

---

Aus dem Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Dr. h.c. Ch. Mawrin

**Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in Meningeomen:  
Untersuchungen zur Rolle von E-Cadherin und E-Cadherin-  
assoziierter Transkriptionsfaktoren**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Maren Louise Anna Wallesch  
aus Ulm  
Magdeburg, 14.08.2017

---

### Bibliographische Beschreibung:

Wallesch, Maren

Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in Meningeomen: Untersuchungen zur Rolle E-Cadherin-assoziiierter Transkriptionsfaktoren. – 2017. 83Bl., 10 Abb., 5 Tab.,

### Kurzreferat

Als Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) wird eine Vielzahl biochemischer Prozesse bezeichnet, die es der ortsständigen und polaren epithelialen Zelle ermöglichen, mesenchymale Eigenschaften und ein migratorisches Potential anzunehmen. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und der Organentwicklung. Zunehmende Hinweise legen außerdem eine fundamentale Rolle der EMT in der Tumorbilogie nahe, vor allem in der Formation von Metastasen, der Tumorprogression sowie der Resistenz gegen Chemotherapeutika. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen EMT und Tumorbilogie konnten bereits für verschiedene Tumoren, wie etwa Kolonkarzinome gezeigt werden. Um eine mögliche Rolle der EMT in der Biologie humaner Meningeome aufzuzeigen, wurde die Expression von E-Cadherin, einem Protein der Adherens Junctions, und E-Cadherin-assoziiierter Transkriptionsfaktoren sowie dem Tight Junction assoziierten Protein Zonula-Occludens-1 unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen untersucht. Ferner wurde die Möglichkeit, das EMT-assoziierte Expressionsprofil von Meningeomzellen durch den Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) zu beeinflussen, geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede zwischen Meningeomen unterschiedlicher WHO-Grade gibt, insbesondere was die Expression des Glykoproteins E-Cadherin betrifft. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Expression der untersuchten EMT-Marker in Meningeomen mit malignen Charakteristika von der Vergleichsgruppe unterscheidet und, dass diese veränderten Expressionsmuster in wesentlichen Teilen mit einer EMT in Meningeomen vereinbar sind.

### **Schlüsselwörter**

EMT, Meningeom, TGF- $\beta$ , E-Cadherin, Slug, Snail, Twist, NF2

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	6
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	7
<b>1 Allgemeiner Teil</b>	8
1.1 Meningeome	8
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	11
1.1.2 Lokalisation	12
1.1.3 Risikofaktoren	13
1.1.4 Genetik	14
1.2 Die Epithelial-Mesenchymale Transition	15
1.2.1 Kennzeichen der EMT und die Rolle von E-Cadherin	16
1.2.3 Funktionelle Bedeutung der EMT	18
<b>2 Zielsetzung</b>	19
<b>3 Material</b>	20
3.1 Tumorproben	20
3.2 Zellkulturlinien	20
3.3 Geräte	20
3.4 Verbrauchsmaterial	22
3.5 Chemikalien und Reagenzien	23
3.6 Antikörper	26
3.7 Sekundärantikörper	26
3.8 Puffer und Lösungen	26
3.9 Zellkulturmedien	26
3.10 Kitsysteme	28
3.11 Gellösung für SDS-Polyacrylamidgele	29
3.11.1 Trenngel	29
3.11.2 Sammelgel	29
<b>4 Methoden</b>	30
4.1 Zellbiologische Methoden	30

---

4.1.1	Kultivierung der Zellen	30
4.1.2	Gewinnung von Primärkulturen	30
4.1.3	Kryokonservierung	31
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl	31
4.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	31
4.2.1	RNA Isolierung	31
4.2.2	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	32
4.2.3	Reverse Transkription	33
4.2.4	SYBRgreen <sup>TM</sup> basierte Real Time PCR	33
4.2.5	Statistische Auswertung	35
4.3	LOH-Untersuchung	35
4.3.1	LOH-PCR	35
4.3.2	Gene-Scan Auswertung	36
4.4	Immunhistochemische Färbung	37
4.5	Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$	38
4.6	Proteinbiochemische Methoden	38
4.6.1	Proteinisolierung aus Gewebe	38
4.6.2	Proteinisolierung aus Zellen	39
4.7	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.7.1	Herstellung eines Polyacrylamidgels	40
4.7.2	Elektrophorese	40
4.7.3	Proteintransfer durch Blot	41
4.7.4	Markierung mit spezifischen Antikörpern	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	42
5.1	EMT Marker in Meningeomen	42
5.1.1	Charakterisierung der Meningeom-Subtypen auf Transkriptionsebene	42
5.1.2	Charakterisierung auf Proteinebene	43
5.1.3	Immunhistochemische Färbung	43
5.2	Vergleich unterschiedlicher WHO-Grade	45
5.2.1	Expression auf Transkriptionsebene	45

---

5.2.2	Expression auf Proteinebene	45
5.2.3	Immunhistochemische Färbung	46
5.3	Korrelation mit klinischem Verhalten	47
5.3.1	Invasivität	48
5.3.2	Rezidiv	49
5.3.3	Heterozygotieverlust im NF2-Gen	50
5.3.4	Geschlecht	52
5.4	Induzierbarkeit der EMT	53
5.4.1	Transforming-Growth-Factor- $\beta$	53
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>6.1</b>	<b>Zur Rolle von E-Cadherin</b>	<b>61</b>
<b>6.2</b>	<b>Kein Hinweis für EMT in fibroblastischen Meningeomen</b>	<b>65</b>
<b>6.3</b>	<b>Partielle EMT</b>	<b>65</b>
<b>6.4</b>	<b>Aktivierung der EMT und TGF-<math>\beta</math></b>	<b>66</b>
<b>6.5</b>	<b>Die Rolle von NF2</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>Ehrenerklärung</b>	<b>82</b>
<b>11</b>	<b>Darstellung des Bildungsweges</b>	<b>83</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-A Modellvorstellung der EMT	19
Abbildung 4-A Beispielhafte Darstellung der Produktamplifikation	35
Abbildung 5-A Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der relativen Expression <b>A</b> der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin abhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp in WHO –Grad I Meningeomen <b>B</b> Expression auf Proteinebene <b>C</b> immunohistochemische Färbung	45
Abbildung 5-B Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der relativen Expression <b>A</b> der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin assoziierter Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom WHO-Grad <b>B</b> Expression auf Proteinebene <b>C</b> immunohistochemische Färbung	48
Abbildung 5-C Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der relativen Expression der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin assoziierter Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit der Invasion	50
Abbildung 5-D Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der relativen Expression der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin assoziierter Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit des Auftretens von Rezidiven	51
Abbildung 5-E Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der relativen Expression der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin assoziierter Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit des NF2 Genstatus humaner Meningeome	52
Abbildung 5-F Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der relativen Expression der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin assoziierter Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom Geschlecht	54
Abbildung 5-G <b>A</b> Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der relativen Expression der gewählten EMT-Marker E-Cadherin assoziierter Transkriptionsfaktoren in einer primären Meningeomzelllinie vor und nach 48stündiger Behandlung mit TGF- $\beta$ <b>B</b> x200 fache Vergrößerung der 3.Passage einer primären Meningeomzelllinie links vor und rechts nach einer 48 stündigen Behandlung mit TGF- $\beta$	56
Abbildung 5-H Ax200fache Vergrößerung von Men-Zellen links, rechts Men-sh-NF2Zellen vor und nach 48stündiger TGF- $\beta$ Behandlung <b>B</b> Mittelwert der relativen Expression $\pm$ Standardabweichung ausgewählter EMT Marker in Men und Men-sh-NF2 Zellen	58

---

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1-1	WHO Klassifikation der Meningeome	10
Tabelle 1-2	Auswahl EMT Meningeom	15
Tabelle 3-1	Charakteristika der Zelllinien	22
Tabelle 5-1-3	Immunoexpression in WHO-Grad I Meningeomen	45
Tabelle 5-2-3	Immunoexpression in verschiedenen WHO-Graden	48

---

## Abkürzungsverzeichnis

Aq. dest.	Aqua destillata
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BP	Basen-Paare
bzw.	Beziehungsweise
DEPC	Diethylcarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
HPF	High power Field
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
Min	Minuten
NF2	Neurofibromatose Typ 2
OD	Optische Dichte
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase Chain Reaction
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
Rn	normalized Reporter
Rpm	Rounds per minute
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	World Health Organization



# 1 Allgemeiner Teil

## 1.1 Meningeome

Eine der frühesten bekannten Beschreibungen eines Meningeoms geht auf den Schweizer Arzt und Schriftsteller Felix Plater zurück. Im Jahre 1614 beschrieb er im Autopsiebericht des Caspar Bonecurtius eine Raumforderung, bei der es sich, nach heutigen Erkenntnissen, am ehesten um ein Meningeom handelte (Lee 2010). Diese Charakterisierung mag eine der ältesten der Neuzeit sein. Die durch Meningeomwachstum verursachte charakteristische Hyperostosis des oberen Calvariums, erlaubt es jedoch, mit einiger Sicherheit Meningeome im Nachhinein an weltweit bislang 11 fossilen Funden, zu diagnostizieren, wobei der älteste derzeit bekannte auf ein Alter von circa 365.000 Jahren geschätzt wird (Zhang et al. 2011).

Den Begriff „Meningeom“ prägte erst Harvey Cushing 1922 in seiner „Cavendish Lecture“ (Cushing 1922), um die bis zu diesem Zeitpunkt ungenügend klassifizierten neuroaxialen Tumoren, als deren Ursprung er, wie aus der Namensgebung ersichtlich, die Meningen vermutet, zu beschreiben. In Zusammenarbeit mit Luise Eisenhardt entsteht schließlich 1938 das Werk „Meningeomas“, das detaillierte klinisch-pathologische Betrachtungen zu 313 Meningeomen enthält und eine weiter entwickelte Klassifikation nach Lokalisation vorstellt, die in ihren Grundzügen bis heute klinisch gebräuchlich ist (Bigner et al. 2006). Eine Weiterentwicklung mit Percival Bailey (Lee 2010) bildete schließlich den Grundstock für das heute genutzte Schema zur histopathologischen Klassifikation der *World Health Organisation* (WHO). Gebräuchliche Subtypen gemäß WHO-Klassifikation und die ihnen entsprechenden histopathologischen Merkmale sind nachfolgend in Tabelle 1-1 aufgeführt.

Tabelle 1-1 WHO-Klassifikation der Meningeome

## Subtypen WHO-Grad I:

<b>Meningothelial</b>	<b>Fibroblastisch</b>	<b>Transitional</b>	<b>Psammomatös</b>	<b>Angiomatös</b>	<b>Sekretorisch</b>
Durch kollagene Septen getrennte Läppchen;	Kollagen reiche Matrix;	Meningotheliale und fibroblastische Eigenschaften	Reichlich Psammoma Körper,	Blutgefäße machen mehr als 50% des Tumorumfanges aus	PAS-positive eosinophile Einschlüsse (Pseudopsammoma-Körper),
Polygonale oder epitheloide Zellen mit runden bis ovalen Kernen	Spindelförmige Zellen mit länglichen bis ovalen Kernen in parallelen oder bastmattenartigen Strukturen		Kalzifikation Manchmal Ossifikation	Oft hyalinisiert	häufig Mastzellen und Histiocyten
Häufige Kernveränderungen: Zentrale Aufhellungen/eosinophile Pseudoinklusionen					

## Subtypen WHO-Grad II:

<b>Atypisch</b>	<b>Chordoid</b>	<b>Klarzellig</b>
Gesteigerte mitotische Aktivität (4 oder mehr/10HPF)	Läppchen oder Trabekel der Zellen	Polygonale Zellen mit glykogenreichem, klarem Zytoplasma
Prominente Nucleoli und erhöhte Kern-Plasma-Relation	muzinreiches Stroma	Perivaskulär und interstitial Kollagenablagerung
Hirninvasion*		
*Ergänzung der revidierten Klassifikation von 2016 (Louis et al. 2016)		

Subtypen WHO-Grad III:

Anaplastisch	Papillär	Rhabdoid
20 oder mehr Mitosen/10HPF	Papilläres oder pseudopapilläres Wachstum	Rhabdoide Zellen mit exzentrischem Kern und prominentem Kernkörperchen
Karzinom-, Melanom- oder Sarkom-ähnliche Histologie	Teilweise Verlust der zellulären Kohäsion,	Häufig globuläre Inklusionen im Zytoplasma (Intermediärfilamente)

modifiziert nach Mawrin & Perry, 2010

Die wichtigste klinische Komplikation von Meningeomen sind Rezidive. Auch nach mikroskopisch kompletter chirurgischer Resektion wird innerhalb einer 10 Jahres-Spanne die Rezidivhäufigkeit, je nach WHO-Grad, mit einer prozentualen Häufigkeit zwischen 10% und 37% angegeben (İldan et al. 2007; Maillo et al. 2007). Als prognostischer Wegweiser dienen bislang in erster Linie zyto- und histomorphologische Kriterien, auf die sich das Grading System der WHO stützt, sowie das Ausmaß der Resektion, wie sie durch das Graduierungssystem nach Simpson beschrieben wird (Simpson 1957). So sind es vor allem atypische und anaplastische Meningeome, die zu Rezidiven neigen. Es gilt jedoch zu beachten, dass es ebenso niedriggradige Meningeome gibt, die trotz kompletter chirurgischer Resektion zu Rezidiven, beziehungsweise zu untypischem und invasivem Verhalten neigen (Fèvre-Montange 2009; Mawrin und Perry 2010; Pecina-Slaus et al. 2012). Zur Vorhersagbarkeit dieses Verhaltens wurden bereits Biomarker, wie die Antigene gegen Kathepsin-B und -L, die Proteine S100A5 und c-myc, der Progesteronrezeptorstatus des Tumors (Fèvre-Montange 2009) sowie zytogenetische Veränderungen auf den Chromosomen 9,10 und 14 vorgeschlagen (Maillo et al. 2007). Abschließende Sicherheit für die Prognose kann jedoch bislang durch keinen der diskutierten Faktoren erbracht werden.

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Meningeome sind mit einem Anteil von 13 bis 26% an der Gesamtheit die häufigsten intrakraniellen Neoplasien. Sie zählen nicht zu den hirneigenen Tumoren, sondern zur Gruppe der extrazerebralen Tumoren. Die Inzidenzrate der Meningeome wird in der Literatur mit jährlich zwischen 1,6 und 5,5 Neuerkrankungen pro 100 000 Personen angegeben (CBTRUS (2009-2010); Kjaeboe et al. 2005).

---

Heute wird angenommen, dass der meist gutartige, bekapselte Tumor seinen Ursprung vom arachnoidalen Deckendothel der Pacchionischen Granulationen nimmt, welches der Arachnoidea außen aufsitzt und an der Resorption des Liquor beteiligt ist (Weller 1983; Louis et al. 2007). Gestützt wird diese Annahme durch zytologische wie auch durch funktionelle Ähnlichkeiten zwischen den Zellpopulationen: Zeigt das normale histologische Bild der arachnoidalen Deckzellen eine einzige Schicht fibroblastischer Zellen oder epitheloid anmutender, zusammengelagerter Zellen, so finden sich, vor allem in höherem Alter, vermehrt Wirbel und psammomatöse Strukturen im histologischen Bild der Deckzellen, wie sie auch im Meningeom zu finden sind (Mawrin und Perry 2010). Weiterhin gelang es Kalamarides et al. zu zeigen, dass die Ausschaltung von NF2 in bestimmten (PGDS-positiven) arachnoidalen Vorläuferzellen bei der Maus Meningeome erzeugt, die sogar histologisch an diverse menschliche Subtypen erinnern (Kalamarides et al. 2011). Obwohl bezüglich dieser Theorie über den Ursprung der Meningeome in der bis dato verfügbaren Literatur ein gewisser Konsens besteht, sei an dieser Stelle erwähnt, dass bislang kein absoluter Beweis erbracht werden konnte und einige seltenere Meningeomvarianten, wie beispielsweise das mikrozystische Meningeom wiederum anderen Zellen, in diesem Beispiel den arachnoidalen Trabekelzellen in größerem Maße ähneln (Bigner et al. 2006).

### **1.1.2 Lokalisation**

Meningeome können sowohl intrakraniell als auch intraspinal gefunden werden. Die genaue Lokalisation ist zum Einen ausschlaggebend für die Symptomatik und beeinflusst zum Anderen die Operabilität und damit das klinische Outcome.

Die meisten Meningeome werden intrakraniell gefunden, gut die Hälfte hiervon in der Konvexität beziehungsweise Falx- und Parasagittalregion. Die mögliche klinische Symptomatik dieser Tumore umfasst fokale Anfälle sowie im Verlauf auftretende Hemiparesen und neuropsychologische Defizite. Befindet sich der Tumor nahe der Zentralregion ist das Mantelkantensyndrom, also eine meist asymmetrische Paraparese, häufig zu beobachten. Weitere 30% der Meningeomfälle finden sich in der Schädelbasis. Zu den seltener betroffenen Regionen zählen die hintere Schädelgrube und das Ventrikelsystem. Ebenfalls selten (in 2-18% der Fälle) finden sich Meningeome in der Orbita beziehungsweise entlang des Nervus Opticus. Diese Lokalisation ist, möglicherweise auch wegen der chirurgisch schwierigen Erreichbarkeit, mit vergleichsweise hohen Rezidivraten assoziiert. In etwa 12% der Fälle werden Meningeome spinal gefunden. Inte-

---

ressant ist hierbei, dass die Geschlechtsverteilung bei den spinalen Meningeomen besonders asymmetrisch ist, so sind in der Literatur bei Frauen bis zu 10fache Häufungen im Vergleich zu Männern beschrieben.

Auch primär extrakranielle Meningeome sind beschrieben, sie finden sich am häufigsten im Bereich der Nasennebenhöhlen, sowie in der Schläfenregion. Meningeome dieser Regionen zeigen häufig intraossäre Invasion, präsentieren sich ansonsten aber meist als gut differenziert. Abzugrenzen von Tumoren mit Knocheninvasion sind schließlich primär intraossäre Meningeome, die ebenso wie Erstere in der Lage sind eine Hyperostose oder auch fokale Osteolysen zu induzieren. Es wird, aufgrund der Tatsache, dass eine enge örtliche Beziehung zu den Suturen besteht, vermutet, dass diese Tumoren aus während der Geburt in die Suturen verschleppten Deckzellen entstehen (Yaşargil und Abernathy 1996; Al-Mefty 1998; Bigner et al. 2006).

Weitere Publikationen legen nahe, dass der Entstehungsort eines Meningeoms eine gewisse Vorhersagbarkeit des histopathologischen Subtyps erlaubt. So konnte gezeigt werden, dass Meningeome die abseits der Schädelbasis entstehen ein höheres Risiko für WHO - Grad II oder III-Pathologie haben (Kane et al. 2011).

### **1.1.3 Risikofaktoren**

Der einzig nachweisliche Risikofaktor für die Entwicklung eines Meningeoms ist, nach heutigem Kenntnisstand, ionisierende Strahlung. Diese verursacht auch in niedrigen Dosen, vor Allem atypische Meningeome mit hohen Proliferationsindizes (Baheti et al. 2010). Für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Meningeomen und Schädelhirntraumata, Mobilfunkgebrauch oder Brustkrebs konnten bislang keine definitiven Beweise erbracht werden (Inskip et al. 2001; Phillips et al. 2002; Wiemels et al. 2010).

Statistisch gesehen entwickeln Frauen zweimal häufiger Meningeome, als Männer, angenommen ist hierbei der anaplastische Subtyp, der häufiger bei Männern gefunden wird. Dies legt einen generellen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Meningeomen und dem Einfluss von Sexualhormonen nahe, wobei die Rolle der Hormonabhängigkeit komplex zu sein scheint. Tatsächlich ist bei Frauen ein vermehrtes Tumorstadium während der Schwangerschaft und Lutealphase des Menstruationszyklus be-

---

schrieben. Bemerkenswert ist, dass Progesteronrezeptoren ebenso häufig in den Meningeomen von Männern und Kindern nachgewiesen werden können, wie in denen von Frauen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die aggressiveren Subtypen häufiger Männer betreffen (Bigner et al. 2006).

#### **1.1.4 Genetik**

Eine häufig in rezidivierenden, atypischen aber auch in rund 60% aller sporadisch auftretenden Meningeome beschriebene Aberration betrifft das Chromosom 22 (Zankl und Zang 1972; Mawrin und Perry 2010). Mutationen und Deletionen eines hier liegenden Genes sind die Ursache für die Neurofibromatose vom Typ 2 (NF2), einem familiären Dispositionssyndrom, das vor Allem mit dem gehäuften Auftreten verschiedener Tumoren des zentralen Nervensystems, darunter Schwannome, Ependymome und auch Meningeome, assoziiert wird. Das betroffene Gen auf Chromosom 22, das NF2 Gen, codiert ein Protein, das Schwannomin oder Merlin (Moesin-Ezrin-Radixin-Like-Protein) genannt wird und zur ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)- Protein-Familie gehört (Tsukita et al. 1997).

Merlin ist ein Protein mit zahlreichen Funktionen in der Zelle. Dazu zählt zunächst die Verlinkung von Transmembranproteinen mit dem Aktinzytoskelett der Zelle. Außerdem trägt es zur Regulierung von Zellmorphologie und Motilität bei und, durch Interaktion mit dem Adhäsionsmolekül CD44 vermittelt es die Kontaktinhibition der wachsenden Zellen. Hierdurch und indem es die Expression verschiedener Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Integrine beeinflusst und mit Signalwegen, wie mTOR oder Raf/MEK/ERK interferiert (Zhou et al. 2011) fungiert Merlin als Tumorsupressor-Protein (Stamenkovic und Yu 2010).

Ferner interagiert Merlin mit Cadherinen und Cateninen in den Adherens-Junctions und trägt so zum stabilen Zell-Zellkontakt bei. Entsprechend werden Tumoren mit funktionellem NF2-Verlust als hyperproliferativ und besonders mobil beschrieben, sodass ein genereller Zusammenhang zum Metastasierungspotential vermutet wird (Morrison 2001; Lallemand et al. 2003; Claus et al. 2005; Striedinger et al. 2008).

Mutationen und Genverluste im NF2-Gen sind in fibroblastischen und transitionalen Meningeomen häufiger als in Meningeomen mit meningothelialelem Subtyp. Veränderungen des Karyotyps insgesamt, neben Chromosom 22 ist auch das Chromosom 1 be-

---

troffen, sind absolut in den höhergradigen Meningeomen am häufigsten (Ragel und Jensen 2005; Fèvre-Montange 2009).

Abweichend von der WHO-Klassifikation schlägt eine auf Mikroarrays basierte Studie die Einteilung der Meningeome in „Low-proliferative“ und „High-Proliferative“ Tumore vor, wobei in dieser Einteilung atypische Meningeome interessanter Weise in beide Gruppen fallen können (Carvalho et al. 2007).

