

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. W. Schmahl)

**Das intracraniale Meningeom des Hundes:
Analysen zu morphologischen, immunhistochemischen
und genomischen Alterationen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Dirk Michael Janik
aus
Hamburg

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Grundlagen zu den Meningeomen des Hundes	3
2.1.1	Nomenklatur	3
2.1.2	Epidemiologie	3
2.1.3	Ursprung und Lokalisation	4
2.1.4	Ätiologie	4
2.1.5	Histologie, Immunhistochemie und Klassifikation	6
2.1.6	Das atypische Meningeom	9
2.1.7	Metastasierung	11
2.2	Zellzyklus und Zellzyklus-Kontrolle	12
2.2.1	Grundlagen	12
2.2.2	Regulation und Kontrolle	13
2.3	Tumorwachstum	20
2.3.1	Einflussgrößen des Tumorwachstums	20
2.3.2	Untersuchung der Tumorzellproliferation – methodische Betrachtungen	22
2.3.2.1	Grundlagen	22
2.3.2.2	Beispiele für Methoden, die der Erfassung des Proliferationszustandes dienen	23
2.3.2.3	Beispiel für eine Methode zur Erfassung zeitlicher Abläufe des Zellzyklus	34
2.4	Molekulare Onkologie	35
2.4.1	Begriffsbestimmungen und Grundlagen	35
2.4.2	Tumorsuppressorgene	38
2.4.2.1	p53	38
2.4.2.2	PTEN	53
2.4.3	Identifikation und Untersuchung von Tumorsuppressorgenen durch Nachweis von Heterozygotieverlusten (<i>loss of heterozygosity</i> , LOH) unter Anwendung polymorpher DNA-Marker	69
2.4.3.1	Grundlagen	69
2.4.3.2	p53-LOH auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 des Menschen	70

2.4.3.3	Definitionen	71
2.4.3.4	Anwendung und methodische Betrachtungen	74
2.4.3.5	Chromosomale Alterationen und Allelverluste beim humanen Meningeom	76
2.4.3.6	Weitere Bedeutung von Mikrosatelliten-Analysen im Zusammenhang mit Tumoren: Mikrosatelliten-Instabilität	78
2.4.3.7	Mikrosatelliten-Analyse und zytogenetische Untersuchungen auf dem Gebiet der Onkologie beim Hund	80
3	MATERIAL UND METHODEN	82
3.1	Untersuchungsmaterial	82
3.2	Allgemeine Kasuistik	82
3.3	Probenaufbereitung	86
3.3.1	Fixierung, Einbettung und Zuschnitt	86
3.3.2	Standardfärbungen	87
3.3.2.1	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	87
3.3.2.2	Cresylviolett-Färbung (Nissl-Färbung)	87
3.3.2.3	periodic acid Schiff's reaction (PAS)	88
3.3.3	Immunhistochemische Färbungen	89
3.3.3.1	Prinzip	89
3.3.3.2	Technische Durchführung	89
3.4	Dokumentation und Auswertung	94
3.4.1	PCNA, Ki-67 und p53	94
3.4.2	PTEN	95
3.4.3	Mitose-Index	95
3.5	Gruppeneinteilung	95
3.6	Statistik	96
3.7	Molekulargenetische Untersuchungen	97
3.7.1	DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe	97
3.7.2	DNA-Extraktion aus Blut	98
3.7.3	Auswahl der Primer	99
3.7.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	100
3.7.5	Agarosegelelektrophorese	101

3.7.6	Auswertung	101
4	ERGEBNISSE	103
4.1	Gruppeneinteilung	103
4.2	Untersuchung der Tumorzellproliferation	104
4.2.1	Immunhistochemische Darstellung der Proliferationsmarker PCNA und Ki-67	104
4.2.2	Erstellung der <i>labeling indices</i> (LI) von PCNA und Ki-67	108
4.2.3	Mitose-Index	110
4.3	Immunhistochemische Detektion der Tumorsuppressoren p53 und PTEN	111
4.3.1	p53	111
4.3.2	PTEN	116
4.4	Molekulargenetische Untersuchungen	119
5	DISKUSSION	123
6	ZUSAMMENFASSUNG	149
7	SUMMARY	151
8	ANHANG	153
8.1	Chemikalien und Reagenzien	153
8.2	Antikörper und Normalserum	154
8.3	Geräte	154
8.4	Rezepte	155
9	LITERATURVERZEICHNIS	159
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	182

1 EINLEITUNG

Tumorerkrankungen stellen bei Hunden in ca. 24 % der Fälle die Todesursache dar (1). Es wird generell angenommen, dass Hunde etwa doppelt so häufig Neoplasien entwickeln wie der Mensch. Dabei zeigen Klinik, Biologie und Histologie verschiedener caniner Tumoren weitreichende Übereinstimmungen mit dem humanen Korrelat (2). Die Kenntnisse der molekularen Hintergründe sind beim Hund allerdings noch lückenhaft (3). Dies gilt in besonderer Weise für das canine Meningeom, welches als der häufigste Primärtumor des Zentralen Nervensystems dieser Spezies gilt (4-6). Das gesteigerte Interesse an einer Behandlung dieser Tumoren durch Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie (7-10) geht einher mit einem Bedarf an präzisierten Kriterien für Diagnose und Prognose sowie an einem verbesserten Verständnis der Pathogenese. In der Humanmedizin hat sich das Grading von Meningeomen anhand histologischer Kriterien als bedeutsam für Therapie und Prognose erwiesen (11). Dabei werden den verschiedenen Tumorsubtypen entsprechend ihrer biologischen Aggressivität die WHO (*World Health Organization*)-Grade I, II und III zugeordnet. Der am lichtmikroskopischen Routinepräparat zu erstellende sog. Mitose-Index gilt dabei neben der Tumormorphologie als einer der wichtigsten Determinanten. Trotz Vorgabe detaillierter Kriterien kann die Diagnose insbesondere des „atypischen Meningeoms“ (WHO-Grad II) Schwierigkeiten bereiten und die Einbeziehung weiterer Parameter erforderlich machen wie z.B. der Proliferationsaktivität. In dieser Arbeit wird die Anwendbarkeit der im Vergleich zur Tiermedizin (12) umfassenderen humanmedizinischen Klassifikationskriterien der WHO (11) auf das canine intracraniale Meningeom bewertet und die Eignung der immunhistochemisch im Tumorpräparat dargestellten Proliferationsmarker PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und Ki-67 als ergänzende quantitative Kriterien für die Diagnose überprüft.

Die Proteine p53 und PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) sind Kontrollelemente fundamentaler zellulärer Prozesse wie z.B. Zellproliferation und Apoptose und werden entsprechend der damit verbundenen protektiven Wirkung gegen eine Initiation und/oder Progression von Neoplasien als „Tumorsuppressoren“ bezeichnet (13). Um bislang fehlende Erkenntnisse über die potentielle Rolle von p53 und PTEN für das

canine Meningeom zu gewinnen, wird deren Expression im Tumorgewebe immunhistochemisch detektiert und der Proliferationsaktivität sowie dem histologischen Subtyp gegenübergestellt. Ziel der durchgeführten PCR-basierten Analyse repetitiver DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten) auf Chromosom 5 des Hundes ist die Erfassung von Allelverlusten, die auf eine Alteration des hier lokalisierten *p53* Gens (14, 15) hinweisen können. Der Literaturteil verschafft einen umfassenden Überblick über die regulatorischen Mechanismen von Zellproliferation und Tumorsuppression bei Mensch und Tier. Neben der Bedeutung für Grundlagenforschung und onkologische Diagnostik stellen die involvierten Proteine und Gene einen Ansatzpunkt für verschiedene Therapieformen dar. Die Erforschung der einer bestimmten Neoplasie zugrundeliegenden funktionellen Defekte (z.B. von bestimmten Tumorsuppressoren) dient langfristig der Entwicklung einer zielgerichteten und effektiven Therapie (16).

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Grundlagen zu den Meningeomen des Hundes

2.1.1 Nomenklatur

Harvey CUSHING (17) prägte im Jahr 1922 die Bezeichnung *meningioma* in der Absicht, eine bis dahin herrschende begriffliche Vielfalt und Konfusion zu beenden und einen einfachen Begriff für eine Gruppe histologisch variantenreicher Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) zur Verfügung zu stellen, deren gemeinsames Merkmal der Ursprung aus den Hirnhäuten ist. Heute bezieht sich der Begriff Meningeom streng auf Tumoren, die Zellen der *Arachnoidea* (s.u.) entstammen - ungeachtet der histologischen Erscheinung (18). Das im deutschen Sprachraum gebräuchliche Synonym für „Meningeom“ ist „Meningiom“ (19).

2.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz intracranialer Neoplasien bei Hunden wird mit 14,5 pro 100.000 angegeben (5). Das Meningeom ist mit einem Anteil von ca. 50 % der häufigste intracraniale Primärtumor des Hundes, gefolgt vom Astrozytom (4-6). Auch bei Mensch, Katze und Ratte ist dies der häufigste Tumor der Schädelhöhle, selten dagegen werden Meningeome bei Rind, Schaf und Pferd festgestellt (20).

Etwa 82 % der caninen Meningeome sind intracranial, 15 % intraspinal und 3 % retrobulbär lokalisiert (21).

Meningeome zeigen beim Hund eine mit dem Lebensalter ansteigende Prävalenz. Die meisten dieser Tumoren treten bei Hunden über 7 Jahren auf, wobei auch Erkrankungsfälle junger Tiere (16 Monate) bekannt sind (21).

Über die geschlechtliche Verteilung sind unterschiedliche Aussagen zu finden. Zum einen wird eine höhere Erkrankungshäufigkeit weiblicher Individuen angegeben, wie sie auch bei Meningeomen des Menschen zu finden ist (20), wohingegen andere Autoren kein eindeutiges Überwiegen eines Geschlechts feststellen (21, 22).

2.1.3 Ursprung und Lokalisation

Meningeome entstehen aus arachnoidalen Zellen (ebenfalls als meningothele Zellen, Meningozyten oder Meningoblasten bezeichnet), die in sog. *Villi arachnoideales* lokalisiert sind, d.h. fingerförmigen Protrusionen des Subarachnoidalraumes in die Venensinus der *Dura mater*. Generell können sich Meningeome überall dort entwickeln, wo Meningen oder ektopes meningeales Gewebe vorhanden sind. Diese Tumoren sind histologisch vielfältig und können sowohl eine mesenchymale als auch epitheliale Differenzierung vollziehen – Eigenschaften, die der Entwicklung aus multipotenten arachnoidalen Zellen zugeschrieben werden (23). Typische Lokalisationen caniner Meningeome sind die cerebralen Hemisphären, Falx cerebri, Hirnbasis und Bulbus olfactorius.

2.1.4 Ätiologie

Die Ätiologie der Meningeome ist weitgehend ungeklärt. Beim Menschen ist das gehäufte Auftreten von Meningeomen nach Exposition ionisierender Strahlung des Kopfbereiches im Rahmen der Behandlung von Tumoren oder Tinea capitis beschrieben. In Abhängigkeit von der applizierten Dosis können die Tumoren nach Jahren bis Jahrzehnten entstehen. Experimentelle Untersuchungen am Tier bestätigten, dass ionisierende Strahlung intracraniale Tumoren incl. Meningeome induzieren kann. Als Wirkungsmechanismus wird die Schädigung von Basen der DNA und resultierende Einzel- oder Doppelstrangbrüche angenommen (24). Zusätzlich zu ionisierender Strahlung wurden bei Hunden Meningeome experimentell induziert durch Methylcholanthrene und Rous-Sarkomvirus, bei Rindern durch bovines Papillomvirus (21).

Klinische Beobachtungen bei menschlichen Patienten mit Meningeom führten zur Untersuchung der Rolle von Geschlechtshormonen in Zusammenhang mit dieser Tumorentität. So treten Meningeome zwei- bis viermal häufiger bei Frauen als bei Männern auf, wachsen während der Lutealphase des Menstruationszyklus oder in der Schwangerschaft schneller und wurden mit Brustkrebs in Verbindung gebracht. Demgemäß wurde eine Beteiligung von Progesteron und/oder Östrogen postuliert. Während sich bei ca. zwei Dritteln humaner Meningeome die Expression von Progesteronrezeptoren feststellen lässt, ist die Östrogenrezeptorexpression in der Mehrheit der Fälle sehr niedrig oder nicht nachweisbar. Androgenrezeptoren, denen in diesem Zusammenhang ebenfalls eine potentielle Relevanz

beigemessen wird, wurden in 40–100 % der durch verschiedene Methoden untersuchten Meningeomen gefunden. Es bleibt allerdings noch die genaue Bedeutung dieser Rezeptoren für Entstehung und Wachstum von Meningeomen und die potentielle Rolle einer Hormontherapie als mögliche Behandlungsstrategie zu bestimmen (11, 25).

Auch in Meningeomen von Hund und Katze lassen sich Rezeptoren für Progesteron, Östrogen und Androgen demonstrieren (20). Die untersuchten caninen Tumoren exprimierten mit deutlicher Mehrheit Progesteronrezeptoren (70-100 %), während nur in wenigen Fällen Rezeptoren für Östrogen (0-12,5 %) nachgewiesen werden konnten. (8, 26, 27).

In verschiedenen Untersuchungen konnte eine inverse Korrelation zwischen der Detektion von Progesteronrezeptoren und dem Anteil proliferierender Zellen festgestellt werden. Letzterer wurde durch die immunhistochemische Darstellung der proliferationsassoziierten Proteine *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (8) bzw. Ki-67 (26) bestimmt.

Die von MANDARA et al. (26) und ADAMO et al. (27) untersuchten malignen Meningeome zeigten im Vergleich zu gutartigen Tumoren deutlich niedrigere Quotienten Progesteronrezeptor-positiver Zellkerne.

Übereinstimmend wird der Evaluation von Progesteronrezeptoren eine Bedeutung als prognostisches Kriterium für Meningeome des Hundes beigemessen und Anti-Progesterontherapie für rezidivierende und für nicht oder unvollständig resezierbare Tumoren vorgeschlagen (8, 26, 27).

HASKINS et al. (28) dokumentieren ein Auftreten von Meningeomen bei vier von sieben, an Mukopolysaccharidose I erkrankten jungen Katzen (< 3 Jahren). Der Zusammenhang zwischen diesem erblich bedingten Mangel an α -L-Iduronidase und den Tumoren ist allerdings nach Aussage der Autoren unklar. Für canine Meningeome sind bislang keine vergleichbaren Fälle beschrieben.

Bei Hunden sind dolichocephale Rassen (Deutscher Schäferhund, Collie) häufiger von Meningeomen betroffen, was Hinweis auf eine mögliche genetische Komponente geben kann (29).

Kopftraumata standen seit langer Zeit (17) im Verdacht einen Risikofaktor für Meningeome darzustellen und es wurden zahlreiche Studien zu dieser Fragestellung durchgeführt. Allerdings sind die epidemiologischen Daten widersprüchlich und nicht überzeugend, so dass von diesem Ansatz Abstand genommen wurde (24).

Das Meningeom des Menschen zählt zu den ersten soliden Tumoren, bei denen charakteristische zytogenetische Veränderungen gefunden wurden. Bei spontanen Meningeomen des Menschen wurde der Verlust eines Chromosoms 22 als typische, früh in der Tumorentwicklung auftretende Läsion identifiziert. Spätere Untersuchungen wiesen Mutationen des Neurofibromatose-Typ-2 (*NF2*)-Gens und eine Reihe weiterer genetischer Alterationen nach (11). Eine vertiefende Darstellung der Rolle von Tumorsuppressorgenen findet sich unter Abschnitt 2.4.

2.1.5 Histologie, Immunhistochemie und Klassifikation

Die histologische Typisierung der Tumoren des Nervensystems bei Haustieren (12) basiert auf der Beurteilung des vorherrschenden Zelltypus und/oder der Histogenese des Tumors unter Anwendung der konventionellen Lichtmikroskopie. Die immunhistochemisch darstellbare Expression von Markerantigenen wie z.B. saures Gliafaserprotein (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*), Neurofilamente und Synaptophysin wird, soweit geeignet, einbezogen.

Es konnte gezeigt werden, dass das immunhistochemische Profil der wichtigsten Varianten caniner Meningeome große Ähnlichkeit mit dem der menschlichen Tumoren besitzt: Vimentin ist das vorherrschende Intermediärfilament und es ist eine starke Vimentin-Expression in der Mehrheit der Tumorzellen zu erwarten. Der immunhistochemische Nachweis von Zytokeratin zeigt ein vergleichsweise größeres Maß an Variabilität, und positive Zellen bilden oftmals kleine multifokale Aggregate. Der Nachweis sowohl von Vimentin als auch Zytokeratin in einem fraglichen Meningeom wird als hilfreiches Merkmal zur Abgrenzung gegen andere Tumoren des ZNS gewertet. Der Nachweis von GFAP deutet auf einen glialen Tumor hin; GFAP-positive Meningeome stellen die Ausnahme dar. Zudem erbrachte die Untersuchung caniner und humaner Meningeome konstant negative Ergebnisse für eine Darstellung von Synaptophysin. *Epithelial membrane antigen* (EMA) ist ein in der Humanmedizin aufgrund der in Meningeomen konstanten Expression häufig herangezogener Marker. Für die tiermedizinische Diagnostik stehen bislang keine geeigneten Antikörper zur Verfügung (30).

Ein numerisches Grading-System zur Beschreibung des Differenzierungs- und Malignitätsgrades (19) kommt in der obigen Klassifikation (12) nicht zur Anwendung, da im Allgemeinen nur ein oder zwei histologische Differenzierungen (gut differenziert oder anaplastisch) und Wachstumsverhaltensweisen (begrenzt oder invasiv) vorkommen. Die Eigenschaft „benigne“ oder „maligne“ wird in indizierten Fällen angegeben.

In der Veterinärmedizin wird folgende Klassifikation der Meningeome vorgeschlagen (12):

- I. meningotheliomatös
- II. fibrös/fibroblastisch
- III. transitional/gemischt
- IV. psammomatös
- V. angiomatös/angioblastisch
- VI. papillär
- VII. Granularzell
- VIII. myxoid
- IX. anaplastisch/maligne

Alle angeführten Varianten zeigen mit Ausnahme des anaplastischen (malignen) Meningeoms ein ähnliches biologisches Verhalten, d.h. langsames expansives Wachstum. Das papilläre Meningeom der Haustiere weist, soweit bekannt, nicht das aggressive Verhalten der humanen Form (WHO-Grad III, s.u.) auf.

Die aktuelle Fassung der humanmedizinischen Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) (11) unterscheidet 15 Meningeomsubtypen, die in drei „Grade“ (WHO-Grad I, II, III) eingeteilt werden.

Histologisches Erscheinungsbild (12):

- I. **meningotheliomatöses Meningeom:** solide, mäßig zelluläre Läppchen polygonaler Zellen; mäßige Menge eosinophilen Zytoplasmas mit unscharfen Zellgrenzen, runde bis ovale fein punktierte Zellkerne, kleine oder undeutliche Nukleolen. Der Mitose-

Index ist niedrig. Zytoplasmavaginationen in den Kern sind gewöhnlich vorhanden. Gelegentlich treten Riesenzellen mit bizarren Kernformen auf.

- II. **fibröses/fibroblastisches Meningeom:** spindelförmige Zellen, welche in langen, verflochtenen Bändern angeordnet sind; Tumorzellen besitzen ovale, fein punktierte Zellkerne, kleine oder undeutliche Nukleolen und eine geringe Menge eosinophilen Zytoplasmas mit unscharfen Zellgrenzen. Tumorzellen sind durch wenig bis reichlich Kollagen und Retikulin voneinander getrennt.
- III. **transitionales/gemischtes Meningeom:** Dieser Subtyp zeigt Merkmale sowohl meningotheiomatöser als auch fibröser Meningeome. Konzentrische Wirbel treten häufig in Erscheinung; diese formieren sich oftmals um Kapillaren. Gelegentlich befinden sich Psammomkörper (mineralisierte Konkremente) im Zentrum der Wirbel.
- IV. **psammomatöses Meningeom:** Wirbelformationen enthalten reichlich konzentrisch geschichtetes Hyalin und häufig Psammomkörper.
- V. **angiomatöses/angioblastisches Meningeom:** Diese Form ist charakterisiert durch das Vorhandensein zahlreicher großer oder kleiner Blutgefäße. Nester meningealer Zellen können auftreten.
- VI. **papilläres Meningeom:** Der Tumor zeigt perivaskuläre, aus Meningothelzellen bestehende Pseudopapillen.
- VII. **Granularzell-Meningeom:** Dieser Tumor besteht vorwiegend aus ovalen bis polygonalen Zellen, welche reichlich granuläres, eosinophiles Zytoplasma besitzen. Granula lassen sich durch *periodic acid Schiff's reaction* (PAS) anfärben und widerstehen einem Verdau mit Diastase.

VIII. **myxoides Meningeom:** Die Tumorzellen sind vakuolisiert und durch eine mäßig bis reichlich vorhandene myxomatöse Matrix getrennt. Die Matrix ist mit PAS, Alcianblau und Mucicarmin gut anfärbbar.

IX. **anaplastisches/malignes Meningeom:** Dieser Typ weist mehrere Malignitätskennzeichen auf wie: häufige Mitosen, hohe Zellularität, ununterbrochenes musterloses Wachstum, umfangreiche Nekrosen, Invasion des Gehirns sowie Metastasierung.

Das meningotheliale und das transitionale Meningeom zählen zu den häufigsten Formen beim Hund. Selten bei Haustieren sind der papilläre und der angiomatöse/angioblastische Subtyp (12, 21).

In der Veterinärmedizin werden die Begriffe „angiomatös“ und „angioblastisch“ oftmals synonym verwendet. Allerdings haben humanmedizinische Studien gezeigt, dass es sich bei den mit dem - heute obsoleten - Term „angioblastisches Meningeom“ bezeichneten Tumoren tatsächlich um Hämangioperizytome handelt. Der Ausdruck „angiomatös“ beschreibt dagegen zulässig eine Meningeomvariante. Für die Veterinärmedizin steht die Erforschung und Umsetzung dieser Differenzierung noch aus (11, 30).

Erweitert wird das Tumorspektrum bei Hunden durch Fallberichte von zystischen Meningeomen (31, 32) und die in der veterinärmedizinischen Klassifikation bei MEUTEN (21) aufgeführten mikrozystischen Meningeome.

Im Kontrast zum Menschen zeigen viele canine Meningeome fokale Nekrosen mit Ansammlung neutrophiler Granulozyten (20). Bei meningothelialen und transitionalen Meningeomen können Areale chondroiden, ossären, myxoiden oder Xanthom-artigen Gewebes zu finden sein. Jeder Meningeom-Typ kann multifokale, dichte Akkumulationen von T- und/oder B-Lymphozyten-Subpopulationen aufweisen (21).

2.1.6 Das atypische Meningeom

Die klinische Erfahrung zeigt, dass es zusätzlich zu den seltenen anaplastischen Formen beim Menschen eine weitere Gruppe von Meningeomen gibt, die trotz vollständiger Resektion eine

erhöhte Rezidivneigung aufweist. Der Subtyp „atypisches Meningeom“ wurde 1993 in die revidierte Fassung der WHO-Klassifikation für Tumoren des zentralen Nervensystems (33) zusätzlich aufgenommen und soll Meningeome bezeichnen, die mit einer im Vergleich zu üblichen Meningeomen gesteigerten Tendenz zur Rezidivbildung einhergehen. Übliche Meningeomtypen (WHO-Grad I) zeigten in einer Studie von 160 Fällen eine Rezidivrate von 9 %. Atypische Meningeome (WHO-Grad II) und anaplastische Meningeome (WHO-Grad III) rezidierten mit einer Rate von 29 % bzw. 50 % (34).

Die aktuelle Fassung der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (11) nennt folgende histologische Kriterien für die Einordnung als atypisches Meningeom:

- erhöhte mitotische Aktivität, d.h. 4-19 Mitosefiguren pro 10 Gesichtsfelder bei starker Vergrößerung (*high power field*, HPF)

oder der Tumor weist mindestens 3 der nachfolgend genannten 5 Merkmale auf:

- eine erhöhte Zelldichte
- eine kleinzellige Tumorzellpopulation mit erhöhter Kern-Plasma-Relation
- prominente Nukleolen
- ein ununterbrochenes, strukturloses oder flächenhaftes Wachstumsmuster mit Architekturverlust („*patternless or sheet-like growth*“)
- Herde spontaner oder geographischer (d.h. landkartenartig begrenzter) Nekrosen (in unbehandelten Tumoren)

Meningeome, die lediglich eine fokale Gehirninvasion zeigen oder einen MIB-1 Proliferationsindex (s. Abschnitt 2.4) oberhalb von 5 % als auffälliges Merkmal zeigen, nehmen eine Sonderstellung ein. Für solche Tumoren hat die Klassifikation der WHO noch keine verbindliche Zuordnung vorgenommen. Meningeome, die das Gehirn infiltriert haben, ansonsten aber die Kriterien des anaplastischen Meningeoms nicht erfüllen, verhalten sich in der Regel wie atypische Meningeome. Auch ein auf 5-10 % erhöhter MIB-1 Index geht in Meningeomen mit einer erhöhten Rezidivquote einher (11). Die Untersuchungen von KOLLES et al. (34) zeigten, dass der MIB-1 Proliferationsindex das wichtigste Kriterium für

die Unterscheidung des anaplastischen Meningeoms (Mittelwert des MIB-1 Index: 11 %) vom atypischen Meningeom (2,1 %) und von den üblichen Typen (0,7 %) ist. Da aber die immunhistochemischen Farbreaktionen erfahrungsgemäß in verschiedenen Labors einer größeren Schwankungsbreite unterworfen sind, lässt die WHO einen erhöhten MIB-1 Index allein nicht als diagnostisches Kriterium für Atypie gelten (11).

Der Begriff „atypisches Meningeom“ hat auch in die veterinärmedizinische Literatur Eingang gefunden. In der bei MEUTEN (21) angegebenen Klassifikation von Meningeomen bei Haustieren ist das atypische Meningeom mit folgenden Eigenschaften beschrieben: Aggressive Invasion des angrenzenden Neuropils, flächenhaftes Wachstumsmuster meningoethelialer Zellen, intratumorale Foci neutrophiler Granulozyten gemischt mit nekrotischen Tumorzellen, hohe mitotische Aktivität, Zellpleomorphismus, Nekrose von Einzelzellen. In dieser - hauptsächlich an der Humanmedizin (11, 33) orientierten - Einteilung findet sich kein anaplastisches (malignes) Meningeom, welches von WHO-Klassifikationen von Mensch (11, 33) und Tier (12) angegeben ist. Folglich kann die von MEUTEN (21) geführte Beschreibung nicht zur Identifizierung eines möglichen intermediären, d.h. zwischen den üblichen Formen und dem anaplastischen Meningeom einzugliedernden, Subtyps herangezogen werden.

RASKIN (35) beschreibt ein Meningeom, welches sich histologisch als homogene, histiozytenartige Zellpopulation mit mukoider Degeneration darstellt. Der Autor benutzt hierfür den Ausdruck „atypisches Meningeom“ als Signalisierung einer für den Hund histologisch ungewöhnlichen Tumorentität, ohne auf ein gesteigertes proliferatives oder malignes Potential zu verweisen.

2.1.7 Metastasierung

Das humane Meningeom nimmt hinsichtlich seiner vergleichsweise hohen Metastasierungshäufigkeit (3,4 % bezogen auf alle ZNS-Tumoren) im Vergleich zu anderen Neoplasien des zentralen Nervensystems (Glioblastom: 0,6 %, Medulloblastom 0,09 %) eine Sonderstellung ein. Diese humanmedizinischen Befunde lassen sich allerdings nicht auf die Verhältnisse bei Tieren übertragen: Meningeome von Haus- und Labortieren bleiben selbst

bei einem hohen Grad an Anaplasie und Invasionsneigung örtlich begrenzt. Die Ursache für dieses unterschiedliche Metastasierungsverhalten ist bislang ungeklärt. Speziesspezifische Differenzierungsunterschiede der Meninxanlagen, die für Tumorzellsubklone unterschiedliche Selektionsbedingungen mit Hinsicht auf Invasionsfähigkeit darstellen könnten, werden diskutiert (36).

Für Hunde mit Meningeom sind einzelne Fälle von Lungenmetastasen beschrieben (37, 38).

2.2 Zellzyklus und Zellzyklus-Kontrolle

2.2.1 Grundlagen

Der Zellzyklus ist eine Abfolge hoch geordneter Prozesse, die in der Verdopplung einer Zelle resultieren. Mit dem Durchlaufen des Zellzyklus passiert die Zelle einige diskrete Übergänge. Ein Übergang im Zellzyklus bedeutet eine unidirektionale Zustandsänderung, mit der die Zelle von einem zu einem anderen spezifischen Satz an Aktivitäten wechselt (39). Entsprechend wird der Zellzyklus in vier Abschnitte eingeteilt:

- **M-Phase:** Kernteilung (Mitose), gefolgt von der Teilung des Zytoplasmas (Zytokinese)
- **G₁-Phase:** RNA- und Proteinsynthese (G von englisch *gap* Lücke, Wartezeit)
- **S-Phase:** DNA-Reduplikation
- **G₂-Phase:** Vorbereitung auf die Mitose, insbesondere Teilung der Zentriolenpaare und Synthese von Mikrotubuli

Als **Interphase** werden die zwischen zwei Mitosen liegenden Abschnitte (G₁, S, und G₂-Phase) zusammengefasst (40). Die Zellzyklusdauer kultivierter Zellen wird, obwohl weite Variationen möglich sind, mit typischerweise 24 h angegeben. Dieser Zeitraum teilt sich auf die einzelnen Phasen in etwa wie folgt auf: **M:** 30 min, **G₁:** 12 h, **S:** 6 h und **G₂:** 6 h (41). Nach Beendigung der Mitose wird in der anschließenden G₁-Phase durch extrazelluläre Signale die weitere Bestimmung der Zelle festgelegt: entweder Fortschreiten auf eine neue Teilung, Ausscheiden aus dem Zellzyklus in einen Zustand der Teilungsrufe, aus dem eine Rückkehr in den Zellzyklus möglich ist (**G₀-Phase**), oder die schrittweise Differenzierung. Aus der terminalen Differenzierungsphase (**G_T**) kann schließlich kein Eintritt in den Zellzyklus mehr erfolgen. Die Regulationsmöglichkeiten durch äußere Faktoren, wie z.B.

Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Nährstoffe, Adhäsionsmoleküle, sind auf den ersten Teil der G₁-Phase limitiert (42, 43).

2.2.2 Regulation und Kontrolle

Die Präzision mit der die Prozesse des Zellzyklus ausgeführt werden, stellt das Überleben des Organismus sicher, während ein Verlust dieser Genauigkeit zu einer zunehmenden genomischen Instabilität führt und einen wichtigen Faktor der Kanzerogenese darstellt (44). Ungeachtet der großen Vielfalt an Tumoren und umfassenden Änderungen der Genexpression im Vergleich von normalen Zellen mit Tumorzellen, wird eine relativ kleine Anzahl essentieller Alterationen von den meisten - möglicherweise allen - Tumoren geteilt (45). Solche Mutationen können Wachstumskontrollmechanismen außer Kraft setzen oder Zellzyklus-Kontrollpunkte aufheben, die normalerweise die Zellteilung limitieren oder Apoptose induzieren als Antwort auf DNA-Schädigung oder Onkogen-Aktivierung. Die Tumorsuppressoren **Rb** (*retinoblastoma*) Protein und **p53**, bzw. die zugrundeliegenden Tumorsuppressorgene **Rb** und **p53**, nehmen in diesen Prozessen eine zentrale Stellung ein (16, 46).

Das vorherrschende Ordnungsprinzip beruht auf positiven und negativen Regelkreisen, die z.B. den Abschluss kritischer Ereignisse überwachen und dann die Einleitung der nächsten Prozesse gestatten. Es werden dabei zwei Klassen regulatorischer Schaltkreise unterschieden:

- **Intrinsische Mechanismen:** legen die Reihenfolge der Abläufe bei jedem Zellzyklus fest
- **Extrinsische Mechanismen:** werden nur aktiviert, wenn ein Schaden festgestellt wurde.

Beide Mechanismen können sich derselben Komponenten bedienen um ein Anhalten des Zellzyklus zu bewirken. Die Pause wird dazu genutzt, Fehler zu reparieren bzw. die Phase ordnungsgemäß abzuschließen. Schlägt dies fehl, kann Apoptose, der sog. programmierte Zelltod eingeleitet werden. Wird ein genomischer Schaden nicht erkannt oder mißlingt die Eliminierung einer Zelle mit erkanntem Defekt, so kann dieser Schaden an die Tochterzellen weitergegeben werden (39, 43). Eine bestimmte Untergruppe intrinsischer und extrinsischer Mechanismen wird als **Kontrollpunkt** (*checkpoint*) bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen biochemischen Reaktionsweg, der die Abhängigkeit eines Prozesses von einem anderen - normalerweise biochemisch in keinem Zusammenhang stehenden - Prozess sicherstellt.

Essentielle Elemente dieses Überwachungssystems sind Sensoren, Signalübertragungswege und Effektoren. (39, 47).

Im Gegensatz zur Passage von S, G₂ und M-Phase, hängt die G₁-Progression normalerweise von der Stimulation durch Mitogene ab und kann durch antiproliferative Zytokine blockiert werden. Die Entscheidung zur Zellteilung wird in der späten G₁-Phase getroffen: Sowie die Zelle den **Restriktionspunkt** passiert wird diese refraktär gegenüber extrazellulären Wachstumsregulationssignalen und vollzieht ein autonomes Programm, das sie der Teilung zuführt (42). Die Passage des Restriktionspunktes und weitere Progression durch den Zellzyklus wird durch Proteinkomplexe, bestehend aus **Cyclin-abhängigen Kinasen** (*cyclin-dependent kinases*, **CDKs**) und **Cyclinen**, reguliert. Im Verlauf des Zellzyklus werden verschiedene Cycline synthetisiert (und durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse wieder abgebaut), die mit den konstanter exprimierten CDKs assoziieren und diese dadurch aktivieren. Um ihre volle katalytische Aktivität zu erreichen, müssen die meisten CDKs an einem konservierten Threoninrest phosphoryliert werden. Aktivierte Cyclin/CDK-Komplexe phosphorylieren für den Übergang in verschiedene Zellzyklusphasen essentielle Proteine. Die Kennzeichnung der CDKs erfolgt durch Nummern. Eine Funktion im Rahmen der Zellzyklusregulation ist für CDK 1, 2, 4, 5, 6 bekannt. Cycline werden mit Großbuchstaben bezeichnet (s.u.) (39, 43, 46, 48). Eine Besonderheit stellen die D-Cycline (D1, D2, D3) dar. Diese sind in Anwesenheit von Wachstums- bzw. Überlebensfaktoren in allen Zellzyklusphasen nachweisbar; unter solchen Bedingungen schwankt ihre Konzentration, anders als bei den anderen Cyclinen (E, A, B1, B2), nur geringfügig. Erfolgt ein Entzug der Wachstumsfaktoren zwischen dem Beginn der G₁-Phase und dem Restriktionspunkt so führt dies zu einer rapiden Degradation der D-Cycline, womit eine Hemmung der Zellzyklus-Passage einhergeht. Dies gilt nicht für die späte G₁-Phase und die folgenden Phasen des Zellzyklus. Die Funktion von D-Cyclinen als Sensor für Wachstumssignale ist also eng mit dem Restriktionspunkt der G₁-Phase verknüpft (42, 43).

Aktivität der Holoenzym-Komplexe von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) im Verlauf des Zellzyklus:

- G₁-Phase: D-Cyline / CDK 4, 6
- Übergang G₁/S –Phase: E-Cyclin / CDK 2
- S-Phase: A-Cyclin / CDK 2
- späte S-Phase und G₂-Phase: A-Cyclin / CDK 1
- G₂ und M –Phase: A, B-Cycline / CDK 1

Somit wird deutlich, dass die jeweiligen Komplexe für verschiedene Phasen und Übergänge spezialisiert sind. Über eine Inhibierung der Kinasen bewirken einige Kontrollpunkte den Arrest des Zellzyklus (39, 42).

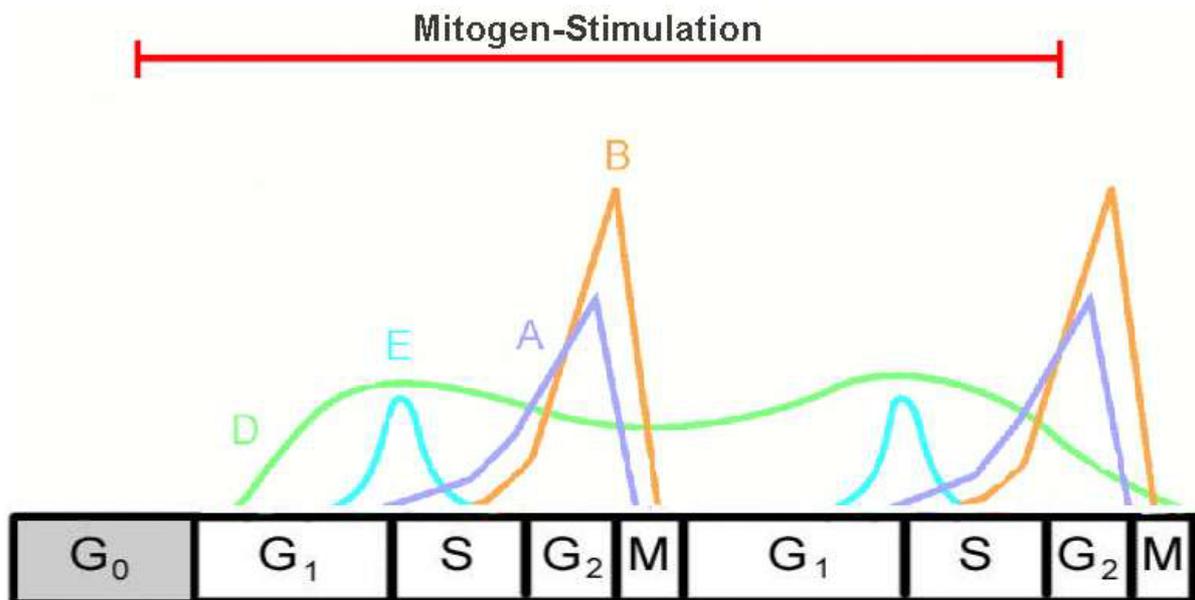


Abb. 1: Fluktuation der Cyclin-Konzentrationen im Verlauf des Zellzyklus. Die Expression der Cycline E, A und B erfolgt periodisch. Cycline vom D-Typ (D1, D2, D3) werden über den gesamten Zellzyklus als Reaktion auf induzierte Mitogen-Stimulation (Zeitdauer als oberer Balken schematisiert) exprimiert. (modifiziert nach SHERR (42))

Das Rb Protein ist ein wichtiges Substrat für Cyclin D/CDK 4, 6 und Cyclin E/CDK 2-Komplexe der G₁ und S-Phase. Die Menge an Rb ändert sich im Verlauf des Zellzyklus nicht, allerdings der Grad der Phosphorylierung: Während der G₀-Phase und im Zellzyklus bis zur

Mitte der G₁-Phase ist Rb hypophosphoryliert und bildet einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren, z.B. den Vertretern der E2F Proteinfamilie (E2F1-3). Im Komplex sind die verschiedenen E2Fs funktionell blockiert und infolgedessen wird eine Transaktivierung E2F-abhängiger Gene unterdrückt. Ein weiterer inhibierender Mechanismus ist die Bindung von Histon-Deacetylasen (HDACs) an hypophosphoryliertes Rb. Eine Deacetylierung führt zu einer engeren Assoziation von DNA und Nukleosomen und damit zu einer Behinderung des Zugangs von Transkriptionsfaktoren. Mit der Phosphorylierung von Rb Proteinen durch Cyclin/CDK-Komplexe werden HDACs und E2Fs aus ihrer Bindung entlassen und letztere aktivieren die Transkription von mehreren Genen, die für den Eintritt in die S-Phase und die Replikation der DNA benötigt werden (z.B. Thymidin-Kinase, Dihydrofolat-Reduktase, DNA-Polymerase α und p19^{ARF}). Zusammengefasst blockiert die hypophosphorylierte, aktive Form der Rb Proteinfamilie den Eintritt in die S-Phase durch Inhibierung des E2F-Transkriptionsprogramms. Bei Mutation oder Abwesenheit von Rb oder infolge einer Überexpression von Cyclin D/CDK 4 bleibt die Aktivität von E2F unreguliert und der Übergang in die S-Phase unkontrolliert (16, 43, 46).

Regulation der CDK-Aktivität:

- Wie geschildert trägt die Phosphorylierung eines bestimmten Threoninrestes zur Aktivierung von CDKs bei. Durch Phosphorylierung eines weiteren Threonin- und Tyrosinrestes wird die Aktivität herabreguliert.
- Der proteolytische Abbau der Cyclin-Komponente des Holoenzym bewirkt die Inaktivierung der assoziierten Kinase. Beispielsweise wird die Degradation von D-Cyclinen als Reaktion auf Zell-Zell-Kontakt oder auf eine Verminderung von Überlebensfaktoren wie Interleukin-1 eingeleitet.
- Darüber hinaus steht die CDK-Funktion unter der Kontrolle inhibitorischer Proteine, den *cyclin dependent kinase inhibitors* (CKIs). Bei Säugetieren werden zwei Familien von CKIs unterschieden:
 - 1) **INK4-Familie** (*polypeptide inhibitors of CDK 4 and CDK 6*) mit den Vertretern p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Diese Proteine treten ausschließlich mit CDK 4 und CDK 6 in Wechselwirkung und verhindern deren Aktivierung durch die D-Cycline der G₁-Phase.

- 2) **CIP** (*CDK interacting protein*), KIP oder WAF –Familie. Mitglieder dieser Familie, z.B. p21^{CIP} und p27^{CIP}, inhibieren Komplexe von CDK 2, CDK 4 und CDK 6 und den zugehörigen Cyclinen (43).

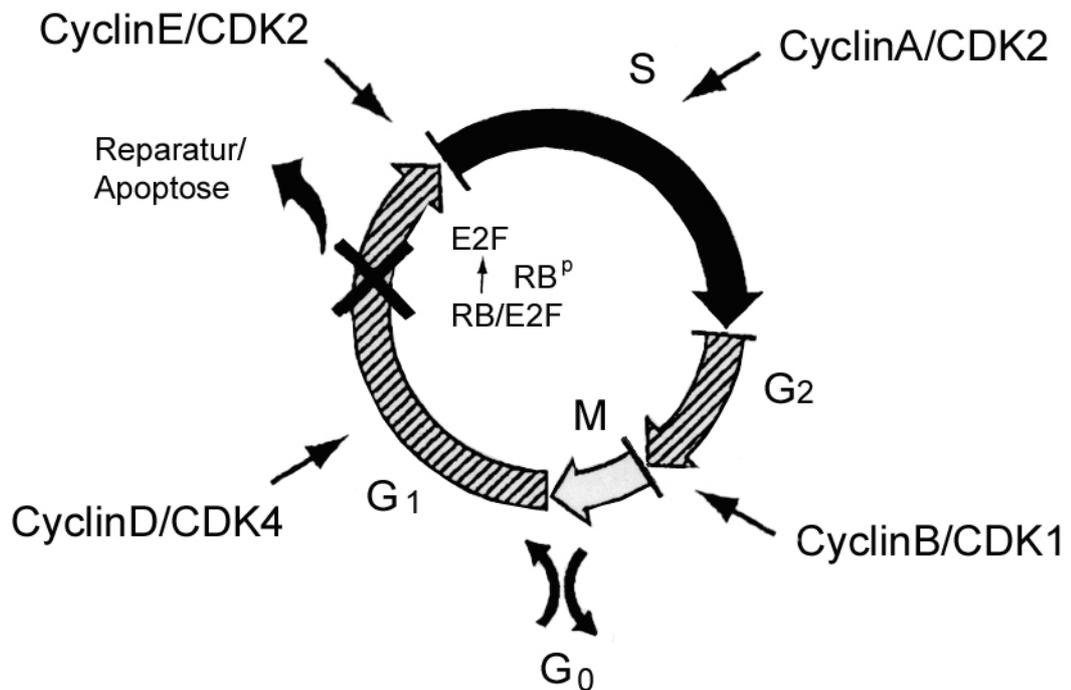


Abb. 2: Kontrolle der Progression des Zellzyklus durch Proteinkomplexe aus Cyclinen A-E und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs). Mit Erreichen der Maxima während verschiedener Phasen des Zellzyklus bilden Cycline mit den relativ konstant exprimierten CDKs Komplexe, welche durch Phosphorylierung spezifischer Zielproteine den Übergang von einer Zellzyklusphase zur nächsten regulieren. Das Protein p53 ist am Kontrollpunkt der G₁-Phase beteiligt. Erhöhungen der zellulären p53-Konzentration treten als Reaktion auf Schädigung der DNA auf, was in Abhängigkeit vom Zelltyp entweder zu G₁-Arrest oder Apoptose führt. Im unterphosphorylierten, aktiven Zustand formt Rb Komplexe mit DNA-bindenden Proteinen, wie den Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Bei Phosphorylierung von Rb stimulieren aus der Bindung entlassene E2F-Faktoren die Transkription zellulärer Gene, die an der Induktion der S-Phase beteiligt sind. (modifiziert nach CORDON-CARDO (41))

Die am besten definierten **Kontrollpunkte** sind der DNA-Schadens-Kontrollpunkt, DNA-Replikations-Kontrollpunkt und Spindel-Kontrollpunkt:

Ein **DNA-Schadens-Kontrollpunkt** ist ein Mechanismus, zur Erkennung fehlerhafter DNA. Hierbei wird ein Signal generiert, welches den Arrest der Zelle in der G₁-Phase des Zellzyklus, die Verlangsamung der DNA-Synthese, den Halt in der G₂-Phase und die Transkription von Reparaturgenen vermittelt. Die Position der Unterbrechung innerhalb des Zellzyklus variiert in Abhängigkeit von der Phase, in der der Schaden festgestellt wurde. Säugetiere haben dieselben Reaktionsmöglichkeiten des Zellzyklus auf DNA-Schädigung wie Hefen, hinzu kommt die Möglichkeit Apoptose einzuleiten.

Von den verschiedenen Schadens-Überwachungssystemen bei Säugetieren ist der **G₁/S-Phasen-Kontrollpunkt** in einigen Details verstanden: Entscheidenden Anteil an der Funktion dieses Kontrollpunktes hat das Tumorsuppressorgen *p53* (39). Genomische Läsionen durch ionisierende Strahlung (Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen) oder UV-Strahlung (Bildung von Pyrimidin-Dimeren) führen innerhalb kurzer Zeit zu einer Erhöhung der zellulären *p53*-Konzentration. Eine Konzentrationserhöhung von *p53* infolge Einwirkung genotoxischer Agenzien wird auch als „Aktivierung“ oder „Stabilisierung“ bezeichnet. Dabei ist zu beachten, dass in Abhängigkeit von der Art der Läsion unterschiedliche Signalwege die Stabilisierung von *p53* bewirken: DNA-Strangbrüche führen zu einer Aktivierung der **ATM-Kinase** (*ataxia teleangiectasia mutated*), durch UV-Licht oder Chemotherapeutika induzierte Schäden aktivieren die **ATR-Kinase** (*ataxia teleangiectasia related*). Die Übertragung von Phosphatgruppen auf *p53* verhindert dessen Degradation und trägt so zur Stabilisierung einer hohen *p53*-Konzentration bei. Eine Aktivierung von *p53* geht mit einem Arrest des Zellzyklus in der späten G₁-Phase einher. Ein Teil der Fähigkeit Zellen in der G₁-Phase anzuhalten resultiert aus der Initiierung der Transkription von *p21^{CIP}*, einem Inhibitor von CDKs, der den Eintritt in die S-Phase kontrolliert (43, 49). Hieraus wird eine Verbindung von *p53* mit Rb ersichtlich: Durch Inhibierung der betreffenden CDKs bleibt Rb in der hypophosphorylierten Form, was seinerseits die E2F-Funktion unterbindet. In dieser Situation kann *p53* im Signalweg als „stromaufwärts“ von Rb gelegen angesehen werden (50).

Der **DNA-Replikations-Kontrollpunkt** oder ***S phase completion checkpoint*** vermittelt die Blockade des Übergangs in die Mitose bei Störungen im Ablauf der S-Phase, wie z.B. ein Innehalten des DNA-Replikationsapparates, Erschöpfung von Synthese-essentiellen

Substraten und DNA-Schäden, welche von einer längeren Verzögerung der Synthese herrühren. Die Einleitung der Mitose wird verhindert solange das Genom nicht vollständig verdoppelt ist. Der zugehörige Sensor erfasst auf Replikation hinweisende DNA-Strukturen oder die Anwesenheit von Proteinkomplexen, die an der Replikation beteiligt sind (44, 51).

DNA-Replikations-Kontrollpunkt und der nachfolgend beschriebene G₂-Kontrollpunkt haben gemeinsam, dass sie den Eintritt in die Mitose blockieren. Der Unterschied liegt im auslösenden Signal. Der Regulation des G₂/M-Übergangs dienen sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Wege, von denen einige skizziert werden.

Enthalten Zellen mit abgeschlossener S-Phase fehlerhafte DNA, tritt der **G₂-Kontrollpunkt** in Kraft. Ein Teil der Mechanismen durch die p53 Zellen am G₂-Kontrollpunkt blockiert beinhaltet die Inhibierung von Cdc2. Diese Cyclin-abhängige Kinase der Hefen ist für die Einleitung der Mitose erforderlich. Viele grundlegende Erkenntnisse sind durch Untersuchungen an Hefen gewonnen worden; dabei wird oftmals für die Faktoren eine eigene Nomenklatur verwendet. Das entsprechende Enzym vielzelliger Organismen ist CDK 1. Für die Aktivierung von Cdc2 ist die Bindung an Cyclin B1 erforderlich. Sowohl das *cdc2*-Gen als auch das *cyclin B1*-Gen wird durch p53 unterdrückt. Cdc2 wird simultan durch die Proteine p21, Gadd45 und 14-3-3 σ inhibiert. Die Transkription der entsprechenden Gene wird durch p53 vermittelt. Zusätzlich zur Modulation der Cdc2-Aktivität beeinflusst p53 mehrere Gene mit Bedeutung für den G₂/M-Übergang: Durch Repression des Promotors wird DNA-Topoisomerase II herabreguliert. Infolgedessen wird ein G₂-Arrest verstärkt und der Eintritt in die Mitose blockiert. Dieses Enzym ermöglicht eine Entspannung verdrillter DNA durch Induktion von Doppelstrangbrüchen und hat Anteil an der Ausbildung des hoch kondensierten Zustandes der Chromosomen im Rahmen der Mitose. Auch durch p53-unabhängige Wege kann Cdc2 inhibiert werden. Die bereits vorgestellten Enzyme ATM und ATR aktivieren die Proteinkinasen Chk1 und Chk2 (*checkpoint kinase*), die ihrerseits Cdc25 inaktivieren. Cdc25 ist jene Phosphatase, die Cdc2 aktiviert (51).

Der **Spindel-Kontrollpunkt** verhindert das Einsetzen der Anaphase, also der eigentlichen Trennung der Schwesterchromatiden, falls der Spindelapparat nicht vollständig aufgebaut ist oder die Chromosomen nicht ordnungsgemäß ausgerichtet und mit der Mitosespindel verbunden sind. Es wird angenommen, dass der Spindel-Kontrollpunkt die korrekte Assoziation von Kinetochoren und Mikrotubuli überwacht. Ist diese gestört, dann bleibt die

Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden aufrechterhalten und die Mikrotubuli sind außerstande sich zu verkürzen. Folglich werden die Chromatiden nicht auf die opponierenden Zellpole verteilt. Ein Versagen dieses Kontrollpunktes ließe die Teilung von Zellen mit ungleich aufgeteilter genetischer Information zu (39, 44).

Kontrollpunkte überwachen also die Abläufe des Zellzyklus sowohl auf molekularer Ebene (präzise Replikation) als auch auf zellulärer Ebene (gleichmäßige Verteilung der Chromosomen) (44).

2.3 Tumorwachstum

2.3.1 Einflussgrößen des Tumorwachstums

Die Wachstumsrate eines Tumors wird von verschiedenen Einflussgrößen bestimmt:

- Länge des Zellzyklus
- Wachstumsfraktion
- Zellverlust

Teilungsaktive Tumorzellen durchlaufen den Zellzyklus nicht schneller als die Zellen des zugrunde liegenden Normalgewebes. Es wird hierzu die gleiche, in vielen Fällen sogar eine längere Zeit benötigt. So haben z.B. humane Knochenmarksstammzellen eine Zellzyklusdauer von ca. 18 h, wogegen neoplastische Zellen einer akuten myeloischen Leukämie 80 h zur Absolvierung des Zellzyklus benötigen. Die Länge des Zellzyklus ist insgesamt für die Bestimmung der Wachstumsrate eines Tumors von untergeordneter Bedeutung (46).

