

Aus dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Guido Reifenberger

**Molekulare Analyse der Kandidatengene *TIMP3*, *CDH1* und *CTNNB1* in
Meningeomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Dimitri Barski

2010

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Reifenberger

Korreferent: Prof. Dr. Albers

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht in:

Barski D, Wolter M, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. Hypermethylation and Transcriptional Downregulation of the TIMP3 Gene Is Associated with Allelic Loss on 22q12.3 and Malignancy in Meningiomas. *Brain Pathol.* 2009 Oct 6. [Epub ahead of print]

Barski D, Wolter M, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. Promoter methylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 434-434 (abstract)

INHALTSVERZEICHNIS

A	Einleitung	6
1	Molekulargenetische Grundlagen der Tumorentstehung	6
1.1	Onkogene	7
1.2	Tumorsuppressorgene	7
1.3	Epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Promotorhypermethylierung	8
1.4	DNA-Methylierung und Onkogenese	10
2	Meningeome	12
2.1	Epidemiologie und Klinik	12
2.2	Morphologie und biologisches Verhalten	13
2.3	Histopathologie	14
2.3.1	WHO-Grad I Meningeome	15
2.3.2	WHO-Grad II Meningeome	15
2.3.3	WHO-Grad III Meningeome	16
2.4	Immunhistochemie der Meningeome	17
2.5	Molekulare Genetik der Meningeome	18
3	<i>TIMP3</i>, <i>CDH1</i> und WNT/β-Catenin – Signalweg	20
3.1	Matrixmetalloproteinasen und Timp3	20
3.2	WNT/ β -Catenin – Signalweg	24
3.3	E-Cadherin	26
3.4	Ziele der eigenen Arbeit	28
B	Material und Methoden	29
4	Material	29
4.1	Tumorgewebe und Blut	29
4.2	Oligonukleotide	32
4.3	Lösungen und Puffer	33
5	Methoden	34
5.1	PCR	34
5.2	Agarosegelelektrophorese	35
5.3	mRNA Expressionsanalyse	36
5.3.1	cDNA Herstellung aus mRNA	36
5.3.2	<i>Real-Time</i> Reverse Transkriptase-PCR	37
5.4	Deletionsuntersuchung mittels Duplex-PCR-Analyse	41

5.5	Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA	41
5.6	Methylierungsspezifische PCR (MSP)	43
5.7	DNA-Sequenzierung	45
5.8	Mikrosatellitenanalyse	48
5.9	5-Aza-2'-Deoxycytidin- und Trichostatin A-Behandlung von Zelllinien	49
5.10	Immunhistochemische Untersuchungen	52
5.11	Statistische Auswertung	54
C	Ergebnisse	55
6	Analyse des Tumorsuppressorgen-Kandidaten <i>TIMP3</i> in Meningeomen	55
6.1	Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von <i>TIMP3</i>	55
6.2	Ergebnisse der <i>TIMP3</i> Deletionsuntersuchung mittels Duplex-PCR	59
6.3	Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von <i>TIMP3</i> in unbehandelten und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-behandelten Meningeomzellen mittels RT-PCR	62
6.4	Methylierungsanalyse von <i>TIMP3</i> in Meningeomen	63
6.4.1	Methylierungsanalyse der <i>TIMP3</i> CpG-Insel mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP)	64
6.4.2	Methylierungsanalyse der <i>TIMP3</i> CpG-Insel mittels direkter Sequenzierung Natriumbisulfit-behandelter DNA	65
6.4.3	Korrelation der <i>TIMP3</i> mRNA-Expression mit der Hypermethylierung in der 5'-CpG-reichen Region von <i>TIMP3</i>	70
6.5	Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse auf 22q und Korrelation mit der <i>TIMP3</i> Hypermethylierung und mRNA-Expression	72
6.6	Untersuchung der <i>Timp3</i> Proteinexpression mittels Immunhistochemie	74
7	Analyse des Tumorsuppressorgen-Kandidaten <i>CDH1</i> in Meningeomen	76
7.1	Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von <i>CDH1</i>	76
7.2	Ergebnisse der mRNA-Expression von <i>CDH1</i> in unbehandelten und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-behandelten Meningeomzellen	78
7.3	Methylierungsanalyse der <i>CDH1</i> Promotorregion mittels direkter Sequenzierung natriumbisulfitbehandelter DNA	79
7.4	Untersuchung der <i>Cdh1</i> Proteinexpression mittels Immunhistochemie	80
8	Untersuchung der β-Catenin Proteinexpression mittels Immunhistochemie	83

D	Diskussion	85
9	<i>TIMP3 – Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase 3</i>	85
9.1	<i>TIMP3</i> Hypermethylierung in Meningeomen	85
9.2	<i>TIMP3</i> Hypermethylierung – entscheidender Mechanismus der Gen-Inaktivierung?	87
9.3	Timp3 Proteinexpression in Meningeomen	89
9.4	<i>TIMP3</i> , ein neues Tumorsuppressorgen in Meningeomen?	90
10	Die Rolle von Cdh1 und β-Catenin in der Pathogenese der Meningeome	90
E	Literaturverzeichnis	93
F	Danksagung	99
G	Tabellarischer Lebenslauf	100
H	Zusammenfassung (Abstract)	102

A Einleitung

Nach den kardiovaskulären Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Das große Anliegen der medizinischen Forschung ist es, durch neue Behandlungswege, Früherkennung und Prävention die Mortalität in der älter werdenden Bevölkerung zu senken. Ein wichtiger Bestandteil der aktuellen Forschung ist das Verstehen der Onkogenese und die Anwendung dieser Kenntnisse in der Diagnostik und Therapie. Viele der Gewebszellen können entarten, sie zeigen jedoch gemeinsame Eigenschaften und Mechanismen in der Tumorentstehung. Durch epigenetische und genetische Veränderungen verschaffen sich Krebszellen Selektionsvorteile gegenüber den normalen Körperzellen und entziehen sich den physiologischen Regulationsmechanismen. Auf diese Weise eignen sich Tumorzellen im Verlauf der Onkogenese bestimmte Eigenschaften an: autokrine Autonomie und Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, Unabhängigkeit gegenüber wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Signalen, die Fähigkeit sich unbegrenzt zu replizieren, Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli, Etablierung der eigenständigen Blutversorgung und die Fähigkeiten zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung (46, 129).

1 Molekulargenetische Grundlagen der Tumorentstehung

Die Onkogenese wird durch zwei Mechanismen aufrechterhalten: Aktivierung von Proto-Onkogenen (c-onc) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG). Die Entwicklung maligner Tumoren basiert vermutlich auf der Kombination mehrerer solcher zeitlich unabhängiger Ereignisse, die zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen (108, 65). Die wichtigsten Pathomechanismen der Inaktivierung von TSG auf der genetischen Ebene sind Deletionen und Mutationen sowie auf der epigenetischen Ebene eine aberrante Promotormethylierung mit konsekutiv verminderter transkriptioneller Aktivität. Die Aktivierung von Proto-Onkogenen erfolgt am häufigsten durch aktivierende Punktmutationen, Translokationen oder eine Erhöhung der Genkopiezahl, d.h. eine Genamplifikation.

1.1 Onkogene

Onkogene kodieren meist Komponenten zellulärer Signalwege, die direkt oder indirekt Zellwachstum, -differenzierung und Genexpression regulieren (21). Proto-Onkogene kommen physiologisch vor und werden durch zelleigene Kontrollmechanismen reguliert. Durch genetische Veränderungen wie Mutationen, Amplifikation oder Translokationen entziehen sich die Proto-Onkogene diesen Mechanismen. In Folge entsteht ein Zugewinn an Aktivität und die Tumorzelle kann unkontrolliert proliferieren (21). In der Regel reicht die aberrante Aktivierung eines Allels eines Protoonkogens aus, um eine onkogene Wirkung zu erreichen. Onkogene lassen sich funktionell in verschiedene Gruppen einteilen (58):

- Wachstumsfaktoren (z.B. *PDGFB*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF-5*)
- Rezeptor-Tyrosin-Protein-Kinasen (z.B. *EGFR*)
- Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Protein-Kinasen (z.B. *ABL1*)
- Serin-Threonin-Protein-Kinasen (z.B. *RAF1*, *GSK3 β*)
- Membrangebundene G-Proteine (z.B. *RAS*)
- Transkriptionsfaktoren (z.B. *MYC*, *FOS*)
- Regulatoren des Zellzyklus (z.B. *CDK4*, *CCND1*)

1.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene (TSG) werden auch als Anti-Onkogene bezeichnet, da sie funktionell den Proto-Onkogenen entgegenwirken (46). Die Proteine dieser Gene können in Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparaturproteine, Zellkontakt-Proteine sowie Mitglieder von Signaltransduktionsketten gegliedert werden. *TP53* und *RB* (Retinoblastom) zählen zu den bekanntesten Vertretern der Tumorsuppressoren. TSG verhalten sich häufig rezessiv. Für die vollständige Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens reicht es nicht, wenn nur ein Allel mutiert vorliegt. Zur Auswirkung auf den Phänotyp bedarf es zumeist einer Schädigung beider Allele. Dieser Mechanismus wurde von Knudson in den 70er Jahren untersucht und begründete die sogenannte *two-hit*-Hypothese (59, 60). Knudson beobachtete die phänotypische Ausprägung des Retinoblastoms, eines Tumors der embryonalen Retinazellen. Auffällig war, dass 40 % der Kinder eine genetische Disposition zeigten und bei ihnen der Tumor meist bilateral auftritt. Knudson kam zum Schluss, dass zwei unabhängige Mutationen auf beiden Allelen für die maligne Entartung der Retinazellen erforderlich sind. Das

unilaterale Retinoblastom tritt mit einer geringen Inzidenz von 1:30000 auf, weil die doppelte Mutation der somatischen Zelle äußerst unwahrscheinlich ist. Bei der hereditären Form wird bereits ein mutiertes Allel über die Keimbahn vererbt. Erfährt die Zelle eine weitere Mutation desselben Gens auf dem zweiten Chromosom, kann diese Zelle entarten. Im Jahre 1988 konnte das auf 13q14 gelegene *RBI*-Gen isoliert werden. Die Mechanismen der DNA-Schädigung, die zur TSG-Inaktivierung führen sind unter anderem Punktmutationen, Deletionen, Insertionen, Translokationen aber auch epigenetische Veränderungen, wie z.B. eine transkriptionshemmende Promotorhypermethylierung (siehe Kapitel 1.4). Eine häufige pathologische genetische Alteration besteht in der Kombination von primärer Mutation eines Allels mit sekundärem Verlust des zweiten Allels (LOH = *loss of heterozygosity*). Die homozygote Deletion, d.h. der Verlust beider Allele, tritt seltener auf. Überdurchschnittlich häufige Allelverluste in einer bestimmten chromosomalen Lokalisation können somit auf das Vorhandensein eines TSGs in dieser Region hinweisen (67). In Meningeomen ist eine solche Region vor allem der lange Arm von Chromosom 22, auf dem das *NF2*-Tumorsuppressorgen lokalisiert ist und in etwa der Hälfte der sporadischen Meningeome Mutationen aufweist (110). Die Identifizierung und Charakterisierung möglicher weiterer auf 22q lokalisierter TSGs ist Gegenstand dieser vorliegenden Arbeit.

1.3 Epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Promotorhypermethylierung

Unter einer epigenetischen Inaktivierung von Genen versteht man die Promotorhypermethylierung eines Gens, sowie die Veränderung (Deacetylierung, De-/Methylierung) bestimmter Histone in den Nukleosomen (34). Neue Forschungsergebnisse haben auch gezeigt, dass kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle, sogenannte RNAi-Moleküle, eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression und Chromatinstruktur spielen und Einflüsse auf das Muster der DNA-Methylierung nehmen (90). Epigenetische Prozesse sind wichtige, natürliche Regulationsmechanismen. Sie vermitteln z.B. die Transkriptions- und Genregulierung, Chromatinverdichtung sowie X-Chromosomeninaktivierung (116). Die Grundlage der Methylierung ist die Anlagerung einer Methylgruppe am C5-Atom der Base Cytosin durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) (siehe Abb. 1).

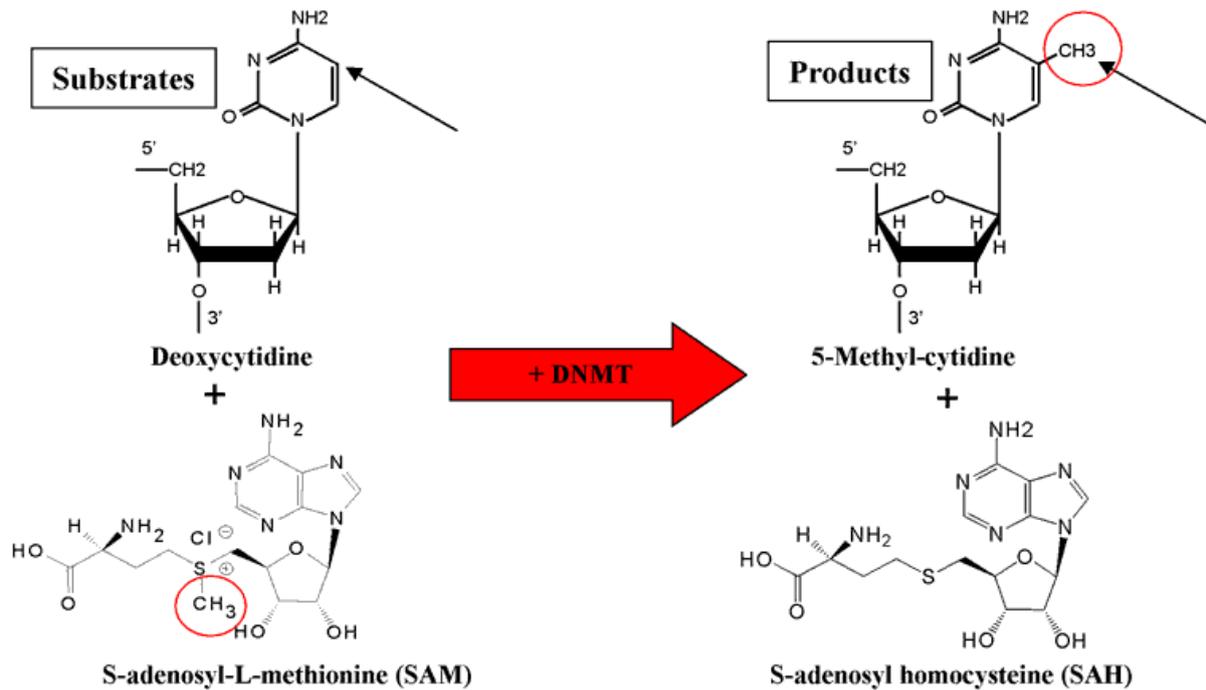


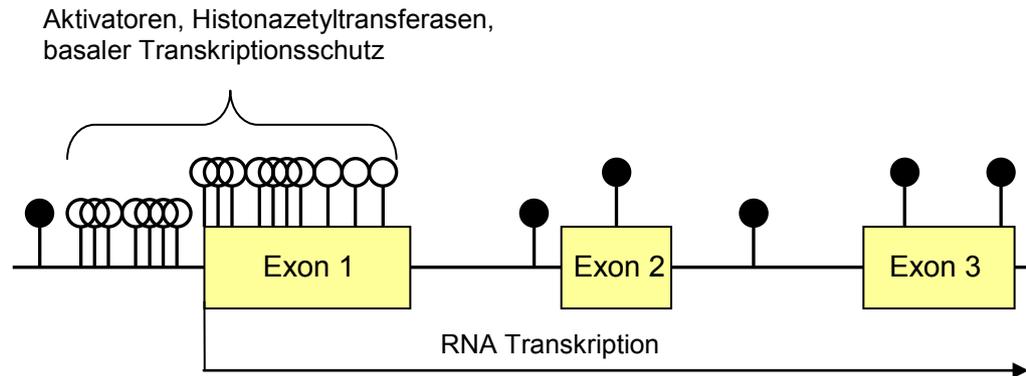
Abb. 1: Methylierung von Cytosin am C5-Atom durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) mit S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor (114).

Es gibt fünf bekannte DNMT-Familienmitglieder (DNMT 1, 2, 3A, 3B und 3L) in Säugetierzellen, unter denen DNMT 1, 3A und 3B die DNA-Moleküle während der embryonalen Entwicklung methylieren und diese in der somatischen Zelle aufrechterhalten. Man unterscheidet zwischen zwei Methylierungsreaktionen: die postreplikative Methylierung von hemi-methylierter DNA durch DNMT1 und die *de-novo*-Methylierung von nicht-methylierter DNA durch DNMT3A und 3B (62). Die aberrante Methylierung in Tumorzellen betrifft häufig die Cytosine von CpG-Inseln, d.h. in DNA-Abschnitten, die zahlreiche CG-Dinukleotide beinhalten und meist im Promotorbereich bzw. in der Nähe des Transkriptionsstarts eines Gens liegen (12, 13). CpG-Inseln sind durchschnittlich 200 - 2000 bp lang und sind oft mit sogenannten „Haushaltsgenen“ assoziiert, deren Produkte für die Homöostase und Regulation der Zelle wichtig sind.

1.4 DNA-Methylierung und Onkogenese

Vor über zwanzig Jahren wurde erkannt, dass das DNA-Methylierungsmuster in Tumorzellen im Vergleich zu dem in normalen Zellen verändert ist. Tumorzellen weisen eine globale Hypomethylierung des Genoms auf, begleitet von Region-spezifischer Hypermethylierung (5). Abnorme Methylierungen von CpG-Inseln können effizient die Transkription der zugehörigen Gene unterdrücken und dadurch zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beitragen. Die Hypermethylierung von 5'-CpG-Inseln von TSGs rückte in der letzten Zeit zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Diese CpG-Inseln liegen normalerweise unmethyliert vor. Wie die Abbildung 2 zeigt, führt die Hypermethylierung im Promotorbereich eines TSG zu einer verminderten Transkription dieses Gens und kann zur Tumorentstehung beitragen (52). Die Inhibierung der TSG führt zu unkontrolliertem Zellwachstum, Akkumulation von DNA-Schäden und Apoptoseresistenz der Zellen. Aber auch die Hypomethylierung von physiologisch methylierten Promotorregionen kann aufgrund einer Aktivitätssteigerung der betreffenden Gene zur Krebsentstehung führen (88, 93). Für das Retinoblastom-Gen (*RB*) wurde als erstes eine Inaktivierung durch Promotorhypermethylierung beschrieben (42). Mit dem *VHL* (von-Hippel-Lindau)-Gen in kleinzelligen Nierenzellkarzinomen und dem *APC*-Gen in kolorektalen und gastralen Karzinomen folgten weitere wichtige Tumorsuppressorgene. Durch die Methylierung kommt es häufig zur Punktmutation an der Base Cytosin. Durch eine spontane Desaminierung am C4-Atom des Pyrimidinringes kann eine Transition von Cytosin zu Thymin erfolgen. Auch unter normalen physiologischen Bedingungen finden sich Methylierungen an CpG-Stellen, jedoch dann meist außerhalb von Promotorregionen, in den sogenannten repetitiven Sequenzen. Diese Regionen sind im Tumor dagegen oft hypomethyliert. Dies wird als Ursache für die Chromosomeninstabilität in Tumorzellen angesehen. Inhibitoren der DNA-Methylierung, wie 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC), Zebularine, Antisense-Oligonukleotide gegen DNMT1 (76) und Procainamid, sind in der Lage die aberrante Promoterhypermethylierung umzukehren, was zu einer Gen-Reaktivierung und Wiederherstellung von Zellzykluskontrolle, Apoptosefunktion und DNA-Reparatur-Kapazität führen kann (9, 49, 137). Darüber hinaus gibt es jetzt ein großes Interesse der pharmazeutischen Industrie an der Entwicklung neuer spezifischer Inhibitoren von epigenetischen Veränderungen. Es werden wahrscheinlich innerhalb der nächsten Jahre neue Medikamente entwickelt werden, die u.a. auch für eine Chemoprävention geeignet sein könnten.

A) Nicht methylierte CpG Insel



B) Methylierte CpG Insel

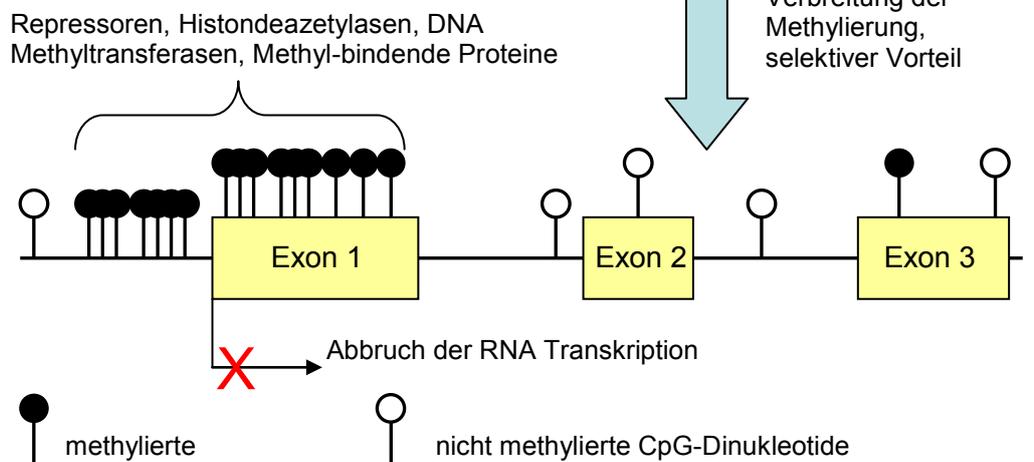


Abb. 2: CpG-Insel eines Tumorsuppressorgens in einer normalen Zelle (A) und in einer Tumorzelle (B) (31). A) Gene werden exprimiert, regulieren Zellwachstum, DNA-Reparatur und Apoptose. B) Gene werden inhibiert, es entwickelt sich unkontrolliertes Zellwachstum, DNA-Schäden akkumulieren und Apoptoseresistenz entsteht.

2 Meningeome

2.1 Epidemiologie und Klinik

Meningeome sind Tumoren, die sich aus meningealen Zellen, insbesondere den Arachnoideadeckzellen entwickeln (55). Sie wachsen meistens als scharf begrenzte, intradurale Raumforderungen mit einer breiten Anheftung an die Dura. Die häufigsten Lokalisationsstellen sind die Parasagittalregion, die zerebrale Konvexität, die Keilbeinflügel, die olfaktorische Grube, der Nervus opticus, das Tentorium, der Falx cerebri und die Foramen magnum Region (18). Die jährliche Inzidenz der Meningeome liegt bei 4 - 6 pro 100.000 Einwohner (72). Sie sind nach den Gliomen die zweithäufigsten primären Tumoren des zentralen Nervensystems im Erwachsenenalter und machen bis etwa 30% der histopathologisch untersuchten intrakraniellen Geschwülste aus (110). Die meisten Meningeome sind benigne, langsam wachsend und heilbar durch operative Resektion (57). Diese Neoplasien betreffen alle Altersklassen, treten aber bevorzugt im mittleren und höheren Alter mit einem Gipfel in der sechsten und siebten Lebensdekade auf. Das weibliche Geschlecht ist häufiger betroffen, bei einer Verteilung weiblich zu männlich von 2:1 intrakraniell und sogar 10:1 im Rückenmark (48). Seltene Subtypen und höhergradige Tumore sind überrepräsentiert bei Kindern und Männern (50). Nur 1,5% aller Meningeome treten bei Kindern oder Jugendlichen bis zum 19. Lebensjahr auf. 20-25% der Jugendlichen mit einem Meningeom leiden dabei unter Neurofibromatose Typ II (38). Als exogenen Risikofaktor für das Auftreten von Meningeomen gilt die Exposition des Schädel-Hirn-Bereiches gegenüber ionisierender Strahlung. Weiterhin wird aufgrund der höheren Prävalenz des weiblichen Geschlechtes und der Tatsache, dass etwa zwei Drittel der Meningeome Progesteron- und etwa ein Zehntel Östrogenrezeptoren tragen, angenommen, dass hormonelle Wachstumssignale bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen (99). Meningeome dringen häufig in Dura und Knochen ein und verdrängen das Hirngewebe. Eine Hirngewebsinvasion ist jedoch selten (57). Die benignen Meningeome manifestieren sich durch Cephalgien, epileptische Anfälle, Hemiparesen, Gesichtsfeldausfälle, Aphasien und andere fokale Symptome. Die übliche Therapie besteht in der Tumorresektion. Die Prognose ist im Regelfall günstig. Weniger häufig, insbesondere bei maligneren Typen und bei Rezidiven, wird eine fraktionierte Radiotherapie oder stereotaktische *single-dose* Radiochirurgie eingesetzt. Die wichtigsten Prognosefaktoren sind der histologische Grad und die Resektionsgrenze. Während die Prognose von Patienten mit einem benignen Meningeom

(WHO-Grad I) in der Regel gut ist, beträgt die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einem anaplastischen Meningeom (WHO-Grad III) nur ungefähr zwei bis drei Jahre.

2.2 Morphologie und biologisches Verhalten

Das Meningeom nimmt seinen Ursprung von Zellen der Hirnhaut und wächst als ein der Dura anhaftender Tumor von meist prall-elastischer Konsistenz. Die Mehrheit der Meningeome hat die Eigenart, verdrängend beziehungsweise nicht infiltrativ zu wachsen. Die Konsequenz ist jedoch die Verdrängung des benachbarten Hirngewebes mit folgendem Anstieg des intrakraniellen Drucks. Das biologische Verhalten der Meningeome ist entsprechend den vielen histologischen Subtypen jedoch sehr variabel (79). Sie sind überwiegend benigne, langsam wachsend und durch eine bindegewebige Kapsel vom restlichen Gewebe getrennt. Meningeome können jedoch auch invasiv wachsen und starke Neovaskularisierung und eine hohe Wachstumsrate aufweisen. Makroskopisch präsentieren sich Meningeome als graue, derbe, meist rundliche Tumoren verschiedener Lokalisation, die häufig interne Verkalkungsareale, in Form von so genannten Psammomkörperchen aufweisen. Charakteristisch für die weiteren Subtypen ist die Ausbildung von konzentrischen Wirbelformationen mit zentraler Hyalinisierung. Dies wird häufig als zwiebelschalenartiges Wachstum beschrieben. Zerebrale Gefäßstämme werden manchmal in den Tumor einbezogen, aber die Gefäßwände werden selten vom Tumor infiltriert. Wenn die Meningeome die Dura durchwachsen und den Knochen erreichen, induzieren sie typischerweise eine hyperostotische Reaktion, die mit einer Tumordinfiltration des Knochens verbunden ist. Das mikroskopische Erscheinungsbild variiert mit der histologischen Subtypisierung (siehe Tab. 1). Von diesen Subtypen gehört das „klassische“ meningotheiomatöse Meningeom zu den häufigsten.

2.3 Histopathologie

Der histologische Grad der Meningeome ist ein wichtiger Prognosefaktor und häufig maßgebend für die Therapiewahl. Die histologische Einteilung erfolgt gemäß der World Health Organisation (WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems). Die aktuellste WHO-Klassifikation (73) teilt die Meningeome in drei WHO-Grade: das gut differenzierte, am häufigsten vorkommende, benigne WHO-Grad I Meningeom (80%), das atypische WHO-Grad II Meningeom (15 – 20%) und das anaplastische (maligne) WHO-Grad III Meningeom (1 – 3%). Das Grading basiert auf histologischen Faktoren, die mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert sind. Es werden 15 histologische Subtypen unterschieden (Tab. 1).

Tabelle 1: Histologische Meningeomsubtypen, eingeteilt nach WHO-Grad.

WHO-Grad	Histologischer Subtyp
I	Meningotheliales Meningeom
	Fibröses (fibroblastisches) Meningeom
	Transitionales (gemischtes) Meningeom
	Psammomatöses Meningeom
	Angiomatöses Meningeom
	Mikrozystisches Meningeom
	Sekretorisches Meningeom
	Lymphoplasmozytenreiches Meningeom
	Metaplastisches Meningeom
II	Atypisches Meningeom
	Klarzelliges Meningeom
	Chordoides Meningeom
III	Anaplastisches Meningeom
	Rhabdoides Meningeom
	Papilläres Meningeom

Die höhergradigen Tumoren (WHO-Grad II und III) weisen eine grössere Rezidivneigung auf und sind aggressiver in ihrem biologischen Verhalten.

2.3.1 WHO-Grad I Meningeome

Ungefähr 80% aller Meningeome sind WHO-Grad I Tumore (110). Sie wachsen langsam und können in der Regel durch eine operative Entfernung geheilt werden. Fünf Jahre nach vollständiger Resektion benigner Meningeome treten Rezidive in 12% der Fälle auf, wobei die Rezidivrate bei subtotaler Resektion steigt (101). Die häufigsten histologischen Subtypen sind das meningotheliale Meningeom mit 50% - 60%, das fibröse Meningeom mit 7% - 25% und das transitionelle Meningeom mit 20% - 40% (4). Das meningotheliale Meningeom ist gekennzeichnet durch Tumorlobuli, welche von dünnen kollagenösen Septen umrandet werden. Meningeomzellen dieses Subtyps sind ihren Ursprungszellen, den Arachnoideadeckzellen, sehr ähnlich (73). Das fibröse Meningeom besteht aus spindelförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die Faszikel in einer kollagen- und retikulinreichen Matrix formen. Das transitionelle Meningeom kombiniert die Eigenschaften beider Subtypen und zeigt häufig eine wirbelartige Anordnung der Zellen. In benignen Meningeomen finden sich oft intranukleäre hyaline zytoplasmatische Einschlüsse und charakteristische konzentrische Verkalkungen (Psammomkörper), jedoch nur selten Mitosen oder Nekrosen. Die WHO-Grad I Meningeome können Knochen, Dura und extrakranielle Kompartimente infiltrieren. Dies erschwert die Exstirpation des Tumors, wird jedoch nicht als Malignitätszeichen gewertet. Infiltriert ein benignes Meningeom das Hirngewebe, so nähern sich seine Rezidivquote und Mortalitätsrate denen der atypischen Meningeome an (100).

2.3.2 WHO-Grad II Meningeome

Atypische Meningeome machen einen Anteil von 15% – 20% aller Meningeome aus. Die Rezidivquote nach fünf Jahren liegt bei ungefähr 41% (101). Ein Rezidivtumor neigt zu weiteren Rezidiven, zu aggressivem Wachstum mit lokaler Überschreitung und seltener zur Metastasierung (41). Bei der Diagnose eines atypischen Meningeoms muss die klinische Nachsorge engmaschiger durchgeführt werden. Für die histologische Diagnose muss mindestens eines der folgenden Kriterien zutreffen (57, 73):

- erhöhte Mitoseraten mit einem Mitose-Index ≥ 4 Mitosen auf 10 HPF (*high-power fields*) oder
- mindestens drei der folgenden fünf Merkmale müssen zutreffen: erhöhte Zelldichte, kleine Zellen mit einer hohen Kern-Plasma-Relation, prominente Nukleoli, Verlust des

lobulären Musters und rasenartiges Wachstum (*sheeting*), Herde spontaner oder geographischer Nekrosen in unbehandelten Tumoren.

Das sicherste histologische Korrelat für ein atypisches Meningeom ist die erhöhte Mitoserate. Die Eigenschaft des infiltrativen Wachstums in Knochen- und Weichgewebe ist bei Meningeomen kein Zeichen der Malignität und somit kein Kriterium einer höheren Gradeinteilung. Jedoch lassen sich bei diesen Tumoren häufiger Rezidive nachweisen. Der Nachweis einer Hirngewebsinvasion gilt nicht als Anaplasiemerkmal, jedoch als Zeichen der Atypie mit entsprechend erhöhtem Rezidivrisiko. Das klarzellige und das chordoide Meningeom zeichnen sich wie atypische Meningeome durch eine erhöhte Rezidivneigung aus und werden dementsprechend in den WHO-Grad II eingestuft.

2.3.3 WHO-Grad III Meningeome

Anaplastische Meningeome machen einen Anteil von 1 – 3 % der Meningeome aus (57, 73). Diese Tumoren haben ähnliche Eigenschaften wie maligne Neoplasien anderer Gewebe, insbesondere Sarkome, und können schnell lokale Nachbarstrukturen infiltrieren und auch metastasieren. WHO-Grad III-Meningeome rezidivieren in 50 – 80 % der Fälle und die mittlere Überlebenszeit der Patienten beläuft sich auf zwei bis drei Jahre (100). Anaplastische Meningeome zeichnen sich histologisch durch markante Malignitätszeichen aus, welche die Atypiezeichen der WHO-Grad II-Meningeome bei weitem übersteigen. Für die histologische Diagnose muss mindestens eines der folgenden Kriterien zutreffen (57):

- Mitose-Index ≥ 20 Mitosen auf 10 HPF
- starke Anaplasie (histologische Ähnlichkeit zu einem Sarkom, Karzinom oder Melanom)

Anaplastische Meningeome weisen häufig ausgedehnte Nekrosen auf. Seltene Varianten der WHO-Grad III-Meningeome sind das papilläre und das rhabdoide Meningeom (96, 101).

