; 49: 636-49

Liotta LA, Rao NC, Barsky SH, Bryant G. The laminin receptor and basement membrane dissolution: role in tumour metastasis. *Ciba Found Symp*, 1984; 108: 146-62

Lopes CA, Mair WG. Ultrastructure of the outer cortex and the pia mater in man. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1974; 28: 79-86

Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ. Meningiomas. In: *World Health Organisation, Classification of Tumours, Pathology & Geneticts, Tumours of the Nervous System*, Edited by: Kleihues P and Cavernee WK, 2000; 176-84

Marks SM, Whitwell HL, Lye RH. Recurrence of meningiomas after operation. *Surg Neurol*, 1986; 25: 436-40

Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest*, 1983; 48: 656-77

McCutcheon IE. The biology of meningiomas. *J Neurooncol*, 1996; 29: 207-16

Meis JM, Ordonez NG, Bruner JM. Meningiomas. An immunohistochemical study of 50 cases. *Arch Pathol Lab Med*, 1986; 110: 934-7

Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL. Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg*, 1985; 62: 18-24

Mizoue T, Kawamoto H, Arita K, Tominaga A, Kurisu K. Secretion of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by meningiomas detected by cell immunoblot analysis. *Acta Neurochir (Wien)*, 1999; 141: 481-6

Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, Nerenberg MI. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol*, 1991; 3: 465-74

Nakasu S, Hirano A, Shimura T, Llena JF. Incidental meningiomas in autopsy study. *Surg Neurol*, 1987; 27: 319-22

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, 1997; 71: 241-319

Nordqvist AC, Mathiesen T. Expression of IGF-II, IGFBP-2, -5, and -6 in meningiomas with different brain invasiveness. *J Neurooncol*, 2002; 57: 19-26

Nordqvist AC, Smurawa H, Mathiesen T. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in meningiomas associated with different degrees of brain invasiveness and edema. *J Neurosurg*, 2001; 95: 839-44

Norenberg MD. Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994; 53: 213-20

Okuducu AF, Zils U, Michaelis SA, Michaelides S, von Deimling A. Ets-1 is up-regulated together with its target gene products matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in atypical and anaplastic meningiomas. *Histopathology*, 2006; 48: 836-45

Perry A. Meningiomas. In: *Russel & Rubensteins Pathology of Tumours of the Nervous System*, 7th Edition. Edited by: McLendon RE RM, Bigner DD, 2006; 427-68

Perry A, Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A. Meningiomas. In: *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, 4th. Edited by: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD and Cavenee WK, 2007; 164-72

Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer*, 1999; 85: 2046-56

Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol*, 1997; 21: 1455-65

Peters A, Palay SL, Webster H. The Meninges. In: *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells*, 3rd. Edited by: 1991; 395-409

Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem*, 1995; 43: 791-800

Presland RB, Jurevic RJ. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ*, 2002; 66: 564-74

Rempel SA, Ge S, Gutierrez JA. SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res*, 1999; 5: 237-41

Rempel SA, Golembieski WA, Ge S, Lemke N, Elisevich K, Mikkelsen T, Gutierrez JA. SPARC: a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998; 57: 1112-21

Rooprai HK, Liyanage K, King A, Davies D, Martin K, Pilkington GJ. CD44 expression in human meningiomas: An immunocytochemical, immunohistochemical and flow cytometric analysis. *Int J Oncol*, 1999; 14: 855-60

Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg*, 1988; 69: 155-70

Rutka JT, Giblin J, Dougherty DV, McCulloch JR, DeArmond SJ, Rosenblum ML. An Ultrastructural and Immunocytochemical Analysis of Leptomeningeal an Meningioma Cultures. *J Neuopathol Exp Neurol*, 1985; 45: 285-303

Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, Jung S, Tsugu A, Matsuzawa K. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg*, 1997; 87: 420-30

Schittenhelm J, Mittelbronn M, Roser F, Tatagiba M, Mawrin C, Bornemann A. Patterns of SPARC expression and basement membrane intactness at the tumour-brain border of invasive meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2006; 32: 525-31

Siddique K, Yanamandra N, Gujrati M, Dinh D, Rao JS, Olivero W. Expression of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and urokinase plasminogen activator in human meningiomas. *Int J Oncol*, 2003; 22: 289-94

Sievers J, Pehlemann FW, Gude S, Berry M. Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane. *J Neurocytol*, 1994; 23: 135-49

Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1957; 20: 22-39

Sinclair C, Mirakhur M, Kirk J, Farrell M, McQuaid S. Up-regulation of osteopontin and alphaBeta-crystallin in the normal-appearing white matter of multiple sclerosis: an immunohistochemical study utilizing tissue microarrays. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005; 31: 292-303

Skullerud K, Loken AC. The prognosis in meningiomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1974; 29: 337-44