Größeren Einfluss auf die Wachstumsrate eines Tumors übt der Anteil sich teilender Zellen im Gewebe aus, die sog. Wachstumsfraktion. Die Faktoren, welche die Größe dieses Anteiles bestimmen sind im Detail noch nicht bekannt, dem Differenzierungsgrad des Tumors kommt jedoch mit Sicherheit eine bedeutende Rolle zu: In der Regel schließt eine vollständige Differenzierung ein Zurückkehren in den Zellzyklus aus. Daher ist in gut differenzierten Neoplasien ein großer Anteil der Zellen teilungsunfähig und das Wachstum entsprechend langsam. Untersuchungen zeigen, dass zu Beginn des Tumorwachstums, bevor die Neoplasie die Grenze der klinischen Nachweisbarkeit von ca. 10^9 Zellen (einer Masse von ca. 1 g entsprechend) erreicht hat, die Mehrheit der Zellen der Wachstumsfraktion angehören. Im

weiteren Verlauf wird der Anteil teilungsaktiver Zellen geringer, z.B. durch Eintritt in die G₀-Phase oder in Ermangelung an Nährstoffen, bis auch bei einigen schnell wachsenden Tumoren die Wachstumsfraktion bei nur noch etwa 20 % liegt (46, 52).

Die Imbalance zwischen Zellproliferation und Zellverlust ist die wichtigste Einflussgröße auf das Tumorwachstum. Dabei repräsentiert jede Verlustrate von unter 100 % ein Wachstum des Tumors (46).

Tumorzellen sterben im Verlauf von Differenzierung und Zellalterung, infolge chromosomaler und/oder biochemischer Alteration, Ischämie, inadäquater Nährstoffversorgung oder durch Erkennung und Angriff des Immunsystems. Ischämie ist eine der wichtigsten Ursachen für den Tod einer Tumorzelle: Zellen, die weiter als 100 bis 150 µm von einem kleinen Blutgefäß entfernt sind gehen zugrunde, da die Diffusion von Sauerstoff und anderer Substanzen im Gewebe nur über diese Strecke in ausreichendem Maße möglich ist. Somit ist für das weitere Wachstum eines soliden Tumors Angiogenese und damit Anschluß an das Blutgefäßsystem essentiell (46). Als Angiogenese bezeichnet man die Ausbildung neuer Gefäße aus bestehenden Gefäßen; dagegen versteht man unter Vaskulogenese die Gefäßneubildung im Verlauf der Embryonalentwicklung (43).

Im Laufe der Zeit erwerben viele Tumoren ein gesteigertes malignes Potential z.B. ein beschleunigtes Wachstum, Invasivität und die Fähigkeit zur Metastasierung. Diesem als Progression bezeichneten Phänomen liegt das Auftreten von Zellen mit neuen Eigenschaften zugrunde. Trotz eines in der Regel monoklonalen Ursprungs wird der Tumor bezüglich der Eigenschaften seiner Zellen heterogen. Manche Subklone sind nicht überlebensfähig oder werden durch Kontrollmechanismen des Wirtes eliminiert, andere dagegen erwerben in diskreten Schritten Wachstumsvorteile. Nach verbreiteter Ansicht ist diese klonale Evolution Ausdruck einer genetischen Instabilität, verursacht z.B. durch Inaktivierung von p53 (52).

2.3.2 Untersuchung der Tumorzellproliferation – methodische Betrachtungen

2.3.2.1 Grundlagen

Das Wachstum eines Tumors ist die absolute Zunahme der Zellzahl als Ausdruck des Ungleichgewichtes von Zellzugewinn durch proliferative Aktivität und Zellverlust durch Apoptose und Nekrose. Die proliferative Aktivität **P** lässt sich durch die Formel $P = G / T$ erfassen, dabei repräsentiert **G** die Wachstumsfraktion [%] und **T** die Generationszeit [h]; letztere ist umgekehrt proportional zur Geschwindigkeit mit welcher der Zellzyklus durchlaufen wird. Eine hohe proliferative Aktivität resultiert also aus einer hohen Wachstumsfraktion oder einer kurzen Generationszeit oder aus der Kombination beider Parameter (53).

In der veterinärmedizinischen Literatur überwiegen gegenwärtig Untersuchungen über die Proliferation von Tumorzellen. Vielgestaltige Studienansätze dienen der Erfassung einer Assoziation der durch verschiedene Methoden quantifizierten **Proliferation** und **Prognose**, **Grading**, **Therapieerfolg** oder **Diagnose** (54, 55).

Zwei Aussagequalitäten lassen sich unterscheiden:

- I. **Proliferationszustand**, ermittelt aus der Anzahl an Zellen, die sich zu einem beliebigen Zeitpunkt in einem bestimmten Zustand befinden
- II. **Proliferationsrate**, definiert durch die Anzahl an Zellen, die eine bestimmte Phase des Zellzyklus innerhalb einer vorgegebenen Zeitperiode passieren (56)

Im Folgenden werden einige Methoden zur Erfassung der Proliferation vorgestellt. Es ist dabei erforderlich, die zugrundeliegenden biologischen Prozesse zu betrachten, weil sich vergleichbare, nicht jedoch identische Resultate ergeben. Bei Zählung von Mitosefiguren und den Markern der DNA-Synthese wie z.B. BrdU sind die Zusammenhänge leicht ersichtlich. Bei AgNORs (argyrophile nicht-Histon-Proteine von Nucleolus-Organisator-Regionen), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und Ki-67-Immunfärbungen bleiben allerdings gewisse Unsicherheiten darüber, was genau gemessen wird (57).

2.3.2.2 Beispiele für Methoden, die der Erfassung des Proliferationszustandes dienen:

Mitose-Index

Zellen in der Mitose können lichtmikroskopisch am Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Routineschnitt identifiziert werden. Das Zählen von Mitosefiguren ist die älteste Methode um Proliferation in einem Gewebe zu erfassen. Meistens wird der Mitose-Index ausgedrückt als die Gesamtzahl an Mitosen in einer definierten Anzahl mikroskopischer Gesichtsfelder bei starker Vergrößerung, sog. *high power fields* (HPF). Die Angabe der im HPF erfassten Fläche ist notwendig, um eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten. Eine weitere Möglichkeit der Dokumentation ist die Angabe der Mitosen bezogen auf eine bestimmte Anzahl von Tumorzellen (z.B. 1000). Die Identifizierung von Mitosen kann Schwierigkeiten bereiten; es ist notwendig, strenge morphologische Kriterien anzuwenden, um nur eindeutige Kernteilungsfiguren in die Zählung aufzunehmen, pyknotische Kerne dagegen auszuschließen. Mitosen können definiert werden als dunkle Chromosomen-Kondensate, die bei Variation der Fokussierung lichtmikroskopisch häufig faserartige Extensionen erkennen lassen. Die Kernhülle ist aufgelöst und das Zytoplasma eher basophil als eosinophil. Um reproduzierbare, von Einflüssen des Untersuchers freie Daten zu erhalten, wurden automatisierte Verfahren entwickelt, die mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems Mitosen in z.B. durch die Feulgen-Reaktion gefärbten Schnitten quantifizieren. Die Feulgen-Reaktion ist ein spezifischer histochemischer Nachweis von DNA. Die Aussagekraft des Mitose-Index als Proliferationsmarker ist limitiert, denn zum einen werden - methodisch bedingt - nur jene im Zellzyklus befindlichen Zellen erfasst, die Kernteilungsfiguren erkennen lassen, zum anderen kann die Zeitdauer der Mitose stark variieren, insbesondere in Tumoren mit Abweichungen vom normalen Chromosomensatz. Aspekte, die für eine Vergleichbarkeit von Mitose-Indizes wichtig sind: standardisierte Schnittdicke und Färbung sowie eine rasche Fixierung des Gewebes. Mitoseprozesse können im exzidierten, inadäquat fixierten Gewebe weiterlaufen und abgeschlossen werden, während wenige – wenn überhaupt – eingeleitet werden. Dies führt u.U. zu einer beträchtlichen Unterbewertung der mitotischen Aktivität eines Tumors (53, 58-60).

Analyse von AgNORs (argyrophile nicht-Histon-Proteine von Nucleolus-Organisator-Regionen)

Ribosomen, jene zytoplasmatischen Organellen welche die Translation katalysieren, bestehen aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten, die aus ribosomaler RNA (rRNA) und einer Vielzahl von Proteinen zusammengesetzt sind. Hauptort der Ribosomen-Synthese ist der Nucleolus (Kernkörperchen): Es erfolgt hier die Bildung von rRNA-Vorläufermolekülen und Anlagerung ribosomaler Proteine. Diese Ribosomen-Vorstufen werden ins Zytoplasma transportiert und dort vollendet. Nucleolus-Organisator-Regionen (NORs) sind DNA-Schleifen, die rRNA-kodierende Gene in vielfach hintereinander angeordneten Kopien enthalten. NORs sind mit argyrophilen nicht-Histon-Proteinen (z.B. Nucleolin) assoziiert, den sog. **AgNOR**-Proteinen (61, 62). AgNORs stehen in Bezug zu DNA-Synthese und metabolischer Aktivität (53). Durch eine Versilberungstechnik, die am Paraffinschnitt in einem Schritt bei Raumtemperatur durchführbar ist, lassen sich die AgNORs als kleine schwärzliche Granula visualisieren (63). Die einfachste Methode der Auswertung ist die Auszählung der AgNORs pro Zellkern am Lichtmikroskop; als Methode der Wahl gilt jedoch die computergestützte Bildanalyse, durch die neben der Anzahl auch Größe und Verteilungsmuster erfasst werden können. Normale Zellen besitzen, ebenso wie nicht oder gering proliferierende Tumorzellen eine kleine Anzahl großer AgNORs, proliferationsaktive Zellen dagegen verfügen über mehr und kleinere AgNORs (64, 65). AgNORs sind als Proliferationsmarker bei Tumoren von Mensch und Hund weit verbreitet (66).

Immunhistologische Detektion Zellzyklus-assoziierter Antigene

Bei dieser Methode werden endogene, mit dem Ablauf des Zellzyklus gekoppelte Moleküle durch Einsatz spezifischer Antikörper am histologischen Schnitt detektiert. Die in ihrer Anwendung weiteste Verbreitung haben die im Zellkern lokalisierten Antigene PCNA und Ki-67. Darüber hinaus können zellmembranständige (z.B. der Transferrin-Rezeptor) oder zytoplasmatische Antigene (z.B. Zytoskelett-assoziierte Moleküle) zur Untersuchung der Zellproliferation herangezogen werden (57).

PCNA

Einleitung und Nomenklatur:

Das heute als PCNA bekannte Protein wurde Ende der 1970er Jahre von zwei Forschergruppen unabhängig voneinander identifiziert: MIYACHI et al. (67) fanden im Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes Autoantikörper gegen ein im Kern sich teilender Zellen lokalisiertes Protein und benannten es *proliferating cell nuclear antigen*. BRAVO und CELIS (68) stellten ein in der S-Phase des Zellzyklus synthetisiertes Protein durch zweidimensionale Gelelektrophorese dar und bezeichneten es als *cyclin*. Der Begriff „Cyclin“ ist heute für eine Gruppe von regulatorischen Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) reserviert. PCNA zeigt keine strukturellen Analogien zu den Cyclinen. CDK-Cyclin-Komplexe regulieren die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus (siehe Abschnitt 2.2) (44, 69).

Struktur/Charakteristika:

PCNA ist ein nukleares, saures nicht-Histon Protein mit einer Masse von 36 kDa (70) und Mitglied der evolutionär hoch konservierten *sliding clamp family* (sog. „Ringklemme“), welche z.B. auch die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III von *E. coli* beinhaltet. In Lösung formieren sich diese Proteine zu einer symmetrischen ringförmigen Struktur mit einer zentralen Öffnung, die weit genug ist, um eine DNA-Doppelhelix aufzunehmen. Dieser besondere Aufbau erlaubt ein Gleiten entlang des DNA-Gerüsts. Bei Eukaryoten bilden drei identische PCNA-Monomere das Ringklemmen-Protein; dabei stellt jedes Monomer drei in ihrer Spezifität und Topographie verschiedene Hauptbindungsregionen für eine Interaktion mit diversen Partnern zur Verfügung. Die äußere Oberfläche wird aus β -Faltblättern und die innere Auskleidung aus α -Helices gebildet. (62, 71-74).

Expression während des Zellzyklus:

PCNA wird in der späten G₁- und S-Phase synthetisiert und erreicht in der G₂-Phase ein Plateau. Die Halbwertszeit von PCNA liegt bei 16-20 h (75-77). Daher ist es möglich, dass auch in Zellen, die den Zellzyklus kürzlich verlassen haben, PCNA mit immunhistologischen Methoden detektierbar ist. In Zellen, die sich seit längerem in Quieszenz befinden, ist PCNA durch die Immunhistologie nicht festzustellen; allerdings ergaben molekularbiologische

Analysetechniken bei diesen Zellen ca. 10% jener PCNA-Mengen, die bei im Zellzyklus befindlichen Zellen messbar sind (57, 77, 78).

Zellzyklus-unabhängige Expression:

Frühe immunhistochemische Untersuchungen mit PCNA-spezifischen Antikörpern deuteten auf eine Beteiligung von PCNA bei DNA-Reparaturprozessen hin. Nach UV-Bestrahlung konnte eine intensive Anfärbung der Kerne festgestellt werden, obwohl sich die Zellen nicht in der S-Phase des Zellzyklus befanden (79, 80).

In histopathologisch normalem Gewebe, welches an bestimmte Tumorarten (z.B. Mammakarzinom) angrenzt, lässt sich in eine gesteigerte PCNA-Immunoreaktivität in Zellen nachweisen, die sich nicht im Zellzyklus befinden. Es wird angenommen, dass durch den Tumor synthetisierte Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (*platelet-derived growth factor*) eine Stabilisierung der PCNA mRNA induzieren, die ihrerseits in einer erhöhten PCNA-Expression resultiert.

In Anwesenheit von Hydroxyharnstoff, einem Zytostatikum welches die DNA-Synthese inhibiert, kommt es zu einer Akkumulation von PCNA (57, 70, 81).

Lokalisation:

Für die immunhistologische Darstellung steht ein weitgefächertes Angebot an Antikörpern zur Verfügung. Der in der vorliegenden Studie benutzte monoklonale Antikörper PC10 und weitere verwandte Antikörper werden durch Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem PCNA der Ratte aus *E. coli* gewonnen. Es werden unterschiedliche Epitope erkannt, die je nach Art des verwendeten Fixatives Unterschiede in der Detektierbarkeit aufweisen (77, 82). Zusätzlich ist die Zeitdauer der Fixation zu beachten; so kann eine verlängerte Fixierung mit Formalin die PC10-Immunoreaktivität reduzieren (48h) oder fast vollständig unterbinden (72h). PC10-Färbung ist fast ausschließlich auf den Zellkern beschränkt und zeigt ein diffuses und/oder granuläres Muster. Während der Mitose liegt üblicherweise eine diffuse Anfärbung der gesamten Zelle vor, was mit der Auflösung der Kernhülle in dieser Phase begründet wird. Eine zytoplasmatische Färbung in anderen Zellzyklusphasen ist selten zu beobachten, diese wird von einigen Autoren als Ausdruck zytoplasmatischer Synthese oder Degradation interpretiert (70).

Funktion:

Die hervorstechende Eigenschaft von PCNA ist die Fähigkeit mit multiplen Partnern zu interagieren. PCNA kommt in Säugetierzellen eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle einer Vielzahl von Reaktionen zu, indem es die Funktion dieser Partner räumlich und zeitlich organisiert. Viele der Proteine, die mit PCNA zusammenwirken (*PCNA-interacting proteins*, PIPs) enthalten ein spezielles Bindemotiv, die *PIP-box* (83). PIPs können verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet werden (74):

- DNA-Replikation
- DNA-Reparatur
- Zellzyklus-Kontrolle
- Chromatin-Metabolismus
- Genexpression
- Schwester-Chromatin-Kohäsion
- Apoptose

DNA Replikation: PCNA übernimmt im Rahmen der DNA-Replikation mehrere Aufgaben. Ausgangspunkt der Replikation ist ein kurzes RNA-Stück mit einem 3'-OH-Ende, der sog. Primer. Dieser wird durch DNA-Polymerase (Pol) α / Primase synthetisiert. Für die Verlängerung der Nukleotidkette des Vorwärts- oder Führungsstranges ist Pol δ zuständig. PCNA dient diesem Enzym als Prozessivitätsfaktor. Die Prozessivität einer DNA-Polymerase wird von der Anzahl der Nukleotide bestimmt, die durchschnittlich an die wachsende DNA-Kette angefügt wird bevor das Enzym abdissoziiert. PCNA und seine Homologe steigern die Prozessivität einer Polymerase durch Beteiligung an Protein-Protein Interaktionen mit seiner äußeren Oberfläche und Befestigung der Polymerase an die DNA. Es wird so die Dissoziation der Polymerase während des Fortschreitens entlang der Matrize verhindert. PCNA benötigt, um an seinen Wirkort zu gelangen, den Ladungsfaktor RF-C (*replication factor C*). RF-C erkennt die Primer-Enden in DNA-Substraten und belädt die DNA mit der Ringklemme; dabei ist der Mechanismus durch den das PCNA-Trimer um den Primer herum zusammengesetzt wird noch in weiten Zügen unbekannt (69, 72, 74, 84). Pol α / Primase ist neben der Primer-Synthese auch an der Bildung der Okazaki-Fragmente des Rückwärts- oder Verzögerungsstranges beteiligt. Die Weiterführung und Vervollständigung der

diskontinuierlichen DNA-Synthese wird von Pol δ oder Pol ϵ übernommen. Sowohl die Initiation der Synthese des Vorwärtsstranges als auch die diskontinuierliche Synthese des Rückwärtsstranges erfordert ein Umschalten von Pol α auf Pol δ (oder Pol ϵ). Dieser Vorgang wird maßgeblich von PCNA koordiniert (74, 85). PCNA dient auch als Prozessivitätsfaktor der Pol ϵ , allerdings kann dieses Enzym auch ohne PCNA hoch prozessiv wirken. Bei Reparaturprozessen und Replikation übernimmt Pol ϵ wichtige Funktionen, wobei nicht vollständig geklärt ist, wie bei der Kettenverlängerung im Rahmen der Replikation die Arbeitsteilung mit Pol δ organisiert ist (62, 69). Pol δ oder Pol ϵ führen die Synthese der Okazaki-Fragmente fort, bis das 5'-Ende des vorausliegenden Primers erreicht ist. Anschließend werden Wasserstoffbrücken zwischen Primer und Matrizenstrang durch verdrängende DNA-Synthese (*displacement synthesis*) gelöst. Es ist nun erforderlich den Primer zu entfernen, die Lücke zu aufzufüllen und die Abschnitte zu verknüpfen. In diese Prozesse sind die PCNA-bindenden Proteine Fen1 (*flap-endonuclease*) und Lig1 (*dna-ligase*) involviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Fen1 durch PCNA stimuliert wird (86, 87).

DNA-Reparatur: DNA kann durch endogene und exogene Einflüsse alteriert werden. Wird ein genomischer Schaden erkannt, folgt die Aktivierung eines der Art der Läsion angemessenen Mechanismus:

- Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem
- Basen-Exzisionssystem
- Mismatch-Reparatursystem
- DNA-Doppelstrangbruch Reparaturssysteme

Die genannten Wege der DNA-Reparatur beinhalten einen DNA-Syntheseschritt von Pol δ oder Pol ϵ , was eine Beteiligung von PCNA indiziert. Neben dieser Rolle als Prozessivitätsfaktor übernimmt PCNA eine Vielzahl anderer Funktionen, die zusammenfassend betrachtet der Rekrutierung und Koordination spezifischer Faktoren dienen (74, 88, 89). *Translesion synthesis* (TLS) ist ein Weg Schäden zugunsten der DNA-Integrität zu tolerieren, indem die DNA-Synthese mit Hilfe spezialisierter Polymerasen über die Schadensstelle hinweg geführt wird. Dieser Weg ist für die S-Phase von Bedeutung, da die replikativen DNA-Polymerasen außerstande sind, beschädigte DNA zu überbrücken und es

daher zu einem Innehalten der Replikationsgabel an der Läsion kommt. Ein Stop der Replikationsgabel kann zu Doppelstrangbrüchen führen, was entweder eine fehleranfällige Reparatur oder Apoptose auslöst. Um derartig drastische Konsequenzen zu vermeiden, können Zellen replikative Polymerasen durch TLS-Polymerasen ersetzen, welche die Fortsetzung der DNA-Synthese durch Einfügen eines Nukleotids mit einer 3'-OH-Gruppe ermöglicht. Beispielfür TLS-Polymerasen sind zu nennen: Pol η , Pol ι , Pol κ und Pol λ . *Translesion synthesis* bedarf des koordinierten Zusammenspiels dieser spezialisierten Polymerasen und der replikativen Pol δ und Pol ϵ . PCNA wird bei diesen Prozessen die Rolle des zentralen organisatorischen Elementes zugesprochen (74, 90).

Die Assoziation von PCNA mit DNA-Reparaturprozessen zeigt, dass eine Expression von PCNA nicht notwendigerweise mit einer DNA-Synthese im Zusammenhang mit der S-Phase des Zellzyklus verknüpft ist. Da in vielen Tumoren DNA-Reparaturprozesse stattfinden, kann PCNA auch in nicht-proliferierenden Zellen hochreguliert sein. In einigen Tumoren erwiesen sich 100% der Zellen als PCNA-positiv. Deshalb wird PCNA nach einer Phase der Popularität nicht mehr uneingeschränkt als ein zuverlässiger Proliferationsmarker angesehen (53, 78).

Zellzyklus-Kontrolle: PCNA bindet sowohl an Cyclin/CDK-Komplexe, welche Übergang und Progression der Zellzyklusphasen regulieren, wie auch an den CDK-Inhibitor p21^{CIP}. Die Menge an p21^{CIP} nimmt bei Schädigung der DNA durch Aktivierung von p53 zu. Dies führt zu einer Blockade des Übergangs von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus durch Inhibierung der Kinase-Aktivität. Des Weiteren bindet p21^{CIP} direkt an PCNA und hemmt so die prozessive DNA-Synthese. Die Bindung von PCNA an Cyclin/CDK-Komplexe könnte dazu dienen, letztere ihren Zielproteinen zuzuleiten (74, 91-93).

Chromatin-Metabolismus: Einige PCNA-interagierende Proteine sind an der Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur beteiligt. So bindet z.B. CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*) an PCNA und wirkt als molekulares Chaperon (Hilfsprotein) bei Anlagerung der Histone H3 und H4 an neusynthetisierte DNA. PCNA kommt bei diesem Prozeß die Rolle der Markierung neusynthetisierter DNA für die Chromatin-Zusammenlagerung zu (94). Der Bindung von PCNA an p300, einem Coaktivator mit Histon-Acetyl-Transferase Funktion, wird eine wichtige Aufgabe bei der Umgestaltung der

Chromatinstruktur an DNA-Schäden zugeschrieben. Diese Strukturänderung soll die Funktion von PCNA im Rahmen der DNA-Reparatur erleichtern (95).

Genexpression: Methylierung von Cytosin in sog. „CpG-Inseln“ (Dinukleotidfolgen von Cytosin und Guanin) des Säugetiergenoms beeinflusst die Genexpression, so sind z.B. häufig CpG-Inseln in Promotoren stillgelegter Gene methyliert. Für die Weitergabe des Methylierungsmusters während der Replikation ist eine spezifische Methyltransferase (MeCTr) nötig. An dieses Enzym bindet PCNA, und es wird gefolgert, dass der Erhalt des Methylierungsmusters auch von PCNA abhängig ist (62, 96).

Apoptose: p53 induziert neben p21 auch Gadd45 (*growth arrest and damage dependent*). Der Name ist Ausdruck der Beobachtung, dass bei Wachstumsstop und DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung die Transkription des Gadd45 Gens gesteigert wird. Die Interaktion von Gadd45 mit PCNA führt zum Arrest des Zellzyklus (97) und behindert eine Induktion von Apoptose (98).

Ki-67 Protein

Einleitung und Nomenklatur:

Das Ki-67 Protein wurde erstmals durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 detektiert. Der Name leitet sich von der Stadt des Ursprungs (Kiel) und der Nummer des Originalklons ab. Ki-67 entstammt Mäusen, die mit Kernen der Hodgkin–Lymphom Zelllinie L428 immunisiert wurden (99). Neben dem ursprünglichen Antikörper Ki-67, der nur zur Anwendung an unfixiertem Gewebe von Mensch und Primaten geeignet ist, wurden zusätzliche Antikörper entwickelt, die das Speziesspektrum erweitern und das Ki-67 Protein bzw. sein Äquivalent auch im fixierten Gewebe nachweisen: MIB-1 (Mensch, Primaten, Hund, Rind, Schaf, Pferd), MIB-5 (Ratte) und TEC-3 (Maus) (100). MIB-1 hat eine weite Verbreitung erfahren und wird als verlässlicher Marker für proliferierende Zellen eingeschätzt (53).

Struktur/Charakteristika:

Im Jahre 1993 wurde die für das Ki-67 Protein kodierende cDNA-Sequenz veröffentlicht und zwei, durch alternatives Spleissen des primären Transkriptionsproduktes generierte, Protein-Isoformen mit einer molekularen Masse von 320 und 359 kDa beschrieben. Sie enthalten eine zentrale Region mit 16 repetitiven Elementen (*Ki-67 repeats*), welche durch ein Exon von 6845 bp kodiert wird. Innerhalb dieser repetitiven Elemente befindet sich das *Ki-67 motif* FKELF, eine hochkonservierte Region, die das durch den MIB-1 Antikörper erkannte Epitop beinhaltet (F=Phenylalanin, K=Lysin, E=Glutamat, L=Leucin) (101, 102). Zehn mutmaßliche *nuclear targeting signals* wurden aus der Aminosäuresequenz des Ki-67 Proteins vorhergesagt – in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass während der Interphase das Protein ausschließlich im Zellkern zu detektieren war. Es handelt sich hierbei um kurze Aminosäurefolgen (Importmotive) die durch spezielle Rezeptoren oder Bindeproteine erkannt werden und so den Transport des Proteins in den Zellkern vermitteln (62, 103-105). Das gesamte Ki-67 Gen umfaßt annähernd 30000 bp (106). Neuere Untersuchungen zeigten weitere Spleiss-Produkte bei humanen und murinen Zelllinien (100).

Expression während des Zellzyklus:

Es wird angenommen, dass die Menge an Ki-67 Protein im Verlauf des Zellzyklus einer präzisen Regulation mittels abgestimmter Synthese- und Degradationssysteme unterliegt; möglicherweise mit Beteiligung von Proteasomen, deren Rolle beim Abbau von Ki-67 Protein nachgewiesen werden konnte (100, 107).

Das Ki-67 Protein ist im Kern normaler und neoplastischer Zellen in der G₁, S, G₂ und M-Phase des Zellzyklus detektierbar. G₀-Zellen sind Ki-67 negativ (108). Untersuchungen über die relative Expression in der G₁-Phase ergaben kontroverse Ergebnisse: Einige Autoren beobachteten den Beginn des Anstiegs der Ki-67 Färbung in der späten G₁-Phase (109, 110) während andere einen Abfall bis zum Einsetzen der DNA Synthese feststellten (111, 112). Dieser Widerspruch kann teilweise durch eine Hypothese gelöst werden, die drei verschiedene Wege innerhalb der G₁-Phase vorschlägt (113):

Weg 1) in dessen Verlauf die Ki-67 Färbung absinkt und schließlich zum Ausscheiden aus dem aktiven Zellzyklus führt (G₀-Phase). Erfahren auf diesem Weg befindliche Zellen eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren, können sie

Weg 2) einschlagen, der zur S-Phase führt und durch einen Anstieg von Ki-67 Protein gekennzeichnet ist.

Zellen im Verlauf von Weg 3) exprimieren eine konstante Ki-67 Intensität; dieser Weg korrespondiert mit optimalen lokalen Wachstumsbedingungen.

Während der S und G₂-Phase steigt die Intensität der Ki-67 Färbung an und erreicht ihr Maximum in der Metaphase der Mitose. Im Verlauf von Anaphase und Telophase beginnt der Rückgang der Intensität (110, 111, 113).

Die Halbwertszeit des Proteins wird auf 60 – 90 min veranschlagt (114, 115).

Lokalisation:

Die intrazelluläre Lokalisation von Ki-67 Protein ist im Verlauf des Zellzyklus auffälligen Veränderungen unterworfen. In der sehr frühen G₁-Phase wurde das Ki-67 Protein an Satelliten-DNA in den Centromer- und Telomer-Bereichen von Chromosomen lokalisiert. Im weiteren Verlauf der G₁-Phase nimmt die Assoziation mit Satelliten-DNA ab und Ki-67 Protein wird in die sich formierenden Nucleolen integriert (116-118). Untersuchungen über die Verteilung von Ki-67 Protein in S und G₁-Phase hatten uneinheitliche Ergebnisse: Einerseits wurde eine auf die Nucleolen beschränkte Ki-67 Färbung festgestellt, andererseits über eine zusätzliche diffuse und fokale nucleoplasmatische Verteilung berichtet (110, 116). In der Prophase erfolgt eine Reorganisation des Ki-67 Proteins und es wird in Verbindung mit dem kondensierenden Chromatin als feines Maschenwerk detektierbar. In der Metaphase zeigen die Chromosomen eine intensive Ki-67 Färbung (119). Nach Auflösung der Kernmembran kann ein Anteil des Ki-67 Protein auch diffus verteilt im Zytoplasma nachgewiesen werden (110).

Die beschriebenen örtlichen Veränderungen der Ki-67 Immunreaktion könnten nach Ansicht einiger Autoren nur zu einem Teil durch eine tatsächliche Umverteilung des Ki-67 Proteins bedingt sein. Es wird die Möglichkeit einer Maskierung des FKELF-Motives in Betracht gezogen, da die Färbintensität durch den verwendeten Puffer oder DNA-Bindung beeinflusst wird. Komplexbildung oder Konformationsänderungen des Ki-67 Proteins könnten die Wechselwirkung von Antigen und Antikörper beeinflussen und sich in einem variierenden Färbemuster widerspiegeln (100). Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Proliferations-Index von Zellen mit einer massiven Expression von Ki-67 Protein oder bei

einer großen Anzahl an Zellen in G₁-Phase aufgrund eines niedrigen immunhistochemischen Ki-67 Index unterbewertet werden kann. Ein derartiger Zusammenhang wurde für Primärtumoren am kolorektalen Adenokarzinom unter Verwendung von MIB-1 gezeigt. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Phänomen auch bei anderen Tumoren auftreten kann. Als Modell wird eine durch die Fähigkeit zur Eigenbindung bedingte Strukturvariabilität vorgeschlagen: In der geschlossenen Form ist der N-Terminus an die *repeat*-Region gebunden, in der offenen Form dagegen nicht. In der geschlossenen Form sind zumindest einige der *repeats* gegen eine Interaktion mit DNA oder Proteinen geschützt und demzufolge für MIB-1 zugänglich. In der offenen Form sind alle FKELF-Motive an Wechselwirkungen beteiligt und einem immunhistochemischen Nachweis durch MIB-1 entzogen (101).

Funktion:

Trotz der umfangreichen Informationen über Struktur und Lokalisation des Ki-67 Proteins ist über dessen Funktion bislang wenig bekannt. Der Mangel an ersichtlichen Homologien mit Proteinen bekannter Funktion verhindert, dass durch einen Vergleich diesbezüglich Rückschlüsse gezogen werden können (100). Jedoch wird eine essentielle Rolle für den Ablauf der Zellproliferation angenommen: Eine Hemmung von Ki-67 Protein auf verschiedenen Ebenen z.B. Inkubation mit zur Ki-67 mRNA komplementären Oligonukleotiden oder Mikroinjektion von spezifischen Antikörpern resultierte in einer Inhibierung der DNA-Synthese bzw. einem Absinken der Zellteilungsrate (102, 109). Aufgrund der Fähigkeit des Ki-67 Proteins an DNA und RNA zu binden sowie mit anderen Proteinen zu interagieren nehmen einige Autoren eine strukturelle Funktion innerhalb des Nucleolus an. Die Lokalisation des Ki-67 Protein innerhalb der dichten fibrillären Komponente (DFC) des Nucleolus, jener Struktur in der sich die rRNA Prozessierung vollzieht, legt eine essentielle Funktion bei der Bildung von Ribosomen nahe (120). Untermuert wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Rate der Proteinsynthese positiv mit der Expression von Ki-67 Protein korreliert ist (121). Während der frühen G₁-Phase des Zellzyklus ist Ki-67 Protein extranucleolär mit Satelliten-DNA assoziiert, was auf eine Rolle in der DNA – Organisation hinweist (117).

Inkorporation von Bromodeoxyuridin (BrdU)

Zellen in der G_1 -, S- und G_2 -Phase lassen sich mikroskopisch am routinemäßig gefärbten Präparat nicht unterscheiden. Zum Nachweis DNA-replizierender Zellen der S-Phase wird das modifizierte Nukleotid BrdU eingesetzt, welches anstelle von Thymidin eingebaut wird. Diese Markierungsmethode ist also nur bei lebenden Gewebe einzusetzen, entweder *in vivo* mit i.v. BrdU-Applikation einige Stunden vor der Tumorsektion, oder *in vitro* an einer umgehend nach Gewebeentnahme angelegten und mit BrdU inkubierten Kultur. Im Anschluß wird das Gewebe fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Visualisierung der S-Phase Zellen erfolgt durch einen monoklonalen, gegen BrdU gerichteten Antikörper. Durch Auszählung wird der BrdU labeling index (LI) erstellt, der den prozentualen Anteil von Zellen in der S-Phase bezogen auf alle Tumorzellen wiedergibt (122).

2.3.2.3 Beispiel für eine Methode zur Erfassung zeitlicher Abläufe des Zellzyklus:

Durchflußzytometrie (flow cytometry):

Das Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers besteht darin, dass Zellen oder Zellkerne in einer Suspension nacheinander eine Meßkammer passieren. In der Kammer regt ein Laserstrahl gebundene Fluoreszenzfarbstoffe zur Emittierung von Licht an. Diese Lichtsignale werden in mit der Intensität korrelierende elektrische Impulse umgewandelt und nachfolgend ausgewertet (123). Eine gängige Methode zur Untersuchung zellkinetischer Parameter in Tumorgewebe ist die präoperative i.v. Bolusinjektion von BrdU. Das gewonnene Gewebe wird mechanisch und enzymatisch in eine Zellkernsuspension überführt. Ein zugesetzter primärer Antikörper bindet an das während der DNA-Synthesephase eingebaute BrdU. Der Primärantikörper wird seinerseits durch einen sekundären, mit einem Fluorochrom konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Im Anschluß wird die DNA aller Kerne markiert, z.B. mit dem interkalierenden Farbstoff Propidiumjodid. Letzteres ermöglicht die Erfassung des individuellen DNA-Gehaltes, der je nach Kompartiment verschieden ist: diploid in G_0 und G_1 –Phase, tetraploid in G_2 und M –Phase und intermediär in der S-Phase. Darüber hinaus können Abweichungen im Chromosomensatz von Tumorzellen charakterisiert werden (**Ploidiegrad**). Die im Durchflußzytometer erhobenen Daten von DNA-Gehalt und BrdU-Aufnahme liefern die Grundlage für die Bestimmung der Dauer der S-Phase T_s [h] und des Anteils der DNA-synthetisierenden Zellen **BrdU LI** [%]. Diese Werte sind die Basis für

die Berechnung der potentiellen Tumorverdoppelungszeit T_{pot} , ein relatives Maß des Tumorwachstums. T_{pot} ist definiert als die Zeit, die für eine Verdoppelung der Anzahl der Tumorzellen benötigt wird, unter der Annahme, dass keine Zellen zugrunde gehen. In die Kalkulation gehen je nach zugrundeliegendem Berechnungsmodell unterschiedliche Korrekturfaktoren ein. Deren Zweck ist der Ausgleich von Abweichungen, die durch Unterschiede in der Zeitdifferenz zwischen BrdU-Applikation und Resektion entstehen (124-126).

2.4 Molekulare Onkologie

2.4.1 Begriffsbestimmungen und Grundlagen

Onkogene: Nach heutigem Verständnis kodieren **Protoonkogene** Proteine, die als Element von Signalwegen Vorgänge der Zellproliferation, Differenzierung und Entwicklung steuern. Unter physiologischen Bedingungen wird z.B. das Zellwachstum stimuliert, um den Erfordernissen des Zellumsatzes von Haut, Gastrointestinaltrakt und Blut zu genügen.

Protoonkogene können z.B. durch chemische Kanzerogene verändert werden und tragen - bei mutationsbedingter Dysregulation oder Überexpression - zur Tumorentstehung bei: Betroffene Zellen zeigen auch in Abwesenheit von Wachstumssignalen eine kontinuierliche Proliferationsaktivität oder entziehen sich dem Zelltod. Solche alterierten Protoonkogene werden **zelluläre Onkogene (c-onc)** genannt. Als **v-onc** bezeichnet man Onkogene akut transformierender Retroviren. Onkogene werden als dominant wirkende Gene bezeichnet, da die Mutation eines Allels typischerweise ausreicht, um über das veränderte Produkt oder gesteigerte Expression (**gain of function**) zu einem neoplastischen Phänotyp beizutragen. Diese Mutationen stellen einen Letalfaktor in der Fetalentwicklung dar und sind deshalb nicht an vererbten Krebsprädispositionen beteiligt. Beispiele: *Ras*-Mutationen lassen sich in Pankreas- und Kolonkarzinomen feststellen, *Bcl-2* ist in Lymphomen durch Mutation aktiviert vorzufinden. Die Entdeckung genetisch dominanter, „aktivierter“ Onkogene legte die Vermutung nahe, dass eine Klasse von „Anti-Onkogenen“ deren Wirkung entgegensteht und die Tumorentwicklung hemmt (13, 46, 49).

Tumorsuppressorgene: Diese Gene regulieren diverse zelluläre Aktivitäten wie Reaktionen von Zellzyklus-Kontrollpunkten, Detektion und Reparatur von DNA-Schäden, Ubiquitinierung und Degradation von Proteinen, mitogene Signalwege, Zell-Spezifizierung und –Differenzierung, Migration und Tumor-Angiogenese. Dies illustriert das weite Spektrum autonomer Prozesse, die in Tumorzellen dereguliert sein können.

Tumorsuppressorgene sind an der Limitierung der Zellzahl durch Inhibierung der Zellzyklusprogression oder Einleitung der Apoptose beteiligt. Die Zelle verfügt über eine Vielzahl dieser „Bremsen“. Funktionsverlust mehrerer Tumorsuppressorgene hat die Umbildung in eine maligne Tumorzelle zur Folge. Ungeachtet der Kenntnisse über die biochemischen Funktionen besteht noch kein tieferes Verständnis darüber, warum viele Tumorsuppressoren mit bestimmten Krebsarten assoziiert sind. Möglicherweise intensiviert ein Mangel an funktioneller Redundanz von Signalwegen in bestimmten Zellpopulationen die Konsequenzen einer Tumorsuppressorgen-Inaktivierung (13, 49).

Für die tumorpräventive Wirkung ist normalerweise die Anwesenheit nur eines funktionstüchtigen Tumorsuppressorgens erforderlich. Die Mutation eines Allels verursacht einen Funktionsverlust (*loss of function*), verhält sich aber bezüglich des Wildtyp-Allels rezessiv. Demnach bedarf es für die Inaktivierung prototypischer, rezessiver Tumorsuppressorgene zweier Ereignisse, die beide Allele außer Funktion setzen (*two-hit inactivation*). Aufgrund der Rezessivität verursacht ein mutiertes Allel keine Schädigung des Fetus und kann vererbt werden – eine Hauptursache für ererbte Krebsprädispositionen (46, 127). Die typische Konstellation einer biallelen Geninaktivierung beinhaltet ein vererbtes mutiertes Allel und eine somatische Mutation, die den Funktionsverlust des zweiten Allels herbeiführt. Diese Zusammenhänge definieren drei grundlegende Eigenschaften „klassischer“ Tumorsuppressorgene:

- 1) Sie sind rezessiv und durchlaufen eine biallele Inaktivierung in Tumoren.
- 2) Die Vererbung eines einzelnen mutierten Allels verstärkt die Tumoranfälligkeit, weil für den kompletten Verlust der Genfunktion nur noch eine weitere Mutation erforderlich ist.
- 3) Dasselbe Gen ist häufig in sporadischen Tumoren inaktiviert.

Als das erste „klassische“ Tumorsuppressorgen wird *Rb* betrachtet. Das für das Rb Protein codierende Gen ist in humanen Retinoblastomen inaktiviert (13, 128).

Konzept der Haploinsuffizienz (*one-hit inactivation*)

Aufgrund ihrer rezessiven Natur besteht der herkömmliche Ansatz zur Identifikation von Tumorsuppressorgenen in der Lokalisation kleiner Chromosomenabschnitte mit einem *loss of heterozygosity* (LOH). Es handelt sich um einen Verlust von Allelen auf einem Chromosom, der durch DNA-Marker nachgewiesen wird, für die ein Individuum heterozygot ist. Nachfolgend wird die entscheidende Region eingegrenzt und das intakte homologe Chromosomensegment nach mutierten Genen durchsucht, deren Wildtyp-Funktion sich als protektiv gegen Tumorbildung demonstrieren lässt. Diese Vorgehensweise ist zum Scheitern verurteilt, wenn das zweite Allel epigenetisch stillgelegt ist oder das betreffende Gen haploinsuffizient bezüglich der Tumorsuppression ist. In dieser Situation bedingt schon der Funktionsverlust nur eines Allels einen Selektionsvorteil für Tumorwachstum. Haploinsuffizienz gestattet die klonale Expansion von Zellen, die ein mutiertes Tumorsuppressor-Allel tragen und vergrößert so die Population an Zielzellen für weitere Mutationen (13, 129).

Bei Tumoren mit Mutation eines *p53*-Allels und dem Erhalt eines Wildtyp-Allels wird angenommen, dass das mutierte Genprodukt die Funktion des Produktes des Wildtyp-Allels hemmt (sog. **dominant-negative Wirkung**). Dies wird auf die Ausbildung oligomerer Komplexe zwischen Wildtyp-*p53* und mutiertem *p53* Protein zurückgeführt (130, 131).

Gentechnisch entwickelte Mäuse, die nur über ein *p53* Wildtyp-Allel verfügen (*p53 +/-*), zeigen eine deutlich höhere Tumor-Inzidenz als Mäuse mit zwei funktionellen *p53* Allelen (*p53 +/+*). Erstere entwickeln Tumoren in denen zum Teil Wildtyp *p53* erhalten bleibt und normales, funktionelles *p53* Protein exprimiert wird. Diese Untersuchung liefert Hinweise darauf, dass aus einer Reduktion der *p53*-„Dosis“ um 50 % Bedingungen für die Zelle resultieren, die weitere kooperierende onkogene Läsionen und die Entwicklung eines Tumors begünstigen (*gene dosage effect*). Eine mögliche Erklärung ist, dass *p53* in erster Linie als Tetramer funktionell aktiv ist. Bei einer Halbierung des *p53* Proteinspiegels kann die effektive Konzentration an Tetrameren, in Abhängigkeit von der gegenseitigen Affinität der *p53* Monomere, mehr als halbiert sein. Für eine beschleunigte Tumorentstehung ist der Funktionsverlust beider *p53* Allele also keine notwendige Voraussetzung und entsprechend

kann dieses Tumorsuppressorgen als eine Ausnahme vom klassischen „two-hit“-Modell angesehen werden (132).

Mäuse mit einer Haploinsuffizienz des Tumorsuppressorgens *PTEN* (*phosphatase and tens homolog deleted on chromosome ten*) zeigen ein beschleunigtes Tumorwachstum. Der Verlust eines *PTEN*-Allels bei Erhalt des zweiten ist in Tumoren des Menschen eine übliche Konstellation. Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist jedoch noch Gegenstand von Kontroversen (133).

Tumorsuppressoren wie *p53* und *PTEN* können haploinsuffiziente Effekte zeigen, insbesondere in Kombination mit weiteren mutierten Tumorsuppressoren oder Onkogenen (13).

Bislang wurden nur einige wenige haploinsuffiziente Tumorsuppressoren identifiziert, was Vermutungen zufolge nicht ihre tatsächliche Anzahl, sondern eher die Schwierigkeiten sie aufzufinden widerspiegelt (13).

Reparaturgene: Diese Gene kontrollieren im Gegensatz zu Onkogenen und Tumorsuppressorgen nicht die Proliferation oder den Tod von Zellen, sondern sie überwachen die Mutationsrate aller Gene. Wenn Reparaturgene selbst mutiert sind, steigt die Rate an Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgen, was der Initiation und Progression eines Tumors Vorschub leistet. So führt beispielsweise die Inaktivierung von Genen des Nukleotid-Exzisions-Reparatursystems oder Mismatch-Reparatursystems zu Empfänglichkeit für Haut- und Kolontumoren (49).

2.4.2 Tumorsuppressorgene

2.4.2.1 p53

Historie

Das p53 Protein wurde in den späten 1970er Jahren entdeckt als ein nukleäres 53 kDa Phosphoprotein, gebunden an das *large transforming antigen* des SV40 DNA-Virus (SV40 T-Antigen) (134, 135). Nach der Identifizierung des p53 Protein und anschließender Klonierung von *p53* Genen verschiedener Spezies legten frühe Beobachtungen nahe, dass p53 als ein

Onkogen wirken könnte, da eine Überexpression von p53 eine onkogene Transformation zu veranlassen schien. In den 1980er Jahren jedoch definierten einige entscheidende Beobachtungen die normale Funktion von p53 als anti-onkogen. Wildtyp *p53* Gene, die in die Zelle eingebracht wurden, erwiesen sich als Suppressoren der Transformation (136, 137).

Es wurde festgestellt, dass der kurze Arm (p) des humanen Chromosom 17, welcher das *p53* Gen trägt, in vielen Tumoren des Menschen, z.B. dem kolorektalen Karzinom verlorengegangen ist. In der Mehrheit der humanen kolorektalen Karzinome mit Allelverlusten von Chromosom 17p wurde im verbleibenden Allel eine Missense-Mutation detektiert. Diese Untersuchungsergebnisse standen im Einklang mit der Hypothese, dass das Produkt des Wildtyp *p53* Gens als Suppressor neoplastischen Wachstums wirkt, und Mutation und/oder Deletion diese Suppressorfunktion außer Kraft setzt (138, 139).

Bei Angehörigen von Familien mit Li-Fraumeni-Syndrom (ein autosomal-dominant vererbtes, neoplastisches Syndrom, das durch das Auftreten multipler Tumoren gekennzeichnet ist) wurden Keimbahnmutationen von p53 als Grundlage der Tumorprädisposition erkannt (140).

Es wurde beobachtet, dass Mäuse, die homozygot „null“ für *p53* (*p53* $-/-$) sind, sich normal entwickeln jedoch eine sehr hohe Tumorzinzidenz und ein großes Maß an Aneuploidie und Mutationsereignissen in Tumoren aufweisen. Diese und weitere Befunde brachten *p53* die Bezeichnung „Wächter des Genoms“ ein (131).

Zusammenfassend wurden bislang bei den meisten humanen Tumoren Störungen der Funktion von p53 festgestellt. In etwa der Hälfte dieser Tumoren ist p53 **direkt** als Folge einer Mutation des *p53* Gens inaktiviert. In anderen Fällen wirkt ein **indirekter** Inaktivierungsmechanismus: Bindung an virale Proteine oder Alterationen von Genen, dessen Produkte mit p53 interagieren oder Signale auf oder von p53 übermitteln (49).

Struktur des p53 Proteins

Das humane p53 Protein ist aus 393 Aminosäuren aufgebaut und auf der Polypeptidkette lassen sich mindestens drei strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen differenzieren (Abb. 3), über deren Anzahl an Aminosäuren geringfügig voneinander abweichende Angaben gemacht werden (97, 137):

1) N-terminale Transaktivierungsdomäne

Die ersten 43 Aminosäuren (AS) des N-Terminus vermitteln die Interaktion mit den Proteinen des Transkriptionsapparates und sind so für die positive Regulation der Genexpression verantwortlich (97, 137).

Der Amino-Terminus von p53 interagiert mit Komponenten allgemeiner Transkriptionsfaktoren z.B. TBP (*TATA-box-binding protein*) (62, 137).

Die durch p53 vermittelte Aktivierung der Transkription wird negativ reguliert durch Bindung von MDM2 Protein oder Adenovirus-Protein E1B-55 kDa (97).

2) Sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne

Diese auch als zentrale Domäne bezeichnete Region (AS 100-300) übernimmt die spezifische Bindung an Promotorsequenzen. Die gefaltete Domäne enthält ein Zink²⁺-Ion, das für die DNA-Bindungsaktivität erforderlich ist.

An die spezifische DNA-Bindungsdomäne bindet das große T-Antigen des SV40-Virus.

Über 90 % der Missense-Mutationen von *p53* des Menschen betreffen die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne. Dabei werden zwei Kategorien unterschieden:

- A) **Kontakt-Mutanten:** Behinderung der Kontaktaufnahme mit DNA und Verlust der Fähigkeit als Transkriptionsfaktor zu agieren
- B) **Konformations-Mutanten:** Beeinträchtigung der Ausbildung des β -Faltblattes und des Schleifen-Faltblatt-Helix-Motivs und damit Störung des Strukturgerüsts der Bindungsdomäne. Das veränderte Produkt reagiert mit dem monoklonalen Antikörper Pab240. Das betreffende Epitop ist bei Wildtyp-p53 nicht zugänglich (97, 137).

3) Die C-terminale Domäne / unspezifische DNA-Interaktions-Domäne

Diese multifunktionelle Domäne (AS 300-393) kann in drei Regionen unterteilt werden:

- a) **flexibles Verbindungsstück** (AS 300-320)
- b) **Tetramerisierungsdomäne** (AS 320-360) Die Tetramerisierung von p53 ist für die spezifische DNA-Bindung und Funktion als Tumorsuppressor essentiell. Es lagern sich

dabei zwei p53-Monomere zu einem Dimer und anschließend mit einem weiteren Dimer zum Tetramer zusammen.

- c) **äußerster Carboxyl-Terminus** AS 363-393 bilden eine offene (Protease-sensitive) Domäne mit neun basischen Resten, die in der Lage sind an DNA oder RNA zu binden (43, 137).

Die C-terminale Domäne reguliert die Fähigkeit von p53 mit spezifischen DNA-Sequenzen eine Bindung einzugehen: Phosphorylierung von Serin 378 durch Protein Kinase C oder von Serin 392 durch Casein Kinase II führt zur Aktivierung der spezifischen DNA-Bindung durch die zentrale Domäne. Kurze einzelsträngige DNA (20-39 Nukleotide), die mit der C-terminalen Domäne interagiert, kann ebenfalls die spezifische DNA-Bindung aktivieren.

Der Carboxyl-Terminus von p53 ist in der Lage unspezifisch an verschiedene, auch defektive Formen von DNA zu binden (z.B. DNA-Enden und an interne Deletions-Schleifen, wie sie durch Replikationsfehler entstehen) und katalysiert darüber hinaus die Reassoziierung von komplementären Einzelsträngen von DNA oder RNA (97, 137).

In der C-terminalen Domäne liegen auch die Signalsequenzen für die Lokalisation von p53 im Zellkern (NLSs, *nuclear localization sequences*).

TBP interagiert ebenso wie mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne auch mit dem Carboxylende von p53 (137).

Das Genom der humanen Papillomaviren vom Typ 16 und 18 enthält das Onkogen *E6*, dessen Produkt an die C-terminale Domäne bindet und die Degradation von p53 einleitet, sowie das Onkogen *E7* dessen entsprechendes Protein an RB bindet. Auf diese Weise kann in permissiven Zellen der Zellzyklus initiiert und Apoptose verhindert werden (43).

Die Exon/Intron-Struktur des *p53* Gens ist bei Mensch und Hund identisch. Das canine Genprodukt stimmt zu 81 % mit dem humanen p53 Protein überein. Der Homologiegrad evolutionär konservierter Domänen, welche die Mutations-„Hotspots“ enthalten, beträgt über 90 % (141).

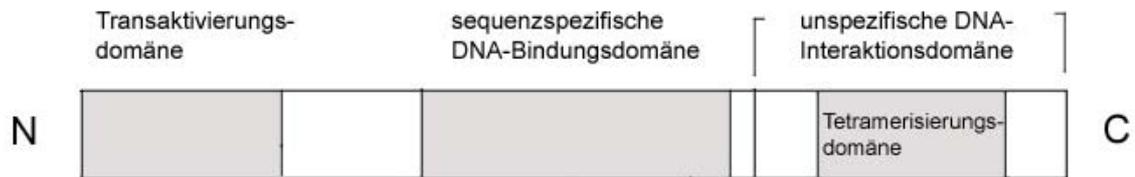


Abb. 3: Domänenstruktur des p53 Protein. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne interagiert mit Proteinen des Transkriptionsapparates. Über die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne wird die Bindung an Promotorsequenzen vermittelt. Das C-terminale Ende bindet ohne Präferenz für spezifische Sequenzen auch an beschädigte DNA-Abschnitte. Die Tetramerisierungsdomäne vermittelt die Oligomerisierung von p53 Monomeren (nach KO und PRIVES (137)).