2.4 Immunhistochemie der Meningeome

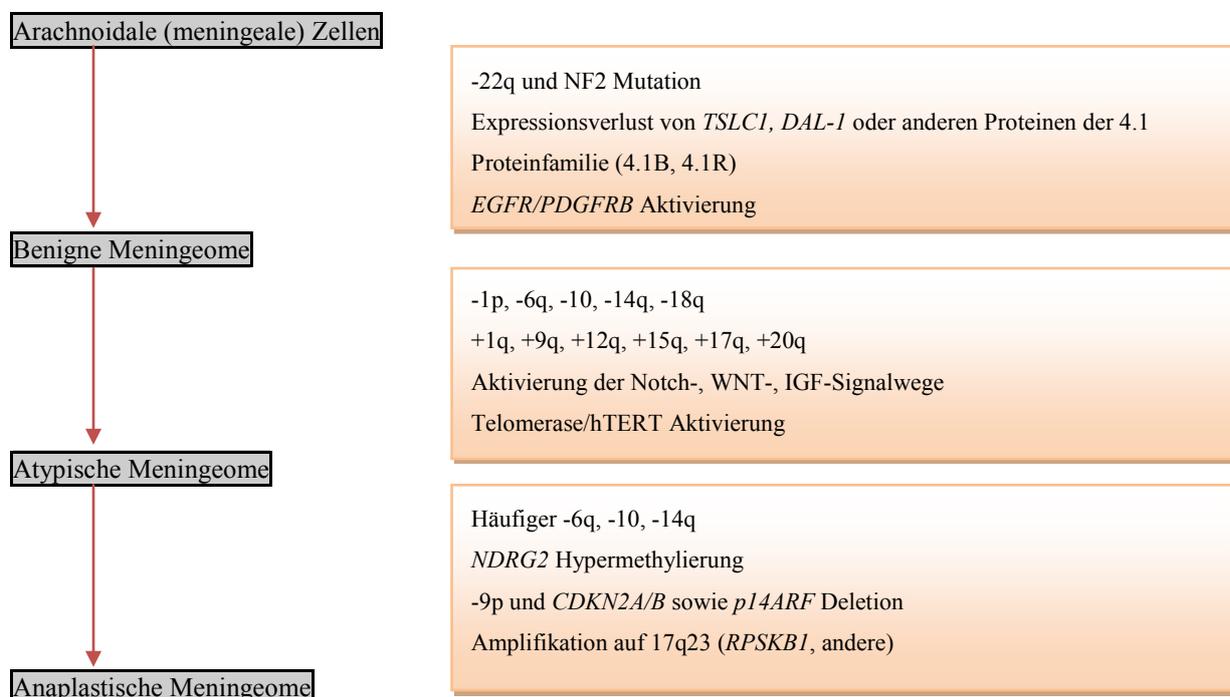
Meningeome exprimieren sowohl ektodermale als auch mesodermale Differenzierungsantigene (80). Als epitheliales Markerenzym eignet sich das epitheliale Membran-Antigen, EMA, welches in der Mehrheit der Meningeomfälle exprimiert wird (115). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die EMA-Expression in Meningeomen mit klinischen und histopathologischen Parametern korreliert. Im Gegensatz zum glialen Gewebe zeigen die Meningeome keine positive Färbung für das saure Gliafaserprotein (GFAP) (80), so dass das meningeale Tumorgewebe vom Hirngewebe unterschieden werden kann. Zusätzlich kann eine Vimentin-Färbung zur Differentialdiagnose hilfreich sein. Leider sind die Marker EMA und Vimentin nicht spezifisch für meningeales Gewebe. Eine wichtige Bedeutung der Immunhistochemie in der Meningeomdiagnostik liegt in der Einschätzung der Proliferationsrate, welche mit dem Antikörper MIB-1 gemessen wird. MIB-1 erkennt spezifisch das Antigen Ki-67, welches nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird und dadurch ein Marker für die Wachstumsrate ist (106). Ki-67 ist ein nukleäres Protein und wird nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert. Die erhöhte Markierung mit MIB-1 (> 5 % der Tumorzellen) korreliert mit einem erhöhten Rezidivrisiko (82, 87). Bei rezidivierenden Meningeomen ist der Index in Tumorrezidiven gegenüber dem Primärtumor meist erhöht (113). Die Aussagekraft des MIB-1-Index ist durch laborspezifische Unterschiede eingeschränkt, wird jedoch als Hilfe zum Grading, insbesondere bei grenzwertigen Fällen verwendet. Ungefähr zwei Drittel aller Meningeome exprimieren Progesteron- und etwa ein Zehntel Östrogenrezeptoren. Ein negativer Progesteronrezeptor- und ein positiver Östrogenrezeptorstatus zählen zu den negativen Prognosefaktoren (103). Eine neue immunhistochemische Methode zur Graduierung der Meningeome ist der mitosespezifische Antikörper gegen das Phosphohiston H3. Histon H3 wird während der Mitose stark phosphoryliert und ist in der Apoptose nicht phosphoryliert. Mit dem spezifischen Antikörper werden die Mitose-durchlaufenden Zellen besonders hervorgehoben (109), was eine Graduierung der Meningeome erleichtern kann.

2.5 Molekulare Genetik der Meningeome

Der Verlust des langen Arms von Chromosom 22 gehört zu den typischen zytogenetischen Veränderungen bei spontan entstandenen Meningeomen. Ungefähr die Hälfte der Meningeome zeigen genetische Verluste der chromosomalen Bande 22q12 (29, 119). *NF2* (*Neurofibromatosis 2*) wurde als das wichtigste Tumorsuppressorgen dieser Region identifiziert und seine Veränderungen finden sich in 70 – 80% der Meningeome unabhängig vom WHO-Grad. Bei der Neurofibromatose Typ II, die durch einen Gendefekt des *NF2*-Gens entsteht, haben die Patienten ein erhöhtes Risiko an Meningeomen zu erkranken. *NF2* Mutationen geschehen etwa gleich häufig in den Meningeomen verschiedener WHO-Grade und spielen eine Rolle in der frühen Entstehung der Meningeome. Das Genprodukt von *NF2* ist Merlin (Schwannomin), ein Verbindungsprotein zwischen dem Zytoskelett und der Plasmamembran (45). Auch der Expressionsverlust des Tumorsuppressorgens *DAL-1* und anderer Gene, die Proteine der Familie 4.1 kodieren, ist ein wichtiges frühes Ereignis in der Pathogenese der Meningeome (99). Weitere diskutierte Tumorsuppressorgen-Kandidaten, wie *BAM22*, *MNI*, *LARGE*, *INI1* und *TIMP3* auf Chromosom 22 sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Die bisher beschriebenen Veränderungen sind frühe Ereignisse in der Pathogenese der Meningeome. Von den weiteren genetischen Aberrationen scheinen Verluste auf dem Chromosomarm 1p, 6q, 10q, 14q, 18q und Gewinne auf 1q, 9q, 12q 15q, 17q und 20q häufig mit dem Auftreten von atypischen und anaplastischen Meningeomen assoziiert zu sein (Tabelle 2). Die anaplastischen Meningeome zeigen häufiger Allel-Verluste auf 6q, 10 und 14q (64, 131). Ferner findet man in WHO-Grad III-Meningeomen oft homozygote Deletionen des *CDKN2A/B*-Tumorsuppressorgens auf dem Chromosomenarm 9p und eine Amplifikation von Sequenzen auf 17q23 (17). Die zweithäufigste chromosomale Veränderung in Meningeomen sind Verluste auf 1p, die positiv mit dem Tumorgrad korrelieren und daher potentielle Indikatoren für die Tumorprogression sind (131). Der Bereich der am häufigsten deletierten Regionen konnte auf zwei Bereiche, d.h. 1p33-p34 und 1p36, eingengt werden (8), wobei die Suche nach Kandidatengenen in dieser Region bisher erfolglos blieb. Die dritthäufigste genetische Veränderung in Meningeomen sind Verluste auf Chromosom 14, die in der Region 14q24.3-q32.3 eine Assoziation zu Tumoren höheren Grades zeigen und somit als Progressionsmarker dienen können (77). Mit dem *NDRG2*-Gen konnte kürzlich ein potentielles Tumorsuppressorgen für Meningeome auf 14q identifiziert werden, das insbesondere in klinisch aggressiven atypischen und anaplastischen Meningeomen häufig epigenetisch inaktiviert ist (77, 124). In anaplastischen Meningeomen finden sich ebenfalls

häufig homozygote Deletion oder Mutationen der für Zellzyklus-Regulatoren kodierenden Gene *CDKN2A*, *p14ARF* und *CDKN2B* auf 9p21, die mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten einhergehen (14). Weiterhin spielen Änderungen in den Rb- und p53-abhängigen Signalwegen, sowie der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte WNT-Signalweg eine wichtige Rolle in WHO-Grad III Meningeomen. Das Verständnis der genetischen und epigenetischen Veränderungen in Meningeomen ist nicht zuletzt für die Etablierung einer molekularen Diagnostik dieser Tumoren von grundlegender Bedeutung.

Tab. 2: Übersicht über chromosomale und genetische Veränderungen, die im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von Meningeomen stehen (110).



3 TIMP3, CDH1 und WNT/ β -Catenin – Signalweg

3.1 Matrixmetalloproteinasen und Timp3

Matrixmetalloproteinasen (Mmp) bezeichnen eine Familie von mindestens 20 substratspezifischen kalziumabhängigen Endopeptidasen unterschiedlicher Struktur, denen ein ionisiertes Zinkatom im aktiven Zentrum gemeinsam ist. Mmp sind in der Lage, nahezu alle Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) zu spalten (53). Alle Mmp sind aus einer Prodomäne, einer katalytischen Domäne, einer Gelenkregion und einer terminalen Hämopexindomäne zusammengesetzt. Die Hauptaufgabe der Mmp besteht im kontrollierten Umbau der EZM. Sie sind beteiligt an Prozessen wie z.B. Wundheilung, Angiogenese, Nervenwachstum und Knochenbildungen. Die Kontrolle der Mmp-Aktivität ist für den Organismus von entscheidender Bedeutung und findet auf verschiedenen Regulationsebenen statt (Abb. 3 und 4). Eine fehlerhafte Aktivität von Mmp ist assoziiert mit Arthritis, Multipler Sklerose, Leberfibrose und manchen Tumorarten (37, 94, 95).

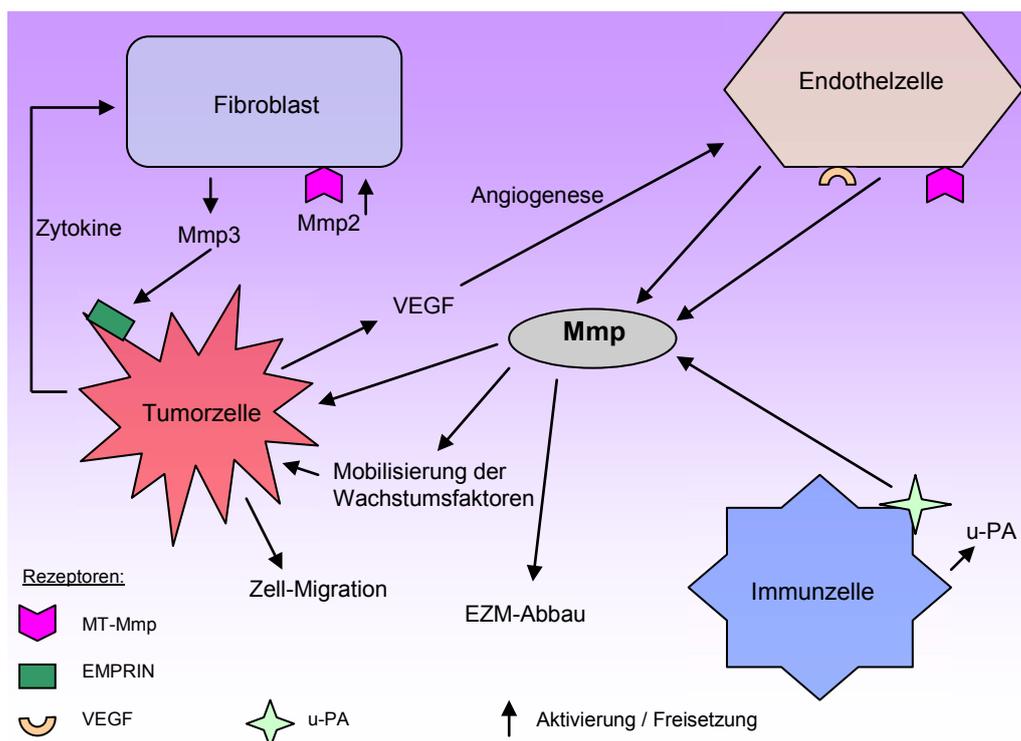


Abb. 3: Rolle der Mmp in der Interaktion zwischen den Tumor- und Stromazellen im Tumorgewebe (in Anlehnung an www.abcam.com). Mmp werden nicht kontinuierlich exprimiert, sondern werden zeitweise als Reaktion auf exogene Signale, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix-Interaktionen und veränderte Zell-Zell Kontakte sezerniert. Mmp beteiligen sich unter anderem am Abbau der extrazellulären Matrix, an der Angiogenese und an der Tumorzellaktivierung durch Wachstumsfaktoren. MT-Mmp, *membrane-type matrixmetalloproteinase*; u-Pa, Urokinase Plasminogenaktivator; EMPRIN, *extracellular-matrix-metalloproteinase inducer*.

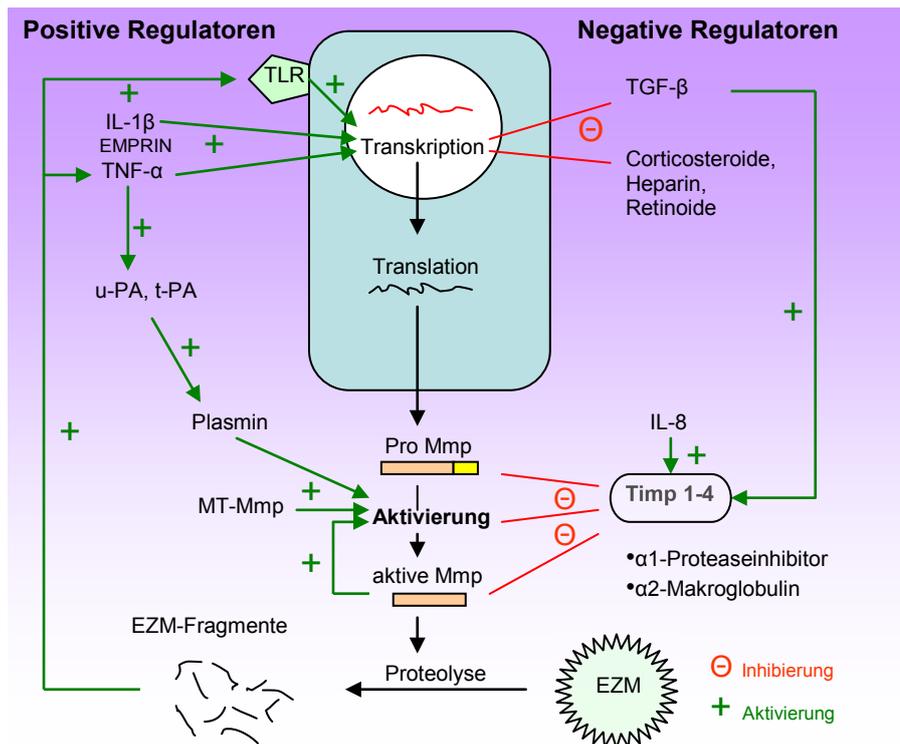


Abb. 4: Regulation der Mmp (111). Mmp werden als inaktive Proenzyme sezerniert, die eine enzymatische Abspaltung der Prodomäne zur Aktivierung benötigen. Die Regulatoren von Mmp wirken auf der Ebene der Transkription und der Enzymaktivierung. Zu den unspezifischen Inhibitoren der Mmp gehören unter anderem der α 1-Proteaseinhibitor und das α 2-Makroglobulin. Zu den spezifischen Inhibitoren gehören die *Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases* (Timp). TLR, *Toll-like* Rezeptor; MT-Mmp, *membrane-type matrixmetalloproteinase*; u-Pa, Urokinase Plasminogenaktivator; t-Pa, Gewebe (*tissue*) Plasminogenaktivator; EMPRIN, *extracellular-matrix-metalloproteinase inducer*.

Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (Timp) gehören zu den spezifischen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (39). Die Timp bilden eine Familie von mindestens vier 20-29 kDa großen Proteinen (Timp 1-4). Die wenig spezifische Inhibition findet durch die reversible Ausbildung starker 1:1 Komplexe mit der katalytischen Domäne der jeweiligen Mmp statt. Timp1, 2 und 4 sind lösliche Proteine während Timp3 mit der Matrix assoziiert ist. Timp1 und 2 fungieren als Inhibitoren aller aktiven Mmp, dagegen inhibieren Timp3 und 4 nur bestimmte Mmp. Die wesentliche physiologische Funktion der Timp liegt wahrscheinlich in der Limitierung der proteolytischen Wirkung der Mmp, wie sie bei der Involution, der embryonalen Implantation und der Wundheilung vorgefunden wird. Die Timp zeigten in verschiedenen Experimenten auch proliferationsfördernde, signaltransduzierende und apoptotische Eigenschaften (40). Die antiproteolytische Fähigkeit ist eine der zentralen Eigenschaften der Timp bei der Tumordinvasion, der Metastasierung und der Angiogenese (51). Bei "*TIMP-knockout*" Tieren zeigen sich ein vermehrtes Tumorstadium, eine häufigere maligne Tumorstadium und eine ausgeprägte Invasivität (56). Dabei scheinen

die Timp weniger Einfluss auf Metastasierung und Invasivität zu haben, als vielmehr auf das Tumorwachstum.

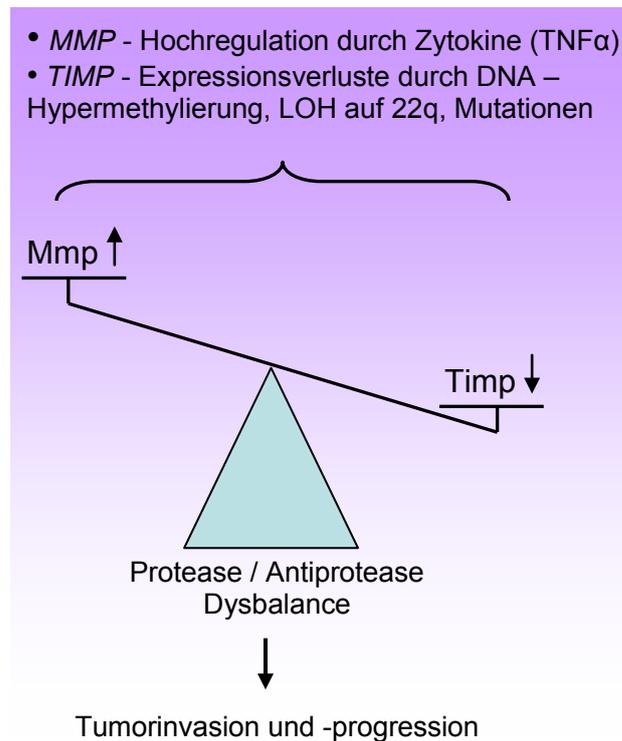
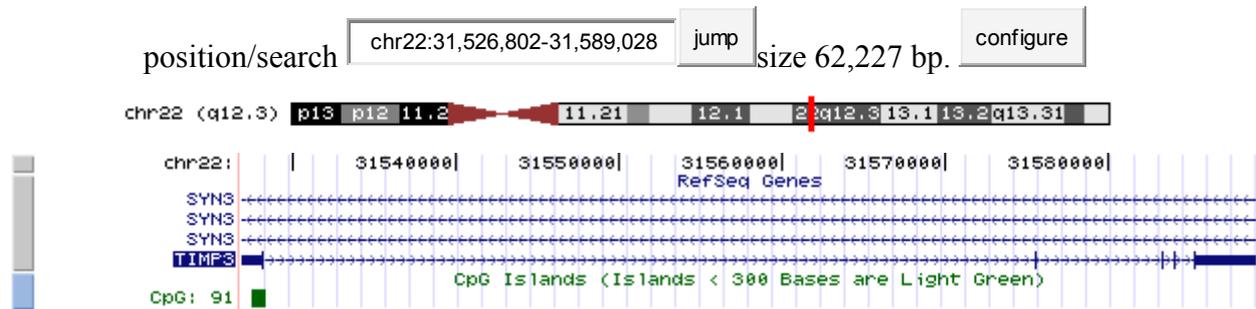


Abb. 5: Pathologisches Ungleichgewicht zwischen Mmp und Timp. Durch Zytokin- gesteuerte Hochregulation von *MMP* und epi-/genetische Inaktivierung von *TIMP* entsteht die Dysbalance und führt zu Tumorwachstum und –progression.

Timp3 wurde zuerst als ein 21 kDa großes Protein aus embryonalen Hühnerfibroblasten isoliert (97). Timp3 hat ungewöhnliche Eigenschaften: es bindet sehr stark an die extrazelluläre Matrix (135), so dass es nur sehr schwierig aus Geweben zu isolieren ist. Die Bindung erfolgt über den C-Terminus von Timp3 an bestimmte Moleküle der EZM, so dass eine spezifische Lokalisation in bestimmten Geweben resultiert (66). Das *TIMP3*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 im Bereich der Bande q12.3 lokalisiert (Abb. 6A).

A)

UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 Assembly



B)

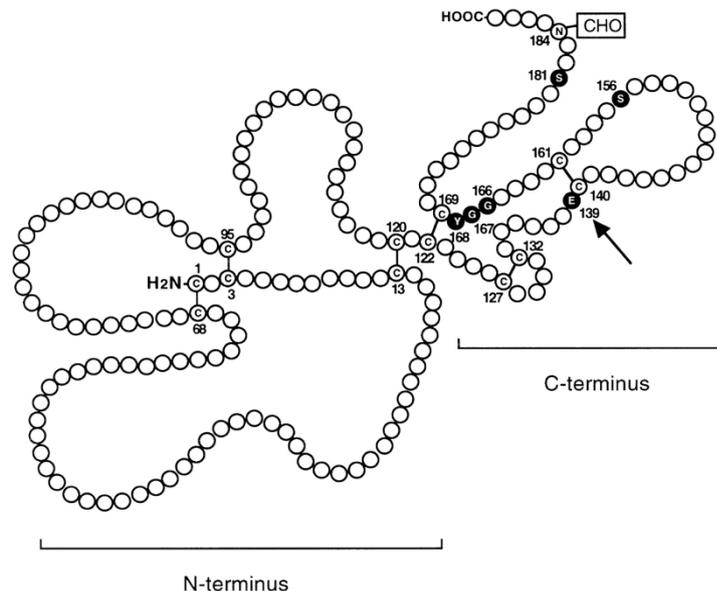


Abb. 6: *TIMP3*-Position auf 22q12.3 (A) und seine Proteinstruktur (B). A) Die genomische Lage des *TIMP3*-Gens und der assoziierten CpG-Insel (grünes Rechteck) auf Chromosom 22q12.3 (*UCSC Genome Browser, März 2006 Assembly*). *TIMP3* besteht aus 5 Exonen und 4 Intronen. B) *Timp3*-Proteinstruktur (66): Pfeile und schwarz gefärbte Bausteine zeigen die Mutationsstellen bei Sorsby's Fundusdystrophie. CHO markiert die N-Glykosierungsstelle. Das fertige Translationsprodukt besteht aus 211 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 24,4 kDa.

Timp3 inhibiert die Metalloproteinasen *Mmp1*, *Mmp2*, *Mmp3*, *Mmp7*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Mmp14* und *Mmp15* und besitzt somit keine ausgeprägte Spezifität. Die Expression von *TIMP3* wird als Reaktion auf mitogene Stimulierung von Zellen hochreguliert (132). Auch einige Mitglieder der oberflächlichen Proteasen *Adamts* (*a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin motifs*) werden durch *Timp3* inhibiert (54). *Timp3* blockiert den Faktor VEGF und inhibiert somit die Angiogenese (105). Mutationen im C-Terminus von *Timp3* verursachen Sorsby's Fundusdystrophie, eine autosomal-dominant vererbliche Augenerkrankung mit frühzeitiger Makuladegeneration (66; Abb. 6B). Die Überexpression von *Timp3* in glatten Muskelzellen wirkt pro-apoptotisch (4). *TIMP3* mRNA-Expressionsverluste und *TIMP3*-Hypermethylierung spielen eine Rolle in der Entstehung und

Progression von Ösophagus-, Kolon-, Mamma-Karzinomen, Melanom, Medulloblastom und anderen Tumorarten (3, 4, 28, 30, 74, 84, 133). Deletionen auf 22q12.3 sind von Bedeutung für die Progression von einem niedriggradigen Astrozytom zu einem sekundären Glioblastom (86). Allelverluste auf dem langen Arm des Chromosoms 22 sind frühe genetische Veränderungen in der Meningeomentstehung (131). Neben dem lange bekannten *NF2* werden andere Tumorsuppressorgene in dieser Region gesucht und *TIMP3* ist ein möglicher Tumorsuppressorgen-Kandidat.

3.2 WNT/ β -Catenin – Signalweg

Der WNT-Signalweg reguliert Zellinteraktionen während der Embryogenese und im adulten Organismus die Stammzellzahl in Epithelien und anderen Geweben. Die Rolle dieser Signalkaskade bei Krebserkrankungen ergibt sich aus Studien, die in zahlreichen Tumorarten eine aberrante Aktivierung des WNT-Signalwegs nachgewiesen haben (121, 123). β -Catenin ist der zentrale Vermittler im WNT-Signaltransduktionsweg (Abb. 7). Zytoplasmatisches β -Catenin unterliegt einem ständigen Abbauprozess. Fehlt WNT, so wird ein Komplex aus Tumorsuppressor APC, Serin/Threonin-Kinase GSK3 β und Axin aktiv und phosphoryliert β -Catenin. Daraufhin wird die Ubiquitinierung und Degradation von β -Catenin durch das Proteasom induziert. Eine aktivierte WNT-Signalkaskade inhibiert die Bildung des Degradationskomplexes und verhindert so den Abbau von β -Catenin. Stabilisiertes β -Catenin wird im Zytoplasma angereichert, wandert in den Zellkern und interagiert mit Transkriptionsfaktoren der TCF / LEF – Familie. Dadurch wird die Expression von WNT-Zielgenen verändert (91, 92). Die aktivierten Gene induzieren Zellmigration, bauen Zellverbindungen ab und führen zur Tumorprogression. Die Aktivierung der WNT-Signalkaskade durch Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von TSGs stellt einen Hauptmechanismus der malignen Transformation in verschiedenen Tumorarten dar, so zum Beispiel im kolorektalen Karzinom (118). In malignen Meningeomen sind ebenfalls genetische Veränderungen im Zusammenhang mit dem WNT-Signalweg nachgewiesen worden (16, 120, 128).

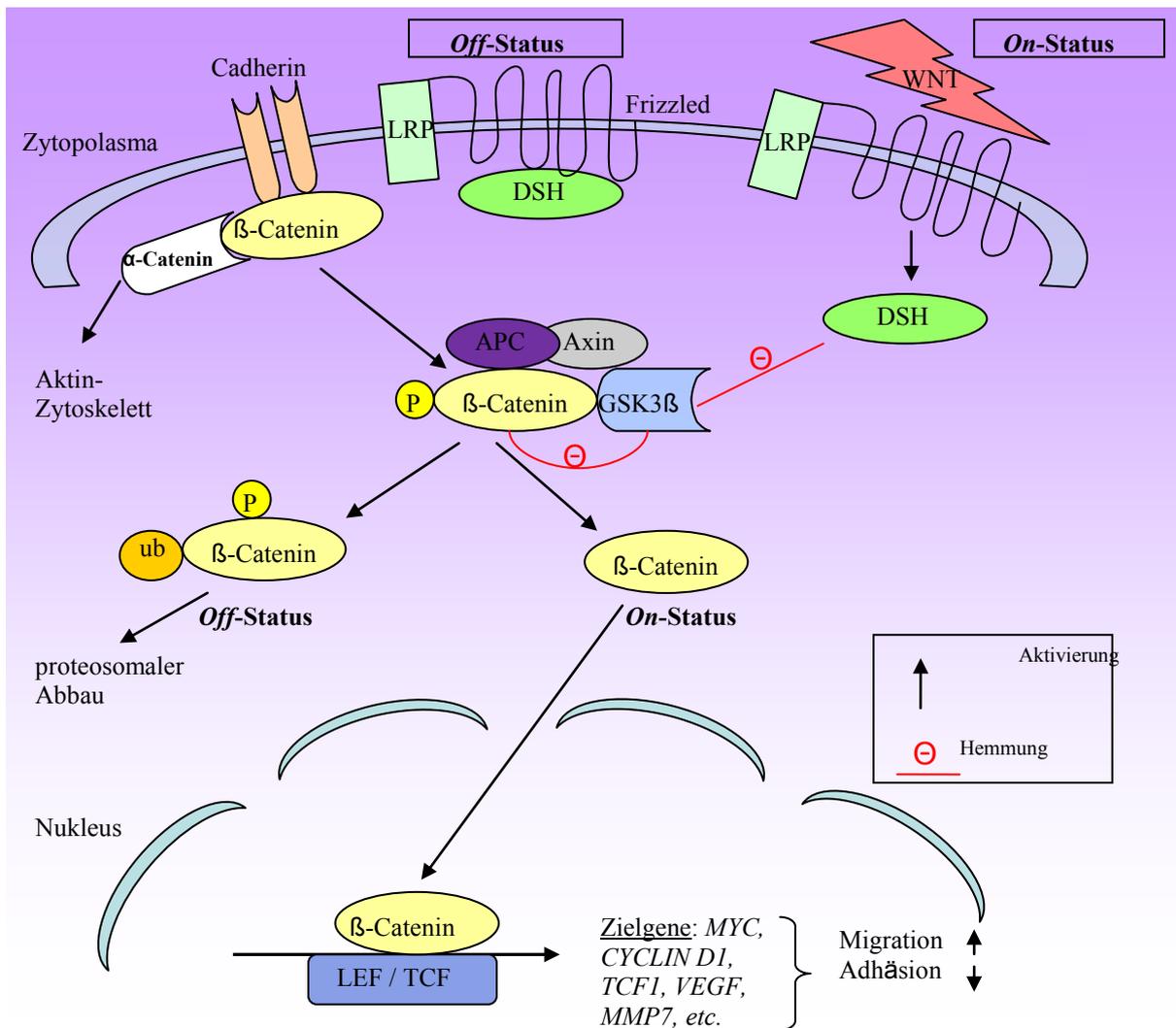


Abb. 7: Der WNT/β-Catenin - Signalweg. Im Zytoplasma unterliegt β-Catenin einem permanenten Degradationsprozess. Ein Proteinkomplex aus GSK3β (Glykogen Synthase Kinase), APC (adenomatöse Polyposis coli) und Axin bindet an β-Catenin und bewirkt durch seine Phosphorylierung eine anschließende Ubiquitinierung (ub) und den Abbau durch das Proteasom. Im aktivierten WNT-Signaltransduktionsweg wird Dishevelled (DSH) durch den Frizzled-Rezeptor freigesetzt und inhibiert die Bildung des Degradationskomplexes. Stabilisiertes β-Catenin kann gemeinsam mit den Transkriptionsfaktoren LEF und TCF die Transkription einer Reihe von Genen aktivieren. β-Catenin bindet an die zytoplasmatische Domäne der transmembrangängigen Cadherine und über α-Catenin an Aktinfilamente und stellt so die Verbindung zwischen dem Zytoskelett und den Zell-Zellverbindungen her. LRP, WNT-Korezeptor *lipoprotein receptor-related protein*.

3.3 E-Cadherin

Die Zelladhäsion ist wichtig für die Erhaltung der Gewebeintegrität. Veränderungen in der Regulation der Zelladhäsion können zu Tumorprogression führen. Ein wichtiges Adhäsionsmolekül in epithelialen und meningealen Zellen ist E-Cadherin, ein 120 kD transmembranöses Glykoprotein (122) und das wichtigste Mitglied der Cadherin-Familie. Der Name Cadherin leitet sich aus dem Begriff Calcium-abhängiges Adherin ab. *CDH1* ist auf dem Chromosom 16q22.1 lokalisiert, besteht aus 16 Exonen und erstreckt sich über eine Region von ungefähr 100 kB (19) (Abb. 8).

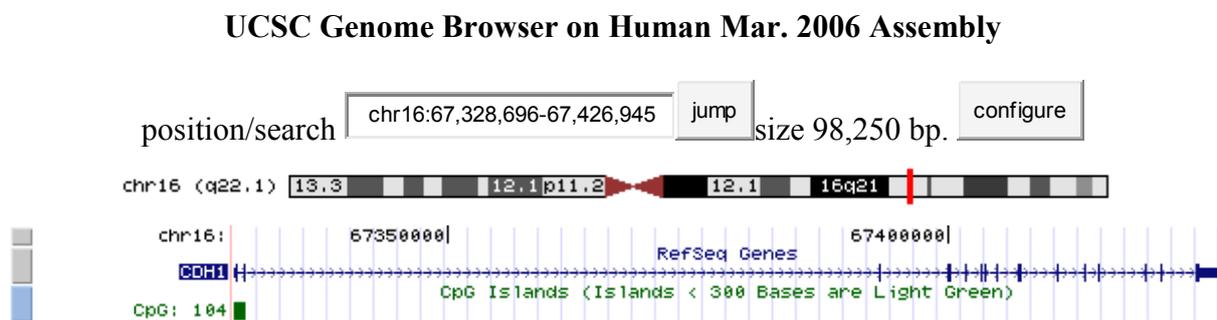


Abb. 8: *CDH1*. Die genomische Lage des *CDH1*-Gens und der assoziierten CpG-Insel (grünes Rechteck) auf Chromosom 16q22.1 (*UCSC Genome Browser, März 2006 Assembly*).