## 1.2 Die Epithelial-Mesenchymale-Transition

Im ausgehenden 19. Jahrhundert wurden bereits epitheliale und mesenchymale Zellen voneinander unterschieden. Nur wenig später beschrieb Frank R. Lillie, amerikanischer Zoologe und Pionier der Embryologie, eine wechselseitige Umwandlung der beiden Zelltypen ineinander am Beispiel der Embryogenese des Huhnes (Lillie 1908). Detailliertere Darstellungen dieses Konzeptes folgten unter Mitwirkung von Elizabeth Hay, deren Arbeiten über Embryogenese, Tumorgenese und die Bedeutung der Epithelial-Mesenchymalen-Transition als wegweisend gelten (Trelstad et al. 1967; Greenburg und Hay 1982; Hay 2005). In den nachfolgenden Jahren gelang schließlich die umfassendere Darstellung der EMT als ein biochemischer Prozess, der es einer polaren, ortständigen epithelialen Zelle in seinem Verlauf ermöglicht, mesenchymales Aussehen und Charakteristika zu zeigen (Thiery 2002; Kalluri und Weinberg 2009).

Die Unterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen sind vielfältig und betreffen sowohl die jeweilige Morphologie als auch das Verhalten der Zelle im Verband. Epitheliale Zellen stehen typischerweise in enger Verbindung zueinander; sie sind durch Tight- Junctions, Gap-Junctions und Adherens-Junctions fest miteinander verbunden, zeigen zudem apiko-basale Polarität und haften über die Basalmembran ihrer Oberfläche fest an. Mesenchymale Zellen hingegen zeigen keine Polarisierung und besitzen typischerweise eine eher spindelförmige Morphologie.

Im Verlauf der EMT dissoziieren membranassoziierte Adherens-Junctions und Desmosomen, das Zytoskelett wird rearrangiert. Ebenso verändert sich das Expressionmuster von Oberflächenproteinen, so dass spezifische Proteine als Marker für EMT Verwendung finden (siehe Tabelle 1-2) (Kalluri und Neilson 2003; Kalluri und Weinberg 2009; Zeisberg und Neilson 2009).

Tabelle 1-2 Auswahl EMT Proteom

Verminderte Expression	Gesteigerte Expression
E-Cadherin	N-Cadherin
Zonula-Occludens-1	Vimentin
Desmoplakin	Kollagen Typ I und III
Muc-1	Fibronectin
Syndecan-1	Transkriptionsfaktoren (SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB-1)
Cytokeratin-1	FTS-binding Protein

Nach Kalluri 2009

### 1.2.1 Kennzeichen der EMT und die Rolle von E-Cadherin

Als Cadherine bezeichnet man eine Familie von calciumabhängigen, transmembranösen Adhäsionsproteinen. Allein im Menschen sind bisher 80 verschiedene Cadherine bekannt. Die klassischen Subtypen: E- (Epithelial), N- (Neuronal), P- (Plazental) - Cadherin, verfügen hierbei über unterschiedliche Bindungsspezifitäten und ein charakteristisches Verteilungsmuster im Gewebe. Ihnen gemein sind sich wiederholende Aminosäuresequenzen, die auch als Cadherin-Repeats oder ECs bezeichnet werden und die über Linkermoleküle, wie  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin, p120 und Plakoglobin mit dem Aktinskelett der Zelle in Verbindung stehen (Tohma et al. 1992; Takeichi 1993; Huber et al. 1996).

E-Cadherin, das vor allem in Epithelien gefunden wird, gehört zu den am besten untersuchten Mitgliedern der Familie und wird als Prototyp für deren Verhalten betrachtet (Nollet et al. 2000). Zu den Funktionen der Cadherine zählt die Regulierung des stabilen Zell-Zell-Kontaktes in Desmosomen und Adherens-Junctions. Beispielsweise durch Modifikation der Catenine oder Dissoziation des Catenin-Cadherin-Komplexes kann der Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakt moduliert werden und so eine Reorganisation des Zytoskelettes beziehungsweise eine dynamische Umwandlung von Zellen und Geweben, wie sie auch im Rahmen der EMT stattfindet, erreicht werden (Takeichi 1995). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass der Verlust beziehungsweise die reversible Herabregulation von E-Cadherin in Verbindung zu Malignität beziehungsweise erhöhter Invasionsbereitschaft eines Tumors steht (Tohma et al. 1992). Der Verlust gilt außerdem als vorrangiges Kennzeichen der EMT, oft verbunden mit einer Mehrexpres-



sion eines anderen Mitgliedes der Cadherinfamilie dem N-Cadherin. Dieses Phänomen wird als „Cadherin Switch“ bezeichnet (Kalluri und Weinberg 2009).

Zudem konnte gezeigt werden, dass Meningeome Desmosomen, also epitheliale Zell-Zell-Kontakte aufweisen und (Schwechheimer et al. 1998) das E-Cadherin der in Meningeomen vorherrschende Cadherintyp ist (Akat et al. 2003).

### **1.2.2 Induktoren und molekulare Mechanismen der EMT**

Stoker und Perryman zeigten 1985, dass es vereinzelt möglich ist, epithelialen Zellen, durch Zugabe von zuvor durch Fibroblasten konditioniertem Medium, Migrationsfähigkeit zu verleihen (Stoker und Perryman 1985). Als Ursache dieser Veränderung wurde der zunächst der als Scatter Factor bezeichnete hepatozytische Wachstumsfaktor (HGF) erkannt, der über c-Met, einen Tyrosinkinase-Rezeptor, EMT induziert (Stoker et al. 1987; Sonnenberg et al. 1993).

Nach neuesten Erkenntnissen kann EMT über eine Reihe von onkogenen Signalwegen über Wachstumsfaktoren induziert werden, dazu zählen Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), wnt, notch, hedgehog, nuclear factor  $\kappa$ B (Pecina-Slaus et al. 2012). Eine herausragende Bedeutung kommt hierbei TGF- $\beta$  zu. Dabei handelt es sich um ein Zytokin, das in Abhängigkeit von Zelltyp und Kontext sehr unterschiedliche Antworten hervorrufen kann. So beeinflusst es beispielsweise das Verhalten von Tumorzellen in ambivalenter Weise: Zum Einen fungiert es als Tumor-Suppressor. Die Suppressorfunktion beziehungsweise die TGF- $\beta$  induzierte Wachstumshemmung funktioniert über verschiedene Signalwege. Smad-vermittelte Apoptose wirkt entartetem Zellwachstum entgegen. Zellzyklusarrest wird zum Einen durch die vermehrte Expression von Inhibitoren verschiedener Cyclin-abhängigen Kinasen wie p21, die den Übertritt der Zelle in die G1/S-Phase des Zellzyklus vermitteln, erreicht. Zum Anderen kann durch TGF- $\beta$ -Signale die Expression des Protoonkogens c-myc gemindert werden (Datto et al. 1995). Entsprechend finden sich bei Patienten mit Tumorerkrankungen Mutationen, etwa des TGF- $\beta$ -Rezeptors oder der Smads, die mit verminderter Ansprechbarkeit der Zelle auf die Tumorsuppressionsfunktion von TGF- $\beta$  einhergehen (Massagué 2008). Im physiologischen Kontext trägt TGF- $\beta$  also zur Gewebe-Homöostase bei und fungiert als Tumor-Suppressor. Pathologische Formen des Signalweges hingegen, wie sie vor allem in höhergradigen Tumoren gefunden werden, spielen eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Progression und Invasivität von Tumoren. Außerdem induzieren sie Angiogenese und sind an der Suppression des Immunsystems beteiligt (Rahimi und Leof 2007; Massagué

---

2008). In vitro ist TGF- $\beta$  zudem als Induktor der EMT (Thiery 2002; Siegel und Massagué 2003; Kasai et al. 2005; Kalluri und Weinberg 2009) beschrieben.

Auch TGF- $\beta$  induzierte EMT ist ein hochkomplexer Vorgang, der durch eine Vielzahl teilweise zelltypabhängiger Signalwege gesteuert werden kann. Lee et al. beschreiben in Zusammenfassung der Erkenntnisse des EMT-Meetings von 2005 in Vancouver, Canada die folgenden Zusammenhänge. Die TGF- $\beta$  abhängige Initiierung der EMT erfolgt einerseits über die Smad-3 abhängige Aktivierung von Mitgliedern der Hairy/Enhancer-of-split (HEY1) -Familie, nukleären Proteinen, die als transkriptionale Repressoren fungieren. Es konnte eine Reihe von Angriffspunkten für HEY1 identifiziert werden: Dazu zählen die Suppression der Produktion von Notch, GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin. Zum Anderen konnte eine TGF- $\beta$  abhängige Aktivierung von Smad-2 nachgewiesen werden, die über Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Tcf-Lef1 EMT zu induzieren vermag. Ferner wird ein Zusammenhang zwischen der TGF- $\beta$  vermittelten Produktion von Proteinen der Extrazellulärmatrix, vor Allem von Kollagenen und der Initiierung der EMT, durch phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin angenommen. Dieses transloziert nach Phosphorylierung in den Zell-Nukleus und aktiviert hier EMT-Zielgene (Lee 2006). Als ein wichtiges Kennzeichen der EMT gilt der Verlust des kalziumabhängigen Zell-Zell Adhäsionsproteins E-Cadherin. Demzufolge geht man davon aus, dass eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug (Snail2), ZEB-1 oder Twist, die E-Cadherin herab regulieren können, als Induktoren der EMT fungieren (Medici et al. 2008).

### **1.2.3 Funktionelle Bedeutung der EMT**

Die Bedeutung der EMT sowohl für die physiologische als auch die pathologische Entwicklung von Zellen sind vielfältig. In vivo werden anhand des Kontextes und der funktionellen Konsequenz drei verschiedene Subtypen der EMT beschrieben. So wird EMT im Rahmen der Implantation, Embryogenese und Organentwicklung als Subtyp 1 bezeichnet. Subtyp 2 beschreibt EMT in der Wundheilung und Fibrosierung. Es gibt etwa Hinweise darauf, dass die EMT in der renalen Fibrosierung bei Dialysepatienten ursächlich beteiligt ist (Kalluri 2009). Ein dritter Subtyp wird in Bezug auf Tumorwachstum und Progression beschrieben; einige Autoren gehen davon aus, dass die einen malignen Tumor kennzeichnenden Merkmale, wie die Befähigung zu invasivem Wachstum, Metastasenbildung oder die Neubildung von Gefäßen, durch die Aktivierung des EMT-Programmes initiiert werden (Desmoulière 1995; Kalluri und Neilson 2003; Kalluri und Weinberg 2009). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in genetischen veränderten

Mäusen mit Mamma-Karzinomen die Expression des sogenannten Fibroblastenspezifischen-Proteins zur Entwicklung eines zur Metastasierung befähigten Phenotyps beiträgt (Xue et al. 2003; Lee et al. 2006; Tsukamoto et al. 2007). Interessant ist ebenso, dass es zudem Hinweise darauf gibt, dass der Prozess der EMT nicht nur mit dem Erwerb von Motilität und Aggressivität, sondern auch mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie einhergehen kann (Lee et al. 2014; Maheswaran und Haber 2015).

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Analyse von E-Cadherin, ZO-1 und E-Cadherin-assoziierten Transkriptionsfaktoren einen potentiellen Zusammenhang der EMT mit der Meningeombiologie zu untersuchen. Das biologische Spektrum der Meningeome ist groß und ihr Verlauf bisweilen schwer vorhersagbar: Histopathologisch als gutartig klassifizierte Meningeome zeigen vereinzelt untypisches Verhalten wie Rezidivneigung oder Hirninvasivität (Fèvre-Montange 2009; Mawrin und Perry 2010; Pecina-Slaus et al. 2012). Ein genaueres Verständnis einer potentiellen Beteiligung der EMT könnte in Zukunft zur genaueren Abschätzung des klinischen Outcomes beziehungsweise der Prognose, gezielteren Überwachung und effektiveren Therapieplanung beitragen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich hierbei im Wesentlichen in zwei Teile. Zunächst wurden Meningeom-Subtypen hinsichtlich der Expression verschiedener mit EMT-assoziiierter Marker analysiert. Im zweiten Teil wurde das Potential des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  zur Induktion von EMT beziehungsweise EMT-ähnlichen Veränderungen auf Meningeomzellen untersucht.

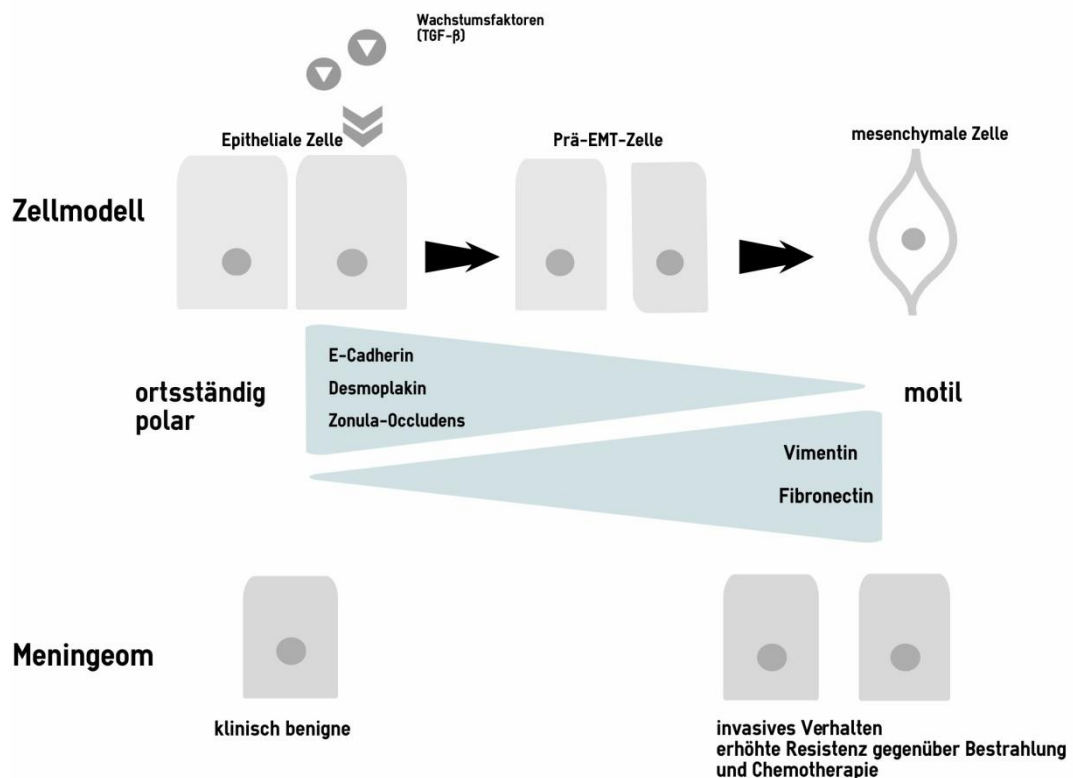


Abbildung 2-A Modellvorstellung der EMT

## **3 Material**

### **3.1 Tumorproben**

Die verwendeten Tumoren stammen aus der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg oder der Sammlung des Institutes für Neuropathologie des Universitätsklinikums Magdeburg. Die Tumore wurden nach operativer Entfernung bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Insgesamt wurden 85 Meningeome verwendet, darunter 63 WHO-Grad I, 15 WHO-Grad II-Meningeome und 7 WHO-Grad III-Meningeome. Die Patienten, von denen 58 weiblich und 27 männlich sind, waren bei Diagnosestellung im Durchschnitt 61,71 Jahre alt. Die Nutzung der humanen Materialien für die vorliegende Arbeit wurde von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt.

### **3.2 Zellkulturlinien**

Die Zelllinien, die in dieser Arbeit Verwendung finden sind bereits in der entsprechenden Literatur beschrieben. Die Linie Men ist eine Kontrolltransfektion mit dem Vektor, über den auch die NF2-shRNA in die korrespondierenden NF2-defizienten Linien eingeführt wurde. Die genaue Herkunft, Immortalisierung und Generierung stabiler shRNA gegen NF2 kann den Erstbeschreibungen entnommen werden (Lee 1990; Striedinger et al. 2008).

Tabelle 3-1 Charakteristika der Zelllinie

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Bezugsquelle</b>
MenII-1 (Men) / MenII-sh-NF2	Humanes Meningeom (WHO-Grad II)	Anita Lal, Brain Tumor Research Center, University of California, San Fransisco, USA
Primäre Meningeom Zelllinie	3.Passage eines humane Meningeoms (WHO-Grad I)	Isolierung aus dem Meningeom einer 63 Patientin, Sammlung Insitut für Neuropathologie, Madeburg

### 3.3 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Brutschrank</b>	CB150	<b>Binder, Tuttlingen</b>
<b>Brutschrank</b>	Galaxy B	<b>Roche, Grenzach-Wyhlenster, NY, USA</b>
<b>Digitalkamera</b>	Powershot A 95	<b>Canon, Amstelveen, NL</b>
<b>Eliza-Reader</b>	Infinite M200	<b>Tecan, Crailsheim</b>
<b>Entwicklermaschine</b>	Curix 60	<b>Agfa Health Care, Bonn</b>
<b>Fluoreszenzmikroskop</b>	Biozero	<b>Keyence-Deutschland GmbH, Neu-Isenburg</b>
<b>Gewebehomogenisator</b>	Precellys 24	<b>Peqlab.Biotechnologie, GmbH, Erlangen</b>
<b>Heizblock</b>	Rotilab®Block-Heater H250	<b>Roth, Karlsruhe</b>

<b>Homogenisator</b>	Ultra-Turrax T10 basic	<b>IKA®, Staufen</b>
<b>Lampe</b>	KL 1500 LCD	<b>Zeiss, Oberkochen</b>
<b>Magnetrührer</b>	Variomag Mono	<b>Thermo Scientific, Waltham, MA, USA</b>
<b>Phasenkontrastmikroskop</b>	Axiovert 40 CFL	<b>Zeiss, Oberkochen</b>
<b>Photometer</b>	Biophotometer	<b>Eppendorf, Hamburg</b>
<b>pH-Meter</b>	CG 842	<b>Schott AG, Mainz</b>
<b>Pipetten</b>	Einkanalpipetten im Volumenbereich 0,5µl -20ml	<b>Eppendorf, Hamburg</b>
<b>Pipettierhilfe für Zellkultur</b>	Pipettus	<b>Hirschmann, Herrenberg</b>
<b>Real-Time-PCR-Maschine</b>	ABI Prism 7000 SDS	<b>Applied Biosystems, Foster City, CA, USA</b>
<b>Blotter</b>	Trans-Blot Turbo™	<b>BioRad, Hercules, CA, USA</b>
<b>Sequenzierer</b>	ABI Prism 310 DNA Sequencer	<b>Applied Biosystems, Foster City, CA, USA</b>
<b>Sterilbank</b>	Klasse 2, Herasafe 12	<b>Heraeus, Hanau</b>
<b>Temperature controller</b>	ATC1000	<b>WPI, Sarasota, FL, USA</b>
<b>Thermocycler</b>	Mastercycler	<b>Eppendorf, Hamburg</b>
<b>Vakuumentrifuge</b>	Speed Vac 5301	<b>Eppendorf, Hamburg</b>
<b>Wasserbad</b>	WB 22	<b>Memmert, Schwabach</b>
<b>Westernblot-Apparatur</b>	Protean II System	<b>BioRad, Hercules, CA, USA,</b>
<b>Zellzähler</b>	Cellometer™ Auto T4	<b>Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen</b>
<b>Zentrifuge</b>	Multifuge X1R	<b>Heraeus, Hanau</b>

### 3.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
<b>6 well Platten (steril)</b>	Cellstar®	<b>Greiner, Frickenhausen</b>
<b>96 well Platten (steril)</b>	Nunc, Roche, Grenzach- Wyhlenster, NY, USAlon™ Surface	<b>Nunc, Roche, Grenzach- Wyhlenster, NY, USA</b>
<b>Cellscraper</b>	25 cm	<b>Greiner, Frickenhausen</b>
<b>Einmalzählkammern</b>	SD 100	<b>Peqlab Biotechnolo- gie GmbH, Erlangen</b>
<b>Hyperfilm ECL</b>	14 x 28 cm	<b>GE Healthcare Eu- rope, Freiburg</b>
<b>Keramikkügelchen</b>		<b>Peqlab Biotechnolo- gie GmbH, Erlangen</b>
<b>Mikroreaktionsgefäße</b>	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	<b>Eppendorf, Hamburg</b>
<b>Nitrocellulose Membran</b>	Protran®	<b>Whatman, GE Healthcare Europe, Erlangen</b>
<b>Pipettenspitzen</b>	1 µl – 5000 µl	<b>Eppendorf, Hamburg</b>
<b>Verpackungsfolie</b>	Saran	<b>The DOW Chemi- cals, Midland, MI, USA</b>
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	15 ml, 50 ml	<b>Falcon, BD Biosci- ence, San Jose, CA, USA</b>
<b>Zellkulturflaschen (steril)</b>	6cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	<b>Greiner, Frickenhausen</b>



### 3.5 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Abkürzung/Summenformel/ Trivialname	Bezugsquelle
<b>1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan</b>	MTT Formazan	<b>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</b>
<b>1,4-Dithio-DL-threitol</b>	DTT	<b>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</b>
<b>2 x SensiMix SYBR-HiRox</b>		<b>Bioline, Luckenwalde</b>
<b>5-fach RT Puffer</b>		<b>Bioline, Luckenwalde</b>
<b>Acrylamid (30 %)</b>	AA	<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Ammoniumperoxodisulfat</b>	APS	<b>Merck, Darmstadt</b>
<b>Ampullenwasser</b>	Ampuwa	<b>Fresenius Kabi AG, Bad Homburg</b>
<b>Diethylpyrocarbonat</b>	DEPC	<b>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</b>
<b>Dimethylsulfoxid</b>	DMSO	<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Entwickler (2 Komponenten)</b>	G153	<b>Agfa Healthcare, Bonn</b>
<b>Ethanol</b>	EtOH	<b>Otto Fischar GmbH, Saarbrücken</b>
<b>Ethylendiamintetraessigsäure Dinatrium-Salz</b>	EDTA	<b>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</b>
<b>Fetales Rinderserum</b>	FBS	<b>PAA, Pasching, AU</b>
<b>Fixierer</b>	G354	<b>Agfa Healthcare, Bonn</b>
<b>Formaldehyd</b>	CH <sub>2</sub> O	<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Glycerin</b>		<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>IsoproPAN Biotech, Aidenbachol</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	<b>Roth, Karlsruhe</b>