Biologische Rolle und Funktionen von p53

Heute ist bekannt, dass p53 einen homotetrameren Transkriptionsfaktor darstellt, der durch verschiedene Formen von zellulärem Stress aktiviert wird:

- Bestrahlung (ionisierende Strahlung, UV-Strahlung)
- Hypoxie
- medikamentös induzierter genotoxischer Schaden
- Onkogen-Aktivierung

Als Reaktion leitet p53 eine transkriptionelle Antwort ein, die entweder die Zellproliferation hemmt oder Apoptose induziert (50).

Das p53 Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkriptionsrate von mindestens sechs bekannten Genen steigert, deren Produkte zumindest teilweise p53-abhängige Funktionen ausüben (97):

- p21^{CIP}** Inhibierung von Cyclin-CDK-Komplexen; Bindung an PCNA; Arrest des Zellzyklus
- MDM2** Produkt eines Onkogens; inaktiviert die p53-vermittelte Transkription und bildet auf diese Weise eine autoregulatorische Schleife der p53-Aktivität
- Gadd45** induziert durch DNA-Schaden; bindet an PCNA und führt zu Zellzyklus-Arrest; beteiligt am Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem
- Cyclin G** Cyclin mit unbekannter Funktion und unbekannter Cyclin-abhängiger Kinase

BAX Mitglied der BCL-2 Familie; fördert Apoptose, nicht in allen Zellen durch p53 induziert

IGF-BP3 *insulin-like growth factor binding protein-3*; blockiert den Signalweg eines mitogenen Wachstumsfaktors

Mehrere Dutzend direkt durch p53 kontrollierte Gene wurden identifiziert. Sie lassen sich vier funktionellen Kategorien zuordnen (49):

- I. Inhibierung des Zellzyklus
- II. Apoptose
- III. Genetische Stabilität
- IV. Inhibierung der Blutgefäßbildung

I. Inhibierung des Zellzyklus: Einer der ersten Effekte der p53-Expression in nahezu allen Säugetierzelltypen ist die Blockade des Zellzyklus. p53 stimuliert direkt die Expression von **p21^{CIP}**, einen Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs). Ein anderes Zielgen von p53 ist **reprimo**, welches einen Arrest des Zellzyklus in der G₂-Phase vermittelt. In Epithelzellen kann p53 die Expression von Protein **14-3-3σ** stimulieren, welches Cyclin B1-CDK1-Komplexe außerhalb des Zellkerns sequestriert und auf diese Art zur Aufrechterhaltung eines G₂-Blocks beiträgt.

II. Apoptose: Einige der Zellen in denen p53 aktiviert ist vollziehen den programmierten Zelltod. Es existieren mehrere potentielle Mediatoren p53-induzierter Apoptose: Das in den Mitochondrien lokalisierte **BAX** Protein ist Mitglied der BCL-2 Proteinfamilie. Die Transkription des *BAX* Gens wird in einigen menschlichen Zelltypen direkt über die p53-Bindestellen in der regulatorischen Region des Gens aktiviert. Ebenso wie BAX sind **NOXA** und **P53AIP1** mitochondriale Proteine, deren p53 Expression die Apoptose einleitet. Als ein weiterer potentieller Mediator ist **PIDD** zu nennen. Darüber hinaus wird angenommen, dass p53 den Zelltod direkt durch Stimulation der mitochondrialen Produktion toxischer reaktiver Sauerstoffspezies hervorrufen kann (49). Es konnte gezeigt werden, dass der p53-vermittelte Zelltod eine Koordination der durch PTEN Repression von PKB/Akt (Proteinkinase-B/Akt) – mediierten Überlebenssignale erfordert. Die durch p53 transaktivierte Phosphatase PTEN

inaktiviert Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat, einen auf dem Überlebenssignalweg gelegenen second messenger (142).

III. Genetische Stabilität: Eine Inaktivierung von Reparaturgenen führt zu einer genetischen Instabilität (d.h. einer Akkumulation von Fehlern in allen Genen incl. solcher, die das Zellwachstum kontrollieren) und trägt auf diese Weise indirekt zur Tumorentwicklung bei. Die Mechanismen, durch die p53 in diesem Zusammenhang zum Erhalt der genetischen Stabilität beiträgt, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass sie eine Induktion jener Gene beinhalten, die DNA-Nukleotid-Exzisions-Reparatur, Chromosomen-Rekombination und Chromosomen-Segregation kontrollieren.

IV. Inhibierung der Blutgefäßbildung: Das normale p53 Protein stimuliert die Expression von Genen, die das Wachstum neuer Blutgefäße verhindern. Zellen in denen p53 infolge Mutation inaktiviert ist, ziehen demnach mit höherer Wahrscheinlichkeit neue Blutgefäße zur Versorgung des Tumors heran, was einen entscheidenden Wachstumsvorteil in einem späteren Stadium der Tumorentwicklung darstellt.

Nahezu alle natürlich auftretenden Mutationen des *p53* Gens vermindern die Fähigkeit des entsprechenden Proteins, die Transkription zu aktivieren, was Anlass zur Annahme ist, dass diese Aktivität entscheidend für die Funktion als Tumorsuppressor ist. (49). Zusätzlich zu seiner Funktion als Transkriptionsaktivator von Genen mit spezifischer Bindungsstelle ist das p53 Protein in der Lage, die Transkription von Genen, denen diese Sequenz fehlt zu inhibieren (137)

Das p53-Netzwerk/Signalwege

p53 ist in ein Netzwerk von Signalwegen integriert und bildet einen der komplexesten Knotenpunkte der Zelle. Eine Alteration von p53 in Form einer Mutation führt zu Störungen basaler Zellfunktionen insbesondere der Reaktionen auf DNA-Schäden und auf tumorprädisponierende Stresseinwirkungen (49).

Das p53-Netzwerk ist unter normalen Bedingungen inaktiv (49) und p53 ist höchst instabil mit einer Halbwertszeit im Bereich von Minuten. Nach DNA-Schädigung steigt die

Halbwertszeit signifikant an und infolgedessen kommt es zur Akkumulation von p53 und der Transkription von Zielgenen wie *p21^{CIP}* und *BAX*. Das Ergebnis dieser gesteigerten Transkription ist vom Zelltyp abhängig und manifestiert sich i.d.R. als verlängerter, wahrscheinlich irreversibler G₁-Arrest oder Apoptose (143).

Mindestens drei verschiedene Wege führen zu einer Aktivierung des p53-Netzwerkes:

- I. DNA-Schäden z.B. durch ionisierende Strahlung verursachte DNA-Doppelstrangbrüche.
Die Aktivierung des Netzwerkes ist abhängig von zwei Proteinkinasen (Enzyme, die Phosphatgruppen auf Proteine übertragen):
 - a) **ATM** (*ataxia teleangiectasia mutated*), durch Doppelstrangbrüche stimuliert
 - b) **Chk2** (*checkpoint kinase*), durch ATM stimuliert (143)

- II. Aberrante Wachstumssignale, wie jene, die aus der Expression der Onkogene *Ras* und *Myc* resultieren. In diesem Falle ist die Aktivierung abhängig von **p14^{ARF}**

- III. UV-Licht, zahlreiche Chemotherapeutika und Proteinkinase-Inhibitoren; dieser Pfad unterscheidet sich von den anderen durch die Unabhängigkeit von ATM, Chk2 oder p14^{ARF} und involviert stattdessen die Kinasen:
 - a) **ATR** (*ataxia teleangiectasia related*)
 - b) **Casein Kinase II**.

Diese drei genannten Wege inhibieren den Abbau von p53 und halten so das Protein in einer hohen Konzentration. Die gesteigerte Konzentration an p53 gestattet die Ausübung folgender Funktionen:

- Bindung bestimmter DNA-Sequenzen
- Aktivierung der Transkription assoziierter Gene

Diese Gene führen direkt oder indirekt zum Zelltod oder Hemmung der Zellteilung (49).

Stabilisierung und Modifikation von p53

Die Menge an p53 Protein in der Zelle wird hauptsächlich durch die Rate der Degradation, weniger durch die Syntheserate bestimmt. Dem Abbau liegt die Ubiquitin-mediierte Proteolyse zugrunde. Das MDM2 Protein ist eines jener Enzyme, die an der Markierung von p53 mit Ubiquitin beteiligt sind. Diese Regulation basiert auf einem negativen Rückkopplungsmechanismus: Das p53 Protein bindet an die regulatorische Region des *MDM2* Gens und induziert dessen Transkription. Das synthetisierte MDM2 Protein bindet an p53 und stimuliert die Addition von Ubiquitin an dessen Carboxyl-Terminus. Infolgedessen nehmen p53-Konzentration und Transkription des *MDM2* Gens ab. Um als Transkriptionsfaktor wirksam werden zu können reicht ein Anstieg der Konzentration an p53 nicht aus. Es sind Konformationsänderungen erforderlich, resultierend aus kovalenten Modifikationen wie Addition oder Entfernung von Phosphat-, Acetyl-, Glycosyl-Resten oder anderen chemischen Gruppen. Der Carboxyl-Terminus von p53 ist normalerweise zurückgefaltet und blockiert die zentral gelegene DNA-Bindungsdomäne. Acetylierung von Lysin-Resten oder Phosphorylierung von Serin-Resten in der Nähe des Carboxyl-Terminus verstärkt die Bindungsfähigkeit von p53 an DNA vermutlich durch Beeinflussung der Faltung. Phosphorylierung des Amino-Terminus beeinflusst nicht die DNA-Bindfähigkeit, sondern die Affinität für MDM2 und nachfolgende Degradation (49).

Verknüpfung von Aktivierung und Stabilisierung

Der am intensivsten untersuchte Aktivierungsweg von p53 ist jener, der durch DNA-Schädigung in Gang gesetzt wird. Der Schaden wird durch *checkpoints* erfasst und der Ablauf des Zellzyklus bis zur Schadensbehebung verzögert. Proteine, die Schäden erfassen und signalisieren sind evolutionär hoch konserviert. Zu ihnen zählen mehrere Kinasen, insbesondere **DNA-abhängige Proteinkinase**, **ATM**, **Chk1** und **Chk2**. Alle Säugetierformen dieser vier Kinasen phosphorylieren p53 an aminoterminalen Resten in der Nähe der MDM2-Bindungsstelle und führen so, Modellvorstellungen zufolge, über die Blockade der Interaktion mit MDM2 zur Stabilisierung des p53 Proteins (49, 143).

Der zweite Weg der p53-Aktivierung beinhaltet die Expression von Onkogenen in Abwesenheit von DNA-Schäden. Diese Onkogene stimulieren die Transkription des *p14^{ARF}* Gens oder die Stabilisierung des p14^{ARF} Proteins, welches an MDM2 bindet und dessen

Aktivität inhibiert. Hinzu kommt ein räumlicher Aspekt: p14^{ARF} ist im Nucleolus lokalisiert und sequestriert in einigen Situationen MDM2 in dieses Subkompartiment - getrennt von p53, das im Zellkern außerhalb des Nucleolus die Transkription seiner Zielgene initiiert. Über die oben beschriebenen kovalenten Modifikationen hinaus binden zahlreiche Proteine an p53 und verändern potentiell dessen Stabilität und Fähigkeit der Transkriptionsaktivierung (49).

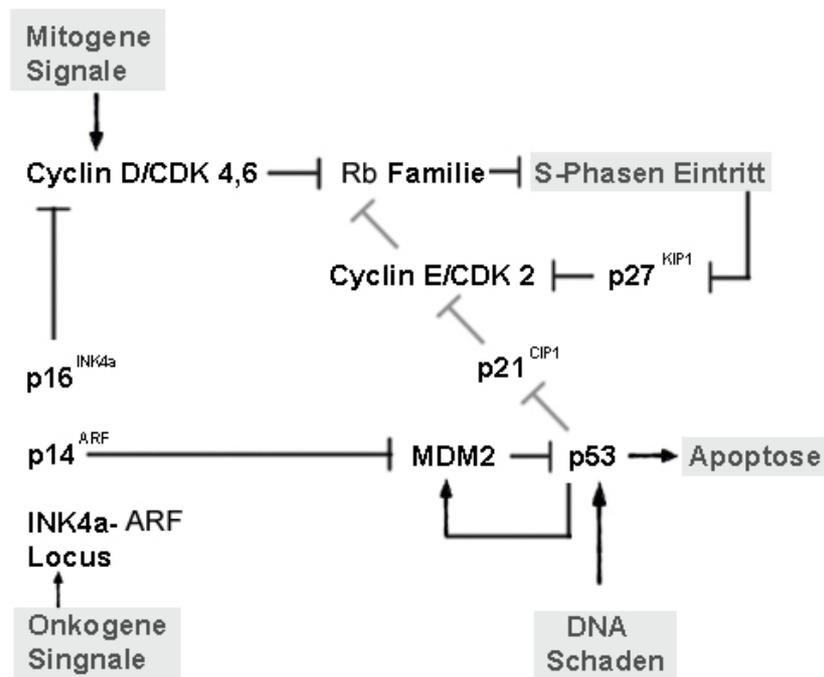


Abb. 4: Übersicht über die Interaktion von p53 und der Rb Proteinfamilie bei der Kontrolle der Zellproliferation. Mitogene Signale aktivieren Cyclin D-abhängige Kinasen (CDK 4,6), welche Rb und Mitglieder der Rb Proteinfamilie (p107 und p130) phosphorylieren, um den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus zu erleichtern. Der *cyclin-dependent kinase 2* (CDK 2)-Inhibitor p27^{KIP1} wird von ruhenden Zellen in hohen Spiegeln exprimiert, durch Cyclin E/CDK 2 in der späten G₁-Phase phosphoryliert und mit dem Eintritt in die S-Phase degradiert. Onkogene Signale können den *INK4a/ARF* Locus aktivieren. Über die Antagonisierung der Aktivität Cyclin D-abhängiger Kinasen aktiviert p16^{INK4a} Rb und verhindert auf diese Weise den Eintritt in die S-Phase. *MDM2* ist ein durch p53 induzierbares Gen, welches normalerweise eine p53-Antwort beendet. Das Protein p14^{ARF} inhibiert MDM2 und gestattet so die Induzierung von p53, was entweder p53-abhängige Apoptose einleitet, oder den über den CDK 2 Inhibitor p21^{CIP1} vermittelten Rb-abhängigen Zellzyklus-Arrest. Bei Austritt aus dem Zellzyklus wird p27^{KIP1} stabilisiert und kann reakkumulieren. Von einem DNA-Schaden ausgehende Signale werden auf p53 über ARF-unabhängige Signalwege übertragen. Pfeilspitzen repräsentieren aktivierende/fördernde, stumpfe Enden inhibierende Wirkungen. (Nach SHERR (13))

Bedeutung von p53 für die Tumorentstehung

Tumorbildung ist ein schrittweiser Prozess, der die progressive Akkumulation genetischer Alterationen erfordert. Für die Anhäufung der veranschlagten sechs Mutationsereignisse, die für die Umwandlung in eine Tumorzelle nötig sind, bedarf es genetischer Instabilität – eine Konsequenz des Verlustes von p53. Ein weiterer wichtiger Schritt ist das Überwinden der Apoptose, die einem unkontrollierten Zellwachstum entgegensteht – auch dies wird durch den Verlust von p53 ermöglicht (45, 143).

Mutationen von *p53* werden in 50-70 % aller humanen Tumoren gefunden. Diese Mutationen sind stark auf p53 Proteine selektiert, welche außerstande sind, DNA sequenzspezifisch zu binden. Während die Funktionen des Zellzyklus-Arrests transkriptionelle Aktivität von p53 erfordern, bedürfen zumindest einige Apoptose-Aktivitäten von p53 keiner p53-abhängigen Genprodukte. Dies könnte bedeuten, dass die Transkription ausgewählter p53-Zielgene entscheidend für die Tumorsuppressorfunktion ist, (d.h. einige Formen von Apoptose nicht entscheidend sind) oder, dass der direkte p53-Signalweg, in Abwesenheit von Transkription, eine sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 erfordert. (97)

Einige aufgrund von Mutationen veränderte p53 Proteine können p53-responsive Sequenzen im *p21* Gen, nicht aber im *bax* Gen aktivieren.

Dies könnte darauf hinweisen, dass die transkriptionelle Aktivierung von *bax* (Apoptose) häufiger das Ziel der Selektion ist, als die Aktivierung von *p21* und *bax* zusammen (G₁-Arrest).

Das „Timing“ von somatischen p53-Mutationen, die zur Entwicklung maligner Neoplasien beitragen, zeigt eine Abhängigkeit vom Tumortyp. In kolorektalen Karzinomen wird eine Alteration von *p53* i.d.R. als ein spätes Ereignis in der Tumorentwicklung festgestellt, dagegen treten in Hauttumoren *p53* Mutationen häufiger früh, in prämaligen Läsionen auf. Der Zeitpunkt der Selektion auf *p53* Mutationen wird durch einen komplexen Satz an Variablen bestimmt. Da die Induktion und Aktivierung von p53 als Antwort auf Hypoxie erfolgt, wird der Bedarf an Angiogenesefaktoren (oder des Verlustes an Inhibitoren der Angiogenese) balanciert mit der Eliminierung von *p53* durch Mutation. Eine reiche Blutversorgung in der

frühen Tumorentwicklung gestattet eine Verschiebung der Selektion auf p53 Mutationen auf einen späteren Zeitpunkt. Darüber hinaus spielt der genetische Hintergrund des Wirtes eine Rolle, z.B. in dem Sinne, dass p53 und Rb bei der Entstehung neuer Phänotypen kooperieren. p53 reduziert die Inzidenz von Tumoren durch Mediierung von Apoptose in Zellen mit aktivierten Onkogenen. Die durch p53 vermittelte Apoptose ist ein wichtiges Element der Tumorsuppression und Gegenstand der Selektion auf mutierte *p53* Gene in Tumoren. Zusammengefasst betrachtet ist Krebs eine Erkrankung, bei der allele Differenzen und der genetische Hintergrund des Wirtes Krankheitsbeginn, Inzidenz und Tumortyp beeinflussen (97).

Mechanismus der p53-Inaktivierung	typische Tumoren	Effekt der Inaktivierung
Austausch einer Aminosäure in der DNA-bindenden Domäne infolge Mutation	Kolon, Mamma, Lunge, Harnblase, Hirn, Pankreas, Magen, Ösophagus u.a.m.	verhindert Bindung von p53 an spezifische DNA-Sequenzen und Aktivierung zugehöriger Gene
Deletion der C-terminalen Domäne	gelegentliche Tumoren verschiedener Lokalisationen	Verhinderung der Tetramerbildung von p53
Vervielfachung des <i>MDM2</i> -Gens im Genom	Sarkome, Gehirn	zusätzliches MDM2 stimuliert den Abbau von p53
virale Infektion	Zervix, Leber, Lymphome	Produkte viraler Onkogene binden an und inaktivieren p53, in einigen Fällen Stimulation des p53-Abbaus
Deletion des p14ARF-Gens	Mamma, Gehirn, Lunge u.a.m., insbesondere wenn <i>p53</i> selbst nicht mutiert ist	Versagen MDM2 zu inhibieren und p53-Degradation unter Kontrolle zu halten
Fehl-Lokalisation von p53 im Zytoplasma	Mamma, Neuroblastome	Verlust der p53-Funktion (p53 ist nur im Zellkern wirksam)

Tab. 1: Vielfalt der Inaktivierungsmechanismen von p53 bei unterschiedlichen Tumoren. (nach VOGELSTEIN et al. (49))

p53 und Meningeom

NAGASHIMA et al. (144) untersuchten eine Zusammenstellung von 61 Meningeomen verschiedener Dignität (52 benigne, 4 atypische und 5 anaplastische Meningeome) auf Mutationen der Exons 5-8 des *p53* Gens per *single strand conformation polymorphism* (SSCP)-Analyse und Akkumulation des p53 Proteins mittels Immunhistochemie. In allen anaplastischen Fällen wurde eine Überexpression von p53 festgestellt; keine p53-positiven Zellen wurden in den atypischen und nur einzelne schwach gefärbte Zellen bei 2 von 52 benignen Meningeomen identifiziert. Die SSCP-Analyse erbrachte auch in den Tumorproben mit p53 Überexpression keine Abweichungen, die Rückschlüsse auf eine Mutation zuließen. Es wird in dieser Studie der Schluß gezogen, dass es sich beim überexprimierten Protein um Wildtyp p53 handelt. Des Weiteren wurde die Proliferation unter Erstellung des immunhistochemischen MIB-1 Färbeindex analysiert; dieser war positiv korreliert mit dem Tumor-Grad und der p53 Proteinüberexpression. Die Untersucher stellten fest, dass erhöhte p53-Spiegel mit biologisch aggressiven Meningeomen mit hohem Proliferationspotential, schneller Rezidivbildung und Resistenz gegen Strahlentherapie assoziiert sind.

In einer anderen Untersuchung wurde bei keinem von 19 benignen humanen Meningeomen eine immunhistochemische p53-Anfärbung des Zellkernes festgestellt; 4 von 5 atypischen Meningeomen und beide malignen Fälle zeigten eine i.d.R. schwache und schütter verteilte Immunreaktivität. Eines der malignen Meningeome wies eine intensive Kernfärbung in ca. 90 % der Zellen auf. Nur in letzterem Falle konnte eine Mutation des *p53* Gens festgestellt werden. *p53* Mutationen werden als Marker für eine maligne Transformation bei Meningeomen in Erwägung gezogen. Die Untersucher stellen eine Assoziation von immunoreaktivem p53 Protein im Zellkern - auch bei Abwesenheit detektierbarer Mutationen - und histopathologisch atypischem oder malignem Erscheinungsbild fest (145).

ELLISON et al. (146) berichten über eine immunhistochemisch detektierbare Akkumulation von p53 Protein in 9 von 34 (26 %) untersuchten Meningeombiopsien. Die positiven Fälle waren nicht auf anaplastische Subtypen beschränkt, sondern repräsentierten ein breites histologisches Spektrum incl. benignen und atypischer Vertreter. Die p53-positiven Exemplare zeigten keinen signifikant höheren mittleren Proliferationsindex. Letzterer wurde

immunhistochemisch mit einem Ki-67 Antikörper bestimmt. In der Gesamtheit der untersuchten Proben wurden keine Mutationen in den Exons 4-9 des *p53* Gens festgestellt.

Ein Screening auf *p53* Mutationen bei 59 humanen Meningeomen der WHO Grade I-III per SSCP-Analyse erbrachte für die untersuchten Exons 5-8 des Gens bei keinem der Fälle Hinweise auf eine Mutation. Obgleich die große Mehrheit der in dieser Studie untersuchten Meningeome der WHO Grade II und III komplexe chromosomale Aberrationen aufwiesen, und *p53* Alterationen als prädisponierender Faktor für genomische Instabilität betrachtet wird. Soweit keine Mutationen in den selten betroffenen Regionen des *p53* Gens auftreten, wird einer Alteration dieses Tumorsuppressors im Zusammenhang mit Meningeomen eine untergeordnete Bedeutung beigemessen (147).

Gleichfalls völlige Abwesenheit von *p53* Mutationen (Exons 5-8) wurde bei einer ebenfalls mit SSCP-Analyse durchgeführten Untersuchung von 22 Meningeomen menschlicher Patienten (darunter 7 anaplastische Fälle) festgestellt (148).

In einer weiteren Studie wurden bei 2 von 61 untersuchten humanen Meningeomen Mutationen von *p53* detektiert. Es handelte sich um ein sporadisches anaplastisches und um ein strahleninduziertes atypisches Meningeom. Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle von *p53* bei der Entwicklung von Malignität bei Meningeomen hin (149).

Erkenntnisse über die Bedeutung von *p53* für das canine Meningeom liegen bislang nicht vor.

Bedeutung des mouse double minute 2 (*MDM2*) Protoonkogen

MDM2 kann das *p53* Protein für den Export aus dem Zellkern und Degradation markieren (150). Eine Unterbrechung der *p53*-*MDM2*-Interaktion in normalen Zellen führt zu einer Akkumulation von *p53* und Aktivierung der *p53*-abhängigen Transkription. Die Transkription des *MDM2* Gens selbst wird durch *p53* aktiviert, d.h. *p53* fördert die Transkription jenes Gens, das für seinen Abbau zuständig ist. Für eine Aktivierung der *p53*-Antwort wäre demnach eine Blockade dieses Abbauweges ausreichend. Dieses Modell liefert eine Erklärung dafür, warum mutiertes *p53* Protein stabil ist: Wenn *p53* inaktiv ist, herrscht in der Zelle ein

Mangel an MDM2 Protein, welches für den Abbau von p53 erforderlich ist (131). Die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor wird nicht nur durch die MDM2-gesteuerte Ubiquitinierung von p53 limitiert, sondern auch durch den MDM2-abhängigen Export aus dem Zellkern (16).

Amplifikationen von *MDM2* finden sich in ca. einem Drittel verschiedener humaner Knochen- und Weichteilsarkome (151). Das onkogene Potential des, aufgrund einer Amplifikation überexprimierten, Genproduktes beruht zumindest teilweise auf der Inaktivierung der Tumorsuppressorfunktion von p53 (152).

Der Vergleich der Nukleotidsequenz der caninen *MDM2* cDNA mit der entsprechenden Sequenz des Menschen zeigt eine Übereinstimmung von 93 % und auch auf der Aminosäure-Ebene ist mit 95 % Übereinstimmung von caninem und humanem MDM2 ein hohes Maß an Homologie festzustellen (153).

Zusammenhang zwischen p53-Mutationen und immunhistochemischer Darstellung

An den Mutationen von *p53* haben Missense-Mutationen einen Anteil von 80 %. Diese Art der Mutation bedingt den Austausch einer Aminosäure gegen eine andere. Die daraus hervorgehenden p53 Proteine zeigen in den meisten Fällen eine im Vergleich zum Wildtyp Protein abweichende Konformation und eine Steigerung der Halbwertszeit von Minuten auf Stunden. Die relativ niedrigen Konzentrationen des p53 Proteins in normalen Zellen sind generell nicht durch immunhistochemische Techniken zu detektieren; dagegen lässt sich in Tumoren, die Missense-Mutationen tragen, aufgrund der verlängerten Halbwertszeit eine Akkumulation von p53 im Zellkern demonstrieren. Eine Kernfärbung der Mehrheit der Tumorzellen, in Abwesenheit einer Reaktivität des umgebenden Gewebes oder Stromas, ist das am häufigsten beobachtete Reaktionsmuster bei Vorliegen einer Missense-Mutation (152).

Wie auch der entsprechende Tumor des Menschen zeigen einige canine Mammakarzinome eine Überexpression von p53. Der Anteil an caninen Mammakarzinomen mit einer positiven immunhistochemischen Darstellung von p53 liegt in einem ähnlichen zahlenmäßigen Größenbereich wie der Anteil dieser Tumoren mit *p53* Mutation (141).

Es können allerdings positive p53-Immunfärbungen (sog. „falsch positive“ Ergebnisse) in Tumoren auftreten, die keine Träger von Mutationen sind. Dies deutet auf alternative

Mechanismen der Stabilisierung von p53 hin: Die nukleäre Akkumulation von p53 kann verursacht werden durch die Stabilisierung des Wildtyp p53 Protein über Komplexbildung mit verschiedenen zellulären und viralen Proteinen. Alternative Erklärungen beinhalten die Anwesenheit von DNA-Schäden und/oder genetischer Instabilität als Auslöser einer Hochregulation von p53 Protein (144, 154).

Durch immunhistochemische Methoden ist p53 in Tumoren mit Leseraster (*frameshift*)-Mutationen oder Nonsense-Mutationen in der kodierenden Sequenz erwartungsgemäß nicht detektierbar, da in solchen Fällen das Protein trunziert, instabil oder gar nicht vorhanden ist. Diese Formen tragen mit weniger als 20 % zu den *p53*-Mutationen menschlicher Tumoren bei. Als weitere Ursache eines sog. „falsch negativen“ Ergebnisses (Abwesenheit der immunhistochemischen Darstellung von p53 in Gegenwart von Mutationen des entsprechenden Gens) kommt umfangreiche Deletion, welche jegliche Produktion ausschließt in Frage. Obwohl die Übereinstimmung zwischen Vorliegen einer *p53*-Genmutation und der Akkumulation von p53 Protein nicht perfekt ist, wird die Immunoreaktivität als ein Indikator für Tumoren mit alterierter p53-Funktion betrachtet (152, 154).

Darüber hinaus muss in Bezug auf Auswertung und Interpretation der immunhistochemischen Darstellung von p53 auf die Bedeutung einer Quantifizierung der positiven Zellen aufmerksam gemacht werden. Dem Anteil an Zellen, die eine immunhistochemisch deutlich feststellbare p53 Akkumulation aufweisen, wird eine größere potentielle Aussagekraft zugemessen, als der schiere Nachweis von p53 positiven Zellen in einer Probe. Das Auftreten vereinzelter positiver Zellen könnte, in Ermangelung einer Korrelation mit erkennbaren molekularen Abnormalitäten von p53, die normale funktionelle Aktivität des p53 Systems widerspiegeln. In Kontrast hierzu ist die intensive Anfärbung der Mehrheit der Zellen häufig mit einer Mutation assoziiert (155).

2.4.2.2 PTEN

Historie

Protein-Phosphorylierung ist ein hoch regulierter Prozess, durch den Informationen von der Zelloberfläche zum Zellkern übermittelt werden können. Es gibt zwei Enzymklassen, Protein-Kinasen und Protein-Phosphatasen, die durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Proteinen Signalübertragung regulieren (156). Es wurde lange postuliert, dass Protein

Tyrosin-Phosphatasen aufgrund ihrer Fähigkeit onkogene Wirkungen von Protein-Tyrosin-Kinasen zu kompensieren als Tumorsuppressoren agieren können (157). *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), auch bezeichnet als *MMAC1* (*mutated in multiple advanced cancers*), wurde etwa zeitgleich von zwei verschiedenen Gruppen als Kandidaten-Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10 (10q23) des Menschen bestimmt (158, 159). Eine andere Gruppe identifizierte das Gen bei der Suche nach einer neuen dual-spezifischen Phosphatase und benannte es *TEP1* (*TGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase*) (157).

Das für PTEN kodierende Gen wird in allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Weitere Orthologe zu PTEN wie TPTE, PTEN2 und TPIP haben sich in Säugetieren entwickelt. Im Unterschied zu PTEN, welches ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression von TPTE und PTEN2 auf den Hoden, und jene von TPIP auf Hoden, Gehirn und Magen beschränkt. Darüber hinaus sind diese sog. „Transmembran-Homologe“ von PTEN auf Golgi-Apparat oder endoplasmatisches Retikulum limitiert. Aufgrund der gewebsspezifischen Expression und des fehlenden Zugangs zur Plasmamembran wird angenommen, dass diese Orthologe nicht wie PTEN an der Regulation des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges (s.u.) an der Plasmamembran beteiligt sind. Der Mangel an Redundanz von PTEN an der Plasmamembran könnte die hohe Frequenz erklären, mit der PTEN-Inaktivierung während der Tumorentwicklung selektiert wird (133).

Struktur des PTEN Protein

Das *PTEN* Gen des Menschen ist auf Chromosom 10q23 lokalisiert. Es kodiert ein Peptid mit 403 Aminosäuren und einer relativen Molekülmasse von ca. 47 kDa. Die Analyse der *PTEN* cDNA-Sequenz legt nahe, dass es sich um ein Mitglied der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) Gen-Superfamilie handelt (157-159). PTPs bestehen aus konservierten katalytischen Domänen, flankiert von nicht-katalytischen regulatorischen Sequenzen. Die katalytischen Domänen aller PTPs enthalten das *signature motif* „HCxxGxxRS(T)“ (H=Histidin, C=Cystein, G=Glycin, R=Arginin, S=Serin, T=Threonin, x steht für eine beliebige Aminosäure). Die PTP Superfamilie kann eingeteilt werden in die:

a) „klassische“ PTP Familie

b) dual-spezifische Phosphatase Familie

Die meisten bekannten Mitglieder der Familie der dual-spezifischen Phosphatasen dephosphorylieren Phosphotyrosin, Phosphoserin und/oder Phosphothreonin *in vivo*. Die PTEN-Sequenz legt nahe, dass es sich um eine dual-spezifische Phosphatase handelt. Die N-terminale Phosphatase-Domäne von PTEN (ca. 180 Aminosäuren) zeigt also Ähnlichkeit mit anderen Protein-Phosphatasen, besitzt jedoch eine vergrößerte aktive Region für die Wechselwirkung mit Phosphatidylinositol(3,4,5)-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃): Zusätzlich zur genannten Protein-Phosphatase-Aktivität zeigt PTEN eine hochspezifische Funktion als Lipid-Phosphatase: PtdIns(3,4,5)P₃ wird an Position 3 des Inositolringes dephosphoryliert. Viele Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Lipid-Phosphatase-Aktivität von grundlegender Bedeutung für die Funktion als Tumorsuppressor und die Rolle in der normalen Entwicklung ist (133, 156, 160-162).

Die Kristallstruktur des menschlichen PTEN weist eine zweite Hauptdomäne auf, welche Phospholipide bindet. Es wird davon ausgegangen, dass die C2-Domäne (ca. 165 Aminosäuren) PTEN an die Plasmamembran bindet und die Ausrichtung der katalytischen Domäne für die Interaktion mit PtdIns(3,4,5)P₃ und anderen potentiellen Substraten bewirkt (161, 162).

PTEN enthält außerdem eine Sequenz, welche die katalytische Domäne überlappt und Ähnlichkeit mit einer Domäne innerhalb der Zytoskelettproteine Tensin und Auxilin aufweist. Obwohl diese Region verknüpft sein könnte mit Effekten von PTEN auf Zelladhäsion und Migration ist die biologische Bedeutung dieser Ähnlichkeit jedoch noch unklar, zumal viele PTPs in ihrer katalytischen Domäne eine ähnliche Region enthalten (160, 163).

Der C-terminalen „Schwanz“-Region (ca. 50 Aminosäuren) werden regulatorische Eigenschaften zugeordnet. Es wurde gezeigt, dass Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threonin-Reste die enzymatische Aktivität und Stabilität von PTEN modulieren kann. Dephosphorylierung oder Deletion der „Schwanz“-Region resultiert in einer gesteigerten Phosphatase-Aktivität und rapider Degradation. Als Schlüsselenzym, welches die Regulation der Phosphorylierung der C-terminalen Serin- und Threonin-Reste übernimmt, wird Protein-Kinase CK2 (auch als Casein-Kinase II bezeichnet) betrachtet (162, 163).

PTEN besitzt an seinem C-Terminus eine potentielle Bindungsstelle für Proteine mit PDZ (*PSD-95/Dlg/ZO-1*)-Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine mit PDZ-Domäne den Zusammenbau von Multiprotein-Komplexen dirigieren, z.B. die Lokalisation von Ionenkanälen und Adhäsionsmolekülen an Zell-Zell-Kontaktstellen incl. Synapsen (160, 164). Über diese Region bindet PTEN an die PDZ-Domänen der membranassoziierten Guanylat-Kinasen MAGI2 und MAGI3 (*membrane associated-guanylate kinase inverted*). Diese sind lokalisiert an tight junctions von Epithelzellen und kooperieren mit PTEN bei der Regulation der Aktivität von Akt. Die PDZ-Bindungsdomäne könnte also eine Rolle spielen bei der Veränderung der Balance von PTEN-Effekten auf stromabwärts gelegene Effektoren wie Akt/PKB und anderen Systemen wie z.B. der RAC-vermittelten Signalübertragung (163, 165, 166). RAC, ein Mitglied der Familie kleiner GTP-bindender Proteine wird über PtdIns(3,4,5)P₃ aktiviert und vermittelt Polymerisierung von Actin-Molekülen an der Innenseite der Zellmembran, was zur Ausbildung von Lamellopodien und Kräuselung der Zellmembran führt (43).

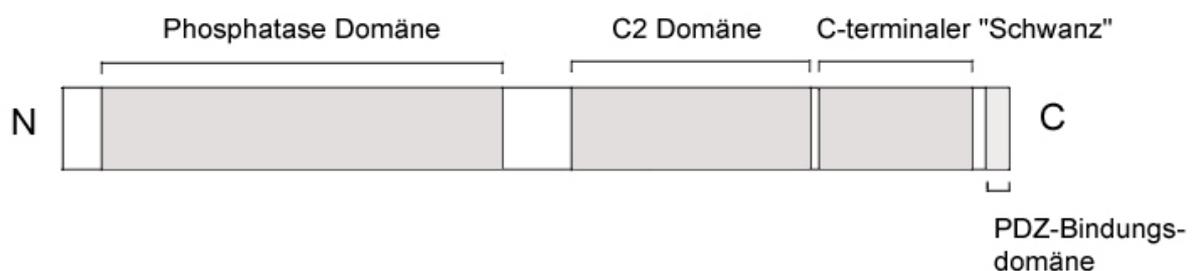


Abb. 5: Domänenstruktur von PTEN. Die N-terminale Phosphatase-Domäne ist sowohl für Membranbindung als auch für die katalytische Aktivität erforderlich. Die C2-Domäne stellt eine zweite essentielle Membranbindungsdomäne dar. Zumindest in Säugetieren besitzt die C-terminale „Schwanz“-Region eine Funktion bei der Regulation der Aktivität und Stabilität des Moleküls. Die PDZ-Domäne beeinflusst vermutlich die subzelluläre Lokalisation des Moleküls (nach GOBERDHAN und WILSON (167)).

Biologische Rolle und Funktionen von PTEN

Die meisten Säugetierzellen, die das Wildtyp *PTEN* Gen enthalten, exprimieren unter normalen Wachstumsbedingungen messbare Spiegel an *PTEN* mRNA und Protein (142).

I. Embryonalentwicklung

PTEN wird für die normale Entwicklung eine essentielle Rolle zugeschrieben: Verschiedene *PTEN*-Mutanten zeigten im Maus-Modell bei Homozygotie eine frühe embryonale Sterblichkeit. Es wird angenommen, dass *PTEN* wichtige Funktionen bei Differenzierung und Organisation der Keimblätter übernimmt und an der Regulation lokaler Apoptose und/oder Proliferation beteiligt ist. Dabei können die Funktionen je nach Gewebe, Wachstumsbedingungen und genetischem Hintergrund variieren (160, 163).

II. Tumorsuppressor/Proliferation

Mäuse mit heterozygoter *PTEN*-Mutation demonstrierten eine gesteigerte Tumorzinzidenz - in Einklang mit der Identifikation von *PTEN* als Tumorsuppressorgen (160). Übereinstimmend mit der Vorstellung, dass ein Tumorsuppressor in der Lage ist Zellproliferation zu unterdrücken, konnte in einigen Ansätzen durch Wiederherstellung der *PTEN* Expression ein Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus ausgelöst werden, einhergehend mit Anstieg der Spiegel von Zellzyklusinhibitoren wie p27^{KIP1} und Absinken der Rb Protein Phosphorylierung (163, 168). Der Arrest in der G₁-Phase wird zurückgeführt auf die Lipid-Phosphatase Aktivität von *PTEN* gegenüber PtdIns(3,4,5)P₃ (169). Es ist zu betonen, dass *PTEN* bislang nicht als physiologischer Regulator des normalen Zellzyklus nachgewiesen wurde. Außerdem ist *PTEN* nicht als einfacher Blocker der Proliferation anzusehen, da normale *PTEN* exprimierende Zellen rasche Proliferation vollziehen können (163).

III. Apoptose

Zellen mit mutiertem *PTEN* erweisen sich infolge konstitutiver PKB/Akt-Aktivität als z.T. resistent gegen Apoptose-stimulierende Einflüsse wie UV-Bestrahlung, Hitzebehandlung und TNF- α (*tumor necrosis factor- α*). Expression von exogenem *PTEN* in mutierten Zellen stellt die Empfindlichkeit gegen Apoptose-Stimuli und das normale Ausmaß der PKB/Akt Phosphorylierung wieder her. Es wird angenommen, dass *PTEN* einer Hemmung der Apoptose durch PKB/Akt entgegenwirkt (170). Eine bedeutende Rolle kommt *PTEN* bei

einer speziellen Form der Apoptose, namens Anoikis, zu. Anoikis bezeichnet die Induktion von Apoptose nach Kontaktverlust der Zelle zur extrazellulären Matrix. In vielen transformierten und malignen Zellen ist die Abhängigkeit des Überlebens der Zelle von ihrer Verankerung aufgehoben. Es wurde eine funktionelle Verknüpfung von Anoikis mit dem Signalübertragungs- und Gerüstprotein *focal adhesion kinase* (FAK) nachgewiesen. Die Interaktion von Integrinen mit Proteinen der extrazellulären Matrix kann FAK aktivieren und Anoikis in normalen Epithel- und Endothelzellen unterdrücken (163, 171). FAK bezeichnet eine für fokale Adhäsionsstellen charakteristische Tyrosinkinase, über die Organisation des Zytoskelettes und Signalübertragungswege zusammengeführt werden. Fokale Adhäsionsstellen sind Strukturen der Zellmembran an denen Integrine über ihre extrazellulären Domänen Kontakt zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix aufnehmen. Diese Integrine binden über intrazelluläre Domänen Proteine, die einerseits den Kontakt zu Aktinfilamenten herstellen, andererseits die Interaktion der verschiedenen Komponenten regeln. Eine Möglichkeit der Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) besteht in der direkten Bindung an FAK. In malignen Zellen wurden erhöhte Spiegel an FAK festgestellt, was es diesen Zellen möglicherweise gestattet Anoikis zu umgehen (43, 163, 172). Die PTEN Interaktion mit FAK ist eine notwendige Voraussetzung für die PTEN-medierte Dephosphorylierung. In Zellen mit *PTEN*-Mutation bleibt die Tyrosin-Phosphorylierung in FAK auch nach Trennung von Matrix-Substraten erhalten, was einhergeht mit Aufrechterhaltung von FAK/PI3K-Assoziation, PI3K-Aktivität, PtdIns(3,4,5)P₃ Spiegeln, Akt Phosphorylierung sowie Resistenz gegen durch den Verlust des Matrix-Kontaktes induzierte Apoptose (Anoikis). Expression von exogenem PTEN in mutierten Zellen stellt die Empfindlichkeit für Anoikis und normale Spiegel an PI3K-Aktivität und PtdIns(3,4,5)P₃ wieder her. PTEN moduliert Apoptose durch die Reduzierung der Konzentration von PtdIns(3,4,5)P₃. Dieses Signalpeptid vermittelt die Aktivierung von Akt, einem zentralen Regulator der Apoptose, über die Kinasen PDK1 und PDK2 (*phosphoinositide-dependent kinase1/2*). Die Rolle von FAK bei Anoikis besteht zumindest zum Teil in der Fähigkeit, den PtdIns(3,4,5)P₃ Spiegel durch Förderung der PI3K Aktivität zu erhöhen. Die Protein-Tyrosinphosphatase Aktivität von PTEN inhibiert möglicherweise über Dephosphorylierung von FAK dessen Wirkung auf PI3K. Es werden also kombinierte Effekte von PTEN im Rahmen der Förderung von Apoptose deutlich: Herabregulation des PI3K/Akt

„Überlebens“-Signalweges nicht nur durch direkte Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P₃, sondern auch durch Inhibierung der im Signalweg stromaufwärts gelegenen FAK (173).

IV. Migration

PTEN Überexpression oder Rekonstituierung inhibiert Zellmigration. An embryonalen Mäuse-Fibroblasten mit Deletion von *PTEN* konnte eine Steigerung der Motilität beobachtet werden, die sich durch Einführen von Wildtyp-PTEN reduzieren lies.

V. Invasion

Untersuchungen an einer Glioblastom-Zelllinie zeigten, dass PTEN über Dephosphorylierung von FAK sowohl Migration als auch Invasion reduziert (168, 174).

VI. Angiogenese

Inhibierung von endogenem PTEN in kultivierten Endothelzellen vermittelt Adenovirus-mediiertes Überexpression einer dominant-negativen PTEN-Mutante förderte *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-medierte Akt Phosphorylierung. Dieser Effekt korrelierte mit Abnahme der Caspase-3 Spaltung, Caspase Aktivität und DNA Degradation nach Induktion von Apoptose durch TNF- α . Die Überexpression der dominant-negativen PTEN-Mutante steigerte darüber hinaus VEGF-mediierte Proliferation und Migration von Endothelzellen. In Kontrast hierzu inhibierte Überexpression von Wildtyp-PTEN die anti-apoptischen, proliferativen und chemotaktischen Effekte von VEGF (175).

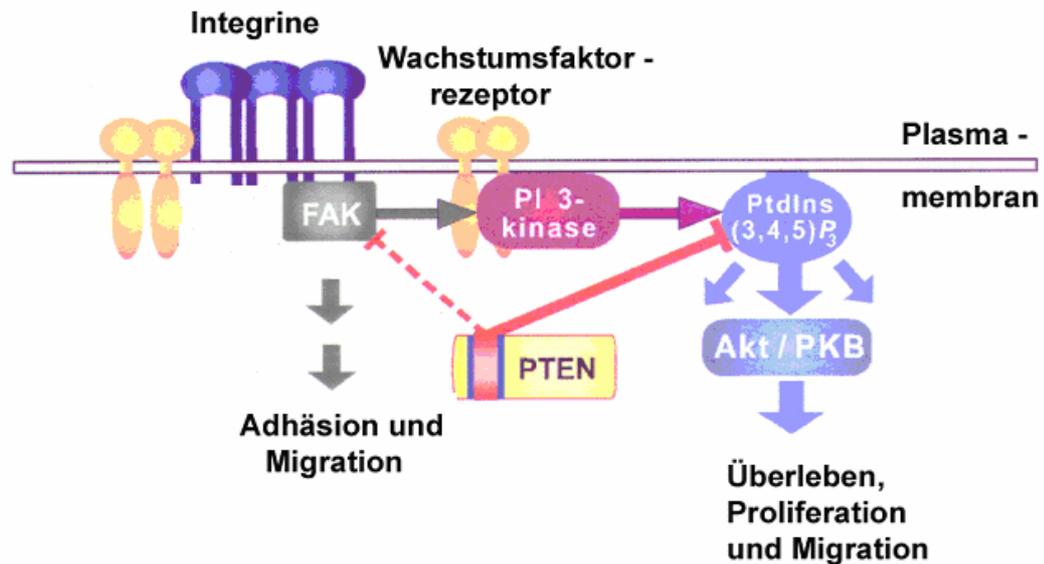


Abb. 6: Wirkungsbereiche von PTEN. Extrazelluläre Wechselwirkungen initiieren die Signaltransduktion von Integrienen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Als Hauptfunktion von PTEN wird die Herabregulation des PI3K-Produktes PtdIns(3,4,5)P₃ angesehen, welches Akt (auch als PKB bezeichnet) und komplexe stromabwärts gelegene Signalwege von Zellwachstum, Überleben und Migration beeinflusst. Zusätzlich hat PTEN eine schwache Protein-Tyrosin Phosphatase Aktivität, welche möglicherweise u.a. mit FAK interagiert und auf diese Weise andere komplexe Signalwege moduliert. Die Phosphatase-Domäne (rot) reguliert durch Dephosphorylierung (rote Linien) die Substratmoleküle herab. (modifiziert nach YAMADA und ARAKI (163))

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase

Akt/PKB: Akt/Proteinkinase-B

PtdIns(3,4,5)P₃: Phosphatidylinositol(3,4,5)-Trisphosphat

FAK: focal adhesion kinase

Das PTEN-Netzwerk / Signalwege

Phosphatase-Aktivität von PTEN wurde sowohl für Lipid- als auch für Protein-Substrate festgestellt. Als das primäre physiologische Substrat wird das signalübertragende Lipid PtdIns(3,4,5)P₃ angesehen. Als zytoplasmatisches Phosphoprotein-Substrat ist u.a. FAK bekannt. (163).

PTEN bewirkt eine negative Regulation von Proteinkinase-B/Akt (PKB/Akt) -medierten Signalen der Zelle über die Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P₃ zu Phosphatidylinositol

(4,5)-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂). PtdIns(3,4,5)P₃, ein *Lipid-second messenger*, ist ein Produkt der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) –Aktivität (170).

Der Spiegel an PtdIns(3,4,5)P₃ in ruhenden Zellen, die Wildtyp *PTEN* enthalten ist sehr gering. Die Aktivierung von Rezeptoren der Zelloberfläche rekrutiert PI3K zum Rezeptor, wo es das Substrat PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃ phosphoryliert (133). Die Aktivierung von PI3K und Akt übermittelt Signale als Reaktion auf *nerve growth factor* **NGF**, *insulin-like growth factor 1* (**IGF-1**), *platelet-derived growth factor* (**PDGF**), *interleukin-3* (**IL-3**) und **extrazelluläre Matrix**. Infolge der Stimulation steigt die PtdIns(3,4,5)P₃-Konzentration innerhalb von Sekunden bis Minuten an (133, 160). Die Halbwertszeit von PtdIns(3,4,5)P₃ ist kurz und es wird neben *PTEN* auch durch die Phosphatasen *SHIP1* und *SHIP2* metabolisiert. Zellen, denen *PTEN* fehlt, zeigen auch in der Ruhephase erhöhte Spiegel an PtdIns(3,4,5)P₃ (133).

Der *second messenger* PtdIns(3,4,5)P₃ bindet an Proteine, die eine Pleckstrin-Homologieeinheit (PH)–Domäne enthalten. Die Erkenntnis, dass *PTEN* Phosphatidylinositol-Phosphate dephosphoryliert, führte zu einem Modell in dem *PTEN* als Tumorsuppressor in die Kontrolle mindestens zweier bekannter zellulärer Protoonkogene, **PI3K** und **Akt** involviert ist. *PTEN* inhibiert die **PI3K**-abhängige Aktivierung von **Akt** (auch als **PKB** bezeichnet), eine Protein-Serin/Threonin Kinase. Eine Deletion oder Inaktivierung von *PTEN* führt zu einer konstitutiven Akt-Aktivierung. Verschiedene Proteine binden über ein bestimmtes Motiv, die Pleckstrin-Homologieeinheit (PH)–Domäne, spezifisch Phosphoinositide. Im Zusammenhang mit *PTEN* sind Proteine der **Akt**-Familie (*Akt1*, *Akt2* und *Akt3*) und deren Regulatoren **PDK1** und **PDK2** bedeutsam. Es handelt sich um Protein-Serin/Threonin Kinasen (133, 160, 163). Die N-terminale, autoinhibitorische PH-Domäne von Akt hat eine hohe Affinität zu PtdIns(4,5)P₂ und eine etwas niedrigere Affinität zu PtdIns(3,4,5)P₃. Durch Bindung dieser Phosphoinositide wird Akt an die Zellmembran lokalisiert und das Enzym öffnet seine katalytische Region. **PDK1**, über seine PH-Domäne ebenfalls befähigt PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ zu binden, kolokalisiert mit Akt und phosphoryliert die *activation loop* der exponierten katalytischen Region. Auf diese Weise wird die Kinase-Funktion von Akt aktiviert (160).

Akt-Substrate:

Akt übermittelt Überlebenssignale bzw. inhibiert Apoptose durch Phosphorylierung und Inaktivierung von **BAD**, einem pro-apoptotischen Mitglied der BCL-2 Familie und der im Apoptose-Signalweg gelegenen Cystein-Proteinase **Caspase-9** (43, 160). Zusätzlich zur Förderung des Überlebens der Zelle wird davon ausgegangen, dass Akt durch Phosphorylierung anderer Zielmoleküle die Zellproliferation reguliert: Die Akt-katalysierte Phosphorylierung der Serin/Threonin Kinase, **GSK3** (Glykogen-Synthase-Kinase 3) führt zu dessen Inaktivierung. GSK3 fördert die Proteolyse von Cyclin D, d.h. durch Inhibierung von GSK3 trägt Akt möglicherweise zu Cyclin D-Akkumulation und Eintritt in den Zellzyklus bei (160).

Akt-vermittelte Phosphorylierung von p27^{CIP} hemmt dessen Bindung an Cyclin-CDK-Komplexe. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MDM2 durch Akt phosphoryliert wird (133); die Bedeutung dieser Aktivität für p53 wird im Anschluss erläutert.

Weitere Signalmoleküle des PI3K-Signalweges

Die 70 kDa ribosomale S6 Kinase (p70S6K) wird als Reaktion auf Mitogene und Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1) im Zuge des PI3K-*pathway* durch Phosphorylierung aktiviert. Über Phosphorylierung der Ribosomen-Untereinheit S6 und folglich gesteigerter ribosomaler Biosynthese wird das Zellwachstum durch p70S6K positiv reguliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die p70S6K-vermittelte Phosphorylierung von BAD Überlebenssignale übertragen werden können (176). Zellen mit PTEN-Mangel zeigen erhöhte Spiegel an PtdIns(3,4,5)P₃, phosphoryliertem Akt und p70S6K. Diese Veränderungen konnten in Verbindung gebracht werden mit gesteigerter Proliferation und verminderter Apoptose von T- und B-Zellen, unreifen Neuronen, Keratinozyten und Milchdrüsenepithel (133).