E-Cadherin besitzt eine extrazelluläre, eine transmembranöse und eine intrazelluläre Domäne. Mit den extrazellulären Bestandteilen bilden E-Cadherine Dimere mit den Cadherinen benachbarter Zellen und stellen so den Kontakt zwischen den Zellen her. Die intrazelluläre Domäne enthält eine stark phosphorylierte Region, welche für das Binden von α - und β -Catenin essentiell ist (Abb. 7). Funktionell handelt es sich um ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das Epithelzellen über Calcium-abhängige Interaktionen verbindet (122). Seine Expression wird während der Embryonalentwicklung reguliert und korreliert mit verschiedenen morphogenetischen Vorgängen, bei denen Zellaggregation und -disaggregation eine Rolle spielen. E-Cadherin ist der wichtigste Mediator der interzellulären Adhäsion von Epithelzellen, seine Funktion ist außerdem entscheidend für die Induktion und Aufrechterhaltung der Zellpolarität und für die Differenzierung *in vitro* und in reifen epithelialen Geweben (44). Die Interaktion von β -Catenin und Cadherin ist für diese Anbindung des Zytoskeletts an den Adhäsionskomplex essentiell und beeinflusst das Adhäsionsverhalten der Zelle. Cadherine, die nicht mit β -Catenin interagieren, können auch keine Zellverbindungen herstellen (104). Die Cadherin-Catenin-Zelladhäsionsmoleküle sind

streng durch Transkriptionsfaktoren, intrazelluläre Inaktivierung durch Phosphorylierung oder extrazellulären Abbau durch Metalloproteinasen reguliert (20, 69). Eine Fehlfunktion des Cadherin-Catenin-Komplexes kann zur Akkumulation und verstärkten Transkriptionsaktivierung von β -Catenin führen (134). Cadherin-Mutationen vor allem in der Catenin-Bindungsdomäne sind häufig mit Metastasenbildung und erhöhter Invasivität verbunden (11, 22). Mutationen in frühen Stadien nicht invasiver Tumore lassen vermuten, dass Cadherine auch als Regulatoren von Zellwachstum und -proliferation von Bedeutung sind (43). In vielen Tumoren geht der Verlust der E-Cadherin Funktion mit der *de novo* Expression von mesenchymalen Cadherinen (N-cad, P-cad, cad-11, cad-6), Matrixmetalloproteinasen und nukleärer β -Catenin Translokation einher. Dies führt zu gesteigerten Invasion und Migration (20). Dieser Prozess wird als epithelial-mesenchymaler Übergang (EMT = *Epithelial Mesenchymal Transition*) bezeichnet und findet auch in der embryonalen Entwicklung statt. In der Onkogenese unterliegen vor allem die invasiven Tumorzellen dem EMT (15). E-Cadherin Expressionsverlust ist eins der wichtigen EMT-Bausteine und wird häufig durch die inhibierende Bindung diverser Transkriptionsfaktoren an die *CDHI*-Promotorregion bewirkt (20). Deletionen auf 16q sind häufig in metastasierenden Leber-, Prostata- und Mamma-Karzinomen detektiert worden (98). *CDHI*-Mutationen sind gut am Beispiel des Magenkarzinoms und des kolorektalen Karzinoms untersucht worden. Keimbahn-Mutationen sind verteilt im ganzen Gen, während somatische Mutationen im sporadischen Tumor die Exone 7 – 9 betreffen (10). *CDHI*-Hypermethylierungen sind unter anderem in Ösophagus-, Mamma-, Cholangio- und Blasenkarzinomen aber auch in der Leukämieentstehung nachgewiesen worden (31, 68). In Meningeomen fand sich in mehreren Studien veränderte E-Cadherin Immunreaktivität (16, 117, 120, 125, 128). Daten zu genetischen Veränderungen und zum Methylierungsstatus der *CDHI*-Promotorregion in Meningeomen fehlen jedoch.

3.4 Ziele der eigenen Arbeit

Allelverluste auf Chromosom 22q sind die häufigsten genomischen Veränderungen in Meningeomen. Neben dem bereits bekannten Tumorsuppressorgen *NF2* werden in dieser Region weitere Kandidatengene vermutet. Für den Metalloproteinasen-Inhibitor *TIMP3* auf 22q12.3 wurden bereits inaktivierende Veränderungen in anderen Tumorentitäten beschrieben. Untersuchungen an Meningeomen haben bisher widersprüchliche Ergebnisse für eine epigenetische Inaktivierung von *TIMP3* durch Promotorhypermethylierung gezeigt. In dieser Arbeit soll in einer Serie von Meningeomen unterschiedlicher Malignität sowohl die 5'-CpG-Insel von *TIMP3* auf eine DNA-Methylierung hin untersucht als auch die Expression des Gens auf mRNA und Proteinebene bestimmt werden, um eine mögliche Rolle von *TIMP3* in der Meningeomentwicklung und Progression abzuklären. Ein Zusammenhang mit Allelverlusten auf dem Chromosomarm 22q soll geklärt werden.

Eine aberrante Aktivierung des für die Embryonalentwicklung essentiellen WNT-Signalweges konnte bereits als wichtiger Faktor in der Entstehung und Progression verschiedener Tumoren nachgewiesen werden. In Meningeomen fanden sich ebenfalls genetische Alterationen und veränderte Expressionslevel von Komponenten dieses Signalweges. Im zweiten Teil der eigenen Arbeit sollen systematisch E-Cadherin und β -Catenin auf epigenetische DNA-Veränderungen, d.h. aberrante 5'-CpG-Insel-Hypermethylierung, und deren mögliche Auswirkung auf die Proteinexpression hin untersucht werden.

B Material und Methoden

4 Material

4.1 Tumorgewebe und Blut

Die in dieser Arbeit untersuchte Tumorserie umfasste 50 meningiale Tumoren von 32 weiblichen und 18 männlichen Patienten im Alter von 6 bis 81 Jahren (Tab. 3 und 4). Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag bei 61 Jahren. Die histopathologische Einstufung erfolgte durch Prof. G. Reifenberger gemäß der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (57, 73). Demnach bestand die Serie aus 12 anaplastischen (WHO-Grad III), 11 atypischen (WHO-Grad II) und 27 benignen (WHO-Grad I) Meningeomen. Die Patienten wurden zwischen August 1991 und Oktober 2001 in der Neurochirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf oder der Abteilung für Neurochirurgie der Evangelischen und Johanniter-Krankenanstalten Duisburg-Nord/Oberhausen operiert. Insgesamt handelte es sich in 40 Fällen um Primärtumoren, in 4 Fällen um das erste Rezidiv, in 2 Fällen um das zweite, in drei Fällen um das dritte und in einem Fall um das vierte Rezidiv (Tab. 3 und 4). DNA und RNA aus den verwendeten Tumoren lag bereits extrahiert vor. Verwendet wurden nur Gewebeproben mit mindestens 80% Tumorgehalt (lichtmikroskopisch bestimmt). Für die eigenen Untersuchungen stand von den meisten Patienten Leukozyten-DNA zur Verfügung. Für die immunhistochemische Untersuchung standen in den meisten Fällen die entsprechenden Paraffinblöcke der Tumoren zur Verfügung.

Tab. 3: Klinische Daten zu den untersuchten Meningeomfällen (WHO-Grad III und II).

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	WHO-Grad	Histologischer Subtyp	Anmerkungen
MN 67	w	70	Konvexität	III	anaplastisch	1. Rezidiv
MN 34	m	55	parrieto-okzipital	III	anaplastisch	3. Rezidiv
NM 49A	w	55	temporo-basal	III	anaplastisch	1. Rezidiv
MN 210	m	40	parietal	III	anaplastisch	
MN 63B	w	78	fronto-basal	III	anaplastisch	3. Rezidiv
MN 64	m	6	frontal	III	anaplastisch	
MN 213	w	60	Konvexität	III	anaplastisch	
MN 119	m	83	Keilbein	III	anaplastisch	
MN 217	w	44	parietal	III	anaplastisch	2. Rezidiv
MN 212	w	67	frontal	III	anaplastisch	
MN202	w	56	Falx	III	anaplastisch	3. Rezidiv
MN 113	m	59	temporo-parietal	III	anaplastisch	
MN 4	m	70	Falx	II	atypisch	1. Rezidiv
MN 14	w	66	fronto-parietal	II	atypisch	
MN 16	w	78	frontal	II	atypisch	
MN 20	m	44	frontal	II	atypisch	
MN 22	w	71	fronto-basal	II	atypisch	
MN 40	w	71	parietal	II	atypisch	
MN 42	w	58	temporal	II	atypisch	
MN 47	w	81	fronto-basal	II	atypisch	
MN 61	w	74	Konvexität	II	atypisch	
MN 62	w	74	sphenoidal	II	atypisch	1. Rezidiv
MN 56B	m	47	Falx	II	atypisch	4. Rezidiv

Legende: MN, Meningeom; m, männlich; w, weiblich.

Tab. 4: Klinische Daten zu den untersuchten Meningeomfällen (WHO-Grad I).

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Lokalisation	WHO-Grad	Histologischer Subtyp	Anmerkungen
MN 1	m	65	parasagital	I	meningotheliomatös	2. Rezidiv
MN 2	m	42	Tentorium	I	fibroblastisch	
MN 877	w	76	frontal	I	psammomatös	
MN 7	w	50	fronto-basal	I	fibroblastisch	
MN 342	m	55	parietal	I	angiomatös	
MN 10	w	38	Konvexität	I	transitional	
MN 11	m	49	intraventrikulär	I	fibroblastisch	
MN 12	m	74	temporal	I	meningotheliomatös	
MN 17	w	55	frontal	I	fibroblastisch	
MN 19	w	52	intraventrikulär	I	fibroblastisch	
MN 993	w	61	parasagital	I	transitional	
MN 27	w	73	sphenoidal	I	transitional	
MN 876	m	73	fronto-basal	I	psammomatös	
MN 30	w	57	sphenoidal	I	transitional	Hirngewebs-invasiv
MN 684	w	54	frontal	I	meningotheliomatös	
MN 918	w	66	Keilbein	I	sekretorisch	
MN 37	w	71	parietal	I	fibroblastisch	
MN 38	m	53	olfakt. Grube	I	transitional	
MN 41	w	55	Tentorium	I	fibroblastisch	
MN 411	w	62	temporo-occipital	I	fibroblastisch	multiple Meningeome
MN1004	m	54	frontal	I	transitional	
MN1005	w	70	Tentorium	I	transitional	
MN 412	w	63	frontal	I	fibroblastisch	multiple Meningeome
MN 51	m	63	planum-sphenoidale	I	psammomatös	
MN 53	m	73	atlanto-okzipital	I	sekretorisch	
MN 58	w	59	sphenoidal	I	meningotheliomatös	
MN 1038	w	60	Falx	I	transitional	

Legende: *MN*, Meningeom; *m*, männlich; *w*, weiblich.

4.2 Oligonukleotide

Die in der eigenen PCR-basierten Untersuchung verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten PCR-Primer.

Name		Sequenz	Amplikon- grösse (bp)	Accession- Nr.	Verwen- dung	T _m , °C
<i>TIMP3</i>						
MSP-U	FOV	5'-TATTTATTTGTGTGTTTATGGTGGT-3'	236	NM_000362	1	54
MSP-U	REV	5'-CTACTACCCACTCTACACCA-3'		NM_000362	1	
MSP-M	FOV	5'-ATTCGCGTGTTTACGGCGGT-3'	230	NM_000362	1	58
MSP-M	REV	5'-TACTACCCGCTCTACGCCG-3'		NM_000362	1	
SEQ-1	FOV	5'-GCGGCCGCGTTAGAGATATTTAGT GGTTTAG-3'	263	NM_000362	2	54
SEQ-1	REV	5'-CCCTCAAACCAATAACAAAAC-3'		NM_000362	2	
SEQ-2	FOV	5'-GCGGCCGCGTCGGAGGTTAAGGTT GTTT-3'	179	NM_000362	2	52
SEQ-2	REV	5'-CCAAACTCCAACCTACCCAAA-3'		NM_000362	2	
TAQ	FOV	5'-CCTTCTGCAACTCCGACATC-3'	1097	NM_000362	3	59
TAQ	REV	5'-CTTGGTGAAGCCTCGGTACA-3'		NM_000362	3	
EX1-gen	FOV	5'-GCAACTCCGACATCGGTAAG-3'	167	NM_000362	4	58
EX1-gen	REV	5'-GCCCAAGGACATCGAGTTT-3'		NM_000362	4	
EX4-gen	FOV	5'-GTGCAACTTCGTGGAGAGGT-3'	100	NM_000362	4	58
EX4-gen	REV	5'-CCCAGAGCTTACCTTGCAGT-3'		NM_000362	4	
D22S929	FOV	5'-CTGCAGATCACAACCTCCTTG-3'	130	D22S929	5	
D22S929	REV	5'-GCATTTATGGAGTATCCACAG-3'		D22S929	5	
D22S430	FOV	5'-GGACTCACCTGTGCATGCGT-3'	94	D22S430	5	
D22S430	REV	5'-GATCTTGGCTTTTCCCTCCCG-3'		D22S430	5	
D22S304	FOV	5'-GTGAAACTCATACTGTCCAGG-3'	115-133	DD22S304	5	
D22S304	REV	5'-GGCATTTGATAGCTCAAGATG-3'		D22S304	5	
<i>CDHI</i>						
TAQ	FOV	5'-GATTTGGAGAGACTGCCAAC-3'	2688	NM_004360	3	58
TAQ	REV	5'-GTAGCAACTGGAGAACCTAAG-3'		NM_004360	3	
SEQ-1	FOV	5'-GCGGCCGCTAGGTTTTAT AATTTATTTAGATTTTAGT-3'	245	NM_004360	2	51
SEQ-1	REV	5'-CAAACCTCACAATACTTTACAA-3'		NM_004360	2	
SEQ-2	FOV	5'-GCGGCCGCTTGTAAGTA TTTGTGAGT TTG-3'	165	NM_004360	2	54
SEQ-2	REV	5'-AAATACCTACAACAACAACAA-3'		NM_004360	2	
<i>ARF1</i>						
TAQ	FOV	5'-GACCACGATCCTCTACAAGC-3'	324	NM_001658	3	59
TAQ	REV	5'-TCCCACACAGTGAAGCTGATG-3'		NM_001658	3	
5F-gen	FOV	5'-GACCACGATCCTCTACAAGC-3'	211	NM_001658	4	58

6R-gen	REV	5'-TCCCACACAGTGAAGCTGATG-3'		NM_001658	4	
F1-gen	FOV	5'-GACCACGATCCTCTACAAGC-3'	147	NM_001658	4	58
R1-gen	REV	5'-TCCCACACAGTGAAGCTGATG-3'		NM_001658	4	

Legende: 1, MSP-PCR; 2, Sequenzierung; 3, Real-Time RT-PCR; 4, Duplex-PCR; 5, Mikrosatellitenanalyse.

4.3 Lösungen und Puffer

Es folgt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer:

Tabelle 6

Lösung:	Ansatz:
6 x BFB-Ladepuffer:	0.25 % Bromphenol-Blau 0.25 % Xylencyanol FF 30 % Glycerol in Aqua dest.
1 x TE-Puffer:	10 mM Tris HCL 1 mM EDTA, pH 8,0
10 x TAE-Puffer	400 mM Tris-Base 200 mM NaOAc 10 mM EDTA, pH 8,0
10 x TBE-Puffer:	900 mM Tris Base 900 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
TBS-Puffer	NaCl 18 g Tris-Puffer 200 ml Aqua dest. ad 2000 ml
Tris-Puffer pH 7,6; 0,05 M	Tris 6,1 g in 50 ml Aqua dest. lösen 1 N HCL 41 ml Aqua dest. ad 1000 ml
Citratpuffer-Gebrauchslösung	30 ml Dako Cytomation + 270 ml Spüllösung, pH 6,0 eingestellt
PBS-Tween-Lösung	Na ₂ HPO ₄ 21.8 g NaH ₂ PO ₄ 6.4 g NaCl 180 g Aqua dest. ad 1000 ml auf pH 7,2 einstellen und 5 ml Tween 20
DAB	Lösung A ChemMate™ Substratbuffer Lösung B ChemMate™ DAB-Chromogen Lösung A zu Lösung B = 1 : 50
Sequenzierungs-Puffer:	4 ml deionisiertes Formamid (80% v/v) 1 ml EDTA (25 mM, 20% v/v, pH 8,0) 250 mg Blue Dextran (50 mg/ml)

5 Methoden

5.1 PCR

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dient der Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen in kürzester Zeit (Mullis, 1983). Das Prinzip der PCR beruht auf dem wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird die Reaktionslösung mit der Matrizen-DNA auf 95°C erhitzt, um die beiden komplementären Stränge der DNA aufzutrennen (*denaturieren*). Dann wird die Temperatur (*Annealing*-Temperatur) herabgesetzt und es findet eine stabile Anlagerung der Primer an die DNA statt (*Hybridisierung*). Die *Annealing*-Temperatur richtet sich nach den Eigenschaften der Primer. Im dritten Schritt baut die hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase die komplementären DNA-Stränge mit den Nukleotiden aus dem Reaktionsansatz auf (*Elongation*). Während jeder Zykluswiederholung werden die kopierten DNA Moleküle verdoppelt.

Das Reaktionsgemisch enthält neben dem optimalen Puffer vier verschiedene Didesoxynukleotide (*dNTPs*), zwei Oligonukleotide (*sense*- und *antisense*-Primer), die die zu amplifizierende Sequenz einrahmen, eine thermostabile DNA-Polymerase und eventuell Additiva wie beispielsweise Dimethylsulfoxid (DMSO) als DNA-Stabilisator. Für die PCR wurde in dieser Arbeit folgenden Reaktionsansatz verwendet:

DNA	20-100 ng
10 x PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
2 mM dNTP-Gemisch	2,5 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Taq DNA Polymerase, Invitrogen (5 u/µl) bzw. HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen	0,2 µl bzw. 0,125 µl
Aqua dest.	ad 25 µl

Zur Verbesserung der PCR-Bedingungen wurden optional folgende Zusätze je Ansatz verwendet: Q-Faktor (Qiagen, Hilden), 5% Formamid, 5% DMSO und 50 mM TMAC. Die PCR wurde im T3-Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt.

Nach einer anfänglichen Denaturierung von 5 min (Taq DNA Polymerase, Invitrogen) bzw. 15 min (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen) erfolgte eine Amplifizierung der DNA für 30 – 40 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	30 sec
Anlagerung der Primer	56-60°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec

Die Anzahl der Reaktionszyklen und die Höhe der *Annealing*-Temperatur wurden für jedes Primerpaar ausgetestet.

5.2 Agarosegelelektrophorese

Durch Gelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle ihrer Größe nach auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ergibt sich abhängig von der Größe, Form, Nettoladung, sowie der angelegten Spannung und Porengröße der Gel-Matrix. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur Anode. Durch Interkalieren von Ethidiumbromid in die DNA-Helix werden unter UV-Anregung die PCR-Banden sichtbar gemacht. Die Elektrophorese der PCR-Produkte erfolgte in horizontalen Standard-Elektrophoresekammern. Zur Herstellung eines 2% Gels wurden 2 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml Tris-Acetat-EDTA (1xTAE)-Puffer versetzt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle erhitzt bis sich die Agarose vollkommen aufgelöst hatte. Nach Abkühlung und Zugabe von 5 Ethidiumbromidlösung (Stammlösung: 10 mg/ml) wurde das flüssige Gel blasenfrei in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen. Nach Aushärtung wurde das Gel mit dem Träger in die mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer platziert und der Probenkamm entfernt. Die mit 5 µl Probenpuffer versetzte DNA wurde in die Taschen gegeben und bei einer Spannung von 180 Volt bis 20 min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden im UV-Licht des Transilluminators sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

5.3 mRNA Expressionsanalyse

5.3.1 cDNA Herstellung aus mRNA

Durch *reverse* Transkription wird die RNA in eine stabilere cDNA (*copy DNA*) überschrieben, die für die nachfolgende PCR-Analyse eingesetzt werden kann. Das dazu notwendige Schlüsselenzym, die aus Retroviren isolierte *reverse* Transkriptase, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Zur cDNA-Synthese wurden jeweils 3 µg RNA in ein autoklaviertes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem *Aqua dest.* auf ein Gesamtvolumen von 30,4 µl ergänzt. Die RNA-Lösung wurde für 5 min bei 70°C zur Denaturierung der RNA Sekundärstrukturen inkubiert. Nach Ablauf dieses Reaktionsschrittes wurden die Proben für zwei Minuten auf Eis gestellt und anschließend kurz zentrifugiert. Die *reverse* Transkription erfolgte durch Zugabe von 19,6 µl des folgenden RNA-Reaktionsgemisches:

0,1 M DTT (Dithiothreitol, Invitrogen)	0,4 µl
RNAsin (40.000 U/ml, Promega)	1,0 µl
BSA = bovines Serumalbumin(2,9 mg/ml)	1,7 µl
dNTP-Gemisch (25 µM je dNTP)	2,5 µl
pd(N)6 (1,5 µg/µl, Pharmacia)	3,0 µl
5x H-RT-Puffer (Invitrogen)	10,0 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)	1,0 µl
Gesamt	19,6 µl

Zur cDNA-Synthese wurden die Proben bei 42°C für 50 Minuten inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend durch zehnmütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren. Um die Qualität der synthetisierten cDNA zu überprüfen, wurde das ubiquitär exprimierte Gen $\beta 2M$ ($\beta 2$ -Mikroglobulin) amplifiziert. Von den cDNAs wurden für die Expressionsanalysen mittels Real-Time RT-PCR Gebrauchslösungen mit einer Verdünnung von 1:50 in *Aqua dest.* hergestellt.

5.3.2 *Real-Time* Reverse Transkriptase-PCR

Die *Real-Time* RT-PCR ist eine Methode der semi-quantitativen Expressionsanalyse und basiert auf der Polymerasenkettenreaktion. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, bei der immer nur eine Endproduktbestimmung möglich ist, findet bei der *Real-Time*-PCR die Messung der Produktzunahme nach jedem Zyklus statt und die quantitative Bestimmung des PCR-Produktes kann in die exponentielle Anstiegsphase gelegt werden.

Das Messprinzip basiert auf der Interkalierung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I) in die dsDNA. *SYBR Green I* fluoresziert stark nur bei Vorliegen von dsDNA nach spezifischer Anregung durch eine Halogenlampe (470 nm). Die resultierende Emmissionsfluoreszenz wird durch eine Photodiode mit einem Wellenlängenfilter von 530 nm gemessen. Die Fluoreszenzzunahme wird mit diesem System nach jedem PCR-Zyklus gemessen und auf einem Monitor dargestellt.

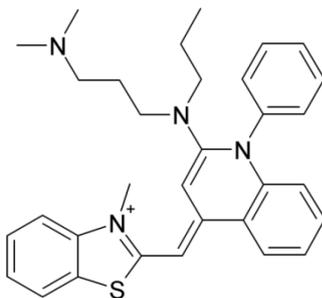


Abb. 9: SYBR Green I (138).

Es wurde ein zwei- oder dreifacher cDNA-Ansatz verwendet. Das Amplifikationsprodukt vom Zielgen wurde gegen das Produkt des Referenzgens *ARF-1* (*ADP-Ribosylierungsfaktor-1*; NCBI GenBank-Zugangsnr. M36340) gemessen. Als Normalgewebe diente nicht-neoplastisches Hirnhautgewebe (Leptomeninge). Um das optimale Konzentrationsverhältnis der Vorwärts- und Rückwärtsprimer zu ermitteln, wurde eine sogenannte „Primermatrix“ erstellt. Es wurden dabei folgende Reaktionsgemische je nach Zielgen und Primerverhältnis angesetzt:

Reagenz/Zielgen	Timp3 (100 mM/100 mM)	CDH1 (100 mM/600 mM)
cDNA (1:50 verd.)	5 µl	5 µl
SYBR Green Farbstoff	0,75 µl	0,75 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl	2,5 µl
50 mM MgCl ₂	1,75 µl	1,75 µl
5,0 mM dNTPs	1,0 µl	1,0 µl
Hot Gold Star Taq Polymerase	0,125 µl	0,125 µl
Vorwärts-Oligonukleotid (Zielgen, 10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 µl
Rückwärts-Oligonukleotid (Zielgen, 10 pmol/µl)	0,25 µl	1,5 µl
Vorwärts-Oligonukleotid (ARF1, 10 pmol/µl)	1,5 µl	1,5 µl
Rückwärts-Oligonukleotid (ARF1, 10 pmol/µl)	1,5 µl	1,5 µl
<i>Aqua dest.</i>	ad 25 µl	ad 25 µl

In eine 96-,„well“ PCR-Platte wird zuerst 20 µl des PCR-Gemisches pipettiert und dann 5 µl der cDNA-Lösungen hinzugegeben. Die Real-Time RT-PCR mit dem ABI Prism® 5700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt, wobei die letzten beiden Schritte 39-mal wiederholt wurden:

Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Uracil-Glykosylase	50°C	2 min
Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min
Denaturierung der dsDNA	95°C	15 s
Anlagerung der Primer und DNA-Synthese	60°C	1 min

Im Verlauf des Programms steigt die DNA-Menge exponentiell an und entsprechend wird mehr *SYBR Green I* gebunden, so dass die Fluoreszenz ansteigt. Nach dem Programmende kann man die Fluoreszenzunahme zu verschiedenen PCR-Zyklen am Monitor betrachten und

es erfolgt die Auswertung. Die relative Zunahme an PCR-Produkt wird logarithmisch gegen die Zyklenzahlen aufgetragen (siehe Abb. 10).

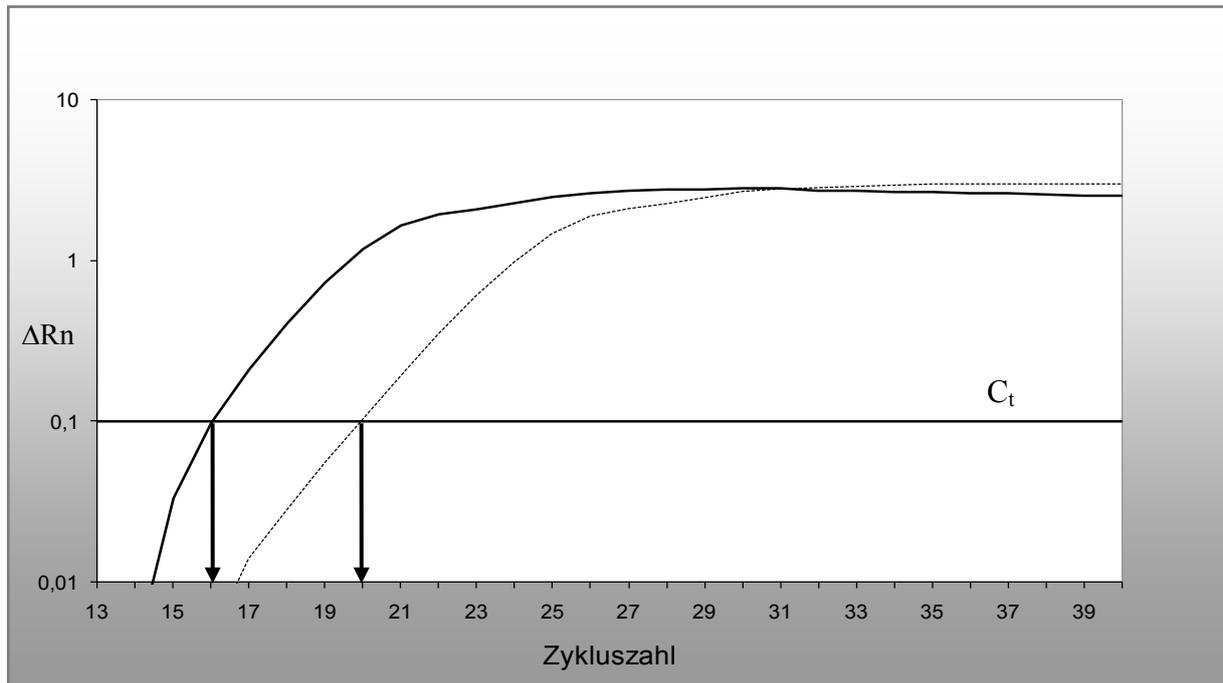


Abb. 10: Graphische Darstellung der Produktzunahme (Ordinate, ΔRn) gegen die Zyklenzahl (Abszisse). Dargestellt sind beispielhaft zwei Kurvenverläufe mit von links nach rechts abnehmender Fluoreszenz. Je kleiner der C_t -Wert desto mehr RNA bzw. cDNA war im Ansatz. Die linke Kurve schneidet den Schwellenwert (C_t) ungefähr beim 16. PCR-Zyklus, während die rechte Kurve beim 20. Zyklus den Schwellenwert überschreitet.

Zusätzlich wird die Dissoziationskurve betrachtet. Im Idealfall sollen die untersuchten Proben einen scharfen Peak bei der Schmelztemperatur des Amplikons ergeben. Dagegen dürfen in den entsprechenden Leerkontrollen (ohne Template) keine signifikanten Fluoreszenzsignale auftreten.

Für die Analyse wird ein Fluoreszenzschwellenwert („*Threshold Cycle*“ oder C_t -Wert) festgelegt. Der C_t -Wert entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau (*Threshold-Fluoreszenz*) zu erreichen. Per Definition befindet sich am C_t in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neuhergestellter DNA. Die Berechnung des C_t -Wertes kann direkt aus den Fluoreszenz-Rohdaten oder aus entsprechenden Kurven abgeleitet werden und dient der Korrektur der Hintergrund-Fluoreszenz. Zu diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation exponentiell, da es in dieser Phase der PCR keine limitierenden Faktoren, wie Oligonukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibierung der PCR durch Bildung hemmender Produkte gibt.

In dieser Arbeit wurde die am häufigsten verwendete relative oder vergleichende Geneexpressionsanalytik gebraucht. Diese C_t -Methode ($\Delta\Delta C_t$) ermöglicht die relative

Quantifizierung der mRNA-Expression des Zielgens gegen die mRNA-Expression eines Referenzgens. In einem zweiten Schritt wird die relative Expression des Zielgens in einem Tumorfall auf eine nicht-neoplastische Kontrolle bezogen. Die Software berechnet für jede PCR-Probe einen C_t -Wert. Da von jedem Gen ein dreifacher Ansatz geführt wurde, muss zuerst ein Mittelwert der C_t -Werte ermittelt werden. Anschließend wird die Differenz der C_t -Mittelwerte von Ziel- und Referenzgen berechnet (ΔC_t). Nachfolgend wird der $\Delta\Delta C_t$ der Tumorproben bestimmt, indem die Differenz der ΔC_t -Werte der Tumorproben und der ΔC_t -Werte der Kontrollproben gebildet wird. Dadurch setzt man die Werte der Kontrollen gleich null und die der Tumorproben hierzu in Relation. Die relative mRNA-Expression des Zielgens im Tumor ergibt sich durch die Umkehr des Logarithmus der $\Delta\Delta C_t$ -Werte ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Tab. 7: Beispiel für eine Real-Time RT-PCR Auswertung.

Probe	C_t Zielgen	MW C_t Zielgen	C_t Kontrollgen	MW C_t Kontrollgen	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	Ratio ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)
Tu 1	22,77	22,42	21,29	21,34	1,08	-0,07	1,05
	22,14		21,40				
	22,34		21,32				
Tu 2	25,71	25,54	25,28	25,53	0,02	-1,14	2,20
	25,58		25,77				
	25,34		25,24				
Tu 3	26,46	26,15	18,46	18,66	7,49	6,34	0,01
	26,12		18,86				
	25,87		18,54				
Tu 4	19,39	19,37	20,29	20,45	-1,08	-2,23	4,70
	19,22		20,36				
	19,5		20,70				
Kontrolle	22,47	22,44	21,66	21,29	1,15	0	1,00
	22,41		20,92				
	22,45		20,94				

Legende: Von den zu untersuchenden Tumorproben wird jeweils ein dreifacher RT-PCR- Ansatz durchgeführt und von diesen Messwerten der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Tumorproben Tu2 und Tu4 zeigen eine Überexpression der Zielgen mRNA im Vergleich zu der Kontrolle, während die Tumorprobe Tu3 eine deutliche Unterexpression aufweist. In der Tumorprobe Tu1 ist die Expressionshöhe des Zielgens vergleichbar mit der im Kontrollgewebe. *Tu*, Tumorfall; *Kontrolle*, nicht-neoplastisches Hirnhautgewebe; C_t , Fluoreszenzschwellenwert; *MW*, Mittelwert.

5.4 Deletionsuntersuchung mittels Duplex-PCR-Analyse

Eine Duplex-PCR-Analyse erlaubt die gleichzeitige Amplifikation zweier Zielsequenzen in einem Reaktionsansatz, der dementsprechend je ein Primerpaar für das Ziel- und Kontrollfragment enthält. Das Kontrollfragment soll etwas grösser als das Zielfragment sein, um die beiden PCR-Produkte in der Gelelektrophorese auftrennen zu können. Zuerst wird das ideale Konzentrationsverhältnis der beiden Primerpaare zueinander ermittelt. Wichtig dabei ist, dass die PCR nicht in der Sättigungsphase ist und die Produktbanden des Ziel- und Kontrollfragments im UV-Licht des Transilluminators ein ähnlich starkes Fluoreszenzsignal erzeugen. Als Referenzamplikon wurden 2 *APRT* Genfragmente (*APRT*-gen-5f/6R und *APRT*-gen-F1/R2) (Tab. 5) ausgesucht, die etwas länger als die entsprechenden *TIMP3*-PCR-Produkte sind. Als Kontrollen wurden Leukozyten-DNA mehrerer Patienten verwendet. Die Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte wurden in einem 3-4% Agarosegel aufgetrennt und im UV-Licht des Transilluminators sichtbar gemacht. Aus dem Fluoreszenzsignal der einzelnen Banden wurde ein Wert für die Signalstärke mit Hilfe der GelDoc Software (Biorad) ermittelt. Zuerst wurden die Werte für das Zielgen gegen die Werte für das Referenzgen geteilt. Anschliessend wurde für die Kontrollfälle (Leukozyten-DNA) ein Mittelwert der Quotienten ($MW_{\text{kontrolle}}$) berechnet. Die Werte der Quotienten für Tumorfälle wurden nachfolgend gegen diesen Kontrollmittelwert ($MW_{\text{kontrolle}}$) geteilt. Anhand der ermittelten Werte wurden die Verminderungen der Gendosis des Zielgens festgestellt. Werte $<0,3$ lassen auf eine homozygote biallelische Deletion schließen, Werte zwischen 0,3 und 0,6 weisen auf eine hemizygoten monoallelische Deletion hin.