<b>Ladepuffer</b>	5 x Protein Loading Buffer	<b>Fermentas, St.Leon-Rot, St. Leon-Roth</b>
<b>Ladepuffer</b>	2 x Loading Buffer nach Laemmli	<b>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</b>
<b>L-Leucin</b>	L-Leu	<b>Bio&amp;Sell e.K., Feucht</b>
<b>L-Methionin</b>	L-Met	<b>Bio&amp;Sell e.K., Feucht</b>
<b>Magermilchpulver</b>		<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Methanol</b>		<b>Mallinckrodt Baker, Griesheim</b>
<b>Tetramethylethylenediamin</b>	TEMED	<b>Serva, Heidelberg</b>
<b>Natriumchlorid</b>	NaCl	<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Natriumlaurylsulfat</b>	SDS	<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Natriumorthovanadat</b>	NaVan	<b>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</b>
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	PS	<b>PAN Biotech, Aidenbach</b>
<b>Phosphatase-Inhibitor Cocktail</b>		<b>Calbiochem über Merck, Darmstadt</b>
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung</b>	PBS	<b>PAN Biotech, Aidenbach</b>
<b>Physiologische Kochsalzlösung</b>	NaCl	<b>Fresenius Kabi</b>
<b>Protein-Leiter, biotinyliert</b>		<b>Cell-Signaling Inc., FFM</b>
<b>Reverse Transkriptase</b>	RT	<b>New England Biolabs</b>
<b>Standardmarker für Proteine</b>	PageRuler, PageRuler Plus	<b>Fermentas, St.Leon-Rot</b>
<b>Stripping Puffer</b>	Restore	<b>Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA</b>
<b>Transforming-Growth-Factor-<math>\beta</math></b>	TGF- $\beta$	<b>ImmunoK, AMS Bio-</b>

		technology (Europe) Ltd., Abingdon, UK
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Base</b>	Tris-Base	<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan -HCl</b>	Tris-HCL	<b>Roth, Karlsruhe</b>
<b>Trizol</b>		<b>Invitrogen, Karlsruhe</b>
<b>4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol</b>	Triton X100	<b>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</b>
<b>Trypsin</b>		<b>PAN Biotech, Aidenbach</b>
<b>Tween 20</b>		<b>Merck, Darmstadt</b>

### 3.6 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<b>EMT-Antibody Sampler Kit</b>	Cell Signaling Inc., FFM	<b>Westernblot 1:1000</b>
<b>Merlin (NF2-Antikörper)</b>	Santa Cruz, Biotechnology, Inc.; CA, USA	<b>Westernblot 1:1000</b>
<b>Snail 1 (Snail), Snail 2 (Slug), Twist, Zeb-1</b>	Cell Signaling Inc., FFM	<b>Westernblot 1:1000</b>

### 3.7 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<b>Goat-anti-rabbit (HRP-gekoppelt)</b>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	1:1000

<b>Goat-anti-mouse IgG (HRP-gekoppelt)</b>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	1:1000
--------------------------------------------	-------------------------------------	--------

### 3.8 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
<b>APS-Lösung:</b>	10g APS ad 100ml Aqua dest.
<b>Einfríermedium</b>	Zellkulturmedium + 24% FBS + 7% DMSO
<b>Laufpuffer (pH 8,3)</b>	15,1g Tris-Base 72g Glycin 5,0g SDS 5000ml Aqua dest.
<b>Lysis-Puffer</b>	1ml RIPA-Puffer 10µl 100mM Na-ortho-vanadat 10µl Proteaseinhibitor-Cocktails 1µl 1 M DTT
<b>Transferpuffer</b>	7,57 g Tris-Base 28,15 g Glycin 500 ml Methanol 2500 ml Aqua dest.
<b>1,88 M Tris/HCl (pH 8,8):</b>	56,9 g Tris-Base ad 250 ml Aqua dest.
<b>0,625 M Tris/HCl (pH 6,8):</b>	18,9 g Tris-Base ad 250 ml Aqua dest.

<b>RIPA Puffer</b>	0,24 g Tris
	1,75 g NaCl
	0,42 g NaF
	4 ml 0,5 M (w/v) EDTA
	2 ml Triton-X 100
	0,67 ml 30 % (w/v) SDS
	1 g Deoxycholat
ad 193,33 ml Aqua dest.	
<b>0,5 % (w/v) SDS-Lösung:</b>	0,5 g SDS
	ad 200 ml Aqua dest.

### 3.9 Zellkulturmedien

Medium	Hersteller
<b>RPMI 1640</b>	PAA, Pasching, AU
<b>Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose</b>	PAA, Pasching, AU

### 3.10 Kitsysteme

Kitsystem	Hersteller
<b>RNA Midi Easy Kit</b>	QIAGEN, Venlo, NL
<b>QIAamp DNA Mini Kit</b>	QIAGEN, Venlo, NL

QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Venlo, NL
DC Protein Assay	BioRad, Hercules, CA, USA
cDNA Synthesis Kit	Bioline, Luckenwalde

### 3.11 Primer Systeme für PCR

Name	Sequenz	Annealing Temperatur
CDH-1-F (E-Cadherin)	5'-tga agg tga cag agc ctc tgg at-3'	60°C
CDH-1-R (E-Cadherin)	5'-tgg gtg aat tcg ggc ttg tt-3'	60°C
SNAI1-101-F	5'-gct cct teg ttc tcc tc-3'	55°C
SNAI1-R	5'-gag atc ctt ggc ctc aga ga-3'	55°C
SLUG-119-F	5'-cat acc aca acc aga gatcc-3'	55°C
SLUG-R	5'-gag gag tat ccg gaa aga gg-3'	55°C
TWIST-88-F	5'-ctc gga caa gct gag caa ga-3'	55°C
TWIST-R	5'-cag ctt gcc atc ttg gag tc-3'	55°C
ZEB-1-80-F	5'-aag aaa gtg tta cag atg cag ctg-3'	55°C
ZEB-1-R	5'-ccc tgg taa cac tgt ctg gtc-3'	55°C
ZO-1-F	5'-aag tca cac tgg tga aat cc-3'	60°C
ZO-1-R	5'-ctc ttg ctg cca aac tat ct-3'	60°C

### 3.12 Gellösungen für SDS-Polyacrylamidgele

#### 3.12.1 Trenngel

Substanz	8%iges Gel	12%iges Gel	15%iges Gel
Aqua dest.	2ml	1,1ml	0,6ml
Acrylamid (30%)	1,6ml	2,5ml	3ml
1,88M Tris/HCL	1,2ml	1,2ml	1,2ml
SDS (5%)	1,2ml	1,2ml	1,2ml
TEMED	5 µl	5µl	5µl
APS	30µl	30µl	30µl

**3.12.2 Sammelgel**

<b>Substanz</b>	<b>4%</b>
<b>Aqua dest.</b>	0,87ml
<b>Acrylamid (30%)</b>	0,33ml
<b>0,625 M Tris/HCL</b>	0,4ml
<b>SDS (5%)</b>	0,4ml
<b>TMED</b>	2 $\mu$ l
<b>APS</b>	10 $\mu$ l

## **4 Methoden**

### **4.1 Zellbiologische Methoden**

Jegliche Zellkulturarbeiten wurden an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank der Schutzklasse II, mit autoklavierten Geräten beziehungsweise steril filtrierten Lösungen, durchgeführt.

Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank, bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **4.1.1 Kultivierung der Zellen**

Je nach Verwendungszweck wurden für die Anzucht der verschiedenen Zelllinien unterschiedliche sterile Kulturgefäße verwendet.

Bei Bedarf erfolgte eine Subkultivierung der Zellen nach Ausbildung eines subkonfluenten Monolayers. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 5ml PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und für circa 2 min bei 37°C inkubiert. Hierbei lösen sich die Zellverbände ab. dies wurde mehrfach mit dem Mikroskop kontrolliert, bei Bedarf kann das Ablösen durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche („shake off“) vervollständigt werden. Die Zellsuspension wurde schließlich nach Auffüllen auf 5 ml mit PBS 10min bei 1000rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde durch vorsichtiges Resuspendieren in 10ml warmem Kulturmedium gelöst und die Zellen, je nach Zelltyp, etwa im Verhältnis 1:10 bzw. 1:5 (Primärkulturen) auf mehrere Zellkulturgefäße verteilt.

#### **4.1.2 Gewinnung von Primärkulturen**

Um kultivierbare Zellen direkt aus einem frischen Meningeom zu gewinnen, wurde folgendermaßen verfahren: Ein diagnostisch nicht benötigter Anteil des Tumors wurde vorsichtig durch ein 200µm Stahlsieb gestrichen. Die Zellen und Gewebereste wurden in einer Petrischale mit angewärmtem Medium zunächst aufgefangen und schließlich in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24h, sobald die meisten Zellen adhärent sind,



---

wurde das Medium mitsamt Geweberesten und Zelltrümmern entfernt und gegen frisches ausgetauscht.

#### **4.1.3 Kryokonservierung**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie zum Passagieren vom Boden des Kulturgefäßes durch Trypsin/EDTA abgelöst. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1000rpm wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit Medium zur Kryokonservierung (glycerol- und DMSO-haltig) resuspendiert und in Teilmengen zu je einem Milliliter in frische Kryoröhrchen überführt. Diese wurden zunächst in einer dickwandigen Styroporbox auf -80°C herunter gekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Nach 24-48 Stunden wurden die Gefäße zur Langzeitaufbewahrung in die Dampfphase Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert.

#### **4.1.4 Bestimmung der Zellzahl**

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen, wie unter 4.1.1 beschrieben, abgelöst und sedimentiert, um anschließend in einer definierten Menge Medium resuspendiert zu werden. 20µl dieser Zellsuspension wurden in eine Zählkammer gegeben und die Zellzahl/ml mithilfe des Zählgerätes *Cell Counter<sup>TM</sup>* und der entsprechenden Software bestimmt.

## **4.2 Polymerase- Ketten- Reaktion**

### **4.2.1 RNA Isolierung**

RNA aus Zellkulturen wurde mittels Trizol-Methode, modifiziert nach der von Chomczynski (Chomczynski und Sacchi 1987) vorgestellten Methode zur RNA-Isolierung, gewonnen. 1ml Trizol Reagent wurde hierbei den, mit PBS gewaschenen Zellen hinzugefügt und für 5 Minuten in bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt aus dem Zellkulturgefäß in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 300µl Chloroform vermischt und anschließend für 15 Minuten bei 10 000rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der isolierten RNA, die sich absetzt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 700µl Isopropanol versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 10 000rpm für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das zurückbleibende Pellet mit 75% eis-

gekühltem Ethanol gewaschen. Das vollständig getrocknete Pellet wurde mit 60µl DEPC-Wasser versetzt und die RNA durch Schütteln im Mikroschaker für weitere 10 Minuten bei 64°C vollständig gelöst.

Die Tumoren für die RNA Isolierung stammten aus der Sammlung des Institutes für Neuropathologie Magdeburg. Ihre Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels des RNA Midi-Easy Kits der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers. Um das Kontaminationsrisiko der RNA mit den ubiquitär vorkommenden RNasen möglichst gering zu halten, wurde jegliche Arbeit mit RNA mit Einmalhandschuhen und unter Verwendung von für den Umgang mit RNA vorbehaltenen Gerätschaften durchgeführt.

Gewebestücke mit einer Masse von etwa 30mg wurden mittels eines Skalpellts soweit wie möglich zerkleinert, in die Qiagen-Shredder-Säulen gegeben und in 600µl RLT-Puffer lysiert. Durch ein-minütiges Zentrifugieren bei 14.000rpm wurde das Lysat homogenisiert.

Die Isolierung der RNA aus dem Homogenisat erfolgte gemäß dem „Protocol for Isolation of Total RNA“ des Herstellers: Guanidium-Thiocyanat haltiger Puffer denaturiert zunächst RNasen. Anschließende Zugabe von Ethanol schafft für die RNA optimale Bedingungen um selektiv an die Silica-Gel-Membran der im Kit enthaltenen Spin-Collums zu binden. Durch drei Waschschrte werden etwaige Kontaminationen entfernt und die RNA schließlich in 50 - 80µl in DEPC-Wasser vollständig gelöst. Um etwaige Degradation zu verhindern wurde RNA bei -80° Celsius gelagert.

#### **4.2.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Nukleinsäuregehalt und Reinheit der gewonnenen Proben können mittels spektralphotometrischen Analysen im UV-Bereich bestimmt werden.

Gemessen wird die Extinktion einer im Verhältnis 1:12 mit DEPC-Wasser verdünnten RNA-Lösung bei 260 und bei 280nm. Die Konzentration lässt sich nach folgendem Verhältnis ermitteln:

Eine bei 260nm gemessene Optische Dichte (OD) von 1 entspricht 40µg/ml RNA; demnach ergibt sich:

$$(4.2.2.1) \quad C = OD_{260nm} * E * V$$

C =	Konzentration in
OD <sub>260nm</sub> =	Optische Dichte bei 260nm
E =	Extinktionskoeffizient (40ng/μl für RNA 50ng/μl für DNA)
V =	Verdünnung des Messansatzes

Ferner lässt sich aus dem Verhältnis der bei 260nm zu der bei 280nm gemessenen OD die Qualität der RNA bestimmen. Für eine reine RNA-Isolierung, liegt dieses Verhältnis bei 2,0. Ist die Nukleinsäure-Lösung hingegen mit zum Beispiel Proteinen kontaminiert, ist das Verhältnis um einiges kleiner.

### 4.2.3 Reverse Transkription

Die einzelsträngige RNA dient bei der reversen Transkription als Matrize zur Synthese eines komplementären DNA Stranges (cDNA). Die so hergestellte cDNA ist widerstandsfähiger als RNA, da sie nicht durch RNasen degradiert werden kann. Zudem ist die Synthese von cDNA Voraussetzung für die Polymerasekettenreaktion, die DNA-abhängige Polymerasen verwendet. Die Synthese erfolgte mit dem cDNA Synthesis Kit der Firma Bioline.

Ein Ansatz enthält pro Probe 2μg/μl RNA, dieser wurde für den Probenmix zunächst mit DEPC-Wasser gemischt. Die Menge ist dabei variabel und hängt von der RNA-Konzentration der Stammlösung ab. Es wurde so viel DEPC behandeltes Aqua bidest. hinzugefügt, dass das Gesamtvolumen eines einfachen Ansatzes der Reversen Transkription 20μl betrug. Die verdünnte RNA wurde anschließend 10 Minuten lang bei 70°C im Thermocycler inkubiert und anschließend in Eis abgekühlt, um zunächst Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, bevor der Reaktionsansatz hinzugefügt wurde.

#### Reaktionsansatz:

5x Reaktionspuffer:	4μl
Hexanucleotidprimer:	4μl
Nucleotide (25mM :)	0, 4μl
Reverse Transkriptase:	0, 25μl

Der gesamte Ansatz wurde für 55 Minuten bei 42°C inkubiert und die Reaktion schließlich durch 15 minütiges Erhitzen auf 70°C beendet. Die so synthetisierte cDNA ist sofort für die Polymerasekettenreaktion einsetzbar, ihre Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 4.2.4 SYBRgreen™ basierte Real Time PCR

Die Echtzeit-Reverse Transkriptions-PCR (real time RT-PCR) mit SYBRgreen™ erfolgte mit dem AbiPrism 7000 Sequence Detection System, basierend auf dem von Schmittgen et al. vorgestellten Prinzip (Schmittgen et al. 2000). Die Quantifizierung erfolgt relativ, das bedeutet, die in der Probe vorhandene RNA-Menge des gewählten Zielgens wird hierbei als Vielfaches eines Referenzgenes, wie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dargestellt. Die Genexpressionsanalysen wurden nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

SYBR-Green:	8,26µl
HPLC-Wasser:	5,3µl
Vorwärtsprimer:	1µl
Rückwärtsprimer:	1µl
cDNA:	1µl

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription von RNA in cDNA ist eine Abwandlung der klassischen PCR, wie sie von Mullis et al. vorgestellt wurde (Mullis et al. 1986). Voraussetzung ist der Fluoreszenzfarbstoff SYBRgreen™, der unter Zunahme der Fluoreszenzintensität in die doppelsträngige DNA-Helix interkaliert. Es entsteht ein fluoreszierender Komplex, der Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$  absorbiert und bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$  emittiert. Am Ende eines PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz der gebildeten DNA Doppelstränge gemessen, was eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung über die Zeit ermöglicht. Im verwendeten Mastermix ist zudem der Fluoreszenzfarbstoff ROX enthalten, welcher als Standard zum Ausgleich von Pipettierfehlern dient. Division der Emissionsintensität von SYBRgreen™ durch die von ROX ergibt den sogenannten Rn (normalized reporter). Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Produktmenge und wird als sog. Rn-Wert (normalized reporter) bezeichnet.

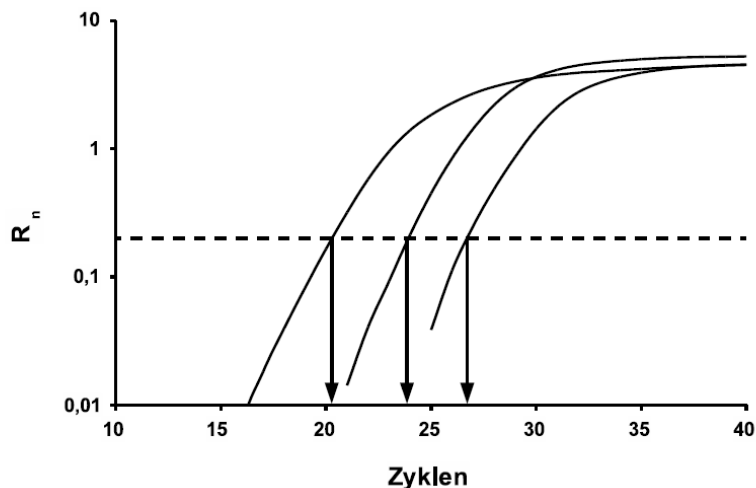


Abbildung 4-A Beispielhafte Darstellung der Produktamplifikation

Die PCR-Maschine stellte die Produktamplifizierung graphisch dar durch Auftragung der  $R_n$ -Werte (Ordinate) gegen die Zyklenzahl (Abszisse) (siehe Abb. 4-A). Zur Qualitätskontrolle wurde eine Dissoziationskurve der amplifizierten DNA in einem Bereich von 60 bis 100°C erstellt. Die Auswertung erfolgte durch Analyse der  $C_t$ -Werte (*threshold cycle*: Schwellenwertzyklus) für alle erhaltenen Kurven. Hierzu wurde ein konstanter  $R_n$ -Wert festgelegt, der alle Kurven im logarithmischen Amplifikationsbereich schneidet. Die zu diesem  $R_n$ -Wert gehörigen Zyklenzahlen ( $C_t$ -Werte) wurden von der Maschine automatisch als Abszissenwerte der jeweiligen Schnittpunkte der Kurven abgelesen und tabellarisch zusammengestellt. Zudem ist die Repräsentierung einer ursprünglichen RNA-Sequenz im Real Time PCR-Ansatz abhängig von der Menge der eingesetzten cDNA und der cDNA-Synthese-Effizienz. Aufgrund dessen wird zur Quantifizierung in der Regel ein Referenz-Gen herangezogen (*House-keeping-Gen*, z.B. GAPDH). Die Normierung relative Expression ( $E_r$ ) des Zielgens (Z), normiert auf GAPDH erfolgte gemäß der Beziehung:  $E_r = 1/2^{\Delta C_t}$ , mit  $\Delta C_t = C_t(z) - C_t(\text{GAPDH})$ .

Die Primer wurden von der Firma Biomers, Ulm, hergestellt, HPLC gereinigt und lyophilisiert geliefert. Mit destilliertem Wasser wurde eine Konzentration von 100pmol/ $\mu\text{l}$  eingestellt zur Lagerung bei -20°C. Die Gebrauchslösungen der Primer wurden durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf 4pmol/ $\mu\text{l}$  gewonnen. Die Primersequenzen sind unter 3.10 aufgelistet. Die Effizienz der Primer sowie ihre ideale Annealing-Temperatur wurden vorab experimentell bestimmt. Hierfür wurde für das jeweilige System zunächst die benötigte Annealing-Temperatur annäherungsweise mit-

tels des Programmes *Gene Runner 3.0 (Hastings Software Inc.)* abgeschätzt und experimentell optimiert.

#### 4.2.5 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen erfolgten mit dem Programmpaket IBM SPSS, Version 21 (IBM, Armonk, NY, USA). Einfache paarweise Vergleiche zweier Gruppen erfolgten mit dem Student-t-Test für ungepaarte Stichproben, auf dem Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ . Fehlerbalken in den Abbildungen sind als Standardabweichung (SD) oder Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) in den jeweiligen Abbildungen ausgewiesen. Die durchgeführten Analysen waren hierbei explorativ, weshalb nichtadjustierte p- beziehungsweise alpha-Werte genutzt wurden. Mitbeachtet wurden hierbei die Holm-adjustierten Werte der Analyse.

### 4.3 LOH-Untersuchung

#### 4.3.1 LOH-PCR

Für die Loss of Heterozygosity (LOH) -Untersuchung wurde die DNA jeweils aus den korrespondierenden Blut- und Tumorproben eines Patienten extrahiert. Hierfür wurden das QIAamp DNA Blood Mini Kit, beziehungsweise das QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen, Venlo, NL gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die so isolierte DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Zur Detektion von Allelverlusten im NF2-Gen fanden die Mikrosatellitenmarker D22S929, D22S268 und D22S421 Verwendung.

##### Reaktionsansatz LOH-PCR:

10x Reaktionspuffer	2,5µl
Nukleotide (dNTP)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5µl
F-Primer	2µl
R-Primer	2µl
Aq.dest.	14,5µl
Polymerase	0,1µl
cDNA	1µl

---

PCR-Protokoll:

1. 95°C: 10min
2. 94°C: 1min
3. 72°: 1:30h  
(Wiederholung ab Schritt 2 für 30Zyklen)
4. 72°C: 10min zur Abschließenden Polymerisation

### **4.3.2 Gene-Scan Auswertung**

Die Analyse der genomischen DNA auf Heterozygotieverlust erfolgte mit Hilfe des ABI Prism 310 Genetic Analyser und der zugehörigen GeneScan Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sie erlaubte die Detektion der PCR-Produkte aufgrund der Fluoreszenz-Markierung der PCR-Primer (6-FAM) und wies die Peaks automatisch definierten Fragmentlängen (Allelen) zu anhand des mit auf die Kapillare gegebenen Längenstandards (ROX-500, Applied Biosystems). Bei Vorliegen von zwei Allelen mit detektierbarem Längenunterschied im Blut (informativer Locus) wurde geprüft, ob eines dieser Allele im zugehörigen Tumor fehlte (LOH).