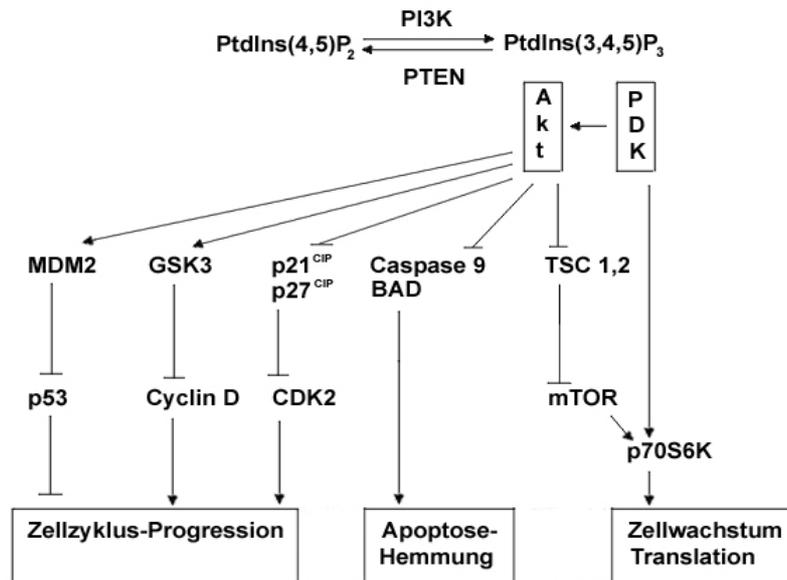


Abb. 7: Auswahl an PI3K-Signalwegen.

PI3K, welche über verschiedene Wachstumsfaktor-Rezeptoren aktiviert wird, katalysiert die Bildung von PtdIns(3,4,5)P₃ aus PtdIns(4,5)P₂. PI3K wirkt der Lipid-Phosphatase-Aktivität von PTEN entgegen. PtdIns(3,4,5)P₃ rekrutiert die Kinase Akt/PKB zur Plasmamembran, wo sie durch PDK phosphoryliert wird. Akt phosphoryliert verschiedene Substrate und fördert/erleichtert Zellzyklusprogression und Translation bzw. hemmt Apoptose. p70S6K, ein Regulator der Zellgröße, benötigt PtdIns(3,4,5)P₃, PDK1 und mTOR für die Aktivierung. TSC1 und TSC2 formen den tuberous sclerosis complex. Akt-medierte Phosphorylierung von TSC2 bewirkt Degradation des TSC1-TSC2-Komplexes, was regulierend auf mTOR und p70S6K wirkt. Die funktionellen Bedeutungen der übrigen Komponenten sind dem Text zu entnehmen. Pfeilspitzen repräsentieren fördernde, stumpfe Enden hemmende Wirkung. (modifiziert nach SULIS und PARSONS (133) und SHERR (13))

PtdIns(4,5)P₂: Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat

PtdIns(3,4,5)P₃: Phosphatidylinositol(3,4,5)-Trisphosphat

PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

Akt/PKB: Akt/Proteinkinase-B

PDK: phosphoinositide-dependent kinase

CDK2: cyclin-dependent kinase

MDM2: murine double minute chromosome 2

p70S6K: 70 kDa ribosomale S6 Kinase

mTOR: mammalian target of rapamycin

TSC1: hamartin

TSC2: tuberin

GSK3: Glykogen-Synthase-Kinase 3

Zelluläre Lokalisation von PTEN

Die intrazelluläre Lokalisation von PTEN variiert in Abhängigkeit von Zelltyp und Untersuchung, jedoch ist PTEN generell relativ diffus lokalisiert und assoziiert nicht präferentiell mit Adhäsions-Strukturen (163). Da PTEN $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ an der Plasmamembran reguliert, muss sich ein Anteil des Enzyms in diesem Kompartiment der Zelle befinden; allerdings wird hier nicht der Großteil endogenen PTENs gefunden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass die zelluläre Verteilung zwischen verschiedenen Gewebearten variiert. In den meisten epithelialen Zellen, wie z.B. von Haut, Kolon, Mamma und Prostata ist PTEN mehrheitlich im Zytoplasma nachweisbar. Im Kontrast dazu befindet sich PTEN in Neuronen, Fibroblasten, Zellen der Schilddrüse und des Nebennierenmarks überwiegend im Zellkern (133). Die Ursache für das unterschiedliche Verteilungsmuster ist noch wenig verstanden (133, 162, 166).

An Lysaten mehrerer Endothel-Zelllinien konnte per Western-Blot mit Anti-PTEN Antikörpern ebenfalls PTEN Expression nachgewiesen werden (175).

Die Konzentration an PTEN im Nukleus verhält sich während des Zellzyklus parallel zum zytoplasmatischen Spiegel. Hierbei sind die höchsten Konzentrationen an PTEN sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma mit der G_0 - G_1 Phase assoziiert, was auf eine mögliche Rolle von nukleärem PTEN bei PTEN-bedingtem G_1 -Arrest hinweist (177). Die Lokalisation von PTEN im Zytoplasma und Nukleus dient möglicherweise lediglich dazu das Enzym von der Plasmamembran zu trennen; alternativ könnte PTEN aktiv an zellulären Prozessen in diesen Kompartimenten beteiligt sein (133).

In Verbindung mit Zelldifferenzierung und neoplastischer Transformation wurden spezifische Verlagerungen der subzellulären Lokalisation des PTEN Proteins festgestellt: In normalen Follikelepithelzellen der Schilddrüse zeigt der Zellkern eine moderate bis starke immunhistochemische PTEN-Anfärbung und das Zytoplasma eine schwächere Reaktion. In Schilddrüsenkarzinomen zeigt sich eine deutliche Abnahme insbesondere der nukleären Färbeintensität (178). Vergleichbare Verschiebungen konnten bei Untersuchungen von Melanomen und Tumoren des endokrinen Pankreas festgestellt werden. Ob und inwieweit diese Veränderungen funktionelle Bedeutung in der Pathogenese von Tumoren haben ist bislang nicht aufgeklärt (133).

Interaktion zwischen PTEN und p53

Die Wechselwirkungen der Tumorsuppressoren PTEN und p53 vollziehen sich auf verschiedenen Ebenen. Die präzisen Mechanismen der Interaktionen und ihre funktionelle Bedeutung müssen allerdings noch vollständig definiert werden. (133).

Innerhalb des *PTEN*-Promotors ist eine funktionelle Bindungsstelle für p53 lokalisiert. Diese DNA-Sequenz ist erforderlich für die p53-vermittelte Transaktivierung: Als Antwort auf p53-Induktion, z.B. durch γ -Bestrahlung, steigen die Spiegel von PTEN mRNA und Protein. p53 ist demnach fähig, die induzierbare Expression von *PTEN* zu regulieren; basale Spiegel der *PTEN*-Transkription werden von Elementen außerhalb der p53-responsiven Region des *PTEN*-Promotors kontrolliert. In immortalisierten Fibroblasten der Maus konnte PTEN als essentiell für effiziente p53-medierte Apoptose demonstriert werden. Es besteht also eine funktionelle Interaktion zwischen den beiden am häufigsten in menschlichen Tumoren mutierten Tumorsuppressorgenen *p53* und *PTEN* (142).

Der C-Terminus von p53 bindet an die C2-Domäne von PTEN. Zudem bestehen Hinweise darauf, dass Wildtyp-PTEN, ebenso wie eine katalytisch inaktive Form, p53 über einen MDM2-unabhängigen Mechanismus stabilisieren kann (179).

Untersuchungen zeigen, dass Akt in der Lage ist p53-abhängige Apoptose zu inhibieren. Akt phosphoryliert MDM2 und induziert so dessen nukleäre Lokalisation. Hieraus resultiert der Export von p53 ins Zytoplasma und Degradation. Die Inhibierung von Akt, entweder durch PTEN oder eine dominant-negative Form von Akt, macht Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Agenzien empfindlich – möglicherweise über die Wiederherstellung der p53-Aktivität (133)

Bedeutung von PTEN für die Tumorentstehung und Progression

Der Verlust von PTEN-Funktion ist ein bedeutsamer Faktor in der Entwicklung eines Tumors, denn er bedingt einen Zustand der konstitutiven Aktivität des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges. Dies stimuliert die Zellteilung, steigert die Zellgröße, fördert Angiogenese und inhibiert Apoptose. Die Zell-Migration ist oftmals gesteigert, kann aber auch beeinträchtigt werden. Untersuchungen an verschiedenen Modellorganismen zeigen,

dass *PTEN*-Verlust allein zwar nicht ausreichend für die Auslösung der Onkogenese ist, jedoch ein Milieu geschaffen wird, das auf Tumorwachstum selektiert. (133).

Die Aneignung der Fähigkeit Apoptose-Signale zu überwinden ist ein essentielles Ereignis in der Progression von Tumoren. Der PI3K/Akt-Signalweg stellt einen entsprechenden Ansatzpunkt dar. Normalerweise ist die Akt-Aktivität in Abwesenheit von Wachstumsfaktor-Stimulation gering. *PTEN*-defiziente Tumorzelllinien ebenso wie immortalisierte Fibroblasten und Tumoren von *PTEN*-defizienten Mäusen zeigen hohe basale Spiegel an Akt-Phosphorylierung. In Übereinstimmung mit der anti-apoptotischen Wirkung von Akt sind *PTEN* $-/-$ Fibroblasten resistent gegen multiple pro-apoptotische Stimuli; die Rekonstitution der Expression von Wildtyp-*PTEN* stellt die normale Regulation von Akt und die Sensitivität für derartige Signale wieder her. Darüber hinaus kann die Wirkung von *PTEN* durch Expression einer konstitutiv aktiven Form von Akt überwunden werden. Insgesamt weisen diese Resultate darauf hin, dass eine Deregulierung des PI3K/Akt-Signalweges zu einem größeren Anteil menschlicher Tumoren beitragen kann (160, 170).

Keimbahnmutationen von *PTEN* verursachen u.a. drei seltene autosomal-dominant vererbte Tumorsyndrome des Menschen mit sich überschneidenden klinischen Bildern: Cowden-Syndrom, Lhermitte-Duclos-Syndrom und Bannayan-Zonana-Syndrom. Diese Syndrome sind charakterisiert durch multiple Hamartome, d.h. gutartigen Geschwülsten aus differenzierten Zellen mit Verlust der Gewebearchitektur. Patienten mit Cowden-Syndrom weisen ein erhöhtes Risiko des Auftretens von Mamma- und Schilddrüsen-Karzinomen sowie von Meningeomen auf. Hamartome von Patienten mit Cowden-Syndrom weisen einen LOH um den *PTEN*-Locus herum auf, was darauf hinweist, dass für die Ausbildung von Hamartomen der homozygote Verlust der *PTEN*-Funktion erforderlich ist (160).

Untersuchungen zeigten *PTEN*-Mutationen in einem großen Anteil humaner Glioblastoma multiforme-Primärtumoren und -Zelllinien sowie, mit geringerer Häufigkeit, in Brust- und Prostata-tumoren (158, 159). Deletionen in der Region 10q22-25 treten in verschiedenen Tumorarten auf, insbesondere in fortgeschrittenen glialen Tumoren (Glioblastoma multiforme, anaplastisches Astrocytom) aber auch in Prostata-, Endometrium- und Nierentumoren, kleinzelligen Lungenkarzinomen und Melanomen. Insgesamt ist *PTEN* eines

der häufigsten Ziele von Mutationen in menschlichen Tumoren, mit einer Mutationsfrequenz, die jener von *p53* nahe kommt (160).

Die funktionelle Inaktivierung des *PTEN* Gens kann durch Deletion und andere Mutationsmechanismen verursacht werden. Diese sind an verschiedenen Tumortypen variabel beteiligt (180). Die Mutation von *PTEN* in Verbindung mit einem *loss of heterozygosity* stellt dabei den typischen Inaktivierungsmechanismus dar. Der Verlust eines *PTEN* Allels bei Erhalt des verbleibenden Wildtyp Allels ist ebenfalls ein häufiger Befund; ob *PTEN*-Haploinsuffizienz die Tumorprogression begünstigt wird kontrovers diskutiert (133).

Allerdings wurden in einigen Tumoren Reduktionen an *PTEN* festgestellt, die sich nicht auf Mutationsprozesse zurückführen ließen: Der Verlust der *PTEN* Funktion in Mammakarzinomen (181), Prostatakarzinomen (182) und malignen Melanomen (183) tritt häufiger auf, als dies durch genetische Veränderungen allein erklärt werden kann. Der Ausschluss von Deletionen und Mutationen in solchen Fällen führte zur Postulierung alternativer Ursachen eines Funktionsverlustes: verminderte Synthese bzw. gesteigerte Degradation von *PTEN* Protein oder ein epigenetischer Mechanismus wie Promotor-Hypermethylierung des *PTEN* Gens.

PTEN Inaktivierung kann verschiedene Stadien der Tumorentwicklung betreffen. In Adenokarzinomen des Endometrium lassen sich üblicherweise in frühen Stadien, u.U. sogar vor dem Erwerb zytologischer Atypien, Verluste der *PTEN* Expression feststellen. Entsprechend wird *PTEN* in diesem Gewebe eine Rolle als „Wächter“ gegen die Initiation der Karzinogenese zugeschrieben. Untersuchungen zufolge treten *PTEN* Mutationen häufig und fast ausschließlich in primären (*de novo*) Glioblastomen auf, selten dagegen in sekundären Glioblastomen, denen eine schrittweise Entwicklung mit Steigerung des Differenzierungsgrades (*grading*) vorausgeht (180, 184).

Es ist bemerkenswert, dass Mutationen des *PTEN* Gens sowohl sehr früh in der Tumorgenese (wie bei vererblichen Krebsyndromen), als auch deutlich später in fortgeschrittenen Tumoren vorgefunden werden. Eine Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass Defekte von *PTEN* - ob durch Mutation oder epigenetische Mechanismen entstanden - in verschiedenen Entwicklungsstadien mit dem Verlust anderer Tumorsuppressoren und/oder der Aktivierung

von Onkogenen kooperieren können. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Funktionen von PTEN bei der Regulation der zellulären Interaktion mit der extrazellulären Matrix von besonderer Bedeutung in späteren Stadien der Tumorprogression sein können. Alterationen der Zelladhäsion an Matrixproteine, Migration und Apoptose werden bei Tumorerkrankung und Metastasierung ein Stellenwert beigemessen. Der Verlust von PTEN könnte einen zentralen Mechanismus für diese Veränderungen darstellen (163).

PTEN und Meningeom

BOSTROM et al. (185) konnten in ihren Untersuchungen an humanen Meningeomen mit 10q Abnormalitäten keine *PTEN*-Mutationen oder homozygote Gen-Deletionen nachweisen.

Eine andere Gruppe stellte eine gesteigerte Häufigkeit an LOHs von 10q Markern bei atypischen und anaplastischen Meningeomen fest. Nur bei einem malignen Meningeom mit LOH konnte eine Mutation des verbliebenen Allels nachgewiesen werden. *PTEN* scheint folglich nicht in die Pathogenese von Meningeomen niedrigeren Grades involviert zu sein, kann jedoch offenbar zur malignen Progression eines Anteils anaplastischer Meningeome beitragen (186). Beide Gruppen vertreten die Hypothese, dass mindestens ein weiteres Tumorsuppressorgen auf dem langen Arm von Chromosom 10 lokalisiert ist. Bei einer Untersuchung von 61 Meningeomen menschlicher Patienten konnten Mutationen von *PTEN* bei einem sporadischen anaplastischen und einem strahleninduzierten transitionalen Meningeom festgestellt werden. Es wird auch hier eine Beteiligung von PTEN an der malignen Progression eines kleineren Teils von Meningeom-Fällen in Betracht gezogen (149). Über die immunhistochemische Darstellung von PTEN in humanen Meningeomen liegen bislang keine Veröffentlichungen vor. Die Fachliteratur enthielt zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen keine Berichte über Analysen von PTEN beim caninen Meningeom.

2.4.3 Identifikation und Untersuchung von Tumorsuppressorgenen durch Nachweis von Heterozygotieverlusten (*loss of heterozygosity*, LOH) unter Anwendung polymorpher DNA-Marker

2.4.3.1 Grundlagen

Untersuchungen auf Heterozygotieverlust werden durchgeführt, um Hinweise auf die Lokalisation von Kandidaten-Tumorsuppressorgenen zu finden, die an familiären bzw. sporadischen Tumorformen beteiligt sind. Je dichter ein gekoppelter Marker an dem mutmaßlichen Locus liegt, desto höher ist die zu erwartende Häufigkeit der Feststellung eines *loss of heterozygosity* (LOH) (187).

Bei der erblich bedingten Form des Retinoblastoms handelt es sich beim somatischen, das zweite Allel betreffenden Ereignis, welches die bereits bestehende rezessive Mutation zu Tage treten lässt, häufig um **mitotische nondisjunction** (Nichttrennung) mit Verlust des Wildtyp-Chromosoms, **Deletion**, **mitotische Rekombination** oder **Genkonversion**. Solche Prozesse resultieren in der Abwesenheit genetischen Materials eines Elternteils und können über den Heterozygotieverlust von Markern, die den Locus flankieren, festgestellt werden. Entsprechende Vorgänge lassen auch in der sporadischen Form des Retinoblastoms rezessive, somatische Mutationen erkennbar werden (128, 187, 188). Der erste Hinweis auf Rekombination zwischen homologen Chromosomen in somatischen Zellen stammte aus Untersuchungen familiärer Retinoblastome (188). Nachfolgend wurde LOH infolge mitotischer Rekombination in mehreren weiteren Tumorarten festgestellt und als ein wesentlicher Beitrag in der Tumorgenese bewertet (189).

Krebszellen entstehen durch eine Akkumulation von Mutationen in entscheidenden Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen. Dabei kann jede genetische Veränderung – entweder ererbt (Keimbahn) oder erworben (somatisch) - einen Wachstumsvorteil für die transformierten Zellen beitragen (190). Die im Verlauf der Tumorgenese auftretenden genetischen Alterationen können für die Detektion von Krebszellen in Gewebeproben herangezogen werden. Auf PCR (*polymerase chain reaction*) basierende Techniken erlauben eine rapide Amplifikation der zu untersuchenden DNA, was die Menge des benötigten Ausgangsmaterials vermindert (190).

Zusätzlich zu spezifischen Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen können Veränderungen in Mikrosatelliten (d.h. sich wiederholenden DNA-Sequenzen) als Marker für die Detektion der klonalen Evolution neoplastischer Zellen verwendet werden. Da Mikrosatelliten interindividuell hoch polymorph sind, ist eine Unterscheidung maternaler und paternaler Allele möglich. Typischerweise werden gepaarte Proben von normaler DNA (z.B. aus Lymphozyten des Blutes) und DNA aus Tumorgewebe oder einer Körperflüssigkeit wie Urin (bei Verdacht auf Harnblasenkarzinom) verglichen (190, 191).

Bei Gewebeproben, die nur wenige neoplastische Zellen enthalten oder bei einer Infiltration mit normalen Lymphozyten kann allerdings die Diagnose eines LOHs verdeckt werden (191).

Ein *loss of heterozygosity* (LOH), d.h. Verlust eines Allels stellt sich auf dem Elektrophoresegele durch die Abwesenheit der entsprechenden Bande der Tumor-DNA im Vergleich zur konstitutionellen DNA dar und wird als Hinweis auf mutmaßliche Tumorsuppressorgene in dieser Lokalisation gewertet (192).

2.4.3.2 *p53*-LOH auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 des Menschen

Ein LOH im Bereich des *p53*-Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 des Menschen und somatische Mutationen von *p53* sind die am häufigsten festgestellten genetischen Alterationen bei humanen Krebserkrankungen. Diese molekularen Aberrationen sind mit der Entwicklung und Progression einer großen Anzahl menschlicher Tumoren assoziiert (41).

Beispielsweise konnte in einer Untersuchung humaner kolorektaler Karzinome mit Markern für den kurzen Arm (p) von Chromosom 17 in der Mehrheit der Fälle eine Häufung von Deletionen einer Region nachgewiesen werden, in der das *p53* Gen lokalisiert ist. Ein Allelverlust liegt vor, wenn eines der beiden in normalen Zellen vorhandenen und durch informative Marker erfassbaren Allele im Tumorgewebe desselben Individuums fehlt. Bei dieser Studie dienten **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen** (RFLPs) als Marker für die Untersuchung von Allelverlusten. Die Darstellung erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden. In den Fällen mit Deletionen auf Chromosom 17p, welche zusätzlich noch durch Sequenzierung der cDNA des verbliebenen *p53* Allels

untersucht wurden, konnten Punktmutationen festgestellt werden, die einen Aminosäureaustausch im Protein bedingen (138).

Eine Identifikation aller möglichen Mutationen in der kodierenden Region eines Tumorsuppressor- oder Onkogens ist aufwendig. Ein derartiges „Scannen“ auf Mutationen in einer Mischung von normalen und neoplastischen Zellen ist gegenwärtig nicht durchführbar, mit Ausnahme des Nachweises einiger Mutations-„Hot Spots“ von *p53* oder *K-Ras*. Ein „Hot Spot“ ist beispielsweise Codon 249 von *p53* beim humanen Leberzellkarzinom, zurückzuführen auf die mutagene Wirkung von Aflatoxin B₁ (43, 190).

Diese technische Limitierung erweckt einen Bedarf nach anderen klonalen Markern: Die Mikrosatelliten-Analyse stellt eine wichtige und relativ einfach durchzuführende Alternative der Tumor-Detektion dar. Im Gegensatz zu der Verwendung spezifischer Sonden um z.B. bestimmte Onkogen-Mutationen zu identifizieren, wird bei der Mikrosatelliten-Analyse ein Satz an PCR-Primern für alle Proben verwendet (190).

2.4.3.3 Definitionen

Mikrosatelliten gehören der Familie repetitiver, nicht kodierender DNA an, die sich wie folgt einteilen lässt:

- a) **Satelliten-Sequenzen:** Anordnungen mit Wiederholungseinheiten (*repeats*) von 5-100 Basenpaaren (bp), charakteristischerweise organisiert in Gruppierungen von ca. 100 Megabasen. Sie sind im Heterochromatin lokalisiert, in der Nähe der chromosomalen Zentromere und Telomere. Innerhalb von Populationen sind sie bezüglich ihrer Größe nicht so variabel wie andere Mitglieder dieser Familie.
- b) **Minisatelliten-Sequenzen:** Diese auch als *variable number of tandem repeats* (VNTRs) bezeichneten Sequenzen besitzen repeats von 15-70 bp und eine Größe von 0,5-30 Kilobasen. Sie sind in euchromatischen Regionen des Genoms anzutreffen und häufen sich am Ende von Chromosomen. Innerhalb von Populationen besteht hinsichtlich der repeat-Größe eine ausgeprägte Variabilität.
- c) **Mikrosatelliten-Sequenzen:** Mikrosatelliten, auch als *simple sequence length polymorphisms* (SSLPs) oder *short tandem repeat polymorphisms* (STRs) bezeichnet, können definiert werden als tandemartige Anordnung kurzer Nukleotidsequenzen mit

repeats von (1)2-6 bp, die üblicherweise zwischen (10)15 und 30(50) mal wiederholt werden. Für die Bearbeitung genetischer Fragestellungen ist bedeutsam, dass die Anzahl der Wiederholungen in einem gegebenen Mikrosatelliten hoch polymorph ist, d.h. zwei Allele eines bestimmten Mikrosatelliten unterscheiden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in ihrer Kopiezahl der Wiederholungseinheiten. Hinsichtlich der Längenfragmente ergibt sich also eine ausgeprägte Variabilität; als Durchschnittswert werden ca. 100 bp angegeben. Mikrosatelliten sind ubiquitär im Genom sowohl in kodierenden als auch nicht kodierenden Regionen anzutreffen, allerdings ist ihre Verteilung innerhalb eines einzelnen Genoms nicht homogen. Für Säugetiere werden 238 Mikrosatelliten pro Mbp des Genoms erwartet. Größenpolymorphismen von Mikrosatelliten werden kodominant, entsprechend den Mendelschen Regeln vererbt. Mikrosatelliten kodieren i.d.R. keine Proteine und ihre Funktion ist – falls vorhanden – bislang noch unklar. Möglicherweise handelt es sich um überflüssige, „egoistische“ DNA, die sich im Laufe der Evolution angesammelt hat und lediglich aufgrund der Fähigkeit zur Replikation und Ausbreitung im Genom erhalten bleibt (62, 192-194).

Klassifikation von Mikrosatelliten-Sequenzen:

Ausdrücke wie $(GATA)_n$ repräsentieren entsprechende Anzahlen an Tandem-repeats von GATA. Die Angabe der Sequenz eines Stranges impliziert die entsprechende Sequenz des komplementären Stranges der DNA-Doppelhelix.

- **Einfache, perfekte repeats:** Die repeat-units sind tandemartig, d.h. hintereinander angeordnet; z.B. $(TG)_{12}$
- **Einfache, nicht perfekte repeats:** Nicht perfekte repeats unterscheiden sich von perfekten repeats durch die Anwesenheit von ein bis drei sich nicht wiederholenden Basen, die eine Abfolge z.B. $(CA)_n$ unterbrechen. Auf beiden Seiten der Unterbrechung befinden sich mindestens drei vollständige repeats; z.B. $(CA)_{18}AT(CA)_3$
- **zusammengesetzte, perfekte repeats:** z.B. $(CA)_{10}(AG)_{11}$
- **zusammengesetzte, nicht perfekte repeats;** z.B. $(AC)_5T(CA)_9T(AC)_8(AG)_5$

Diese Klassifizierung findet sowohl beim Menschen als auch beim Hund Anwendung (195).

Entstehung von Mikrosatellitenpolymorphismen

Als grundlegender Entstehungsmechanismus wird *slipped-strand mispairing* (SSM) während der Replikation oder DNA-Reparatur an kurzen, zufällig bestehenden Wiederholungssequenzen angenommen: In seiner einfachsten Form beinhaltet SSM eine lokale Denaturierung und eine Verschiebung der DNA-Einzelstränge. SSM ist also ein intrahelikales Ereignis, das die zwei Stränge einer DNA-Doppelhelix betrifft. Die einfachsten Folgen dieser Fehlpaarung sind Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Wiederholungseinheiten, wodurch ein Längenpolymorphismus bedingt wird. Durch Mutation können neue Motive entstehen, die durch weitere SSM-Ereignisse propagiert werden. Poly-CA-Folgen sind gehäuft festzustellen. Methylierte C-Reste können desaminiert werden, was die Transition zu T bedingt. Ca. 90% der methylierten C-Reste treten in 5'CG3'-Nukleotidfolgen auf. Durch Desaminierung dieses Motivs entsteht 5'TG3' und im komplementären Strang 5'CA3'. Es wird vermutet, dass mit der Expansion der repetitiven Sequenzen eine Prädisposition für eine beschleunigte Ausdehnung aufgrund von *unequal crossing over* (UCO) einhergeht. UCO ist ein interhelikales Ereignis, das DNA-Moleküle zweier verschiedener Chromosomen oder Schwesterchromatiden einbezieht. UCO kann dementsprechend nur während der Chromosomenausrichtung im Zuge der Zellteilung auftreten. Im Gegensatz dazu ist SSM frei von solchen Einschränkungen und kann potentiell immer dann auftreten, wenn sich im Rahmen von Reparatur oder Replikation ungepaarte Schleifen ausbilden. Neben SSM kann UCO ebenfalls Tandem-Duplikationen in DNA generieren. UCO wird allgemein als eine wichtige Antriebskraft bei Bildung und Erhalt von Satelliten-DNA angesehen (196).

Es wird davon ausgegangen, dass Mutationen infolge des SSM-Mechanismus ausreichend häufig auftreten, um einen hohen Grad an Polymorphismus innerhalb von Populationen zu erhalten, andererseits diese Ereignisse jedoch nicht häufig genug sind, um in aufeinander folgenden Generationen aufzutreten (193).

Als genetischer Polymorphismus wird die erbliche Vielgestaltigkeit eines definierten Genortes bezeichnet, dessen seltene Genvarianten definitionsgemäß mit einer Frequenz von über 1% in der Population auftreten müssen. Polymorphe DNA-Marker sind polymorphe

DNA-Abschnitte ohne erkennbaren Informationsgehalt. Zumeist werden Mikro- und Minisatelliten als polymorphe Marker eingesetzt (197).

Der Informationsgehalt eines Polymorphismus (PIC, *polymorphism information content*) kann aus Allelfrequenz und Anzahl der Allele berechnet werden. Je höher die Anzahl der Allele und je ausgeglichener die Allelfrequenzen, desto größer wird der PIC-Wert und damit die Eignung als genetischer Marker; mit abnehmenden PIC-Wert wird es dagegen immer schwieriger, doppelt heterozygote Individuen zu finden (198).

2.4.3.4 Anwendung und methodische Betrachtungen

Mikrosatelliten machen einen signifikanten Anteil an der Familie repetitiver DNA-Sequenzen aus und treten in allen eukaryotischen Genomen auf. Sie sind im Erbgut weit verteilt, werden nach den Mendelschen Regeln kodominant vererbt, zeigen einen ausgeprägten Polymorphismus und lassen sich durch Polymerase-Kettenreaktion amplifizieren und analysieren. Mikrosatelliten spielen als Marker für das Genom eine bedeutende Rolle mit einer breiten Palette an Anwendungsmöglichkeiten bei Mensch und Tier wie Genomkartierung, Tumorforschung, Abstammungsprüfung, Individuenidentifizierung, Populationsgenetik und Konstruktion evolutionärer Stammbäume (192, 197, 199).

Vergleich der Marker zur Feststellung von Heterozygotieverlusten:

I. RFLPs (restriction fragment length polymorphisms)

RFLPs sind Unterschiede in der Länge von DNA-Fragmenten, die durch den Verdau mit Restriktionsnukleasen entstehen. Durch Punktmutation hervorgerufene individuelle Variationen in der Nukleotidsequenz können die Schnittstellen dieser Enzyme betreffen. Insertionen und Deletionen können dagegen die relative Lage der Restriktionsloci zueinander verändern. Der Nachweis von RFLPs erfolgt über die relativ aufwendige Southern-Blot-Methode mit geeigneter Hybridisierungssonde oder PCR-Verfahren (62, 200).

Da RFLPs i.d.R. nur zwei Allele haben, die sich durch eine Punktmutation unterscheiden, ist der PIC-Wert eher niedrig (198).

II. Minisatelliten

In der praktischen Anwendung von Minisatelliten als polymorphe Marker ergeben sich DNA-Fragmentlängen von einigen wenigen bis zu 30 Kilobasen. Durch die Southern-Blot-Technik werden die Fragmente dargestellt. Eine schwerwiegende Beeinträchtigung ergibt sich daraus, dass bei diesem Verfahren ein spezifisches DNA-Fragment nur durch seine Länge und die allen analysierbaren Fragmenten gemeinsame Wiederholungssequenz dargestellt wird. Infolgedessen können Fragmente mit gleicher Wiederholungssequenz und gleicher Kopiezahl aber unterschiedlichen flankierenden Sequenzen, die verschiedene Genorte repräsentieren, nicht differenziert werden (197). Minisatelliten besitzen darüber hinaus die Nachteile, dass sie sich aufgrund ihrer Größe nicht immer mittels PCR amplifizieren lassen und auf die subtelomere Region von Chromosomen konzentriert sind (43, 192).

III. Mikrosatelliten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die direkte Amplifikation definierter DNA-Abschnitte aus genomischer DNA (201). Mikrosatelliten werden normalerweise von einzigartigen DNA-Folgen flankiert. Es ist also möglich Primer auszuwählen, welche die Vervielfältigung eines spezifischen Mikrosatelliten definieren. Die Länge der amplifizierten Region liegt im Bereich von ca. 50 bis 300 bp, was die Auftrennung in einem geeigneten Standard-Elektrophoresegel erlaubt; mit dieser Methode können Längendifferenzen von einzelnen Nukleotiden dargestellt werden (193). Durch die Einmaligkeit der flankierenden Sequenzen können die entstehenden Amplifikate eindeutig auf ihren Genort bezogen werden, was bei Minisatelliten nicht zweifelsfrei möglich ist (197). Als weiterer methodischer Vorteil ist die weite Verteilung von Mikrosatelliten über das Genom anzusehen (62). Physiologischerweise zeigen Mikrosatelliten ausgeprägte interindividuelle Längenpolymorphismen in Bezug auf verschiedene chromosomale Loci und intraindividuell verschiedene Längen der korrespondierenden Allele auf homologen Chromosomen. Diese Eigenschaften machen Mikrosatelliten zu geeigneten genetischen Markern für die Untersuchung von Heterozygotieverlusten und Mikrosatelliten-Instabilität (202).

2.4.3.5 Chromosomale Alterationen und Allelverluste beim humanen Meningeom:

Die ersten Hinweise auf genetische Loci, die an Entstehung oder Progression des Meningeoms beteiligt sein könnten lieferten zytogenetische Untersuchungen, die als regelmäßigen Befund das Fehlen eines Chromosoms 22 erhoben (203).

In einer frühen molekulargenetischen Untersuchung menschlicher Meningeome konnten SEIZINGER et al. (204) durch RFLP-Analyse bei 43 % der Tumoren Heterozygotieverluste von Markern für Chromosom 22 darstellen. Die Häufigkeit der Alteration von Chromosom 22 im Vergleich zu anderen Autosomen und die Tatsache, dass LOH sich sowohl in benignen als auch malignen Meningeomen beobachten ließ, führten zu der Hypothese, dass der Verlust eines oder mehrerer „Anti-Onkogene“ (d.h. Tumorsuppressorgene im heutigen Sprachgebrauch) auf Chromosom 22 ein entscheidendes, frühzeitiges Ereignis in der Tumorgenese darstellen könnte.

LOH von Chromosom 22 konnte in 44 % der durch polymorphe CA-Marker untersuchten und informativen Meningeome festgestellt werden (in 5 von 15 benignen, 2 von 2 atypischen und 5 von 10 malignen Tumoren). Ein Marker ist für ein Individuum informativ, wenn sich in der Gelspur des Normalgewebes zwei Banden darstellen; diese repräsentieren Heterozygotie des Markers d.h. zwei verschiedene Allele an einem Genlocus homologer Chromosomen. Im Kontrast hierzu wurden Allelverluste von Chromosom 10 in 14,3 % der informativen Fälle detektiert (in 0 von 20 benignen, 1 von 2 atypischen und 4 von 13 malignen Tumoren). Diese Ergebnisse stützen die Modellvorstellung, nach der die Tumorprogression von der initiierten meningealen Zelle zum malignen Meningeom assoziiert ist mit einem frühzeitigen LOH von Chromosom 22 und einer nachfolgenden Ergänzung durch Allelverluste von Chromosom 10 (205).

Spätere Untersuchungen zeigten, dass die Mehrheit sporadischer Meningeome mit LOH auf Chromosom 22q Mutationen des *NF2* (*neurofibromatosis type 2*) Gens des korrespondierenden Allels (22q12.2) tragen. Eine Inaktivierung des *NF2* Tumorsuppressorgens wurde in ca. 60 % der untersuchten Fälle festgestellt. Mutation und/oder Verlust von *NF2* wurden in Meningeomen aller Malignitätsgrade gefunden, was

darauf hinweist, dass die Inaktivierung dieses Gens ein frühes Ereignis in der Pathogenese von Meningeomen darstellt (206, 207). Allerdings zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der *NF2*-Mutationrate bei einigen, als WHO Grad I klassifizierten Meningeom-Typen: *NF2*-Mutationen traten signifikant häufiger in fibroblastischen (70 %) und transitionalen (83 %) Meningiomen auf als in Meningeomen vom meningotheiomatösen Typ (25 %), was auf eine unterschiedliche molekulare Pathogenese dieser Formen hindeutet (207).

Zahlreiche progressionsassoziierte Alterationen konnten im Meningeom des Menschen bereits identifiziert werden, z.B. chromosomale Deletionen von 1p, 6q, 10 und 14q wie auch Zugewinne und Amplifikationen von 17q und anderer Lokalisationen (147, 205, 208, 209) Basierend auf diesen Erkenntnissen erstellten WEBER et al. (147) ein genetisches Modell der Meningeom-Progression. Die Identifikation der in Bezug auf die Tumorentwicklung entscheidenden Gene dieser Loci steht allerdings noch aus.

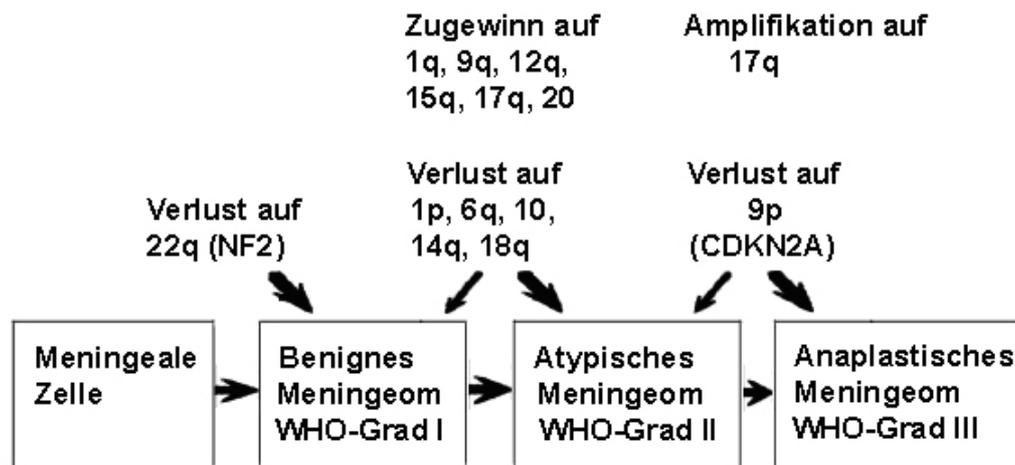


Abb. 8: Modell der Verluste und Zugewinne genetischen Materials verschiedener Chromosomen im Verlauf der Progression des humanen Meningeoms. Es ist zunächst die Nummer des Chromosoms gefolgt von der Bezeichnung des Chromosomenarms (p=kurzer Arm; q=langer Arm) angegeben. Die Alterationen sind jeweils vor jenem Tumor-Grad notiert, bei dem sie mit einer Häufigkeit von über 30 % detektiert wurden. Es ist möglich, dass die Veränderungen zu einem geringeren Anteil schon bei einem niedrigeren Tumor-Grad aufgetreten sind. Dies wird symbolisiert durch dünnere Pfeile die auf den niedrigeren Tumor-Grad weisen. Das *cyclin dependent kinase inhibitor*-Gen $p16^{INK4a}$ trägt die alternative Bezeichnung *CDKN2A*. (nach WEBER et al. (147))

Ein Allelverlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) ist die zweithäufigste chromosomale Alteration menschlicher Meningeome. SULMAN et al. (210) identifizierten hier unter Anwendung von Mikrosatelliten-Markern eine kleinste gemeinsame deletierte Region (*smallest region of overlapping deletion*, SRO) mit einer Ausdehnung von ca. 2,8 Megabasen. Der Verlust dieser Region ist assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Rezidivierung. Es wird davon ausgegangen, dass es sich um einen potentiellen Tumorsuppressor-Locus handelt.

2.4.3.6 Weitere Bedeutung von Mikrosatelliten-Analysen im Zusammenhang mit Tumoren:

Mikrosatelliten-Instabilität

In den vergangenen Jahren konnte ein neuer Weg der Karzinogenese charakterisiert werden, der ein Versagen der zellulären, für die Genauigkeit der DNA-Replikation verantwortlichen, Mechanismen beinhaltet. Damit kann eine erhöhte Rate an Mutationen hervorgerufen werden, von denen einige zur neoplastischen Transformation beitragen können. Diese spezifische Form der genomischen Instabilität wird als Mikrosatelliten-Instabilität (MSI, *microsatellite instability*) bezeichnet. MSI ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Längenalterationen von Mikrosatelliten-repeats in Tumor-DNA im Vergleich zur korrespondierenden konstitutionellen DNA und stellt ein diagnostisches Kriterium für den sog. *defective replication error repair* (RER)-Phänotyp dar. Die PCR-Produkte der Mikrosatelliten-Marker stellen sich bei MSI auf dem Elektrophoresegel charakteristischerweise als eine „Leiter“ mit geringen Größendifferenzen zwischen den einzelnen Banden dar (211, 212).

Mikrosatelliten-Instabilität wurde zuerst bei kolorektalen Karzinomen festgestellt. Da die veränderten Mikrosatelliten über das Genom verstreut liegen wurde gefolgert, dass diese Mutationen mit einem grundlegenden Defekt, einem sog. „Mutator-Phänotyp“ assoziiert seien (213).

Defektive RER wird am häufigsten durch eine Defizienz des DNA-Mismatch-Reparatursystems (MMR) aufgrund von Mutation von Genen, die für Proteine dieses Systems kodieren, verursacht. Als weitere Mechanismen konnten Promotor-Methylierung, dominant-negative Mutation oder Imbalancen in der Expression von MMR-Genen nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer repetitiven Natur sind Mikrosatelliten bei der Replikation besonders zu Fehlern geneigt (211, 212).

Im Verlauf der DNA-Replikation können Fehlpaarungen einzelner Basen durch fehlerhaften Einbau mittels Polymerasen und größere Fehlpaarungen als Folge eines Verrutschens der Stränge gegeneinander auftreten. Diese Fehler werden normalerweise durch das DNA-Mismatch-Reparatursystem erkannt und beseitigt. Mikrosatelliten-Instabilität ist ein sehr häufiger Befund bei Patienten mit HNPCC (hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom). Diese Form macht ca. 2 - 4 % aller kolorektalen Karzinome aus. Bei HNPCC liegen der Expansion oder Deletion von repetitiven Elementen in Tumor-DNA Defekte im Mismatch-Reparatursystem zugrunde (214).

PYKETT et al. (215) konnten bei einer Analyse von 16 Proben (14 primäre Meningeome, 2 Meningeom-Zelllinien) in 25 % der Fälle Expansionen oder Kontraktionen von zwei oder mehr Mikrosatelliten-Markern nachweisen.

Die Untersuchung verschiedener Tumoren des zentralen Nervensystems zeigte unter anderem bei 6,3 % von 32 untersuchten Meningeomen eine Mikrosatelliten-Instabilität. Einem Mutator-Phänotyp wird keine Rolle bei der Entwicklung der meisten Primärtumore des zentralen Nervensystems zugeschrieben und es wird für unwahrscheinlich gehalten, dass Gene des DNA-Mismatch-Reparatursystems eine Schlüsselstellung in deren Pathogenese innehaben. Allerdings wird eine Beteiligung dieser speziellen Form der genetischen Instabilität für kleine Untergruppen von Meningeomen, Gliomen und Schwannomen für möglich gehalten (211).

In einer Studie wurde MSI bei 27 % pädiatrischer Astrozytome (WHO Grad III und IV) und bei 24 % pädiatrischer Gangliogliome festgestellt mit einem nachweislichen Trend zwischen einer kürzeren mittleren Überlebenszeit und dem Vorliegen von MSI. Keiner der verschiedenen ZNS-Tumoren adulter menschlicher Patienten (darunter ein Meningeom) zeigte eine MSI (212).

Die veterinärmedizinische Literatur enthält bislang keine Untersuchungen über Mikrosatelliten-Instabilitäten bei caninen Tumoren.

2.4.3.7 Mikrosatelliten-Analyse und zytogenetische Untersuchungen auf dem Gebiet der Onkologie beim Hund

Die Untersuchung von Heterozygotieverlusten mittels Mikrosatelliten-Analyse wird auch bei der Erforschung von Funktionsverlusten der Tumorsuppressorgene des Hundes als eine geeignete Methode betrachtet. Die Etablierung hierfür verwendbarer Mikrosatelliten-Marker steht allerdings noch am Anfang. In einer Studie wurde ein Mikrosatelliten-Polymorphismus in Intron 14 des caninen *BRCA1* (*breast cancer*) Gens identifiziert, mit dessen Hilfe eine mögliche Rolle von LOH dieses Tumorsuppressorgens bei der Pathogenese des Mammakarzinoms untersucht werden soll (199).

Für den Hund (*canis familiaris*) stehen die vollständigen DNA-Sequenzinformationen seit Mitte 2004 zur Verfügung (216).

Mit Hilfe von DNA-Polymorphismen ist es möglich, Allelverluste in Tumoren auch ohne Anwendung zytogenetischer Methoden nachzuweisen (43).

Ziel zytogenetischer Untersuchungen ist die Erfassung struktureller Chromosomenmutationen (Deletion, Duplikation, Inversion, Translokation, Fusion) durch Auswertung von Karyogrammen, d.h. der bildlichen Darstellung aller Chromosomen in der Metaphase. Voraussetzung ist die Kenntnis des „normalen“ Karyogrammes (197). In der Diagnostik und Therapieüberwachung menschlicher Tumoren spielt die Zytogenetik eine bedeutende Rolle. Für die Anwendung am Hund besteht erst seit den letzten Jahren Interesse an dieser Methode. Zielsetzung zytogenetischer Studien am Hund ist zum einen die Verbesserung der Tiergesundheit zum anderen die Bereitstellung von Tiermodellen für Erkrankungen des Menschen. Der Hund (*canis familiaris*) besitzt einen diploiden Chromosomensatz mit 78 Chromosomen ($2n=78$): zwei zweiarmige Geschlechtschromosomen und 76 akrozentrische Autosomen. Viele der kleineren Autosomen sind schwierig voneinander zu unterscheiden, da sie sowohl in Größe als auch Bandenmuster einander ähneln. Die Analyse des Hundegenoms gilt aufgrund der einheitlichen Morphologie und großen Zahl an Chromosomen als problematisch. Neuere Arbeiten zur Nomenklatur haben jedoch gezeigt, dass mit verbesserten Techniken auch das Hundegenom der zytogenetischen Darstellung zugänglich ist. Es zeichnet sich auch für den Hund ab, dass Tumoren häufig mit, auf der Ebene des Chromosoms nachweisbaren, genetischen Veränderungen einhergehen und, dass spezifische Neoplasien mit

charakteristischen Chromosomenaberrationen assoziiert sind. Im Unterschied zu den Befunden beim Menschen wird für den Hund zunehmend deutlich, dass weniger spezifische Translokationen als vielmehr numerische Chromosomenaberrationen wie Polysomien (vor Allem Trisomien) einzelner Chromosomen auftreten. Auch neigen die kleinen akrozentrischen Hundechromosomen zur Bildung metazentrischer Markerchromosomen, offenbar durch telomerische Fusion mit anschließender klonaler Expansion (29, 217).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsgut umfasste 18 Fälle caniner intracranialer Meningeome der Jahre 1995 bis 2004, bestehend aus 10 Tumoren aus dem Sektionsgut des Institutes für Tierpathologie, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, 6 Einsendungen tumorös alterierter, in toto entnommener Gehirne sowie aus 2 eingesandten Tumorresektaten zur histopathologischen Untersuchung im Rahmen einer chirurgischen Intervention. Das Gewebe wurde in 7 % Formalin eingelegt verschickt. Zwischen Eintritt des Todes und Sektion des Tierkörpers lag eine durchschnittliche Zeitdauer von 1,2 Tagen. Bei den Einsendungen ganzer Gehirne lagen, soweit dokumentiert, im Durchschnitt 2,4 Monate (1 Tag bis 4,5 Monate) zwischen Tod des Tieres und Überweisung an das Institut.

3.2 Allgemeine Kasuistik

Rasseverteilung

Mischlinge sind im Untersuchungsgut am stärksten repräsentiert, gefolgt von Boxern und Deutschen Schäferhunden (Abb. 9)

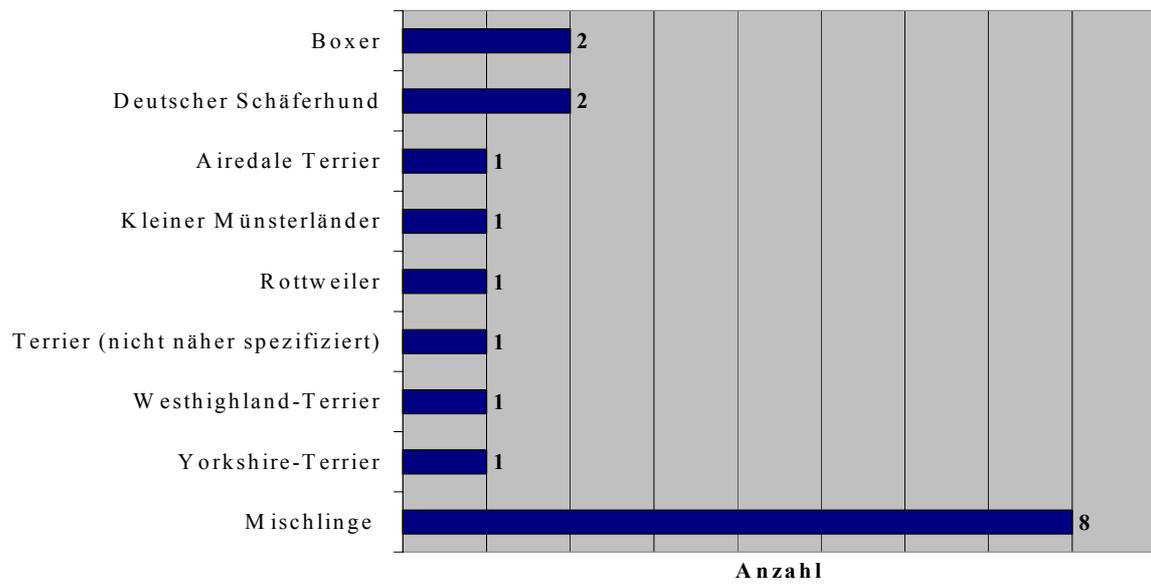


Abb. 9: Rasseverteilung der in der Studie untersuchten Hunde mit intracranialem Meningeom

Alter

Durchschnitt: 9,8 Jahre

Spanne: 4 - 17 Jahre (Abb.10)

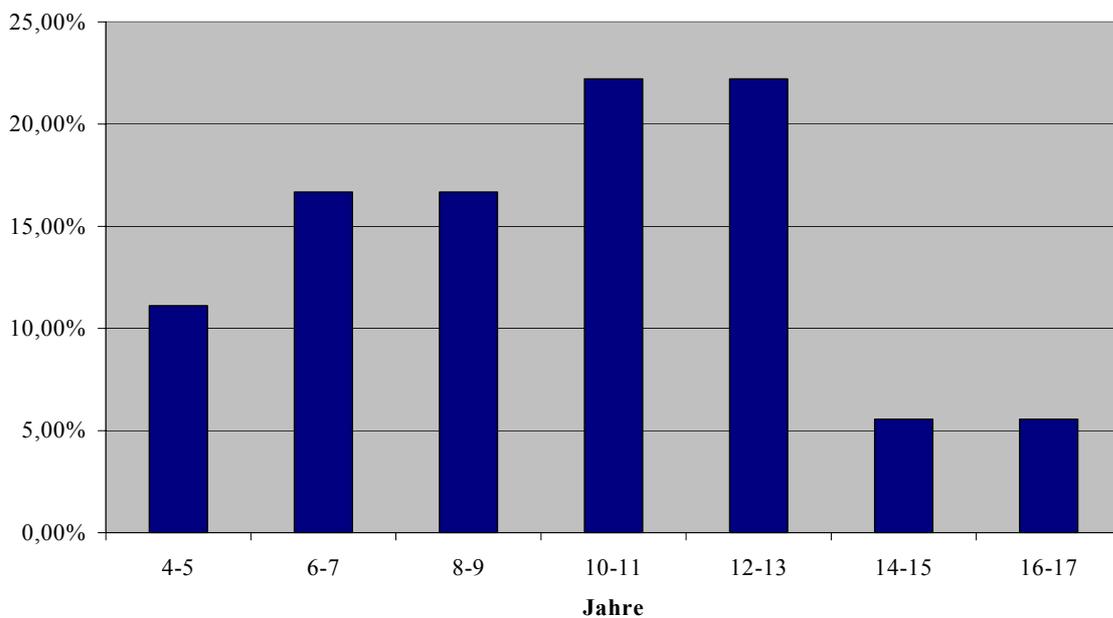


Abb. 10: Altersverteilung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hunde mit intracranialem Meningeom (in %)

Geschlecht (Anzahl)

männlich: 7
weiblich, kastriert: 6
weiblich: 3
männlich, kastriert: 2

Der Zeitpunkt der Kastration war im einzelnen nicht feststellbar (Abb. 11).