5.5 Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA

Die Umwandlung genomischer DNA durch Natriumbisulfit basiert auf der erstmals von Frommer beschriebenen Methode (35). Dabei werden nicht methylierte Cytosine in Uracile umgewandelt, während 5-Methylcytosine durch den „Schutz“ der Methyl-Gruppe unverändert bleiben. Ein Cytosin-Molekül kann über sein C5-Atom Addukte mit zahlreichen Substanzen, einschliesslich des Bisulfit-Ions, bilden. Die relativ langsame Reaktion mit Natriumbisulfit wird bei niedrigem pH-Wert (pH 5,0) katalysiert und ist stark einzelstrangspezifisch. In wässriger Lösung wird das Cytosin-Bisulfit-Addukt unter Abspaltung der NH_2 -Gruppe zum

Uracil-SO₃-Derivat desaminiert und durch eine abschließende Alkali-Behandlung zu Uracil desulphoniert (Abb. 11).

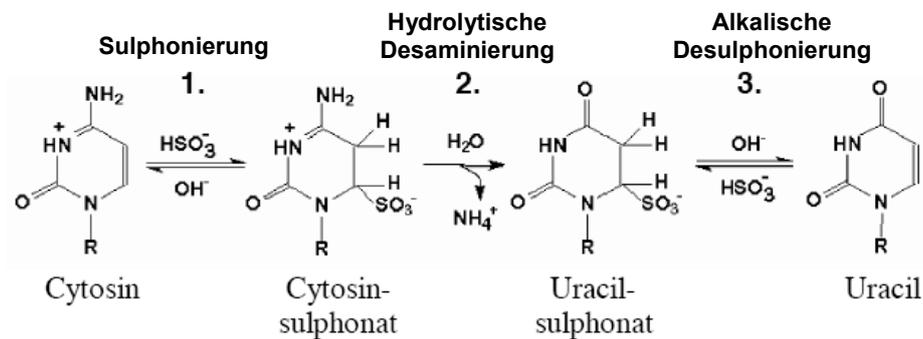


Abb. 11: Reaktionskette für die chemische Umwandlung eines Cytosin- in ein Uracil-Molekül durch Natriumbisulfit (23).

Für die Natriumbisulfitbehandlung werden zuerst folgende Lösungen frisch angesetzt:

Lösung	Ansatz
10 N NaOH	4 g NaOH in 10 ml <i>Aqua dest.</i>
10 mM Hydrochinon	0,11 g in 100 ml <i>Aqua dest.</i>
3 M Natriumbisulfit, pH 5,0	15,6 g in 50 ml <i>Aqua dest.</i>

10 μl DNA-Arbeitslösung (100 ng/ μl) werden nach Zugabe von 1,5 μl 10 N NaOH und 38,5 μl *Aqua dest.* für 15 Minuten in einem Hybridisierofen bei 37°C denaturiert. Nachfolgend findet die Natriumbisulfitbehandlung durch Zugabe von 30 μl 10 mM Hydrochinon und 520 μl 3 M Natriumbisulfit statt. Der Ansatz wird mit Mineralöl bedeckt und über Nacht (16 h) in einem Hybridisierofen bei 55°C inkubiert. Die Aufreinigung der Natriumbisulfit-behandelten DNA erfolgt mit dem Wizard® DNA Clean-Up System von Promega nach Anleitung des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wird mit 50 μl aufgewärmtem *Aqua dest.* eluiert und mit 1,5 μl NaOH für 15 Minuten bei 37°C desulphoniert. Anschließend werden 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. 99% Ethanol hinzugegeben und die DNA für 30 Minuten bei -20°C gefällt. Nach dem Zentrifugieren mit 14000 rpm bei 4°C für 30 Minuten wird das Pellet mit 200 μl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μl *Aqua dest.* aufgenommen. Die Natriumbisulfit-behandelte DNA wird direkt für methylierungsspezifische PCRs verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

Bei einer nachfolgenden PCR-Amplifizierung und Sequenzierung dieser modifizierten DNA werden alle Uracil-Moleküle als Thymin gelesen, dagegen werden methylierte Cytosine als

Cytosin erkennt. Diese Methode ermöglicht daher den sensitiven indirekten Nachweis der methylierten Cytosine (Abb. 12).

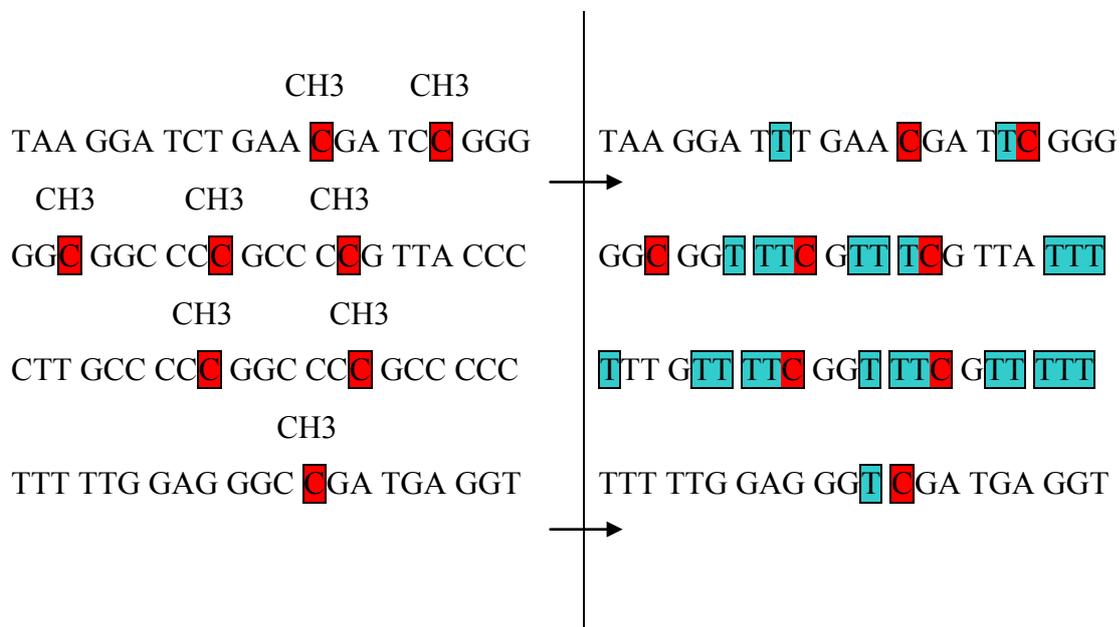


Abb. 12: Schematische Darstellung der DNA-Sequenz vor und nach der Natriumbisulfitbehandlung. Die 5-Methyl-Cytosine bleiben vor dem „Angriff“ des Natriumbisulfits geschützt. Alle anderen Cytosine werden in Uracile bzw. nach Amplifizierung in Thymin, wie hier dargestellt, umgewandelt. *Rot*, methylierte Cytosine; *türkis*, in Thymin umgewandelte nicht methylierte Cytosine.

5.6 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die MSP ermöglicht eine schnelle und sensitive Untersuchung von großen Tumorserien auf Methylierung eines oder mehrerer Gene hin. Es ist die momentan sensitivste Methode und kann einen Anteil von 0,1% methylierter DNA in einem DNA-Gemisch detektieren. Der Nachteil der Methode liegt in der fehlenden quantitativen Information. Außerdem ist der Nachweis der methylierten CpG-Dinukleotide auf die beiden Primerbindungsstellen beschränkt.

Notwendig sind zwei verschiedene Primerpaare. Das methylierungsspezifische Primerpaar (M) bindet nur an die bisulfitumgewandelte DNA, wenn die DNA in der Primerbindungssequenz methyliert war, d.h. wenn CG-Nukleotide vorliegen. Dagegen bindet das zweite Primerpaar (U), wenn die entsprechende Sequenz nicht methyliert war, d.h. nur UG- bzw. TG-Nukleotide vorhanden sind. Im ersten Schritt der MSP erfolgt die Natriumbisulfitbehandlung der DNA (siehe Kap. 5.5), dann werden die entsprechenden Amplifikationsreaktionen mit den M- und U-Primerpaaren durchgeführt. Im Rahmen dieser

Arbeit wurde die Promoterregion des *TIMP3*-Gens mittels MSP-Analyse nach folgendem Schema durchgeführt (Primersequenzen siehe Tab. 5):

bisulfitbehandelte DNA (Kap. 5.5)	1 µl
2 mM dNTPs-Mix	2,5 µl
10 x PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂ , Qiagen)	2,5 µl
je Primer (10 pmol/µl)	1 µl
HotStar Taq DNA Polymerase (5 u/µl; Qiagen)	0,2 µl
Detergenz *	x µl
<i>Aqua dest.</i>	ad 25 µl

Legende: * 5 µl 5xFaktor Q (Qiagen) für das M-Primerpaar; 1,25 µl DMSO für das U-Primerpaar.

Die MSP-Reaktionen wurden unter folgenden PCR-Bedingungen in einem Thermocycler der Firma BIOMETRA durchgeführt:

<i>TIMP3</i>	Annealingtemperatur	PCR-Zyklen
Primer für methylierte DNA	58°C	43
Primer für unmethylierte DNA	54°C	43

Zur Auswertung der MSP-Analyse wurden jeweils 5 µl der PCR-Produkte mit 5 µl Ladepuffer auf 2%-Agarosegele in 1 x TAE-Puffer (siehe Kap. 4.3) mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) als Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese konnten die Nukleinsäurebanden unter UV-Licht abgebildet werden. Als Größenstandard wurde ein 100 bp-DNA-Größenmarker (PeqLab) verwendet. Als positive Kontrolle für die methylierungsspezifische PCR diente mit *SSSI-Methyltransferase* und Natriumbisulfit-behandelte genomische DNA. Natriumbisulfit-behandelte, nicht-methylierte Leukozyten-DNA wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

5.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung Natriumbisulfit-behandelter DNA ermöglicht es, die exakte Basensequenz eines definierten DNA-Abschnittes zu ermitteln und ist der Goldstandard der Methylierungsanalyse (81). Die Methode erbringt einen sensitiven Nachweis jeder methylierten CpG-Stelle in der untersuchten Sequenz.

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach dem weiterentwickeltem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (114) und wurde auf einem semi-automatischen DNA-Sequenziergerät der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Bei dieser Sequenzierungsmethode handelt es sich um eine modifizierte Polymerasekettenreaktion. Der Reaktionsansatz enthält zusätzlich einen komplementären Oligonukleotidprimer und in geringer Konzentration fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide. Nach der Denaturierung der DNA und der Anlagerung des Reverse-Primers wird die Oligonukleotidkette solange verlängert, bis die Polymerase zufällig ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP anstelle eines dNTP einbaut. Die Kettenreaktion endet dann und die DNA-Polymerase fällt vom DNA-Matrizen-Strang ab. Dem Zufallsprinzip folgend geschieht dies in annähernd gleichem Maße an allen Stellen des neusynthetisierten Stranges. Am Ende hat man also DNA-Einzelstränge jeder möglichen Länge mit endständigem fluoreszenzmarkiertem ddNTP. Nachfolgend wird die DNA im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Reihenfolge der Fluoreszenzmarkierungen von einem Laserscanner registriert. Jedes der vier verschiedenen Didesoxynukleotide (ddGTP, ddATP, ddCTP und ddTTP) ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert und die Nukleotidsequenz kann so in einer Gelspur detektiert werden. Aus dem entstandenen Elektropherogramm kann man nun die Basenfolge ablesen und entscheiden, ob noch methylierte CpG-Stellen vorliegen oder alle Cytosine durch die Bisulfitbehandlung umgewandelt wurden.

Nach Amplifikation des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes wurde das PCR-Produkt mit einem Aufreinigungskit (Jetquick PCR Product Purification Spin Kit, Genomed) nach dem Hersteller-Protokoll aufgereinigt. Zur Abschätzung der Produktmenge wurden je 5 µl der aufgereinigten DNA und 5 µl Ladepuffer auf einem Agarosegel aufgetrennt und je nach Bandenstärke 4-7,5 µl Produkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt:

Aufgereinigtes PCR-Produkt	4-7,5 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Mix (Applied Biosystems)	2,0 µl
<i>Aqua dest.</i>	ad 10 µl

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen für 25 Zyklen:

Temperatur	Zeit
96°C	10 s
50°C	4 min
4°C	Pause

Zur Abtrennung nicht-eingebauter fluoreszenzmarkierter ddNTPs wurde die Sequenzreaktion nach Zugabe von 1 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 25 µl 95% Ethanol 20 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet wurde zweimal mit je 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 4 µl Sequenzierungspuffer (siehe Kap. 4.3) aufgenommen, wovon 2 µl auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel folgender Zusammensetzung aufgetragen wurden:

Urea (Harnstoff)	21 g
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid, 29:1 vernetzt (BIORAD)	8,4 ml
10x TBE	6 ml
<i>Aqua dest.</i>	20 ml
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	350 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	15 µl

APS und TEMED wurden kurz vor dem Gießen des Gels zum Auspolymerisieren zur Gellösung dazugegeben. Die Glasplatten müssen mit speziell nicht fluoreszierenden Tüchern gründlich mit *Aqua dest.* und Isopropanol gesäubert werden, damit der Laser des Sequenziergeräts nur die fluoreszierenden ddNTPs wahrnimmt. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wurden die Proben im semiautomatischen Sequenziergerät der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 377 Sequencer) aufgetragen und der Gellauf gestartet.

Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer Laufzeit von acht Stunden bei 2500 Volt, 48 Watt und 51°C Geltemperatur. Der Laser registriert bei Passage des Ablesebereichs die Fluoreszenz und generiert dadurch das Elektropherogramm. Während des Gellaufs wird von der Sequenzier-Software ein imaginäres Gelbild erstellt und anschließend automatisch ausgewertet. Danach wurden die Elektropherogramme ausgedruckt und die DNA-Sequenzen per Hand auf das Vorliegen von methylierten, also durch die Natriumbisulfitbehandlung nicht umgewandelten CpG-Dinukleotiden untersucht. Aufgrund des eingesetzten DNA-Gemischs und der eventuell unterschiedlichen Methylierung der einzelnen Stränge an den CpG-Stellen wird ein doppeltes Signal erwartet, was sich im Elektropherogramm als Doppelpeak, bestehend aus Cytosin (C) und Thymin (T), darstellt. Ein reines T- bzw. C-Signal wird allerdings nur dann erhalten, wenn die DNA eines Probanden an einem CpG-Dinukleotid entweder gar nicht beziehungsweise vollständig methyliert war (81). Man kann nun diese Peak-Höhen vergleichen und so den Methylierungsstatus relativ quantifizieren. Vier Kategorien wurden bei der semiquantitativen Abschätzung des Methylierungsstatus der CpG-Stellen, je nach Verhältnis der Peak-Höhen zueinander, gewählt (Abb. 13):

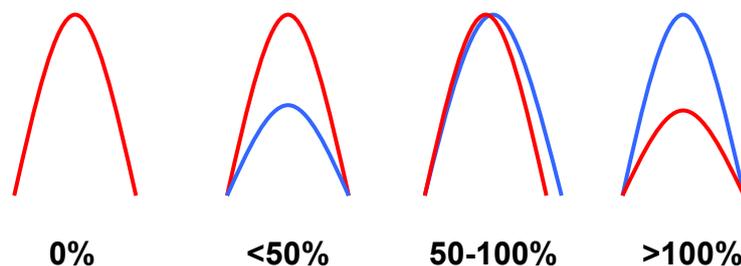


Abb. 13: Semiquantitative Abschätzung der methylierten Cytosine. Zur Auswertung wurden die Peak-Höhen des Thyminsignals (rot) und des Cytosinsignals (blau) zueinander ins Verhältnis gesetzt und so der Methylierungsstatus den prozentualen Kategorien zugeordnet.

5.8 Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatellitenanalyse zum Nachweis von Allelverlusten (auch *loss of heterozygosity*, LOH-Analyse) basiert auf der Untersuchung von Mikrosatellitenpolymorphismen des menschlichen Genoms. Mikrosatelliten sind kurze, nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom oft wiederholt werden. Die wiederholte Sequenz in einem Mikrosatelliten ist sehr einfach und besteht aus zwei bis vier Nukleotiden, meistens die Basen Cytosin und Adenin. Diese Regionen sind vermutlich funktionslos, so dass Veränderungen der Sequenz phänotypisch unwirksam sind. Mutationen und Replikationsfehler ereignen sich hier statistisch häufiger als in kodierenden Genregionen. Die hohe Mutationsrate führt zu vielen Mikrosatellitenpolymorphismen in der Bevölkerung und die Mikrosatellitensequenz ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch im väterlichen und mütterlichen Allel einer Person unterschiedlich (*heterozygot*). Trennt man das Amplifikationsprodukt einer solchen heterozygoten DNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel auf, so kann man 4 Banden unterscheiden. Hat der Patient im Falle der Heterozygotie unterschiedliche Allele von seiner Mutter und seinem Vater geerbt, kann durch den Vergleich beider Allele in Tumor- und Leukozyten-DNA ein Verlust von zwei Banden bzw. eines Allels im Sinne einer allelischen Deletion (LOH) festgestellt werden (siehe Abb. 14).

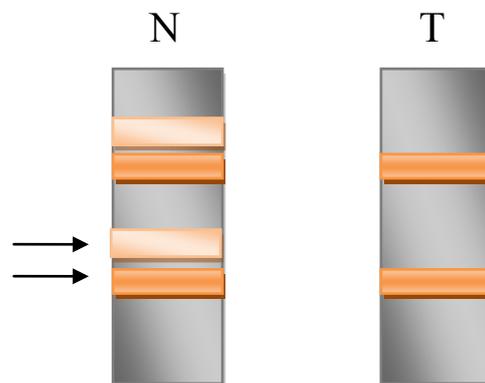


Abb. 14: Beispiel der Mikrosatellitenanalyse nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte mit Verlust der Heterozygotie in Tumoren. Heterozygotie, d.h. mütterliches und väterliches Allel sind unterschiedlich. Die normale Gewebeprobe (N) ist für diesen LOH-Marker (Pfeile) heterozygot (informativer Locus), die Tumorprobe (T) hat dagegen das obere Allel verloren. Die Banden, die höher im Gel liegen, sind „Konformationsbanden“, Nebenbanden, die durch alternativ gefaltete Sequenzen eines jeden Allels entstehen.

Somit ist es möglich durch Amplifikation bestimmter Mikrosatellitenregionen und anschließender Auftrennung des PCR-Produktes im Polyacrylamidgel Informationen über

Allelverluste der entsprechenden chromosomalen Region zu erhalten. Es sind aber nur heterozygote Loci informativ.

Für einen Teil der in dieser Arbeit untersuchter Meningeom-Serie lagen bereits Daten zum Chromosom 22q-Status aus Voruntersuchungen vor (131). Die noch fehlenden LOH-Daten wurden in der Tumorserie für folgende drei Mikrosatelliten-Loci ergänzt: D22S430 (22q12.2), D22S304 (22q12.3) und D22S929 (22q12.2).

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der entsprechenden Tumor- und Leukozyten-DNA-Proben erfolgte auf denaturierenden Polyacrylamidgelen (8 M Harnstoff; 10% (29:1) PAA; 0,5 x TBE) bei einer Spannung von 45 W bei Raumtemperatur. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der Größe der Amplikons. Die DNA-Banden wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Zuerst wurde das Gel in 10 % Ethanol geschwenkt und anschließend für 1-3 Minuten in 1% Salpetersäure gebadet. Das Gel wurde danach mit *Aqua dest.* gespült und für mindestens 20 Minuten im Dunkeln in 0,2 % Silbernitratlösung geschwenkt. Nicht-komplexierte Silberionen wurden durch 3 x waschen mit *Aqua dest.* entfernt. Nachfolgend wurde das Gel in 3 % Natriumhydroxidlösung inkubiert, um durch eine pH-Änderung die komplexierten Silberionen zu elementarem Silber zu reduzieren. Die Natriumhydroxidlösung wurde erneuert bis die DNA-Banden sichtbar wurden und dann die Reaktion mit 10 % Essigsäure durch erneute pH-Wert-Umkehr gestoppt. Anschliessend wurde das Gel auf Whatman-3M-Papier gelegt und bei 80°C für 1 h unter Vakuum getrocknet.

5.9 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A-Behandlung von Zelllinien

Durch Behandlung einer Meningeomzelllinie (Ben-Men-1 Zelllinie, freundlicherweise von Prof. W. Paulus, Münster, zur Verfügung gestellt) mit demethylierender Substanz (5-Aza-2'-Deoxycytidin) und einem Histondeacetylase-Hemmer (Trichostatin A) sollen Gene re-exprimiert werden, deren Promotorregionen durch epigenetische Veränderungen inaktiviert sind. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob das *TIMP3*- und *CDH1*-Gen in der Zelllinie nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA) wieder exprimiert wird. Die molekulare Struktur des 5-Aza-2'-Deoxycytidin entspricht einem Cytidin-Analogon, bei dem die Carbongruppe an Position 5 des Pyrimidinrings durch eine Nitrogruppe ersetzt ist (Abb. 15A).

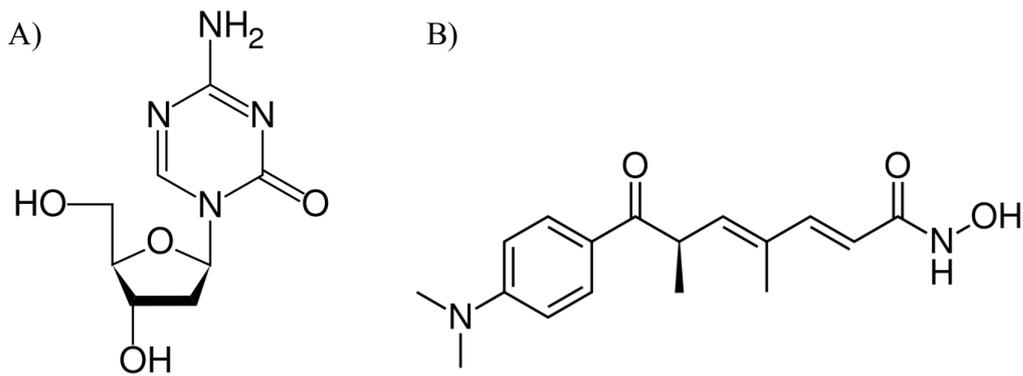


Abb. 15: Strukturformel von 5-Aza-2'-Deoxycytidin (A) und Trichostatin A (B).

Die demethylierende Wirkung dieser Substanz ergibt sich aus dem Einbau in die DNA während der Replikation. Integriert in die Erbsubstanz geht 5-Aza-2'-Deoxycytidin eine kovalente Bindung mit der DNA-Cytosin-C5-Methyltransferase 1 (Dnmt1) ein. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Methylierung des neu synthetisierten Stranges nach abgelaufener Replikation. Dabei wird das Methylierungsmuster des komplementären Stranges übernommen. Durch irreversible Bindung an 5-Aza-2'-Deoxycytidin wird das Enzym nichtkompetitiv gehemmt, so dass nach Ablauf einer Replikation unter Anwesenheit von 5-Aza-2'-Deoxycytidin der neu-synthetisierte Strang demethyliert ist. Um vollständig demethylierte DNA zu erhalten, sind zwei Replikationszyklen notwendig. Der Acetylierungsstatus der Histonschwänze wird durch das Wechselspiel zweier Enzyme beeinflusst: Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) fördern die Acetylierung, während Histon-Deacetylasen (HDAC) sie verhindern. Die Substanz Trichostatin A (TSA, Abb. 15B) ist ein spezifischer Inhibitor der Histon-Deacetylase (HDAC). Vermehrte Histon-Acetylierung in einer DNA-Region führt zu einer weniger dichten Chromatinstruktur, die wiederum das Ablesen der DNA erleichtert und somit in einer gesteigerten Genexpression resultiert. TSA bewirkt Chromatindekondensation und kann dadurch die Unterdrückung der Genexpression aufheben.

Die Zellen wurden in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe nach folgendem Schema behandelt (61):

A + T1:	Anzucht der Zellen für 24 h; Behandlung der Zellen für 24 h mit 500 nM 5-Aza-dC, Zellen mit PBS waschen und weitere 24 h mit 500 nM 5-Aza-dC und 1 μ M TSA (3 mM Stammlösung in DMSO) behandeln.
A + T2:	Anzucht der Zellen für 24 h; Behandlung der Zellen 48 h mit 1 μ M 5-Aza-dC; Zellen mit PBS waschen und weitere 24 h mit 1 μ M 5-Aza-dC und 1 μ M TSA behandeln.
Kontrolle:	Anzucht der Zellen mit täglichem Mediumwechsel für 5 Tage

Nach der Zellernte wurde die RNA extrahiert und für die cDNA-Synthese verwendet.

5.10 Immunhistochemische Untersuchungen

Zum Nachweis der Expression von Timp3, E-cadherin und β -Catenin auf Proteinebene wurde eine immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten der jeweiligen Tumoren vorgenommen. Als Detektionssystem wurde die *Envision*TM Methode von Dako gewählt. Die Vorteile gegenüber den Streptavidin-Biotin-Techniken sind die einfachere Zweischrittmethode und die höhere Sensitivität. Das System enthält Maus- und Kaninchen-spezifische Sekundärantikörper, die mit einem Enzymmolekül-gekoppeltem Dextran-Komplex konjugieren (Abb. 16).

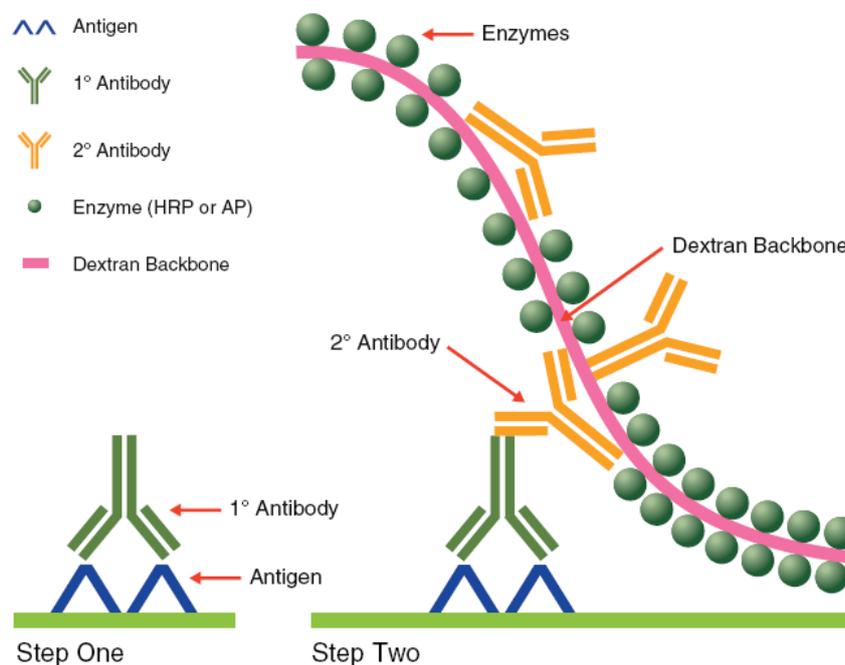


Abb. 16: Zwei-Schritte Polymermethode, *Envision*TM (aus *Education Guide „Immunohistochemical Staining Methods“ 4th Edition, Dako*). Der spezifische, unkonjugierte Primärantikörper bindet direkt an das nachzuweisende Antigen. In einem zweiten Schritt verbindet sich der mit einem Markerenzym (Dextran-Komplex) konjugierte Sekundärantikörper, der spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist, mit dem Primärantikörper.

Zuerst wurden 4 μ m dicke Schnitte von paraffineingebetteten Präparaten angefertigt und für 15 Minuten in Xylol entparaffiniert. Weiter wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-96%-70%-50%-Ethanol) für jeweils 2 Minuten rehydriert. Nach anschließendem Spülen in *Aqua dest.* wurden die Präparate in einer bis zum Rand mit 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) gefüllten Küvette für 30 Minuten in einem Dampfbad aufgeköcht. Dadurch werden die Antigene im Gewebe demaskiert und für die Bindung des primären Antikörpers freigelegt. Die Schnitte wurden dann für 5 Minuten im Leitungswasser und anschließend in *Aqua dest.* gespült und in PBS-Gebrauchslösung eingebracht. Um zu

verhindern, dass das Chromogen mit der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase reagiert, muss diese blockiert werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten in eine Küvette mit Wasserstoffperoxid-Gebrauchslösung (Dako) gestellt. Um ein unspezifisches Anfärben des Gewebes zu verhindern, wurden die Präparate anschließend für 20 Minuten in 1%-Pferdeserum inkubiert. Diese Blockierungslösung sättigt die elektrostatischen Ladungen im Gewebe ab. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zwei Mal in PBS-Lösung gespült und mit dem Primärantikörper für 60-90 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörper wurden in der entsprechenden Lösung von Dako verdünnt und je 100 µl der Antikörperlösung wurden auf die Objektträger pipettiert. Danach wurden die Präparate mit PBS gespült und 5-10 Minuten in ein frisches PBS-Pufferbad gestellt, um ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Nachfolgend wurden die Schnitte mit dem Dako *Envision*TM-Konjugat für 35 Minuten inkubiert. Die spezifische Bindung an dem Primärantikörper wurde mit dem Chromogen DAB (Diaminobenzidin) sichtbar gemacht. Die Präparate wurden mit DAB-Substrat-Lösung (siehe Kap. 4.3) für 3 Minuten inkubiert und die Reaktion danach in *Aqua dest.* gestoppt. Längere Inkubation könnte zur Hintergrundfärbung führen. Nach der Gegenfärbung in Hämalaun wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und zum Schluss wurden die Schnitte mit dem Mikroskopier-Einschlussmittel Eukit eingedeckelt. Die Präparate wurden dann im Lichtmikroskop untersucht. Als Positivkontrollen wurden ein in der *Real-Time* RT-PCR stark *TIMP3*- bzw. *CDH1*-exprimierender Tumor und die vom Hersteller empfohlenen Kontrollen mitgeführt. Zur Beurteilung einer unspezifischen Färbung und zur besseren Bewertung einer spezifischen Färbung an der Antigenstelle wurde in jeder behandelten Serie ein Schnitt (negative Kontrolle) mit unspezifischer negativer Reagenzkontrolle anstelle des primären Antikörpers verwendet. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte semiquantitativ am Lichtmikroskop. Die Proteinexpression wurde anhand eines numerischen Scoring-Systems bewertet, basierend auf dem Prozentsatz der positiv gefärbten Tumorzellen multipliziert mit der Färbungsintensität, der Score-Bereich lag zwischen 0 und 12. Der Anteil der immunpositiven Zellen wurde wie folgt bewertet: 0 (keine oder nur minimale Reaktivität, ähnlich wie nicht-neoplastisches Hirngewebe), 1 (< 10%), 2 (10-50%), 3 (50-90%), 4 (> 90%). Die Färbungsintensität wurde als 0 (negativ), 1 (schwach), 2 (mittel) oder 3 (stark) eingestuft.

Tab. 8: Verwendete Antikörper und immunhistochemische Bedingungen.

Antikörper	Verdünnung	Inkubation	positive Kontrollen
Anti-Timp-3 , polyklonal, Kaninchen, AB19122, Chemicon	1 : 50	60 Minuten, Raumtemperatur, Envision-Methode	Mamma-Karzinom, Darm, Kolonkarzinom, Pankreas
NCL-E-Cad , monoklonal, Maus, 36B5, Novocastra	1 : 50	90 Minuten, Raumtemperatur, Envision-Methode, Vorbehandlung mit Pferdeantiserum	Tonsille, Darm, Kolonkarzinom
β-catenin , monoklonal, Maus, C19220, Transduction Laboratories, Lexington, USA	1 : 100	60 Minuten, Raumtemperatur, Envision-Methode	Mamma-Karzinom, Darm, Kolonkarzinom, Tonsille

5.11 Statistische Auswertung

Zweiseitige *Student's T-Test-Analysen* wurden verwendet, um mRNA-Expression zwischen Meningeomen verschiedener WHO-Grade und zur Beurteilung der Korrelation zwischen der mRNA Expression und der CpG-Methylierung zu vergleichen. Der Mann-Whitney U-Test wurde benutzt, um Protein-Expression *scores* zwischen Meningeomen verschiedener WHO-Grade zu vergleichen. *Fisher's exact Test* wurde verwendet, um die Häufigkeitsverteilung der *TIMP3* Methylierung in Abhängigkeit vom WHO-Grad und die Assoziation zwischen der *TIMP3* Hypermethylierung und dem Allel-Status auf 22q12.3 zu bewerten. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant für alle Analysen festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Software-Programm *GraphPad Prism 4*.

C Ergebnisse

6 Analyse des Tumorsuppressorgen-Kandidaten *TIMP3* in Meningeomen

6.1 Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von *TIMP3*

Expressionsverlust oder ein beschleunigter Abbau einer aberranten RNA („*RNA decay*“) können Folgen von epigenetischen oder genetischen Veränderungen sein. Um die Konsequenz einer möglichen epigenetischen oder genetischen Inaktivierung des *TIMP3*-Gens in Meningeomen auf Transkriptionsebene zu überprüfen, wurde die mRNA Expression von *TIMP3* in 43 von 50 Meningeomen (21 benigne, 11 atypische und 11 anaplastische Meningeome), für die ausreichend qualitativ hochwertige RNA vorlag, mittels *Real-Time* RT-PCR untersucht (Tab. 9).

Tab. 9: Ergebnisse der mRNA Expressionsanalyse von *TIMP3* in Meningeomen.