## **4.4 Immunhistochemische Färbung**

Für die Anfertigung des Tissue Microarray (TMA) wurden in einen leeren Paraffinblock (Rezeptor-Block) Stanzen des zu untersuchenden Gewebes (Donor-Block) eingebracht. Hierbei handelte es sich um insgesamt 55 Proben humaner Meningeome aus der Sammlung des Instituts für Neuropathologie Magdeburg. Dafür wurde der Manual Tissue Arrayer MTA-1<sup>®</sup> (Alpha Metrix Biotech<sup>®</sup>, Rödermark, D) verwendet. Von den Proben in Paraffin wurden pro Probe 3 Stanzen aus dem Donor-Block in den Rezeptor-Paraffinblock übertragen. Von dem so entstandenen Rezeptor-Block wurden dann mit dem Schlittenmikrotom (Leica<sup>®</sup>, Solms, D) mehrere Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend entparaffiniert. Hierfür wurden sie zunächst mit Protax-Clear, einem Xylol-Ersatz, versetzt und dreimal 10 min inkubiert. Anschließend wurde den Schnitten Ethanol in absteigender Konzentration zugesetzt. Angefangen mit Ethanol 100%ig zweimalig für jeweils 5 min, danach zweimalig Ethanol 96%ig für jeweils 5 min und anschließend Ethanol 70%ig für 5 min. Die Schnitte wurden im nächsten

---

Schritt mehrfach mit destilliertem Wasser gespült und mit TBS-Tween20 für 20 min im Dampfgerar erhitzt. Anschließend erfolgte dann das Abkühlen unter Zimmertemperatur für 10 min.

In den nachfolgenden Schritten wurden die Schnitte dann dreimal mit destilliertem Wasser für je 5 min und anschließend für 10 Minuten mit 3%igem Wasserstoffperoxid gewaschen. Darauffolgend wurden die Objektträger für 1 h in Blockierlösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die primären Antikörper für E-Cadherin beziehungsweise die Transkriptionsfaktoren in einer Verdünnung von 1:100 (E-Cadherin, Snail, Slug, Zo-1, Twist) beziehungsweise 1:200 (Zeb-1) zugegeben und über Nacht inkubiert. Die primären Antikörper wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween 20 für je 5 min entfernt. Anschließend wurden 1-3 Tropfen SignalStain<sup>®</sup> auf die Objektträger aufgetragen und diese bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Daran schlossen sich drei Waschschritte für jeweils 5 Minuten mit TBS-Tween 20 an. Die Proben wurden danach mit 1 ml SignalStain<sup>®</sup>-DAB Diluent 30µl SignalStain<sup>®</sup>-DAB Chromogen Concentrate behandelt. Von dieser Lösung wurden dann jeweils 200µl für 10 Minuten auf beide Objektträger gegeben. Die Lösungen wurden durch das einmalige Eintauchen in destilliertem Wasser entfernt. In den folgenden Schritten wurden die Kerne entsprechend der Hämatoxylin-Färbung angefärbt. Die Objektträger wurden danach für jeweils 5 Minuten zweimalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Dehydrierung wurden die Objektträger zweimalig für 10 s in 95%igem Alkohol und danach erneut zweimalig für 10 s in 100%igem Alkohol inkubiert. Zum Abschluss erfolgte die Inkubation mit Protax-Clear zweimalig für jeweils 10s und die Aufbringung eines Deckglases auf die Proben mit Kanada-Balsam. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch. Hierbei hoben sich die Kerne violett und die jeweils markierten Proteine bräunlich ab. Negativkontrollen umfassten Testfärbungen nach Weglassen des primären Antikörpers.

Die zytoplasmatische Färbung von Tumorzentrum und Tumorrandszone der 55 Tumoren wurde semiquantitativ durch den Verfasser analysiert. Dabei wurde eine zweistufige Bewertung vorgenommen. Waren mehr als 50% der Zellen angefärbt wurde die Färbung als positiv bewertet.



---

## 4.5 Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$

Für die Behandlung wurden die Zellen in 6-Well Platten eingesät. Für 24 Stunden wurden die Zellen bei 0% Serumzusatz zum Medium ausgehungert, bevor sie behandelt wurden. Rekombinantes TGF- $\beta$  wurde in einer Konzentration von 5ng je ml Medium, für 48 Stunden hinzugefügt. Für jeden behandelten Ansatz wurde je eine Kontrolle mitgeführt, die analog ausgehungert, jedoch ohne TGF- $\beta$  Zusatz belassen wurde.

Nach Beendigung der jeweiligen Behandlung wurde zunächst die Morphologie der Zellen beurteilt, bevor sie entweder zur RNA- oder Proteinisolation eingesetzt wurden.

## 4.6 Proteinbiochemische Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden soweit möglich auf Eis durchgeführt, um das Risiko der Denaturierung durch Wärme möglichst gering zu halten.

### 4.6.1 Proteinisolierung aus Gewebe

Für die Proteinisolierung wurden circa 30mg Gewebe von der bei -80°C kryokonservierten Tumorprobe abgenommen und mit etwa 300 $\mu$ l frisch angesetztem Lysispuffer überschichtet. Anschließend wurde das Gemisch elektrisch mit dem Ultra-Turrax Dispergiergerät homogenisiert und dann weitere 10min bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die Lagerung von Proteinen erfolgte bei -80°C.

### 4.6.2 Proteinisolierung aus Zellen

Das Zellmedium wurde entfernt und die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Zellkulturflasche für einige Minuten aufrecht stehen gelassen, damit möglichst viel PBS sich am Boden sammelt und mit einer Pipette abgenommen werden kann.

Je nach Konfluenz der Zellen wurden dann zwischen 50 und 300 $\mu$ l Lysispuffer zugegeben und für 10min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und in eine Ecke des Zellkulturflasche geschoben und schließlich mit einer Pipette abgenommen und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde zum Aufschluss mit 10 Pulsen ultraschalliert,

---

bevor sie wiederum bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert wurde. Der so erhaltene Überstand wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung von Proteinen erfolgte bei -80°C.

### 4.6.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels einer nach Lowry modifizierte Methode (Peterson 1979). Dazu wurde der „DC Protein-Assay“ der Firma BioRad gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die quantitative Proteinbestimmung beruht hierbei auf zwei Reaktionen: In einer Biuretreaktion bilden Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen blauviolette Komplexe. Daran anschließend wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert, welches dann seinerseits ein Gemisch aus Phosphomolybdat und Phosphowolframat (Folin-Ciocalteu Reagenz) zu Molybdänblau reduziert. Die intensive Blaufärbung dieser Reaktion kann photometrisch gemessen und zur Quantifizierung des Proteins herangezogen werden. Als Eichprobe diente verdünntes bovines Serumalbumin.

Zu 5 µl der zu analysierenden Proteinlösung sowie je 5 µl einer BSA-Verdünnungsreihe (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0µg/µl) wurden in einer Mikrotitrierplatte 200 µl Reagenz B sowie 25µl des Reagenzgemisches A/S in die Vertiefung der Mikrotitrierplatten gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Messung der Extinktion des Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 550nm und deren Auswertung durch die Software Magellan 3.1. Aus jeweils zwei Proben pro Bedingung wurde die durchschnittliche Proteinkonzentration durch Vergleich mit der Standardkurve ermittelt.

## 4.7 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Denaturierte Proteine wurden hierbei nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das im Probenpuffer enthaltene SDS bindet an die denaturierten Proteine und bedingt deren negative Ladung. Da die spezifische Ladung dabei näherungsweise konstant ist, werden die SDS-Komplexe im Gel nur ihrer Molmasse nach aufgetrennt.

Bei der hier verwendeten Methode nach Laemmli (Laemmli 1970), erfolgte durch ein Sammelgel, in dessen Taschen jeweils ein Aliquot des zu untersuchenden Proteingemisches pipettiert wird, eine Fokussierung der Proteine an der Grenze zwischen Trenngel und Sammelgel. Zur Auftrennung der Proteine wurden Trenngele mit einer Konzentra-

---

tion von 8 % bzw. 15 % Acrylamid, je nach Molekulargewicht der später im Westernblot darzustellenden Proteine, verwendet. Das Sammelgel hatte stets eine Konzentration von 4 % Acrylamid.

#### **4.7.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels**

Für das Gießen der vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gele und die Elektrophorese wurde das Mini Protean II System der Firma BioRad verwendet. Zunächst wurde das Trenngel zwischen den Glasplatten des Gelgießstandes gegossen, wobei ein Raum von etwa 2 cm unterhalb des oberen Randes der kleineren Glasplatte für das Sammelgel freigelassen wurde. Durch einen Platzhalter von 0,7 mm Dicke wurde der Abstand der beiden Glasplatten voneinander definiert. Bis zur vollständigen Auspolymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um am Ende eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Vor Hinzufügen des Sammelgels wurde das Isopropanol abgegossen. Auf das Trenngel wurde die Mixtur für das Sammelgel gegossen, und ein Kamm zur Herstellung der Taschen für das Einfüllen der Proteingemische hineingesteckt.

#### **4.7.2 Elektrophorese**

Nach Einbringen der Gele in die vertikale Elektrophoresekammer und Überschichtung mit Laufpuffer wurden die Kämmen aus dem polymerisierten Sammelgel gezogen. In die entstandenen Taschen wurden zwischen 40 und 60 µg je nach zu untersuchendem Protein des Gemisches, sowie ein Proteinstandard pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150V, bis das Bromphenolblau-Band des Probenpuffers am Unterrand des Gels herausgelaufen war.

#### **4.7.3 Proteintransfer durch Blot**

Nach der so erfolgten elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine polymere Nitrozellulose-Membran aufgebracht. Die verwendeten Membranen zeichnen sich durch eine hohe Bindungskapazität, niedrigen unspezifischen Hintergrund sowie hohe mechanische Stabilität aus. Das so entstehende Muster spiegelt exakt das Muster auf dem Gel wider.

Eine Transferkammer wurde mit einem Fließ ausgelegt, auf die zwei 3mm Whatman-Papier-Rechtecke gelegt wurden. Darauf wurde zunächst das Gel, anschließend die Nitrozellulose-Membran aufgebracht. Darauf folgten wiederum zwei Whatman-Papiere, auf die ein weiteres Fließ gelegt wurde. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luft-

blasen zwischen Gel, Nitrozellulose und Whatman-Papier befanden, ebenso wurden alle Materialien durchgehend mit Transferpuffer feucht gehalten.

Der Transfer wurde bei einer Spannung von 200V und einer Stromstärke von 0.5 - 0.6A für 90 Minuten durchgeführt. Die Membran wurde anschließend in 5%ige Blockierlösung überführt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

#### **4.7.4 Markierung mit spezifischen Antikörpern**

Nach der Blockierung wurde der entsprechende Antikörper in der jeweils vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in BSA und TBST über die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit PBS-T gewaschen, bevor sie wiederum 1h mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (mouse oder rabbit) inkubiert wurde.

Darauf folgten zwei weitere Waschschrirte in PBS, bevor die Membran mit Immobilon-ECL-Lösung der Firma Merck Millipore, Darmstadt, behandelt wurde, deren Signal mithilfe des Entwicklersystems der Firma Agfa sichtbar gemacht und anschließend digital gescannt wurde.

---

## 5 Ergebnisse

### 5.1 EMT-Marker in Meningeomen

In der Literatur wird eine Reihe von molekularen Markern für die EMT vorgeschlagen (Lee 2006; Kalluri und Weinberg 2009). Besondere Bedeutung kommt hierbei E-Cadherin sowie den E-Cadherin-assoziierten Transkriptionsfaktoren Slug, Snail, Twist und Zeb-1 zu. Diese Marker und das Tight-Junction Protein Zonula occludens 1 (ZO-1) werden im Folgenden untersucht.

#### 5.1.1 Charakterisierung der Meningeom-Subtypen auf Transkriptionsebene

Um die Expression der ausgewählten Marker auf Transkriptionsebene (mRNA-Level) zu vergleichen, wurde die real time RT-PCR verwendet.

Zunächst wurde die Expression vergleichend zwischen verschiedenen Subtypen von WHO-Grad I Meningeomen betrachtet. Hierbei wurden 19 meningotheliale und 14 mit fibroblastischem beziehungsweise transitionalem Subtyp verglichen, wobei die Zusammenfassung der beiden letztgenannten Subtypen (summarisch ‚fibroblastisch‘ in den Abbildungen) unter Berücksichtigung der histologischen Ähnlichkeit erfolgte, um statistisch verwertbare Fallzahlen zu erhalten.

Die Ergebnisse der Real-Time PCR sind in Abbildung 5-A dargestellt. Hierbei zeigt **A** die Expression der gewählten Marker auf mRNA-Ebene. Im Vergleich zeigen die fibroblastisch/transitionalen Meningeome eine diskrete, nicht statistisch signifikante Erhöhung der mRNA Expression von E-Cadherin und Zonula-Occludens-1. Gleichzeitig sehen wir eine statistisch signifikante Herabregulation der Expression von Zeb-1 und Twist und eine gleichsinnige (nicht signifikante) Herabregulation von Slug. Unter den potenziell E-Cadherin reprimierenden Transkriptionsfaktoren reagiert demgegenüber Snail genau entgegengesetzt.

Trotz der entsprechend veränderten Morphologie ist klar zu erkennen, dass die Expressionsmuster auf mRNA-Ebene nicht die denkbare Hypothese einer EMT vom epithelialen zum fibroblastischen Subtyp stützen. Die Änderungen der Expressionsmuster verhalten sich eher umgekehrt, als für diesen Fall zu erwarten wäre.

---

### 5.1.2 Charakterisierung auf Proteinebene

Um die Ergebnisse der Real-Time PCR zu bestätigen, wurde die Proteinexpression der EMT-Marker exemplarisch an vier zufällig ausgewählten meningothelialen und drei fibroblastischen Meningeomen untersucht. Die Ergebnisse der Westernblotanalyse sind in Abbildung 5-A **B** dargestellt.

Es zeigt sich hierbei, dass die E-Cadherin Expression der verglichenen Subtypen in etwa gleich ist, was mit den Ergebnissen der PCR übereinstimmt. Ausgeprägter ist dieser Unterschied für den Marker Zonula-Occludens, dessen Protein in den fibroblastischen Meningeomen deutlich vermindert erscheint. Bei Betrachtung der Transkriptionsfaktoren Snail und Slug fällt auf, dass Snail annähernd gleichmäßig in den betrachteten Tumoren verteilt ist, Slug jedoch in den meningothelialen Meningeomen stärker exprimiert wird als in denjenigen mit fibroblastischem Subtyp.

Durch das gegenüber der mRNA-Analyse stark abweichende Verhalten des Zellkontaktproteins Zo-1 und des Transkriptionsfaktors Snail ergab die Darstellung der korrespondierenden Proteine an dieser nur kleinen für die Proteinbiochemie verfügbaren Auswahl von Fällen keine wesentliche Zusatzinformation. Immerhin liefert jedoch auch die Proteinanalytik wegen der relativen Konstanz des wichtigsten epithelialen Markers E-Cadherin keinen glaubwürdigen Hinweis auf eine EMT beim fibroblastischen Subtyp.

### 5.1.3 Immunhistochemische Färbung

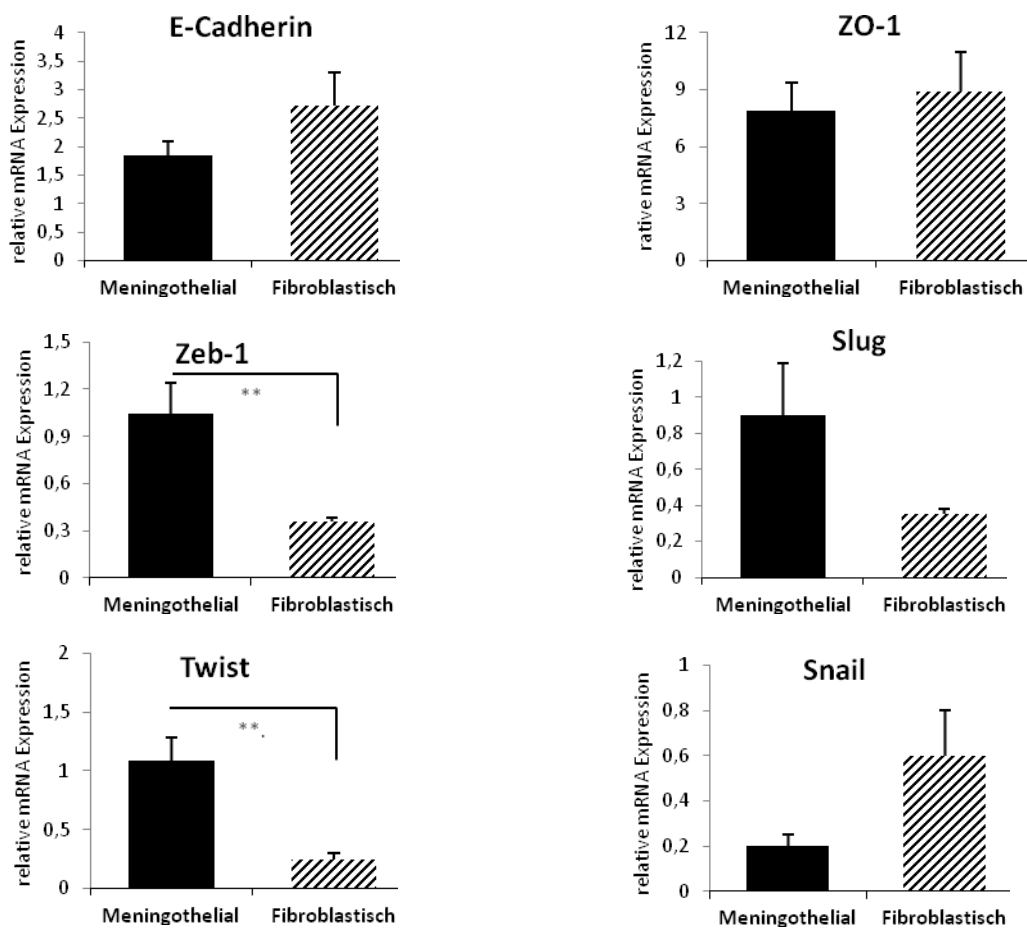
Die zusätzlich durchgeführte immunhistochemische Färbung einer Auswahl der gewählten Marker erbrachte die in Abbildung 5-A **C** dargestellten Ergebnisse. Analog zu den mRNA Daten zeigt sich hier kein wesentlicher Unterschied zwischen den Subtypen in Bezug auf die beiden Zellkontaktproteine. Auch bezüglich der Transkriptionsfaktoren waren die Unterschiede in diesem lediglich qualitativen Test gering, wie auch Tabelle 5-1-3 zeigt.

Tabelle 5-1-3 Immunoexpression in WHO-Grad I Meningeomen

	Meningothelial	Fibroblastisch/Transitional
<b>E-Cadherin</b>	10/10 (100%)	12/14 (86%)
<b>Slug</b>	10/10 (100%)	14/14 (100%)
<b>Zeb-1</b>	7/9 (78%)	9/13 (69%)
<b>Snail</b>	9/10 (90%)	12/14 (86%)
<b>Twist</b>	8/9 (89%)	6/6 (100%)

Abbildung 5-A

A



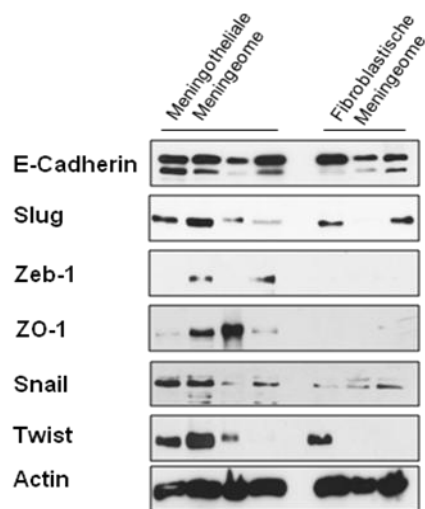
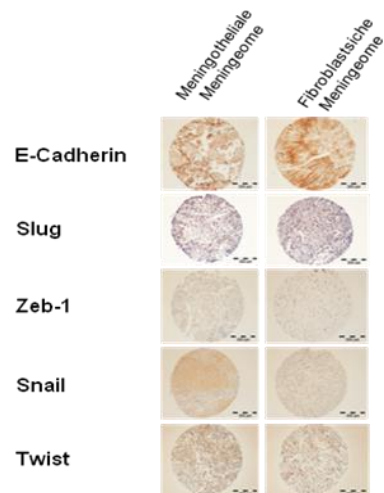
**B****C**

Abbildung 5-A: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Expression **A** der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin abhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp in WHO-Grad I Meningeomen. **B** zeigt die Expression ausgewählter Marker auf Proteinebene. **C** zeigt immunhistochemische Färbung von E-Cadherin und E-Cadherinabhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit des histologischen Subtypen.

## 5.2 Vergleich unterschiedlicher WHO-Grade

Ausgehend von der Überlegung, dass bereits die häufigsten WHO-Grad I-Subtypen zumindest auf mRNA-Ebene ein unterschiedliches Expressionsmuster der gewählten Marker aufwiesen, erschien es sinnvoll, die WHO-Grade miteinander zu vergleichen. Diese sind ebenfalls durch unterschiedliche morphologische Merkmale, aber vor allem durch unterschiedlich aggressives biologisches Verhalten voneinander abgrenzbar.

### 5.2.1 Expression auf Transkriptionsebene

Verglichen wurden 36 als benigne WHO-Grad I klassifizierte Tumoren mit 11 höhergradigen, davon 7 WHO-Grad II und vier WHO-Grad III, Tumoren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-2 A dargestellt. Auf Grund der relativ geringen Fallzahl wurden die WHO-Grade II und III zusammenfassend betrachtet. Es konnte eine signifikante Herabregulation der Marker E-Cadherin, sowie Zonula-Occludens-1 in den Grad II/III Meningeomen gezeigt werden. Dies geht mit einer Mehrexpression von Slug und Zeb-1 einher, die ebenfalls ein signifikantes Niveau erreicht, während die Expression von Twist und Snail keine signifikanten Unterschiede zeigt. Überwiegend sind diese Ergebnisse mit dem Konzept der EMT bei höheren Tumorgaden zu vereinbaren, hierbei



muss jedoch die, wenn auch nicht signifikante Tendenz der herab regulierten Twist-Expression in den höhergradigen Meningeomen ausgenommen werden.

### **5.2.2 Expression auf Proteinebene**

Zur genaueren Analyse wurden einige der gewählten Marker zusätzlich durch Westernblotanalyse auf Proteinebene in je drei WHO-Grad I beziehungsweise WHO-Grad II Meningeomen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-2 **B** dargestellt.

Es zeigt sich, dass die Expression des E-Cadherins keine deutlichen Unterschiede zwischen den Graden der WHO Klassifikation aufweist.