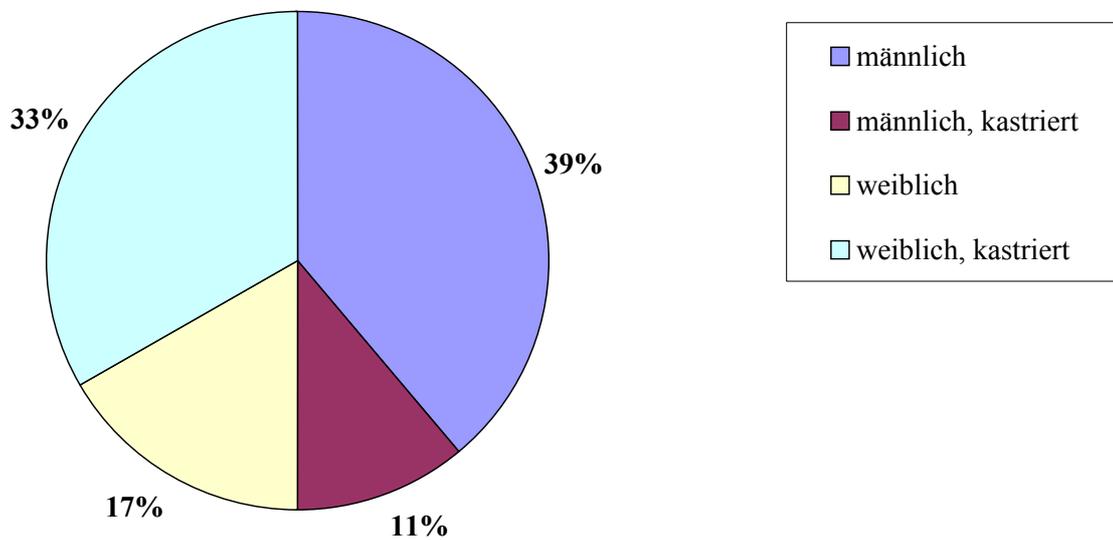


Abb. 11: Geschlechtsverteilung der untersuchten Hunde mit intracranialem Meningeom (in %)

Todesart (Anzahl)

Euthanasie: 10
natürlicher Tod: 4
unbekannt: 2

Die operierten Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung am Leben.

Lokalisation der Meningeome (Anzahl)

Es handelte sich in allen Fällen um singuläre Neoplasien. Bei Resektaten wurden die Angaben des Einsenders übernommen.

- Telencephalon:
 - Bulbus olfactorius (li./re.) 3/2
 - Großhirnhemisphäre (li./re.) 2/2
 - Lobus piriformis (li./re.) 2/0
 - Großhirn, frontobasal (li./re.) 1/0
 - Großhirn ohne weitere Angabe 1
- Metencephalon:
 - Kleinhirnbrückenwinkel (li./re.) 1/0
 - Radix sensoria nervi trigemini (li./re.) 0/1
- Falx cerebri: 1
- Hirnbasis: 1
- keine Angabe: 1

Volumen der Tumoren (soweit metrisch erfasst)

Durchschnitt: 3,7 cm³

Spannweite: 0,1 cm³ - 8 cm³

Neurologische Symptomatik

In 16 der 18 Fälle zeigten die betroffenen Hunde zumeist kombinierte neurologische Symptome; ein Tier war symptomfrei und eine Einsendung enthielt diesbezüglich keine Angabe.

- Epileptische Anfälle / Krampfanfälle: 13
- Ataxie: 3
- Drohreflex reduziert oder negativ: 3
- Umfallen und Seitenlage: 3
- Wesensänderung: 3
- Blindheit / vermutete Blindheit: 2

- Kopfschiefhaltung: 2
- Mydriasis: 2
- Ruderbewegung: 2
- Somnolenz: 2
- Haltungs- und Stellreaktion reduziert: 1
- Hyperästhesie im Kopfbereich: 1
- Manegebewegung: 1
- monotones Wandern: 1
- Nystagmus, vertikal: 1
- Parese: 1
- Pupillarreflex negativ: 1
- Strabismus: 1

Gemeinsames Auftreten von Meningeomen mit anderen Tumoren

Bei 2 von 10 Sektionsfällen wurden weitere tumoröse Prozesse erfasst:

- Leydigzelltumor eines Hodens, knotige Hyperplasie des kontralateralen Hodens, Prostatahyperplasie
- Chemodektom (extraadrenales Paragangliom), Adenom der hepatoiden Perianaldrüsen

Die Vorberichte der übrigen Fälle enthielten keine Hinweise auf weitere Tumoren.

3.3 Probenaufbereitung

3.3.1 Fixierung, Einbettung und Zuschnitt

Das Gewebe wurde in 7 %igen ungepufferten Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixationszeiten im einzelnen waren nicht bekannt; je nach Größe und Permeabilität der Probe werden institutsüblich Zeiten von 3-14 Tagen veranschlagt. Im Anschluß wurde das Gewebe 1-2 Stunden mit fließendem Leitungswasser gespült.

Es erfolgte die automatisierte Entwässerung und Einbettung der Proben in Paraffin (Paraplast Plus, Sherwood Medical) durch das System Hyper Center XP (Shandon, Life Sciences International). Das Schneiden der Präparate wurde an einem Rotationsmikrotom der Firma Leica (Geräte-Typ: 2055) vorgenommen. 5 µm dicke Schnitte wurden im 48°C warmen Wasserbad gestreckt (HIR-3, Kunz Instruments) und für Routinefärbungen sowie molekulargenetische Untersuchungen auf unbeschichtete Objektträger (R Langenbrinck, Emmerdingen) aufgezogen. Für die immunhistochemische Aufarbeitung wurden adhäsivbeschichtete Objektträger eingesetzt (TES OT-Beschichtung, siehe Anhang 8.4). Die Schnitte wurden über Nacht bei ca. 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

3.3.2 Standardfärbungen

3.3.2.1 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Darstellung: Zellkerne, Kalk, saurer Schleim,

grampositive Bakterien *blau*

übrige Strukturen *rot*

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe bis 30 %
- Spülen in Aqua dest.
- Kernfärbung mit Mayers Hämalaun-Lösung 7-10 min
- Bläuen in fließendem Leitungswasser 30 min
- Spülen in Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Eosin G 5-7 min
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe je 5 min
- Xylol 5 min
- Eindecken mit Eukitt[®]

3.3.2.2 Cresylviolett-Färbung (Nissl-Färbung)

Darstellung: Rauhes endoplasmatisches Retikulum,

Kernmembran, Nukleolen *intensiv blau*

Zytoplasma von Glia- und Ganglienzellen *blass blau*

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe bis 96 %
- 12 Stunden stehen lassen

MATERIAL UND METHODEN

- Inkubation in Cresylechtviolett-Lösung (Anhang 8.4) 10 min
- Differenzierung in 2 x 96 % Alkohol unter optischer Kontrolle bis der rötliche Farbton entfernt ist
- Entwässern in 2 x 100 % Alkohol je 5 min
- Xylol 5 min
- Eindecken mit Eukitt®

3.3.2.3 periodic acid Schiff's reaction (PAS)

Darstellung: Polysaccharide, Muco- und Glykoproteide,

Muco- und Glykophospholipide *rot*

übrige Strukturen incl. Zellkerne *blau*

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe
- Spülen in Aqua dest.
- Einstellen der Schnitte in 1 % Perjodsäure 15 min
- Spülen in Aqua dest. 15 min
- Einstellen der Schnitte in fuchsinschweiflige Säure (Schiffs Reagenz) 40 min
- Auswaschen in 3 Portionen in SO₂-haltigen Wasser (Anhang 8.4) je 5 min
- Auswaschen in fließendem Leitungswasser 15 min
- Kernfärbung mit Mayers Hämalaun-Lösung 1 min
- Bläuen in fließendem Leitungswasser 2 min
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe je 5 min
- Xylol 5 min
- Eindecken mit Eukitt®

3.3.3 Immunhistochemische Färbungen

3.3.3.1 Prinzip

Die immunhistochemische Darstellung von *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), Ki-67-Antigen, p53-Protein und *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten* (PTEN)-Protein erfolgte durch die *avidin-biotin-complex* (ABC)-Methode (218). Nach Bindung des Primärantikörpers an das gesuchte Antigen dient ein biotinierter Sekundärantikörper als Brücke zwischen dem Primärantikörper und einem Komplex aus Avidin und biotiniliertem Enzym (hier: Meerrettichperoxidase).

In Anwesenheit von H₂O₂ wird durch dieses Enzym über mehrere Reaktionsschritte das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) oxidiert, welches anschließend zu einem braunen Produkt polymerisiert.

3.3.3.2 Technische Durchführung

Alle Reaktionen fanden soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur statt.

Als Positivkontrollen dienten Schnitte von humanen und caninen Mammakarzinomen; für PCNA und Ki-67 zusätzlich Präparate von caninen Lymphknoten.

Als Negativkontrollen wurden Schnitte derselben Präparate verwendet, welche an Stelle des primären Antikörpers mit dem zur Blockierung unspezifischer Bindungsmöglichkeiten eingesetzten Normalserum inkubiert wurden.

Tab. 2: Verwendetes Normalserum

Normalserum	Verdünnung	Hersteller
Ziege (G-Serum Art. Nr. 600605)	1:20	Novocastra Laboratories Ltd, UK

Tab. 3: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
Maus anti proliferating cell nuclear antigen (Code No. M08790)	PC10	1:1000	DAKO A/S, DK
Maus anti human Ki-67 Antigen (Code No.M7240)	MIB-1	1:200	DAKO A/S, DK
Kaninchen anti NCL-p53-CM1	polyklonal	1:800	Novocastra Laboratories Ltd, UK
Maus anti PTEN (#9556)	26H9	1:300	Cell Signaling Technology, Inc, USA

Tab. 4: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti Maus, biotiniliert (E0433)	1:200	DAKO A/S, DK
Ziege anti Kaninchen, biotiniliert (E0432)	1:200	DAKO A/S, DK

A) PCNA bzw. p53

- | | | |
|-----|--|------------|
| 1. | Entparaffinieren mit Xylol | 2 x 20 min |
| 2. | Rehydrieren über absteigende Alkoholreihe (100 % Isopropanol, 96 %, 70 % Ethanol) bis Aqua dest. | jew. 5 min |
| 3. | Mikrowellenbehandlung in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 (Anhang 8.4) bei 500 W zur Antigendemaskierung; verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen | 20 min |
| 4. | Schnitte im Citratpuffer abkühlen lassen | 20 min |
| 5. | Waschen in PBS (Anhang 8.4) | 3 x 5 min |
| 6. | Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87 %iges H ₂ O ₂ in Methanol (Anhang 8.4) | 30 min |
| 7. | Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| 8. | Inkubation mit 1:20 in PBS verdünnten Normalserum zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine im Untersuchungsgut und damit zur Verhinderung von unspezifischen Anfärbungen | 30 min |
| 9. | Dekantieren des Normalserums | |
| 10. | Inkubation mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper gegen PCNA bzw. p53 in einer feuchten Kammer bei 4°C | über Nacht |
| 11. | Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| 12. | Inkubation mit 1:200 in PBS verdünnten biotinilierten Sekundärantikörper welcher gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist | 30 min |
| 13. | Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| 14. | Auftragen des 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz (Anhang 8.4) | 30 min |
| 15. | Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| 16. | Farbreaktion mit 1 mg/ml 3,3' Diaminobenzidintetrahydrochlorid in Phosphatpuffer (PBS) pH 7,0-7,6 mit 1µl frisch hinzugefügten 30 %igem H ₂ O ₂ pro ml Lösung (Anhang 8.4) unter optischer Kontrolle | 2 – 5 min |
| 17. | Waschen in PBS | 2 x 5 min |
| 18. | Waschen in Aqua dest. | 2 x 1 min |
| 19. | Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung | 5 s |

MATERIAL UND METHODEN

20. Bläuen in fließendem Leitungswasser 20 min
21. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 % Ethanol, 100 % Isopropanol) jew. 1 min
22. Xylol 2 x 5 min
23. Eindecken mit Eukitt®

B) Ki-67

1. Entparaffinieren mit Xylol 2 x 20 min
2. Rehydrieren über absteigende Alkoholreihe (100 % Isopropanol, 96 %, 70 % Ethanol) bis Aqua dest. jew. 5 min
3. Antigendemaskierung mit 0,1 %iger Trypsin-Lösung in PBS (Anhang 8.4) bei 37°C 6 min
4. Waschen in PBS 3 x 5 min
5. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87 %iges H₂O₂ in Methanol 30 min
6. Waschen in PBS 3 x 5 min
7. Mikrowellenbehandlung in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 bei 500 W zur Antigendemaskierung; verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen 20 min
8. Schnitte im Citratpuffer abkühlen lassen 20 min
9. Waschen in PBS 3 x 5 min
10. Inkubation mit 1:20 in PBS verdünnten Normalserum 30 min
11. Dekantieren des Normalserums
12. Inkubation mit dem 1:200 in PBS verdünnten Primärantikörper gegen Ki-67 in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht
13. Waschen in PBS 3 x 5 min
14. Inkubation mit 1:200 in PBS verdünnten biotinilierten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper 30 min
15. Waschen in PBS 3 x 5 min
16. Auftragen des 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz 30 min
17. Waschen in PBS 3 x 5 min

MATERIAL UND METHODEN

18. Farbreaktion mit 1 mg/ml 3,3' Diaminobenzidintetrahydrochlorid in Phosphatpuffer (PBS) pH 7,0-7,6 mit 1µl frisch hinzugefügten 30 %igem H₂O₂ pro ml Lösung unter optischer Kontrolle 2 – 5 min
19. Waschen in PBS 2 x 5 min
20. Waschen in Aqua dest. 2 x 1 min
21. Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung 5 s
22. Bläuen in fließendem Leitungswasser 20 min
23. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 % Ethanol, 100 % Isopropanol) jew. 1 min
24. Xylol 2 x 5 min
25. Eindecken mit Eukitt®

C) PTEN

1. Entparaffinieren mit Xylol 2 x 20 min
2. Rehydrieren über absteigende Alkoholreihe (100 % Isopropanol, 96 %, 70 % Ethanol) bis Aqua dest. jew. 5 min
3. Waschen in PBS 5 min
4. Mikrowellenbehandlung in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 bei 500 W zur Antigendemaskierung; verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen 10 min
5. Schnitte im Citratpuffer abkühlen lassen 20 min
6. Waschen in Aqua dest. 3 x 5 min
7. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 1 %iges H₂O₂ in Aqua dest. (Anhang 8.4) 10 min
8. Waschen in Aqua dest. 3 x 5 min
9. Waschen in PBS 5 min
10. Inkubation mit 1:20 in PBS verdünnten Normalserum 60 min
11. Dekantieren des Normalserums
12. Inkubation mit dem 1:300 in 5 %igem Normalserum von der Ziege verdünnten Primärantikörper gegen PTEN in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht
13. Waschen in PBS 3 x 5 min

- | | | |
|-----|---|------------|
| 14. | Inkubation mit 1:200 in PBS verdünnten biotinilierten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper | 30 min |
| 15. | Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| 16. | Auftragen des 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz | 30 min |
| 17. | Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| 18. | Farbreaktion mit 1 mg/ml 3,3' Diaminobenzidintetrahydrochlorid in Phosphatpuffer (PBS) pH 7,0-7,6 mit 1µl frisch hinzugefügten 30 %igem H ₂ O ₂ pro ml Lösung unter optischer Kontrolle | 2 – 5 min |
| 19. | Waschen in Aqua dest. | 2 x 1 min |
| 20. | Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung | 5 s |
| 21. | Bläuen in fließendem Leitungswasser | 20 min |
| 22. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 % Ethanol, 100 % Isopropanol) | jew. 1 min |
| 23. | Xylol | 2 x 5 min |
| 24. | Eindecken mit Eukitt [®] | |

3.4 Dokumentation und Auswertung

3.4.1 PCNA, Ki-67 und p53

Von den immunhistochemisch angefärbten Präparaten wurden 6 bis 10 digitale Mikrophotos mit einer 400fachen Gesamtvergrößerung in gleichmäßiger Verteilung über die Tumorfläche angefertigt (Mikroskop: Zeiss Axiolab[®], Jena; Kamera: ProgRes 3003, Kontron Elektronik, Eching). Die Bilddaten wurden auf CD-ROM archiviert. Eine positive immunhistochemische Reaktion wurde definiert als eine deutliche mittel- bis dunkelbraune Anfärbung des Zellkerns, welcher sich hierdurch vom blassen Zytoplasma abgrenzen lässt.

In die Untersuchung eines Falles einbezogen wurde jeweils das Bild mit augenscheinlich maximaler und jenes mit minimaler Dichte an positiven Zellkernen. Dazu wurden so viele weitere zufällig ausgewählte Photos hinzugezogen bis eine Mindestanzahl von 1000 Zellkernen der Beurteilung zur Verfügung stand. Die Quantifizierung wurde unterstützt durch das frei erhältliche Computerprogramm *UTHSCSA Image Tool for Windows Version 3.00* (<http://www.ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Mittels der *Count and Tag* Funktion wurden

zuerst die negativen, dann die positiven Tumorzellkerne markiert und gezählt. Endothel- und Entzündungszellen wurden von der Zählung ausgeschlossen. PCNA, Ki-67 und p53 *-labeling indices* (LI) wurden definiert als Quotient der Anzahl der positiven Tumorzellkerne und der Gesamtanzahl der untersuchten Tumorzellkerne.

3.4.2 PTEN

Die Auswertung der immunhistochemischen Reaktion auf PTEN-Protein erfolgte semiquantitativ (183). Das Endothel der im Tumor als auch im angrenzenden Gewebe verlaufenden Blutgefäße diente als interne Positivkontrolle: Der Färbung des Endothels wurde eine mittlere Intensität (++) zugeordnet. Eine Intensität die jener des Blutgefäßendothels entspricht wurde als (++) bewertet, eine geringere als (+) und eine höhere als (+++). Eine abwesende immunhistochemische Färbung wurde als (-) dokumentiert. Die Reaktionen von Zellkern, Kernmembran und Zytoplasma wurden getrennt beurteilt.

3.4.3 Mitose-Index

Der Mitose-Index (MI) wurde definiert als Anzahl der eindeutigen Mitosefiguren innerhalb von 10, über die Fläche des HE-gefärbten Präparates verteilten, lichtmikroskopischen Gesichtsfeldern bei 400facher Gesamtvergrößerung. Ein Gesichtsfeld hat eine Fläche von 0.096 mm².

3.5 Gruppeneinteilung

Die Tumoren wurden anhand der HE-, Nissl- und erforderlichenfalls PAS-gefärbten Präparate unter Anwendung der gegenwärtig gültigen histologischen Klassifikation der Tumoren des Nervensystems der Haustiere (12) subtypisiert. Falls erforderlich wurde eine bereits bestehende Diagnose revidiert, bzw. der aktuellen Terminologie angepaßt. Auf diese Weise wurden Gruppe I („klassische Subtypen“) und Gruppe III (anaplastisches Meningeom) etabliert. Auf Tumoren, die sich anhand des obigen veterinärmedizinischen Klassifikationssystems nicht widerspruchslos einordnen ließen, wurden die derzeit gültigen Kriterien (11) für das humane atypische Meningeom angewandt:

In Gruppe II wurden jene Tumoren eingeordnet, die zumindest 3 der nachfolgend genannten 5 Merkmale aufwiesen:

- eine erhöhte Zelldichte
- eine kleinzellige Tumorpopulation mit erhöhter Kern-Plasma-Relation
- prominente Nukleolen
- ein ununterbrochenes, strukturloses oder flächenhaftes Wachstumsmuster mit Architekturverlust („*patternless or sheet-like growth*“)
- Herde spontaner oder geographischer Nekrosen (in unbehandelten Tumoren)

3.6 Statistik

Die nach histologischen Kriterien vollzogene Gruppeneinteilung wurde, soweit die Anzahl der jeweilig enthaltenen Fälle dies zuließ, anhand der *labeling indices* (LI) von PCNA, Ki-67 und p53 bzw. des Mitose-Index mit dem Mann-Whitney-Test, einem verteilungsunabhängigen Signifikanztest, unter Anleitung von Prof. Dr.oec.publ., Dr.med.vet., Dipl.-Math. Osterkorn am Institut für Tierzucht der Ludwig-Maximilians-Universität München überprüft.

Die weitere statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen Microsoft® Excel 97 und SPSS 12.0.1 (SPSS Inc.) für Windows. Es wurde das arithmetische Mittel, Median, Standardabweichung und der Bravais-Pearson Korrelationskoeffizient berechnet.

3.7 Molekulargenetische Untersuchungen

Zum Schutz vor Kontamination mit fremder DNA wurde immer mit Latex-Handschuhen gearbeitet. Alle benutzten Gefäße und Pipettenspitzen wurden autoklaviert.

3.7.1 DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe

Das auf unbeschichteten Objektträgern in Form von 5 µm dicken Schnitten aufgezugene Tumorgewebe wurde mit einer sterilen Skalpellklinge (BAYHA[®], C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Plastibrand[®], BRAND GmbH+Co.KG, Wertheim) geschabt. Um die Gefahr einer Kontamination mit Normalgewebe zu reduzieren, wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle im Bereich der i.d.R. gut abgrenzbaren Tumorränder ein ca. 3 mm breiter Saum neoplastischen Gewebes belassen. Für die Gewinnung korrespondierender Wildtyp-DNA wurden Schnitte aus tumorfreien Gehirnregionen herangezogen und komplett in ein für jeden Fall gesondertes Reaktionsgefäß überführt. Für die Extraktion wurden in Abhängigkeit von der Größe des jeweiligen Schnittes 8 – 10 Objektträger benutzt.

Die weitere Prozessierung erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit (Cat. no. 69504, QIAGEN GmbH, Germany):

1. Gewebe mit 1200 µl Xylol versetzen und per Rüttelmischer gründlich durchmischen (Fuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
2. Zentrifugation bei 14000 U/min für 5 min bei Raumtemperatur (15-25 °C) (Sigma Typ 1-15, Sigma Laborzentrifugen, Osterode)
3. Überstand abpipettieren (Transferpette[®], Plastibrand[®], BRAND GmbH+Co.KG, Wertheim)
4. 1200 µl 100 % Ethanol hinzufügen und durchmischen
5. Zentrifugation bei 14000 U/min für 5 min bei Raumtemperatur (15-25 °C)
6. Ethanol-Überstand vorsichtig abpipettieren
7. Schritte 4. bis 6. einmal wiederholen
8. Geöffnetes Reaktionsgefäß bei 37 °C für 10-15 min inkubieren bis das restliche Ethanol verdunstet ist
9. Gewebe-Pellet in 180 µl Buffer ATL resuspendieren

10. 20 µl Proteinase K (QIAGEN GmbH, Germany) hinzufügen, durchmischen und bei 55 °C über Nacht inkubieren (Heizblock, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
11. Ansatz für 15 s durchmischen, 200 µl Buffer AL hinzufügen, mischen und bei 70°C im Heizblock für 10 min inkubieren
12. 200 µl 100 % Ethanol hinzufügen und gründlich durchmischen
13. Gemisch in ein DNeasy Mini Spin Colum pipettieren und letzteres in ein 2 ml collection tube einsetzen. Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 min, abzentrifugierte Flüssigkeit samt collection tube verwerfen
14. DNeasy Mini Spin Colum in ein neues 2 ml collection tube einsetzen, 500 µl Buffer AW1 hinzufügen und bei 8000 U/min für 1 min zentrifugieren. Abzentrifugierte Flüssigkeit samt collection tube verwerfen.
15. DNeasy Mini Spin Colum in ein neues 2 ml collection tube einsetzen, 500 µl Buffer AW2 hinzufügen und bei 14000 U/min für 3 min zentrifugieren. Abzentrifugierte Flüssigkeit samt collection tube verwerfen.
16. DNeasy Mini Spin Colum in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß einsetzen und 100 µl Buffer AE auf die DNeasy-Membran pipettieren. 1 min inkubieren und anschließend bei 8000 U/min für 1 min zentrifugieren
17. Elution der DNA wie in Schritt 16. einmal wiederholen

3.7.2 DNA-Extraktion aus Blut

Von zwei klinisch gesunden Hunden wurde in der Praxis eines niedergelassenen Tierarztes Blut aus der Vena cephalica antebrachii mit einer sterilen Kanüle entnommen. Als Antikoagulanzen diente 1 mg/ml EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure). Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme bei -18 °C tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei dieser Temperatur gelagert. Die DNA-Isolierung erfolgte wieder mit dem DNeasy Tissue Kit:

1. 20 µl Proteinase K in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren
2. 100 µl EDTA-Blut hinzufügen
3. Mit PBS (Anhang 8.4) auf ein Gesamtvolumen von 220 µl auffüllen
4. 200 µl Buffer AL hinzufügen und per Rüttelmischer gründlich durchmischen
5. Bei 70 °C für 10 min inkubieren

6. Mit Schritt 12. des obigen Protokolls für formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe fortfahren

Im Anschluß wurde die DNA-Konzentration des Eluates photometrisch mit einer 1:400 in Aqua dest. verdünnten Lösung bestimmt (Pharmacia GeneQuant RNA/DNA Calculator, LKB Biochrom, UK). Es wurden DNA-Ausbeuten von 90 – 320 ng/µl erzielt.

3.7.3 Auswahl der Primer

Mikrosatelliten-Marker und zugehörige Primersequenzen wurden aus verschiedenen Veröffentlichungen zusammengestellt (Tab. 5). Dies erwies sich als erforderlich um jene Region auf Chromosom 5 des Hundes in möglichst dichter Folge mit Markern abzudecken, in der das Tumorsuppressorgen *p53* mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung detektiert wurde (14). Als grundlegendes Konstrukt für die Auswahl der Mikrosatelliten, diente eine *radiation hybrid map* (15), welche das *p53*- Gen zwischen die Marker ZUBECA6 und GLUT4 positioniert. Da sowohl *p53*-Locus wie auch einige der Marker inkonstant kartiert sind, kann die in der Tabelle vorgenommene Reihung nur als eine plausible Möglichkeit vorgeschlagen werden. Die Primer wurden im Auftrag durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert. Die zu erwartenden Produktlängen sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Primer

Marker	Forward-Primer	Reverse-Primer	erwartete Produktlänge (bp)	repeat	Referenz
ZUBECA6	GCCATAAGCC CCAAGCCAGC AG	TGCCTCGTCAGCC CCTCTTCC	302	(GAAA)N(GA AA) ¹⁴	(219)
FH3702	AAAAATACCA CAGCAGAGAG G	TTCCTTTGGTGATA AAGATTGG	200		(220)
DTR05.8	AGTCATTTGG CCTTACTTCA	CAGTGATGTCATG CTGGTAG	398	(GAAA) ⁴⁵ (GA GA) ³ (GGAA) ⁷	(221)
REN262G24	GCCCACAGAT AAGGGGTTTT	GGAAGGGACAGAA GTTTTGC	158		(222)
REN153H06	TCCCATAGTA AGCACCCCTC	TCCCGCATATGCA CTATTGA	208		(222)
FH3278	CTGCTCTTTGT AACCCATGC	AATGCCTACCAGG TGAAGG	324		(220)
GLUT4	CCGAGATCGA ATCCCACTT	GGCTGCCCTTATT TTTAT	186	(TG) ²¹	(223)

3.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Reaktionen hatten ein Volumen von 50 µl und wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Plastibrand® BRAND GmbH +Co.KG, Wertheim) durchgeführt. Es wurde ein „Primus 96 advanced® Gradient“ programmierbarer Thermocycler mit Heizdeckel (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Als Matrizen-DNA wurden jeweils 5 µl Eluat eingesetzt. In Optimierungsexperimenten wurden die MgCl₂ – Konzentration des Reaktionsgemisches sowie Primeranlagerungstemperatur, Inkubationszeiten und Zykluszahl variiert bis für alle Primer geeignete Parameter gefunden waren. Für diese Experimente wurde anfänglich DNA aus tiefgefrorenem Hundeblood verwendet, um eine möglichst wenig alterierte Matrize in die Reaktion einzusetzen; abschließend wurden die Reaktionsbedingungen mit DNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebe überprüft und soweit erforderlich modifiziert.

Die PCR wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt. Die Komponenten wurden auf Eis gekühlt zusammenpipettiert, wobei das Enzym zum Schluß beigemischt wurde:

- 34,3 µl Aqua dest. für PCR (PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- 5,0 µl 10x Reaktionspuffer Y für hohe Erträge (PEQLAB)
- 2,2 µl MgCl₂ (25mM, PEQLAB)
- 1,0 µl dNTP-Mix (40 mM, 10mM pro dNTP, PEQLAB)
- 1,0 µl Primer forward (10 pmol/µl)
- 1,0 µl Primer reverse (10 pmol/µl)
- 5,0 µl Matrize (90 – 320 ng/µl)
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5 units/ µl, PEQLAB)

Die Reaktionszyklen liefen nach folgendem Temperaturprofil ab:

- Schritt 1: 94,0 °C 5 min Schmelzen der DNA
- Schritt 2: 94,0 °C 20 s
- Schritt 3: 58,0 °C 20 s Primeranlagerung
- Schritt 4: 74,0 °C 20 s Verlängerung
- 45 Zyklen Schritt 2 – 4
- Schritt 5: 74,0 °C 2 min Endverlängerung
- Schritt 6: 4,0 °C ∞ Kühlung bis zur weiteren Bearbeitung

3.7.5 Agarosegelelektrophorese

Jeweils 12 µl des PCR-Reaktionsgemisches wurden mit 1 µl Gel-Ladepuffer (6x Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2,0 % Agarosegel (Anhang 8.4; peqGOLD Universal Agarose, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit einem Ethidiumbromidgehalt von 0,35 µg/ml im Gleichstromfeld bei 80 V über 60 min (Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100, 76 x 100 mm, Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden; Consort Power Supply E 838, Consort, Belgium). Das Gel ist während der Auftrennung mit TAE-Elektrophoresepuffer (Anhang 8.4) bedeckt (*submerged agarose gel electrophoresis*, SAGE). Die Banden wurden mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid auf einem UV-Transilluminator (TFX-20M, 312 nm tube, Vilber Lourmat, France) sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera (Digital Ixus v², Canon Deutschland GmbH, Krefeld) dokumentiert. Die Länge der Amplifikate wurde durch den Vergleich mit einem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Größenstandard, sog. DNA-Leiter (Step Ladder 50 bp S-7025, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; 100 Base-Pair Ladder Pharmacia Biotech, USA) abgeschätzt.

3.7.6 Auswertung

Die Auswertung der amplifizierten polymorphen Marker erfolgte durch optischen Vergleich der Bandenmuster von Tumor- und zugehörigem Normalgewebe auf dem Gel (205, 209). Ein Marker ist für ein Individuum **informativ**, wenn sich in der Spur des Normalgewebes zwei Banden darstellen; diese repräsentieren Heterozygotie des Markers, d.h. das Vorhandensein zweier - in diesem Falle in der Länge - verschiedener Allele an einem Genlocus homologer Chromosomen. Ist in der Spur des Normalgewebes nur eine Bande vorhanden, kann dies als Homozygotie, d.h. dem Vorliegen zweier gleicher Allele, oder als Hemizygotie, dem Zustand bei dem das Allel im sonst diploiden Chromosomensatz nur einmal vorhanden ist, gedeutet werden. In dieser Konstellation besteht keine Aussagemöglichkeit über einen Allelverlust im entsprechenden Tumorgewebe, der Marker ist **nicht informativ (ni)**. Ein **loss of heterozygosity (LOH)** wurde festgestellt, wenn die Amplifikation eines informativen Markers mit DNA des Tumors nur eine Bande ergab. Dieser zur Hemizygotie führende Verlust eines Allels hat seine Ursache z.B. in einer Deletion. Stellte sich das Bandenmuster eines informativen Markers für Tumor- und Normalgewebe in entsprechender Weise dar,

wurde der Erhalt der Heterozygotie (**retention of heterozygosity, ROH**) dokumentiert. War durch die PCR kein Amplifikat zu erhalten wurde dies durch “-” kenntlich gemacht.

Es wurden für jeden Mikrosatelliten-Marker der prozentuale Anteil informativer Fälle (i) an den Amplifikaten bestimmt ($i [\%] = (ROH + LOH) / (ROH + LOH + ni) * 100$).

4 ERGEBNISSE

4.1 Gruppeneinteilung

Die 18 Tumoren dieser Studie wurden lichtmikroskopisch anhand der HE-, Nissl- und im Bedarfsfall PAS-gefärbten Präparate subtypisiert und den Gruppen I bis III zugeordnet.

Zusammensetzung und Fallzahlen der Meningeom-Gruppen

Gruppe I

- transitionales Meningeom: 6
- fibröses Meningeom: 3
- angiomatöses Meningeom: 1
- Granularzell-Meningeom: 1
- meningotheiomatöses Meningeom: 1

Ein primär als transitionales Meningeom diagnostizierter Fall wurde bei der Revision als angiomatöser Typ und ein fibröses Meningeom als transitionaler Typ klassifiziert. Die Gruppenzuordnung bleibt davon unberührt.

Gruppe II

- atypisches Meningeom: 5

Die Vertreter dieser Gruppe rekrutieren sich aus ursprünglich als transitional, angiomatös bzw. maligne typisierten Fällen.

Gruppe III

- anaplastisches/malignes Meningeom: 1

HE-Schnittpräparate repräsentativer Vertreter der Gruppen I bis III sind in Abb. 12A-14A dargestellt.

4.2 Untersuchung der Tumorzellproliferation

4.2.1 Immunhistochemische Darstellung der Proliferationsmarker PCNA und Ki-67

PCNA

Die durch den Primärantikörper PC10 vermittelte immunhistochemische Detektion von PCNA manifestiert sich als eine fast ausschließlich auf den Zellkern beschränkte, überwiegend diffuse, seltener fein-granuläre Braunfärbung. Die Farbskala reicht von einem blassen Hell- bis zu intensivem Dunkelbraun. Bei Zellen in der Mitose-Phase ist eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas erkennbar. In dieser Phase erscheint das kondensierte Chromatin nur schwach PCNA-positiv oder gänzlich negativ. Außerhalb der Mitose-Phase ist eine zytoplasmatische Anfärbung selten zu beobachten. Die Zellen des angrenzenden Nervengewebes zeigen keine immunhistochemische Reaktion mit PC10. In der Regel ist eine geringe, bei einigen Präparaten mäßige, unspezifische Hintergrundfärbung vorhanden (Abb. 12B-14B).

Positivkontrollen:

Lymphknotenpräparate des Hundes sind insbesondere in den kortikalen Keimzentren intensiv immunopositiv für PCNA. Zahlreiche Tumorzellen des humanen und caninen Mammakarzinoms zeigen eine intensive immunhistochemische Reaktion mit PC10. Das angrenzende unalterierte Drüsenepithel weist vereinzelte, ebenfalls intensiv angefärbte Zellkerne auf.

Ki-67

Eine positive immunhistochemische Reaktion des MIB-1 Antikörpers als Nachweis von Ki-67 stellt sich als eine fein-granuläre, mit den Nucleoli assoziiert erscheinende mittel- bis dunkelbraune Färbung des Zellkernes dar. Fahle, fraglich positive Anfärbungen wie bei PC10 sind bei Reaktion mit MIB-1 nur vereinzelt festzustellen. In der Mitose-Phase zeigt das kondensierte Chromatin eine intensiv dunkelbraune Färbung. Das umgebende Plasma ist homogen hellbraun dargestellt. Neuronen und Gliazellen des angrenzenden Hirngewebes sind negativ für MIB-1. Die Präparate sind frei von unspezifischer Hintergrundfärbung (Abb. 12C-14C). Positivkontrollen: Präparate humaner und caniner Mammatumoren bzw. Lymphknoten zeigen ein der PCNA-Darstellung entsprechendes Reaktionsmuster.

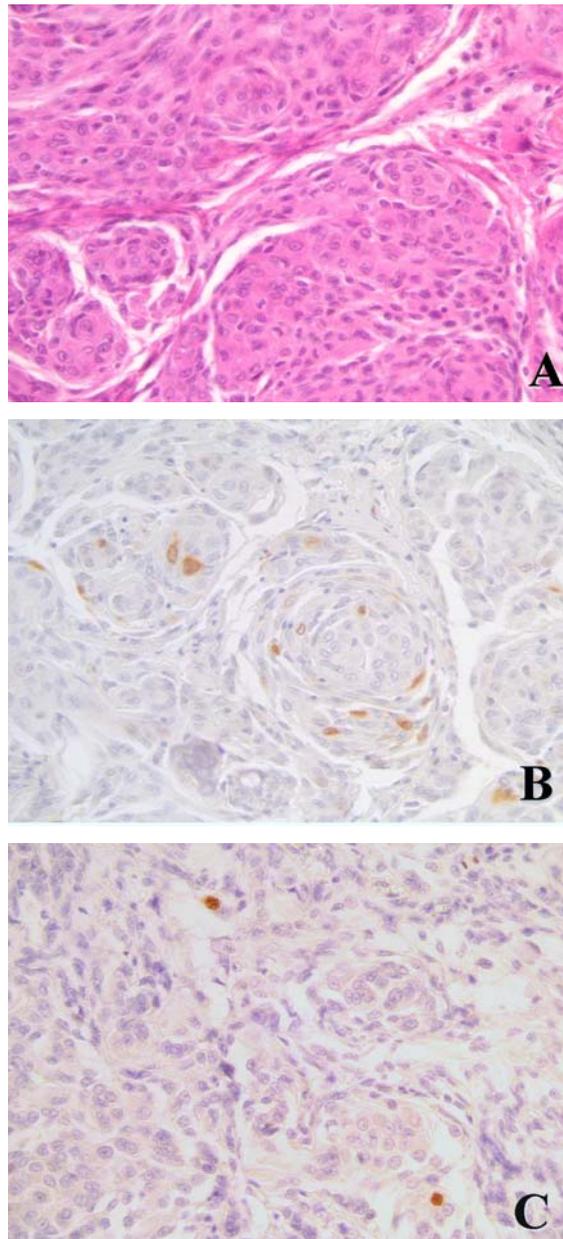


Abb. 12A-C: Schnittpräparat eines meningotheliomatösen Meningeoms (Fall Nr. 348/95) der Gruppe I („klassische Subtypen“); 400fache Vergr.

A) HE-Färbung; Mäßig zeldichter Tumor bestehend aus polygonalen, unscharf begrenzten Zellen, die sich in Läppchen oder Wirbelformationen anordnen. Die Zellkerne sind rund bis oval und enthalten wenig Chromatin. B) Immunhistochemische Darstellung von PCNA als bräunliche Anfärbung des Zellkerns und z.T. auch des Zytoplasmas. PCNA *labeling index* (LI) 5,63.

C) Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67; vereinzelte braungefärbte positive Zellkerne. Ki-67 LI 0,85. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

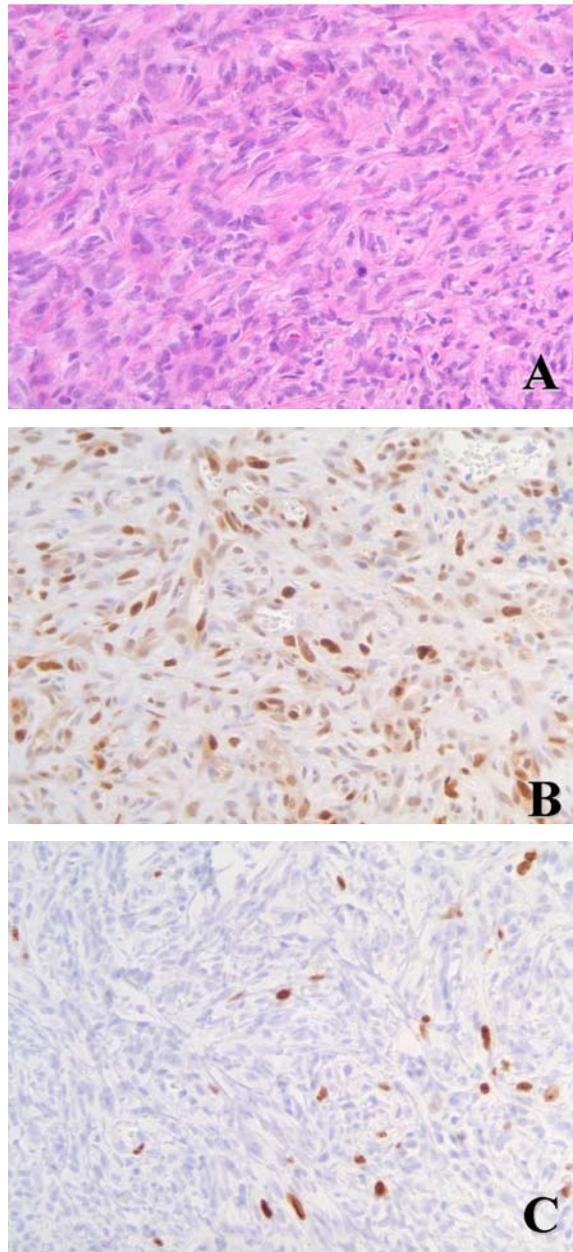


Abb. 13A-C: Präparat eines als atypisches Meningeom klassifizierten Tumors (Fall Nr. 103/04) der Gruppe II; 400fache Vergr.

A) HE-Färbung; weitgehend musterlos wachsendes zelldichtes Proliferat vielgestaltiger, überwiegend kleiner Zellen mit wenig Zytoplasma. Die immunhistochemische Darstellung von PCNA (B) und Ki-67 (C) weist auf eine gesteigerte Proliferationsaktivität hin. PCNA LI 27,92; Ki-67 LI 5,14. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

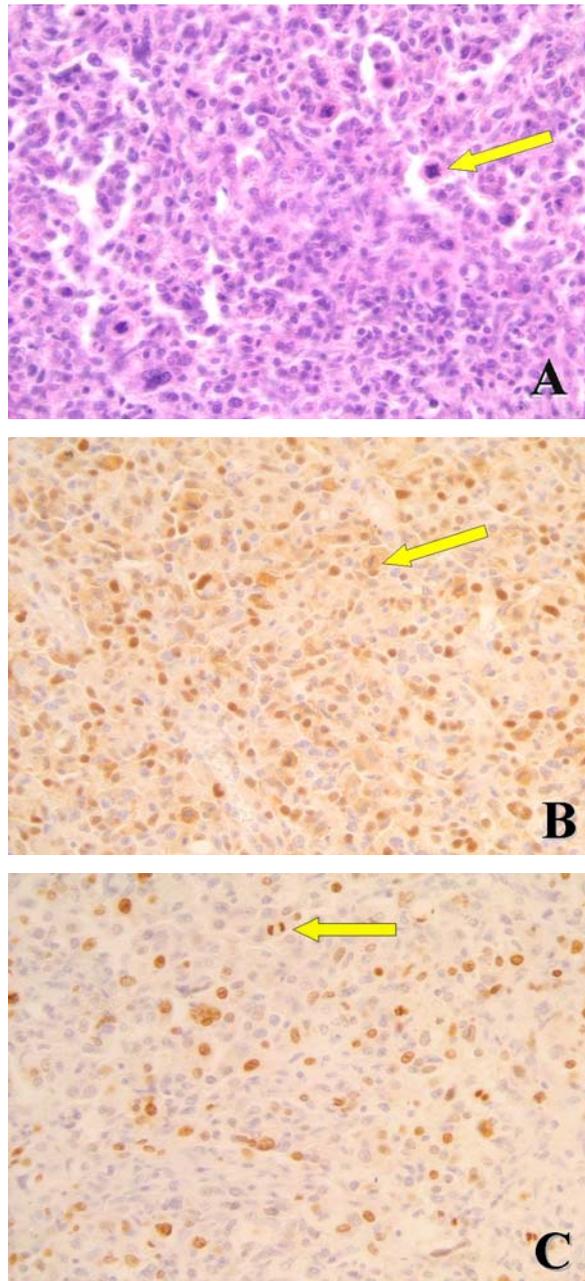


Abb. 14A-C: Präparat des anaplastischen Meningeoms der Gruppe III (Fall Nr. 507/95); 400fache Vergr.
A) HE-Färbung; ungeordnet wachsender Tumor hoher Zellularität mit polymorphen, z.T. mehrkernigen Zellen. Große Anzahl an regulären und irregulären Mitosefiguren (Pfeile). Ausgeprägte Reaktion mit Antikörpern gegen PCNA (B) und Ki-67 (C); PCNA LI 45,52; Ki-67 LI 15,62. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

4.2.2 Erstellung der *labeling indices* (LI) von PCNA und Ki-67

Grundlage der Bestimmung der PCNA, Ki-67 LI ist die Auszählung negativer und positiver Zellkerne unter Anwendung des Computerprogramms *UTHSCSA Image Tool for Windows Version 3.00* (Abb. 15).

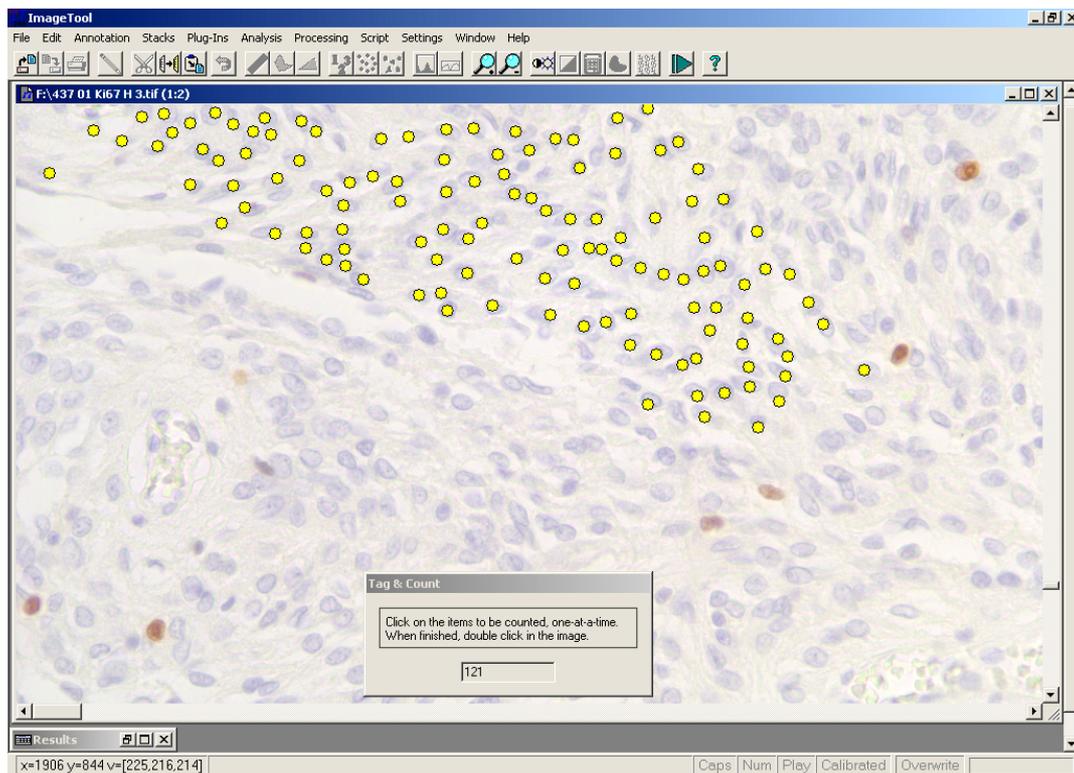


Abb. 15: Bildschirmdarstellung bei der Quantifizierung eines Schnittpräparates. Die bereits gezählten Tumorzellkerne sind durch gelbe Punkte markiert.

Die individuellen Indices eines jeden Tumors mit Diagnose und Gruppenzuordnung sind in Tab. 6 aufgeführt. Es wird deutlich, dass der PCNA LI stets höher ist, als der zugehörige Ki-67 LI. Bei 2 von 18 Tumoren beträgt der Ki-67 LI 0,00, während für PCNA stets positive Werte als LI bestimmt werden konnten.

ERGEBNISSE

Fall Nr.	Diagnose	Gruppe	PCNA	Ki-67	p53	MI
338/96	transitional	I	0,82	0,00	0,00	0
45/99	transitional	I	1,58	0,49	0,81	0
516/00	transitional	I	12,63	3,54	0,14	3
700/02	transitional	I	3,09	0,79	1,63	0
702/02	transitional	I	4,24	0,00	0,00	1
501/03	transitional	I	7,23	1,23	0,61	1
91/95	fibrös	I	3,25	1,82	0,00	1
95/99	fibrös	I	3,24	1,64	0,00	0
392/01	fibrös	I	3,11	2,75	0,00	2
426/97	angiomatös	I	8,84	1,97	2,60	2
209/00	Granularzell	I	42,30	2,35	21,63	0
348/95	meningotheliomatös	I	5,63	0,85	0,00	1
177/95	atypisch	II	3,66	2,18	0,58	3
459/98	atypisch	II	3,29	0,32	0,00	0
182/99	atypisch	II	4,10	0,55	0,00	0
437/01	atypisch	II	5,29	1,01	0,54	4
103/04	atypisch	II	27,92	5,14	8,64	4
507/95	anaplastisch	III	45,52	15,62	16,25	35

Tab. 6: In dieser Studie untersuchte Fälle mit Diagnose, Gruppenzuordnung und individuellem Wert der PCNA, Ki-67, p53 und Mitose-Indices (MI).

Der gemittelte PCNA LI der als atypisch klassifizierte Meningeome der Gruppe II (8,85) liegt zwischen jenem der Gruppe I (8,00) und dem Wert des Tumors in Gruppe III (45,52). In entsprechender Weise ist der Mittelwert der Ki-67 LI der Gruppe II (1,84) zwischen Gruppe I (1,45) und Gruppe III (15,62) positioniert. Innerhalb der Gruppen ist die Spannweite der PCNA LI erheblich größer als bei den korrespondierenden Ki-67 LI (Tab. 7).

Gruppe	Anzahl	MW			SD			R			M		
		PCNA	Ki-67	MI	PCNA	Ki-67	MI	PCNA	Ki-67	MI	PCNA	Ki-67	MI
I	12 (11)	8,00 (4,88)	1,45 (1,37)	0,92 (1,00)	10,82 (3,32)	1,05 (1,06)	0,95 (0,95)	0,82-42,30 (0,82-12,63)	0,00-3,54 (0,00-3,54)	0-3 (0-3)	3,76 (3,25)	1,44 (1,23)	1,00 (1,00)
II	5	8,85	1,84	2,20	9,56	1,77	1,83	3,29-27,92	0,32-5,14	0-4	4,10	1,01	3,00
III	1	45,52	15,62	35									

Tab. 7: Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Spannweite (R) und Median (M) der PCNA, Ki-67 und Mitose (MI) – Indices der Meningeomgruppen I-III und die jeweilige Anzahl an Fällen. In Klammern selbige Parameter bei Ausschluß des Granularzell-Meningeoms (Fall Nr. 209/00). Für Gruppe III ist statt des Mittelwertes der entsprechende Wert angegeben.

Die PCNA bzw. Ki-67 LI der Tumoren in Gruppe I und II sind bezüglich der vorgenommenen Einteilung nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test, $p = 0,574$ bzw. $p = 0,959$, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Da Gruppe III nur ein Element enthält ist eine statistische Prüfung nicht möglich. PCNA LI und Ki-67 LI zeigen eine deutliche positive Korrelation mit Korrelationskoeffizient $r = 0,765$ (Bravais-Pearson). Die Korrelation ist auf dem Niveau von $\alpha = 0,01$ (2-seitig) signifikant.

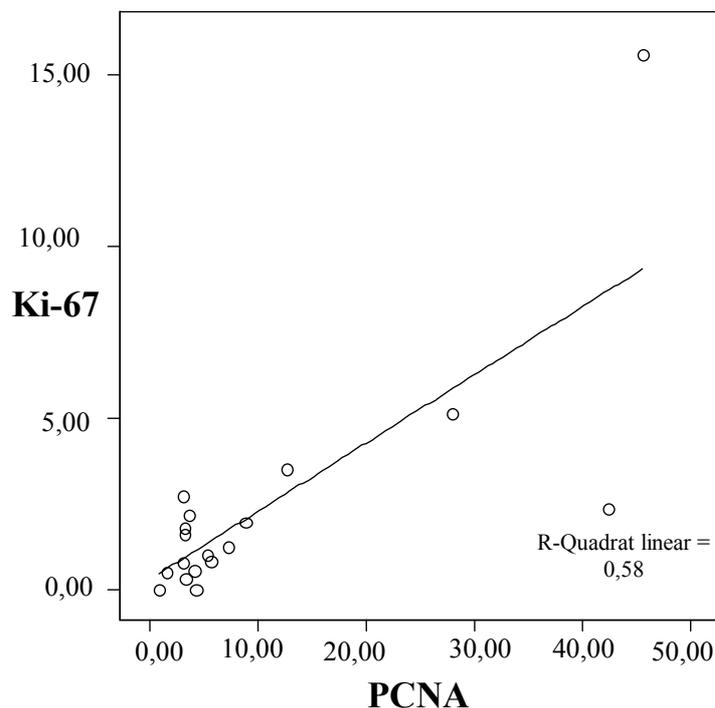


Abb. 16: Regressionsgerade nach der Methode der kleinsten Quadrate angepasst an die Punktwolken von PCNA LI und Ki-67 LI

4.2.3 Mitose-Index

Der Mitose-Index (MI) stellt die Anzahl an Mitosefiguren in 10 Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung dar. Der Mitose-Index der Tumoren von Gruppe I beträgt im Durchschnitt 0,92 mit einer Standardabweichung (SD) von 0,95 und einer Spannweite von 0-4. Die Meningeome der Gruppe II zeigen einen durchschnittlichen Mitose-Index von 2,2 bei einer Standardabweichung von 1,83. Die Spannweite beträgt 0-4. Der Mitose-Index des anaplastischen Meningeoms der Gruppe III ist 35 (Tab. 6 und 7).