Fall	WHO-Grad	<i>TIMP3</i> mRNA Expression	Fall	WHO-Grad	<i>TIMP3</i> mRNA Expression
MN67	III	0,50	MN877	I	na
MN49A	III	2,41	MN7	I	1,18
MN210	III	0,09	MN10	I	1,75
MN63B	III	0,05	MN11	I	1,18
MN64	III	2,08	MN12	I	0,07
MN213	III	4,99	MN17	I	0,17
MN119	III	0,08	MN19	I	1,25
MN217	III	0,10	MN993	I	2,33
MN113	III	0,64	MN27	I	0,30
MN212	III	0,08	MN876	I	13,25
MN202	III	0,01	MN30	I	1,54
MN4	II	0,88	MN684	I	4,28
MN14	II	0,17	MN918	I	3,79
MN16	II	0,07	MN37	I	0,92
MN20	II	0,17	MN38	I	7,56
MN22	II	0,31	MN41	I	1,91
MN40	II	0,30	MN411	I	1,71
MN42	II	1,86	MN1004	I	0,33
MN47	II	0,77	MN1005	I	1,84
MN61	II	1,07	MN412	I	3,78
MN62	II	0,15	MN58	I	1,26
MN56B	II	0,30	MN202	I	0,84

Grau markierte Werte kennzeichnen mRNA-Expressionswerte < 0,5 relativ zu Normalgewebe (normales leptomeningeeales Gewebe). *MN*, Meningeom; *na*, nicht analysiert.

Eine um mehr als 50% verminderte *TIMP3* mRNA Expression im Vergleich zum nicht neoplastischen leptomeningealen Gewebe zeigten am häufigsten die atypischen (7 von 11, 64%) und die anaplastischen Meningeome (6 von 11, 55%). Eine solche *TIMP3* mRNA Reduktion wurde in lediglich 4 von 21 (19%) benignen Meningeomen nachgewiesen (Tab. 9, Abb. 17 und 18).

Außerdem wiesen atypische (MN II; Mittelwert: 0,6; Standardabweichung: 0,5) und anaplastische Meningeome (MN III; Mittelwert: 1,0; Standardabweichung: 1,6) geringere mittlere *TIMP3* mRNA Expression als benigne Meningeome (MN I; Mittelwert: 2,4; Standardabweichung: 3,0) auf (Abb. 17). Diese Erkenntnisse erwiesen sich als signifikant in *Student's-T-Test-Analysen* (MN III und II vs MN I, $p = 0,0211$; Tab. 10).

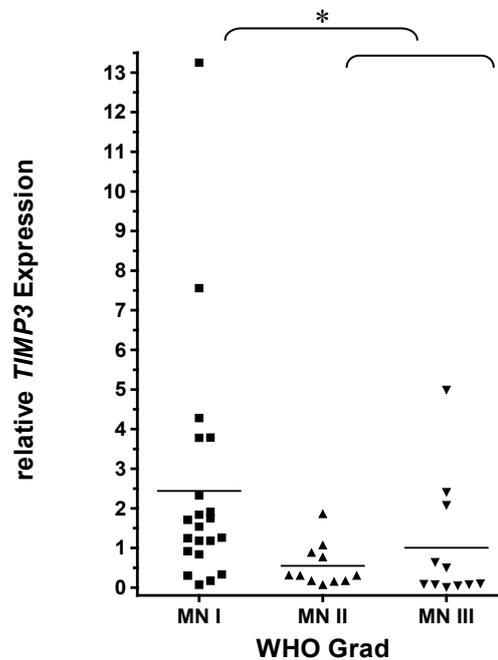


Abb. 17: Die mRNA Expressionslevel von *TIMP3* in Meningeomen. *Ordinate*, relative Expression von *TIMP3*; *Abszisse*, MN I (benigne Meningeome, WHO-Grad I), MN II (atypische Meningeome, WHO-Grad II), MN III (anaplastische Meningeome, WHO-Grad III). Die Expressionswerte der Tumore sind relativ zur Expression von *TIMP3* in der Leptomenix (=1) dargestellt.

Aufgrund eines anaplastischen Meningeoms mit einer erhöhten Expression (MN213; 4,99) erreichte der Expressionsunterschied zwischen den benignen und den anaplastischen Meningeomen nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Tab. 10: Student's T-test zum Vergleich der *TIMP3* Expression zwischen den drei nach WHO-Grad eingeteilten Tumorgruppen.

p-Werte	<i>TIMP3</i> Expression
MN I vs. MN III	0,1528
MN I vs. MN II	0,0504
MN II vs. MNIII	0,384
MN II und III vs. MN I	0,0211 *

Die *Real-Time* RT-PCR ermittelte deutliche Expressionsunterschiede in den WHO-Grad Subgruppen.

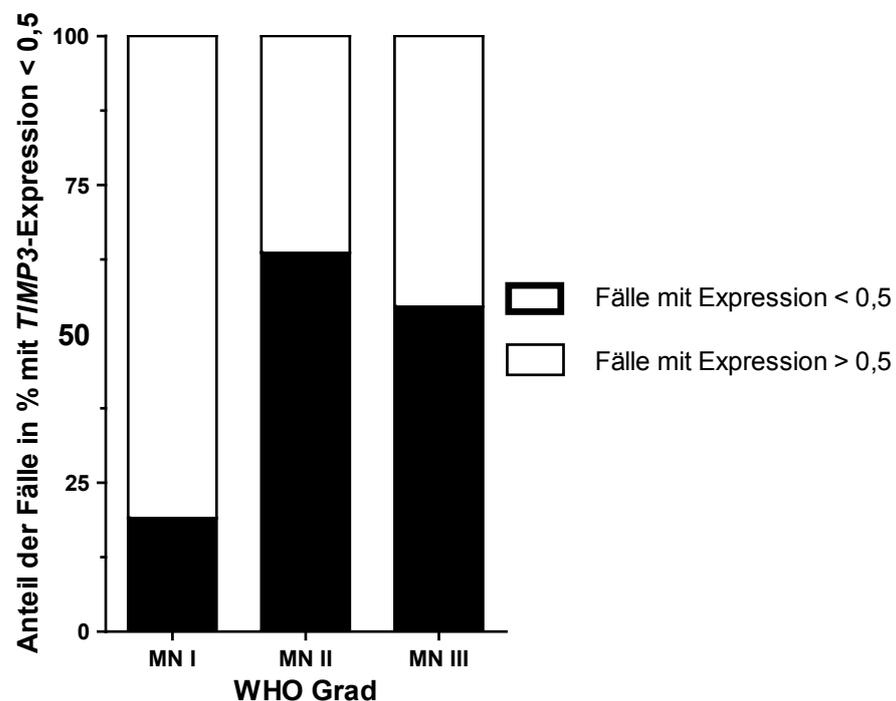


Abb. 18: Vergleich der *TIMP3* mRNA-Expression in benignen, atypischen und anaplastischen Meningeomen. Auffällig ist der hohe Anteil an Tumoren mit geringer *TIMP3*-Expression in den atypischen und anaplastischen Meningeomen.

Bei den anaplastischen Meningeomen gab es die höchsten Expressionsverluste. So zeigten alle 6 Meningeome mit *TIMP3* Unterexpression ein um mindestens 90% vermindertes Transkriptionslevel im Vergleich zum Kontrollgewebe, was bei Berücksichtigung einer gewissen Normalzellkontamination in der Tumorgewebprobe für einen vollständigen Verlust der Expression von *TIMP3* mRNA spricht.

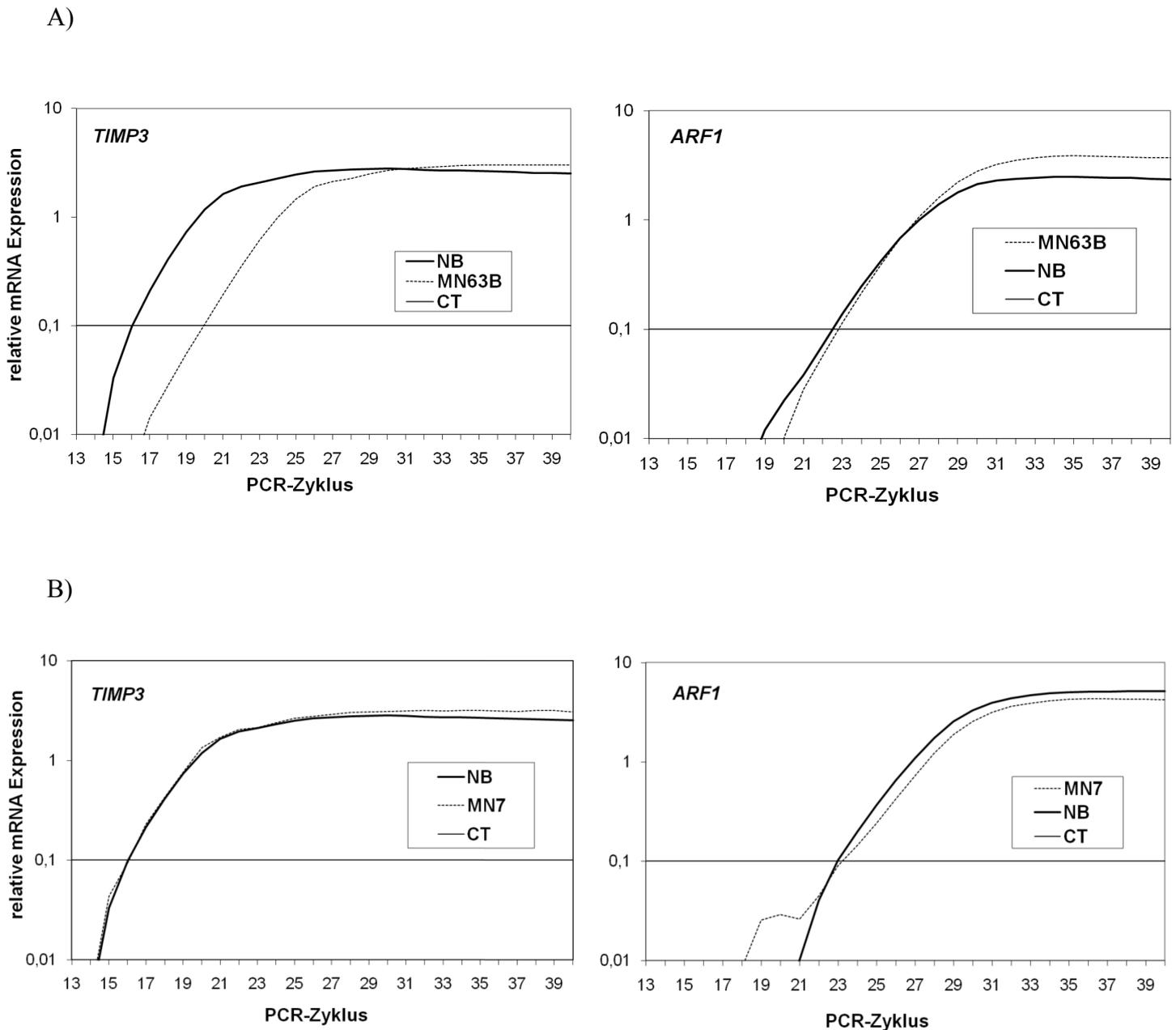
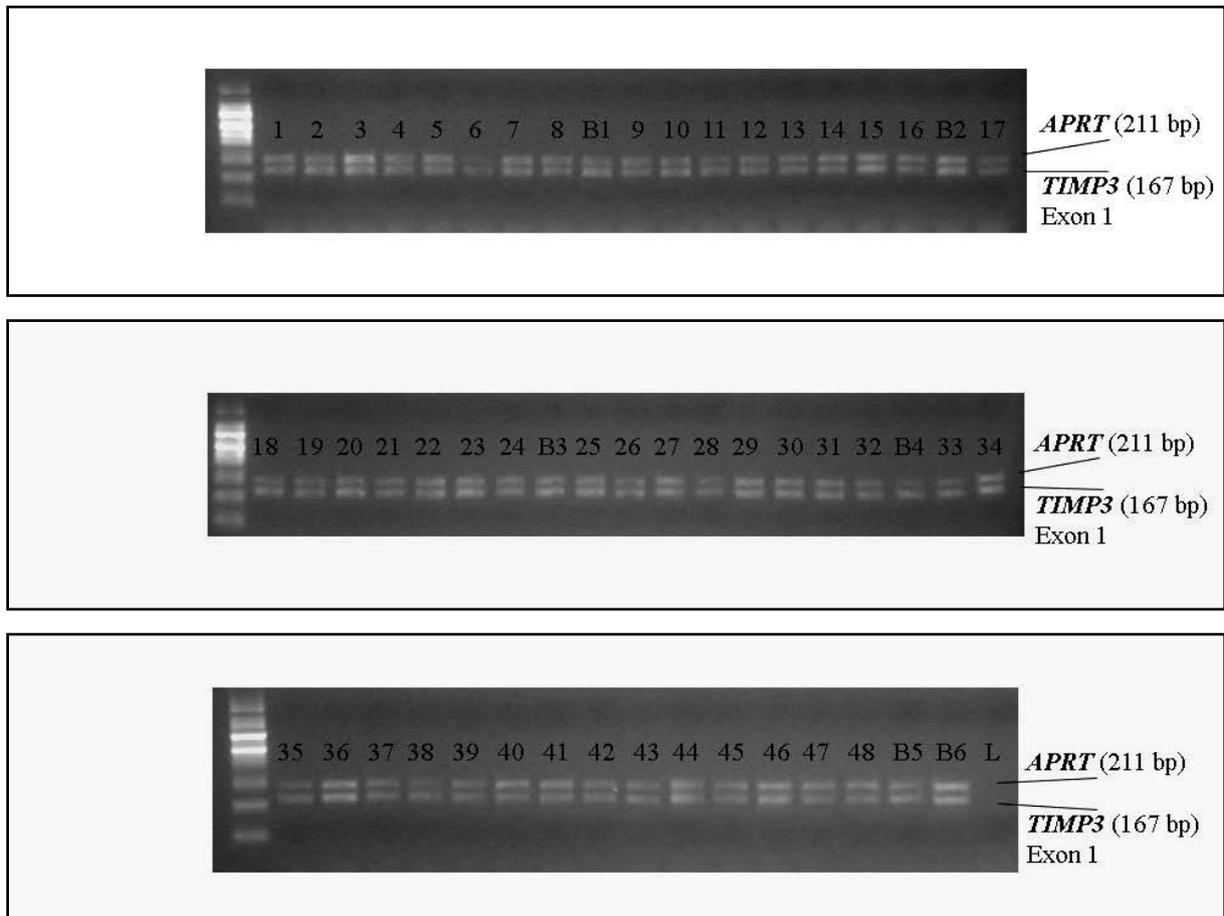


Abb. 19: Beispiele der Real-Time RT-PCR Analyse der *TIMP3* mRNA Expression in einem anaplastischen Meningeom (MN63B) (A) und einem benignen Meningeom (MN7) (B) im Vergleich zum normalen leptomeningealen Gewebe (NB). *Abszisse*, Nummer des PCR-Zyklus; *Ordinate*, Relative Menge an PCR-Produkt; (A), reduzierte *TIMP3* mRNA Expression in MN63B. Während bei MN63B und NB die Kurven der Referenz mRNA (*ARF1*) den C_t Schwellenwert bei nahezu gleichen Zyklenzahlen erreichen, ist die Kurve der *TIMP3* mRNA bei MN63B im Vergleich zu NB deutlich nach rechts verschoben; (B), normale *TIMP3* mRNA Expression in Tumor MN7. Bei MN7 und NB erreichen die Kurven sowohl der Referenz mRNA (*ARF1*) als auch die Kurve der *TIMP3* mRNA den C_t Schwellenwert bei nahezu gleichen Zyklenzahlen. MN63B wies eine *TIMP3* Promotorhypermethylierung und Allelverluste auf 22q auf. Im Gegensatz dazu zeigte MN7 weder eine *TIMP3* Promotorhypermethylierung noch 22q-Verluste.

6.2 Ergebnisse der *TIMP3* Deletionsuntersuchung mittels Duplex-PCR

Um homozygote (biallelische) Deletionen als mögliche Ursache der erniedrigten *TIMP3* mRNA Expression auszuschließen, wurden 48 Meningeome (12 anaplastische, 11 atypische und 25 benigne) im Exon 1 und Exon 4 von *TIMP3* auf homozygote Deletionen mittels Duplex-PCR untersucht. Als Referenzgen wurde das Kontrollgen *APRT* auf Chromosom 16 und als konstitutive Kontrolle wurde Leukozyten-DNA verwendet. Die Duplex-PCR-Untersuchungen ergaben in den untersuchten Meningeomen keinen Hinweis für eine homozygote Deletion von *TIMP3* als Ursache der erniedrigten Expression (Abb. 20).

A)



B)

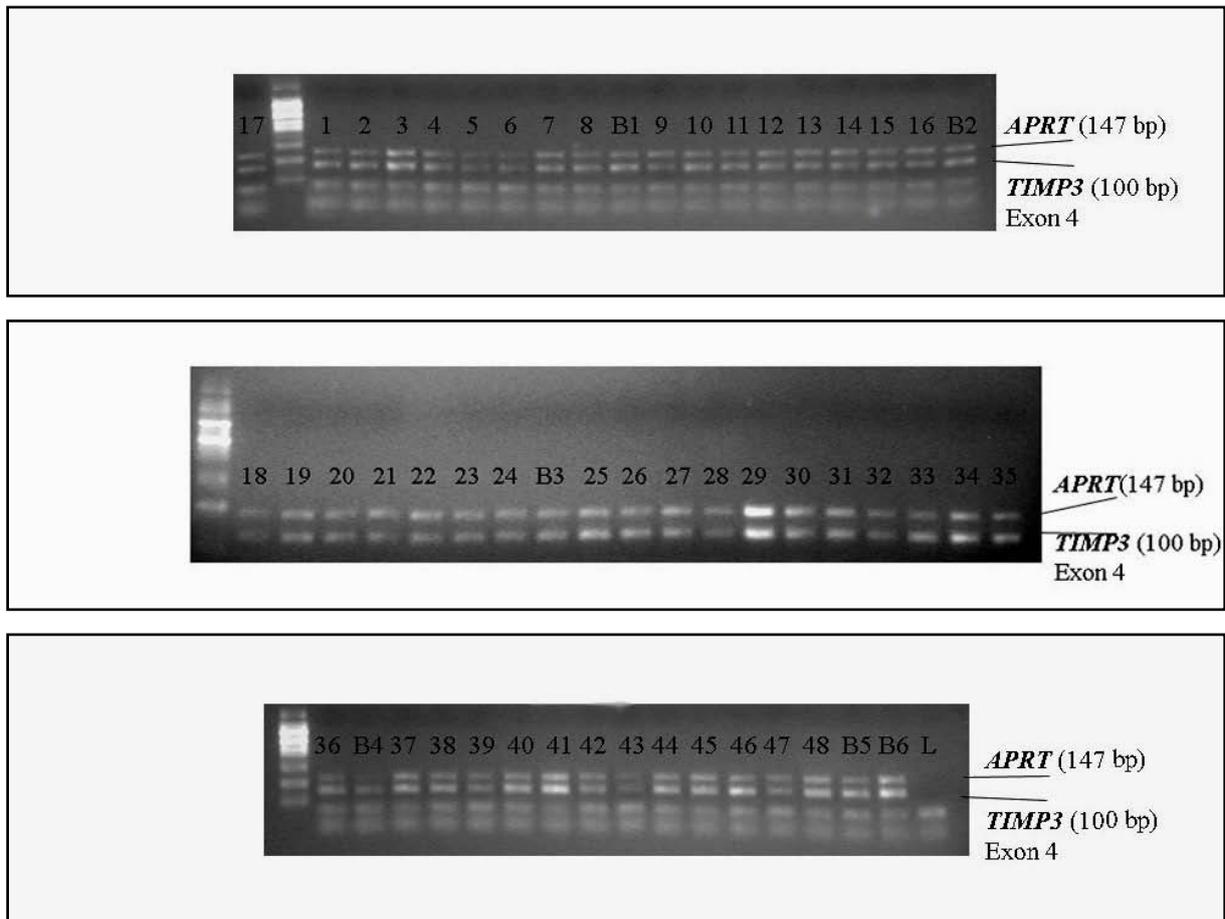


Abb. 20: Deletionsuntersuchung von *TIMP3* in Meningeomen mittels Duplex-PCR. Dargestellt sind Ethidiumbromid-gefärbte PCR-Produkte der Meningeomfälle (1 – 48) nach Auftrennung in einem Agarosegel. B1 – B6, PCR-Produkt aus Leukozyten-DNA, die keine Deletionen im *TIMP3* Gen aufweisen soll. L, Leerkontrolle. (A) Vergleich *TIMP3* Exon 1-Amplikon mit *APRT*-Amplikon; (B) Vergleich *TIMP3* Exon 4-Amplikon mit *APRT*-Amplikon.

Ein Vergleich der Produktstärke des *TIMP3*-Amplikons mit dem entsprechenden *APRT*-Amplikon mittels der *Molecular Analyst Software* (Bio-RAD) zeigte in allen Fällen keinen signifikanten Intensitätsunterschied zwischen den DNA-Banden, so dass eine homozygote (bialellische) Deletion des *TIMP3* Gens (Werte < 0,3) in den untersuchten Tumoren ausgeschlossen werden konnte. In einigen Fällen fanden sich jedoch Hinweise auf hemizygoten (monoallellischen) Deletion (Werte zwischen 0,3 und 0,6) (Tab. 11). Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Mikrosatelliten-Analyse.

Tabelle 11: Ergebnisse der *TIMP3* Deletionsuntersuchung mittels Duplex-PCR, *TIMP3* mRNA Expression und Allelstatus auf 22q in Meningeomen.

Fall	WHO-Grad	<i>TIMP3</i> -Ex1 / <i>APRT</i>	<i>TIMP3</i> -Ex4 / <i>APRT</i>	<i>TIMP3</i> mRNA Expression	22q Allelstatus
MN67	III	0,63	0,42	0,5	na
MN34	III	1,15	1,00	na	LOH
MN49A	III	0,43	0,65	2,41	LOH
MN210	III	0,53	0,44	0,09	na
MN63B	III	0,42	0,53	0,05	LOH
MN64	III	1,19	1,09	2,08	na
MN213	III	0,67	0,53	4,99	na
MN119	III	0,62	0,65	0,08	RET
MN217	III	0,50	0,45	0,1	na
MN113	III	0,92	0,96	0,64	na
MN212	III	0,99	1,54	0,08	na
MN1038	III	0,68	0,78	0,84	LOH
MN202	III	0,97	0,99	0,01	na
MN4	II	0,94	0,86	0,88	LOH
MN14	II	0,56	0,71	0,17	LOH
MN16	II	0,65	0,47	0,07	LOH
MN20	II	0,71	0,55	0,17	LOH
MN22	II	1,48	0,92	0,31	RET
MN40	II	0,67	0,64	0,3	LOH
MN42	II	0,69	0,56	1,86	RET
MN47	II	0,79	1,00	0,77	RET
MN61	II	0,67	0,88	1,07	RET
MN62	II	1,19	1,03	0,15	na
MN56B	II	0,57	0,66	0,3	LOH
MN1	I	0,48	0,85	na	LOH
MN2	I	0,87	1,05	na	RET
MN877	I	0,82	1,02	25,08	LOH
MN7	I	1,00	0,87	1,18	LOH
MN342	I	1,08	0,76	na	RET
MN10	I	0,85	0,75	1,75	LOH
MN11	I	0,65	0,60	1,18	LOH
MN12	I	0,71	0,63	0,07	LOH
MN17	I	0,72	0,60	0,17	LOH
MN19	I	0,75	0,62	1,25	LOH
MN993	I	0,69	0,46	2,33	RET
MN27	I	1,44	1,05	0,3	LOH
MN876	I	0,95	0,92	13,25	RET
MN30	I	1,07	0,76	1,54	RET
MN684	I	0,77	1,09	4,28	RET
MN37	I	0,88	0,68	0,92	RET
MN38	I	0,95	0,97	7,56	RET
MN41	I	0,76	0,85	1,91	RET
MN411	I	0,34	0,98	1,71	RET
MN1004	I	0,58	0,87	0,33	RET
MN1005	I	0,60	0,73	1,84	RET
MN412	I	0,57	1,04	3,78	RET
MN51	I	0,97	0,86	na	RET
MN58	I	0,77	0,65	1,26	LOH

Legende: Gelb markierte Werte kennzeichnen Fälle mit Hinweis auf hemizygote monoallelische Deletion (Werte zwischen 0,3 und 0,6). Grau markierte Werte kennzeichnen m-RNA-Expressionswerte < 0,5 relativ zu Leptomenix. *MN*, Meningeom; *na*, nicht analysiert.

6.3 Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von *TIMP3* in unbehandelten und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-behandelten Meningeomzellen mittels RT-PCR

Behandelt man Zellen in der Wachstumsphase mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) führt dies während mehrerer Replikationszyklen zu einem Verlust der zellspezifischen DNA-Methylierung. Eine Folge dieses Verlustes ist die Veränderung des Expressionsprofils der behandelten Zellen. Das heißt, Gene, deren Expression in der unbehandelten Zelllinie herunterreguliert sind und nach 5-Aza-dC Behandlung einen Anstieg zeigen, werden entweder direkt durch Promotorhypermethylierung oder indirekt über eine Kaskade von epigenetisch regulierten Genen in ihrer Expression beeinflusst. Die Substanz Trichostatin A (TSA) ist ein spezifischer Inhibitor von Histondeacetylasen. Die Behandlung der Zellen mit TSA führt zu einer Chromatindekondensation und zu einer gesteigerten Genexpression. Um eine mögliche Beteiligung der Promotorhypermethylierung an der Herunterregulierung von *TIMP3* auf der mRNA-Ebene *in vitro* zu überprüfen, wurde die Meningeomzelllinie Ben-Men-1 einer 5-Aza-dC- und TSA-Behandlung in zwei verschiedenen Konzentrationen (siehe Kapitel 2) unterzogen, die RNA extrahiert und anschließend durch eine *Real-Time* RT-PCR auf Änderungen der mRNA-Expression hin untersucht. Es ergab sich ein mittlerer Expressionsanstieg nach 5-Aza-dC Behandlung um den Faktor 4 bis 5 je nach Behandlungsbedingung, etwa auf das Niveau der Expressionswerte vom normalen leptomenigealen Gewebe (Abb. 21).

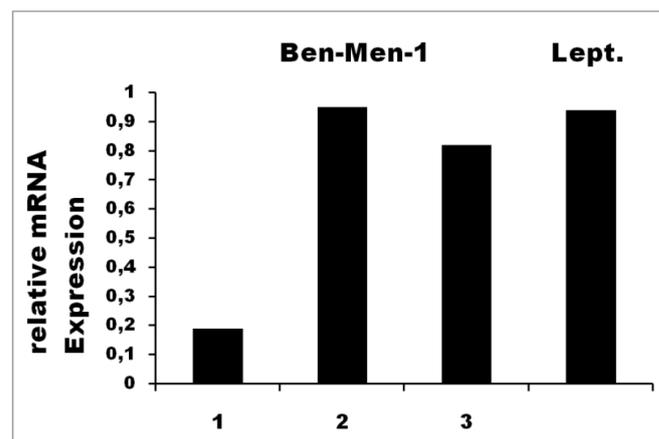


Abb. 21: *TIMP3* Expressionsanstieg in der Ben-Men-1 Zelllinie nach der Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A. 1, Zellen angezchtet unter Standardbedingungen; 2, Zellen behandelt mit 500 nM 5-Aza-dC über 48h + 1 μM TSA über 24h; 3, Zellen behandelt mit 1 μM 5-Aza-dC über 72h + 1 μM TSA über 24h; *Lept.*, mRNA Expression im nicht-neoplastischen leptomenigealen Gewebe.

6.4 Methylierungsanalyse von *TIMP3* in Meningeomen

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus von *TIMP3* wurde die Tumor-DNA von 50 Meningeomen mit Natriumbisulfit behandelt und anschließend zwei Regionen der *TIMP3* 5'-CpG-Insel (Abb. 22) entweder mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) untersucht oder amplifiziert und direkt sequenziert.

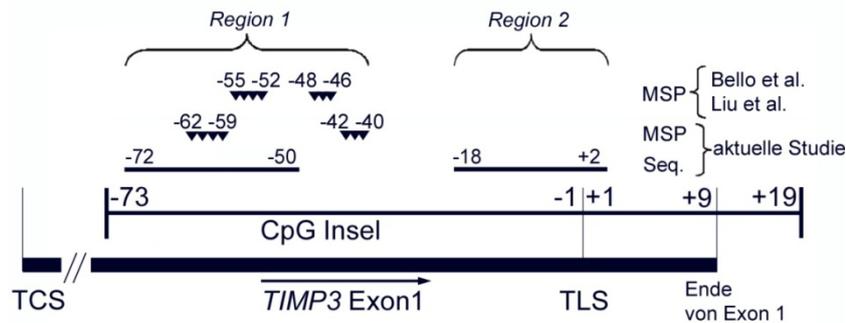


Abb. 22: Übersicht über die *TIMP3* 5'-CpG-Insel. *TIMP3* Methylierung wurde in zwei verschiedenen Regionen untersucht. Region 1 wurde mittels Methylierung-spezifischer PCR, MSP (CpG-Stellen von -42 bis -40 und -62 bis -59 relativ zum *TIMP3* Translationsstartpunkt, TLS) und direkter Bisulfit-Sequenzierung, Seq. (CpG-Stellen von -72 bis -50) untersucht. Diese Region überlappt das Fragment der *TIMP3* 5'-CpG-Insel, welches in zwei vorangegangenen Studien (Bello/Liu) durch Methylierung-spezifische PCR mit unterschiedlichen Ergebnissen (CpG-Stellen von -55 bis -46) analysiert wurde. Ein weiterer Bereich der *TIMP3* 5'-CpG-Insel weiter distal der *TIMP3* 5'-CpG-Insel (Region 2, CpG-Seite -18 bis 2) wurde zusätzlich durch direkte Natriumbisulfit-Sequenzierung untersucht. TCS; Transkriptionsstart.

```

5' - GTAGAGAtAttAGTGGttAGGTGGGCGTGGGGtAGGGCGtAGACGAGAAGGGGtACGAGGGtT
-69 -68 -67 -66 -65 -64-63 -62 -61 -60 -59
tCGtTtCGAGGAtttAGCGGtAAGtAtCGGTtCGGGCGCGttttAGtttAttAtTCGCGTGTttACGGCGGtATTA
-58 -57 -56 -55 -54 -53 -52
TTttTATAAGGAttTGAAcGAttcGGGGCGGtttCGtttCGTTAtttTTGttttCGGtttCGttttTTTTTGGAGG
-51 -50 -49 -48 -47 -46
GtCGATGAGGTAATGCGGtTtTGtATTGGTtTGAGGGGGCGGGtttAAAtAGttCGAGGCGGGGtTtCGG
-45 -44 -43 -42 -41 -40 -39 -38 -37
GGGtttAGCGtTATATtAtTCGtCGtttAGGtAGCGGCGtAGAGCGGGtAGtAGGtAGGCGGCGGGCGtTt
-36 -35 -34 -33 -32 -31 -30 -29-28
AGACCGGtTTtTtTtTtTTGtTtTtAGtTtTgTtTTCGtCGGGAGGtCGttCGtCGAGTtTGCGttAGCGtC
-27 -26 -25 -24 -23 -22 -21-20 -19 -18
GAGGtAGtTcGtTGCGttttAtttCGTttCGtCGGtAtTCGAGGGtAGCGCGtCGGAGGtAAGGTTGtttC
-17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
GtACCGtTtCGGCGGGCGAGCGAGtTCGGGtTGtAGtAGtttCGtCGGCGCGGtACCGtAAtTTGGAG
-5 -4 -3 -2 -1 1 2
AGGCGAGtAGtAGtttCGGtAGCGGCGGtAGtAGCGGtAATGAtttTTGGtTCGGGtTtATCGTGTtTGGGt
3 4 5 6 7
AGtTGGAGtTGGGGGAfTGGGGCGtCGAGGCGTgTAtATGtTCGttAGttAttttAGGACCGttTtTGtAAfTt
8 9 10 11 12 13 14
CGAtATCGGTAAGCGtTtTGGTgTtCGtCGAGttttACGtTGtAGttAGGAfTGtAGCGtTGfTTAGGGAGGt
15 16 17 18
AGGGCGAGttttAtTtTTTTtTtGttttAGGAGAGGGGtAGA CGGGTTGGGGCGGAGTGGAGAAAtTCGA
19
TGTtTTGGGCGGGGCGC

```

- 3'

Abb. 23: DNA-Sequenz der *TIMP3* CpG-Insel nach Bisulfitkonversion. Die CpGs sind von -73 bis 19 durchnummeriert. *Unterstrichen*, von Bello *et al.* (2004) (7) und Liu *et al.* (2005) (70) mittels MSP untersuchte Region 1; *t*, Cytosine, die durch Bisulfitbehandlung in Thyminen umgewandelt wurden. *Blaue Rechtecke*, MSP-spezifische Primer. *Pinke Rechtecke*, Sequenzierungsprimer, welche die mittels MSP untersuchte Region überlappen. *Grüne Rechtecke*, Sequenzierungsprimer für die zweite untersuchte Region der CpG-Insel. *Rot*, Translationsstartpunkt.

6.4.1 Methylierungsanalyse der *TIMP3*-CpG-Insel mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP)

Zuerst wurde die *TIMP3* 5'-CpG-Insel-Methylierung in einer Region untersucht, die in den beiden vorangegangenen Studien kontroverse Ergebnisse ergab (Region 1, Abb. 22 und 23). Die Primersequenzen für die MSP-Analyse von *TIMP3* wurden so ausgewählt, dass das zu amplifizierende Fragment mit dem Fragment aus den Studien von Bello *et al.* (7) und Liu *et al.* (70) überlappt. Es wurden Primer, die nach Natriumbisulfitbehandlung der Tumor DNA spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, in getrennten PCR Ansätzen verwendet. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrollen wurden *in vitro* methylierte Leukozyten-DNA und unbehandelte Leukozyten-DNA mitgeführt. Insgesamt wurden durch die MSP-Primer 7 CpG-Dinukleotide auf Methylierung hin untersucht.