Deutliche Unterschiede lassen sich im Westernblot aber für die Expression der Transkriptionsfaktoren Slug und Zeb-1 erkennen, die in den WHO-Grad I Meningeomen stärker nachgewiesen werden konnten als in den WHO-Grad II Meningeomen. Es muss bemerkt werden, dass diese Muster den Expressionstrends der mRNA-Analyse nicht entsprechen. Allerdings ist zu bedenken, dass wiederum nur eine kleine und somit möglicherweise nicht repräsentative Auswahl von Tumoren für die Proteinbiochemie zur Verfügung stand, vor allem keine WHO-Grad III Meningeome. Ein Vergleich mit der immunhistochemischen Färbung (siehe Abbildung 5-B **C** zeigt hingegen, dass selbst eine qualitative Methode bei einem hinreichend großen Kollektiv auf dem Gewebe-Mikro-Array eine deutliche Absenkung der Positivität für den im Rahmen der EMT wichtigsten epithelialen Marker E-Cadherin in den malignen Meningeomen (Grad III) fand.

### **5.2.3 Immunhistochemische Färbung**

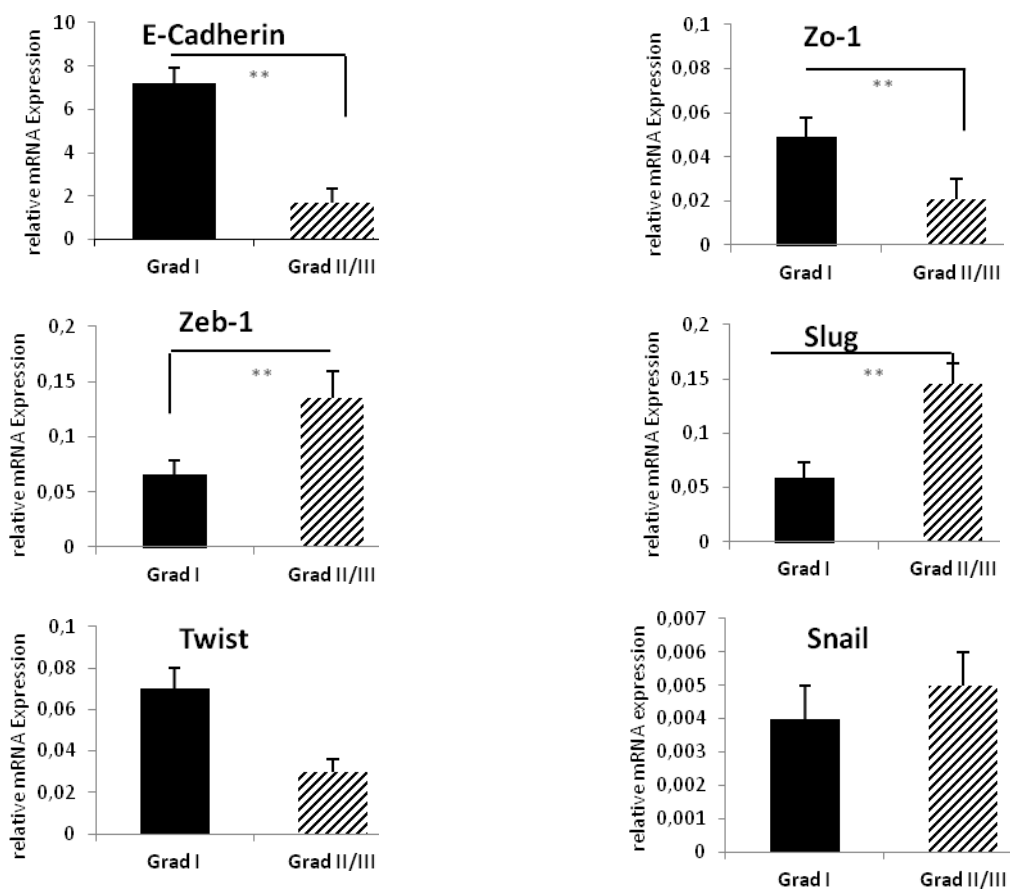
Die in Tabelle 5-2-3 dargestellt sind zeigen, dass der Anteil der E-Cadherin positiven Tumoren in den anaplastischen Meningeomen reduziert ist, während die Transkriptionsfaktoren ein ausgeglichenes Expressionsverhalten zeigen. Beispiele des TMA sind in 5-2-C dargestellt.

Tabelle 5-2-3 Immunoexpression in verschiedenen WHO-Graden

	WHO-Grad I	WHO-Grad II	WHO-Grad III
<b>E-Cadherin</b>	29/31 (94%)	11/12 (92%)	5/9 (56%)
<b>Slug</b>	13/13 (100%)	8/8 (100%)	2/4 (50%)
<b>Zeb-1</b>	21/28 (75%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)
<b>Snail</b>	21/28 (75%)	9/12 (75%)	5/7 (71%)
<b>Twist</b>	15/17 (88%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)

Abbildung 5-B

A



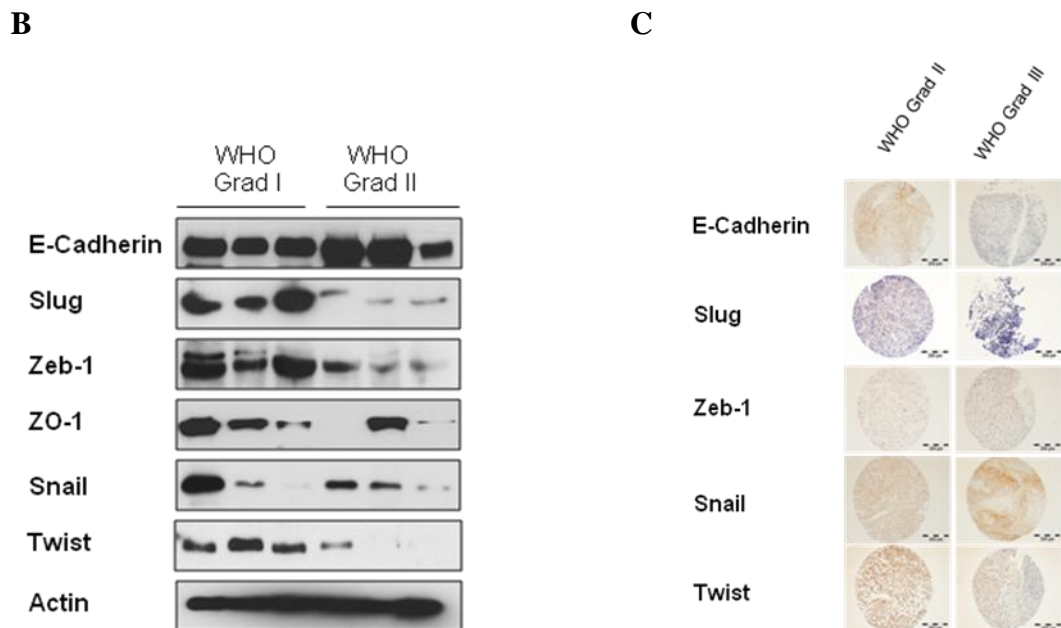


Abbildung 5-B Mittelwerte der relativen Expression  $\pm$  Standardabweichung A der gewählten EMT Marker und E-Cadherin abhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom WHO-Grad Abbildung B Westernblotanalyse ausgewählter Marker in WHO - Grad I und Grad II Meningeomen Abbildung C immunhistochemische Färbung ausgewählter Marker in WHO-Grad II und III Meningeomen

### 5.3 Korrelation mit klinischem Verhalten

Die bislang erhobenen Daten legen einen Zusammenhang zwischen klinischem Verhalten und Expressionsmuster nahe. Der vorliegenden Arbeit liegt die in zwischen novellierte 4. Auflage der WHO Klassifikation für Tumore des zentralen Nervensystems von 2007 zu Grunde (Feiden und Feiden 2008). Im Gegensatz zur novellierten Fassung von 2016, werden hier klinische Merkmale, wie die Invasivität jedoch nicht umfassend berücksichtigt, sodass eine Analyse der gewählten EMT-Marker, im Hinblick auf klinisches Verhalten sinnvoll ist.

#### 5.3.1 Invasivität

Um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten, untersuchten wir die Expression der gewählten Marker zunächst in Abhängigkeit von der dokumentierten Invasivität. Als invasiv wurden in diesem Kontext solche Meningeome bezeichnet, die im histologischen Bild eine Hirn-Invasion zeigten. So wurden, unter dieser Fragestellung, 12 invasive Meningeome, darunter 9 WHO-Grad I und drei WHO-Grad II Tumore im Ver-

gleich mit 34 ohne nachgewiesene Invasivität betrachtet. Die erhobenen Daten sind in Abbildung 5-C dargestellt.

Unter Berücksichtigung der Invasivität zeigt sich in Zusammenschau kein eindeutiges Expressionsmuster. Interessant ist, dass solche Meningeome, die invasives Verhalten zeigten, eine Mehrexpression des Transkriptionsfaktors Twist aufweisen. Demgegenüber steht jedoch eine überwiegend ausgeglichene Expression der übrigen Transkriptionsfaktoren.

Vergleicht man nun diese Daten mit dem mRNA Expressionsmuster der unterschiedlichen WHO-Grade so zeigen sich Unterschiede: Die signifikante Absenkung in der Expression der Zellkontakt-Proteine E-Cadherin und ZO-1 bei Tumoren höheren Grades (s. Abb. 5-B A) fand sich nicht in gleicher Weise bei den invasiven Tumoren wieder, obwohl hier eine höhere migratorische Potenz vermutet werden könnte.

**Abbildung 5-C**

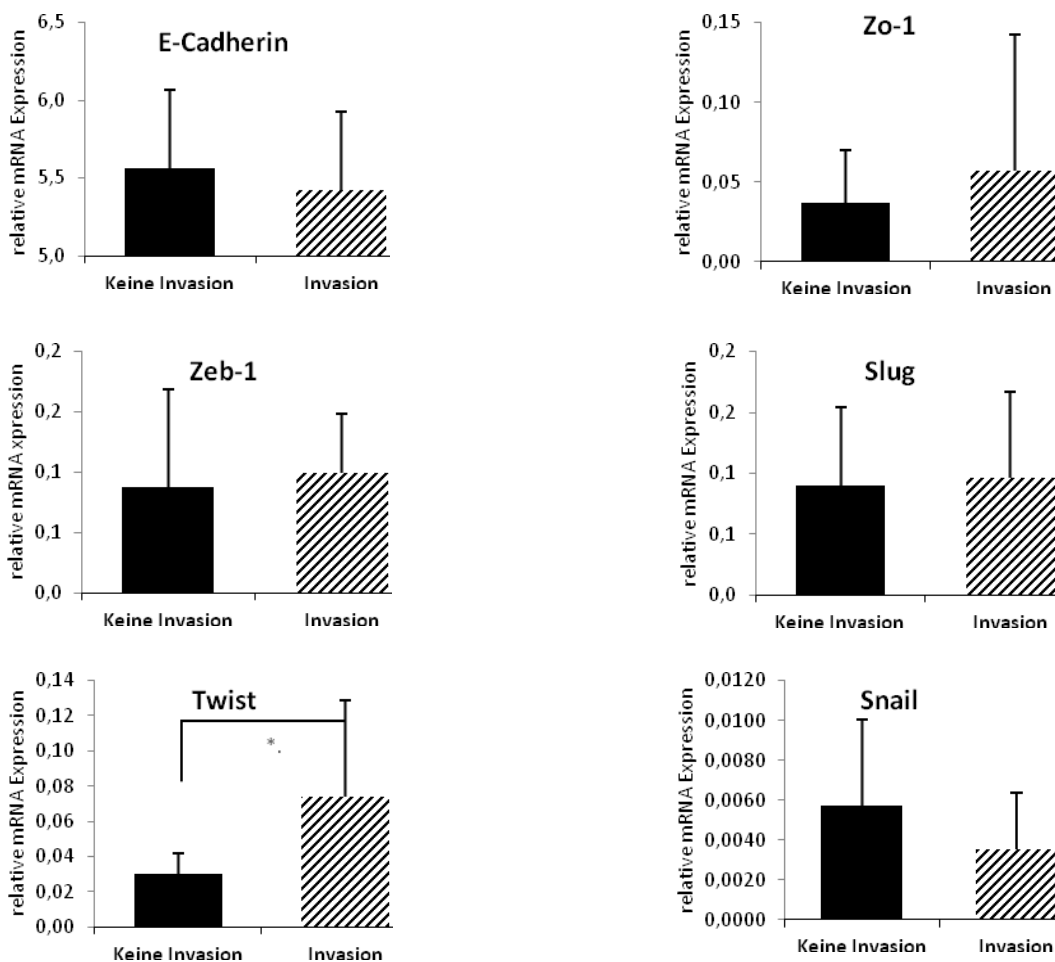
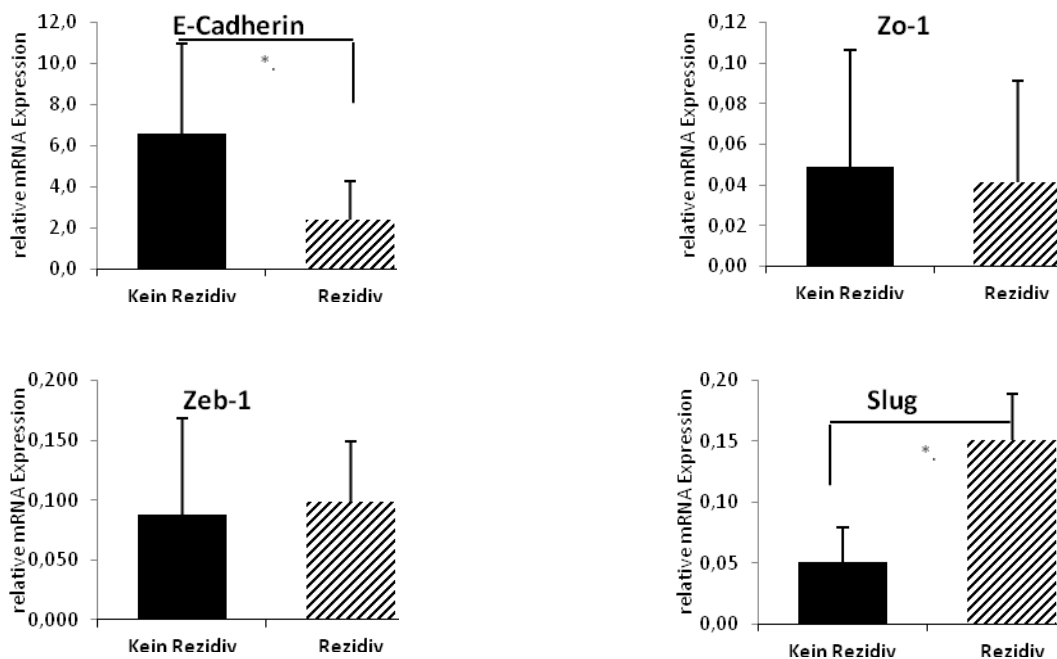


Abbildung 5-C Mittelwerte der relativen Expression  $\pm$  Standardabweichung der gewählten EMT Marker und E-Cadherin abhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von der klinisch dokumentierten Invasivität

### 5.3.2 Rezidiv

In den meisten Fällen lassen sich Meningeome im Rahmen einer kurativen operativen Therapie vollständig entfernen. Ihre Rezidivhäufigkeit variiert zwischen den unterschiedlichen WHO-Graden. Bei gutartigen Meningeomen führt eine vollständige Resektion meist zu einer anhaltenden Heilung. Beim WHO-Grad I Meningeomen liegt die Rezidivhäufigkeit zwischen 7-20 %, bei WHO-Grad II zwischen 30-40 % und bei WHO-Grad III zwischen 50-80 % (İldan et al. 2007). Betrachtet man nun die Expression der gewählten Marker vergleichend in Meningeomen, bei denen im Verlauf ein Rezidiv auftrat, mit solchen, bei denen keines auftrat, so kommt es zu den in Abbildung 5-D dargestellten Ergebnissen. Die Information über Rezidive stammt hierbei aus der Tatsache, dass die Rezidive über das Institut für Neuropathologie diagnostiziert wurden. Besonders interessant ist hierbei, dass die Tumoren, bei denen im Verlauf ein Rezidiv auftrat, eine signifikant geringere Expression von E-Cadherin zeigten und gleichzeitig eine signifikant gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors Slug. Trotz bei den übrigen Proteinen fehlender Signifikanzen passt das Gesamtmuster durchaus zu einer Assoziation zwischen EMT und Rezidiv.

Abbildung 5-D



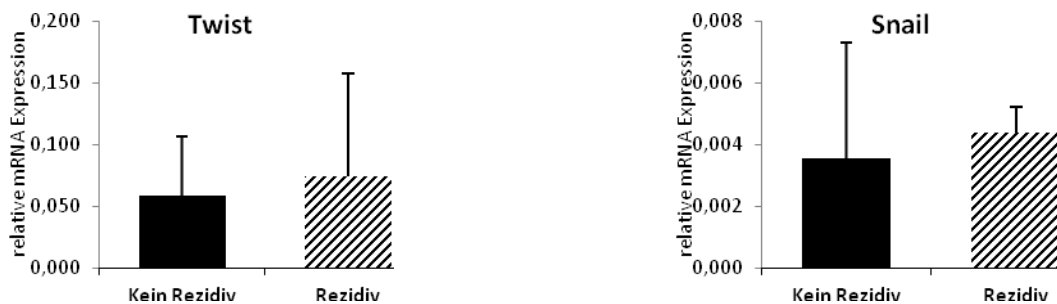


Abbildung 5-D Mittelwerte der relativen Expression  $\pm$  Standardabweichung der gewählten EMT Marker und E-Cadherin abhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom Auftreten von Rezidiven

### 5.3.3 Heterozygotieverlust im NF2-Gen

#### 5.3.3.1 Humane Tumoren

In mehr als der Hälfte aller sporadischen Meningeome lassen sich Heterozygotieverluste (LOH) im Neurofibromatose-Gen 2 nachweisen. Es gibt Hinweise darauf, dass das Tumorsuppressorprotein durch Interaktion mit E-Cadherin funktioniert und NF2 Verlust im Meningeom mit dem Verlust der kontaktabhängigen Wachstumshemmung und mit einem höheren Metastasierungspotential einhergeht (Morrison 2001; Lallemand et al. 2003; Claus et al. 2005; Striedinger et al. 2008). Aus diesem Grund wurde die Expression der EMT Marker in Bezug auf bekannte LOH im NF2 Gen hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-E dargestellt. Hierbei handelte es sich in der Gruppe der Meningeome mit NF2-LOH um 5 Meningeome, von denen 3 als WHO-Grad I zu klassifizieren sind und 2 als WHO-Grad II. Demgegenüber stehen 7 Meningeome, bei denen nachweislich kein LOH besteht von denen 6 einem WHO-Grad I und eines als WHO-Grad II klassifiziert wurde.

Für den epithelialen Marker E-Cadherin zeigt sich eine annähernde Gleichverteilung der Expression in NF2 defizienten wie auch in den Tumoren mit NF2-Wildtyp. Ähnliches gilt für die E-Cadherin- assoziierten Transkriptionsfaktoren. Zonula-Occludens 1 in der NF2 defizienten Vergleichsgruppe etwa um den Faktor 2 (n.s) mehr exprimiert ist als in den Tumoren mit NF2-Wildtyp. Ein eindeutiger Trend beziehungsweise ein klares Expressionsmuster lässt sich aus den erhobenen Daten nicht ableiten.