Für die Mitose-Indices liegt bezüglich der Zuordnung zu Gruppe I und Gruppe II keine Signifikanz vor (Mann-Whitney-Test, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Mitose-Index und PCNA LI sind mit $r = 0,657$ positiv korreliert. Mitose-Index und Ki-67 LI zeigen mit $r = 0,957$ eine starke positive Korrelation. Beide Korrelationen sind auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.3 Immunhistochemische Detektion der Tumorsuppressoren p53 und PTEN

4.3.1 p53

Die immunhistochemische Darstellung des Tumorsuppressors p53 erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper CM1. Bei 10 von 18 Meningeompräparaten ist eine, i.d.R. auf einige wenige über den Schnitt regellos verteilt liegende Zellen beschränkte, positive Reaktion festzustellen. Diese manifestiert sich als eine nukleäre Braunfärbung (Abb. 17A-C). Zwei der p53-positiven Tumoren zeigen einen deutlich erhöhten Anteil reaktiver Zellen (Fall Nr. 209/00 und 507/95). Die Präparate der übrigen 8 Meningeome lassen keine immunpositiven Tumorzellen erkennen. Angrenzendes Hirngewebe, unalterierte Meningen und Blutgefäße sind negativ für p53. Bei allen 18 Tumorpräparaten ist eine unspezifische Hintergrundreaktion in Form einer homogenen blass-braunen Verfärbung vorhanden.

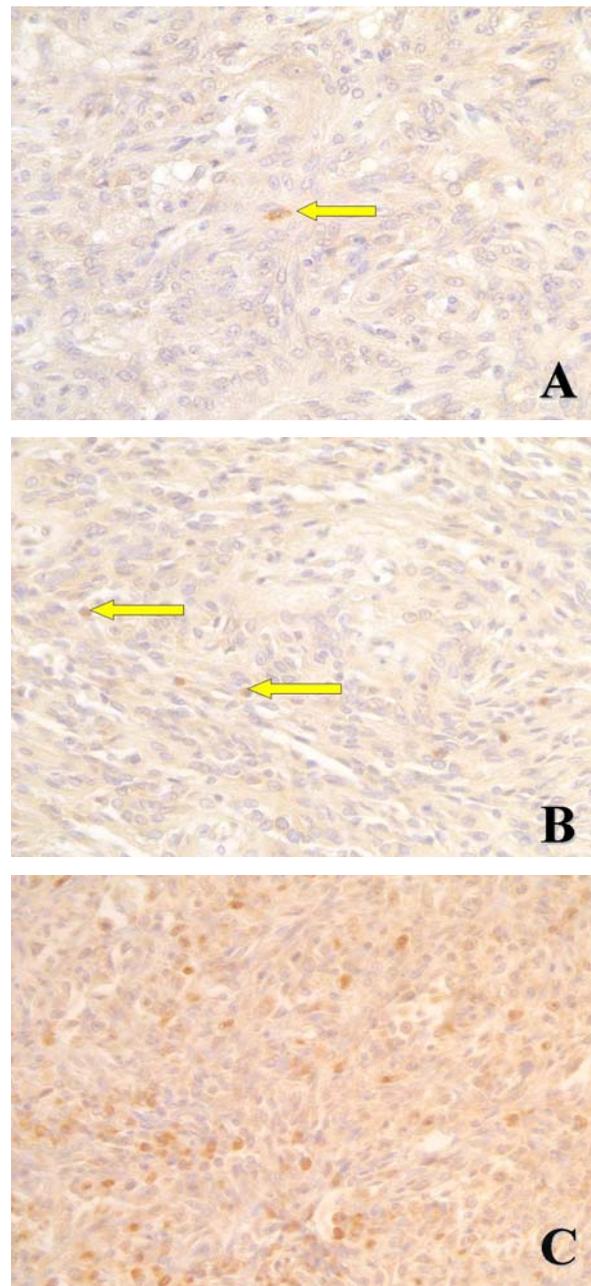


Abb. 17A-C: Immunhistochemische Darstellung von p53 bei verschiedenen Meningeomsubtypen; 400fache Vergr.

A) Transitionales Meningeom der Gruppe I (Fall Nr. 516/00) mit einem p53-positiven Zellkern im Gesichtsfeld (Pfeil), p53 LI 0,14; B) Als atypisch dokumentiertes Meningeom der Gruppe II (Fall Nr. 437/01), p53 LI 0,54; C) anaplastisches Meningeom der Gruppe III (Fall Nr. 507/95), p53 LI 16,25; Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

Positivkontrollen:

Das tumorös umgebaute Milchdrüsengewebe von Mensch und Hund zeigt eine fokale immunhistochemische Reaktion mit dem p53 Antikörper. Positive Zellen zeigen eine homogene, überwiegend zytoplasmatische, seltener auch nukleäre Braunfärbung.

Normales Drüsengewebe, Blutgefäße und Bindegewebe stellen sich p53-negativ dar.

Auswertung:

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen p53-Darstellung erfolgte in gleicher Weise wie bei den Proliferationsmarkern PCNA und Ki-67 mit dem Computerprogramm *Image Tool* (Abb. 15). Die p53 LI der Tumoren im Einzelnen sind in Tab. 6 aufgeführt.

Der gemittelte p53 LI der Tumoren von Gruppe I und Gruppe II beträgt 2,29 und 1,59 mit einer Standardabweichung von 5,89 und 3,35. Für das anaplastische Meningeom der Gruppe III wurde ein p53 LI von 16,25 bestimmt. Ein Vergleich der Ergebnisse ohne Fall Nr. 209/00 der Gruppe I (Granularzell-Meningeom, p53 LI 21,63) zeigt, dass sich die atypischen Meningeome der Gruppe II hinsichtlich Mittelwert (bzw. Wert) der p53 LI zwischen die „klassischen Subtypen“ der Gruppe I und dem anaplastischen Meningeom der Gruppe III eingliedern (Tab. 8).

Gruppe	Anzahl	MW	SD	R	M
I	12 (11)	2,29 (0,53)	5,89 (0,82)	0,00-21,63 (0,00-2,60)	0,07 (0,00)
II	5	1,95	3,35	0,00-8,64	0,54
III	1	16,25			

Tab. 8: Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Spannweite (R) und Median (M) der p53 LI der Meningeomgruppen I-III und die jeweilige Anzahl an Fällen. In Klammern selbige Parameter bei Ausschluß des Granularzell-Meningeoms (Fall Nr. 209/00). Für Gruppe III ist statt des Mittelwertes der entsprechende Wert angegeben.

Eine Zuordnung der Tumoren in Gruppe I und II anhand der p53 LI ist statistisch nicht gesichert (Mann-Whitney-Test, $p = 0,959$, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Der Median des PCNA LI bzw. Ki-67 LI liegt bei p53-positiven Tumoren über dem entsprechenden Wert bei

p53-negativen Tumoren (Abb. 18A-B). Das Ergebnis ist bei $\alpha = 0,05$ nicht signifikant (Mann-Whitney-Test, in beiden Fällen $p = 0,055$).

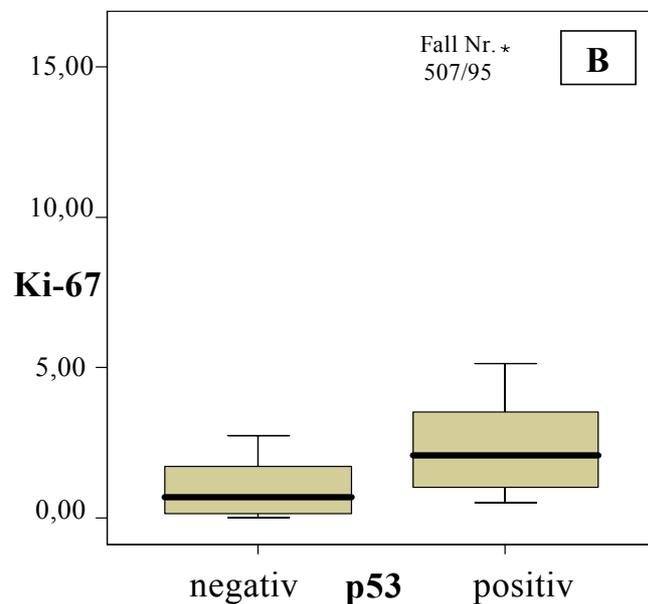
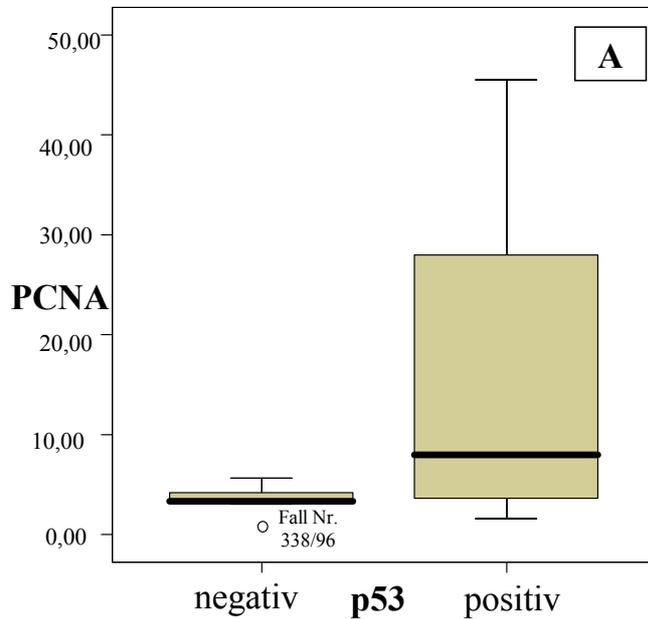


Abb. 18A-B Box-and-Whisker-Plots zur Veranschaulichung der Lage, Streuung und Schiefe der Proliferationsindices ungeachtet der Gruppeneinteilung.

A) PCNA LI bei den p53-negativen und p53-positiven Meningeomen dieser Studie;

B) Ki-67 LI bei den p53-negativen und p53-positiven Meningeomen dieser Studie.

Dargestellt sind der kleinste und niedrigste Wert, erstes und drittes Quartil und der Median.

ERGEBNISSE

Zwischen p53 LI und PCNA LI besteht eine starke positive Korrelation mit $r = 0,957$. p53 LI und Ki-67 LI sind positiv korreliert mit $r = 0,619$. Beide Korrelationen sind auf dem Niveau von $\alpha = 0,01$ (2-seitig) signifikant.

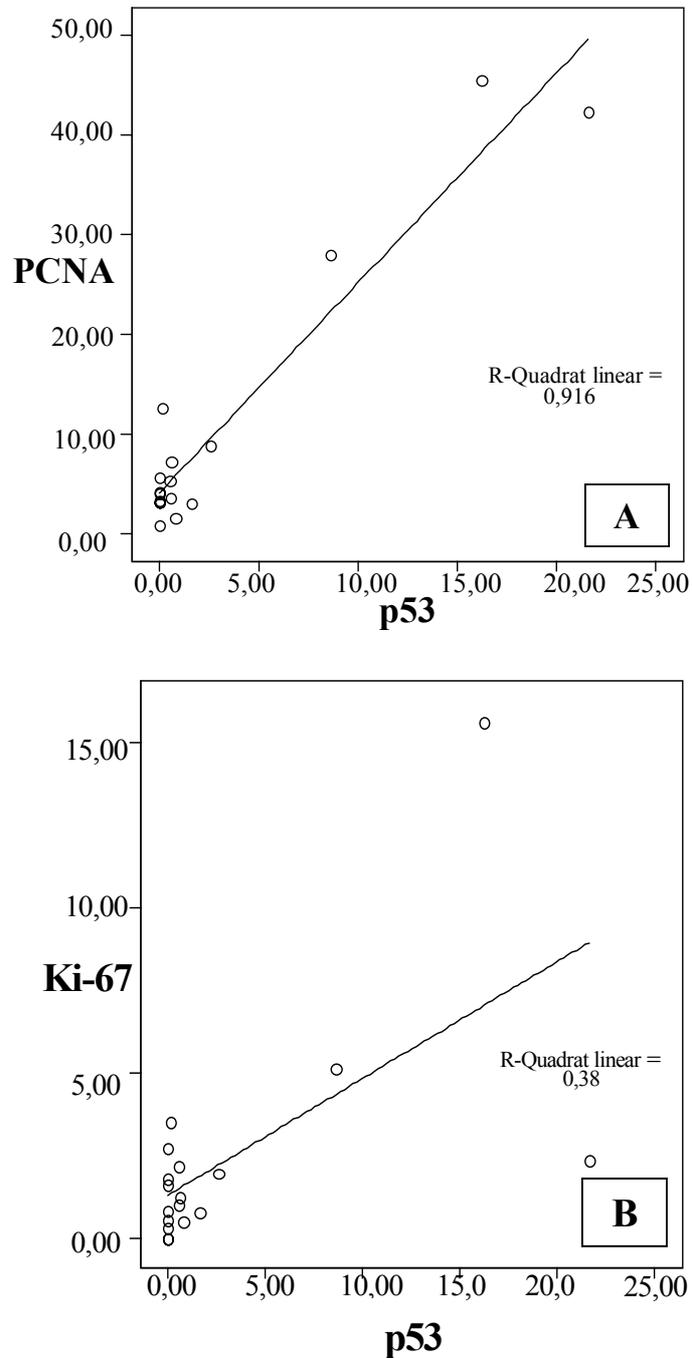


Abb. 19A-B Regressionsgerade nach der Methode der kleinsten Quadrate angepasst and die Punktwolken für die Beziehung zwischen p53 LI und A) PCNA LI, bzw. B) Ki-67 LI

4.3.2 PTEN

Schnittpräparate von 18 caninen Meningeomen wurden mit dem monoklonalen Antikörper 26H9 immunhistochemisch auf die Expression von PTEN untersucht und die Intensität der Färbung semiquantitativ bewertet. Endothelzellen regulärer als auch neovaskulärer Kapillaren zeigen eine konstante, im Vergleich verschiedener Präparate allerdings in einigen Fällen unterschiedlich intensive, immunhistochemische Reaktion, so dass jeder Tumor relativ zu den korrespondierenden Blutgefäßen beurteilt wurde (Tab. 9). Bei unalterierten meningealen Zellen, Neuronen und Gliazellen ist eine mäßige bis intensive nukleäre und/oder zytoplasmatische Expression von PTEN nachzuweisen (Abb. 20).

Fall Nr.	Diagnose	Gruppe	Zellkern	Kernmembran	Zytoplasma	Verteilungsmuster
338/96	transitional	I	+ (selten -)	+	+	homogen
45/99	transitional	I	++	++	+	homogen
516/00	transitional	I	+ (selten -)	+	+	homogen
700/02	transitional	I	+ (selten -)	-	+++	homogen
702/02	transitional	I	+ (selten -)	++	++	homogen
501/03	transitional	I	+ bis ++	+++	teils -/teils +	örtlich heterogen
91/95	fibrös	I	+	+	+	homogen
95/99	fibrös	I	+	++	++	homogen
392/01	fibrös	I	+ (selten -)	+	+	örtlich heterogen
426/97	angiomatös	I	+ (selten -)	+	+ bis ++	homogen
209/00	Granularzell	I	+ bis ++	++	+ bis ++	homogen
348/95	meningotheliomatös	I	+ bis ++	++	++	homogen
177/95	atypisch	II	+ bis ++	+	+ bis ++	homogen
459/98	atypisch	II	++	++	+	homogen
182/99	atypisch	II	+ (selten -)	+	+ bis ++	örtlich heterogen
437/01	atypisch	II	+ (selten -)	++	+ bis ++	homogen
103/04	atypisch	II	++	+	+	örtlich heterogen
507/95	anaplastisch	III	- (selten +)	-	teils -/teils +	heterogen

Tab. 9: In dieser Studie untersuchte Fälle mit Diagnose, Gruppenzuordnung und immunhistochemischer Darstellung der PTEN-Expression in verschiedenen Zellkompartimenten sowie das Verteilungsmuster im Präparat. Blutgefäßendothel diente als interne Positivkontrolle; dessen Färbung wurde eine mittlere Intensität (++) zugeordnet. Eine Intensität die jener des Endothels entspricht wurde als (++) bewertet, eine geringere als (+) und eine höhere als (+++). Eine abwesende immunhistochemische Reaktion wird als (-) dokumentiert.

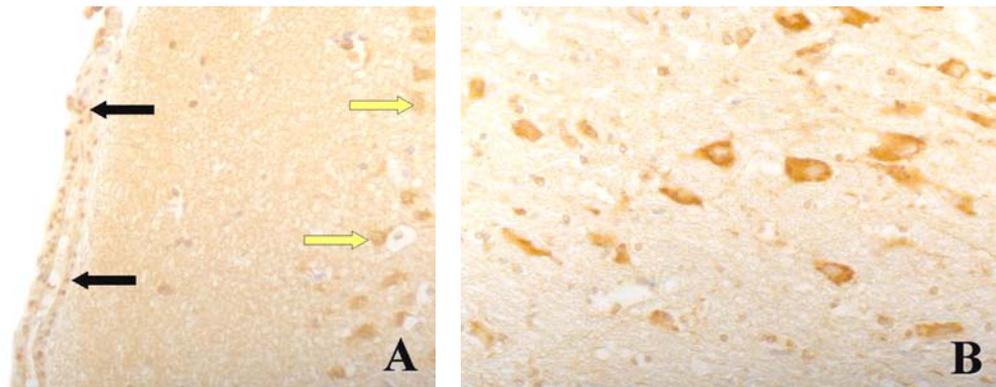


Abb. 20A-B: Präparat der normalen Großhirnrinde eines Hundes. Immunhistochemische Darstellung von PTEN.

A) Positiver Nachweis von PTEN in meningealen Zellen (schwarze Pfeile) und Pyramidenzellen (gelbe Pfeile) als bräunliches Reaktionsprodukt (200fache Vergr.)

B) Ausschnitt aus A) Pyramidenzellen mit deutlicher zytoplasmatischer Immunopositivität (400fache Vergr.) Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

Befunde am Tumor:

Die PTEN-Expression manifestiert sich in 13 von 18 Fällen (72,2 %) als über das gesamte Präparat gleichförmige bräunliche Farbreaktion. Bei 4 von 18 Tumoren (22,2 %) zeigen sich regionale Inhomogenitäten. Ein Meningeom (Fall Nr. 507/95) zeigt einen weitgehenden Ausfall der Reaktion bei irregulärer, „fleckiger“ Anordnung immunopositiver Zellen (Abb. 21A-D).

Bei 17 der 18 Proben (94,4 %) ist eine geringe bis mittlere nukleäre und eine geringe bis intensive zytoplasmatische immunhistochemische Reaktion festzustellen. Aus dieser Gruppe sind bei 8 Tumoren vereinzelte PTEN-negative Zellkerne nachweisbar; ein partieller Ausfall der zytoplasmatischen Reaktion ist bei einem Fall (Nr. 501/03) zu beobachten.

Die Anfärbung des Zytoplasmas ist in 11 von 18 Fällen (61,1 %) intensiver als jene des korrespondierenden Zellkerns; bei 4 Tumoren (22,2 %) überwiegt dagegen die nukleäre Reaktion. Eine gleiche Intensität besteht bei den übrigen 3 Fällen (16,7 %).

Die Membran der Tumorzellkerne ist in 16 von 18 Fällen (88,9 %) leicht bis deutlich betont. Die verbleibenden Fälle (11,1 %) zeigen keine immunhistochemische Reaktion der Kernmembran.

ERGEBNISSE

Ein Meningeom (Fall Nr. 507/95) ist durch einen Ausfall der PTEN-Expression in der deutlichen Mehrheit der Tumorzellkerne und ca. 50 %ige Immunonegativität des Zytoplasmas gekennzeichnet.

Die vorliegenden Ergebnisse der immunhistologischen PTEN-Darstellung gestatten keine signifikante Zuordnung zu Tumorsubtyp und Gruppeneinteilung.

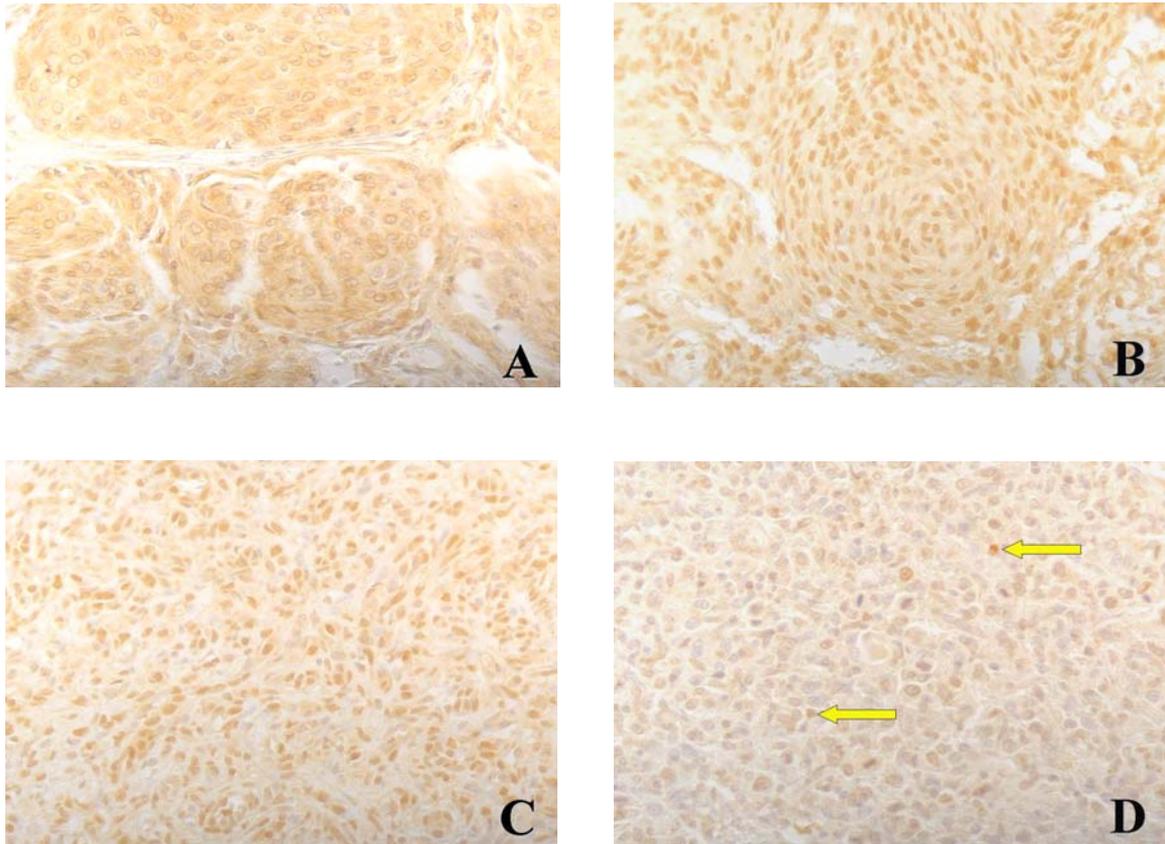


Abb. 21A-D: Immunhistochemische Darstellung von PTEN bei verschiedenen caninen Meningeomen.
400fache Vergr.

A) Meningotheliomatöses Meningeom der Gruppe I (Fall Nr. 348/95) mit homogener zytoplasmatischer und nukleärer PTEN-Expression; B) Transitionales Meningeom der Gruppe I (Fall Nr. 45/99) mit homogener, nukleär betonter Immunopositivität; C) Als atypisch klassifiziertes Meningeom der Gruppe II (Fall Nr. 103/04) mit einem weitgehend mit B) übereinstimmenden immunhistochemischen Befund; D) Anaplastisches Meningeom (Fall Nr. 507/95) mit vereinzelt PTEN-positiven Zellen (Pfeile). Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

Positivkontrollen:

Das unalterierte Milchdrüsenepithel, Myoepithelzellen und vaskuläre Endothelzellen der Mammakarzinom-Präparate von Mensch und Hund zeigen eine positive immunhistochemische Reaktion mit dem PTEN-Antikörper bei Betonung des Zellkerns. Im Kontrast hierzu zeigt sowohl tumorös verändertes Drüsengewebe als auch das interlobuläre Bindegewebe eine variable, schwache bis intensive, örtlich auch negative Anfärbung.

4.4 Molekulargenetische Untersuchungen

Zur Erfassung von Allelverlusten auf Chromosom 5 des Hundes wurden 17 der 18 Meningeome dieser Studie durch PCR-basierte Analyse von 7 Mikrosatelliten-Markern untersucht. Die Auswertung erfolgt durch direkten Vergleich der PCR-Produkte von Tumor-DNA und Wildtyp-DNA auf dem Elektrophoresegel (Abb. 22B-C). Für einen Fall (Nr. 103/04) stand kein Normalgewebe als Quelle unalterierten genetischen Materials zur Verfügung.

ERGEBNISSE

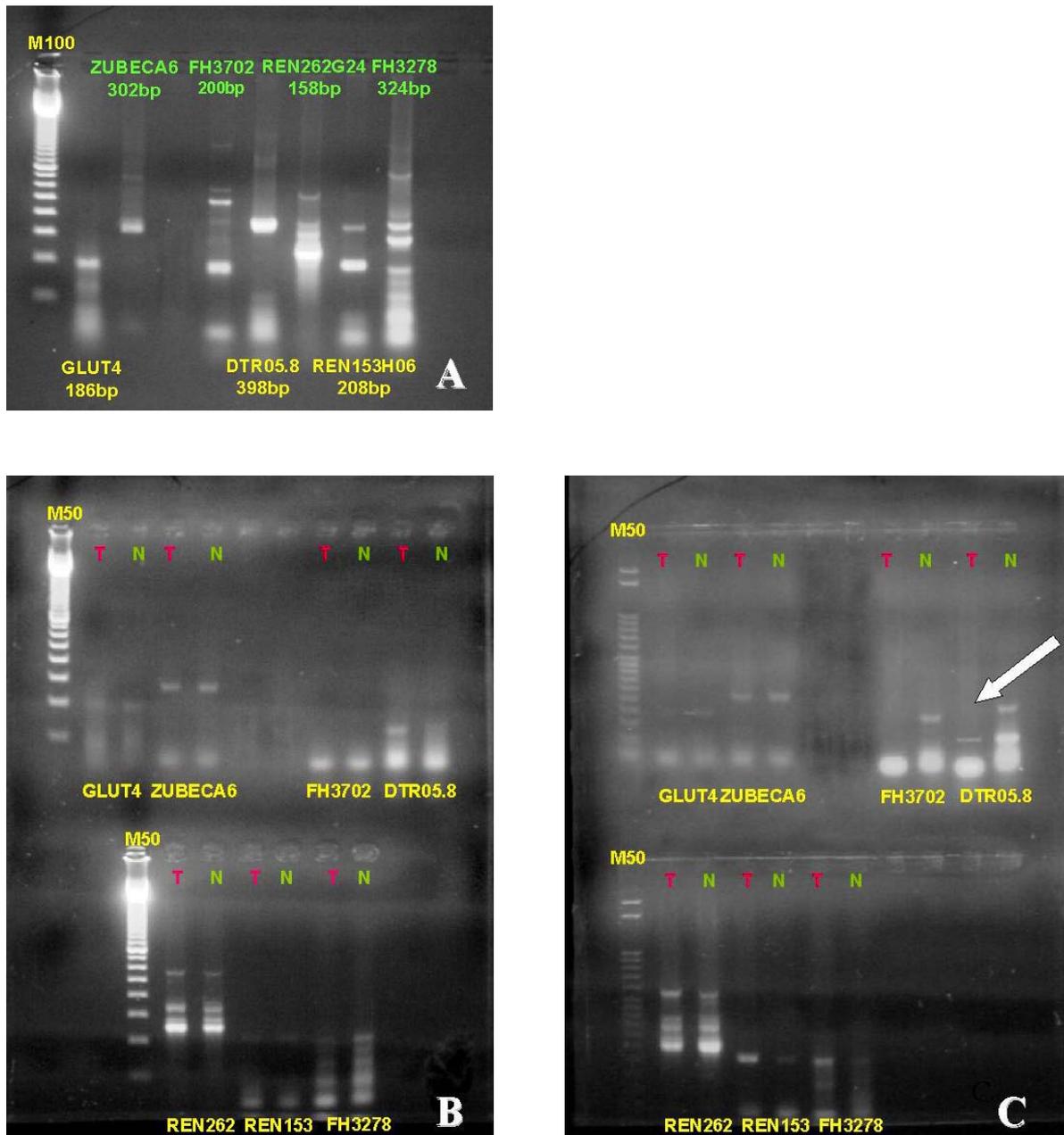


Abb. 22A-C: Auftrennung der Amplifikate auf einem Ethidiumbromid-gefärbten 2,0 % Agarosegel nach 60 min bei 80 V. A) Probe aus tiefgefrorenem EDTA-Blut eines klinisch gesunden Hundes. Angabe der Mikrosatelliten Marker mit zu erwartender Produktlänge in Basenpaaren (bp). Als Größenmarker wurde eine 100 bp-Leiter (M100) aufgetragen. B) Fall Nr. 209/00, Probe aus Tumorgewebe (T) und normalem Gewebe (N) jeweils für jeden Marker parallel aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine 50 bp-Leiter (M50) eingesetzt. C) Fall Nr. 507/95, LOH bei Marker DTR05.8 (Pfeil)

ERGEBNISSE

Fall Nr.	ZUBECA6	FH3702	DTR05.8	REN262G24	REN153H06	FH3278	GLUT4
338/96	ni	-	ni	ROH	-	-	-
45/99	LOH	ni	LOH	LOH	ni	-	ni
516/00	ni	ni	ni	ROH	ni	ni	ni
700/02	-	-	ni	ROH	-	-	-
702/02	ni	-	-	ROH	-	ROH	-
501/03	ni	-	-	-	ni	-	-
91/95	ni	-	-	-	ni	-	ni
95/99	ni	-	ni	ROH	ni	-	-
392/01	-	-	ROH	ROH	ni	-	-
426/97	ni	-	-	LOH	ni	-	-
209/00	ni	-	-	ROH	ni	ROH	-
348/95	-	-	LOH	ROH	-	-	-
177/95	ni	-	LOH	ROH	ni	-	-
459/98	ni	-	-	ROH	ni	-	ni
182/99	-	-	ROH	ROH	ni	-	-
437/01	ni	ni	ni	ROH	ni	-	ni
507/95	ni	ni	LOH	ROH	ni	ni	-

Tab. 10: Ergebnisse der Analyse von 7 Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 5 des Hundes bei 17 Meningeomen.

LOH: Heterozygotieverlust (*loss of heterozygosity*)

ROH: Erhalt der Heterozygotie (*retention of heterozygosity*.)

ni: nicht informativ

-: kein Amplifikat

Bei 5 von 17 Meningeomen (29,5 %) besteht ein LOH mindestens eines Mikrosatelliten-Markers. Es handelt sich dabei um Tumoren aus allen 3 Gruppen; dabei zeigt ein transitionales Meningeom (Fall Nr. 45/99, Gruppe I) mit drei betroffenen Markern den ausgedehntesten Verlust (Tab.10).

Eine kleinste gemeinsame deletierte Region (*smallest region of overlapping deletion*, SRO) kann nicht stichhaltig angegeben werden, da zumindest zu einer Seite eines LOH eine nicht aussagekräftige Situation vorliegt – entweder in Form eines nicht informativen oder eines fehlenden Produktes. Darüber hinaus ist die Abfolge der Marker auf dem Chromosom nicht allgemein definiert.

Eine Mikrosatelliten-Instabilität kann nicht festgestellt werden. Additional Banden mit Abweichung von der erwarteten Länge und „leiterartiger“ Anordnung sind bei der Auftrennung der Produkte sowohl aus Tumor-DNA als auch aus der zugehörigen konstitutionellen DNA erkennbar. Es ist zu folgern, dass es sich bei diesen Banden um PCR-Artefakte, sog. „Schattenbanden“ handelt.

ERGEBNISSE

Die Mikrosatelliten-Marker lieferten für das in dieser Studie eingesetzte Probenmaterial hinsichtlich Amplifizierbarkeit und Aussagekraft heterogene Ergebnisse. In 23,5 % bis 88,2 % wurde ein spezifisches PCR-Produkt durch Gelelektrophorese nachgewiesen. Bei 3 von 7 Markern (42,9 %) konnte jedoch aus den Amplifikaten keine Erkenntnisse hinsichtlich Verlust oder Erhalt der normalen Allelsituation gewonnen werden. Ein Marker (REN262G24) erwies sich für alle Amplifikate als informativ (Tab. 11).

Marker	Amplifikat [%]	informativ [%]	LOH
ZUBECA6	76,47	7,69	1
FH3702	82,45	0,00	0
DTR05.8	64,71	54,55	4
REN262G24	88,24	100,00	2
REN153H06	76,47	0,00	0
FH3278	23,53	50,00	0
GLUT4	29,41	0,00	0

Tab. 11: Übersicht über die Auswertbarkeit der eingesetzten Mikrosatelliten-Marker am formalinfixierten, paraffineingebetteten Meningeomgewebe. Angegeben ist der Anteil an nachweisbaren Amplifikaten und deren Prozentsatz informativer Verhältnisse. LOH bezeichnet die Anzahl der festgestellten Heterozygotieverluste.

5 DISKUSSION

Zu einer der grundlegenden Eigenschaften eines Tumors zählt die dysregulierte Zellproliferation. Ein Ziel dieser Arbeit ist damit die Erfassung quantifizierbarer Parameter hinsichtlich des proliferativen Potentials einer Neoplasie, welche die histopathologische Diagnostik ergänzen und die Beurteilung eines gesteigerten Malignitätspotentials und damit des biologischen Verhaltens objektivieren sollen.

Die Untersuchung der Zellproliferation in der vorliegenden Arbeit basiert zum einen auf der Auszählung von Mitosefiguren im HE-gefärbten Schnittpräparat, zum anderen auf der Darstellung der Zellzyklus-assoziierten Antigene PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und Ki-67. Während die klassische Methode des Zählens von Mitosefiguren sich auf rein morphologische Merkmale einer sich im Teilungsprozess befindlichen Zelle stützt, handelt es sich bei den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Proliferationsmarkern um nukleäre Proteine, die mit Zellproliferation und DNA-Synthese korrelieren und mit entsprechenden Antikörpern immunhistochemisch detektiert werden können (57, 77, 108).

Dem Nachweis dieser Indikatoren für Zellteilung wird prognostische Relevanz beigemessen. So konnte in verschiedenen humanmedizinischen Studien an dieser Tumorentität gezeigt werden, dass PCNA bzw. Ki-67 –Expression mit dem proliferativen Potential und dem Grad an Malignität (224, 225) oder mit postoperativer Rezidivierung (226) assoziiert sind. Für canine Meningeome, die postoperativ bestrahlt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass Lokalrezidive deutlich häufiger in Meningeomen mit hohem PCNA Index auftreten als in Tumoren mit niedrigem Index (8).

Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorpräparate:

Hinsichtlich des intratumoralen Verteilungsmusters PCNA und Ki-67-positiv markierter Zellen ließ sich bei einigen Tumoren eine beträchtliche Heterogenität erkennen. Um ein möglichst repräsentatives Bild der Proliferationsaktivität zu erhalten und wenig subjektive Faktoren in die Auswertung zu implementieren, wurden Bereiche mit maximaler und minimaler Dichte an positiven Zellen ausgewählt und als Ergänzung weitere zufällig bestimmte Ausschnitte hinzugezogen. In verschiedenen Studien wird ebenfalls über eine unregelmäßige Verteilung markierter Zellen berichtet. Um dieser Tatsache gerecht zu werden

werten ROGGENDORF et al. (224) „repräsentative“ Gebiete der Proben aus - ohne jedoch deren Auswahl zu erläutern; MOLLER et al. (227) untersuchen ausschließlich zufällig bestimmte Areale, während wiederum andere Untersucher Felder mit hoher (8, 228, 229) bzw. höchster (225) Aktivität heranziehen oder über die Auswahl der Felder keine Angabe machen (26).

Darüber hinaus erwies sich in der eigenen Auswertung die PCNA-Darstellung als nicht immer eindeutig, da in einigen Proben blass bis intensiv braune immunhistochemische Reaktionen nebeneinander vorkamen. Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten war es insbesondere für die Bestimmung des PCNA LI notwendig, eine positive immunhistochemische Reaktion als eine deutliche mittel- bis dunkelbraune Anfärbung des Zellkerns zu definieren und schwächere Reaktionen auszuschließen. Dagegen stellte sich die Evaluierung von Ki-67 mit dem Antikörper MIB-1 als unproblematisch dar; positive Zellkerne zeigten eine deutliche Farbreaktion ähnlicher Intensität, die sich gut von negativen Zellen und dem neutralen Hintergrund differenzieren ließ. In Übereinstimmung mit TAKEUCHI et al. (230) erweist sich unter diesem Gesichtspunkt die immunhistochemische Detektion von Ki-67 im Vergleich zu PCNA als die praktikablere Methode.

PCNA LI:

In der bisher einzigen Untersuchung von PCNA beim caninen Meningeom erfassen THEON et al. (8) die sog. PF_{PCNA} (*proliferative fraction*) an 20 „klassischen“ Meningeomen verschiedener Subtypen (9 meningotheliomatöse, 5 psammomatöse, 3 angiomatöse, 3 fibröse Fälle). Für die immunhistochemische Detektion wird ein nicht näher benannter monoklonaler Antikörper eingesetzt. Die Auswertung erfolgt durch Auszählung in Gebieten mit hoher Dichte an positiven Zellen. PF_{PCNA} stellt den Mittelwert der LI von 5 untersuchten Präparaten desselben Tumors mit jeweils 5 ausgewerteten Gesichtsfeldern dar. Auf diese Weise werden insgesamt mindestens 5000 Zellen gesichtet (228). Der in der vorliegenden Arbeit angegebene PCNA LI und die PF_{PCNA} stellen das prozentuale Verhältnis immunopositiver Zellen zur Anzahl der untersuchten Zellen dar. Somit besteht trotz methodischer Variationen eine gewisse Vergleichbarkeit. Der von THEON et al. (8) angegebene Median der PF_{PCNA} (24 %) liegt deutlich über dem Median des PCNA LI der Gruppe I (3,76 %) der eigenen Untersuchungen und die Spannweite der eigenen Ergebnisse (0,82-42,30 %) ist größer als in

der zitierten Studie (10-42 %). Neben der gezielten Auswahl von Regionen mit hoher Dichte kann für die im Mittel höheren Werte der zitierten Studie die Tatsache mitverantwortlich sein, dass es sich bei allen Fällen um Operationsresektate handelt. Das eigene Untersuchungsgut besteht mehrheitlich aus Autopsiematerial, das naturgemäß Degradationsprozessen ausgesetzt ist. Darüber hinaus können unterschiedliche Antikörper und abweichende Fixationsbedingungen für inkonsistente Ergebnisse verantwortlich sein (78). PF_{PCNA} erwies sich als signifikanter Prognosefaktor bezüglich der zweijährigen progressionsfreien Überlebenszeit für Hunde mit unvollständig resezierten Meningeomen, die postoperativ strahlentherapeutisch behandelt wurden. Es ergeben sich Hinweise darauf, dass ein höherer PF_{PCNA} mit einem schlechteren Ansprechen auf Strahlentherapie assoziiert ist: Da PCNA insbesondere in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird - während der die Zelle die größte Strahlenresistenz besitzt - kann sich ein Tumor der eine ausgeprägte immunhistochemische PCNA-Darstellung zeigt, als weniger strahlensensibel erweisen (8). Da es sich in der Studie nur um „klassische“ Subtypen handelt, kann die Frage nach einer Assoziation von PCNA mit atypischer und anaplastischer Morphologie für das canine Meningeom nicht diskutiert werden. Im Untersuchungsgut konnten die Autoren keine Korrelation von PF_{PCNA} und Subtyp feststellen, so wie es sich auch in der eigenen Studie innerhalb von Gruppe I verhält.

Ki-67 LI:

MANDARA et al. (26) untersuchen das Proliferationspotential von 7 „klassischen“ (3 angiomatöse, 2 fibröse, 2 transitionale Tumoren) und 2 anaplastischen Meningeomen des Hundes mittels Ki-67 Immunhistochemie. Zur Detektion von Ki-67 wird der gleiche Antikörper-Klon (MIB-1) wie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die Auswertungsmethode unterscheidet sich allerdings grundlegend von der eigenen. Die Autoren setzen ein digitales Bildanalyzesystem ein, welches das Verhältnis der Ki-67-positiven Fläche zur Gesamtfläche des untersuchten Feldes erfasst; damit ist eine direkte Vergleichbarkeit mit den eigenen, auf Auszählung positiver und negativer Zellkerne beruhenden, Ergebnissen nicht gegeben. Übereinstimmend kann jedoch ein höherer Mittelwert (bzw. Wert in der eigenen Arbeit) des Ki-67 Index bei malignen Meningeomen im Vergleich zum gemittelten Ki-67 Index der „klassischen“ Subtypen festgestellt werden.

Korrelation von PCNA und Ki-67 LI zur Gruppeneinteilung:

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten caninen Meningeome war bezüglich der vorgenommenen Gruppeneinteilung weder für PCNA LI noch für Ki-67 LI eine statistische Signifikanz nachweisbar. Eine Differenzierung in „klassische“, atypische und anaplastische Meningeome kann somit auf der Basis der in dieser Arbeit eingesetzten Proliferationsmarker allein nicht erfolgen. Allerdings nehmen die gemittelten PCNA LI und Ki-67 LI der als atypisch diagnostizierten Meningeome im Vergleich zu den übrigen Subtypen eine intermediäre Position ein.

Im Gegensatz dazu gelang in einer humanmedizinischen Untersuchung von 10 benignen (WHO-Grad I) und 4 malignen Meningeomen (Grad III) der Nachweis einer signifikanten Korrelation des Tumors-Grades mit dem Ki-67 LI bzw. PCNA LI (229). Die eingesetzten Antikörper-Klone entsprachen jenen der vorliegenden Arbeit. MOLLER et al. (227) konnten bei atypischen und malignen humanen Meningeomen einen signifikant höheren PCNA LI (Mann-Whitney-Test) als bei benignen Tumoren feststellen; für Ki-67 ergab derselbe Untersuchungsansatz kein statistisch signifikantes Ergebnis. In ähnlicher Weise zeigten HSU et al. (225) signifikante Differenzen bezüglich der drei Tumor-Grade für den PCNA LI, NAGASHIMA et al. (144) wiesen dies für den gemittelten Ki-67 Index (Antikörper MIB-1) nach. Weitere immunhistochemische Untersuchungen an humanen Meningeomen demonstrierten eine starke Korrelation zwischen MIB-1 LI und dem Tumor-Grad; dabei eignete sich der MIB-1 LI als ergänzender Parameter für die Zuordnung von Tumoren mit grenzwertigen Atypie-Zeichen (231-233).

Korrelation von PCNA LI und Ki-67 LI:

Im Rahmen der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte für die Indices von PCNA und Ki-67 eine deutliche positive Korrelation gezeigt werden. Zu entsprechenden Ergebnissen führen die Studien von TAKEUCHI et al. (230) und MOLLER et al. (227) an humanen Meningeomen. In einer weiteren humanmedizinischen Untersuchung (unter Einsatz von zur eigenen Arbeit identischen Antikörper-Klonen) wurde dagegen keine signifikante Korrelation zwischen PCNA und Ki-67 –Expression festgestellt (226).

MI:

Die eigenen Untersuchungen der Mitose-Indices ergaben bezüglich der Zuordnung zu Gruppe I und Gruppe II kein signifikantes Ergebnis. Die Methode der Auszählung von Mitosefiguren erfasst in der Regel die kürzeste Phase des Zellzyklus (41); wobei allerdings in einigen Fällen, insbesondere bei Tumoren mit Aneuploidie, die Zeitdauer der M-Phase variieren kann (53). Zudem können in Abhängigkeit von postmortalen Einflüssen auf das Tumorgewebe Mitosen im histologischen Bild uneindeutig sein und sich nicht oder nur unsicher identifizieren lassen. Es sei in diesem Zusammenhang auch darauf hingewiesen, dass Mitoseprozesse in inadäquat fixierten Gewebe weiterlaufen und abgeschlossen werden können, was eine beträchtliche Unterbewertung der mitotischen Aktivität nach sich ziehen kann (60). Somit stellt sich der Mitose-Index als alleinige Größe als unzureichend dar, um die Gruppenzuordnung zu stützen. Er erweist sich jedoch, eingebettet in ein System zusätzlicher morphologischer Kriterien (humanmedizinischen Klassifikation), als geeignet, „klassische“, atypische und anaplastische Meningeome des Hundes zu differenzieren. HSU et al. (225) konnten bei einer Untersuchung von 63 Meningeomen (26 benigne, 24 atypische, 13 maligne Tumoren) signifikante Differenzen der Mitose-Indices bezüglich der drei Tumor-Grade feststellen. Angesichts dieser Faktoren und anhand des bei den Meningeomen dieser Studie allgemein niedrigen Proliferationsniveaus stellt der Einsatz ergänzender Nachweismethoden in Form einer immunhistochemischen Darstellung proliferierender Zellen mittels Ki-67 und PCNA eine sinnvolle methodische Ergänzung dar.

Korrelation von MI und Indices der Proliferationsmarker:

Die Auswertung der caninen Meningeome dieser Studie weist eine sehr starke positive Korrelation von Mitose-Index und Ki-67 LI ($r = 0,957$) nach. Mitose-Index und PCNA LI sind mit $r = 0,657$ etwas schwächer korreliert. Beide Korrelationen sind statistisch signifikant. HSU et al. (225) konnten ebenfalls eine enge Korrelation zwischen PCNA und Mitose – Indices feststellen und bewerten daher PCNA als eine nützliche methodische Ergänzung zur Erfassung des Proliferationspotentials von Meningeomen.

Anwendbarkeit der immunhistochemischen Proliferationsmarker in der neuroonkologischen Diagnostik:

Die PCNA LI ergeben zwischen den Gruppen häufige Überschneidungen und zeigen eine im Vergleich zu den Ki-67 LI erhebliche größere Streuung. Verschiedene humanmedizinische Studien berichten ebenfalls über eine größere Variation der PCNA LI im Vergleich zu Ki-67 LI. Diese Variation wird als eine erhebliche Einschränkung der Anwendbarkeit von PCNA eingestuft (227) bzw. Ki-67 als der spezifischere Marker der Zellproliferation bewertet (229).

In der eigenen Untersuchung waren die Ki-67 LI individueller Tumoren stets kleiner als die zugehörigen PCNA LI; diese Beobachtung bestätigt sich für fast alle Werte der humanmedizinischen Studie von TAKEUCHI et al. (230). Die Auswertung der Meningeome in der Studie von KAYASELCUK et al. (229) zeigt im Vergleich zum mittleren PCNA LI einen kleineren mittleren Ki-67 LI. Die Autoren führen dies auf die längere Halbwertszeit von PCNA zurück, was auch die Markierung ruhender Zellen bedingen kann: PCNA kann über die Phasen der maximalen Expression (G_1 und S) hinaus noch 24 bis 48 h nachdem die Zelle aufgehört hat sich zu teilen detektiert werden (77). Die eigene Studie unter Verwendung entsprechender Antikörper zeigt dieselbe Konstellation der mittleren PCNA und Ki-67 LI.

Sowohl PCNA als auch Ki-67 sind für die immunhistochemische Erfassung des Proliferationszustandes von caninen Meningeomen unter Einsatz der beschriebenen Antikörper und Quantifizierungsmethode als geeignet zu betrachten; wobei sich Ki-67 aufgrund des engeren Zusammenhanges mit erkennbaren Kernteilungsprozessen als das zuverlässigere Zellzyklus-assoziierte Antigen darstellt. NIEDERMAYER et al. (234) halten gerade bei Meningeomen mit ihrer relativ geringen Proliferationsaktivität zum Zwecke des Grading die Bestimmung des Ki-67 Index für verlässlicher als das Abzählen von Kernteilungsfiguren, betonen aber, dass der Ki-67 Index allein zum Grading dieser Tumoren nicht ausschlaggebend sein kann. In Anbetracht der methodisch bedingten Variationen in verschiedenen immunhistochemischen Proliferationsstudien ist es bislang nicht möglich, einen definitiven Schwellenwert für die Erfassung von Meningeomen mit gesteigerter Rezidivwahrscheinlichkeit im allgemeinen und für das atypische Meningeom im speziellen

anzugeben. Ein MIB-1 LI von 5-10 % gilt als Hinweis auf eine erhöhte Rezidivgefahr; bei atypischen Meningeomen wird „oftmals ein mäßig hoher MIB-1 LI festgestellt“ (11).

Zusätzlich zu der Rolle bei Zellproliferationsprozessen sind für PCNA mittlerweile eine Vielzahl von Funktionen wie z.B. eine Beteiligung bei der DNA-Reparatur (69, 74) bekannt. Da in vielen Tumoren auch Reparaturprozesse ablaufen, muss PCNA heute differenzierter betrachtet werden als ein Indikator, dessen Spektrum über den reinen Nachweis von Zellproliferation in Neoplasien hinaus geht (53, 226).

In diesem Zusammenhang dürfte auch das immunhistochemische Färbeverhalten des Granularzell-Meningeoms dieser Studie (Fall Nr. 209/00) zu sehen sein. Der genannte Tumor zeigt den zweithöchsten PCNA LI (42,30) aller untersuchten Fälle. Aus dem relativ niedrigen Ki-67 LI (2,35) und der Abwesenheit von Mitosefiguren lässt sich ableiten, dass die PCNA-Expression in diesem Tumor keine tatsächlich gesteigerte Proliferationsaktivität reflektiert. Aus verschiedenen Darstellungen geht hervor, dass ZNS-Tumoren des Hundes mit Granularzell-Morphologie wenig teilungsaktiv sind. HIGGINS et al. (235) beschreiben zwei Fälle caniner Granularzell-Tumoren des ZNS mit Einbeziehung der Hirnhäute. Mitosefiguren waren in beiden Fällen selten erkennbar und die immunhistochemische Untersuchung der Zellproliferation mit dem Antikörper MIB-1 ergab einen Index von ca. 2 %. Ein caniner Granularzell-Tumor im Bereich der Sella turcica mit Beteiligung der Hypophyse zeigte keine Mitosefiguren bei einheitlicher typischer Morphologie (236).

Die in der aktuellen Fassung der humanmedizinischen Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (11) genannten Kriterien für das atypische Meningeom erwiesen sich als gut anwendbar und zutreffend (237) für jene Fälle der vorliegenden Studie, die anhand des veterinärmedizinischen Systems (12) nicht widerspruchlos einzuordnen waren. Die Subtypen der übrigen Meningeome ließen sich dagegen in guter Übereinstimmung mit der tiermedizinischen Klassifikation bestimmen.

Um den klinischen Wert der in dieser Arbeit vorgenommenen, an das humanmedizinische Grading angelehnten, Gruppenzuordnung zu erfassen, ist es erforderlich, die individuelle

Diagnose mit Parametern wie Vollständigkeit der Resektion, Rezidivierung, Überleben, Ansprechen auf Strahlen- und/oder Chemotherapie etc. zu korrelieren.

p53:

Der Tumorsuppressor p53 vermittelt als Reaktion auf verschiedene Formen von zellulärem Stress, wie z.B. DNA-Schädigung und dysregulierte Wachstumssignale, über komplexe Signalwege einen Arrest des Zellzyklus oder Apoptose. So wird als Antwort auf eine DNA-Schädigung p53 aktiviert, welches dann die Transkription von $p21^{CIP}$ initiiert. Das Protein $p21^{CIP}$ bindet an verschiedene Cyclin/CDK-Komplexe und blockiert über die Inaktivierung der Kinase-Aktivität die Zellzyklus-Progression. $p21^{CIP}$ bindet darüber hinaus an PCNA, und es wird als erwiesen angesehen, dass $p21^{CIP}$ -PCNA-Komplexierung die Funktion von PCNA als Prozessivitätsfaktor für DNA-Polymerasen im Rahmen der Replikation blockiert, nicht jedoch dessen Rolle bei der DNA-Reparatur (93, 97). Alterationen von p53 sind assoziiert mit Entstehung und Progression eines breiten Spektrums humaner (49, 97) und caniner (3) Tumoren. Die Ursachen einer funktionellen Inaktivierung von p53 können sowohl auf der Ebene des Genoms (Missense- und Nonsense-Mutationen, Deletionen, Allelverluste) als auch auf Proteinebene (Interaktion mit verschiedenen viralen und zellulären Proteinen, Ausschluss aus dem Zellkern) liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 18 canine Meningeome verschiedener histologischer Subtypen immunhistochemisch mit dem polyklonalen Antikörper CM1 auf die Darstellbarkeit von p53 Protein hin untersucht. Das Verhältnis p53-positiver Tumorzellen zur Gesamtzahl der ausgewerteten Tumorzellen wurde als sog. *labeling index* (LI) quantifiziert und dem Tumorsubtyp und der Proliferationsaktivität gegenübergestellt. Ziel der Untersuchung ist die Gewinnung erster Erkenntnisse über eine mögliche Beteiligung von p53 am caninen Meningeom. Darüber hinaus soll die Eignung der immunhistochemischen Darstellung für die Abgrenzung potentieller Meningeom-Grade im Sinne der humanmedizinischen Klassifikation beurteilt werden.