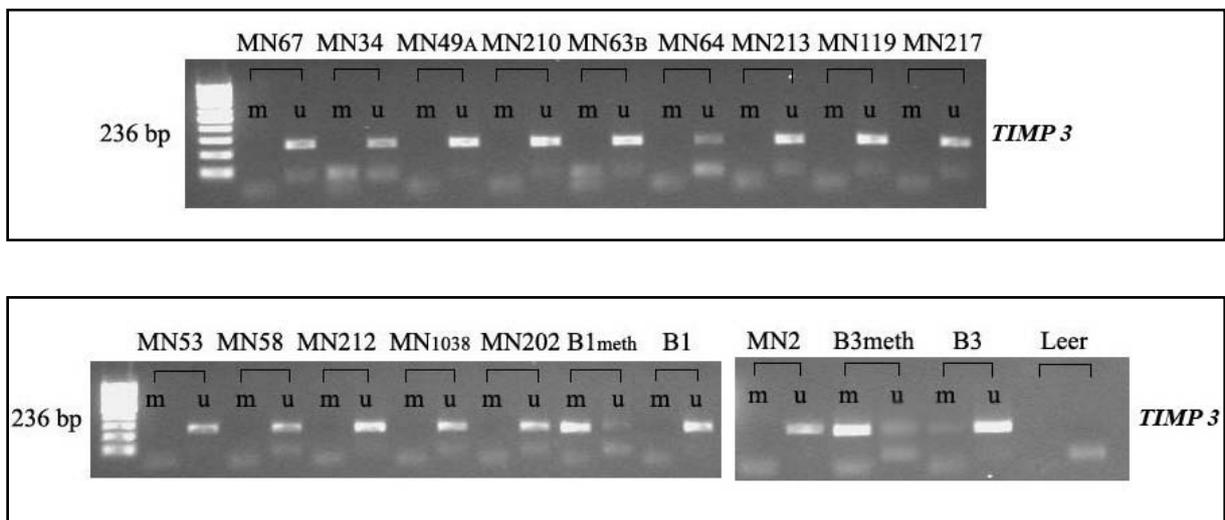


Abb. 24: MSP-Analyse der *TIMP3* CpG-Insel am Beispiel einiger Meningeomfälle. Dargestellt sind Ethidiumbromid-gefärbte PCR-Produkte nach Auftrennung in einem Agarosegel. *B*, MSP-Produkte aus natriumbisulfitbehandelter Leukozyten-DNA; *B_{meth}*, mit *SSSI* Methyltransferase vorbehandelte Leukozyten-DNA; *Leer*, Leerkontrolle; *m*, PCR-Produkt bei Verwendung methylierungsspezifischer Primer; *u*, PCR-Produkt bei Verwendung von MSP-Primern für unmethylierte DNA.

MN 10	I	LOH	2	1,75	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	0
MN1005	I	RET	1	1,84	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na
MN1038	I	LOH	4	0,84	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	0
MN 19	I	LOH	9	1,25	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na
MN 2	I	RET	na	na	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	0
MN 30	I	RET	9	1,54	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN 342	I	RET	4	na	-	0	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na
MN 37	I	RET	3	0,92	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN 38	I	RET	3	7,56	-	0	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN 51	I	RET	2	na	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	0
MN 53	I	na	2	na	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	0
MN 684	I	RET	9	4,28	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN 7	I	LOH	3	1,18	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na
MN 876	I	RET	9	13,25	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN 877	I	LOH	9	na	-	0	na	na	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na
MN 918	I	na	na	3,79	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN 993	I	RET	9	2,33	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lept. meth	Kontr.	na	na	na	+	60	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Blut meth	Kontr.	na	na	na	+	60	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Lept.	Kontr.	na	na	na	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Blut	Kontr.	na	na	na	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legende: Die Ergebnisse sind in Übersicht mit der Protein- und mRNA-Expression sowie dem Allel-Status auf 22q in allen untersuchten Meningeomen dargestellt. Die CpGs sind von -18 bis +2 durchnummeriert. Die Ziffern in Kästchen stellen die Methylierungsstärke der CpG-Dinukleotide dar: 0, vollständig unmethyliert; 1, ein schwaches Methylierungssignal ist detektierbar; 2, methyliertes Signal ungefähr gleich stark wie das unmethylierte Signal; 3, methyliertes Signal deutlich stärker als das unmethylierte Signal. Die Methylierungswerte der einzelnen CpG-Dinukleotide wurden zu einem Methylierungsscore zusammengefasst. *Lept.*, nicht-neoplastisches leptomenigeales Gewebe; *Blut*: Leukozyten-DNA; *meth*: *in vitro* mit SSSI-Methylase vorbehandelte DNA; *na*, nicht analysiert. 8 von 12 anaplastischen Meningeomen (67%) zeigten die höchste Frequenz der *TIMP3* Hypermethylierung (Methylierung Score ≥ 42), meistens assoziiert mit transkriptioneller Herunterregulation. Abgesehen von einem einzigen anaplastischen Meningeom (MN119), wurde *TIMP3* Hypermethylierung ausschließlich bei Tumoren mit Allelverlust auf 22q beobachtet.

Die Tumore können in zwei deutlich verschiedene Gruppen mit entweder starker Methylierung in praktisch der gesamten Region (Methylierungsscore ≥ 42) oder niedriger bzw. fehlender Methylierung (Methylierungsscore ≤ 4) (Tab. 13) getrennt werden. Die *TIMP3* 5'-CpG-Insel-Methylierung war am häufigsten in anaplastischen Meningeomen (8 von 12 Fällen, 67%), während atypische (2 von 11 Fällen, 18%) und benigne Meningeome (4 von 27 Fällen 15%) deutlich geringere Häufigkeit der *TIMP3* Methylierung aufwiesen (*Fisher's exact Test*; MN III vs MN II, $p = 0,0361$; MN III vs MN I, $p = 0,0024$; Abb. 25). Die Meningeome zeigten ein sehr homogenes Methylierungsmuster: alle 14 *TIMP3* hypermethylierten Tumore waren an allen 20 CpG-Stellen methyliert. In 4 (MN67, MN14, MN16 und MN27) dieser 14 Tumoren waren wenige CpGs nur partiell methyliert (Tab. 13). Die DNA-Proben aus normalem leptomenigealem Gewebe zeigten keine *TIMP3* Hypermethylierung während die *in vitro* mit SSSI-Methylase behandelten DNA-Proben eine deutliche Methylierung an allen

20 untersuchten CpGs aufwiesen (Tab. 13, Abb. 25) und als positive Kontrollen verwendet wurden.

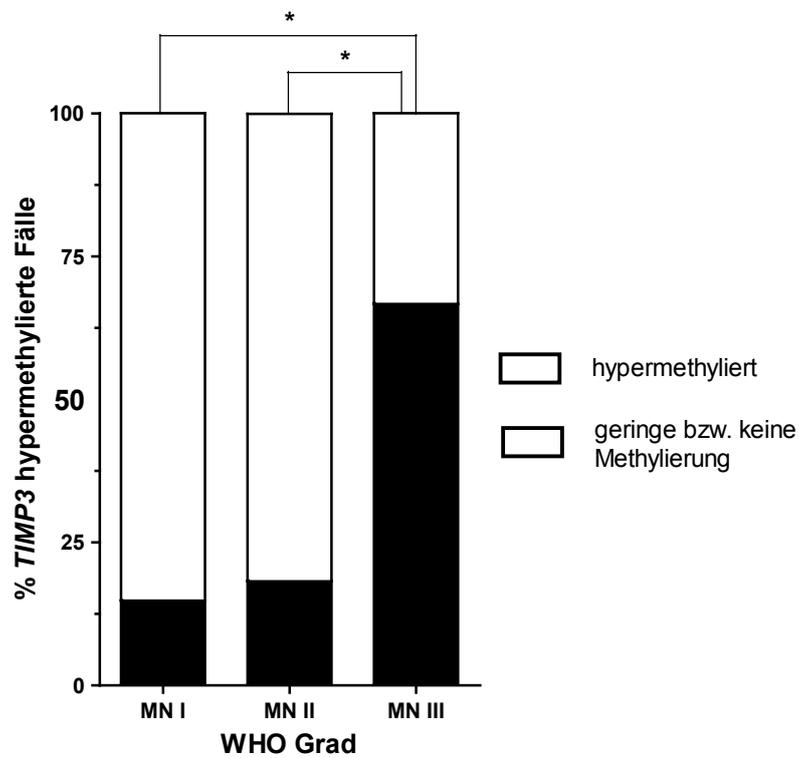


Abb. 25: Häufigkeiten der *TIMP3* Hypermethylierung in Meningeomen unterschiedlicher WHO-Grade. *TIMP3* 5'-CpG-Insel-Methylierung findet deutlich häufiger in anaplastischen (8 von 12 Fällen, 67%) als in atypischen (2 von 11, 18%) und benignen Meningeomen (4 von 27, 15%) statt.

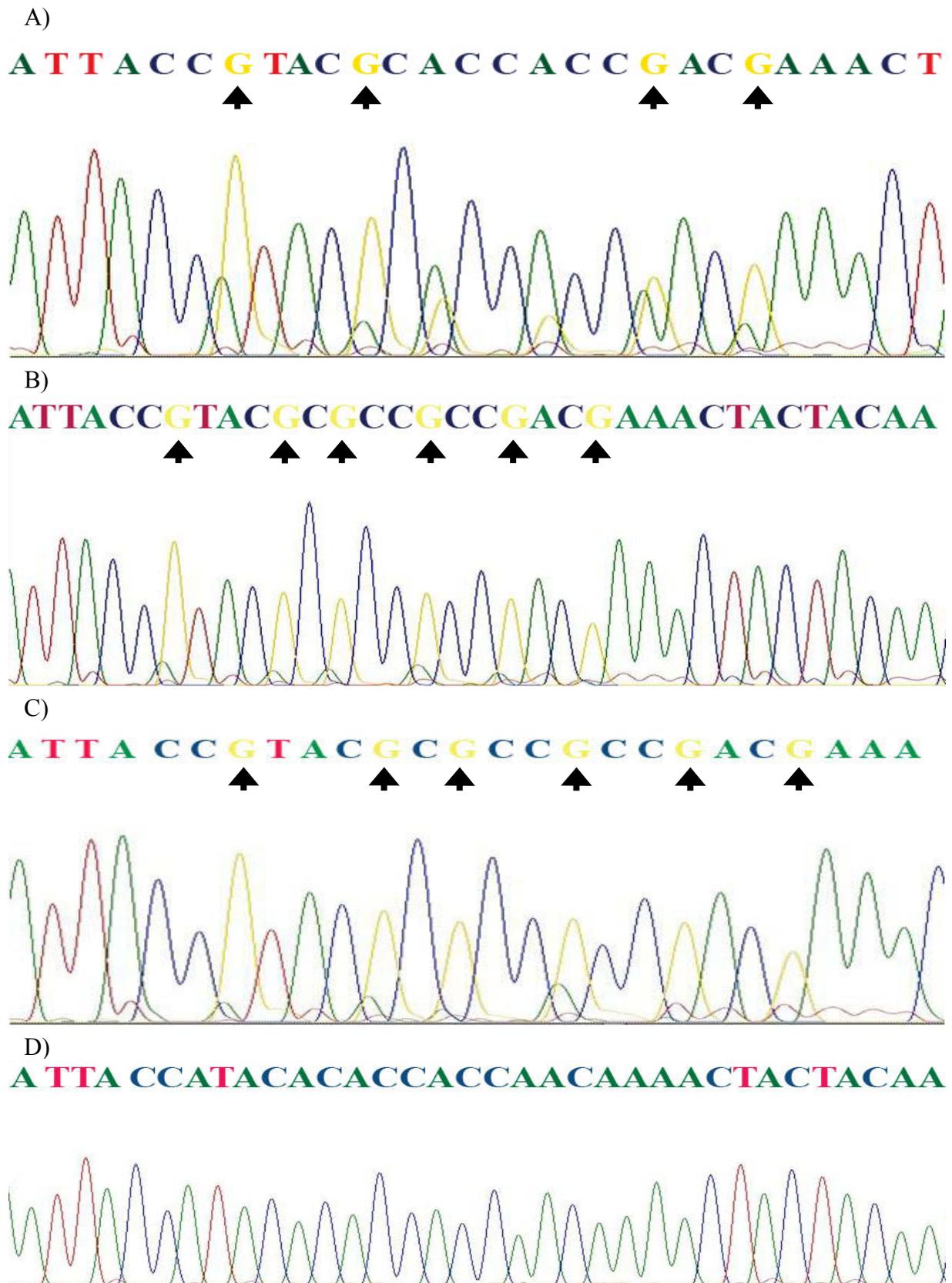


Abb. 26: Methylierungsmuster der *TIMP3* CpG-Insel in ausgewählten Meningeomen. Dargestellt sind die Elektropherogramme in einem Fragment der Region 2 (CG Stellen -11 bis -6) nach der Sequenzierung des Gegenstranges. Die Pfeilspitzen zeigen auf methylierte Cytosinreste in CpG-Dinukleotiden. A), partielles Methylierungsmuster im Tumor MN67. B) und C), die Tumoren MN210 und MN63B zeigen fast vollständig methylierte CpGs in der abgebildeten Sequenz. D), unmethylierte Sequenz im nicht-neoplastischen leptomenigealen Gewebe.

eine normale Expression bzw. einen Expressionsverlust um weniger als 50% im Vergleich zum Kontrollgewebe (MN67, MN113 und MN11).

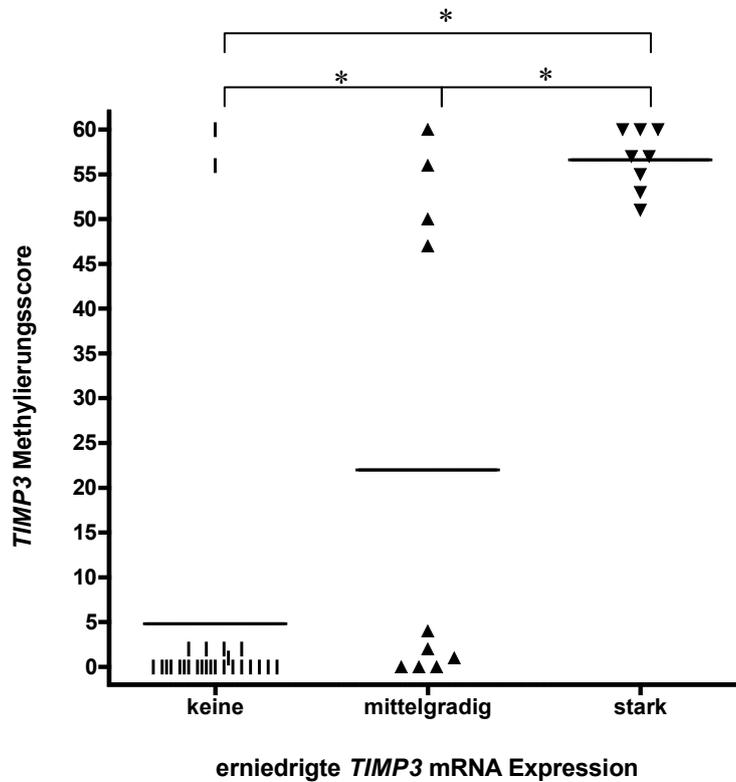


Abb. 28: Korrelation der *TIMP3* Hypermethylierung mit der mRNA Expression. Die Meningeome werden entsprechend ihrer *TIMP3* Expression in folgende Gruppen eingeteilt: keine erniedrigte Expression (Verhältnis Expression Tumor zu Kontrollgewebe > 0,5); mittelgradig erniedrigte Expression (Verhältnis > 0,1 - ≤ 0,5); stark erniedrigte Expression (Verhältnis ≤ 0,1).

Beim Vergleich der stark herunterregulierten mit oder ohne den mittelgradig herunterregulierten Fällen gegen die normal/überexprimierte Subgruppe zeigte sich ein starker Methylierungsunterschied mit einem Signifikanzniveau $p < 0,0001$ (*Student's T-test*, zweiseitig). Auch der Unterschied zwischen der normal/überexprimierten Subgruppe und den mittelgradig herunterregulierten Fällen war mit $p = 0,0229$ signifikant. Ein deutlicher signifikanter Methylierungsunterschied bestand zwischen den mittelgradig herunterregulierten Fällen versus stark unterexprimierten Fällen ($p = 0,0026$). Hier zeigte sich insgesamt eine deutliche Korrelation der *TIMP3* Expression mit der Hypermethylierung. In stark herunterregulierten Meningeomen waren die CpG-Stellen methyliert. Einige Fälle in der mittelgradig unterexprimierten Subgruppe wiesen jedoch keine Methylierung auf, z.B. MN62. Normal/überexprimierte Meningeome zeigten keine Methylierung, bis auf die Fälle MN11 und MN113.

6.5 Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse auf 22q und Korrelation mit der *TIMP3* Hypermethylierung und mRNA Expression

TIMP3 befindet sich in der Nähe des *NF2* Tumorsuppressorgens auf Chromosom 22q12.3, in der Region mit häufigen Allelverlusten in Meningeomen. Mittels einer Mikrosatellitenanalyse sollte in 39 Fällen der Tumorserie (25 MN I, 10 MN II, 4 MN III) bestimmt werden, ob um den *TIMP3*-Genlocus (22q12.3) hemizygoter Allelverluste vorliegen. Von 27 Meningeomfällen lagen bereits Untersuchungsdaten aus LOH- bzw. CGH (*comparative genomic hybridization*) - Analysen aus einer vorherigen Studie (131) vor, die folgende Mikrosatellitenmarker verwendete: D22S430 (22q12.2), D22S304 (22q12.3) und D22S929 (22q12.2). Mit diesen Mikrosatellitenmarkern wurde eine LOH-Analyse in weiteren 12 Meningeomen dieser Serie durchgeführt, von denen die entsprechende konstitutive DNA zur Verfügung stand.

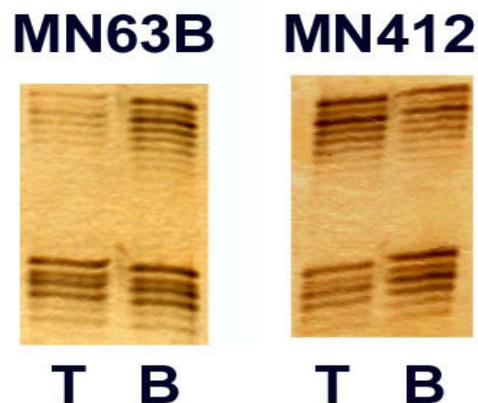


Abb. 29: Mikrosatellitenanalyse ausgewählter Meningeome: MN63B zeigte einen Allelverlust in der Tumor-DNA im Marker D22S304 im Vergleich zur Blut-DNA; MN412 dagegen zeigte eine Retention beider Allele des Markers D22S304; *T*, Tumor-DNA; *B*, Blut-DNA.

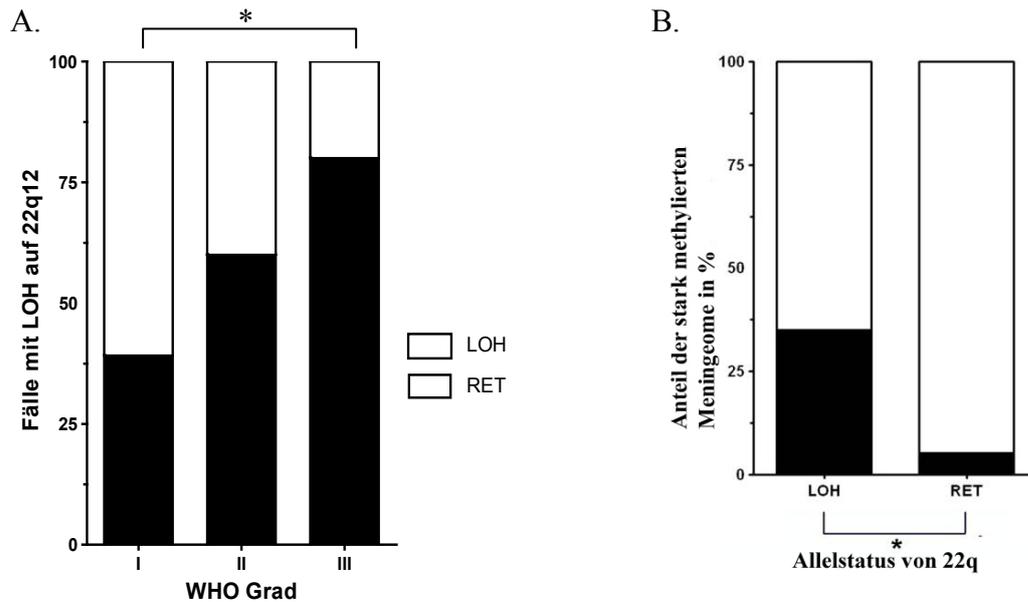


Abb. 30: A, Anteile der Meningeome unterschiedlicher WHO-Grade mit LOH auf 22q12 (%). B, *TIMP3* 5'-CpG-Insel Methylierungsfrequenz in Abhängigkeit vom 22q Allelstatus. *TIMP3* Methylierung ist signifikant häufiger in Meningeomen mit Allelverlust auf 22q als in Tumoren mit Retention dieser chromosomalen Region. *TIMP3* Methylierung wurde, abgesehen von einem einzigen Fall (MN119), ausschliesslich in Meningeomen mit 22q Verlust beobachtet.

Nach der Auswertung aller informativen Mikrosatelliten-Loci zeigte sich ein LOH auf mindestens einem Locus auf 22q12 in 20 der 39 untersuchten Meningeomen (51%), davon in 11 von 25 (44 %) benignen, 6 von 10 (60 %) atypischen und 3 von 4 (75 %) anaplastischen Meningeomen (Abb. 30A). Der *Student's T-test* erbrachte einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit eines Allelverlustes auf 22q12 zwischen den benignen und anaplastischen Meningeomen ($p = 0,01$).

In den Meningeomen mit Allelverlust auf 22q war die *TIMP3* Expression signifikant niedriger ($p = 0,034$) als in den Tumoren mit einer Retention beider Allele.

In den Fällen MN20, MN40 und MN56B erklärt der Allelverlust nur unzureichend die erniedrigte Expression von *TIMP3*, da der Expressionsverlust über 50% im Vergleich zur Expression des Gens im Kontrollgewebe liegt.

TIMP3 5'-CpG-Insel-Methylierung war signifikant häufiger in Meningeomen mit Allelverlust auf 22q (7 von 20 Fällen, 35%) als in Tumoren mit Retention in dieser chromosomalen Region (1 von 19 Fällen, 5%, Fisher's Exact-Test, $p = 0,0436$; Abb. 30B). So wurde *TIMP3* Methylierung, abgesehen von einem einzigen Fall (MN119), ausschliesslich in Meningeomen mit 22q Verlust beobachtet. Umgekehrt war in etwa einem Drittel der Tumoren mit 22q-Verlust eine *TIMP3* Methylierung nachweisbar. Alle Meningeomfälle (außer MN119) mit einer Hypermethylierung von *TIMP3* wiesen einen Allelverlust auf 22q auf, dabei waren

Meningeome mit LOH 22q signifikant stärker methyliert als solche mit der Retention beider Allele (*Student's T-test*, $p = 0,016$).

Tab. 14: Zusammenfassung von epigenetischen und genetischen Veränderungen von *TIMP3* in Meningeomen.

	WHO-Grad	Anzahl der Fälle	LOH auf 22q	<i>TIMP3</i> – Meth.	Verlust der <i>TIMP3</i> - Expression
benigne Meningeome	I	27	11/25 (44%)	4/27 (15%)	3/21 (14%)
atypische Meningeome	II	11	6/10 (60%)	2/11 (18%)	7/11 (64%)
anaplastische Meningeome	III	12	3/4 (75%)	8/12 (67%)	6/11 (55%)

6.6 Untersuchung der *Timp3* Proteinexpression mittels Immunhistochemie

Als nächstes wurde untersucht, ob der Rückgang der *TIMP3* mRNA Expression in höhergradigen Meningeomen auch auf der Protein-Ebene nachweisbar war. Insgesamt wurden Schnittpräparate von 45 Meningeomen der Serie immunhistochemisch auf Expression des *Timp3*-Proteins hin analysiert. Als positive Kontrolle dienten Schnittpräparate von Pankreas, Darm und einem Kolonkarzinom. Der als Positivkontrolle in allen Versuchsdurchgängen mitgeführte Tumor MN213 zeigte immer eine deutliche positive Immunreaktion in einem Teil der Tumorzellen (>50%). Als Negativkontrolle diente der Tumor MN47, in dem keine immunpositiven Tumorzellen nachzuweisen waren. Die Ergebnisse der Immunhistochemie an der gesamten Tumorserie sind in der Tabelle 13 zusammengefasst. Abbildung 31 zeigt repräsentative Beispiele von Immunfärbung.

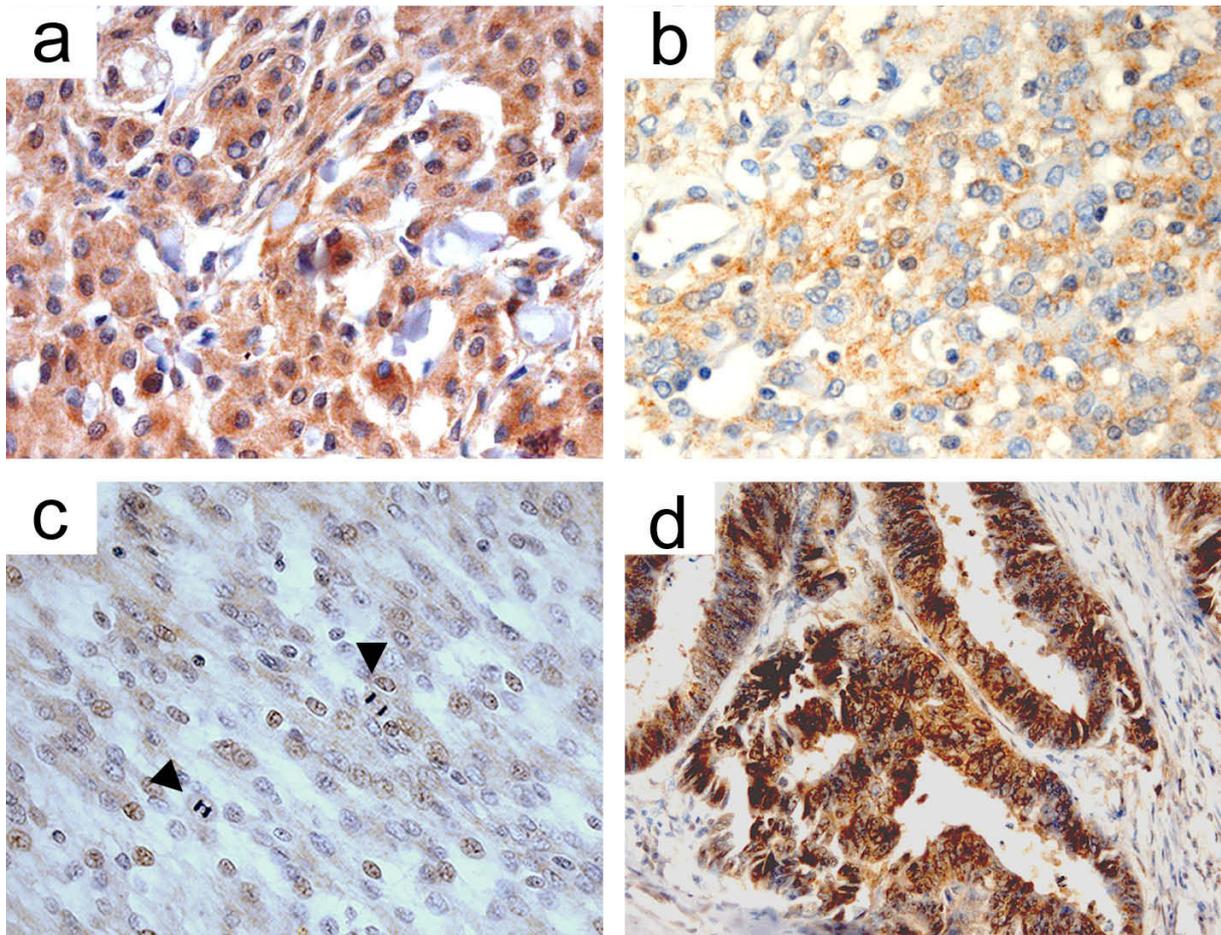


Abb. 31: Beispiele der immunhistochemischen Ergebnisse zur Expression von Timp3. (a) Beispiel für ein benignes Meningeom (MN30, WHO-Grad I) mit starker und diffuser Immunreaktivität für Timp3, übereinstimmend mit starker mRNA Expression. Timp3 Proteinexpression sinkt deutlich mit maligner Progression. Gemässigte Immunreaktivität in atypischen Meningeomen (b, MN14, WHO-Grad II) und niedrigste mittlere Immunreaktivität in anaplastischen Meningeomen (c, MN210, WHO-Grad III). MN14 und MN210 zeigten begleitend *TIMP3* Hypermethylierung. Vergrößerung aller Meningeombilder, x400. Pfeilspitzen, Mitosen. (d) Kolorektales Karzinom diente als positive Kontrolle für Timp3 Immunfärbung. Vergrößerung, x200. Alle gezeigten immunhistochemischen Präparate wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

Benigne Meningeome zeigten in der Auswertung die höchsten Medianwerte für Immunfärbung (Medianer Index, MI: 4; Interquartilbereich, IQR: 3). Mittlere Werte für Timp3 Immunreaktivität wurden in atypischen Meningeomen detektiert (MI: 3; IQR: 2), während anaplastische Meningeome in ihrer Mehrheit nur schwache Timp3 Immunreaktivität bei einem Teil der Tumorzellen zeigten (MI: 2; IQR: 2). In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten war Timp3 Proteinexpression in höhergradigen Tumoren (atypische und anaplastische Meningeome) deutlich niedriger im Vergleich zu benignen Meningeomen (Mann-Whitney U-Test; MN III und II vs MN I; $p = 0,02$).

7 Analyse des Tumorsuppressorgen-Kandidaten *CDH1* in Meningeomen

7.1 Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von *CDH1*

CDH1 ist ein weiteres Meningeom – assoziiertes Tumorsuppressor-Kandidatengen. Sein Genprodukt spielt eine wichtige Rolle für die Zelladhäsion und die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität.

In dieser Arbeit wurde eine *CDH1* mRNA-Expressionsanalyse von 44 Meningeomen (22 benigne, 11 atypische und 11 anaplastische Meningeome) mittels *real-time* RT-PCR-Analyse durchgeführt (Tab. 15). Als Kontrollgewebe diente normales leptomeningeeales Gewebe.

Tabelle 15: Ergebnisse der mRNA - Expressionsanalyse von *CDH1* in Meningeomen.

WHO-Grad	Fall	<i>CDH1</i> mRNA Expression	WHO-Grad	Fall	<i>CDH1</i> mRNA Expression
III	MN67	3,13	I	MN877	2,37
III	MN49A	0,07	I	MN7	0,51
III	MN210	7,09	I	MN10	1,61
III	MN63B	6,08	I	MN11	2,53
III	MN64	0,02	I	MN12	1,65
III	MN213	2,41	I	MN17	2,02
III	MN119	0,31	I	MN19	1,79
III	MN217	13,19	I	MN993	1,38
III	MN113	3,24	I	MN27	0,86
III	MN212	1,53	I	MN876	4,35
III	MN1038	2,15	I	MN30	2,06
II	MN4	1,16	I	MN684	1,38
II	MN14	7,72	I	MN918	2,31
II	MN16	1,69	I	MN37	0,62
II	MN20	4	I	MN38	3,06
II	MN22	2,45	I	MN41	0,64
II	MN40	8,85	I	MN411	3,86
II	MN42	1,07	I	MN1004	1,06
II	MN47	1,46	I	MN1005	4
II	MN61	0,79	I	MN412	1,56
II	MN62	5,58	I	MN58	1,06
II	MN56B	2	I	MN202	2,07

Legende: Grau markierte Werte kennzeichnen mRNA-Expressionswerte < 0,5 relativ zum nicht-neoplastischen Leptomenix). *MN*, Meningeom.

In nur 3 von 11 MN III (27%) konnte ein um mehr als die Hälfte verringertes Expressionsniveau von *CDH1* im Vergleich zur Expression im normalen leptomeningeealen Gewebe nachgewiesen werden. Es fanden sich keine *CDH1*-Expressionsverluste in den benignen und atypischen Meningeomen. Außerdem konnten keine signifikanten

Expressionsunterschiede zwischen den Meningeomen unterschiedlicher WHO-Grade nachgewiesen werden.

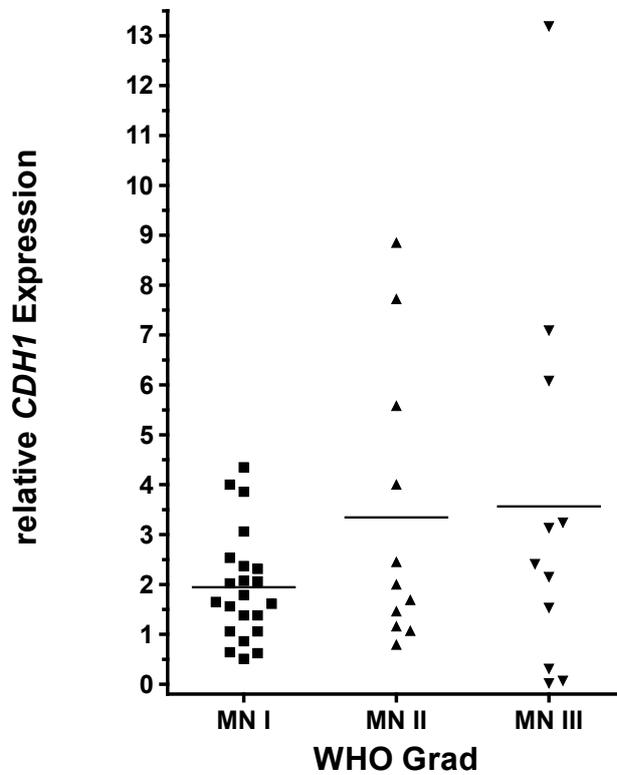


Abb. 32: CDH1 mRNA Expressionslevel in Meningeomen. *Ordinate*, relative Expressionslevel bezogen auf eine Kontrolle, normales leptomeningeeales Gewebe (NB). *Abszisse*, WHO-Grad. Die Querbalken zeigen die jeweiligen Mittelwerte der Meningeom-Subgruppen an.