Suzuki M, Choi BH. The behavior of the extracellular matrix and the basal lamina during the repair of cryogenic injury in the adult rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol*, 1990; 80: 355-61

Taylor BW, Jr., Marcus RB, Jr., Friedman WA, Ballinger WE, Jr., Million RR. The meningioma controversy: postoperative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1988; 15: 299-304

Tidman MJ, Eady RA. Ultrastructural morphometry of normal human dermal-epidermal junction. The influence of age, sex, and body region on laminar and nonlaminar components. *J Invest Dermatol*, 1984; 83: 448-53

Waggener JD, Beggs J. The membranous coverings of neural tissues: an electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1967; 26: 412-26

Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 1996; 271: 509-12

Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94: 14719-24

8 Anhang

Nummer anonym	Alter	Sex	histologischer Subtyp	WHO-Grad
1	49	m	Transitionales Meningeom	II, otherwise benign
2	80	f	Transitionales Meningeom	II, otherwise benign
3	56	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
4	44	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
5	74	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
6	67	m	Angiomatöses Meningeom	II, otherwise benign
7	80	m	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
8	61	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
9	74	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
10	71	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
11	73	m	Transitionales Meningeom	II, otherwise benign
12	69	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
13	74	f	Meningotheliomatöses Meningeom	II, otherwise benign
14	62	f	Transitionales Meningeom	II, otherwise benign
15	61	m	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
16	81	m	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
17	64	f	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
18	65	m	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
19	67	m	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
20	34	f	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
21	39	f	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
22	66	f	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
23	65	m	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
24	70	m	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
25	66	f	Atypisches Meningeom	II, otherwise atypical
26	51	m	Anaplastisches Meningeom	III
27	55	m	Anaplastisches Meningeom	III
28	53	f	Anaplastisches Meningeom	III
29	70	m	Anaplastisches Meningeom	III
30	58	m	Anaplastisches Meningeom	III
31	4	f	Anaplastisches Meningeom	III
32	69	m	Anaplastisches Meningeom	III
33	64	f	Anaplastisches Meningeom	III
34	63	m	Anaplastisches Meningeom	III
35	44	f	Anaplastisches Meningeom	III

Tabelle 3: anonymisierte Patientendaten der hirninvasiven Meningeome (Alter, Geschlecht, Histopathologischer Subtyp)

Nummer anonym	Alter	Geschlecht	Lokalisation
1	35	m	frontal
2	72	m	frontal
3	53	f	frontal
4	94	f	frantal
5	72	m	Hippokampus
6	72	m	Hypophyse
7	56	m	frontal
8	56	m	frontal
9	56	m	occipital
10	56	m	ventral
11	52	m	frontal
12	65	m	Mittelhirn
13	28	f	frontal
14	70	f	frontal
15	66	f	Hippokampus
16	71	m	Hippokampus

Tabelle 4: anonymisierte Patientendaten der Sektionsfälle (Alter, Geschlecht, Lokalisation)

Publikationen

Zeltner L, Schittenhelm J, Mittelbronn M, Roser F, Tatagiba M, Mawrin C, Kim YJ, Bornemann A. The astrocytic response towards invasive meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007, 33(2):163-8**.**

Danksagungen

Ich danke…

Prof. Dr. med. Antje Bornemann für die Überlassung des Themas und die darauf folgende freundliche Zusammenarbeit und geduldige Hilfestellung.

Prof. Dr. med. Richard Meyermann für die Möglichkeit diese Dissertation im Hirnforschungsinstitut erstellen und dabei Labor und Archiv frei benutzen zu können.

Den Neurochirurgen der Universitätsklinik Tübingen, Magdeburg und Homburg, deren Arbeit die Grundlage dieser Dissertation bildet.

Dem gesamten Personal des Hirnforschungsinstituts für die großartige Hilfestellung im Labor und die freundliche Aufnahme ins Team. Ganz besonderer Dank gilt hier Dr. med. Jens Schittenhelm, der mich in allen meinen Fragen und Problemen immer geduldig unterstützt hat.

Meinen Eltern, die mir dieses Studium durch ihre Unterstützung, die weit über das Finanzielle hinausgeht, überhaupt ermöglicht haben.

Meinen Korrekturlesern Andreas Schimo und Anne Ewert, durch die diese Arbeit den letzten Schliff erhalten hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Lena Margarete Zeltner
Geburtstag und –ort:	31.10.1983, Stuttgart
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schulische und universitäre Ausbildung:

1990-2002:	Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in Ditzingen
Juni 2002:	Abitur (Notendurchschnitt 1,2)
Oktober 2002:	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 2004:	Ärztliche Vorprüfung (Note 1,66)
2006:	Beginn der Dissertation am Institut für Hirnforschung Tübingen
2007:	Beginn des Praktischen Jahres an der Universitätsklinik Tübingen, Wahlfach Neurologie
10.06.2009:	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)