Als das grundlegende Prinzip der immunhistochemischen Darstellung von p53 wird angenommen, dass sich durch eine mutationsbedingte Konformationsänderung die Halbwertszeit des Proteins verlängert und infolgedessen eine detektierbare Menge im

Zellkern akkumuliert (152). Allerdings ist es möglich, dass eine Komplexbildung von Wildtyp p53 mit verschiedenen viralen oder zellulären Proteinen ebenfalls die Ansammlung einer immunhistochemisch nachweisbaren Menge im Zellkern verursacht (144). Es ist festzuhalten, dass die immunhistochemische Darstellung von p53 Protein keinen definitiven Beweis für das Vorliegen einer *p53*-Mutation und/oder einer funktionellen Inaktivierung darstellt, sondern auch Ausdruck einer gesteigerten Expression infolge einer DNA-Schädigung sein kann (144, 155). Zu den zellulären Proteinen, die an p53 binden und dessen Wachstumskontrollfunktion außer Kraft setzen gehört MDM2. Darüber hinaus ist MDM2 an der Markierung von p53 mit Ubiquitin beteiligt. Amplifikationen des entsprechenden Gens lassen sich in ca. einem Drittel verschiedener Knochen- und Weichteilsarkome des Menschen nachweisen (49, 151). p53 Immunoreaktivität in Abwesenheit von Mutationen kann auf eine Stabilisierung und Inaktivierung von Wildtyp p53 durch Interaktion mit dem Protein MDM2 hinweisen (238). Amplifikationen des *MDM2* Gens beim Meningeom sind bislang allerdings nicht dokumentiert.

Da sowohl immunhistochemische als auch molekulargenetische Untersuchungen von p53 beim Meningeom des Hundes fehlen, orientiert sich die Bewertung der Ergebnisse an der humanmedizinischen Literatur.

Bei den caninen Meningeomen dieser Studie ist p53 immunhistochemisch ausschließlich im Zellkern zu detektieren. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben verschiedener humanmedizinischer Studien überein (144, 226, 232, 233, 238-240). WANG et al. (145) konnten dagegen bei einem atypischen Meningeom eine Akkumulation von p53 im Zytoplasma feststellen. Bei einigen Tumoren wie z.B. Mammakarzinomen ist die zytoplasmatische Lokalisation von p53 als ein gesondertes Prinzip der funktionellen Inaktivierung beschrieben worden (97). Basierend auf der eigenen Untersuchung dürfte diesem Mechanismus für das canine Meningeom keine Bedeutung zukommen. Im Gegensatz hierzu lässt sich eine zytoplasmatische Reaktion bei den in dieser Arbeit als Positivkontrolle eingesetzten Mammakarzinomen (s.u.) nachvollziehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Meningeome mit klassischem (Gruppe I) bzw. atypischem (Gruppe II) histologischen Erscheinungsbild zu 50 % bzw. 40 % der Fälle p53-negativ sind und in den positiven Fällen ein relativ geringer Anteil der Zellen (ausgedrückt als p53 LI) eine Akkumulation von p53 demonstriert. Eine Ausnahme bildet das Granularzell-Meningeom der Gruppe I (Fall Nr. 209/00) mit einem auffällig hohen p53 LI von 21,63 (s. Seite 135). Das anaplastische Meningeom der Gruppe III (Fall Nr. 507/95) zeigt mit einem p53 LI von 16,25 ebenfalls einen sehr hohen Wert. Dieser Trend zur ausgeprägten Akkumulation von p53 in anaplastischen Meningeomen bei seltenerem p53-Nachweis in atypischen und benignen Subtypen spiegelt sich in den Daten verschiedener Untersucher (144, 232, 233) wider. Dagegen stellten HAKIN-SMITH et al. (226) bei 80 % der untersuchten 85 benignen Meningeome eine positive immunhistochemische Reaktion für p53 fest; davon zeigten 15 % eine starke Reaktion mit über 50 % markierter Zellkerne.

Es ist zu betonen, dass nicht nur der Speziesunterschied, sondern auch die Anwendung unterschiedlicher Antikörper und modifizierter Zählmethoden den direkten Vergleich der Zahlenwerte verbieten.

Die generelle Grenzziehung in der Studie von NAGASHIMA et al. (144) mit einem Anteil p53-positiver Zellen von unter 5 % in benignen und einem Anteil von über 5 % in anaplastischen Meningeomen ist mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung zwanglos vereinbar. Jedoch ist in Ermangelung statistischer Signifikanz dem p53 LI für eine Zuordnung caniner Meningeome in Gruppen unterschiedlicher Dignität eine untergeordnete Rolle beizumessen.

Mehrere immunhistochemische Untersuchungen der Proliferation und p53-Expression bei humanen Meningeomen zeigen einen signifikant höheren durchschnittlichen MIB-1-Index bei p53-positiven Tumoren im Vergleich zu p53-negativen Tumoren (238, 239). In der eigenen Studie zeichnet sich der entsprechende Zusammenhang sowohl für MIB-1 und p53 als auch für PCNA und p53 deutlich ab; die Werte liegen dabei nur knapp außerhalb einer statistischen Signifikanz. Diese Beobachtung legt nahe, dass immunhistochemisch negative und positive p53 Darstellung zwei verschiedene Funktions- bzw. Aktivierungszustände von p53 mit Auswirkung auf die Zellproliferation repräsentieren.

HAKIN-SMITH et al. (226) stellten bei einer Untersuchung von 85 benignen Meningeomen eine signifikante Korrelation zwischen der immunhistochemisch detektierten Expression von p53 und PCNA, nicht aber zwischen p53 und Ki-67 fest.

Die eigene Arbeit zeigt eine sehr starke positive Korrelation zwischen p53 LI und PCNA LI ($r = 0,957$) und eine etwas weniger starke, ebenfalls signifikante Korrelation zwischen p53 LI und Ki-67 LI ($r = 0,619$). Eine nachgewiesene Korrelation lässt nicht zwangsläufig den Schluss auf eine bestehende Kausalbeziehung zu. Es ist bekannt, dass Wildtyp p53 Protein je nach Art und Ausmaß einer Zellschädigung den Ablauf des Zellzyklus blockiert oder Apoptose einleitet. Ein Funktionsverlust infolge Mutation oder anderer Mechanismen kann in einem unkontrollierten Tumorwachstum resultieren (97). In Anbetracht der biologischen Funktionen von p53 erscheint als Interpretation der eigenen Ergebnisse sinnvoll, dass in einigen Fällen eine funktionelle Inaktivierung von p53 vorliegt, die eine gesteigerte Proliferationsaktivität zulässt. Über die Art der zugrundeliegenden Alteration kann anhand der durchgeführten Untersuchungen keine definitive Aussage gemacht werden, da der eingesetzte polyklonale Antikörper CM1 sowohl den Wildtyp als auch mutierte Formen des p53 Proteins detektiert (241).

NAGASHIMA et al. (144) konnten in vergleichbarer Weise eine Korrelation der immunhistochemischen Färbeindices von p53 und Ki-67 bei humanen Meningeomen feststellen. Aus genetischen Analysen dieser und weiterer Studien (146, 238) konnte abgeleitet werden, dass das immunhistochemisch dargestellte p53 Protein dem Wildtyp und nicht einer mutierten Form entspricht. Die von OHKOUDO et al. (238) untersuchten Tumoren wiesen keine Mutationen in den Exons 4–8 des *p53* Gens auf. Dagegen zeigten signifikant häufiger immunhistochemisch p53-positive Meningeome eine Expression von MDM2, welches durch Interaktion mit p53 dessen Funktion inhibieren kann. Die Untersuchung von insgesamt 66 humanen Meningeomen verschiedener histologischer Grade vermittels *single strand conformation polymorphism* (SSCP)-Analyse in einem Mindestumfang von Exon 5-8 des *p53* Gens lieferte keine Hinweise auf Mutationen. Die Autoren können keine relevante Beteiligung von genetischen *p53*-Alterationen an der Pathogenese dieser Tumorform erkennen. Mutationen außerhalb der untersuchten Regionen sind nicht auszuschließen, allerdings betreffen generell ca. 90 % der Genmutationen von *p53* die phylogenetisch konservierten Exons 5-8 (144, 146, 148, 238). Nur in seltenen Fällen sind

bei Meningeomen Mutationen von *p53* dokumentiert. MASHIYAMA et al. (242) fanden bei einem von 8 benignen Meningeomen eine Punktmutation in Exon 5 des *p53* Gens in Vergesellschaftung mit dem Verlust des normalen Allels. In einer Untersuchung von 26 humanen Meningeomen (19 benigne, 5 atypische und 2 maligne Tumoren) stellten WANG et al. (145) bei nur einem malignen Meningeom eine *p53* Mutation fest. Die Autoren bewerten diesen Befund als Indikator einer malignen Transformation. Die immunhistochemischen Analysen derselben Studie lassen eine Assoziation von immunoreaktivem p53 Protein im Zellkern und histopathologisch atypischem oder malignem Erscheinungsbild erkennen, nicht jedoch notwendigerweise mit dem Vorliegen einer *p53* Mutation. Bei einer Untersuchung von 61 Meningeomen (21 atypische, 15 anaplastische Meningeome sowie 25 strahleninduzierte Meningeome verschiedenen Subtyps) zeigten zwei Tumoren *p53* Mutationen. Es handelte sich um ein sporadisches anaplastisches Meningeom und um ein strahleninduziertes Meningeom vom transitionalen Typ. Der Patient des letztgenannten Tumors war Träger einer Keimbahnmutation, ohne dass allerdings klinische Hinweise auf das Li-Fraumeni-Syndrom bestanden hätten. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass *p53* Alterationen bei Meningeomen in die Entwicklung zur Malignität involviert sind (149).

Es ist davon auszugehen, dass an der Entwicklung von Meningeomen bei Hunden ebenso wie beim Menschen (147) mehrere Schritte genetischer Aberrationen beteiligt sind. Die eigenen Untersuchungen weisen darauf hin, dass ein erhöhter p53 LI beim Hund assoziiert ist mit Meningeomen gesteigerter Malignität und erhöhtem Proliferationspotential. Es kann aus den gewonnenen Informationen nicht ermittelt werden, ob p53-positive Tumorzellen Träger einer *p53* Mutation sind. Aus dem Vergleich mit humanmedizinischen Ergebnissen erscheint das Vorliegen von Mutationen in den vereinzelt positiven Zellen der „klassischen“ Meningeomsubtypen zumindest unwahrscheinlich. Eine SSCP-Analyse könnte diesbezüglich weitere Aufschlüsse geben. Es ist zu bedenken, dass auch die fundamentalsten Arten der zellulären Antwort auf DNA-Schäden sich nicht durchgängig in verschiedenen Spezies gleichen, und sogar in unterschiedlichen Zellen desselben Organismus variieren. So verursachen hohe p53-Konzentrationen in einigen Zellen Apoptose, in anderen wird dagegen lediglich der Zellzyklus angehalten (49).

Der negative p53-Nachweis in 50 % der „klassischen“ Meningeome und der geringe p53 LI in der anderen Hälfte dieser Gruppe liefert in Anbetracht der zentralen Bedeutung von p53 (Zellzykluskontrolle, genomischer Stabilität und Inhibierung der Blutgefäßbildung) eine Teilantwort auf die Frage, warum sich die „klassischen“ Subtypen beim Hund als benigne, langsam wachsende Tumoren mit geringer Metastasierungsneigung darstellen.

Nach HALL und LANE (155) repräsentiert das gelegentliche Auftreten p53-positiver Zellen in einem Tumor eher eine normale Funktion des p53-Systems als eine molekulare Aberration. Um Informationen über den Funktionszustand von p53 zu gewinnen kann die Expression von stromabwärts gelegenen Effektoren (z.B. p21^{CIP}) immunhistochemisch untersucht werden, da es unwahrscheinlich ist, dass diese bei funktioneller Alteration von p53 induziert werden. In einer humanmedizinischen Studie konnte eine signifikante Korrelation zwischen der immunhistochemisch detektierten Expression von p53 und p21^{CIP} bei benignen Meningeomen gezeigt werden. Die Autoren halten es für wahrscheinlich, dass die p53 Immunopositivität eine physiologische Reaktion repräsentiert (226).

Besonderheiten hinsichtlich der immunhistochemischen Reaktion mit dem p53-Antikörper treten innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Fälle insbesondere an einem der Gruppe I-Tumore auf, dem Granularzell-Meningeom. Granularzell-Tumoren können bei Hunden in verschiedenen Organen auftreten. Sie sind am häufigsten in der Maulhöhle beschrieben, selten dagegen in anderen Lokalisationen wie ZNS, Herz, Lymphknoten oder Haut. Ungeachtet der Lokalisation besitzen diese Tumoren eine uniforme Morphologie, sind i.d.R. benigne und metastasieren selten. Die Histogenese ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es ist die Ansicht verbreitet, dass sich Granularzell-Tumoren aus verschiedenen Zelltypen ableiten können; die Mehrzahl peripherer Granularzell-Tumoren entsteht Annahmen zufolge aus Schwann-Zellen (236, 243). HIGGINS et al. (235) beschreiben zwei Fälle caniner Granularzell-Tumoren des ZNS im Bereich des Bulbus olfactorius bzw. Lobus frontalis mit substantieller Beteiligung der Meningen. Die Autoren nehmen, basierend auf Untersuchungen der Fein- und Ultrastruktur sowie immunhistochemischen Befunden, als Tumorursprung Zellen der Leptomeninx an. PATNAIK (243) dokumentiert bei einem Hund ein intracraniales meningotheiomatöses Meningeom mit einem größeren Anteil typischer Granularzellen. Die

aufgeführten Dokumentationen zentraler oder peripherer Granularzell-Tumoren bei Hunden beinhalteten keine Untersuchungen über die immunhistochemische Darstellung von p53.

Das Granularzell-Meningeom dieser Studie zeigt einen auffallend hohen p53 LI in Abwesenheit sowohl einer gesteigerten Zellproliferation (erfasst durch Ki-67 LI und Mitose-Index) als auch von Anaplasie-Zeichen. Wie bereits dargestellt, steht der sehr hohe PCNA LI nicht nachvollziehbar im Zusammenhang mit der Proliferationsaktivität. Die auffällige Koinzidenz von hohem p53 LI und PCNA LI bei diesem Tumor ist möglicherweise Ausdruck einer Reaktion auf einen DNA-Schaden, denn p53 wirkt als Sensor und Signalmolekül für DNA-Schäden, und PCNA ist Bestandteil von Reparatursystemen.

Ein alternativer Erklärungsansatz basiert auf einer Alteration des Zellstoffwechsels: Die Tatsache, dass Granularzellen in verschiedenen primären Neoplasien des ZNS nachgewiesen worden sind, kann als Hinweis auf eine unspezifischen metabolische Transformation in diesen Tumorzellen interpretiert werden. In Granularzell-Tumoren des ZNS des Hundes wurde immunhistochemisch eine deutliche Reaktion für Ubiquitin nachgewiesen (235). Wie beschrieben liegt dem Abbau von p53 die Ubiquitin-mediierte Proteolyse zugrunde (49); u.U. liegt der nukleären Akkumulation von p53 beim Granularzell-Meningeom dieser Studie eine Alteration der Degradationsprozesse zugrunde.

Das in der veterinärmedizinischen Klassifikation (12) geführte „Granularzell-Meningeom“ hat unter den Meningeomen des Menschen kein entsprechendes Pendant. In der Humanmedizin dient „Granularzell-Tumor“ als ein rein deskriptiver Begriff für eine histogenetisch heterogene Gruppe von Neoplasien. Die Granularzell-Tumoren des ZNS des Menschen betreffen Neurohypophyse und Infundibulum und werden als WHO-Grad I klassifiziert. Die immunhistochemisch per Ki-67/MIB-1 erfasste Proliferationsaktivität ist generell sehr niedrig und Mitosefiguren sind abwesend. Als zellulärer Ursprung werden Pituitaryzellen (spezifisch differenzierte Gliazellen der Neurohypophyse) angenommen. Darüber hinaus können Granularzellen als Komponente von Glioblastomen angetroffen werden. Für die häufigeren extraneuralen Granularzell-Tumoren wird eine Entstehung aus Schwann-Zellen, Myoblasten und Makrophagen diskutiert (11).

Die in dieser Arbeit beobachtete Charakteristik der p53 Immunoreaktivität bei den als Positivkontrollen eingesetzten humanen und caninen Mammakarzinomen entspricht den Beobachtungen humanmedizinischer (244) und veterinärmedizinischer (245) Studien. Somit ist abzuleiten, dass die in im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen durchgeführte Methode der Gewebeprozessierung und der eingesetzte polyklonale Antikörper CM1 eine spezifische Darstellung von p53 bei formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben von Hunden gestatten. Die Quantifizierung einiger Proben erforderte eine intensive Begutachtung, da schwächere Reaktionen sich farblich nur wenig von der unspezifischen Hintergrundfärbung abhoben. Es ist bekannt, dass polyklonale Antikörper eine unspezifische, die Beurteilung störende Hintergrundfärbung des Präparates verursachen können (246). Darüber hinaus können unterschiedliche Zeiträume zwischen Gewebeentnahme und Fixierung, Unterschiede der Fixationsdauer und das immunhistochemische Detektionssystem das Auftreten von Hintergrundfärbung sowie die Sensitivität einer immunhistochemischen Darstellung beeinflussen (245).

PTEN:

Um eine potentielle Rolle des Tumorsuppressors PTEN (*phosphatase und tensin homolog deleted on chromosome ten*) bei Entstehung und Progression sporadischer caniner Meningeome zu erfassen, wurden 18 Fälle verschiedener Tumorsubtypen immunhistochemisch mit dem Antikörper 26H9 auf Expression von PTEN untersucht.

PTEN oder *MMAC1* (*mutated in multiple advanced cancers*) kodiert ein Protein mit Homologie zur katalytischen Domäne von Tyrosin-Phosphatasen und zu den Zytoskelettproteinen Tensin und Auxilin. PTEN ist an der Regulation von Apoptose, Zellproliferation, Angiogenese und Zelladhäsion beteiligt. Mutationen von *PTEN* werden bei einer Vielzahl menschlicher Tumorerkrankungen wie z.B. Gliomen sowie Karzinomen der Brustdrüse, Prostata und Niere festgestellt (133, 158-160). Untersuchungen an Zelllinien und sporadischen Fällen von caninen Osteosarkomen (247) sowie caninen Melanomen (248) zeigten gehäuft Mutationen bzw. eine Reduktion oder einen Verlust der Expression dieses Tumorsuppressors. Die Autoren schreiben der Alteration von PTEN einen Beitrag zur Pathogenese dieser Tumoren zu.

Die bei einem humanen Meningeom identifizierte Missense-Mutation des *PTEN* Gens erwies sich in einem Transfektionsversuch mit Kulturzellen als geeignet, eine deutliche Steigerung der Proliferationsaktivität im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp-*PTEN* hervorzurufen, sowie in einem weiteren Ansatz die Apoptoserate zu senken (249).

Nach der Auffassung von SANO et al. (250) kann die Untersuchung der Expression - ungeachtet der Mechanismen die der Herabregulation von PTEN zugrunde liegen - als gut geeignete Methode für die Erfassung eines Funktionsverlustes betrachtet werden.

Anders als der bei *p53* zu beobachtende Zusammenhang zwischen Mutation und Akkumulation, führen Mutationen des *PTEN* Gens nicht generell zu erhöhten Spiegeln an PTEN Protein (247). Gleichwohl - da Mutationen die zur Inaktivierung von PTEN führen nicht notwendigerweise auch dessen Expression verhindern - ist es möglich, dass die immunhistochemische Analyse an frischem oder fixiertem Material zu einer Unterbewertung der Häufigkeit derartiger Mutationen führt (248). Es lässt sich demnach nur annehmen, dass der weitgehende Verlust der PTEN-Expression des anaplastischen Meningeoms der vorliegenden Studie ursächlich an der hohen Proliferationsaktivität, repräsentiert durch gesteigerte PCNA, Ki-67 und Mitose –Indices, beteiligt ist.

In einer Untersuchung von 75 humanen Meningeomen verschiedener Malignitätsgrade (55 benigne, 10 atypische und 10 maligne Tumoren) konnte lediglich bei einem anaplastischen Meningeom eine hemizygote *PTEN*-Deletion in Vergesellschaftung mit einer somatischen Leseraster-Mutation von *PTEN* des korrespondierenden Allels identifiziert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Alterationen von *PTEN* nicht an der Pathogenese von Meningeomen niedrigeren Grades beteiligt sind, sondern eine Rolle in der malignen Progression eines Anteils anaplastischer Meningeome innehaben (186). JOACHIM et al. (149) dokumentieren in einer 61 Meningeome umfassenden Studie neben dem obigen Fall zwei weitere Meningeome mit *PTEN*-Mutation, ein sporadisches anaplastisches und ein strahleninduziertes transitionales Meningeom. Bei letzterem kann allerdings aufgrund fehlender konstitutioneller DNA als Vergleichsprobe nicht ausgeschlossen werden, dass es sich anstelle einer Mutation um einen Polymorphismus handelt.

Die Untersuchungen von BOSTROM et al. (185) an 34 Tumoren menschlicher Patienten (2 benigne, 17 atypische und 15 anaplastische Meningeome) konnten zwar in 41 % der Fälle Alterationen von Chromosom 10q, nicht jedoch *PTEN*-Mutationen oder homozygote Gen-Deletionen aufzeigen. Dagegen wurden in derselben Studie bei 25 von 36 Glioblastomen (69 %) Heterozygotieverluste und *PTEN*-Mutationen in 25 % der Fälle detektiert.

Die Mehrzahl der bisherigen humanmedizinischen Untersuchungen stellt also eine Assoziation somatischer *PTEN*-Alterationen mit der malignen Progression eines kleinen Anteils der untersuchten Meningeome fest.

STAAL et al. (249) identifizierten dagegen bei einem Patienten mit benignem Meningeom und Oligodendrogliom eine Keimbahnmutation des *PTEN* Gens ohne, dass Anzeichen eines Zusammenhanges mit Cowden-Syndrom oder ähnlichen Tumorsyndromen bestanden. Häufig ist bei humanen Gliomen ein Verlust des zweiten Tumorsuppressor-Allels aufgrund einer somatischen Deletion auf Chromosom 10 festzustellen. Das zweite Allel des Tumorsuppressors enthielt in diesem Falle keine feststellbare Alteration auf genomischer Ebene d.h. weder einen Heterozygotieverlust noch eine Punktmutation. Als Inaktivierungsmechanismus, d.h. als „*second hit*“, ziehen die Autoren eine Punktmutation einer regulatorischen Sequenz oder eine Methylierung im Bereich des Promotors in Betracht. Es bleibt allerdings offen, ob nicht auch im Zusammenhang mit diesen Tumoren des zentralen Nervensystems des Menschen eine *PTEN*-Haploinsuffizienz zur Zelltransformation beigetragen kann (249). Bisher ist bekannt, dass Mäuse mit einer Haploinsuffizienz dieses Tumorsuppressors ein beschleunigtes Tumorwachstum aufweisen (133, 160).

Es wird aus der geringen Anzahl an Untersuchungen ersichtlich, dass sich die Erforschung der Bedeutung von *PTEN* für das Meningeom beim Menschen noch in den Anfängen befindet, und über eine mögliche Einbeziehung des *PTEN*-Status in diagnostische, prognostische oder therapeutische Überlegungen derzeit noch keine definitive Aussage gemacht werden kann.

Die in dieser Studie vorgestellte immunhistochemische Detektion von *PTEN* stellt bei Meningeomen ein Novum dar; entsprechend wird für die Interpretation der Ergebnisse auf thematisch verwandte Publikationen zugegriffen.

Von 18 in der vorliegenden Arbeit untersuchten caninen Meningeome war nur bei einem anaplastischen Tumor ein deutlicher Verlust der immunhistochemisch detektierbaren PTEN-Expression festzustellen; das heterogene Expressionsmuster dieses Falles deutet auf das Vorhandensein von Subklonen hin, deren Fähigkeit PTEN zu exprimieren verlorengegangen ist. Grundlage der folgenden Überlegungen ist, dass es sich bei beim immunhistochemisch nachgewiesenen PTEN tatsächlich um funktionelles Wildtyp-Protein handelt, was mit der eingesetzten Methode letztlich nicht bewiesen werden kann, zumal der verwendete monoklonale Antikörper gegen ein aus der carboxyterminalen Sequenz von *PTEN* hergeleitetes Peptid gerichtet ist (251). Die Mehrheit der Meningeome zeigt eine PTEN-Immunoreaktivität auf, bzw. liegt hinsichtlich der Färbeintensität geringfügig unter dem Niveau der als physiologisch angenommenen Expression des korrespondierenden Blutgefäßendothels. Der insgesamt seltene Verlust der PTEN-Expression deutet darauf hin, dass die Inaktivierung der Funktion dieses Tumorsuppressors kein initiales Ereignis in der Entstehung intracranialer Meningeome des Hundes darstellt, sondern eine Rolle im Verlauf der malignen Progression dieser Tumoren spielt. Zur Verifikation dieser Hypothese, die sich mit der entsprechenden, in der Humanmedizin gegenwärtig vorherrschenden Auffassung deckt, ist allerdings die Untersuchung einer größeren Anzahl an Fällen sowie eine Mutationsanalyse erforderlich.

Die immunhistochemische Detektion von Tumorsuppressoren am histologischen Schnittpräparat kann die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen einer Akkumulation (p53), einer Fluktuation der subzellulären Lokalisation oder einer fehlenden Darstellung nicht erschöpfend beantworten, sondern ist vielmehr Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen, wie z.B. Mutationsanalyse sowie Quantifizierung von mRNA und Protein.

Befunde verschiedener Autoren machen deutlich, dass eine Reihe von Inaktivierungsmöglichkeiten für PTEN auf genetischer und epigenetischer Ebene besteht. Als Ursache eines kompletten Ausfalls der PTEN Expression kommt auf der Ebene des Genoms eine homozygote Deletion oder eine hemizygoten Deletion in Kombination mit einer Mutation der proteinkodierenden Region des verbleibenden Alles in Frage (182).

Eine monoallele PTEN Expression infolge hemizygoter Deletion ist als plausible Ursache niedriger mRNA-Spiegel denkbar (252).

Dabei ist zu beachten, dass die mRNA-Expression von Tumorsuppressorgenen nicht notwendigerweise den Grad der Proteinexpression widerspiegelt, sondern es können auch relativ hohe Spiegel an PTEN-Transkript auftreten bei Abwesenheit des entsprechenden Proteins (182, 252). Für solche Fälle ist anzunehmen, dass neben der hemizygoten PTEN-Deletion eine Missense-Mutation besteht, die ein abnormal instabiles Protein kodiert (252).

Mutationen oder Deletionen von PTEN treten nach WHANG et al. (182) nur bei einem kleinen Teil fortgeschrittener humaner Prostatakarzinome auf; allerdings ist Verlust der Expression von PTEN auf der mRNA und Protein -Ebene in mindestens der Hälfte der Tumoren festzustellen. Der bedeutendste Mechanismus der den Verlust der mRNA-Expression bedingen kann, ist auf der Ebene der Transkription anzusiedeln; die Methylierung von CpG-Inseln (CG-Dinukleotiden) in der Nähe des Promotor oder Enhancer des PTEN Genlocus ist ein mögliches Modell. Die Expression von PTEN mRNA in nicht exprimierenden Prostatakarzinomzellen konnte wieder hergestellt werden durch in vitro Behandlung mit dem demethylierenden Wirkstoff 5-Azadeoxycytidin (5-Azadeoxycytidin kann DNA demethylieren und die Transkription von Genen aktivieren). Dies zeigt, dass der PTEN Locus in diesen Fällen auf der genomischen Ebene intakt war und stützt die Hypothese, dass Methylierung eine Rolle bei transkriptioneller Suppression eine Rolle spielt (182).

In der Studie von PERREN et al. (181) konnte bei Mammakarzinomen mit Reduktion der immunhistochemisch erfassten PTEN-Expression ein monoalleler Verlust von PTEN identifiziert werden. Andere Tumoren dagegen zeigten einen kompletten Ausfall der PTEN-Expression. Die genetische Analyse dieser Proben zeigte eine hemizygote PTEN-Deletion in Abwesenheit intragenischer PTEN-Mutationen oder einer Deletion des verbliebenen Allels. Als Ursache für letztere Beobachtung wird auch hier eine Inaktivierung über epigenetische Mechanismen angenommen.

Ungeachtet der umfassenden Charakterisierung von PTEN-Mutationen vieler Tumorentitäten des Menschen und des relativ guten Verständnisses der molekularen Funktionen bei der Kontrolle zellulärer Prozesse, ist die Art der Regulation dieses Tumorsuppressors noch wenig erforscht. Es wird angenommen, dass die PTEN-Aktivität durch verschiedene Mechanismen wie Phosphorylierung, Interaktion mit anderen Proteinen und Änderung der subzellulären Lokalisation reguliert wird. Bekannt ist, dass p53 über eine Bindungsregion innerhalb des PTEN Promotors dessen induzierbare Expression positiv reguliert, während basale Spiegel der PTEN Transkription von Elementen kontrolliert werden, die außerhalb der p53-responsiven Region liegen (142, 252). Obwohl PTEN als ein zytoplasmatisches Protein betrachtet wird, wurden bei Mensch und Hund zelltypspezifische Verlagerungen des zellulären Kompartiments von PTEN in Verbindung mit neoplastischer Transformation und Zelldifferenzierung festgestellt. Die funktionelle Bedeutung dieser Veränderungen ist bislang nicht geklärt (178, 248). Möglicherweise ist PTEN in diesen Kompartimenten in spezifische Prozesse involviert oder wird lediglich auf diese Weise von der Plasmamembran entfernt (133).

Die PTEN-Immunoreaktivität der in dieser Arbeit als Positivkontrollen eingesetzten humanen und caninen Mammakarzinome umfasste das zytoplasmatische und nukleäre Zellkompartiment. Dieses Reaktionsmuster steht im Einklang mit den Beobachtungen von PERREN et al. (181) am Mammakarzinom des Menschen.

SANO et al. (250) stellten eine positive immunhistochemische Reaktion der Zellkerne unalterierter Neurone fest. Die eigenen Untersuchungen haben in vielen Fällen eine negative oder schwache Reaktion der Nuklei dieser Zellen ergeben, bei deutlicher Anfärbung des Zytoplasmas. Weitere Studien sind erforderlich, um den Einfluss verschiedener Antikörper und Methoden der Gewebeprozessierung auf diese Beobachtungen zu erfassen.

Die in dieser Arbeit eingesetzte immunhistochemische Methode ist für die Detektion und semiquantitative Evaluierung von PTEN an formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben caniner Meningeome geeignet. Endothelzellen der in allen untersuchten Gewebeschnitten vorhandenen Blutgefäße zeigten eine konstante Reaktion und dienten als interne Positivkontrolle. Durch den Vergleich der immunhistochemischen Anfärbung von Endothel und Tumorgewebe wird eine individuelle Auswertung ermöglicht.

LOH-Analyse:

Wie bereits mehrfach angesprochen, sind der Aussagefähigkeit immunhistochemischer Nachweise von Tumorsuppressoren Grenzen gesetzt. Um fundiertere Hinweise auf diesen Meningeomen zugrunde liegenden Pathomechanismen zu erhalten, sind weiterführende Untersuchungen auf molekularer Ebene erforderlich. Eine dieser Methoden stellt die Untersuchung auf den Verlust der Heterozygotie dar, welche im Bereich der veterinärmedizinischen Tumorforschung noch am Anfang steht. Die LOH (*loss of heterozygosity*)-Analyse basiert auf der Untersuchung von polymorphen genetischen Markern. In der vorliegenden Arbeit wurden 7 Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 5 des Hundes, welches das *p53* Gen trägt (14), durch PCR mit flankierenden Primern untersucht. Hat ein Individuum verschiedene Allele von seiner Mutter und seinem Vater geerbt, d.h. im Falle einer Heterozygotie, kann der direkte Vergleich von DNA aus normalen Körperzellen mit Tumor-DNA Allelverluste (LOH) im Tumorgenom ersichtlich werden lassen. Mit dieser Methode kann allerdings keine Aussage über das Vorliegen von Punktmutationen gemacht werden (190, 191). Mutationen des *p53* Gens und allele Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 des Menschen (auf dem das *p53* Gen lokalisiert ist) sind bei einer Reihe verschiedener Tumoren gefunden worden (41, 138, 242).

Das Meningeom ist der häufigste Tumor des ZNS des Menschen und gehörte zu den ersten soliden Tumoren des Menschen, die zytogenetisch und molekulargenetisch untersucht wurden. Heute ist ein breites Spektrum von Allelverlusten auf verschiedenen Chromosomen bekannt. Zur Identifikation von Allelverlusten und Lokalisierung potentieller Tumorsuppressor-Loci hat die Untersuchung polymorpher repetitiver DNA-Sequenzen entscheidend beigetragen (210, 253).

Die geringe Häufigkeit an in dieser Studie festgestellten LOHs bei caninen Meningeomen lässt keine pathogenetisch essentielle Rolle von Allelverlusten auf Chromosom 5 erkennen. Aufgrund der regional lückenhaften Informationen, bedingt durch „nicht informative“ Allelsituation und fehlende Amplifikate kann die Interpretation der Ergebnisse nur mit Zurückhaltung erfolgen. Überlegungen zur Detektionsmethode (s.u.) lassen es möglich erscheinen, dass die Anzahl der existenten Allelverluste die in dieser Arbeit festgestellten

LOHs übersteigt. Da der *p53*-Locus wie auch einige der Marker nicht in allen Veröffentlichungen einheitlich kartiert sind, kann die Frage, ob die detektierten LOHs tatsächlich mit einer Alteration von *p53* oder aber mit der eines nicht identifizierten potentiellen Tumorsuppressors assoziiert sind, derzeit nicht befriedigend beantwortet werden.

Die Anzahl der informativen, d.h. auswertbaren Amplifikate blieb unter den Erwartungen an einen polymorphen Marker. Es ist davon auszugehen, dass technische Gründe an der insgesamt geringen Anzahl aussagkräftiger Konstellationen beteiligt sind:

Es wurden für die eigenen Untersuchungen Elektrophorese-Gele mit einer Agarosekonzentration von 2,0 % gewählt. Derartige Gele eignen sich für die Auftrennung von Fragmenten mit einer Länge von 100 bis 2000 Basen (254). Das Auflösungsvermögen liegt bei ca. 15 bis 20 Basen und ist damit geeignet heterozygote Allele mit einer Differenz von mindestens 15 Basen zu detektieren. Die Untersuchungen polymorpher Marker von TAUTZ (193) und TSUCHIDA et al. (199) demonstrierten Längendifferenzen der Amplifikate von 2 bis 20 Basen bzw. 2 bis 14 Basen. Diese Angaben liefern nur eine Größenvorstellung, da jedes Individuum und jeder Marker grundsätzlich unterschiedliche Ergebnisse liefern kann. Allerdings ist der Schluss zu ziehen, dass aufgrund des Auflösungsvermögens der eingesetzten Gele in einigen „nicht-informativen“ Konstellationen eine Heterozygotie maskiert wurde und damit die Anzahl der LOHs im Tumorgewebe potentiell zu niedrig bestimmt wurde. Damit erweist es sich als empfehlenswert für weitere Studien hochauflösende Acrylamidgele (z.B. 6 % Acrylamidgel, sog. „Sequenziergel“) einzusetzen, die es erlauben Längendifferenzen von einzelnen Basen zu detektieren (192, 193).

Zudem sind mögliche Unterschiede hinsichtlich des Polymorphismus bei verschiedenen Hunderassen zu beachten. Während der Entstehung von Hunderassen können seltene Allele in bestimmten Rassen akkumulieren, und durch Anpaarung eng verwandter Tiere wird wahrscheinlich eine Homozygotie seltener Allele induziert (199). Dieser Ansatz ist für das eigene Untersuchungsgut als Erklärung für die geringe Zahl dargestellter heterozygoter Allel-Situationen allerdings eher von theoretischem Interesse, da verschiedene Rassen und ein großer Anteil an Mischlingen vertreten sind.

Trotz sorgfältiger Arbeitsweise muss die Möglichkeit einer Kontamination mit nicht-tumorzelleigener DNA in die Bewertung der Ergebnisse einbezogen werden. Die Detektion

von Allelverlusten aus DNA-Präparationen aus Tumoren kann problematisch sein, da die meisten soliden Tumoren signifikante Anzahlen nicht-neoplastischer Stromazellen und Entzündungszellen enthalten und folglich die Diagnose eines LOH verdeckt werden kann (138, 191).

Die Amplifikation von DNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben verlief in nur 54,6 % der Ansätze erfolgreich; dagegen ergab die PCR mit Extraktionen aus tiefgefrorenem Blut konstant nachweisbare Produkte. Die Problematik, die formalinfixiertes Autopsiematerial in Hinsicht auf molekulargenetische Untersuchungen, insbesondere für die Mikrosatelliten-Analyse, mit sich bringt sei abschließend kurz dargestellt:

Die Verwendung von Autopsiematerial für molekulare Untersuchungen ist mit gewissen Einschränkungen versehen, weil post mortem eine ausgeprägte Degradation insbesondere von mRNA und Proteinen stattfindet. Signifikante biochemische Alterationen treten im Gewebe schon innerhalb von 10 min der Anoxie auf (60). GREER et al. (255) konnten jedoch keinen Unterschied in der Ausbeute an Amplifikationsprodukt feststellen zwischen frisch fixiertem Gewebe und Gewebe, welches vor der Fixierung 24 h bei 4 °C gelagert wurde. Für die in der eigenen Untersuchung analysierten Gewebeproben ist die Zeitspanne (und Temperatur) bis zum Beginn der Fixierung nicht exakt zu eruieren; es kann von Zeiten im Bereich einiger Stunden bis zu ca. einem Tag (in Einzelfällen auch mehreren Tagen) ausgegangen werden. Entsprechend kann die Qualität des Gewebes auf molekularer Ebene trotz gut erhaltener Morphologie reduziert sein.

Formaldehyd geht mit DNA verschiedene Interaktionen ein, die als Ursache für wechselhafte Erfolge bei der Extraktion von für molekularbiologische Untersuchungen geeigneter DNA aus formalinfixierten Geweben angesehen werden. Formaldehyd initiiert eine DNA-Denaturierung (Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen und Alteration der Basenstapelung) an AT-reichen Regionen doppelsträngiger DNA, was Angriffspunkte für verschiedene chemische Reaktionen schafft. Unter anderem kann Formaldehyd-Behandlung sog. AP-Stellen (Apurin, Apyrimidin) über Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung hervorrufen, was freie Purin- und Pyrimidinreste hinterlässt. Darüber hinaus wird vermutet, dass Formaldehyd über Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen kurze Ketten von Polydesoxyribose mit intakten Pyrimidinen bildet. Im Vergleich zu DNA aus tiefgefrorenem Gewebe zeigt aus formalinfixiertem Gewebe extrahierte DNA bei PCR eine Neigung zur Generierung von

Artefakten. Es wird vermutet, dass diese aufgrund einer formalinbedingten Verknüpfung von Cytosin-Resten entstehen. Als Konsequenz kann die in die PCR eingesetzte Taq-Polymerase Cytosin nicht erkennen und baut Adenin anstelle von Guanin ein, was eine artifizielle Mutation darstellt.

Die Gesamtrate von Formalin-induzierten Modifikationen von DNA ist Konzentration, Temperatur und pH-Wert des Fixativs abhängig. Formaldehyd-Fixierung bei Raumtemperatur resultiert in einem schlechten Erhalt von DNA mit hohem Molekulargewicht. Dabei kann ein Verlust von bis zu 30 % auftreten. Die Größe der extrahierten DNA steht in einem direkten Verhältnis zur Fixationstemperatur; bei 4°C ist das Ausmaß an DNA-Degradation am geringsten (60). Erfolgreiche Amplifikationen konnten bei Geweben durchgeführt werden, die mit neutral gepuffertem Formalin fixiert wurden (256). Für einige ältere im Institut entnommene Proben ist die Fixierung mit ungepuffertem 7 % Formalin anzunehmen, was bei diesen Fällen zusätzliche Alterationen der DNA möglich erscheinen lässt: Formalin-Fixierung bei einem sauren pH-Wert oder in der Anwesenheit von Ameisensäure verursacht eine Degradation von Nukleinsäuren. Im Vergleich zu neutral gepuffertem Formalin zeigen Gewebe die in Formaldehyd-Lösung bei pH 3,0 fixiert wurden eine höhere Anzahl artifizieller Mutationen. Es wird vermutet, dass eine höhere Rate an Depurinierung bei niedrigem pH den Falscheinbau nicht-komplementärer Nukleotide (Cytosin anstelle von Thymin) an Apurin- und Apyrimidinstellen fördert (60).

Eine längere Fixationsdauer beeinflusst die Qualität der DNA negativ. Die durchschnittliche Größe der DNA, die aus formalinfixierten Gewebe extrahiert werden kann, sinkt mit Zunahme der Fixationszeit. Bei drei- bis sechsständiger Fixierung in gepufferten Formalin lassen sich höhere Ausbeuten an hochmolekularer DNA erzielen (60). Zeiten über 48 h gefährden dagegen die Eignung der DNA für die Amplifikation (256). Die in dieser Arbeit untersuchten Proben erforderten gewebs- und größenbedingt Fixationszeiten von mindestens drei Tagen; bei einigen Einsendungen ist davon auszugehen, dass das Gewebe dem Fixativ über mehrere Wochen ausgesetzt war.

Darüber hinaus spielt für die Beurteilung der Eignung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben für die PCR die Länge des gesuchten Produktes eine Rolle. Es wurde festgestellt, dass Fragmente mit einer Größe über 300-400 bp sich nicht immer erfolgreich amplifizieren lassen (192, 256). Das niedrige Molekulargewicht könnte die Folge

von Fixativ-bedingter Durchtrennung von Phosphodiester-Bindungen der DNA sein. Vergleichsweise weniger problematisch sind kürzere Fragmente mit z.B. 110 bp (60, 256).

Bei den eigenen Untersuchungen kamen drei Mikrosatelliten-Marker zum Einsatz (ZUBECA6, FH3278, DTR05.8), deren zu erwartende Fragmentlänge bei über 300 bp (302-398 bp) liegt. Tatsächlich konnte mit den Primern für den Marker mit der kürzesten zu erwartenden Fragmentlänge (REN262G24, 158 bp) am häufigsten ein Amplifikat synthetisiert werden (88,24 %), während für den zweitlängsten Marker (FH3278, 324 bp) die Erfolgsquote am niedrigsten war (23,53 %). Die eigenen Untersuchungen bestätigen, dass formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe für PCR-basierte Untersuchungen geeignet ist, solange die zu amplifizierenden Fragmente nicht länger als ca. 300 bp sind.

Es ist bislang wenig darüber bekannt, inwieweit Dauer und Temperaturbedingungen der Lagerung von Paraffinblöcken Einfluss auf die Qualität des Gewebes nehmen (60). Es wird davon ausgegangen, dass die maximal amplifizierbare Fragmentlänge mit der Zeit abnimmt, und sich dieser Umstand bei Paraffinblöcken mit einem Alter von über 5 Jahren auf das PCR-Ergebnis auswirkt (255). Zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion hatten einige Proben ein Alter von ca. 8 Jahren; ein negativer Einfluss der Lagerungsdauer von Paraffinblöcken auf die Amplifizierbarkeit geht aus den eigenen Ergebnissen nicht hervor.

Es erwies sich als erforderlich, um auf dem Elektrophorese Gel sichtbare Banden zu erhalten, die Polymerase-Kettenreaktion mit 45 Zyklen d.h. einer vergleichsweise hohen Anzahl an Reaktionsdurchgängen ablaufen zu lassen. Eine höhere Zyklusanzahl (>30) steigert allerdings das Risiko, dass fehlerhafte Nukleotide eingebaut und unspezifische Fragmente amplifiziert werden (257). MIHAILA et al. (253) und SOBRIDO et al. (211) greifen zur PCR-basierten Mikrosatelliten-Analyse gleichfalls auf Paraffin-eingebettetes Meningeomgewebe zurück. Die Untersucher setzten 45 bzw. 30 Reaktionszyklen ein. In Übereinstimmung mit den eigenen Beobachtungen lieferten einige Primer auch bei wiederholten Ansätzen kein Amplifikat.

Bei Verwendung von hochprozessiven aber leseungenauen Polymerasen, kann es dazu kommen, dass ein Nukleotid in jeweils 500 bp Abschnitten falsch eingebaut wird (257). Für die eigene Untersuchung sind derartige, durch Fehler der Taq-Polymerase bedingte, „Punktmutationen“ nicht von Belang, da die Zielsetzung der Agarosegelelektrophorese im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich in einer Detektion von Fragmentgrößen ohne nachfolgende Sequenzierung bestand.

Zusätzlich zu den gewünschten Produkten können bei der PCR unspezifische Amplifikate mit abweichender Länge und/oder Nukleotidsequenz entstehen. Als Ursache kommt die Anlagerung der Primer an nicht vollständig komplementäre Basenfolgen (*mispriming*) in Frage (192). Ein Problem, das die Amplifikation vom Mikrosatelliten, insbesondere von Dinukleotid-Wiederholungen, mit sich bringen kann, sind sog. „Schattenbanden“, die sich zusätzlich zur Mikrosatelliten-Bande mit geringen Längenunterschieden auf dem Elektrophoresegel darstellen. Als hauptsächlicher Entstehungsmechanismus dieser Artefakte wird *slipped-strand mispairing*, d.h. Verrutschungen von Primer- und Matrizenstrang während der PCR angenommen – ähnlich also dem Mechanismus, der für die Entwicklung von Mikrosatelliten verantwortlich gemacht wird. (196, 258). Es wird empfohlen, die Anzahl der PCR-Zyklen und die Primerkonzentration zu reduzieren, um diesen Artefakten entgegenzuwirken (259). Wenn die intensivsten Banden als Basis der Analyse der herangezogen werden, gilt die Auswertung als unproblematisch. Jedes Individuum zeigt maximal zwei Längenvarianten an jedem Locus, so wie es für diploide Organismen zu erwarten ist. Eine Variante stammt von der Mutter und eine vom Vater (193).

Die in der Analyse der eigenen Fälle festgestellten additionalen Banden werden als artifizielle „Schattenbanden“ interpretiert, da diese sowohl bei Amplifikation der Proben konstitutioneller als auch neoplastischer DNA zu beobachten sind. Entsprechend liefert diese Studie keinen Hinweis auf Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) bei caninen Meningeomen. Beim Meningeom des Menschen ist Mikrosatelliten-Instabilität ein seltener Befund. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch ungeklärt; ein Defekt des DNA-Mismatch-Reparatursystems wird allerdings für unwahrscheinlich gehalten (211, 212). Für Tumoren des Hundes liegen bislang keine veröffentlichten Untersuchungen über MSI vor.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das intracraniale Meningeom ist der häufigste ZNS-Tumor des Hundes und aufgrund seiner oft günstigen anatomischen Lokalisation und dem i.d.R. wenig malignen biologischen Verhalten in zunehmendem Maße Gegenstand einer therapeutischen Intervention. Proliferationsindices von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und Ki-67 werden für die Abschätzung von Rezidivierung und Überleben bei menschlichen Meningeom-Patienten standardmäßig eingesetzt.

1. Ziel dieser Studie war die Bestimmung der PCNA und Ki-67 LI (*labeling indices*) bei 18 intracranialen caninen Meningeomen und darüber hinaus der kritische Vergleich der Anwendbarkeit der histologischen WHO-Klassifikationen von Mensch und Haustier auf diese Fälle. Die Tumoren wurden entsprechend des nur für die Humanmedizin existierenden Grading-Systems in drei Gruppen eingeteilt. Die Fälle der Gruppe I umfassten klassische Meningeome (transitional [n=6], fibrös [n=3], angiomatös [n=1], Granularzell [n=1], meningotheliomatös [n=1]) und Gruppe III das anaplastische Meningeom [n=1]. Bei allen Tumoren wies der PCNA LI höhere Werte auf als der Ki-67 LI. Die Meningeome mit atypischer Morphologie (Gruppe II) zeigten gemittelte PCNA LI und Ki-67 LI die zwischen jenen von Gruppe I und III lagen. Anhand der statistischen Auswertung ergab sich eine signifikante Korrelation mit dem Mitose-Index, was PCNA und Ki-67 als geeignete Marker für die Einschätzung des Proliferationspotentials von caninen Meningeomen ausweist.

2. Es wurde p53 mit dem polyklonalen Antikörper CM1 detektiert, der p53 LI erstellt und der histologischen Klassifikation sowie der Proliferationsaktivität gegenübergestellt. Klassische und atypische Meningeome zeigten generell einen niedrigen p53 LI, während der anaplastische Tumor eine ausgeprägte p53-Immunoreaktivität erkennen ließ. Eine signifikante Korrelation von p53 LI und PCNA LI bzw. Ki-67 LI war festzustellen.

3. Heterozygotieverlust (*loss of heterozygosity*, LOH) auf Chromosom 17 im Bereich des *p53* Genlocus und somatische Mutationen von *p53* sind die am häufigsten festgestellten genetischen Alterationen bei menschlichen Tumoren. Um die Relevanz dieses Defektes für das canine Meningeom abschätzen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit sieben polymorphe Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 5 durch PCR mit neoplastischer und korrespondierender konstitutioneller DNA amplifiziert. Die LOH Analyse lässt in einigen

Fällen alle Verluste erkennen; aufgrund inkonstanter Amplifikation ist eine Interpretation allerdings nur unter Vorbehalt möglich.

4. Deletionen und Mutationen des Tumorsuppressorgens *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) wurden in einem breiten Spektrum humaner Tumoren incl. derer des Gehirns beschrieben. In dieser Arbeit wurde das PTEN Protein erstmals immunhistochemisch beim Meningeom dargestellt. Die PTEN Immunoreaktivität der meisten untersuchten Tumoren stellte sich als eine homogene Färbung von Zytoplasma und Zellkern dar. Im Gegensatz dazu zeigte das anaplastische Meningeom ein unregelmäßiges Reaktionsmuster mit fokalem Verlust der PTEN-Expression. Für einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine ist neben der Bedeutung für Diagnostik und Prognose bereits heute eine therapeutische Relevanz nachgewiesen. Strahlentherapie ist insbesondere für inkomplett resezierte Meningeome und Tumoren vom atypischen und anaplastischen Subtyp von Bedeutung. Der PCNA LI kann in solchen Fällen eine Aussage über die Strahlensensibilität individueller Tumoren machen und so die Auswahl der geeigneten Therapieform unterstützen.

Bestrahlung und Chemotherapeutika, die üblicherweise bei der Krebstherapie eingesetzt werden, induzieren p53 in normalem Gewebe, was zu ihrer zytotoxischen Wirkung beiträgt. Tumoren denen p53 fehlt, haben hingegen die Tendenz einer medikamentösen Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose zu widerstehen. Über ein erweitertes Wissen um die den caninen Meningeomen zugrundeliegenden Pathomechanismen kann so eine mögliche Anwendbarkeit humanmedizinischer Behandlungsregimes auf den Hund abgeschätzt und die Therapie gegebenenfalls optimiert werden.

7 SUMMARY

Intracranial meningioma in the dog: Analyses of morphological, immunohistochemical and genomic alterations

Intracranial meningioma is the most frequent tumor of the canine central nervous system. Due to its advantageous anatomical localization and the generally low grade of malignancy this tumor is more and more the target of therapeutic approach. Proliferative indices of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and Ki-67 are routinely used in human meningioma patients to estimate recurrence and survival.

1st aim of this research was to determine PCNA and Ki-67 LI on 18 intracranial canine meningiomas and to critically compare the applicability of WHO histological classifications of humans and domestic animals to these cases. The tumors were classified into three groups according to the grading-system exclusively established in human medicine. The cases of group I comprised common meningiomas (transitional [n=6], fibrous [n=3], angiomatous [n=1], granular cell [n=1], meningothelial [n=1]) and group III anaplastic meningioma [n=1]. In all tumors PCNA LI was higher than Ki-67 LI. The meningiomas with atypical features (group II) showed mean indices between those of group I and III. Statistical analyses showed significant correlation with die mitotic index, indicating that PCNA and Ki-67 are appropriate markers for evaluation of the proliferative potential in canine meningiomas.

2. p53 was detected by immunohistochemistry using the polyclonal p53 antibody CM1. The p53 LI was determined and compared with histological subtype and proliferative activity. Common and atypical meningiomas generally exhibited low p53 LI while the anaplastic case was highly p53 immunoreactive. p53 LI was found to be significantly correlated to PCNA LI or Ki-67 LI.