Abbildung 5-E

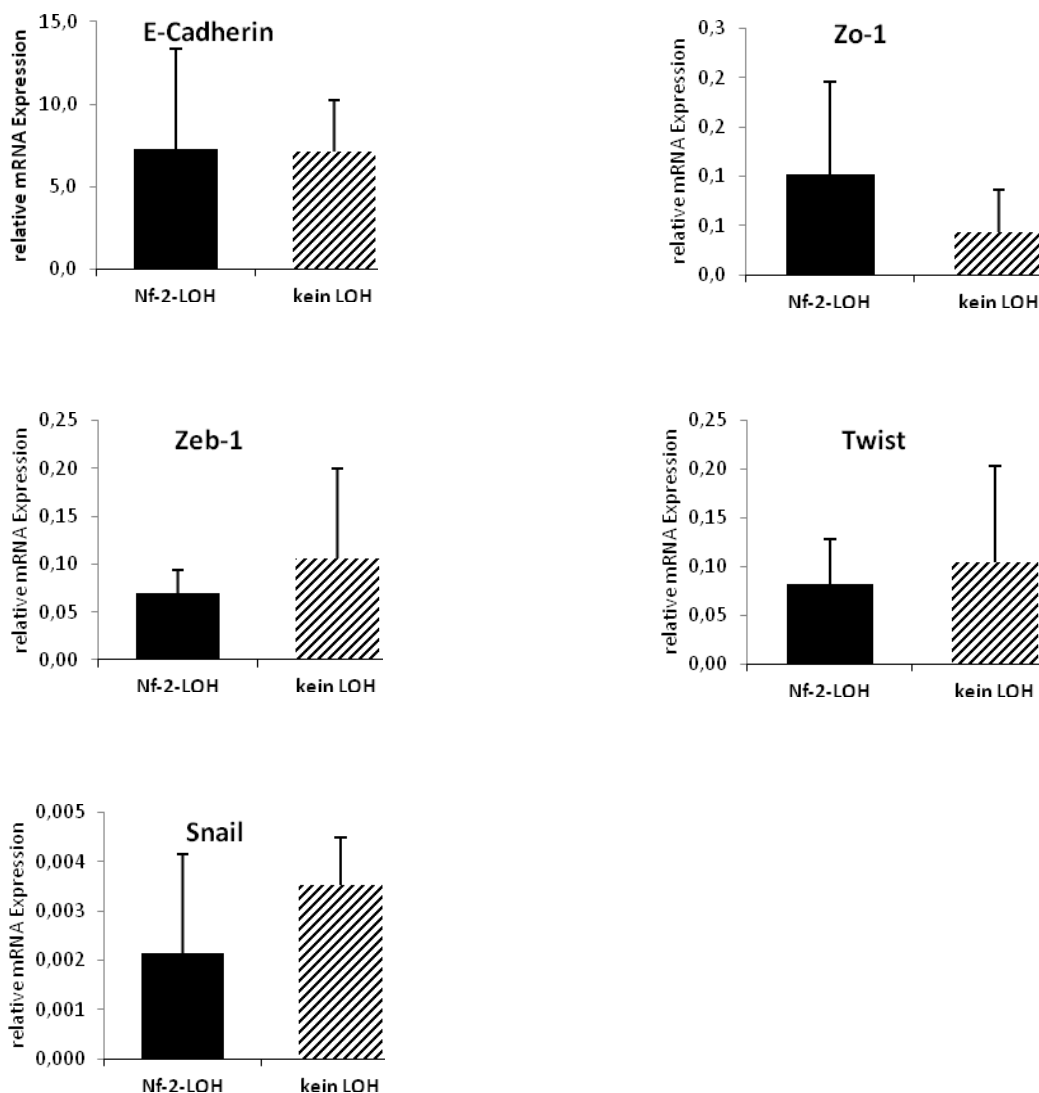


Abbildung 5-E A Mittelwert der relativen Expression  $\pm$ Standardabweichung der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin abhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom NF2 Genstatus der humanen Meningeome

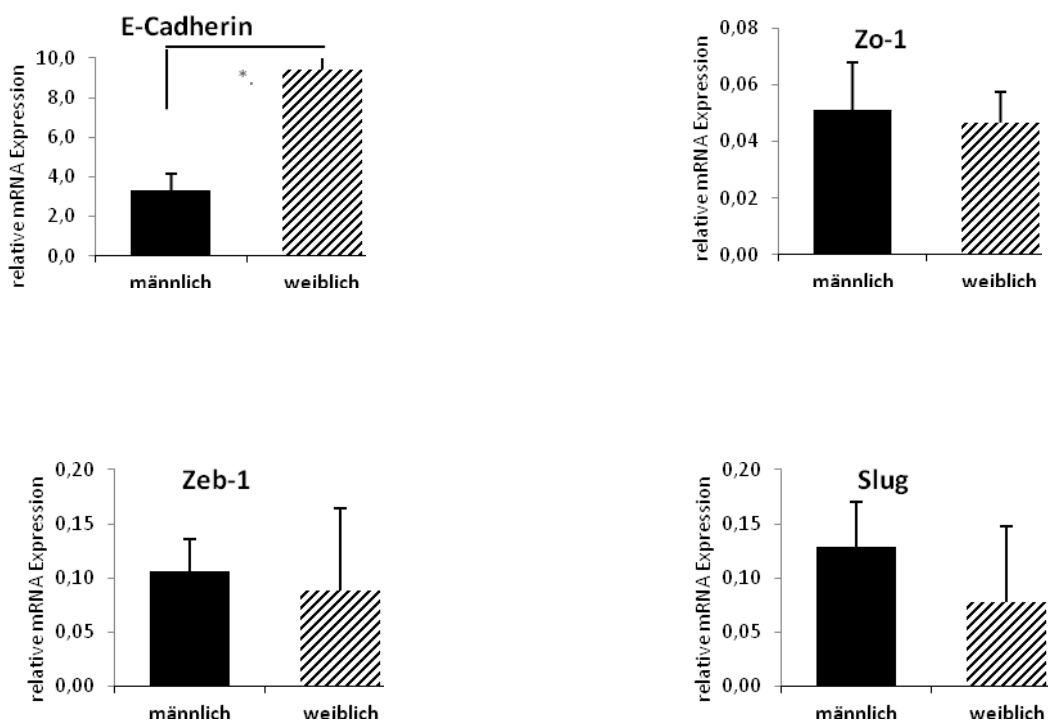
Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von NF2 und den gewählten Markern näher zu beleuchten führten wir zusätzlich eine Korrelationsanalyse durch: Eine statistisch signifikante Korrelation zeigt sich hier zwischen der Expression von NF2 und Zo-1 ( $r = 0,603$ ), E-Cadherin ( $r = 0,560$ ) und Twist ( $r = 0,491$ ). Um dieses Phänomen näher zu beleuchten wurde die Analyse selektiv an den Tumoren mit bekanntem allelischem Verlust auf dem Chromosom 22 (LOH) wiederholt ( $n = 12$ ). Hierbei zeigte sich wiederum eine signifikante Korrelation zwischen der NF2 Expression und den beiden epithelialen Markern E-Cadherin ( $r = 0,637$ ) und Zo-1 ( $r = 0,659$ ). In der Korrelationsanalyse der Meningeome ohne bekannten LOH ( $n = 11$ ), zeigten sich keine statistisch signifikanten Korrelationen.

Wie bereits oben beschrieben, werden Meningeome beim weiblichen Geschlecht bis zu zweimal häufiger gefunden als bei Männern. Dies legt einen Zusammenhang zwischen

dem Auftreten von Meningeomen und dem Einfluss von Sexualhormonen nahe. Es sei auch erwähnt, dass Männer häufiger aggressive oder höhergradige Meningeome entwickeln, sodass zu vermuten ist, dass die Rolle der Hormonstimulation komplex ist (Bigner et al. 2006). Eine vergleichende Betrachtung der mRNA-Expression der EMT Marker bei Männern und Frauen ergab die in Abbildung 5-F dargestellten Ergebnisse. Bei den untersuchten Meningeomen handelte es sich bei den männlichen Patienten um je 6 WHO-Grad I und 6 WHO-Grad II/III Meningeome. In der Gruppe der weiblichen Meningeompatienten wurden 30 WHO-Grad I und 7 WHO-Grad II/III Meningeome betrachtet.

Besonders bedeutsam erscheint der signifikante Unterschied in der Expression von E-Cadherin. Die Expression des epithelialen Markers ist in den Meningeomen weiblicher Patienten rund dreimal stärker als in denen der untersuchten männlichen Patienten, was besonders interessant ist, wenn man bedenkt dass diese Meningeome überwiegend dem WHO-Grad I zugeordnet sind.

**Abbildung 5-F**





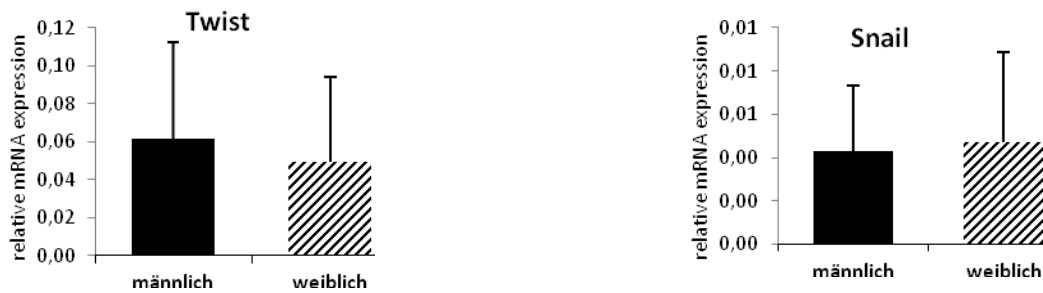


Abbildung 5-F Mittelwert der relativen Expression  $\pm$ Standardabweichung der gewählten EMT-Marker und E-Cadherin abhängiger Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom Geschlecht der Patienten

## 5.4 Induzierbarkeit der EMT

Für verschiedene Wachstumsfaktoren, darunter vor allem der Wachstumsfaktor Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), konnte bislang nicht nur eine Beteiligung an verschiedenen Prozessen der Tumorbilogie gezeigt, sondern auch eine Induzierbarkeit der EMT nachgewiesen werden (Kasai et al. 2005; Miettinen et al. 1994). In Anlehnung an diese Resultate wurde das Verhalten verschiedener Meningeomzelllinien und primärer Meningeomkulturen unter TGF- $\beta$  Einfluss getestet.

### 5.4.1 Transforming-Growth-Factor- $\beta$

Auf ihr Verhalten unter Kultivierung mit TGF- $\beta$  wurden die Meningeomzelllinien Men, beziehungsweise das NF2 modulierte Korrelat Men-shNF2, sowie primäre Meningeomzelllinien hin untersucht.

Alle Zellen wurden, wie unter 4.4.1 beschrieben mit 5ng TGF- $\beta$ / ml Medium behandelt, zunächst hinsichtlich etwaiger morphologisch Veränderungen betrachtet, anschließend zur RNA-Gewinnung eingesetzt und auf Veränderungen des Expressionsmusters der EMT Marker vergleichend untersucht. Für mRNA-Analysen wurden je drei behandelte mit drei unbehandelten Proben verglichen.

#### 5.4.1.1 Primäre Meningeom-Zellkultur

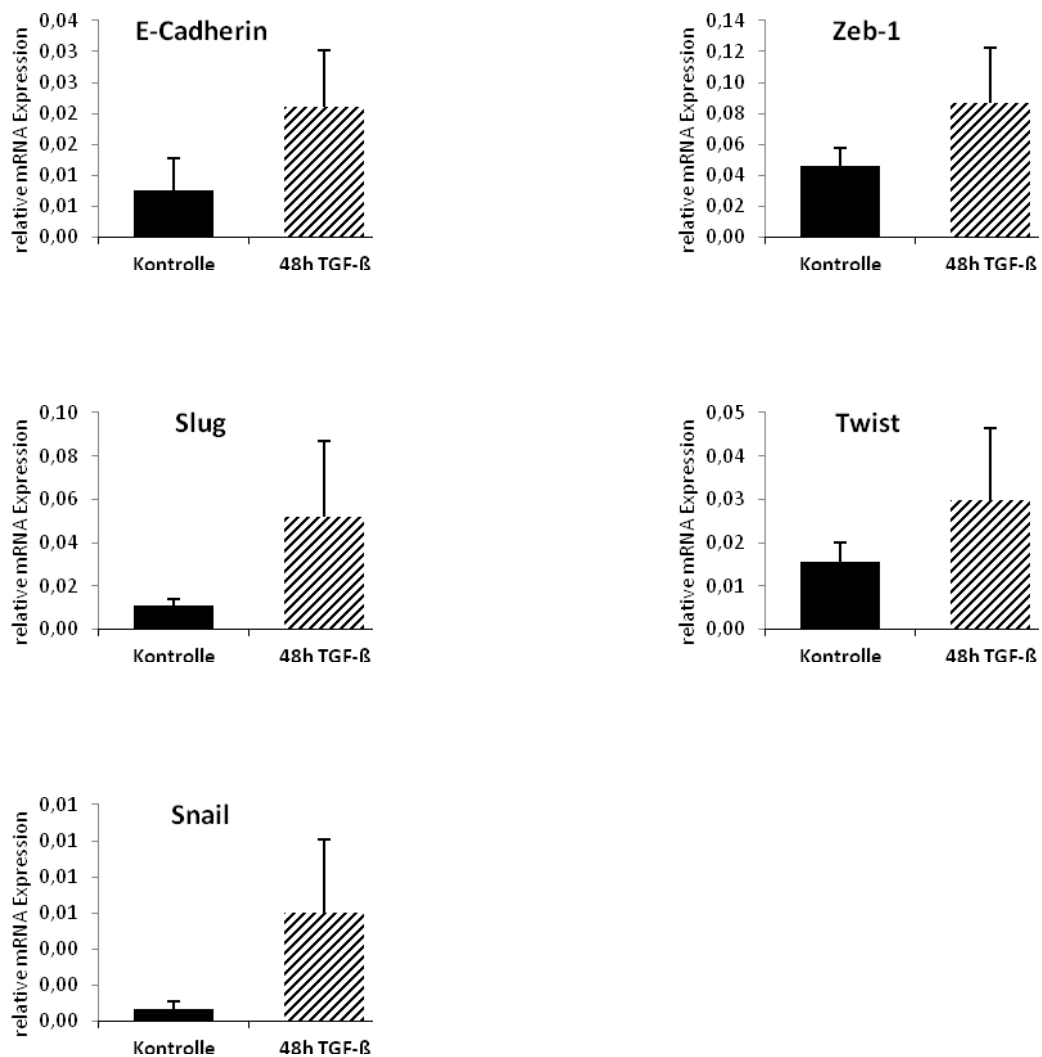
Eine 48 stündige Behandlung der primären Zelllinie mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  führte zu den in Abbildung 5-G A gezeigten Veränderungen. Je drei Ansätze einer primären Zelllinie, die aus einem meningoethelialen WHO-Grad I Meningeom gewonnen wurde, wurden der 48 stündigen Behandlung TGF- $\beta$  unterzogen, beziehungsweise unbehandelt als Kontrolle mitgeführt. Analog den zuvor bearbeiteten

Tumorproben wurde anschließend, wie unter 4.2.1 beschrieben, RNA isoliert und für die RT-PCR eingesetzt.

Es ist zunächst festzustellen, dass die Behandlung mit TGF- $\beta$  in der verwendeten Konzentration von 5ng/ml Medium einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Morphologische Veränderungen unter der 48 stündigen Behandlung sind im Vergleich mit der Kontrolle nicht ersichtlich (Abbildung 5-G **B**). Die Behandlung erbrachte keine signifikanten Ergebnisse, jedoch tendieren alle betrachteten Marker zu einer Mehrexpression unter der Behandlung.

**Abbildung 5-G**

**A**



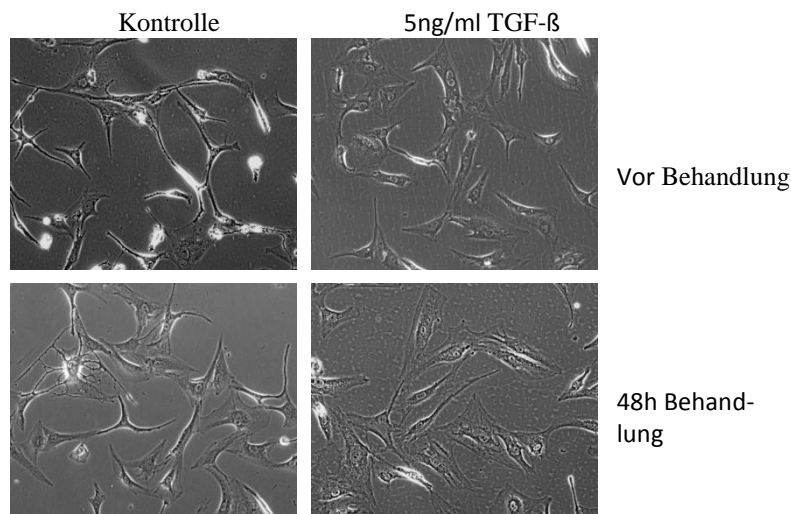
**B**

Abbildung 5-G **A** Mittelwert der relativen Expression  $\pm$ Standardabweichung ausgewählter EMT-Marker abhängiger Transkriptionsfaktoren in einer primären Meningeomzelllinie jeweils vor und nach 48 stündiger Behandlung mit 5ng/ml TGF- $\beta$ . **B** x200 fache Vergrößerung links vor und rechts nach der TGF- $\beta$  Behandlung der 3. Passage einer primären Meningeomzellkultur, WHO-Grad I meningotheelialer Subtyp

#### 5.4.1.2 Stabile Zelllinien

Zusätzlich zur Betrachtung der primären Meningeom Zelllinie wurden die Behandlungen auch an stabilen Zelllinien durchgeführt. Dies geschah vor dem Hintergrund, einen möglichen Einfluss des NF2 Verlustes anhand der NF2-defizienten Men-Zellen zu objektivieren und um den Einfluss anderer Eigenschaften und genetischer Veränderungen abschätzen zu können, zumal für Alveolarepithelzellen (A549) (Kasai et al. 2005) oder auch Epithelzellen der Mamma (NMuMG) (Miettinen et al. 1994) bereits gezeigt werden konnte, dass TGF- $\beta$  in vitro die E-Cadherin Expression modulieren und eine reversible Epithelial-Mesenchymale-Transition induzieren kann.

In Men-Zellen zeigte die Behandlung mit TGF- $\beta$  nach 48h die in Abbildung 5-H **A** dargestellte Morphologie. Eine wesentliche Änderung der Morphologie oder Wachstumsgeschwindigkeit waren nicht objektivierbar.

Der morphologische Vergleich der NF2-defizienten Zellen nach Abschluss der Behandlung ergab ebenfalls keine wesentlichen morphologische Veränderungen, die in Abbildung 5-H **A** dargestellt sind. Zur genaueren Untersuchung wurde analog zu den anderen Zelllinien eine Untersuchung der mRNA Expression angeschlossen, die so erhobenen Ergebnisse sind in Abbildung 5-H **B** dargestellt. Die Expression von E-Cadherin hat sich durch die Behandlung mit TGF- $\beta$  nicht signifikant verändert; tendiert jedoch vor

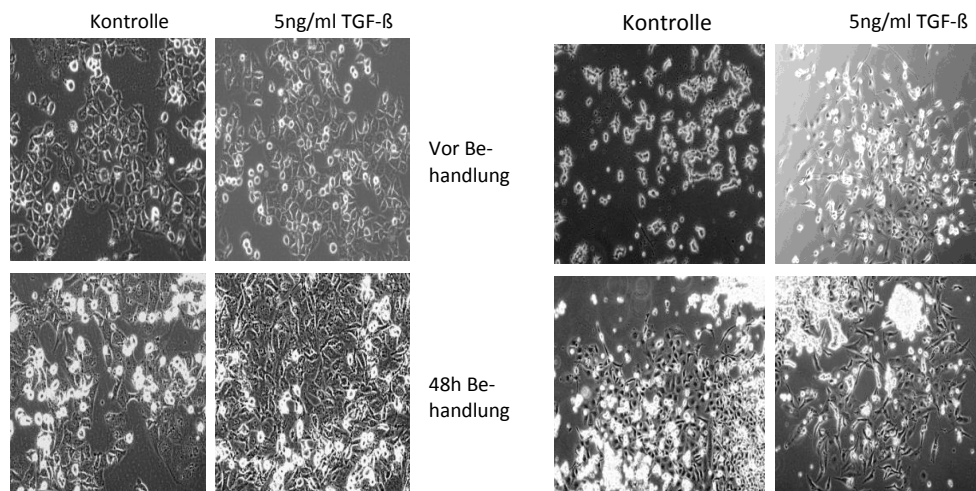
allein in den nicht NF2 defizienten Zellen zu einer Mehrexpression im Zuge der TGF- $\beta$  Behandlung. Bemerkenswert ist die insgesamt sehr geringe Expression von E-Cadherin. Dies ist besonders in Zusammenschau mit der signifikanten Erhöhung des Transkriptionsfaktors Snail in den behandelten Men Zellen gegenüber der geringen Veränderung in den NF2 defizienten Zellen interessant. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch für den Transkriptionsfaktoren Slug. Für den Faktor Twist zeigen die NF2 defizienten Zellen eine leichte Minderung der Expression im Zuge der Behandlung.

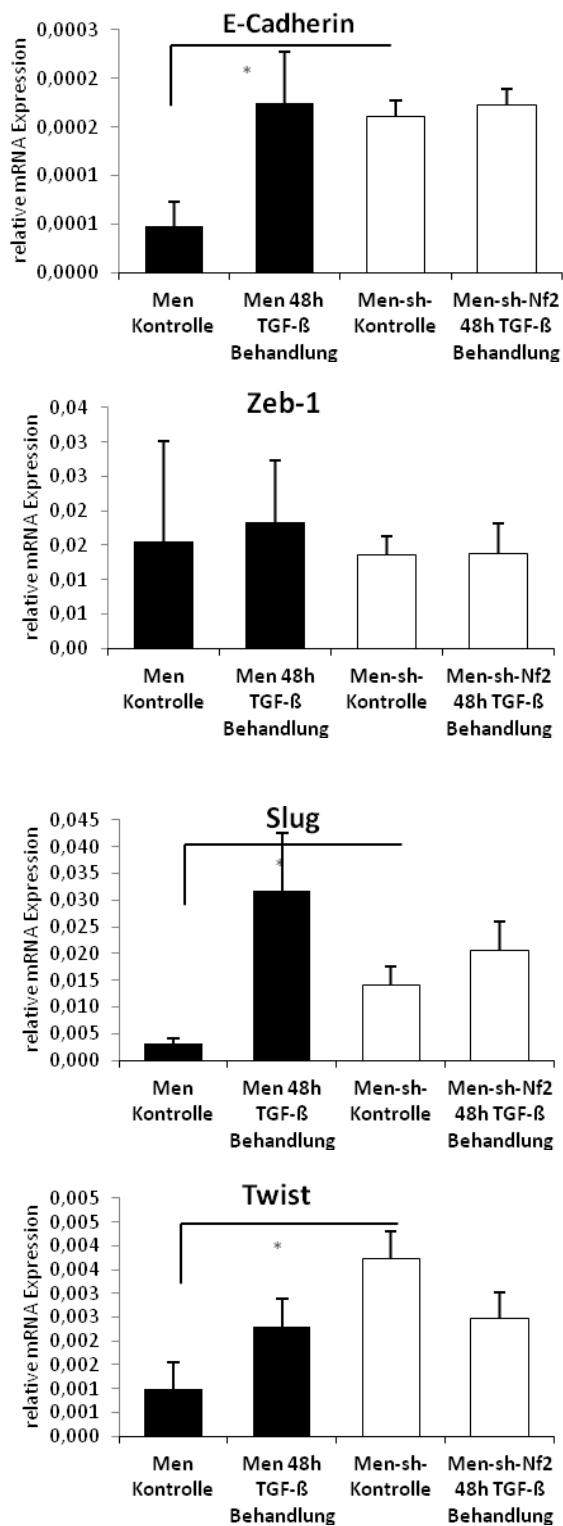
### Abbildung 5-H

A

**Men**

**Men-sh-Nf2**



**B**

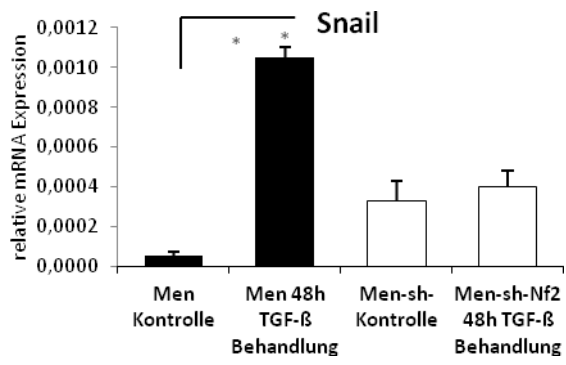


Abbildung 5-H A x200fache Vergrößerung von Men-Zellen links und Men-sh-NF2-Zellen rechts vor und nach 48stündiger TGF- $\beta$  Behandlung. **B** Mittelwert der relativen Expression  $\pm$ Standardabweichung ausgewählter EMT-Marker in Men und Men-sh-NF2 Zellen

---

## 6 Diskussion

Plastizität ist ein essentielles Merkmal maligner Tumore, insofern es Invasivität und Metastasenbildung ermöglicht und somit eine essentielle Bedeutung für das Verhalten und letztendlich das klinische Outcome des Patienten besitzt. Ein genaueres Verständnis der zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen ist also erstrebenswert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschieden klassifizierte Meningeome hinsichtlich der Expression verschiedener, mit der EMT assoziierter Marker analysiert und mit klinischen und histologischen Daten abgeglichen und etwaige Assoziationen vor allem im Hinblick auf ihre mögliche prognostische Aussagekraft hin untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Potential des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  zur Auslösung von EMT beziehungsweise zur Alteration des Expressionsmusters von EMT-Markern an verschiedenen Meningeomzellen untersucht. Hierbei fanden sowohl primäre Zelllinien als auch stabile Meningeomzelllinien Verwendung. Dies erschien insofern erfolgversprechend, als dass bereits gezeigt werden konnte, dass etablierte Meningeomzelllinien in einem Invasions-Assay, der Migration durch enge Poren und Sezernierung ECM-destruierender Enzyme voraussetzt, positiv auf TGF- $\beta$ 1 reagieren (Gogineni et al. 2012). Dies belegt auf funktioneller Ebene die in solchen Zelllinien erhalten gebliebene migratorische Responsivität gegenüber TGF- $\beta$ .