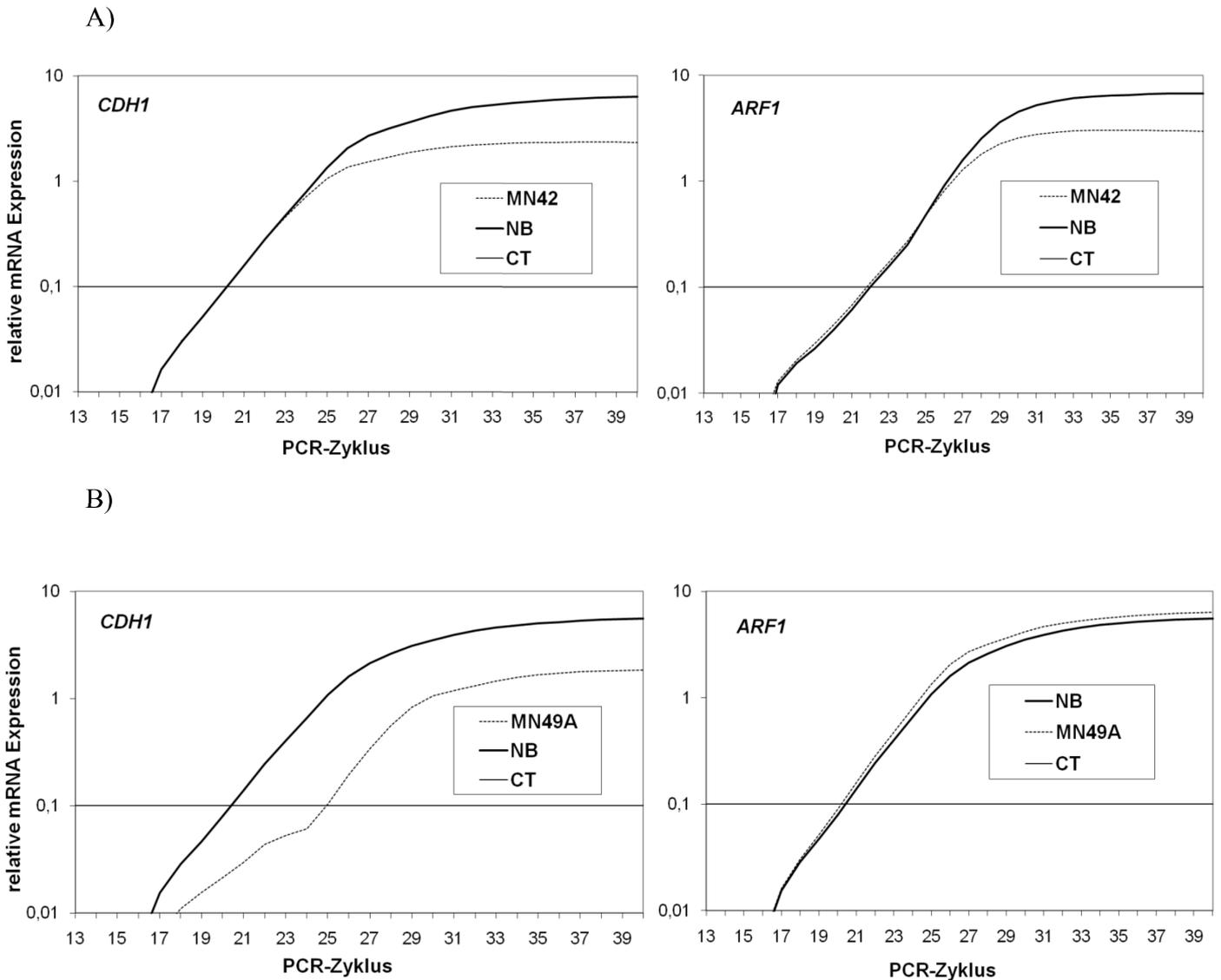


Abb. 33: Beispiele der Real-Time RT-PCR Analyse der *CDH1* mRNA Expression in einem benignen Meningeom (MN42) (A) und einem anaplastischen Meningeom (MN49A) (B) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe (NB). Abszisse, Nummer des PCR-Zyklus; Ordinate, relative Menge an PCR-Produkt; (A), normale *CDH1* mRNA Expression in Tumor MN42. Bei MN42 und NB erreichen die Kurven sowohl der Referenz mRNA (*ARF1*) als auch die Kurve der *CDH1* mRNA den C_t Schwellenwert bei nahezu gleichen Zyklenzahlen. (B), reduzierte *CDH1* mRNA Expression in MN49A. Während bei MN49A und NB die Kurven der Referenz mRNA (*ARF1*) den C_t Schwellenwert bei nahezu gleichen Zyklenzahlen erreichen, ist die Kurve der *CDH1* mRNA bei MN49A im Vergleich zu NB deutlich nach rechts verschoben.

7.2 Ergebnisse der mRNA-Expression von *CDH1* in unbehandelten und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-behandelten Meningeomzellen mittels RT-PCR

Um eine mögliche Beteiligung der Promotorhypermethylierung an der Herunterregulierung von *CDH1* auf der mRNA-Ebene zu überprüfen, wurde die Meningeomzelllinie Ben-Men-1

mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A unter 2 verschiedenen Bedingungen (siehe Kapitel 2) behandelt, die RNA extrahiert und anschließend durch eine RT-PCR auf Änderungen der mRNA-Expression von *CDHI* hin untersucht.

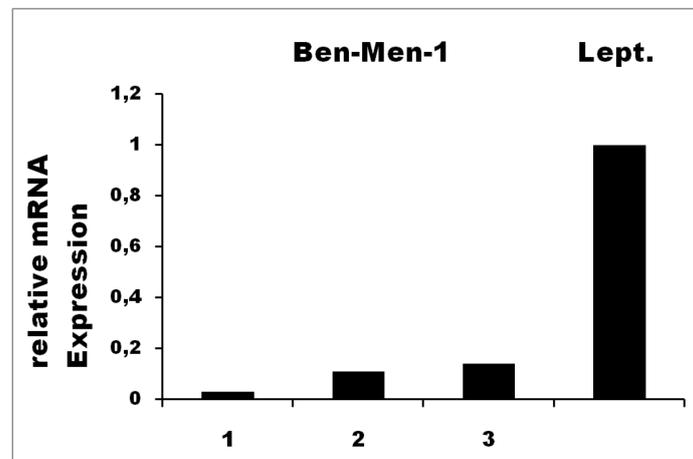


Abb. 34: *CDHI* Expressionsanstieg in der Ben-Men-1 Zelllinie nach der Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A. 1, Zellen angezchtet unter Standardbedingungen; 2, Zellen behandelt mit 500 nM 5-Aza-dC über 48h + 1 μM TSA über 24h; 3, Zellen behandelt mit 1 μM 5-Aza-dC über 72h + 1 μM TSA über 24h; *Lept.*, mRNA Expression im nicht-neoplastischen leptomeningealen Gewebe.

Es zeigte sich ein leichter Expressionsanstieg von *CDHI* in den mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A behandelten Ben-Men-1 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 34). Dieser Expressionsanstieg war jedoch schwach im Vergleich zur mRNA Expression von Leptomeninx. Weil es ein Hinweis auf eine mögliche Rolle einer Promotorhypermethylierung als Ursache für die erniedrigte *CDHI* Expression in den Meningeomen sein könnte, wurde nachfolgend die 5'-CpG-reiche Region von *CDHI* auf methylierte Cytosine hin untersucht.

7.3 Methylierungsanalyse der *CDHI*-Promotorregion mittels direkter Sequenzierung Natriumbisulfit-behandelter DNA

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus wurde die DNA von 50 Meningeomen mit Natriumbisulfit behandelt und anschließend die zu untersuchende CpG-Insel amplifiziert und sequenziert.

Die folgende Abbildung (Abb. 35) zeigt die CpG-Insel von *CDHI*, die mittels Sequenzierung Natriumbisulfit-behandelter DNA auf methylierte Cytosine in CpG-Dinukleotiden hin analysiert wurde.

Tab. 16: *CDH1* mRNA-Expression, Proteinexpression von E-Cadherin und β -Catenin in Meningeomen.

WHO-Grad	Fall-Nr.	<i>CDH1</i> mRNA Expression	E-Cadherin Protein Expression	β -Catenin Protein Expression	WHO-Grad	Fall-Nr.	<i>CDH1</i> mRNA Expression	E-Cadherin Protein Expression	β -Catenin Protein Expression
III	MN 67	3,13	4	9	I	MN 877	2,37	1	12
III	MN 34	na	0	8 (n)	I	MN 7	0,51	3	9
III	NM 49A	0,07	1	9	I	MN 342	na	2	4
III	MN 210	7,09	3	12	I	MN 10	1,61	4	4 (n)
III	MN 63B	6,08	4	9	I	MN 11	2,53	6	9
III	MN 64	0,02	na	na	I	MN 12	1,65	9	12
III	MN 213	2,42	4	9	I	MN 17	2,02	8	12
III	MN 119	0,31	2	12	I	MN 19	1,79	9	12
III	MN 217	13,19	4	9	I	MN 993	1,38	0	6
III	MN 212	3,24	9	6	I	MN 27	0,86	6	12
III	MN 202	1,53	4	9	I	MN 876	4,35	6	12
III	MN 113	2,15	na	na	I	MN 30	2,06	1	6
II	MN 4	1,16	6	6	I	MN 684	1,38	2	6
II	MN 14	7,72	4	12	I	MN 918	2,31	9	12
II	MN 16	1,69	2	6	I	MN 37	0,62	6	6
II	MN 20	4	9	9	I	MN 38	3,06	12	12
II	MN 22	2,45	1	8	I	MN 41	0,64	1	6
II	MN 40	8,85	2	6	I	MN 411	3,86	9	12
II	MN 42	1,07	3	6	I	MN1004	1,06	2	8
II	MN 47	1,46	4	12	I	MN1005	4	9	12
II	MN 61	0,79	4	9	I	MN 412	1,56	2	9
II	MN 62	5,58	4	6	I	MN 51	na	3	9
II	MN 56B	2	2	12	I	MN 53	na	4	12
I	MN 1	na	6	9	I	MN 58	1,06	6	6
I	MN 2	na	0	9	I	MN1038	2,07	4	9

Legende: Die Proteinexpression wurde anhand eines numerischen Scoring-Systems bewertet, basierend auf dem Prozentsatz der positiv gefärbten Tumorzellen multipliziert mit der Färbungsintensität, der Score-Bereich lag zwischen 0 und 12. Der Anteil der immunpositiven Zellen wurde wie folgt bewertet: 0 (keine oder nur minimale Reaktivität), 1 (< 10%), 2 (10-50%), 3 (50-90%), 4 (> 90%). Die Färbungsintensität wurde als 0 (negativ), 1 (schwach), 2 (mittel) oder 3 (stark) eingestuft; (n), positive perinukleäre Färbung.

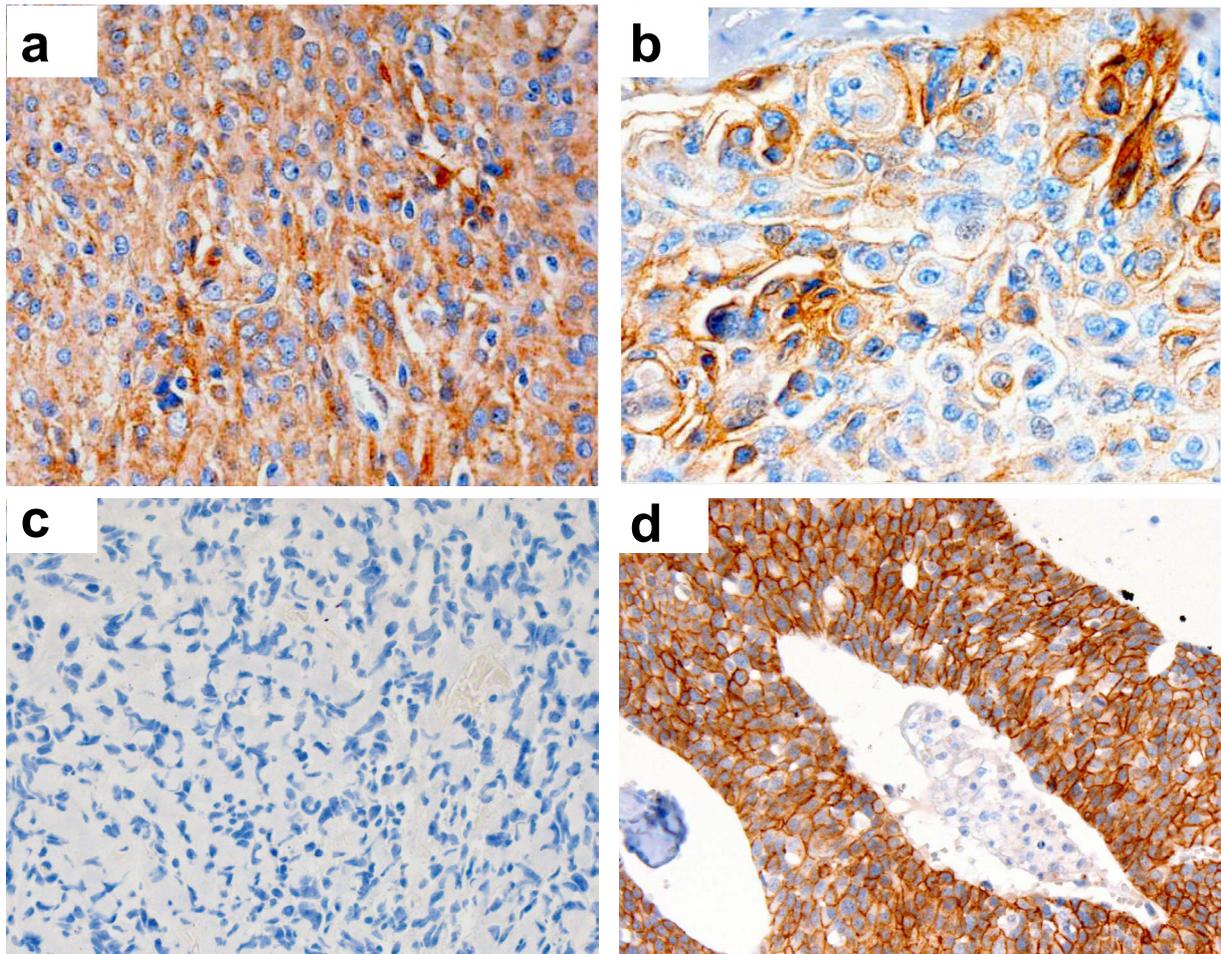


Abb. 36: Beispiele der immunhistochemischen Ergebnisse zur Expression von Cdh1. Cdh1 Proteinexpression verhält sich unabhängig von maligner Progression. (a) Beispiel für ein anaplastisches Meningeom (MN212, WHO-Grad III, Vergrößerung x400) mit starker und diffuser Immunreaktivität für Cdh1, übereinstimmend mit starker mRNA Expression. Gemässigte Immunreaktivität im atypischen Meningeom (b, MN62, WHO-Grad II, Vergrößerung x400) und fehlende Immunreaktivität im benignen Meningeom (c, MN2, WHO-Grad I, Vergrößerung x200). (d) Mamma-Karzinom diente als positive Kontrolle für E-Cadherin Immunfärbung. Alle gezeigten immunhistochemischen Präparate wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

Meningeome zeigten in der Auswertung unabhängig vom WHO-Grad ähnliche Medianwerte für die Cdh1-Expression: benigne Meningeome (Medianer Index, MI: 4; Interquartilbereich, IQR: 6), atypische Meningeome (MI: 4; IQR: 2) und anaplastische Meningeome (MI: 4; IQR: 2,5). In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten war Cdh1 Proteinexpression in allen Tumorgruppen ähnlich (Mann-Whitney U-Test; z.B. MN III und II vs MN I; $p = 0,293$). Zwei von drei Fällen mit deutlich verminderter *CDH1* mRNA Expression zeigten auch reduzierte Immunreaktion (MN49A und MN119). In wenigen Meningeomen war keine E-Cadherin Proteinexpression nachweisbar. Es bestand jedoch kein Zusammenhang mit dem WHO-Grad und der mRNA Expression.

8 Untersuchung der β -Catenin Proteinexpression mittels Immunhistochemie

Um die mögliche Rolle des WNT-Signalwegs in der Meningeomprogression zu prüfen wurde ein weiteres WNT-Signalweg-Element β -Catenin auf Proteinexpression in Meningeomen unterschiedlicher WHO-Grade untersucht. Insgesamt wurden Schnittpräparate von 48 Meningeomen immunhistochemisch analysiert. Die Serie zeigte insgesamt eine kräftige β -Catenin Immunreaktion in allen Meningeomen unabhängig vom WHO-Grad. Nur zwei Tumore (MN34 und MN10) wiesen vereinzelt eine Kernfärbung bei verminderter Zellwandfärbung auf. Das als positive Gewebekontrolle in allen Versuchsdurchgängen mitgeführte Melanom-Präparat zeigte immer eine deutliche positive Zellmembranfärbung des Plattenepithels und nukleare Immunreaktion in einem Teil der Tumorzellen (<50%) (Abb. 37). Schnittpräparate von normaler Epidermis und Tonsillen (Plattenepithel)-Präparat wurden waren weitere positive Kontrollen. Als negative Gewebekontrolle diente die fehlende Immunreaktion in Lymphozyten. Die Ergebnisse der Immunhistochemie an der gesamten Tumorserie sind in der Tabelle 16 zusammengefaßt. Abbildung 37 zeigt repräsentative Beispiele von Immunfärbung.

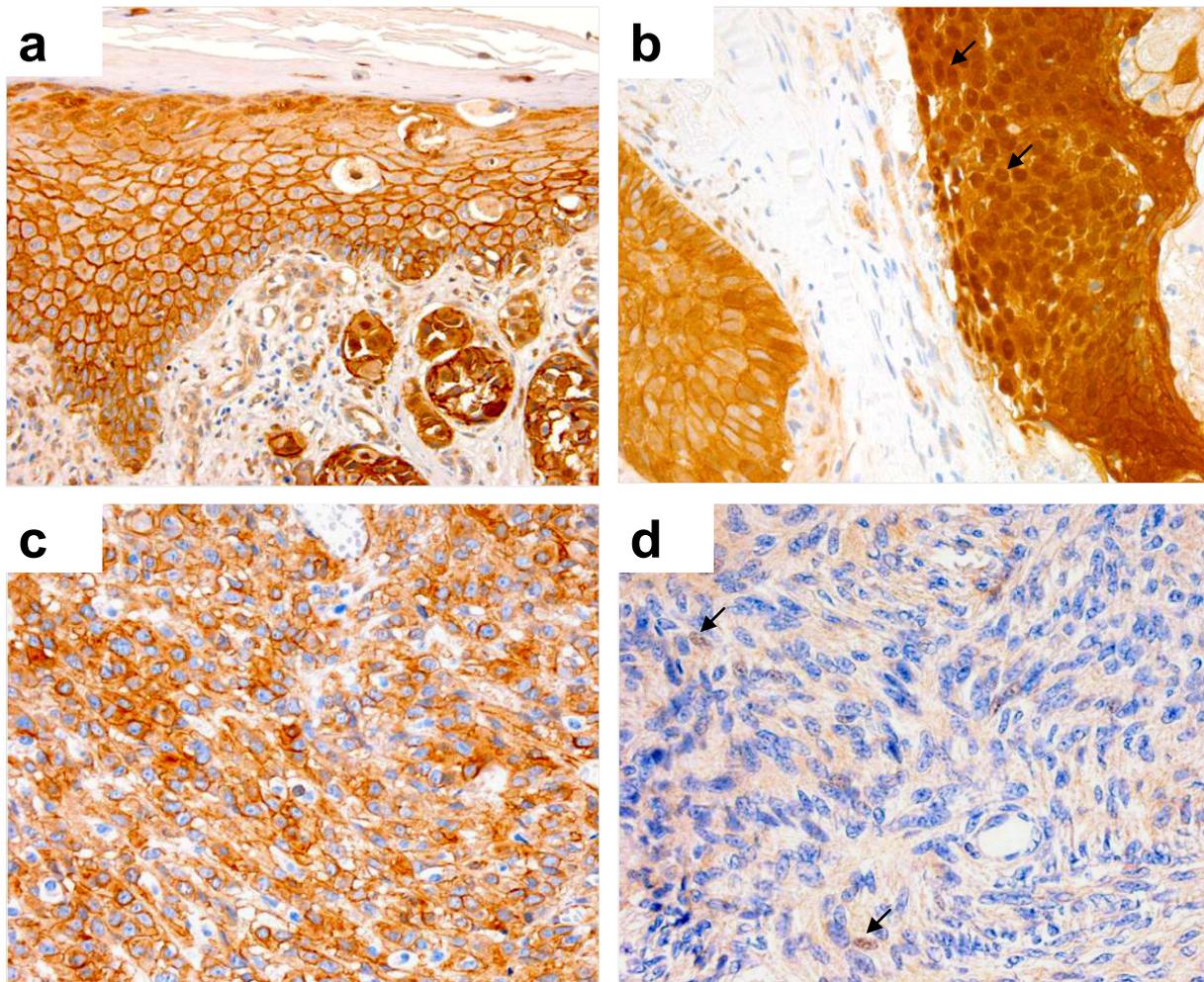


Abb. 37: Beispiele der immunhistochemischen Ergebnisse zur Expression von β -Catenin; β -Catenin Proteinexpression verhält sich unabhängig von maligner Progression. **(a) Epidermis mit Anteilen eines malignen Melanoms, x200**, eine starke homogene Färbung der Zellwände; **(b) malignes Melanom, x400**, im rechten Bildteil zusätzlich eine zytoplasmatische und nukleäre starke β -Catenin Färbung (siehe Pfeile); **(c) Beispiel für ein anaplastisches Meningeom (MN67, WHO-Grad III, Vergrößerung x400)** mit starker positiver β -Catenin Immunreaktion der Zellwand; **(d) Beispiel für ein benignes Meningeom (MN10, WHO-Grad I, x400)** mit vereinzelt positiver Kernfärbung (siehe Pfeile) bei schwacher Zellwandfärbung. Alle gezeigten immunhistochemischen Präparate wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

Meningeome zeigten in der Auswertung unabhängig vom WHO-Grad ähnliche Medianwerte für β -Catenin Expression: benigne Meningeome (Medianer Index, MI: 9; Interquartilbereich, IQR: 6), atypische Meningeome (MI: 8; IQR: 6) und anaplastische Meningeome (MI: 9; IQR: 2). Es fand sich kein statistisch signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Tumorgruppen für β -Catenin (Mann-Whitney U-Test).

D Diskussion

9 *TIMP3 – Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase 3*

Mutationen im *NF2*-Gen und Verluste der Chromosomenbande 22q12 sind die häufigsten genetischen Veränderungen in niedriggradigen Meningeomen. Mit höherem Grading kommen weitere molekulare Veränderungen hinzu (vgl. Kap. 2.5, Tab. 2). Hierbei spielt die epigenetische Inaktivierung von Genen durch Methylierung der entsprechenden CpG-Inseln im 5'-Bereich eine wichtige Rolle in der Meningeomprogression. So konnte kürzlich die Korrelation von *NDRG2* mRNA- und Proteinexpressionsverlusten mit der CpG-Insel-Methylierung von *NDRG2* nachgewiesen werden (75, 124). Ein weiteres Beispiel ist die Hypermethylierung von *TP73* in Tumoren mit Allelverlusten auf dem Chromosomarm 1p (7, 8).

Ein weiteres Meningeom-assoziiertes Tumorsuppressorgen scheint *TIMP3* auf 22q12.3 zu sein. *Timp3* inhibiert spezifisch unterschiedliche Metalloproteinasen und limitiert so den extrazellulären Abbau. Diese antiproteolytische Fähigkeit könnte eine zentrale Rolle für die Hemmung von Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese sein. Für den Metalloproteinasen-Inhibitor *TIMP3* wurden bereits inaktivierende Veränderungen, wie z.B. eine *TIMP3*-Inaktivierung durch Hypermethylierung, assoziiert mit schlechter Prognose in einer Reihe von unterschiedlichen Krebserkrankungen beschrieben (1, 3, 39, 84, 86). Diese Vorkenntnisse führten zur Aufstellung der folgenden Hypothese: *TIMP3* Hypermethylierung und transkriptionelle Herunterregulierung könnten mit Allelverlusten auf 22q12 und einem aggressiven und hochgradigen Meningeom-Phänotyp assoziiert sein.

9.1 *TIMP3* Hypermethylierung in Meningeomen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus von *TIMP3* CpG-Insel in zwei unterschiedlichen Regionen (Kap. 6.4, Abb. 22) in einer Serie von 50 Meningeomen (12 WHO-Grad III, 11 WHO-Grad II und 27 WHO-Grad I) bestimmt. Die Relevanz einer *TIMP3*-Methylierung für die Meningeomentstehung und -progression wurde bis dato in zwei Studien in der Region 1 der *TIMP3* CpG-Insel mit kontroversen Ergebnissen untersucht. In der Studie von Bello *et al.* aus dem Jahr 2004 (7) wurde der Methylierungsstatus in 98 Meningeomen

(68 WHO-Grad I, 27 WHO-Grad II und 3 WHO-Grad III) mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) bestimmt. Die MSP wurde zuerst als Sichtungsverfahren der CpG-Insel-Methylierung durchgeführt und anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert. Insgesamt wurde in 24% der Meningeome eine Promotorhypermethylierung detektiert. Dabei korrelierte die Methylierung mit der Tumorprogression: 18% der Grad I Meningeome und 40% der höhergradigen Meningeome (WHO-Grad II – III) wiesen eine Methylierung im Promotorbereich auf. Der Methylierungsindex wurde als Anteil der methylierten zu den nicht methylierten CpG-Stellen definiert und sein Mittelwert lag bei 0,158. Der Anteil der methylierten CpG-Stellen lag in allen Tumoren, bis auf einen, unter 50%, so dass die Meningeomserie laut der vorliegenden Arbeit für das untersuchte CpG-Fragment nicht methyliert war. Außerdem wurde von Bello *et al.* (7) die Methylierungsstärke der untersuchten CpG-Dinukleotide nicht angegeben. Liu *et al.* (70) untersuchten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2005 dasselbe CpG-Fragment wie Bello *et al.* (7) auf eine Methylierung in einer Serie von 48 Meningeomen (16 WHO-Grad I, 19 WHO-Grad II und 13 WHO-Grad III). Ein Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung und der Transkriptionshemmung wurde mittels 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung und anschließender *Real-Time* RT-PCR überprüft. Als Kontrolle wurde nicht-neoplastisches meningeales Gewebe (*Leptomeninge*) verwendet. In keinem der untersuchten Fälle konnte eine aberrante *TIMP3*-Methylierung mittels MSP nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung wurde nicht durchgeführt, so dass lediglich der Methylierungsstatus von 7 CpGs innerhalb der Primerbindungsstellen bestimmt wurde.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die widersprüchlichen Ergebnisse der vorangegangenen Studien hinsichtlich einer epigenetischen Inaktivierung von *TIMP3* durch Promotorhypermethylierung zu überprüfen. Es wurde zunächst der Methylierungsstatus der Region 1 der *TIMP3* CpG-Insel mittels methylierungsspezifischer PCR-Analyse (MSP) und direkter Bisulfit-Sequenzierung überprüft. Beide Methoden detektierten keine *TIMP3* Hypermethylierung und unterstützten die Ergebnisse von Liu *et al.* (70). Die abweichenden Ergebnisse der Studie von Bello *et al.* könnten darauf zurückzuführen sein, dass MSP nur den Methylierungsstatus weniger, zufällig ausgewählter CpG-Stellen detektiert. Diese Daten sind nicht unbedingt repräsentativ für die Methylierung der gesamten CpG-Region (7). In der vorliegenden Studie wurde dagegen ein umfassendes Bild vom Methylierungsstatus der Region 1 von *TIMP3* 5'-CpG-Insel mittels zusätzlich durchgeführter Sequenzierung erhoben und jede der 23 erfassten CpG-Stellen einzeln beurteilt.

Um den Methylierungsstatus zusätzlicher CpG-Dinukleotide abzuklären, wurde ein weiteres PCR-Fragment (Kap. 6.4, Abb. 22 und 23, Region 2), mittels direkter Bisulfit-Sequenzierung in der gesamten Meningeomserie (n=50) untersucht. Die Region 2 befindet sich weiter distal von der Region 1 und überlappt den Translationsstartpunkt. Die Sequenzierung dieser Region zeigte relevante tumorspezifische Methylierungen in 14 von 50 Meningeomen (28%). Zu beachten ist, dass die Bisulfit-Sequenzierung von 21 CpG-Stellen starke *TIMP3* Methylierung in der Mehrheit (67%) der anaplastischen Meningeomen detektierte. Dagegen war die Methylierungsfrequenz in atypischen (18%) und benignen Meningeomen (15%) deutlich geringer. Die Methylierung korrelierte ähnlich wie in der Arbeit von Bello *et al.* (7) mit der Tumorprogression. In dieser Arbeit wurden jedoch mehr anaplastische Meningeome (12 versus 3 WHO-Grad III-Tumore) als von Bello *et al.* untersucht. Zur relativen Quantifizierung der Methylierung wurde die Methylierungsstärke einer CpG-Stelle definiert (Kap. 6.4.2, Tab. 12 und 13, Legende) und ein Methylierungsscore bestimmt. Eine Methylierung wurde als gegeben definiert, wenn mehr als 50% der untersuchten CpGs methyliert waren. Ein interessanter Aspekt ist das Verteilungsmuster der Methylierung über die 44 analysierten CpGs in der vorliegenden Arbeit. Die erste CpG-Region war vollständig nicht methyliert, während die zweite Region ein homogenes Methylierungsmuster zeigte: 10 von 50 Meningeomen waren an allen CpG-Stellen methyliert und nur 4 von 50 Meningeomen waren partiell methyliert (Kap. 6.4.2, Tab. 13, Abb. 26). Es könnte sich hier um eine große Klusterbildung handeln. Die zugrunde liegende Theorie geht davon aus, dass zuerst einzelne CpGs methyliert werden und von diesen dann eine Ausbreitung auf die angrenzenden Positionen stattfindet (31). Insgesamt deuten die eigenen Ergebnisse auf eine tumorspezifische CpG-Insel-Methylierung von *TIMP3* in Meningeomen hin. Es ergab sich keine signifikante Assoziation zwischen der *TIMP3*-Methylierung und dem Lebensalter oder der Geschlechtsverteilung der Patienten.

9.2 *TIMP3* Hypermethylierung – entscheidender Mechanismus der Gen-Inaktivierung in Meningeomen?

Die vorliegende Arbeit detektierte eine signifikante Verminderung der *TIMP3* mRNA-Expression in den klinisch aggressiven, höhergradigen Meningiomen (WHO-Grad II und III). Eine ähnliche Beobachtung konnte für die Medianwerte der *Timp3* Proteinexpression gemacht werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Berichten über andere

Tumorentitäten, die eine Herunterregulierung von *TIMP3* im Zusammenhang mit einem höhergradigem Tumor-Phänotyp und einer schlechten Prognose gezeigt haben (1, 3, 39, 84, 86).

Die eigenen Daten liefern *in vitro* und *in vivo* Beweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen *TIMP3* Methylierung und der verminderten *TIMP3* mRNA-Expression. Die Behandlung der Meningeom Zelllinie Ben-Men-1 mit der demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin und dem Inhibitor von Histon-Deacetylasen Trichostatin A führte zur Reexpression der *TIMP3* mRNA. In dieser Arbeit wurden neue Daten zu der Korrelation der *TIMP3*-Methylierung mit der mRNA- und Proteinexpression erhoben. Die Meningeome mit *TIMP3* Hypermethylierung zeigten signifikant verminderte mRNA-Expression im Vergleich zu den Tumoren ohne diese epigenetische Veränderung. In allen 8 Meningeomen mit starken mRNA-Expressionsverlusten (Verhältnis der Expression von Tumor zu Kontrollgewebe $\leq 0,1$) waren die untersuchten CpG-Stellen in der Region 2 vollständig methyliert (Kap. 6.4.2, Tab. 13). Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass 5 atypische Meningeome eine mehr als 3-fache Verminderung der *TIMP3* mRNA-Expression in Abwesenheit von *TIMP3* Methylierung aufwiesen und den Rückgang der mittleren Expression in der gesamten Gruppe der atypischen Meningeome bei nur geringfügigem Anstieg der Methylierungsfrequenz widerspiegeln (Tab. 13). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass *TIMP3* Hypermethylierung zwar eine wichtige, aber nicht die alleinige Ursache der transkriptionellen *TIMP3* Herunterregulierung ist. So zeigten die jüngsten Studien, dass andere genetische Änderungen an der Verminderung vom *TIMP3* Genprodukt beteiligt sein könnten. So führten z.B. eine *ERBB2* Überexpression, sowie *p53* Mutation nachweislich zur verminderten *TIMP3* Expression in murinen Fibroblasten (7, 126). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass miR-21 die Expression von *TIMP3* in Gliomzellen *in vitro* und in einem Gliom-Model in Nacktmäusen (36) herunterreguliert. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese Mechanismen im Bezug auf die Inaktivierung von *TIMP3* in Meningeomen zu untersuchen und einen möglichen Zusammenhang zum aggressiven klinischen Verhalten nachzuweisen. Der Stellenwert dieser genetischen Veränderungen vor allem in atypischen Meningeomen im Vergleich zur Promotormethylierung ist zu prüfen.

TIMP3 befindet sich auf dem Chromosom 22q12. Ungefähr die Hälfte der sporadischen Meningeome zeigen genetische Verluste der chromosomalen Bande 22q12, welche das wichtigste Tumor-Suppressor-Gen *NF2* enthält (29, 119). Zusätzlich zu chromosomalen Deletionen auf 22q12 führen *NF2* Mutationen, als zweiter Treffer, zur vollständigen Inaktivierung des *NF2*-Genproduktes Merlin.