3. Loss of heterozygosity (LOH) of chromosome 17 at the *p53* locus and somatic mutations of *p53* are the most common genetic alterations reported in human cancer. Seven polymorphic microsatellite markers on chromosome 5 were amplified by PCR from neoplastic and corresponding constitutional DNA in order to detect allele losses that might alter the *p53*

locus. The LOH analysis revealed allele losses in some cases, but due to inconstant amplification these results have to be interpreted with caution.

4. Deletions and mutations of tumor suppressor gene *PTEN* have been reported in a wide variety of human cancers, including tumors of the brain. In this study immunohistochemistry for PTEN was performed in meningioma for the first time. PTEN immunoreactivity in most of the tumors was homogeneous and involved the cytoplasmic and nuclear compartment. The anaplastic meningioma exhibited an irregular staining pattern with focal loss of PTEN expression. In addition to diagnostic and prognostic implications, some proteins investigated in this study have shown relevance for therapeutic management. Radiation therapy is of value particularly for subtotally resected meningiomas and for atypical and anaplastic tumors. For those cases PCNA LI can provide information of radiosensitivity of individual tumors and help to select the appropriate therapy.

Radiation and drugs commonly used in cancer treatment induce p53 in normal tissues, contributing to their cytotoxic effect. Tumors lacking p53 tend to resist drug-induced cell cycle arrest and apoptosis. A growing understanding of mechanisms fundamental to canine meningeal tumor development allows consideration of treatment modalities from human medicine and optimizing cancer therapy of dogs.

8 ANHANG

8.1 Chemikalien und Reagenzien

- 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, DAB Tablets (Kem-En-Tec Diagnostics A/S, DK)
- 3-Aminopropyl-Triethoxy-Silane, A-3648 (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)
- Aceton, Nr. A 1582 (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- ABC-Reagenz, VECTASTAIN[®] ABC KIT (Vectastain Laboratories, Inc., CA, USA)
- Agarose, peqGOLD Universal Agarose, Nr. 35-1020 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Aqua dest. für PCR (PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Citronensäure-Monohydrat zur Analyse, A 2337 (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- Chloroform, A1585 (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- Cresylechtviolett, 1A396 (Chroma-Gesellschaft mbH & Co., Münster)
- di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, zur Analyse, Nr. 1.06580.1000 (Merck KgaA, Darmstadt)
- DNA-Leiter, Step Ladder 50 bp S-7025 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- DNA-Leiter, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia Biotech, USA)
- DNeasy Tissue Kit, Cat. no. 69504 (QIAGEN GmbH, Germany)
- dNTPs (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- EDTA, Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)
- Eosin G (gelblich) für die Mikroskopie, Nr. 1.15935 (Merck KgaA, Darmstadt)
- Essigsäure (Eisessig) 100 % Nr. 56.2500 (Merck KgaA, Darmstadt)
- Ethanol für die Molekularbiologie, Nr. 1.0854.0250 (Merck KgaA, Darmstadt)
- Ethidiumbromid-Lösung 1 % (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Eukitt[®] (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg)
- Formaldehyd (37 %), Nr. 4002 (Merck KgaA, Darmstadt)
- fuchsinschweflige Säure, Schiffs Reagenz, Nr. 1.09033.0500 (Merck KgaA, Darmstadt)
- Gel-Ladepuffer, 6x Loading Dye Solution (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Gewebe-Einbettungsmaterial, Paraplast Plus (Sherwood Medical Co., St. Louis, Mo, USA)

Isopropanol, 100 % (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat, zur Analyse, Nr. 4873 (Merck KgaA, Darmstadt)
Magnesiumchlorid, 25mM, (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Mayers Hämalaun-Lösung für die Mikroskopie A0884 (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Methanol zur Analyse, A0688 (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Natriumacetat, wasserfrei, Nr. 6268 (Merck KgaA, Darmstadt)
Natriumchlorid, zur Analyse, Nr. 1.06404.1000 (Merck KgaA, Darmstadt)
Perjodsäure, 1 %, Nr. 524 (Merck KgaA, Darmstadt)
Proteinase K (QIAGEN GmbH, Germany)
Reaktionspuffer Y 10x (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Rnase A solution (Amersham Biosciences, USA)
Taq-DNA-Polymerase 5 U/µl (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, reinst, A 0548 (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Tris-Puffer, Nr. T1378 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
Trypsin, EC 3.4.21.4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)
Wasserstoffperoxid 30 %, Nr. A0626 (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Xylol, Nr. 8681 (Merck KgaA, Darmstadt)

8.2 Antikörper und Normalserum

Maus anti proliferating cell nuclear antigen, Klon PC10, Code No.M08790 (DAKO A/S, DK)
Maus anti human Ki-67 Antigen, Klon MIB-1, Code No.M7240 (DAKO A/S, DK)
Kaninchen anti NCL-p53-CM1, poloyklonal (Novocastra Laboratories Ltd, UK)
Maus anti PTEN, Klon 26H9, No.9556 (Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA, USA)
Ziege anti Maus, biotiniliert, E0433 (DAKO A/S, DK)
Ziege anti Kaninchen, biotiniliert, E0432 (DAKO A/S, DK)
Normalserum Ziege, G-Serum Art. Nr. 600605 (Novocastra Laboratories Ltd, UK)

8.3 Geräte

Digitalkamera, Canon Digital Ixus v² (Canon Deutschland GmbH, Krefeld)
Digitalkamera, ProgRes 3003 (Kontron Elektronik GmbH, Eching)
Digital-pH-Meter 646 (Knick Elektronische Meßgeräte GmbH & Co. KG, Berlin)

Elektrophoresekammer, Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100, 76 x 100 mm (Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden)

Gewebe-Einbettungssystem, Hyper Center XP (Shandon, Life Sciences International, GmbH, Frankfurt a. Main)

Heizblock/Inkubator, Model SK1101D (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Laborwaage, Type P-1200 (Mettler-Toledo GmbH, Giessen)

Laborwaage, Sartorius Type 2554 (Sartorius-Werke AG, Göttingen)

Magnetrührer/Heizplatte, IKAMAG[®] (IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.)

Mikroskop, ZEISS Axioplan[®] (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena)

Mikroskop, ZEISS Axiolab[®] (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena)

Mikrowellenherd, Severin Microwave 800 (Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern)

Photometer, GeneQuant RNA/DNA Calculator (Pharmacia LKB Biochrom Ltd, Cambridge, UK)

Rotationsmikrotom, Geräte-Typ: 2055 (Leica Mikrosysteme Vertriebs GmbH, Bensheim)

Rüttelmischer, Fuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Thermo-Cycler, Primus 96 advanced[®] Gradient (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Transformator, Consort Power Supply E 838 (Consort, Turnhout, B)

UV Transilluminator TFX 20M (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée Cedex, F)

Wasserbad, HIR-3 (Kunz Instruments)

Zentrifuge, Typ1-15 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz)

8.4 Rezepte

3,3^c Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Lösung

- DAB 1 Tablette
- PBS-Puffer 10,0 ml
- Wasserstoffperoxid 30 % 10,0 µl

In Puffer gelöstes DAB kann aliquotiert und tiefgefroren aufbewahrt werden. Wasserstoffperoxid unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen

ABC-Reagenz

- PBS-Puffer 5,0 ml
- Lösung A 1 Tropfen
- Lösung B 1 Tropfen

Komponenten mischen und 30 min im Dunklen inkubieren

Agarosegel 2,0 %

- TAE-Elektrophoresepuffer 100,0 ml
- Agarose 2,0 g
- Ethidiumbromid-Lösung 1 % 3,5 µl

Elektrophoresepuffer mit Agarose in der Mikrowelle erhitzen und gründlich mischen bis eine klare Lösung vorliegt; Ethidiumbromid hinzufügen und erneut mischen

Citrat-Puffer (10 mM, pH 6,0)

Stammlösung A:

- Citronensäure-Monohydrat 21,01 g
- Aqua dest. 1000,0 ml

Stammlösung B:

- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 29,41 g
- Aqua dest. 1000,0 ml

Gebrauchslösung:

- Stammlösung A 9,0 ml
- Stammlösung B 41,0 ml
- Aqua dest. 450,0 ml

Die Stammlösungen sind bei 2-8 °C zu lagern. Die Gebrauchslösung kann nicht aufbewahrt werden.

Cresylechtviolett-Lösung (pH 3,5)

- Cresylechtviolett 1,0 g
- Natriumacetat 0,21 g
- Aqua dest. 1000,0 ml

Der Farbstoff wird in warmem Aqua dest. gelöst. Nach dem Erkalten filtrieren und unter ständigem Rühren 24 h reifen lassen; vor Gebrauch 1 ml Essigsäure (99,7 %) auf eine Küvette (300 ml) zugeben

H₂O₂ 1,0 % in Aqua dest.

- Wasserstoffperoxid 30 % 10,0 ml
- Aqua dest. 290,0 ml

H₂O₂ 0,87 % in Methanol

- Methanol 100,0 ml
- Wasserstoffperoxid 30 % 3,0 ml

H₂O₂ 1,0 % in Aqua dest

- Aqua dest. 290,0 ml
- Wasserstoffperoxid 30 % 10,0 ml

PBS-Puffer (*phosphate-buffered saline*, pH 7,0 – 7,6)

- di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat 7,4 g
- Natriumchlorid 36,0 g
- Kaliumdihydrogenphosphat 2,15 g
- Aqua dest. 5,0 l

SO₂-haltige Spülflüssigkeit (für PAS-Färbung)

- Salzsäure 0.1 N 40 ml
- Leitungswasser 800 ml
- Kaliumdisulfitlösung 10 % 40 ml

TAE Elektrophoresepuffer (50 x Stammlösung)

- Tris 121,0 g
- Eisessig 28,5 ml
- EDTA (0,5 M, pH 8,0) 50,0 ml

mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Gebrauchslösung:

- TAE Stammlösung 10,0 ml
- Aqua dest. 490,0 ml

TES-Beschichtung für Objektträger

TES (3-Aminopropyl-Triethoxy-Silane)-Acetongemisch 2 %

- Aceton 196,0 ml
- TES-Stammlösung 4,0 ml

Da TES-Acetongemisch nur für kurze Zeit stabil ist, erst ansetzen wenn der Objektträger trocken ist.

- Chloroform 30 min
- Ethanol 100 % 30 min
- Lufttrocknung 30 min
- TES-Acetongemisch 2 % 5 min
- zweimaliges Spülen mit reinem Aceton
- Spülen mit Aqua dest.
- Trocknung bei 40 °C 24 h

Trypsin-Lösung, 0,1 %

- Trypsin 0,3 g
- PBS-Puffer 300,0 ml

Vor der Zugabe des Trypsin den Puffer auf 37,0 °C erwärmen

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Walter, J. H., Schwegler, K.: The frequency of neoplasms in dogs dissected in Berlin. *Zentralbl Veterinärmed A*, 39: 328-341, 1992.
2. Ostrander, E. A., Galibert, F., Patterson, D. F.: Canine genetics comes of age. *Trends Genet*, 16: 117-124, 2000.
3. Setoguchi, A., Sakai, T., Okuda, M., Minehata, K., Yazawa, M., Ishizaka, T., Watari, T., Nishimura, R., Sasaki, N., Hasegawa, A., Tsujimoto, H.: Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *Am J Vet Res*, 62: 433-439, 2001.
4. Foster, E. S., Carrillo, J. M., Patnaik, A. K.: Clinical signs of tumors affecting the rostral cerebrum in 43 dogs. *J Vet Intern Med*, 2: 71-74, 1988.
5. Heidner, G. L., Kornegay, J. N., Page, R. L., Dodge, R. K., Thrall, D. E.: Analysis of survival in a retrospective study of 86 dogs with brain tumors. *J Vet Intern Med*, 5: 219-226, 1991.
6. Kraft, S. L., Gavin, P. R., DeHaan, C., Moore, M., Wendling, L. R., Leathers, C. W.: Retrospective review of 50 canine intracranial tumors evaluated by magnetic resonance imaging. *J Vet Intern Med*, 11: 218-225, 1997.
7. Colvett, K. T., Hsu, D. W., Su, M., Lingood, R. M., Pardo, F. S.: High PCNA index in meningiomas resistant to radiation therapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 38: 463-468, 1997.
8. Theon, A. P., Lecouteur, R. A., Carr, E. A., Griffey, S. M.: Influence of tumor cell proliferation and sex-hormone receptors on effectiveness of radiation therapy for dogs with incompletely resected meningiomas. *J Am Vet Med Assoc*, 216: 701-707, 2000.
9. Moore, A. S.: Radiation therapy for the treatment of tumours in small companion animals. *Vet J*, 164: 176-187, 2002.
10. Forterre, F., Matis, U., Schrell, U., Geier, M., Gutmannsbauer, B., Schmahl, W.: Das intrakranielle Meningeom - Befunde, Therapie und Ergebnisse bei neun Katzen und einem Hund. *Tierärztl Prax*, 28 (K): 170-177, 2000.
11. Kleihues, P., Cavenee, W. K.: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.

12. Koestner, A., Bilzer, T., Fatzer, R., Schulman, F. Y., Summers, B. A., Winkle Van, T. J.: Histological classification of tumors of the nervous system of domestic animals, 2nd edition, Vol. V. Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
13. Sherr, J. C.: Principles of tumor suppression. *Cell*, 116: 235-246, 2004.
14. Guevara-Fujita, M. L., Loechel, R., Venta, P. J., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Brewer, G. J.: Chromosomal assignment of seven genes on canine chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Mamm Genome*, 7: 268-270, 1996.
15. Jonasdottir, T. J., Mellersh, C. S., Moe, L., Heggebo, R., Gamlem, H., Ostrander, E. A., Lingaas, F.: Genetic mapping of a naturally occurring hereditary renal cancer syndrome in dogs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 4132-4137, 2000.
16. Sherr, J. C., McCormick, F.: The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2: 103-112, 2002.
17. Cushing, H.: The meningiomas (dural endotheliomas): their source, and favoured seats of origin (the cavendish lecture). *Brain*, 45: 282-316, 1922.
18. Langford, L. A.: Pathology of meningiomas. *J Neurooncol*, 29: 217-221, 1996.
19. Wörterbuch-Redaktion: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage. Berlin; New York: Walter de Gruyter, 2002.
20. Summers, B. A., Cummings, J. F., de Lahunta, A.: Veterinary neuropathology. St. Louis: Mosby, Inc., 1995.
21. Meuten, D. J.: Tumors in domestic animals, 4th edition. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2002.
22. Kessler, M.: Kleintieronkologie. Berlin: Parey Buchverlag, 2000.
23. Russell, D. S., Rubinstein, L. J.: Pathology of tumours of the nervous system, 5th edition. London, Melbourne, Auckland: Edward Arnold, 1989.
24. Bondy, M., Lignon, B. L.: Epidemiology and etiology of intracranial meningiomas: A review. *J Neurooncol*, 29: 197-205, 1996.
25. McCutcheon, I. E.: The biology of meningiomas. *J Neurooncol*, 29: 207-216, 1996.
26. Mandara, M. T., Ricci, G., Rinaldi, L., Sarli, G., Vitellozzi, G.: Immunohistochemical identification and image analysis quantification of oestrogen and progesterone receptors in canine and feline meningioma. *J Comp Path*, 127: 214-218, 2002.

27. Adamo, P. F., Cantile, C., Steinberg, H.: Evaluation of progesterone and estrogen receptor expression in 15 meningiomas of dogs and cats. *Am J Vet Res*, *64*: 1310-1318, 2003.
28. Haskins, M. E., Mc Grath, J. T.: Meningiomas in young cats with mucopolysaccharidosis I. *J Neuropathol Exp Neurol*, *42*: 664-670, 1983.
29. Nolte, I., Nolte, M.: *Praxis der Onkologie bei Hund und Katze*. Stuttgart: Enke, 2001.
30. Barnhart, K. F., Wojcieszyn, J., Storts, R. W.: Immunohistochemical staining patterns of canine meningiomas and correlation with published immunophenotypes. *Vet Pathol*, *39*: 311-321, 2002.
31. Kitagawa, M., Kanayama, K., Sakai, T.: Cystic meningioma in a dog. *J Small Anim Pract*, *43*: 272-274, 2002.
32. Bagley, R. S., Kornegay, J. N., Lane, S. B., Thrall, D. L., Page, R. L.: Cystic meningiomas in 2 dogs. *J Vet Intern Med*, *10*: 72-75, 1996.
33. Kleihues, P., Burger, P. C., Scheithauer, B. W.: *Histological typing of tumors of the central nervous system*, 2nd edition. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1993.
34. Kolles, H., Niedermayer, I., Schmitt, C., Henn, W., Feld, R., Steudel, W. I., Zang, K. D., Feiden, W.: Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochir (Wien)*, *137*: 174-181, 1995.
35. Raskin, R. E.: An atypical spinal meningioma in a dog. *Vet Pathol*, *21*: 538-540, 1984.
36. Schmahl, W.: Pathobiologische Aspekte der geringen extrakraniellen Metastasierungsfähigkeit von Tumoren des Zentralnervensystems. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, *108*: 70-72, 1995.
37. Schulman, F. Y., Ribas, J. L., Carpenter, J. L., Sisson, A. F., Lecouteur, R. A.: Intracranial meningioma with pulmonary metastasis in three dogs. *Vet Pathol*, *29*: 196-202, 1992.
38. Geib, L. W.: Ossifying meningioma with extracranial metastasis in a dog. *Path vet*, *3*: 247-254, 1966.
39. Elledge, S. J.: Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, *274*: 1664-1672, 1996.

40. Liebich, H.-G.: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Auflage. Stuttgart: Schattauer, 2004.
41. Cordon-Cardo, C.: Mutation of cell cycle regulators. *Am J Pathol*, *147*: 545-560, 1995.
42. Sherr, J. C.: Cancer Cell Cycles. *Science*, *274*: 1672-1677, 1996.
43. Wagener, C.: Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren, 2. Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 1999.
44. Nurse, P.: A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, *100*: 71-78, 2000.
45. Hanahan, D., Weinberg, R. A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*: 57-70, 2000.
46. Slauson, D. O.: Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology, 3rd edition. St. Louis: Mosby, Inc., 2002.
47. Hartwell, L. H., Weinert, T. A.: Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, *246*: 629-634, 1989.
48. Morgan, D. O.: Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *13*: 261-291, 1997.
49. Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. J.: Surfing the p53 network. *Nature*, *408*: 307-310, 2000.
50. Prives, C.: Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, *95*: 5-8, 1998.
51. Taylor, W. R., Stark, G. R.: Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, *20*: 1803-1815, 2001.
52. Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T.: Robbins pathologic basis of disease, 6th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.
53. van Diest, P. J., Brugal, G., Baak, J. P. A.: Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*, *51*: 716-724, 1998.
54. Brown, D. C., Gatter, K. C.: Ki67 protein: the immaculate deception ? *Histopathology*, *40*: 2-11, 2002.
55. Madewell, B. R.: Cellular proliferation in tumors: A review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Intern Med*, *15*: 334-340, 2001.
56. Hall, P. A. Die Abschätzung von Zellproliferationsmarkern mit besonderer Berücksichtigung von Ki-67 und PCNA. pp. 1-8. London: Division of Histopathology, UMDS St. Thomas's Campus, 1993.

57. Yu, C. C.-W., Woods, A. L., Levison, D. A.: The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem J*, *24*: 121-131, 1992.
58. Hees, H., Sinowatz, F.: *Histologie*, 2. Auflage. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 1992.
59. Hall, P. A., Levison, D. A.: Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*, *43*: 184-192, 1990.
60. Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S.: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*, *161*: 1961-1971, 2002.
61. Ploton, D.: Structure and molecular organization of the nucleolus. *Zentralbl Pathol*, *140*: 3-6, 1994.
62. Knippers, R.: *Molekulare Genetik*, 8. Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 2001.
63. Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F., Adnet, J. J.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*, *18*: 5-14, 1986.
64. Hufnagl, P., Guski, H., Schulz, H.-J.: Measuring of AgNORs using image analysis. *Zentralbl Pathol*, *140*: 31-35, 1994.
65. Martin, H.: Die Bedeutung der AgNOR-Analyse bei malignen Tumoren. *Zentralbl Pathol*, *140*: 15-22, 1994.
66. Kiupel, M., Teske, E., Bostock, D.: Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol*, *36*: 292-300, 1999.
67. Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E. M.: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immun*, *121*: 2228-2234, 1978.
68. Bravo, R., Celis, J. E.: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol*, *84*: 795-802, 1980.
69. Kelman, Z.: PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, *14*: 629-640, 1997.
70. Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, A. L., Yu, C. C.-W., Kellock, D. B., Watkins, J. A., Barnes, D. M., Gillett, C. E., Camplejohn, R., Dover, R., Waseem, N. H., Lane, D. P.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, *162*: 285-294, 1990.

71. Krishna, T. S. R., Kong, X.-P., Gary, S., Burgers, P. M., Kuriyan, J.: Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 79: 1233-1243, 1994.
72. Kelman, Z., O'Donnel, M.: Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Res*, 23: 3613-3620, 1995.
73. Wyman, C., Botchan, M.: DNA replication. A familiar ring to DNA polymerase processivity. *Curr Biol*, 5: 334-337, 1995.
74. Maga, G., Hübscher, U.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, 116: 3051-3060, 2003.
75. Siitonen, S., Kallioniemi, O., Isola, J.: Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry using monoclonal antibody 19A2 and new antigen retrieval technique has prognostic impact in archival paraffin embedded node-negative breast cancer. *Am J Pathol*, 142: 1081-1089, 1993.
76. Wolf, H., Dittrich, K.: Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*, 40: 1269-1273, 1992.
77. Bravo, R., Macdonald-Bravo, H.: Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: associated with DNA replication sites. *J Cell Biol*, 105: 1549-1554, 1987.
78. McCormick, D., Hall, P. A.: The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, 21: 591-594, 1992.
79. Toschi, L., Bravo, R.: Changes in cyclin/PCNA distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol*, 107: 1623-1628, 1988.
80. Celis, J. E., Madson, P.: Increased nuclear PCNA/cyclin antigen staining of non-S phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett*, 209: 277-283, 1986.
81. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996.
82. Waseem, N. H., Lane, D. P.: Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci*, 96: 121-129, 1990.
83. Warbrick, E.: The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays*, 22: 997-1006, 2000.

84. Löffler, G., Petrides, P. E.: *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1997.
85. Waga, S., Bauer, G., Stillman, B.: Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J Biol Chem*, 269: 10923-10934, 1994.
86. Bae, S. H., Bae, K. H., Kim, J. A., Seo, Y. S.: RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature*, 412: 456-461, 2001.
87. Tom, S., Henricksen, L. A., Bambara, R. A.: Mechanism whereby Proliferating Cell Nuclear Antigen stimulates Flap Endonuclease 1. *J Biol Chem*, 275: 10498-10505, 2000.
88. Clark, A. B., Valle, F., Drotschmann, K., Garry, R. K., Kunkel, T. A.: Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *J Biol Chem*, 275: 36498-36501, 2000.
89. Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hübscher, U., Egly, J. M., Wood, R. D.: Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, 80: 859-868, 1995.
90. Hübscher, U., Maga, G., Spadari, S.: Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, 71: 133-163, 2002.
91. Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnel, M., Kuriyan, J.: Structure of the c-terminal region of p21WAF/CIP1 complexed with human DNA. *Cell*, 87: 297-306, 1996.
92. Xiong, Y., Zhang, H., Beach, D.: D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*, 71: 505-514, 1992.
93. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., Stillman, B.: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369: 574-578, 1994.
94. Shibahara, K., Stillman, B.: Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1 coupled inheritance of chromatin. *Cell*, 96: 575-585, 1999.
95. Hasan, S., Hassa, P. O., Imhof, R., Hottiger, M. O.: Transcription coaktivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature*, 410: 387-391, 2001.

96. Iida, T., Suetake, I., Tajima, S., Morioka, H., Ohta, S., Obuse, S., Tsurimoto, T.: PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells*, 7: 997-1007, 2002.
97. Levine, A. J.: p53, the cellular gatekeeper of growth and division. *Cell*, 88: 323-331, 1997.
98. Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, A. G., Hoffman, B., Liebermann, D. M.: Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 and Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem*, 275: 16810-16819, 2000.
99. Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31: 13-20, 1983.
100. Scholzen, T., Gerdes, J.: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182: 311-322, 2000.
101. Schmidt, M. H. H., Broll, R., Bruch, H.-P., Duchrow, M.: The proliferation marker pKi-67 becomes masked to MIB-1 staining after expression of its tandem repeats. *Histochem Cell Biol*, 118: 415-422, 2002.
102. Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H., Key, G., Flad, H.-D., Gerdes, J.: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*, 123: 513-522, 1993.
103. Chelsky, D., Ralph, R., Jonak, G.: Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol*, 9: 2487-2492, 1989.
104. Dingwall, C., Laskey, R. A.: Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biochem Sci*, 16: 478-481, 1991.
105. Silver, P. A.: How proteins enter the nucleus. *Cell*, 64: 489-497, 1991.
106. Duchrow, M., Schlüter, C., Wohlenberg, C., Flad, H.-D., Gerdes, J.: Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif*, 29: 1-12, 1996.
107. Wu, Y., Luo, H., Kanaan, N., Wu, J.: The proteasome controls the expression of a proliferation-associated nuclear antigen Ki-67. *J Cell Biochem*, 76: 596-604, 2000.

108. Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U., Stein, H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, *133*: 1710-1715, 1984.
109. Starborg, M., Gell, K., Brundell, E., Höög, C.: The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nuclear and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci*, *109*: 143-153, 1996.
110. Braun, N., Papadopoulos, T., Müller-Hermelink, H. K.: Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, *56*: 25-33, 1988.
111. Bruno, S., Darzynkiewicz, Z.: Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*, *25*: 31-40, 1992.
112. Lopez, F., Belloc, F., Lacombe, F., Dumain, P., Reiffers, J., Bernard, P., Boisseau, M. R.: Modalities of synthesis of Ki-67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*, *12*: 42-49, 1991.
113. du Manoir, S., Guillaud, P., Camus, E., Seigneurin, D., Brugal, G.: Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*, *12*: 455-463, 1991.
114. Bruno, S., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z.: Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry*, *13*: 496-501, 1992.
115. Heidebrecht, H. J., Buck, F., Haas, K., Wacker, H.-H., Parwaresch, R.: Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif*, *29*: 413-425, 1996.
116. Kill, I. R.: Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus: evidence of a fibrillarin-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*, *109*: 1253-1263, 1996.
117. Bridger, J. M., Kill, I. R., Lichter, P.: Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res*, *6*: 13-24, 1998.

118. van Dierendonck, J. H., Keijzer, R., Velde van de, C. J., Cornelisse, C. J.: Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 49: 2999-3006, 1989.
119. Verheijen, R., Kuijpers, H. J., van Driel, R., Beck, J. L., Dierendonck van, J. H., Brakenhoff, G. J., Ramaekers, F. C.: Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci*, 92: 531-540, 1989.
120. MacCallum, D. E., Hall, P. A.: The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol*, 190: 537-544, 2000.
121. Plaat, B., Kole, A., Mastik, M., Hockstra, H., Molenaar, W., Vaalburg, W.: Protein synthesis rate measured with L-(1-11C)tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody detected proliferation in human soft tissue sarcomas. *Eur J Nucl Med*, 26: 328-332, 1999.
122. Morimura, T., Kitz, K., Budka, H.: In situ analysis of cell kinetics in human brain tumors. *Acta Neuropathol*, 77: 276-282, 1989.
123. Homepage der FACS und Array Core Facility der Universität Mainz, <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>. Vol. 2004.
124. Siegers, H. P., Zuber, P., Hamou, M.-F., Melle van, G. D., Tribolet de, N.: The implications of the heterogeneous distribution of Ki-67 labelled cells in meningiomas. *Br J Neurosurg*, 3: 101-108, 1989.
125. Sendler, A., Gilbertz, K.-P., Becker, I., Mueller, J., Berger, U., Fink, U., Beuningen van, D., Siewert, J. R.: Proliferation kinetics and prognosis in gastric cancer after resection. *Eur J Cancer*, 37: 1635-1641, 2001.
126. Bergström, C., Begg, A., Palmqvist, R., Waites, A., Denekamp, J.: Labelling indices in human tumours: to apply corrections or not - that is the question. *Br J Cancer*, 80: 1635-1643, 1999.
127. Knudson, A. G.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68: 820-823, 1971.
128. Knudson, A. G.: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*, 45: 1437-1443, 1985.

129. Quon, K. C., Berns, A.: Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes Dev*, *15*: 2917-2921, 2001.
130. Eliyahu, D., Goldfinger, N., Pinhasi-Kimhi, O., Shaulsky, G., Skurnik, Y., Arai, N., Rotter, V., Oren, M.: Meth A fibrosarcoma cell express two transforming mutant p53 species. *Oncogene*, *3*: 313-321, 1988.
131. Lane, D. P.: p53, guardian of the genome. *Nature*, *358*: 15-16, 1992.
132. Venkatachalam, S., Shi, Y.-P., Jones, S. N., Vogel, H., Bradley, A., Pinkel, D., Donehower, L. A.: Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J*, *17*: 4657-4667, 1998.
133. Sulis, M. L., Parsons, R.: PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol*, *13*: 478-483, 2003.
134. Linzer, D. I., Levine, A. J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, *17*: 43-52, 1979.
135. Lane, D. P., Crawford, L. V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, *278*: 261-263, 1979.
136. Finlay, C. A., Hinds, P. W., Levine, A. J.: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, *57*: 1083-1093, 1989.
137. Ko, L. J., Prives, C.: p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, *10*: 1054-1072, 1996.
138. Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Tuinen van, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R., Vogelstein, B.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, *244*: 217-221, 1989.
139. Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K. V., Vogelstein, B.: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, *249*: 912-915, 1990.
140. Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F. J., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A., al., e.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, *250*: 1233-1238, 1990.

141. Chu, L. L., Rutteman, G. R., Kong, J. M. C., Ghahremani, M., Schmeing, M., Misdorp, W., Garderen van, E., Pelletier, J.: Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Res Treat*, 50: 11-25, 1998.
142. Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., Mak, T. W.: Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 8: 317-325, 2001.
143. Carr, A. M.: Cell cycle: piecing together the p53 puzzle. *Science*, 287: 1765-1766, 2000.
144. Nagashima, G., Aoyagi, M., Yamamoto, M., Yamamoto, S., Wakimoto, H., Ohno, K., Yamamoto, K., Hirakawa, K.: p53 overexpression and proliferative potential in malignant meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 141: 53-61, 1999.
145. Wang, J.-L., Zhang, Z.-J., Hartman, M., Smits, A., Westermarck, B., Muhr, C., Nister, M.: Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction / single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer*, 64: 223-228, 1995.
146. Ellison, D. W., Lunec, J., Gallagher, P. J., Steart, P. V., Jaros, E., Gatter, K. C.: Accumulation of wild-type p53 in meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 21: 136-142, 1995.
147. Weber, R. G., Bostrom, J., Wolter, M., Baudis, M., Collins, V. P., 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 USA*, 94: 14719-14724, 1997.
148. Ohgaki, H., Eibl, R. H., Schwab, M., Reichel, M. B., Mariani, L., Gehring, M., Petersen, I., Höll, T., Wiestler, O. D., Kleihues, P.: Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinogen*, 8: 74-80, 1993.
149. Joachim, T., Ram, Z., Rappaport, Z. H., Simon, M., Schramm, J., Wiestler, O. D., Deimling von, A.: Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. *Int J Cancer*, 94: 218-221, 2001.

150. Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., Vousden, K. H.: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387: 299-303, 1997.
151. Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D., Vogelstein, B.: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358: 80-83, 1992.
152. Harris, C. C., Hollstein, M.: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 329: 1318-1326, 1993.
153. Nasir, L., Burr, P. D., McFarlane, S. T., Gault, E., Thompson, H., Argyle, D. J.: Cloning, sequence analysis and expression of the cDNAs encoding the canine and equine homologues of the mouse double minute 2 (*mdm2*) proto-oncogene. *Cancer Lett*, 152: 9-13, 2000.
154. Wynford-Thomas, D.: p53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol*, 166: 329-330, 1992.
155. Hall, P. A., Lane, D. P.: p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?: - revisited! *J Pathol*, 172: 1-4, 1994.
156. Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A., Dixon, J. E.: Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*, 87: 361-364, 1996.
157. Li, D. M., Sun, H.: TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*, 57: 2124-2129, 1997.
158. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittman, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., Parsons, R.: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275: 1943-1947, 1997.
159. Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K. A., Lin, H., Lignon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H. F., Tavtigian, S. V.: Identification of a candidate gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced tumours. *Nat Genet*, 15: 356-362, 1997.

160. Cantley, L. C., Neel, B. G.: New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, *96*: 4240-4245, 1999.
161. Lee, J.-O., Yang, H., Georgescu, M.-M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P., Paveletich, N. P.: Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, *99*: 323-334, 1999.
162. Das, S., Dixon, J. E., Cho, W.: Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci USA*, *100*: 7491-7496, 2003.
163. Yamada, K. M., Araki, M.: Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci*, *114*: 2375-2382, 2001.
164. Craven, S. E., Brecht, D. S.: PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell*, *93*: 495-498, 1998.
165. Wu, Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q., Lasky, L. A.: Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem*, *275*: 21477-21485, 2000.
166. Wu, X., Hepner, K., Castelino-Prabhu, S., Do, D., Kaye, M. B., Yuan, X. J., Wood, J., Ross, C., Sawyers, C. L., Whang, Y. E.: Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, *97*: 4233-4238, 2000.
167. Goberdhan, D. C. I., Wilson, C.: PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum Mol Genet*, *12*: R239-R248, 2003.
168. Tamura, M., Gu, J., Tran, H., Yamada, K. M.: PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst*, *91*: 1820-1828, 1999.
169. Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D. B., Perera, S., Roberts, T. M., Sellers, W. R.: Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, *96*: 2110-2115, 1999.
170. Stambolic, V., Suzuki, A., Pompa de la, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., Mak, T. W.: Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, *95*: 29-39, 1998.

171. Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., Y., C.-H. P.: Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 134: 793-799, 1996.
172. Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T., Cance, W. G.: Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*, 55: 2752-2755, 1995.
173. Tamura, M., Gu, J., Danen, E. H., Takino, T., Miyamoto, S., Yamada, K. M.: PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, 274: 20693-20703, 1999.
174. Tamura, M., Gu, J., Takino, T., Yamada, K. M.: Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res*, 59: 442-449, 1999.
175. Huang, J., Kontos, C. D.: PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem*, 277: 10760-10766, 2002.
176. Harada, H., Andersen, J. S., Mann, M., Terada, N., Korsmeyer, S. J.: p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 9666-9670, 2001.
177. Ginn-Pease, M. E., Eng, C.: Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res*, 63: 282-286, 2003.
178. Gimm, O., Perren, A., Weng, L.-P., Marsh, D. J., Yen, J. J., Ziebold, U., Gil, E., Hinze, R., Delbridge, L., Lees, J. A., Mutter, G. L., Robinson, B. G., Komminoth, P., Dralle, H., Eng, C.: Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol*, 156: 1693-1700, 2001.
179. Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H. H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A. D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R. D., Liu, X., Wu, H.: PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, 3: 117-130, 2003.
180. Mutter, G. L.: PTEN, a protean tumor suppressor. *Am J Pathol*, 158: 1895-1898, 2001.

181. Perren, A., Weng, L.-P., Boag, A. H., Ziebold, U., Thakore, K., Dahia, P. L. M., Komminoth, P., Lees, J. A., Mulligan, L. M., Mutter, G. L., Eng, C.: Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol*, 155: 1253-1260, 1999.
182. Whang, Y. E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R. E., Tran, C., Vessella, R. L., Said, J. W., Isaacs, W. B., Sawyers, C. L.: Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5246-5250, 1998.
183. Zhou, X.-P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M. J., Eng, C.: Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol*, 157: 1123-1128, 2000.
184. Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H.: PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57: 684-689, 1998.
185. Bostrom, J., Cobbers, J. M., Wolter, M., Tabatabai, G., Weber, R. G., Lichter, P., Collins, V. P., Reifenberger, G.: Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res*, 58: 29-33, 1998.
186. Peters, N., Wellenreuther, R., Rollbrocker, B., Hayashi, Y., Meyer-Puttlitz, B., Duerr, E.-M., Lenartz, D., Marsh, D. J., Schramm, J., Wiestler, O. D., Parsons, R., Eng, C.: Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 24: 3-8, 1998.
187. Marshall, C. J.: Tumor suppressor genes. *Cell*, 64: 313-326, 1991.
188. Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., White, R. L.: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305: 779-784, 1983.
189. Vrieling, H.: Mitotic maneuvers in the light. *Nature Genetics*, 28: 101-102, 2001.
190. Sidransky, D.: Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science*, 278: 1054-1058, 1997.

191. Mao, L., Schoenberg, M. P., Scicchitano, M., Erozan, Y. S., Merlo, A., Schwab, D., Sidransky, D.: Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science*, 271: 659-662, 1996.
192. Koreth, J., O' Leary, J. J., McGee, J. O. D.: Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol*, 178: 239-248, 1996.
193. Tautz, D.: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 17: 6463-6471, 1989.
194. Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T.: Strategies for microsatellite isolation. *Mol Ecol*, 11: 1-16, 2002.
195. Ostrander, E. A., Sprague Jr., G. F., Rine, J.: Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics*, 16: 207-213, 1993.
196. Levinson, G., Gutman, G. A.: Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*, 4: 203-221, 1987.
197. Kräußlich, H., Brem, G.: Tierzucht und allgemeine Landwirtschaftslehre für Tiermediziner. Stuttgart: Enke, 1997.
198. Dolf, G. Zytogenetik und Molekulargenetik in der Tierzucht. Universität Bern http://www.vetmed.unibe.ch/studvet/download/year23/zootechnik/Zytogenetik%20und%20Zyto-%20und%20Molekgenetik_Dolf_23JK_SS01.pdf, 2001.
199. Tsuchida, S., Ikemoto, S., Tagawa, M.: Microsatellite polymorphism in intron 14 of the canine BRCA1 gene. *J Vet Med Sci*, 63: 479-481, 2001.
200. Nicholl, D. S. T.: Gentechnische Methoden, 2. Auflage. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
201. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.
202. Rohrbach, H., Haas, C. J., Baretton, G. B., Hirschmann, A., Diebold, J., Behrendt, R.-P., Löhrs, U.: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in prostatic carcinomas: comparison of primary tumors, and of corresponding recurrences after androgen-deprivation therapy and lymph node metastases. *Prostate*, 40: 20-27, 1999.

203. Zankl, H., Zang, K. D.: Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. *Humangenetik*, *14*: 167-169, 1972.
204. Seizinger, B. R., de la Monte, S., Atkins, L., Gusella, J. F., Martuza, R. L.: Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci USA*, *84*: 5419-5423, 1987.
205. Rempel, S. A., Schwechheimer, K., Davis, R. L., Cavenee, W. K., Rosenblum, M. L.: Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res*, *53*: 2386-2392, 1993.
206. Rutledge, M. H., Sarrazin, J., Rangaratnam, S., Phelan, C. M., Twist, E., Merel, P., Delattre, O., Thomas, G., Nordenskjold, M., Collins, V. P., Dumanski, J. P., Rouleau, G. A.: Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet*, *6*: 180-184, 1994.
207. Wellenreuther, R., Kraus, J. A., Lenartz, D., Menon, A. G., Schramm, J., Louis, D. N., Ramesh, V., Gusella, J. F., Wiestler, O. D., Deimling von, A.: Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol*, *146*: 827-832, 1995.
208. Simon, M., Deimling von, A., Larson, J. J., Wellenreuther, R., Kaskel, P., Waha, A., Warnick, R. E., Tew Jr., J. M., Menon, A. G.: Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res*, *55*: 4696-4701, 1995.
209. Menon, A. G., Rutter, J. L., Sattel von, J. P., Synder, H., Murdoch, C., Blumenfeld, A., Martuza, R. L., Deimling von, A., Gusella, J. F., Houseal, T. W.: Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative "tumor progression" locus. *Oncogene*, *14*: 611-616, 1997.
210. Sulman, E. P., White, P. S., Brodeur, G. M.: Genomic annotation of the meningioma tumor suppressor locus on chromosome 1p34. *Oncogene*, *23*: 1014-1020, 2004.
211. Sobrido, M. J., Pereira, C. R., Barros, F., Forteza, J., Carracedo, A., Lema, M.: Low frequency of replication errors in primary nervous system tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *69*: 369-375, 2000.

212. Alonso, M., Hamelin, R., Kim, M., Porwancher, K., Sung, T., Parhar, P., Miller, D. C., Newcomb, E. W.: Microsatellite instability occurs in distinct subtypes of pediatric but not adult central nervous system tumors. *Cancer Res*, 61: 2124-2128, 2001.
213. Brentnall, T. A.: Microsatellite Instability. *Am J Pathol*, 147: 561-563, 1995.
214. Kinzler, K. W., Vogelstein, B.: Lessons from hereditary cancer. *Cell*, 87: 159-170, 1996.
215. Pykett, M. J., Murphy, M., Harnish, P. R., George, D. L.: Identification of a microsatellite instability phenotype in meningiomas. *Cancer Res*, 54: 6340-6343, 1994.
216. HUM-MOLGEN: Dog genome assembled <http://hum-molgen.org>. 2004.
217. Fischer, P. E., Holmes, N. G., Dickens, H. F., Thomas, R., Binns, M. M., Nacheva, E. P.: The application of FISH techniques for physical mapping in the dog (*Canis familiaris*). *Mamm Genome*, 7: 37-41, 1996.
218. Hsu, S.-M., Raine, L., Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29: 577-580, 1981.
219. Ladon, D., Schelling, C., Dolf, G., Switonski, M., Schläpfer, J.: The highly polymorphic canine microsatellite ZuBeCa6 is localized on chromosome 5q12-q13. *Anim Genet*, 29: 460-477, 1998.
220. Guyon, R., Lorentzen, T. D., Hitte, C., Kim, L., Cadieu, E., Parker, H. G., Quignon, P., Lowe, J. K., Renier, C., Gelfenbeyn, B., Vignaux, F., DeFrance, H. B., Gloux, S., Mahairas, G. G., Andre, C., Galibert, F., Ostrander, E. A.: A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 5296-5301, 2003.
221. Tiret, L., Kessler, J. L., Bentolila, S., Faure, S., Bach, J. M., Weissenbach, J., Panthier, J. J.: Characterization and mapping of canine polymorphic markers. *Anim Genet*, 30: 475-476, 1999.

222. Breen, M., Jouquand, S., Renier, C., Mellersh, C. S., Hitte, C., Holmes, N. G., Cheron, A., Suter, N., Vignaux, F., Bristow, A. E., Priat, C., McCann, E., Andre, C., Boundy, S., Gitsham, P., Thomas, R., Bridge, W. L., Spriggs, H. F., Ryder, E. J., Curson, A., Sampson, J., Ostrander, E. A., Binns, M. M., Galibert, F.: Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid / linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Res*, *11*: 1784-1795, 2001.
223. Werner, P., Raducha, M. G., Prociuk, U., Henthorn, P. S., Patterson, D. F.: Physical and linkage mapping of human chromosome 17 loci to dog chromosomes 9 and 5. *Genomics*, *42*: 74-82, 1997.
224. Roggendorf, W., Schuster, T., Peiffer, J.: Proliferative potential of meningiomas determined with the monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol*, *73*: 361-364, 1987.
225. Hsu, D. W., Pardo, F. S., Efird, J. T., Linggood, R. M., Hedley-Whyte, E. T.: Prognostic significance of proliferative indices in meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, *53*: 247-255, 1994.
226. Hakin-Smith, V., Battersby, R. D., Maltby, E. L., Timperley, W. R., Royds, J. A.: Elevated p53 expression in benign meningiomas protects against recurrence and may be indicative of senescence. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *27*: 40-49, 2001.
227. Moller, M.-L., Braendstrup, O.: No prediction of recurrence of meningiomas by PCNA and Ki-67 immunohistochemistry. *J Neurooncol*, *34*: 241-246, 1997.
228. Theon, A. P., Metzger, L., Griffey, S.: In situ analysis of cellular proliferation in canine, feline and equine tumors by immunohistochemistry: a comparison of bromodeoxyuridine, proliferating cell nuclear antigen, and interchromatin-associated antigen immunostaining techniques. *J Vet Diagn Invest*, *6*: 453-457, 1994.
229. Kayaselcuk, F., Zorludemir, S., Gümürdülü, D., Zeren, H., Erman, T.: PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *J Neurooncol*, *57*: 115-121, 2002.
230. Takeuchi, H., Kubota, T., Kabuto, M., Kitai, R., Nozaki, J.-i., Yamashita, J.: Prediction of recurrence in histologically benign meningiomas: proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemical study. *Surg Neurol*, *48*: 501-506, 1997.

231. Perry, A., Stafford, S. L., Scheithauer, B. W., Suman, V. J., Lohse, M. L.: The prognostic significance of MIB-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. *Cancer*, 82: 2262-2269, 1998.
232. Karamitopoulou, E., Perentes, E., Tolnay, M., Probst, A.: Prognostic significance of MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Hum Pathol*, 29: 140-145, 1998.
233. Amatya, V. J., Takeshima, Y., Sugiyama, K., Kurisu, K., Nishisaka, T., Fukuhara, T., Inai, K.: Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol*, 32: 970-975, 2001.
234. Niedermayer, I., Kolles, H., Henn, W., Zang, K. D., Steudel, W.-I., Feiden, W.: Meningeome - Klassifikation und Grading. *Pathologe*, 18: 353-358, 1997.
235. Higgins, R. J., Lecouteur, R. A., Vernau, K. M., Sturges, B. K., Obradovich, J. E., Bollen, A. W.: Granular cell tumor of the canine central nervous system: two cases. *Vet Pathol*, 38: 620-627, 2001.
236. Barnhart, K. F., Edwards, J. F., Storts, R. W.: Symptomatic granular cell tumor involving the pituitary gland in a dog: a case report and review of the literature. *Vet Pathol*, 38: 332-336, 2001.
237. Feiden, W., Institut für Neuropathologie Universitätsklinikum des Saarlandes: Persönliche Mitteilung. 2004.
238. Ohkoudo, M., Sawa, H., Hara, M., Saruta, K., Aiso, T., Ohki, R., Yamamoto, H., Maemura, E., Shiina, Y., Fujii, M., Saito, I.: Expression of p53, MDM2 protein and Ki-67 antigen in recurrent meningiomas. *J Neurooncol*, 38: 41-49, 1998.
239. Matsuno, A., Nagashima, T., Matsuura, R., Tanaka, H., Hirakawa, M., Murakami, M., Tamura, A., Kirino, T.: Correlation between MIB-1 staining index and the immunoreactivity of p53 protein in recurrent and non-recurrent meningiomas. *Am J Clin Pathol*, 106: 776-781, 1996.
240. Chozick, B. S., Benzil, D. L., Stopa, E. G., Pezzullo, J. C., Knuckey, N. W., Epstein, M. H., Finkelstein, S. D., Finch, P. W.: Immunohistochemical evaluation of erbB-2 and p53 protein expression in benign and atypical human meningiomas. *J Neurooncol*, 27: 117-126, 1996.

241. Novocastra Laboratories Ltd UK: Datenblatt zum polyklonalen p53 Antikörper (NCL-p53-CM1). 2002.
242. Mashiyama, S., Murakami, Y., Yashimoto, T., Sekiya, T., Hayashi, K.: Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*, 6: 1313-1318, 1991.
243. Patnaik, A. K.: Histologic and immunohistochemical studies of granular cell tumors in seven dogs, three cats, one horse, and one bird. *Vet Pathol*, 30: 176-185, 1993.
244. Porter, P. L., Gown, A. M., Kramp, S. G., Coltrera, M. D.: Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J Pathol*, 140: 145-153, 1992.
245. Rungsipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N., Hayashi, T.: Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci*, 61: 27-32, 1999.
246. Noll, S., Schaub-Kuhnen, S.: Praxis der Immunhistochemie, 1. Auflage. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2000.
247. Levine, R. A., Forest, T., Smith, C.: Tumor suppressor PTEN is mutated in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Vet Pathol*, 39: 372-378, 2002.
248. Koenig, A., Bianco, S. R., Fosmire, S., Wojcieszyn, J., Modiano, J. F.: Expression and significance of p53, Rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Vet Pathol*, 39: 458-472, 2002.
249. Staal, F. J. T., van der Luijt, R. B., Baert, M. R. M., van Drunen, J., van Bakel, H., Peters, E., de Valk, I., van Amstel, H. K. P., Taphoorn, M. J. B., Jansen, G. H., van Veelen, C. W. M., Burgering, B., Staal, G. E. J.: A novel germline mutation of PTEN associated with brain tumours of multiple lineages. *Br J Cancer*, 86: 1586-1591, 2002.
250. Sano, T., Lin, H., Chen, X., Langford, L. A., Koul, D., Bondy, M. L., Hess, K. R., Myers, J. N., Hong, Y.-K., Yung, W. K. A., Steck, P. A.: Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res*, 59: 1820-1824, 1999.
251. Cell Signaling Technology Inc, B., MA, USA: Datenblatt zum monoklonalen PTEN Antikörper (26H9) #9556. 2002.

252. Dahia, P. L. M., Aguiar, R. C. T., Alberta, J., Kum, J. B., Caron, S., Sill, H., Marsh, D. J., Ritz, J., Freedman, A., Stiles, C., Eng, C.: PTEN is inversely correlated with the survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet*, 8: 185-193, 1999.
253. Mihaila, D., Gutierrez, J. A., Rosenblum, M. L., Newsham, I. F., Bögler, O., Rempel, S. A.: Meningiomas: Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in tumor progression and the delineation of four regions of chromosomal deletion in common with other cancers. *Clin Cancer Res*, 9: 4435-4442, 2003.
254. Müllhardt, C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 1. Auflage. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag, 1999.
255. Greer, C. E., Lund, J. K., Manos, M. M.: PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods and Applications*, 1: 46-50, 1991.
256. Doyle, C. T., O' Leary, J. J.: The search for the universal fixative or "magic juice". *J Pathol*, 166: 331-332, 1992.
257. Müller, H.-J.: *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2001.
258. Hauge, X. Y., Litt, M.: A study of the origin of "shadow bands" seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Hum Mol Genet*, 2: 411-415, 1993.
259. Newton, C. R., Graham, A.: *PCR*, 2. Auflage. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1994.

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>avidin-biotin-complex</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre oder kopierte DNA
cm	Zentimeter
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat (umfasst: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HE	Hämalaun-Eosin
HPF	<i>high power field</i> (400fache Gesamtvergrößerung)
i.d.R.	in der Regel
incl.	inklusive
kDa	kilo-Dalton
li.	links
log	dekadischer Logarithmus
LOH	Verlust der Heterozygotie (<i>loss of heterozygosity</i>)
M	molar (Mol/l)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Normalität von Lösungen
PAS	<i>periodic acid Schiff's reaction</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten</i>
re.	rechts
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s.o.	siehe oben
SO ₂	Schwefeldioxid
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
u.a.	unter anderem

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

u.a.m.	und andere/anderes mehr
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
V	Volt
Vergr.	Vergrößerung
W	Watt
w/v	Masse/Volumen (<i>weight/volume</i>)
x	in Färbeprotokollen: „mal“
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Schmahl danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen, sowie für inhaltliche Anregungen und konstruktive Kritik.

Ein sehr herzlicher Dank gilt Frau Dr. Birgit Stierstorfer für die kompetente Betreuung dieser Arbeit und die jederzeit gewährte, engagierte Unterstützung.

Allen Beschäftigten des Lehrstuhls, insbesondere Frau Györgyi Farkas, Frau Britta Janowetz, Frau Petra Mühlenhardt und Frau Karin Stingl, möchte ich für ihre wertvolle Unterstützung und das gute Arbeitsklima verbindlich danken.

Für die statistische Beratung danke ich Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn vom Institut für Tierzucht und Herrn S. Krieger vom Institut für Statistik der LMU.

Herrn PD Dr. J. Maierl vom Institut für Tieranatomie I danke ich für den großzügig gewährten Zugang zu Digitalkamera und Mikroskop des Hauses.

Für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts und für die Unterstützung bei der Erstellung der Graphiken sei Frau Dr. Annette Bruder herzlich gedankt.

Lebenslauf

Name: Dirk Janik

Geburtsdatum: 11.03.1971

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Vater: Dr. med. Ingomar Janik, 08.05.1940, Hamburg
Mutter: Dr. med. Gertraude Janik, geb. Stein, 02.07.1936, Weimar

Geschwister: Christina Janik, 24.12.1968

Schulbildung: 1977-1981 Grundschule am Ohkamp, Hamburg
1981-1991 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg

Schulabschluss: 14.06.1991 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung: 1992-1994 Ausbildung zum Medizinisch-Technischen-
Radiologieassistenten am A.K. St. Georg, Hamburg

Wehrdienst: 1994-1995 Sanitätsdienst, Itzehoe

Studium: 1995-2002 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität, München

Tierärztliche Prüfung: 10.04.2002

Approbation: 05.07.2002

Promotion: seit Juli 2002 Doktorand am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie
und Neuropathologie, Institut für Tierpathologie der Ludwig-
Maximilians-Universität, München