### 6.1 Zur Rolle von E-Cadherin im Meningeom

Die bislang bekannte Bedeutung von E-Cadherin in der Karzinombiologie ist vielseitig: Zum Einen wird ihm eine Tumorsuppressorfunktion in epithelialen Zellen zugeschrieben und der Verlust entsprechend mit ungünstiger Prognose assoziiert (Birchmeier und Behrens 1994; Takeichi 1993). Zum Anderen gilt der Verlust von E-Cadherin als bedeutendes Kennzeichen für die abgelaufene EMT (Thiery 2002; Lee 2006; Kalluri und Weinberg 2009; Zeisberg und Neilson 2009). Die vergleichende Betrachtung des Expressionsmusters von E-Cadherin in den verschiedenen WHO-Graden zeigte einen signifikanten Verlust in den höhergradigen Meningeomen. Dieser Verlust lässt sich in die Modellvorstellung von E-Cadherin als Suppressor von malignem Verhalten einfügen. Auch die bis dato in der Literatur beschriebenen Daten zur Expression von E-Cadherin in Meningeomen unterscheiden sich zum Teil deutlich. Beschreiben einige Autoren beispielsweise keinen Zusammenhang zwischen der Ex-

---

pression des transmembranen Glykoproteins und dem WHO-Grading (Brunner et al. 2004; Shimada et al. 2005; Panagopoulos et al. 2008), gibt es ebenso Publikationen, die einen relevanten Zusammenhang zwischen malignem Verhalten höhergradiger Meningeome und einer deutlich reduzierten E-Cadherin-Expression beschreiben (Utsuki et al. 2005; Pećina-Šlaus et al. 2010), wie er auch aus den für diese Arbeit erhobenen PCR-Daten hervor geht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auf mRNA-Ebene deutliche Unterschiede in der Expression EMT-assoziiierter Marker zwischen den bekannten Meningeom-Subgruppen gibt. Sowohl die höhergradigen WHO-Grad II/III Meningeome als auch die mit klinisch nachgewiesenen Rezidiven, zeigen vor allem eine signifikante Minderexpression des epithelialen Markers und Zellkontaktproteins E-Cadherin. Tendenziell gilt dieser Trend auch für Meningeome mit klinisch nachgewiesener Invasivität, auch wenn hier keine statistische Signifikanz erreicht wird. Gleichzeitig konnte ein gegenläufiger Trend der mit E-Cadherin assoziierten Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Es konnte eine signifikante Heraufregulation der Transkriptionsfaktoren Zeb-1 und Slug in den höhergradigen Tumoren gezeigt werden (Abbildung 5-B), sowie des Transkriptionsfaktors Slug in Meningeomen mit bekannten Rezidiven (Abbildung 5-D). Diese Ergebnisse lassen sich mit den bislang bekannten Erkenntnissen zur EMT vereinbaren, das heißt dem Verlust der organisierten Zell-Zell-Kontakte, einhergehend mit gesteigerter Befähigung zu Motilität. Dieses konnte im Wesentlichen mit klinisch malignem Verhalten assoziiert werden, da wir diese Tendenz auch unabhängig vom WHO-Grading, durch die Gruppierung nach Invasivität und Rezidiv zeigen konnten.

Ebenfalls für einen Zusammenhang zwischen potentiell aggressivem Verhalten und dem molekularen Expressionsprofil spricht die Tatsache, dass auch ein signifikanter Unterschied der E-Cadherin Expression in Abhängigkeit vom Geschlecht gezeigt werden konnte (Abbildung 5-G). Meningeome sind bei Frauen nicht nur bis zu zweimal häufiger als bei Männern. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Männer häufiger aggressive beziehungsweise höhergradige Meningeome entwickeln (Bigner et al. 2006), was vielleicht mit dem häufigeren starken Verlust des Zellkontaktproteins und Tumorsuppressors E-Cadherin in Zusammenhang stehen könnte.

Invasivität ist ein Faktor der nicht in der alten WHO Klassifikation berücksichtigt wurde (Feiden und Feiden 2008; Whittle et al. 2004), für die Prognose des Patienten jedoch bedeutend ist, nicht zuletzt weil er die Vollständigkeit der chirurgischen Resektion beein-



---

flusst. Die Bedeutung des Faktors Invasivität spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass die revidierte Fassung des WHO-Gradings von 2017 (Harter et al. 2017) dieses neben weiteren Charakteristika berücksichtigt.

Aus diesem Grund wurde die histologisch gesicherte Invasion der Meningeomzellen in umliegendes Hirngewebe gesondert vom Grading gemäß WHO betrachtet. Ein signifikanter E-Cadherin-Verlust, wie er in den höhergradigen Meningeomen gezeigt wurde, konnte jedoch in den invasiven nicht reproduziert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Analyse nur eine geringe Fallzahl zugrunde liegt. Jedoch konnte der Faktor Invasivität in gewisser Weise unabhängig vom Grading betrachtet werden. Von den betrachteten invasiven Meningeomen gehörten 8 dem WHO-Grad I an, während 6 als WHO-Grad II/III klassifiziert waren. Es muss bei der Betrachtung dieser Daten auch im Hinterkopf behalten werden, dass die mRNA für die Analyse jeweils aus einer mehr oder minder zufälligen Stelle des Tumors gewonnen wurde. Zellen die invasive Marker exprimieren finden sich vermutlich jedoch eher an der „Invasionsfront“, nicht im übrigen Tumor (Brivio et al. 2015), sodass davon ausgegangen werden könnte, dass eine Wiederholung der Analysen mit Proben der vermuteten Invasionsfront ein verändertes Bild der Expression zeigen könnte. Dies bliebe jedoch künftigen Arbeiten unter Einsatz einer Mikrodisektion vorbehalten. Ein solches Vorgehen läge durchaus im Bereich des Möglichen für eine hinreichend optimierte Real-Time-PCR oder auch inzwischen NGS-basierter Methoden (next generation sequencing) zur Erhebung der Kopienzahlen (Reads). Sie wären jedoch mit erheblichen methodischen Schwierigkeiten bzw. entsprechendem Aufwand zu deren Überwindung verbunden und daher noch kein geeigneter Gegenstand einer Doktorarbeit. Die Probleme lägen z.B. darin begründet, dass eine qualitativ gute Analyse Gefrierschnitte erfordern würde mit schlechter Markierbarkeit der Invasionsfront unter üblichen Laborbedingungen. Hochtechnologische Entwicklungen in Richtung einer automatisierten Mikrodisektion nach Vorgabe eines parallelen H&E-Präparates laufen jedoch.

Auch in der Literatur verdichten sich die Hinweise, dass die Rolle von EMT in der Metastasierung und Invasion komplexer sind als bislang angenommen. Maheswaran et al. fassen dies so zusammen, dass es bislang wenig klinische Belege für EMT im Tumor gibt, vielmehr sei es bislang ein Phänomen aus *in vitro* Modellen (Maheswaran und Haber 2015).

---

Der Zusammenhang zwischen Invasivität und der Expression von E-Cadherin rückt zunehmend in den Fokus des Interesses. Panagopoulos et al. haben unter anderem den Zusammenhang zwischen verschiedenen Proteinen des Fettsäurestoffwechsels sowie Adhäsionsproteinen wie E-Cadherin und WHO Grading sowie Faktoren wie Invasivität und Rezidivneigung verglichen. Hierbei konnte für die E-Cadherin-Expression keine Korrelation festgestellt werden. Die Studie propagiert allerdings eine entscheidende Rolle von Fettsäuren für die Progression der Meningeome (Panagopoulos et al. 2008). Zhou et al. hingegen konnten zeigen, dass es einen immunhistochemisch belegbaren inversen Zusammenhang zwischen der Expression von E-Cadherin, Invasion, dem den Tumor umgebenden Ödem und der Rezidivneigung gibt (Zhou et al. 2010). Gay et al. zeigten in einer Multiparameteranalyse aus klinischen Daten und molekulargenetischen Daten dass sich invasive von nicht invasiven benignen Meningeomen hinsichtlich ihres Expressionsmusters für Thrombospondin 1 und phosphoryliertes Vimentin abgrenzen lassen (Gay et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die derzeitige Datenlage zur Bedeutung von E-Cadherin im Meningeom insgesamt uneinheitlich ist. Zumindest scheint der E-Cadherin-Verlust nicht absolut notwendig für die Tumorprogression der Meningeome zu sein. Jedoch korrelieren die für diese Arbeit erhobenen mRNA-Daten signifikant mit dem WHO Grading und dem Auftreten von Rezidiven im klinischen Verlauf. Zusätzlich muss bedacht werden, dass sich die große Mehrzahl der bislang erhobenen Befunde sich hierbei auf immunhistochemische Daten stützt und zu einem geringeren Anteil auf die Proteinanalyse durch Westernblots und damit lediglich semiquantitative Aussagen zulassen. Demgegenüber zeichnen sich die hier vorgelegten mRNA-Daten durch eine bessere Quantifizierung und durch eine hohe Spezifität aus. Allerdings ergibt sich aus der Verwendung von mRNA auch die Frage, welcher Anteil der vorliegende mRNA tatsächlich translatiert wird, zumal Untersuchungen darauf hin deuten, dass der Zusammenhang zwischen Transkript und Protein schwach ist. Ghazalpour et al. haben zu dieser Fragestellung herausgearbeitet, dass es sogar nur eine sehr geringe Korrelation zwischen RNA und korrespondierendem Proteinlevel gibt (Ghazalpour et al. 2011). Dies kann als Erklärung dafür herangezogen werden, dass die auf mRNA Ebene gezeigten Effekte sich nicht auf Proteinebene im Westernblot bestätigen ließen. Außerdem muss bei der Betrachtung der Westernblotergebnisse berücksichtigt werden, dass nur eine verhältnismäßig kleine Fallzahl betrachtet werden konnte.

Und zum Anderen muss, gerade im Hinblick auf eine etwaige EMT, die Frage gestellt werden, ob eine Initiierung beziehungsweise die Regulation der Expression beteiligter Biomarker auf Transkriptions- oder Translationsebene stattfinden würde. Abschließend kann die Bedeutung dieser Funde nur dann beurteilt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass der Verlust von E-Cadherin womöglich ein Indikator für den Verlust der Zell-Zell-Kontakte in den transformierten Arachnoidalzellen ist, ohne dass es zu einer vollständigen EMT mit Erlangung einer Motilität vom “mesenchymalen Typ” kommt.

## 6.2 Keine Hinweise für EMT in fibroblastischen Meningeomen

Die Annahme, dass die beobachteten Änderungen der Expression ein Ausdruck von verändertem Malignitätspotential im Gegensatz zu rein morphologischen Charakteristika sind, wird ferner durch die Tatsache gestützt, dass die vergleichenden Betrachtungen verschiedener WHO-Grad I Subtypen keine relevanten Unterschiede zeigte (Abbildung 5-A). Trotz des mesenchymal anmutenden Aussehens der fibroblastischen Tumoren sehen wir keine korrespondierende Veränderung der epithelialen Marker E-Cadherin und Zonula-occludens-1. Die signifikante Minderexpression der Transkriptionsfaktoren Zeb-1 und Twist deutet im Gegenteil in die entgegengesetzte Richtung. Trotzdem sollte die Schlussfolgerung einer entgegengesetzten (ggf. partiellen) MET (mesenchymal-epithelialen Transition) nicht voreilig getroffen werden, vor allem in Anbetracht der nicht signifikanten E-Cadherin Expressionsunterschiede.

## 6.3 Partielle EMT

Die bisher für diese Arbeit erhobenen Daten deuten, soweit es höhergradige und Meningeome mit klinischem Rezidiv betrifft, auf einen Zusammenhang mit einer abgelauften EMT hin. Ein *Beweis* konnte bislang noch nicht erbracht werden

In vielen Fällen erreicht eine Zelle durch den Prozess der EMT nicht sämtliche Charakteristika der mesenchymalen Zelle. Hier könnte das Konzept der partiellen EMT für Klarheit sorgen. Leroy et al. untersuchten MDCK (Madin-Darby canine kidney epithelial cells)-Tubulogenese als Modell für Zellmigration ohne komplette EMT. Sie zeigten dass Slug während der Pre-EMT E-Cadherin nicht supprimiert (Leroy und Mostov 2007).

## 6.4 Aktivierung der EMT und TGF- $\beta$

Die Aktivierung der EMT geschieht auf verschiedenen Wegen. Die physiologische EMT im Rahmen der embryonalen Entwicklung folgt einer definierten kontrollierten Sequenz. Es wird davon ausgegangen, dass es unter pathologischen Umständen zu einer unkontrollierten Aktivierung dieses Programmes kommt (Massagué 2008; Bhowmick et al. 2001; Gatza et al. 2010). Verschiedene Induktoren für EMT konnten bereits identifiziert werden. Darunter der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  (Kasai et al. 2005; Bhowmick et al. 2001; Medici et al. 2008; Miettinen et al. 1994; Zhang et al. 2011; Zheng et al. 2012). In A549-Alveolarepithelzellen aktiviert TGF- $\beta$  die EMT über den SMAD2-Signalweg (Kasai et al. 2005). Die Untersuchung von Biopsien humaner Tumore bedeutet eine gewisse Limitierung, insbesondere wenn man die Plastizität des Prozesses bedenkt. Aus diesem Grund erfolgten ergänzende Untersuchungen am Zellkulturmodell.

Durch die Behandlung mit TGF- $\beta$  konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen der Markerexpression in einer primären Meningeomzelllinie erreicht werden, obwohl eine generelle Mehrexpression der assoziierten Transkriptionsfaktoren beobachtet wurde (Abbildung 5-G).

Die ergänzenden Betrachtungen an der atypischen Meningeomzelllinie Men, auch in Zusammenhang mit der NF2 defizienten Variante Men-sh-Nf2 zeigten ebenfalls keinen Verlust der E-Cadherin Expression wie er durch eine gelungene Induktion der EMT hätte erwartet werden können. In den Men-Zellen zeigte sich ein genereller Trend zur Mehrexpression der untersuchten Transkriptionsfaktoren, insbesondere von Slug und Twist, wobei hier keine statistische Signifikanz erreicht wurde und auch E-Cadherin tendenziell nach Behandlung mehr exprimiert wurde, hierbei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass die E-Cadherin-Expression in den unbehandelten Zellen sehr gering war, sodass man argumentieren könnte, dass eine weitere Suppression nicht möglich ist. Im NF2 defizienten Pendant den Men-sh-Nf2 Zellen zeigten sich jedoch insgesamt keine wesentlichen Veränderungen (Abbildung 5-H) trotz höherer basaler E-Cadherin Expression. Die uniforme Reaktion aller untersuchten Zielgene könnte ein Hinweis auf einen systematischen Fehler bei der Real-Time-Messung des Referenzgens sein. Aber die relativen Expressionslevel des Referenzgens zeigten keine auffällige Verminderung in den TGF- $\beta$ -Gruppen, sodass dies unwahrscheinlich erscheint.

---

## 6.5 Die Rolle von NF2

Hieraus ergibt sich die Frage nach der Bedeutung der NF2-Verluste in der Meningeombiologie. Eine häufig in rezidivierenden, atypischen aber auch generell in rund 60% aller sporadisch auftretenden Meningeome beschriebene Aberration (Zankl und Zang 1972; Mawrin und Perry 2010), die biologische Konsequenz des Verlustes ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Marker E-Cadherin und Zonula-Occludens1 werden nicht nur in Adherens- beziehungsweise Tight Junctions exprimiert, sondern zeigen beide ebenfalls eine Assoziation zu den Aktinfilamenten des Zytoskeletts (Perez-Moreno et al. 2003), während ein NF2/ Merlin Verlust in meningealen Zellen mit einem Verlust der organisierten Tight Junctions einhergeht (James et al. 2008). Allen drei Proteinen gemeinsam ist eine Beteiligung an Prozessen der Kontaktinhibition und Suppression der Tumorzellmotilität (Lallemand et al. 2003; Birchmeier und Behrens 1994) und sowohl E-Cadherin als auch NF2 wird eine Rolle als Tumorsuppressor zugesprochen (Morrison 2001; Schwechheimer et al. 1998; Rangwala et al. 2005). Die für diese Arbeit erhobenen Daten konnten kein klares Bild eines möglichen Zusammenhangs zwischen NF2-Verlust und EMT oder EMT-ähnlichen Veränderungen zeigen. An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass normalerweise der bi-allelische, d.h. komplette Verlust funktionellen Merlins das entscheidende Merkmal ist (z.B. durch LOH und Mutation) (Hansson et al. 2007). Jedoch war keine Gruppe von Tumoren verfügbar, die vollständig über alle relevanten Exons des NF2-Gens hinsichtlich Mutationen in Exons oder Splice-Stellen charakterisiert war. Diese aufwendige Charakterisierung des NF2-Mutationsstatus wäre sicherlich ein Ausgangspunkt für folgende Untersuchungen.

## 7 Zusammenfassung

Um einen eventuellen Zusammenhang der EMT mit der Meningeombiologie aufzuzeigen, wurde die Expression von E-Cadherin, einem Protein der Adherens Junctions, E-Cadherin assoziierter Transkriptionsfaktoren sowie dem Tight Junction assoziierten Protein Zonula-Occludens-1 in verschiedenen Subtypen und an Zellkulturen unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen untersucht. Ferner wurde die Möglichkeit, das Expressionsprofil der Zellen durch den Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) zu beeinflussen, geprüft.

In Zusammenschau konnte eine Bestätigung und Erweiterung der bisher bekannten Erkenntnisse zur Bedeutung der EMT in der Meningeombiologie und insbesondere der Rolle, die E-Cadherin dabei spielt, erbracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede zwischen den WHO-Graden der Meningeome gibt, besonders was die Expression des Glykoproteins E-Cadherin betrifft. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Expression der gewählten Marker in Meningeomen mit malignen Charakteristika von der Vergleichsgruppe unterscheidet und, dass diese veränderten Expressionsmuster in wesentlichen Teilen mit der EMT vereinbar sind.

Weitere Untersuchungen, die diese Phänomene genauer abgrenzen sowie die Möglichkeit einer Induktion, sei es durch TGF- $\beta$  oder andere Induktoren werden in Zukunft nicht nur das Verständnis der molekularen Hintergründe vertiefen, sondern letztendlich vielleicht zur Vorhersagbarkeit oder sogar zur Unterbindung von malignem Verhalten der Meningeome beitragen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Akat K, Mennel H, Kremer P, Gassler N, Bleck CKE, Kartenbeck J. Molecular characterization of desmosomes in meningiomas and arachnoidal tissue. *Acta Neuropathologica* 2003; 106(4):337–47.
2. Al-Mefty O. Operative atlas of meningiomas. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.
3. Baheti A, Mahore A, Zade B, Jalali R. Meningioma and cavernous angioma following childhood radiotherapy. *J Can Res Ther* 2010; 6(3):333.
4. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Molecular Biology of the Cell* 2001; 12(1):27–36.
5. Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM. Russell and Rubinstein's pathology of tumors of the nervous system. 7th ed. London, New York, NY: Hodder Arnold; Distributed in the United States of America by Oxford University Press; 2006.
6. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochemica et Biophysica Acta* 1994:11–26.
7. Bouamrani A, Ramus C, Gay E, Pelletier L, Cubizolles M, Brugière S et al. Increased Phosphorylation of Vimentin in Noninfiltrative Meningiomas. *PLoS ONE* 2010; 5(2):e9238.
8. Brivio S, Cadamuro M, Fabris L, Strazzabosco M. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Invasiveness: What Can We Learn from Cholangiocarcinoma? *J Clin Med* 2015; 4(12):2028–41.
9. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E. Altered expression of  $\beta$ -Catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 2004; (49):178–87.
10. Bukholm IK, Nesland JM, Børresen-Dale AL. Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [see comments]. *J. Pathol.* 2000; 190(1):15–9.
11. Carvalho LH, Smirnov I, Baia GS, Modrusan Z, Smith JS, Jun P et al. Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol. Cancer* 2007; 6:64.
12. CBTRUS (2009-2010). CBTRUS Statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in eighteen states in 2002–2006. Central Brain Tumor Registry of the United States, Hisdale [cited 2013 May 30].
13. Chen Y, Tiang X, Li Z, Luo B, Huang Q. Sporadic meningioangiomatosis-associated atypical meningioma mimicking parenchymal invasion of brain: a case report and review of the literature. *Diagn Pathol* 2010 [cited 2013 Mar 17]; 5(1):39.
14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1):156–9.
15. Claus EB, Bondy ML, Schildkraut JM, Wiemels JL, Wrensch M, Black PM. Epidemiology of Intracranial Meningioma. *Neurosurgery* 2005:1088–95.

16. Corning HK. Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen. 1st ed. München und Wiesbaden: J.F. Bergmann; 1921.
17. Cushing H. The meningiomas (dural endotheliomas): their source and favored seats of origin (Cavendish Lecture). *Brain* 1922; 45:282–316.
18. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 [cited 2013 Aug 21]; 92(12):5545–9.
19. Desmoulière A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol. Int.* 1995; 19(5):471–6.
20. Dezamis E, Sanson M. Génétique moléculaire des méningiomes et corrélations génotype/phénotype. *Rev. Neurol. (Paris)* 2003; 159(8-9):727–38.
21. Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Busund L, Bremnes RM. Co-expression of PDGF-B and VEGFR-3 strongly correlates with lymph node metastasis and poor survival in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2010; 21(2):223–31.
22. Durand A, Labrousse F, Jouvett A, Bauchet L, Kalamaridès M, Menei P et al. WHO grade II and III meningiomas: a study of prognostic factors. *J Neurooncol* 2009; 95(3):367–75.
23. Feiden S, Feiden W. WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren. *Pathologie* 2008; 29(6):411–21.
24. Fèvre-Montange. Microarray gene expression profiling in meningiomas: Differential expression according to grade or histopathological subtype. *Int J Oncol* 2009 [cited 2014 Mar 24]; 35(06).
25. Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *International Journal of Experimental Pathology* 2011; 92(3):143–50.
26. Francí C, Gallén M, Alameda F, Baró T, Iglesias M, Virtanen I et al. Snail1 Protein in the Stroma as a New Putative Prognosis Marker for Colon Tumours. *PLoS ONE* 2009; 4(5):e5595.
27. Gatza CE, Oh SY, Blobe GC. Roles for the type III TGF- $\beta$  receptor in human cancer. *Cellular Signalling* 2010 [cited 2013 Aug 21]; 22(8):1163–74.
28. Gay E, Lages E, Ramus C, Guttin A, El Atifi M, Dupre I et al. The heterogeneity of meningioma revealed by multiparameter analysis: infiltrative and non-infiltrative clinical phenotypes. *Int J Oncol* 2011; 38(5).
29. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN et al. Comparative Analysis of Proteome and Transcriptome Variation in Mouse. *PLoS Genet* 2011; 7(6):e1001393.
30. Gogineni VR, Gupta R, Nalla AK, Velpula KK, Rao JS. uPAR and cathepsin B shRNA impedes TGF- $\beta$ 1-driven proliferation and invasion of meningioma cells in a XIAP-dependent pathway. *Cell Death Dis* 2012; 3(12):e439.
31. Gotzmann J, Fischer ANM, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H et al. A crucial function of PDGF in TGF- $\beta$ -mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* 2006 [cited 2013 Aug 15]; 25(22):3170–85.