Die Häufigkeit der *NF2* Mutation korreliert nicht mit dem WHO-Grad und der Meningeomprogression, was darauf hindeutet, dass diese genetische Veränderung früh in der Meningeomgenese stattfindet (99, 110). Die untersuchte Tumorserie zeigte einen Verlust der Heterozygotie auf 22q in 20 der 39 untersuchten Meningeomen (51%). Dieses Ergebnis entspricht den Daten aus der Literatur (7, 29, 119). Vor allem kam *TIMP3* Methylierung, mit Ausnahme eines einzigen Falls (MN11), ausschließlich in Meningeomen mit Deletionen auf 22q vor. Jedoch im Gegensatz zur *NF2* Mutation wurde *TIMP3* Methylierung bevorzugt in anaplastischen Meningeomen beobachtet und scheint somit ein spätes Ereignis in der Meningeomentstehung und –progression zu sein. *TIMP3* Inaktivierung durch Methylierung könnte also an der Entstehung einer aggressiveren, höhergradigen Subgruppe der Meningeome beteiligt sein, bevorzugt bei den Tumoren mit vorbestehendem Allelverlust auf 22q. Dennoch unterstreicht die hohe Häufigkeit von Fällen mit 22q-Verlust ohne *TIMP3* Methylierung (etwa ein Drittel der Tumoren) die wichtige Rolle der anderen Tumorsuppressorgenen (*NF2*) in dieser Region und schränkt die Rolle der *TIMP3* auf eine (aggressivere) Subgruppe von Meningeomen. Allelverluste alleine erklären jedoch nur unzureichend den niedrigen mRNA-Level einiger Fälle. Die Untersuchung mittels Duplex-PCR ergab keine homozygoten *TIMP3*-Deletionen. Darüber hinaus könnten auch entfernt lokalisierte regulatorische Elemente oder *TIMP3* Expression regulierende Gene epi-/genetisch inaktiviert vorliegen. *TIMP3* Mutationen in Exon 5 sind bislang nur im Zusammenhang mit *Sorsby's Fundus Dystrophie* nachgewiesen worden (66). Die Daten zu Mutationen von *TIMP3* in Meningeomen stehen noch aus.

9.3 Timp3 Proteinexpression in Meningeomen

Es wurden 45 der 50 Meningeome immunhistochemisch auf Expression des Timp3 Proteins hin untersucht. Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Tumorgrad und der *TIMP3* mRNA-Expression. Die wahrscheinlichste Interpretation der teilweise heterogenen Expression von Timp3 im Tumorgewebe dürfte die sein, dass eine intertumorale Heterogenität im Methylierungsgrad des *TIMP3* Promotors vorliegt, d.h. dass innerhalb eines Tumors durchaus methylierte und unmethylierte Tumorzellen nebeneinander oder räumlich getrennt vorkommen können. Alternativ kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Antigenität im Tumorgewebe durch die Fixierung und Einbettung stark gelitten hat, dass

es zu einem falsch-negativen Ergebnis in der Immunhistochemie in einigen Fällen gekommen ist.

9.4 *TIMP3*, ein neues Tumorsuppressorgen in Meningeomen?

Insgesamt liegt hier die erste umfassende Studie zur Untersuchung der *TIMP3* Methylierung, mRNA- und Proteinexpression in Meningeomen und Korrelation der Ergebnisse mit dem allelischen Status auf 22q vor. Die Ergebnisse zeigten, dass Hypermethylierung und transkriptionelle Herunterregulierung von *TIMP3* ein Inaktivierungsmechanismus fast ausschliesslich in Meningeomen mit LOH auf 22q12 ist. Im Gegensatz zu *NF2* Mutation liegt *TIMP3* Inaktivierung signifikant häufiger in den aggressiven, höhergradigen Meningeomen und scheint mit der Tumorprogression assoziiert zu sein. Die verminderten *TIMP3* mRNA-Level konnten in einigen Fällen nur unzureichend mit den untersuchten epigenetischen und genetischen Veränderungen erklärt werden. Nach weiteren *TIMP3* Inaktivierungsmechanismen (z.B. *TIMP3* Mutationen) sollte gesucht werden. Derzeit fehlen zum Beweis einer prognostischen Bedeutung von *TIMP3* Alterationen noch die entsprechenden klinischen Überlebensdaten aus kontrollierten Studien. Diese Daten sind in zukünftigen Studien zu erbringen. Ebenso bleibt der mögliche funktionelle Zusammenhang zwischen Allelverlust auf 22q und *TIMP3* Hypermethylierung aufzuklären. Die histopathologische Einteilung der Meningeome wird bis jetzt hauptsächlich aufgrund morphologischer Kriterien vorgenommen. Die Verfügbarkeit von molekularen Markern für die Unterscheidung zwischen gut- und bösartigen Formen von Meningeomen könnte eine große klinische Relevanz als Prognosefaktor haben.

10 Die Rolle von Cdh1 und β -Catenin in der Pathogenese der Meningeome

Das Zell-Adhäsionssystem enthält Elemente wie E-Cadherin und β -Catenin, welches Cadherin mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbindet. Störungen in diesem System können zur Tumordinvasion und -progression führen (15, 20). Daten zu mRNA-Expression und CpG-Methylierung von *CDH1* in Meningeomen lagen bis jetzt nicht vor und sollten in dieser Arbeit erhoben werden. Von den 50 Tumoren der Gesamtserie wurden 22 benigne, 11 atypische und 11 anaplastische Meningeome mittels *Real-Time* RT-PCR-Analyse auf die

mRNA-Expression von *CDHI* hin untersucht. In nur 3 von 11 (27%) anaplastischen Meningeomen konnte eine signifikant verminderte *CDHI* mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die benignen und atypischen Meningeome zeigten normale *CDHI* Expressionswerte. Es fand sich keine signifikante Assoziation zwischen der relativen *CDHI* mRNA-Expression und der Tumorprogression. Die nachfolgende Überprüfung der epigenetischen Inaktivierung von *CDHI* ergab keine Hinweise auf eine tumorspezifische Methylierung in 32 untersuchten Dinukleotiden der *CDHI* 5'-CpG-Insel. Eine Erklärung könnte die sein, dass die Expressionsverluste von *CDHI* durch die inhibierende Bindung diverser Transkriptionsfaktoren an die *CDHI*-Promotorregion bewirkt werden (11, 20). Darüber hinaus könnte eine genetische Mutation von *CDHI* eine Rolle spielen. *CDHI* Mutationen wurden bis dato in Magen-, Brust- und Endometriumkarzinomen untersucht (10, 43), eine *hot-spot* Region ist jedoch nicht identifiziert worden. Nikuseva-Martić *et al.* (89) fanden Hinweise darauf, dass genetische Veränderungen in den WNT-Signalweg-Elementen an der Genese der Hirntumoren beteiligt sind. So konnten Allelverluste am *CDHI*-Gen in 31% der Meningeome nachgewiesen werden. Die *CDHI* Expression wurde in der eigenen Arbeit auch auf der Proteinebene überprüft. Es wurden 48 der 50 Meningeome immunhistochemisch auf Expression des E-Cadherin-Proteins hin untersucht. Die Tumorserie zeigte in der Auswertung unabhängig vom WHO-Grad und Tumorprogression ähnliche Medianwerte für die E-Cadherin Expression. Zwei von drei Fällen mit deutlich verminderter *CDHI* mRNA-Expression zeigten jedoch reduzierte Immunreaktion. Die Arbeit von Schwechheimer *et al.* (117) detektierte verminderte E-Cadherin Immunreaktivität der Zellmembran in malignen invasiven Meningeomen. In dieser Arbeit (117) wurde die Proteinexpression von E-Cadherin in einer Serie von 75 Meningeomen mittels Immunhistochemie und *Western blot* untersucht. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit fand sich eine starke spezifische Färbung der Zellwand, die intrazelluläre E-Cadherin Expression war gering. Die Sechs der 75 Meningeome (8%), die keine spezifische E-Cadherin-Färbung zeigten, gehörten alle zur Gruppe der anaplastischen Meningeome. Die eigenen Ergebnisse fanden fehlende E-Cadherin Expression in 3 von 48 Meningeomen (6%), allerdings unabhängig vom WHO-Grad. Die Unterschiede könnten damit erklärt werden, dass verschiedene Primärantikörper und Methoden verwendet wurden. Andere Arbeiten fanden entweder eine ubiquitäre E-Cadherin Expression oder eine verminderte Expression in Meningeomen unabhängig vom WHO-Grad (16, 33, 120). Figarella-Branger *et al.* (33) untersuchten 47 Meningeome mittels Immunhistochemie und Immunoblot. Sie fanden eine ubiquitäre E-Cadherin-Protein Expression in allen Meningeomen unabhängig vom WHO-Grad. Diese Daten wurden auch

von Shimada *et al.* (120) bestätigt. Immunohistochemische Analysen von Brunner *et al.* (16) ergaben eine fehlende E-Cadherin Expression in der Zellmembran in 34% der untersuchten Meningeome, unabhängig vom WHO-Grad.

Die immunohistochemische Analyse der Expression von β -Catenin zeigte insgesamt eine kräftige Immunreaktion in allen untersuchten Meningeomen unabhängig vom WHO-Grad. In zwei Meningeomen wiesen wenige Tumorzellen eine Kernfärbung bei geringer Zellwandfärbung auf. Eine große Studie berichtete über eine ubiquitäre β -Catenin Proteinexpression in 107 Meningeomen (120). Eine andere Arbeit fand dagegen eine verminderte β -Catenin Expression in malignen Meningeomen (128). Brunner *et al.* (16) detektierten sogar ubiquitäre β -Catenin Verluste in 79% der Meningeome und eine perinukleäre Färbung in der Mehrheit der Meningeome. Die Unterschiede könnten damit erklärt werden, dass unterschiedliche Primärantikörper und Methoden verwendet wurden.

Insgesamt deuten die eigenen Daten darauf hin, dass Veränderungen von E-Cadherin und β -Catenin eine untergeordnete Rolle in der Meningeomentstehung und –progression spielen. Eine nukleäre Expression von β -Catenin ist auf wenige Einzelfälle beschränkt. E-Cadherin Verluste waren in Meningeomen ebenfalls selten und unabhängig vom WHO-Grad. Ein Zusammenhang zwischen Verlust der *CDHI* Expression und Verlust der *TIMP3* Expression fand sich nicht. Die eigenen Analysen führen zu dem Ergebnis, dass eine fehlende Expression von *CDHI* kein verlässlicher Indikator für anaplastische Meningeome ist.

E Literaturverzeichnis

1. **Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS.** A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol.* 1996; 74(6):853-62. Review.
2. **Apte SS, Olsen BR, Murphy G.** The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem.* 1995 Jun 16;270(24):14313-8. Erratum in: *J Biol Chem.* 1996 Feb 2;271(5):2874.
3. **Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR.** Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):798-802.
4. **Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC.** Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer.* 1999 Mar;79(9-10):1347-55.
5. **Baylin S.** DNA methylation and epigenetic mechanisms of carcinogenesis. *Dev Biol (Basel).* 2001;106:85-7; discussion 143-60.
6. **Beckers J, Herrmann F, Rieger S, Drobyshev AL, Horsch M, Hrabe de Angelis M et al (2005)** Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. *Int J Cancer* 114:590-7.
7. **Bello MJ, Amiñoso C, Lopez-Marin I, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, Lomas J, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA.** DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathol.* 2004 Nov;108(5):413-21. Epub 2004 Sep 10.
8. **Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Kusak ME, Sarasa JL, Rey JA.** High-resolution analysis of chromosome arm 1p alterations in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000 Jul 1;120(1):30-6.
9. **Bender CM, Pao MM, Jones PA.** Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998 Jan 1;58(1):95-101.
10. **Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F.** Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat.* 1998;12(4):226-37. Review.
11. **Birchmeier W, Behrens J.** Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1994 May 27;1198(1):11-26. Review.
12. **Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6-21. Review.
13. **Bird AP.** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986 May 15-21;321(6067):209-13. Review.
14. **Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G.** Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol.* 2001 Aug;159(2):661-9.
15. **Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T.** Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10356-61.
16. **Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E.** Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology.* 2006 Aug;49(2):178-87.
17. **Büsches R, Ichimura K, Weber RG, Reifenberger G, Collins VP.** Allelic gain and amplification on the long arm of chromosome 17 in anaplastic meningiomas. *Brain Pathol.* 2002 Apr;12(2):145-53.
18. **Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS:** *Surgical Pathology of the nervous System and its coverings.* Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia, 49-71, 2002.
19. **Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Mees SG, Kemler R, Schalken JA.** Molecular cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA. *Mol Biol Rep.* 1993 Feb;17(2):123-8.
20. **Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA.** The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):76-83.
21. **Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S.** Oncogenes and signal transduction. *Cell.* 1991 Jan 25;64(2):281-302. Review.
22. **Christofori G, Semb H.** The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999 Feb;24(2):73-6. Review.
23. **Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M.** High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug 11; 22(15):2990-7.
24. **Claus EB; Bondy ML; Schildkraut JM; Wiemels JL; Wrensch M; Black PM** Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery.* 2005 Dec;57(6):1088-95; discussion 1088-95.

25. **Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP.** The molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathol.* 1990 Sep;1(1):19-24. Review.
26. **Commins DL, Atkinson RD, Burnett ME.** Review of meningioma histopathology. *Neurosurg Focus.* 2007;23(4):E3. Review.
27. **Coussens LM, Werb Z.** Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol.* 1996 Nov;3(11):895-904. Review.
28. **Darnton SJ, Hardie LJ, Muc RS, Wild CP, Casson AG.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: loss of expression correlates with poor prognosis. *Int J Cancer.* 2005 Jun 20;115(3):351-8.
29. **Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP, Nordenskjöld M.** Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9275-9.
30. **Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3225-9.
31. **Esteller M.** CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002 Aug 12;21(35):5427-40. Review.
32. **Feinberg AP, Tycko B.** The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb;4(2):143-53. Review.
33. **Figarella-Branger D, Pellissier JF, Bouillot P, Bianco N, Mayan M, Grisoli F, Rougon G.** Expression of neural cell-adhesion molecule isoforms and epithelial cadherin adhesion molecules in 47 human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Mod Pathol.* 1994 Sep;7(7):752-61.
34. **Fraga MF, Esteller M.** Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle.* 2005 Oct;4(10):1377-81. Epub 2005 Oct 20. Review.
35. **Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL.** A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1; 89(5):1827-31.
36. **Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS *et al*** (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* 28:5369-80.
37. **Gallegos NC, Smales C, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB.** The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colorectal cancer. *Surg Oncol.* 1995 Feb;4(1):21-9.
38. **Germano IM, Edwards MS, Davis RL, Schiffer D.:** Intracranial meningiomas of the first two decades of life. *J Neurosurg.* 1994 Mar; 80(3):447-53.
39. **Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., Thorgeirsson, U.P.** (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol.*, 74, 111-22.
40. **Goss KJ, Brown PD, Matrisian LM.** Differing effects of endogenous and synthetic inhibitors of metalloproteinases on intestinal tumorigenesis. *Int J Cancer.* 1998 Nov 23;78(5):629-35.
41. **Goyal LK, Suh JH, Mohan DS, Prayson RA, Lee J, Barnett GH.** Local control and overall survival in atypical meningioma: a retrospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Jan 1;46(1):57-61.
42. **Greger V, Debus N, Lohmann D, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B.** Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet.* 1994 Nov;94(5):491-6.
43. **Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE.** E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature.* 1998 Mar 26;392(6674):402-5.
44. **Gumbiner BM.** Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):345-57. Review.
45. **Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB.** Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Mar 25;1423(2):M29-36. Review.
46. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review.
47. **Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, Maher ER.** Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg.* 1996 May;84(5):847-51.
48. **Hartmann C, Boström J, Simon M.** Diagnostic and molecular pathology of meningiomas. *Expert Rev Neurother.* 2006 Nov;6(11):1671-83. Review.
49. **Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB.** Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.
50. **Jääskeläinen J, Haltia M, Servo A.** Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol.* 1986 Mar;25(3):233-42.

51. **Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE.** Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*. 2002 Mar 28;21(14):2245-52. Review.
52. **Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28. Review.
53. **Kähäri VM, Saarialho-Kere U.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med*. 31(1): 34-45, 1999.
54. **Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K.** TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):12501-4. Epub 2001 Jan 23.
55. **Kepes JJ.** Presidential address: the histopathology of meningiomas. A reflection of origins and expected behaviour; *J Neuropathol Exp Neurol*. 1986 Mar;45(2):95-107.
56. **Khokha R, Denhardt DT.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis*. 1989;9(6):391-405. Review.
57. **Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK.** The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Mar; 61(3):215-25; discussion 226-9. Review.
58. **Knippers R.** Molekulare Genetik. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag. 2001.
59. **Knudson AG Jr.** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.
60. **Knudson AG.** Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996;122(3):135-40. Review.
61. **Köhler B, Wolter M, Blaschke B, Reifenberger G.** Absence of mutations in the putative tumorsuppressor gene KLF6 in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer*. 2004 Sep 10; 111(4):644-5.
62. **Laird PW, Jaenisch R.** The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet*. 1996;30:441-64. Review.
63. **Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M.** Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999 Apr 15;110(2):103-10.
64. **Lamszus K.** Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Apr;63(4):275-86. Review.
65. **Land H, Parada LF, Weinberg RA.** Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*. 1983 Aug 18-24;304(5927):596-602.
66. **Langton KP, McKie N, Curtis A, Goodship JA, Bond PM, Barker MD, Clarke M.** A novel tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mutation reveals a common molecular phenotype in Sorsby's fundus dystrophy. *J Biol Chem*. 2000 Sep 1;275(35):27027-31.
67. **Lasko D, Cavenee W, Nordenskjöld M.** Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet*. 1991;25:281-314. Review.
68. **Lee S, Kim WH, Jung HY, Yang MH, Kang GH.** Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Pathol*. 2002 Sep;161(3):1015-22.
69. **Lilien J, Balsamo J.** The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Oct;17(5):459-65. Review.
70. **Liu Y, Pang JC, Dong S, Mao B, Poon WS, Ng HK.** Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol*. 2005 Apr;36(4):416-25.
71. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4):402-8.
72. **Longstreth WT Jr, Dennis LK, MCGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD.** Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer*. 1993 Aug 1;72(3):639-48. Review.
73. **Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P.** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6. Review. Erratum in: *Acta Neuropathol*. 2007 Nov;114(5):547.
74. **Lui EL, Loo WT, Zhu L, Cheung MN, Chow LW.** DNA hypermethylation of TIMP3 gene in invasive breast ductal carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2005 Oct;59 Suppl 2:S363-5.
75. **Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann DH, Perry A.** Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7121-6.
76. **MacLeod AR, Szyf M.** Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J Biol Chem*. 1995 Apr 7;270(14):8037-43.

77. **Maillo A, Orfao A, Sayagues JM, Diaz P, Gómez-Moreta JA, Caballero M, Santamarta D, Santos-Briz A, Morales F, Taberner MD.** New classification scheme for the prognostic stratification of meningioma on the basis of chromosome 14 abnormalities, patient age, and tumor histopathology. *J Clin Oncol.* 2003 Sep 1;21(17):3285-95.
78. **Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S, Imamura M, Hirano S, Takeichi M, Niitsu Y.** Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. *Br J Cancer.* 1992 Dec;66(6):1122-30.
79. **McCutcheon IE.** The biology of meningiomas. *J Neurooncol.* 1996 Sep;29(3):207-Review.
80. **Meis JM, Ordóñez NG, Bruner JM.** Meningiomas. An immunohistochemical study of 50 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 1986 Oct;110(10):934-7.
81. **Melki JR, Vincent PC, Clark SJ.** Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1999 Aug 1;59(15):3730-40.
82. **Modha A, Gutin PH.** Diagnosis and treatment of atypical and anaplastic meningiomas: a review. *Neurosurgery.* 2005 Sep;57(3):538-50; Review.
83. **Möllemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G.** Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer.* 2005 Jan 20; 113(3):379-85.
84. **Mühlich J, Bajanowski T, Rickert CH, Roggendorf W, Würthwein G, Jürgens H, Frühwald MC.** Frequent but borderline methylation of p16 (INK4a) and TIMP3 in medulloblastoma and sPNET revealed by quantitative analyses. *J Neurooncol.* 2007 May;83(1):17-29. Epub 2007 Jan 6.
85. **Nagashima G, Fujimoto T, Suzuki R, Asai J, Itokawa H, Noda M.** Dural invasion of meningioma: a histological and immunohistochemical study. *Brain Tumor Pathol.* 2006;23(1):13-7.
86. **Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N.** Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest.* 2005 Feb;85(2):165-75.
87. **Nakasu S, Li DH, Okabe H, Nakajima M, Matsuda M.** Significance of MIB-1 staining indices in meningiomas: comparison of two counting methods. *Am J Surg Pathol.* 2001 Apr;25(4):472-8.
88. **Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA.** DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2006 Aug;5(8):993-1001. Epub 2006 Aug 4.
89. **Nikuseva-Martić T, Beros V, Pećina-Slaus N, Pećina HI, Bulić-Jakus F.** Genetic changes of CDH1, APC, and CTNNB1 found in human brain tumors. *Pathol Res Pract.* 2007;203(11):779-87. Epub 2007 Oct 1.
90. **Novina CD, Sharp PA.** The RNAi revolution. *Nature.* 2004 Jul 8;430(6996):161-4.
91. **Nusse R.** The Wnt gene Homepage www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html
92. **Nusse R.** Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 2005 Jan;15(1):28-32. Review.
93. **Ogino S, Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Fuchs CS.** LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2008 Mar 25;
94. **Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R.** Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer.* 2000 May 15;88(10):2201-9.
95. **Parks, W.C., Mecham, R.P.** (1998) Matrix metalloproteinases. Academic Press, San Diego, USA.
96. **Pasquier B, Gasnier F, Pasquier D, Keddari E, Morens A, Couderc P.** Papillary meningioma. Clinicopathologic study of seven cases and review of the literature. *Cancer.* 1986 Jul 15;58(2):299-305.
97. **Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP.** A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem.* 1992 Aug 25;267(24):17321-6.
98. **Pećina-Slaus N.** Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int.* 2003 Oct 14;3(1):17.
99. **Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G.** Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol.* 2004 Nov; 70(2):183-202. Review.
100. **Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC.** "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer.* 1999 May 1;85(9):2046-56.
101. **Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM.** Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol.* 1997 Dec;21(12):1455.
102. **Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L.** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1; 30(9):e36.
103. **Pravdenkova S, Al-Mefty O, Sawyer J, Husain M.** Progesterone and estrogen receptors: opposing prognostic indicators in meningiomas. *J Neurosurg.* 2006 Aug;105(2):163-73.
104. **Provost E, Rimm DL.** Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 Oct;11(5):567-72. Review.

105. **Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B.** A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med.* 2003 Apr;9(4):407-15. Epub 2003 Mar 24.
106. **Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Smith JS, McDermott MW.** Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. *J Neurooncol.* 2005 Aug;74(1):19-30. Review.
107. **Radner H, Blümcke I, Reifenberger G, Wiestler OD.** [The new WHO classification of tumors of the nervous system 2000. Pathology and genetics] *Pathologe.* 2002 Jul;23(4):260-83. German.
108. **Renan MJ.** How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993;7(3):139-46. No abstract available.
109. **Ribalta T, McCutcheon IE, Aldape KD, Bruner JM, Fuller GN.** The mitosis-specific antibody anti-phosphohistone-H3 (PHH3) facilitates rapid reliable grading of meningiomas according to WHO 2000 criteria. *Am J Surg Pathol.* 2004 Nov;28(11):1532-6.
110. **Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G.** Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* 2006 Dec;5(12):1045-54. Review.
111. **Ries C, Petrides PE.** Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem.* 1995;376:345-355.
112. **Robertson KD.** DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):597-610. Review.
113. **Roser F, Samii M, Ostertag H, Bellinzona M.** The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. *Acta Neurochir (Wien).* 2004 Jan;146(1):37-44; discussion 44. Epub 2003 Dec 22.
114. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec; 74(12):5463-7.
115. **Schnitt SJ, Vogel H.** Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. *Am J Surg Pathol.* 1986 Sep;10(9):640-9.
116. **Schulz, W. A.** *Molecular Biology of Human Cancers.* Springer Verlag. 2005.
117. **Schwechheimer K, Zhou L, Birchmeier W.** E-Cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Arch.* 1998 Feb;432(2):163-7.
118. **Segditsas S, Tomlinson I.** Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene.* 2006 Dec 4;25(57):7531-7. Review.
119. **Seizinger BR, de la Monte S, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL.** Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug;84(15):5419-23.
120. **Shimada S, Ishizawa K, Hirose T.** Expression of E-cadherin and catenins in meningioma: ubiquitous expression and its irrelevance to malignancy. *Pathol Int.* 2005 Jan;55(1):1-7.
121. **Taipale J, Beachy PA.** The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):349-54. Review.
122. **Takeichi M.** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991 Mar 22;251(5000):1451-5. Review.
123. **Tannishtha Reya, and Hans Clevers** "Wnt signalling in stem cells and cancer" in *Nature* 434, 843-850 (14 April 2005).
124. **Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH, Perry A, Reifenberger G, Riemenschneider MJ.** Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer.* 2008 Nov 1;123(9):2080-6.
125. **Tohma Y, Yamashima T, Yamashita J.** Immunohistochemical localization of cell adhesion molecule epithelial cadherin in human arachnoid villi and meningiomas. *Cancer Res.* 1992 Apr 1;52(7):1981-7.
126. **Thomas S, Reisman D (2006)** Localization of a mutant p53 response element on the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 promoter: mutant p53 activities are distinct from wild-type. *Cancer Lett* 240:48-59.
127. **Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, Olivero WC, Gujrati M, Dinh DH, Rao JS.** RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis. *Int J Oncol.* 2007 Nov;31(5):1039-50.
128. **Utsuki S, Oka H, Sato Y, Kawano N, Tsuchiya B, Kobayashi I, Fujii K.** Invasive meningioma is associated with a low expression of E-cadherin and beta-catenin. *Clin Neuropathol.* 2005 Jan-Feb;24(1):8-12.
129. **Vogelstein B, Kinzler KW.** The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993 Apr;9(4):138-41. Review.
130. **von Randow AJ, Schindler S, Tews DS.** Expression of extracellular matrix-degrading proteins in classic, atypical, and anaplastic meningiomas. *Pathol Res Pract.* 2006;202(5):365-72. Epub 2006 Mar 24.
131. **Weber RG, Boström 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 Dec 23;94(26):14719-24.

132. **Wick M, Bürger C, Brüsselbach S, Lucibello FC, Müller R.** Novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *J Biol Chem.* 1994 Jul 22;269(29):18953-60.
133. **Wild A, Ramaswamy A, Langer P, Celik I, Fendrich V, Chaloupka B, Simon B, Bartsch DK.** Frequent methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene in pancreatic endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Mar;88(3):1367-73.
134. **Wodarz A, Nusse R.** Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:59-88. Review.
135. **Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr.** TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31226-32.
136. **Zang KD.** Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet.* 2001;93(3-4):207-20.
137. **Zhu WG, Lakshmanan RR, Beal MD, Otterson GA.** DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1327-33.
138. **Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F.** Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 12; 32(12):e103.

F Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger für die Themenstellung, die Ermöglichung dieser Arbeit und vor allem für die vorzügliche und kompetente Betreuung.

Herrn Dr. med. Markus J. Riemenschneider möchte ich danken für die Menge von Arbeit und Zeit, die er in die Auswertung der immunhistologischen Ergebnisse und schließlich Präsentation, Schreiben und Gestalten der Arbeit investiert hat.

Insbesondere danke ich auch Frau Dr. rer. nat. Marietta Wolter, die mir jederzeit mit unermüdlichem Einsatz und bewundernswerter Ausdauer für Fragen und Probleme jeglicher Art zur Verfügung stand. Ihr verdanke ich den komplikationslosen Ablauf der Laborarbeiten durch zahlreiche Anleitungen und Hilfestellungen. Sie hat geholfen diese Arbeit voranzubringen, nicht zuletzt durch wichtige Verbesserungsanregungen und vielfaches geduldiges Korrekturlesen.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. rer. nat. Peter Roerig sowie allen Kollegen im Labor für ihre Hilfestellungen zu meiner Arbeit und die hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Frau Britta Friedensdorf danke ich für die anhaltend freundliche Beantwortung meiner Fragen bezüglich der Zusammensetzung bestimmter Lösungen sowie auch für die helfende Hand während meiner Laborzeit.

Frau Christa Mähler danke ich für die freundliche und kompetente Betreuung im immunhistologischen Labor.

Dir, meiner geliebten Lilie, danke ich für Deine unerschöpfliche Geduld und ständige Ermutigung zum Voranbringen der Arbeit.

Last but not least möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern Natalie und Viktor Barski für ihre große Unterstützung und liebevolle Fürsorge bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

G Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dimitri Barski
Geburtsdatum: 05.03.1982
Geburtsort: L'viv, Ukraine
Nationalität: deutsch
Mail to: Dimitri.Barski@med.uni-duesseldorf.de

Berufliche Weiterbildung

seit 01/2009 Assistenzarzt in der Klinik für Urologie, Universitätsklinik
Düsseldorf

12/2008 Erteilung der Approbation als Arzt

11/2008 Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote gut (2,5)

04/2008 – 07/2008 Praktisches Jahr im Universitätsspital Zürich, Wahlfach:
Urologie

08/2007 – 04/2008 Praktisches Jahr im Marienhospital Düsseldorf, Akademisches
Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf, Fachbereich Innere
Medizin und Chirurgie

10/2005 – 09/2008 Funktions-MTA im schlafmedizinischen Zentrum, Düsseldorf

2005 – 2009 Dissertation am Institut für Neuropathologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf (Doktorvater: Prof. Dr. med.
Guido Reifenberger) Thema: Molekulare Analyse von
Tumorsuppressorgen-Kandidaten *TIMP3*, *CDHI* und *CTNNB1*
in Meningeomen

2004 – 2005 Forschungsstudent am Institut für Neuropathologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

09/2004 Ärztliche Vorprüfung

11/2002 – 10/2004 Studentische Aushilfskraft im St. Vinzenz Krankenhaus,
Düsseldorf

Schulische Ausbildung

1996-2002	Wilhelm-Dörpfeld-Gymnasium in Wuppertal, Abiturprüfung mit der Gesamtnote (1,5)
1988-1996	Mittelschule in L'viv, Ukraine

H Zusammenfassung (Abstract)

Die vorliegende Dissertationsarbeit beschäftigt sich mit der molekularen Analyse der Kandidatengene *TIMP3* (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3*), *CDH1* (*E-Cadherin*) und *CTNNB1* (β -*Catenin*) in der Pathogenese von Meningeomen. Meningeome sind primäre Tumoren der Hirnhäute, die nach den Gliomen die zweithäufigste Gruppe unter den Tumoren des zentralen Nervensystems im Erwachsenenalter bilden. Für das in der chromosomalen Bande 22q12.3 lokalisierte Gen *TIMP3* wurden von anderen Arbeitsgruppen kontroverse Befunde hinsichtlich einer möglichen epigenetischen Inaktivierung durch eine Hypermethylierung von CpG-reichen Sequenzen in seiner Promotorregion berichtet. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde an einer Serie von 50 Meningeomen, darunter 27 benigne Meningeome (WHO-Grad I), 11 atypische Meningeome (WHO-Grad II) und 12 anaplastische Meningeome (WHO-Grad III), der Methylierungsstatus des *TIMP3* Promotors mittels direkter Sequenzierung von Natriumbisulfit-modifizierter DNA bestimmt. Diese Analysen ergaben eine *TIMP3* Promotorhypermethylierung in 67% der anaplastischen Meningeome, 22% der atypischen Meningeome und 17% der benignen Meningeome. Die Hypermethylierung des *TIMP3* Promotors war in den untersuchten Tumoren signifikant mit einer erniedrigten *TIMP3* mRNA-Expression assoziiert. Verluste des langen Arms von Chromosom 22 und Mutationen des auf 22q12.2 gelegenen Tumorsuppressorgens *NF2* (*Neurofibromatose 2*) sind bekanntermaßen die häufigsten genetischen Veränderungen in Meningeomen aller WHO-Grade. In unserer Tumorserie wiesen bis auf einen Tumor alle Meningeome mit *TIMP3* Promotorhypermethylierung gleichzeitig auch Allelverluste auf 22q12 auf. Im Gegensatz zu *NF2* Mutationen fand sich eine *TIMP3* Promotorhypermethylierung aber vornehmlich in anaplastischen Meningeomen und dürfte daher eher für die maligne Progression und weniger für die Initiation von Meningeomen von Bedeutung sein. Der zweite Projektteil der Dissertationsschrift beschäftigte sich mit der molekularen Analyse der mRNA-Expression und des Promotormethylierungsstatus des *CDH1* Gens in Meningeomen. Die Rolle der *CDH1* Inaktivierung an der Störung der Zelladhäsion und der epithelialen Funktion wurde bereits für verschiedene Tumorarten beschrieben, entsprechende Daten zu Meningeomen lagen dagegen bislang nicht vor. In der eigenen Serie von 50 Tumoren konnte allerdings keine signifikante Assoziation zwischen *CDH1* mRNA-Expression und dem WHO-Grad detektiert werden. Die nachfolgende Überprüfung des *CDH1* Promotorstatus ergab keine Hinweise auf eine tumorspezifische Methylierung in der *CDH1*-assoziierten 5'-CpG-Insel. Zusätzlich durchgeführte immunhistochemische Analysen zur Expression von E-Cadherin und β -Catenin auf Proteinebene erbrachten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den immunhistochemischen Expressionswerten und dem WHO-Grad der untersuchten Tumoren. Insgesamt sprechen die eigenen Ergebnisse somit dafür, dass eine aberrante Promotormethylierung und transkriptionelle Herunterregulation von *TIMP3* eine wichtige Rolle für die maligne Progression von Meningeomen mit Verlusten des Chromosoms 22 spielen, während Alterationen der Expression von *CDH1* und *CTNNB1* in Meningeomen von untergeordneter pathogenetischer Bedeutung sind.