- 
32. Gotzmann J, Huber H, Thallinger C, Wolschek M, Jansen B, Schulte-Hermann R et al. Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. *Journal of Cell Science* 2002; 115(Pt 6):1189–202.
33. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* 1982 [cited 2013 Aug 22]; 95(1):333–9.
34. Guo Y, Yin J, Zha L, Wang Z. Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor B, platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ , and E-cadherin expression in gastric carcinoma; 2013 [cited 2013 Aug 15].
35. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Research* 2002; 62(6):1613–8.
36. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K et al. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 2007 [cited 2013 May 30]; 8(1):16.
37. Harter PN, Braun Y, Plate KH. Classification of meningiomas—advances and controversies. *Chinese Clinical Oncology* 2017; 6(1).
38. Hay E. An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Anatomica* 1995; 154(1):8–20.
39. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* 2005 [cited 2013 Aug 9]; 233(3):706–20.
40. Hayat M, editor. *Tumors of the Central Nervous System, Volume 7*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012.
41. Heldin C, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS Letters* 2012; 586(14):1959–70.
42. Herreros AG, Peiró S, Nassour M, Savagner P. Snail Family Regulation and Epithelial Mesenchymal Transitions in Breast Cancer Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(2):135–47.
43. Hofman P, Vouret-Craviari V. Microbes-induced EMT at the crossroad of inflammation and cancer. *gutmicrobes* 2012; 3(3).
44. Hotz B, Arndt M, Dullat S. Epithelial to Mesenchymal Transition: Expression of the Regulators Snail, Slug and Twist in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 2007 [cited 2013 Mar 18]; 16(13).
45. Huber O, Bierkamp C, Kemler R. Cadherins and Catenins in development. *Current Opinion in Cell Biology* 1996 [cited 2013 Oct 23]; (8):685–91.
46. İldan F, Erman T, Göçer A, Tuna M, Bağdatoğlu H, Çetinalp E et al. Predicting the Probability of Meningioma Recurrence in the Preoperative and Early Postoperative Period: A Multivariate Analysis in the Midterm Follow-Up. *Skull Base* 2007; 17(3):157–71.
47. Inskip P, Tarone RE, Hatch EE, Wilcosky TC, Sapiro WR, Welker RG et al. Cellular-Telephone Use and Brain Tumors 2001 [cited 2013 Jun 9].

- 
48. Jaaskelainen J. Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. *Surg Neurol* 1986; 26(5):461–9.
49. Jääskeläinen J, Haltia M, Servo A. Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol* 1986; 25(3):233–42.
50. James MF, Lelke JM, Maccollin M, Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V et al. Modeling NF2 with human arachnoidal and meningioma cell culture systems: NF2 silencing reflects the benign character of tumor growth. *Neurobiol Dis* 2008; 29(2):278–92.
51. Kalamarides M, Stemmer-Rachamimov AO, Niwa-Kawakita M, Chareyre F, Taranchon E, Han Z et al. Identification of a progenitor cell of origin capable of generating diverse meningioma histological subtypes. *Oncogene* 2011; 30(20):2333–44.
52. Kalluri R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(6):1417–9.
53. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2003 [cited 2013 Aug 6]; 112(12):1776–84.
54. Kalluri R, Weinberg R. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(6):1420–8.
55. Kane AJ, Sughrue ME, Rutkowski MJ, Shangari G, Fang S, McDermott MW et al. Anatomic location is a risk factor for atypical and malignant meningiomas. *Cancer* 2011 [cited 2014 Feb 25]; 117(6):1272–8.
56. Kane AJ, Sughrue ME, Rutkowski MJ, Shangari G, Fang S, McDermott MW et al. Anatomic location is a risk factor for atypical and malignant meningiomas. *Cancer* 2011 [cited 2014 Feb 22]; 117(6):1272–8.
57. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF- $\beta$ 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 2005; 6(1):56.
58. Kim HC, Upadhyay S, Li G, Palmer KC, Deuel TF. Platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth arrested murine fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 [cited 2013 Aug 15]; (92):9500–4.
59. Klaeboe L, Lonn S, Scheie D, Auvinen A, Christensen HC, Feychting M et al. Incidence of intracranial meningiomas in Denmark, Finland, Norway and Sweden, 1968–1997. *Int. J. Cancer* 2005; 117(6):996–1001.
60. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-Mesenchymal Transition. *The American Journal of Pathology* 2009; 174(5):1588–93.
61. Kong D. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? [cited 2013 Mar 18].
62. Kong D, Wang Z, Sarkar SH, Li Y, Banerjee S, Saliganan A et al. Platelet-Derived Growth Factor-D Overexpression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of PC3 Prostate Cancer Cells. *Stem Cells* 2008 [cited 2013 Aug 22]; 26(6):1425–35.
63. Kros JM, Wolbers JG. Meningiomen: prognostische relevantie van histopathologische en genetische kenmerken. *Ned Tijdschr Geneesk* 2001; 145(45):2160–5.
64. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680–5.

- 
65. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI, Lallemand D. NF2 Deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions // NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes & Development* 2003; 17(9):1090–100.
66. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(3):178–96.
67. Lee JM. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 2006; 172(7):973–81.
68. Lee J, Joo KM, Lee J, Yoon Y, Nam D. Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *Onco Targets Ther* 2014; 7:1933–44.
69. Lee JH, editor. *Meningiomas: Historical Perspective // Meningiomas*. New York, London: Springer; 2010 [cited 2013 May 26].
70. Lee TK, Poon RTP, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18):5369–76.
71. Lee WH. Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee. *Neurosurgery* 1990; 3(27):389–95.
72. Leroy P, Mostov KE. Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 2007; 18(5):1943–52.
73. Lillie FR. *The development of the chick: An introduction to embryology / Frank R. Lillie*. 1st ed. New York: Henry Holt; 1908.
74. Liu Q, Mao H, Nie J, Chen W, Yang Q, Dong X et al. Transfoming Growth Factor  $\beta$ 1 induces Epithelial-Mesenchymal Transition By Activating the JNK-SMAD3 Pathway in Rat Peritoneal Mesothelial Cells. *Peritoneal Dialysis International* 2007 [cited 2013 Mar 18]; (28):S88-S95.
75. Loboda A. EMT is the dominant program in human colon cancer. *BMC Medical Genomics* 2011 [cited 2013 Mar 18]; 9(4).
76. Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA. Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Autocrine Signaling Regulates Survival and Mitogenic Pathways in Glioblastoma Cells: Evidence That the Novel PDGF-C and PDGF-D Ligands May Play a Role in the Development of Brain Tumors. *Cancer Research* 2002 [cited 2013 Aug 15]; 62:3729–35.
77. Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Research* 2002; 62(13):3729–35.
78. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 2007 [cited 2013 Mar 20]; (114):97–109.
79. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A von, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 2016; 131(6):803–20.

- 
80. Maheswaran S, Haber DA. Cell fate: Transition loses its invasive edge. *Nature* 2015; 527(7579):452–3.
81. Maillo A, Orfao A, Espinosa AB, Sayagues JM, Merino M, Sousa P et al. Early recurrences in histologically benign/grade I meningiomas are associated with large tumors and coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone. *Neuro-Oncology* 2007; 9(4):438–46.
82. Mani SA, Guo W, Liao M, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008 [cited 2013 Mar 20]; 4(133):704–15.
83. Massagué J. TGF $\beta$  in Cancer. *Cell* 2008; 134(2):215–30.
84. Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 2010; 99(3):379–91.
85. McClatchey AI, Saotome I, Mercer K, Crowley D, Gusella JF, Bronson RT et al. Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes&Development* 1998 [cited 2013 Mar 31]; 12(8):1121–33.
86. Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug Promote Epithelial-Mesenchymal Transition through  $\beta$ -Catenin-T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ . *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19(11):4875–87.
87. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* 1994; 127(6 Pt 2):2021–36.
88. Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S et al. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research* 2006; 66(19):9543–56.
89. Morrison H. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes & Development* 2001 [cited 2013 Jun 10]; 15(8):968–80.
90. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986; 51 Pt 1:263–73.
91. Nagaishi M, Nobusawa S, Tanaka Y, Ikota H, Yokoo H, Nakazato Y et al. Slug, Twist, and E-Cadherin as Immunohistochemical Biomarkers in Meningeal Tumors. *PLoS ONE* 2012 [cited 2014 Mar 18]; 7(9):e46053.
92. Nightingale J. Oncostatin M, a Cytokine Released by Activated Mononuclear Cells, Induces Epithelial Cell-Myofibroblast Transdifferentiation via Jak/Stat Pathway Activation. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004 [cited 2013 Aug 6]; 15(1):21–32.
93. Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 2000; 299(3):551–72.
94. Oya S, Kim S, Sade B, Lee JH. The natural history of intracranial meningiomas. *Journal of Neurosurgery* 2011 [cited 2013 Mar 31]; (114):1250–6.

- 
95. Panagopoulos AT, Lancellotti CLP, Veiga JCE, Aguiar PHP, Colquhoun A. Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol* 2008; 89(1):73–87.
96. Park B, Park J, Byun D. Mitogenic Conversion of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Effect by Oncogenic Ha-Ras-induced Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway in Human Prostate Cancer. *Cancer Research* 2000 [cited 2013 Mar 18]; (60):3031–8.
97. Pecina-Slaus N, Cicvara-Pecina T, Kafka A. Epithelial-to-Mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Frontiers in Bioscience* 2012 [cited 2013 Oct 28]; (E4):889–96.
98. Pećina-Šlaus N. Meningiomas: Role of Genetic Instabilities of the E-cadherin Gene. In: Hayat M, editor. *Tumors of the Central Nervous System, Volume 7*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 17–28.
99. Pećina-Šlaus N, Nikuševa Martić T, Deak AJ, Zeljko M, Hrašćan R, Tomas D et al. Genetic and protein changes of E-cadherin in meningiomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010 [cited 2013 Nov 4]; 136(5):695–702.
100. Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark H, Fusenig N, Nieto AM et al. Snail and E47 Repressors of E-Cadherin Induce Distinct Invasive and Angiogenic Properties in Vivo. *Journal of Cell Science* 2004; 117:2827–39.
101. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7(6):415–28.
102. Pendleton C, Olivi A, Brem H, Quiñones-Hinojosa A. Harvey Cushing's Early Treatment of Meningiomas: The Untold Story. *World Neurosurgery* 2011.
103. Pérez-Magán E, Campos-Martín Y, Mur P, Fiaño C, Ribalta T, García JF et al. Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012; 71(10):882–93.
104. Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky Business Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions. *Cell* 2003; 112(4):535–48.
105. Perry A, Schelthauer B, Stafford S, Lohse, Christine Wollan Peter. "Malignancy" in meningiomas. *Cancer* 1999 [cited 2013 Mar 17]; 85:2046–56.
106. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 1979; 100(2):201–20.
107. Petrilli AM, Fernandez-Valle C. Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* 2016; 35(5):537–48.
108. Pham M, Zada G, Mosich G, Chen T, Gianotta S, Wang K et al. Molecular genetics of meningiomas: a systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. *Neurosurg Focus* 2011; (30).
109. Phillips LE, Koepsell TD, van Belle G, Kukull WA, Gehrels J, Longstreth WT. History of head trauma and risk of intracranial meningioma: population-based case-control study. *Neurology* 2002; 58(12):1849–52.
110. Piek E, Westermarck U, Kastemar M, Heldin CH, van Zoelen EJ, Nistér M et al. Expression of transforming-growth-factor (TGF)-beta receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF-beta1. *Int. J. Cancer* 1999; 80(5):756–63.

- 
111. Poser I, Dominiguez D, Garcia Herreros A de, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff A. Loss of E-Cadherin Expression in Melanoma Cells Involves Up-Regulation of the Transcriptional Repressor Snail. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(27):24661–6.
112. Ragel BT, Couldwell WT, Gillespie DL, Wendland MM, Whang K, Jensen RL. A Comparison of the Cell Lines used in Meningioma Research. *Surg Neurol* 2008; 3(70):295–307.
113. Ragel BT, Jensen RL. Molecular genetics of meningiomas. *Neurosurg Focus* 2005 [cited 2014 Mar 24]; 19(5):E9.
114. Rahimi RA, Leof EB. TGF- $\beta$  signaling: A tale of two responses. *J. Cell. Biochem.* 2007; 102(3):593–608.
115. Rangwala R, Banine F, Borg J, Sherman LS. Erbin regulates mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and MAP kinase-dependent interactions between Merlin and adherens junction protein complexes in Schwann cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(12):11790–7.
116. Rangwala R, Banine F, Borg J, Sherman LS. Erbin regulates mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and MAP kinase-dependent interactions between Merlin and adherens junction protein complexes in Schwann cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(12):11790–7.
117. Rempel S, Ge S, Gutierrez J. SPARC: A Potential Diagnostic Marker of Invasive Meningiomas. *Clinical Cancer Research* 1999 [cited 2013 Mar 17]; (5):237–41.
118. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology* 2006; 5(12):1045–54.
119. Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubber B, Busch R et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 2002; 161(5):1881–91.
120. Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363(6429):515–21. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1038/363515a0>.
121. Rutledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjöld M et al. Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10(2):122–30.
122. Rutledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjöld M et al. Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10(2):122–30.
123. Sade B, Chahlavi A, Krishnaney A, Nagel S, Choi E, Lee JH. WORLD HEALTH ORGANIZATION GRADES II AND III MENINGIOMAS ARE RARE IN THE CRANIAL BASE AND SPINE. *Neurosurgery* 2007 [cited 2014 Mar 18]; 61(6):1194–8.
124. Savagner P. Rise and fall of epithelial phenotype: Concepts of epithelial-mesenchymal transition. Georgetown, Tex, New York, NY, Berlin: Landes Bioscience Eureka.com; Kluwer Acad. Plenum Publ; Springer; 2007. (Molecular biology intelligence unit). Available from: URL: <http://www.springerlink.com/content/p21q7g>.

- 
125. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal. Biochem.* 2000; 285(2):194–204.
126. Schweddeheimer K, Zhou L, Birchmeier W. E-Cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Archiv* 1998; 432(2):163–7.
127. Semb H, Christofori G. The Tumor-Suppressor Function of E-Cadherin. *The American Journal of Human Genetics* 1998 [cited 2014 Mar 18]; 63(6):1588–93.
128. Shimada S, Ishizawa K, Hirose T. Expression of E-cadherin and catenins in meningioma: ubiquitous expression and its irrelevance to malignancy. *Pathol. Int.* 2005; 55(1):1–7.
129. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11):807–20.
130. Simpson D. THE RECURRENCE OF INTRACRANIAL MENINGIOMAS AFTER SURGICAL TREATMENT. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; 20(1):22–39.
131. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.* 1993 [cited 2013 Aug 21]; 123(1):223–35.
132. Stamenkovic I, Yu Q. Merlin, a "magic" linker between extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010; 11(6):471–84.
133. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987; 327(6119):239–42.
134. Stoker M, Perryman M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *Journal of Cell Science* 1985 [cited 2013 Aug 21]; 77:209–23.
135. Striedinger K, VandenBerg SR, Baia GS, McDermott MW, Gutman DH, Lal A. The Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor Gene Product, Merlin Regulates Human Meningioma Cell Growth by Signaling through YAP. *Neoplasia (Neoplasia (New York, N.Y.))* 2008 [cited 2014 Mar 3]; 10(11):1204–12.
136. Takeichi M. Cadherins in Cancer: implications for invasion and metastasis. *Current Opinion in Cell Biology* 1993 [cited 2013 Oct 23]; (5):806–11.
137. Takeichi M. Morphogenetic Roles of classic Cadherins. *Current Opinion in Cell Biology* 1995; 7(5):619–27.
138. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2(6):442–54.
139. Thiery JP. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Tumour Progression. *Nat Rev Cancer* 2002; (2):442–54.
140. Tohma Y, Yamashita T, Yamashita J. Immunohistochemical localization of cell adhesion molecule epithelial cadherin in human arachnoid villi and meningiomas. *Cancer Research* 1992; 52(7):1981–7.
141. Trelstad RL, Hay ED, Revel JD. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* 1967; 16(1):78–106.

- 
142. Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Nawa A, Kikkawa F. Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2007; 107(3):500–4.
143. Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S. ERM Proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends in Biochemical Sciences* 1997 [cited 2013 Oct 27]; 22(2):53–8.
144. Utsuki S, Oka H, Sato Y, Kawano N, Tsuchiya B, Kobayashi I et al. Invasive meningioma is associated with a low expression of E-cadherin and beta-catenin. *Clin. Neuropathol.* 2005; 24(1):8–12.
145. van Tilborg AAG, Morolli B, Giphart-Gassler M, Vries A de, van Geenen DAN, Lurkin I et al. Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *J. Pathol.* 2006 [cited 2014 Mar 24]; 208(4):564–73.
146. Wang Z, Ahmad A, Li Y, Kong D, Azmi AS, Banerjee S et al. Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2010 [cited 2013 Aug 15]; 1806(1):122–30.
147. Wellenreuther R, Kraus J, Lenartz D, Menon A, Schramm J, Louis DN et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *American Journal of Pathology* 1995; 4(146):827–32.
148. Weller RO. *Clinical neuropathology*. Berlin: Springer; 1983.
149. Wen-Fang Liu 1 □SJ2JS2YZ2ZL2AL2aHZ3. CD146 Expression Correlates with Epithelial-Mesenchymal Transition Markers and a Poor Prognosis in Gastric Cancer [cited 2013 Mar 18].
150. Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D. Meningiomas. *The Lancet* 2004; 363(9420):1535–43.
151. Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol* 2010 [cited 2013 Mar 17]; 99(3):307–14.
152. Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Research* 2003; 63(12):3386–94.
153. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell* 2008; 14(6):818–29.
154. Yaşargil MG, Abernathy CD. *Microsurgery of CNS tumors*. Stuttgart, New York, New York: Georg Thieme Verlag; Thieme Medical Publishers; 1996. (Microneurosurgery; vol 4).
155. Ye X, Tam WL, Shibue T, Kaygusuz Y, Reinhardt F, Eaton EN et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* 2015; 525(7568):256–60.
156. Zankl H, Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. *Humangenetik* 1972; 14(2):167–9.
157. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(6):1429–37.
158. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone Morphogenic Protein-7 Induces Mesenchymal to Epithelial Transition in Adult Renal Fibroblasts and Facilitates Re-



---

generation of Injured Kidney. *The Journal of Biological Chemistry* 2005 [cited 2013 Mar 20]; 9(280):8094–100.

159. Zhang H, Wang H, Zhang H, Su J, Zhu J, Wang H et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biochem* 2011; 355(1-2):309–14.

160. Zheng D, Song T, Zhongliu X, Wu M, Liang J, Liu Y. Downregulation of transforming growth factor- $\beta$  type II receptor prohibit epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium. *Molecular Vision* 2012 [cited 2013 Mar 18]; (18):1238–46.

161. Zhou K, Wang G, Wang Y, Jin H, Yang S, Liu C. The potential involvement of E-cadherin and beta-catenins in meningioma. *PLoS ONE* 2010; 5(6):e11231.

162. Zhou L, Ercrolano E, Ammoun S, Schmid MC, Barczyk MA, Hannemann CO. Merlin-deficient human tumors show loss of contact inhibition and activation of WNT/ $\beta$ -Catenin signaling linked to the PDGFR/Src and Rac/PAK pathways. *Neoplasia (Neoplasia (New York, N.Y.))* 2011 [cited 2013 Oct 27]; 13(12):1101–12.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Mawrin, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Hilfe und mannigfachen Ideengebung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kirches für die hilfsbereite wissenschaftliche Betreuung sowie die konstruktive Kritik in jeder Situation. Die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung, die kritischen Betrachtungen und differenzierten Anmerkungen waren mir immer sehr willkommen.

Herrn Professor Dr. Kropf aus dem Institut für Biometrie und medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität zu Magdeburg danke ich besonders für die Unterstützung bei der Erstellung der statistischen Auswertung.

Außerdem möchte ich allen MitarbeiterInnen des Instituts für Neuropathologie meinen herzlichen Dank für die geduldigen Einführungen in die Methodik und das Troubleshooting, wenn etwas nicht funktionierte aussprechen. Besonders Frau Dr. Pachow danke ich für die moralische Unterstützung in allen Lebenslagen.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch meinen lieben Freunden Mareike und Michael Juckenack, deren Beitrag stets gewürdigt und sehr wichtig war.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie danken, die mich nicht nur während des Studiums stets unterstützte, sondern mir auch in allen Fragen rund um die Dissertation mit Rat und Tat zur Seite stand.

## 10 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur

Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in Meningeomen: Untersuchungen zur Rolle von E-Cadherin und E-Cadherin-assoziiierter Transkriptionsfaktoren“

im Institut für Neuropathologie der Otto-von Guericke Universität zu Magdeburg,

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. habil. Dr. h.c Christian Mawrin,

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 14.08.2017

---

## 11 Darstellung des Bildungsweges

02/16-09/17	Assistenzärztin AMEOS Klinikum Halberstadt
12/2015	Zweiter Teil der 2.ÄP mit der Note „sehr gut“ abgelegt
10/2014	Erster Teil der 2.ÄP mit der Note „befriedigend“ abgelegt
03/2013-10/2014	promotionsbegleitende Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neuropathologie
Seit 03/2010	Doktorandin am Institut für Neuropathologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
03/2010	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Physikum
seit 10/2008	<b>Studium der Humanmedizin</b> an der Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg
08/2000 - 06/2008	Mariengymnasium, Papenburg. Abschluss: Abitur
04/2007-10/2007	Auslandsjahr am Ratcliffe-College, Leicestershire, England
08/1996-07/2000	Grundschule Westrhauderfehn

Magdeburg, den 14.08.2017