

**Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann**

Mikrogliale Reaktion auf hirninvasive Meningeome

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Stephanie Isabelle Grund
aus
Tuttlingen
2009**

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter

Frau Professor Dr. A. Bornemann

2. Berichterstatter

Professor Dr. P. Ruck

„What are these little cells?“
He shrugged and said,
„I don't know, but do find out.“
(Streit 2002)

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	8
1.1 Mikroglia	8
1.1.1 Geschichtlicher Überblick	8
1.1.2 Histogenese und Ontogenese	9
1.1.3 Morphologische und funktionelle Aspekte	10
1.1.4 Immunhistochemische Marker für Mikroglia	14
1.1.4.1 CD14	14
1.1.4.2 CD45	15
1.1.4.3 CD68 (PGM1)	16
1.1.4.4 MHCII (HLA-DP;-DQ,-DR)	16
1.1.4.5 MRP8	18
1.2 Meningeome	19
1.2.1 Pathologie der Meningeome	19
1.2.2 Risikofaktoren und Onkogenese	20
1.2.3 Prognose und prädiktive Faktoren	21
1.2.4 Aufbau der Hirnhäute als natürliche Barriere	22
1.2.5 Hirninvansion	23
1.2.6 Veränderte Biologie hirninvasiver Meningeome	24
1.2.7 Reaktion des Hirnparenchyms auf Invasion	25
1.3 Fragestellung und Ziel der Studie	26
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Patientendaten	27
2.1.1 Klinische Daten	28
2.2 Immunhistochemie	28
2.2.1 Primärantikörper	28
2.2.1.1 CD14	28
2.2.1.2 CD31	28
2.2.1.3 CD45	29
2.2.1.4 CD68 (PGM1)	29
2.2.1.5 MHCII	29
2.2.1.6 MRP8	30
2.2.1.7 Collagen 4	30
2.2.2 Farbstoffreagenzien	31
2.2.3 Lösungen	31

2.2.4 Chemikalien	32
2.2.5 Herstellung der Schnitte	32
2.2.6 Hämatoxylin-Eosin Färbungen	32
2.2.7 Vorbehandlung und immunhistochemische Färbung	33
2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung	34
2.2.9 Auswertung und Auszählung	34
2.3 Statistische Methoden	34
3 ERGEBNISSE	35
3.1 Expression von CD68 (PGM1)	36
3.1.1 Meningeome WHO-Grad I	36
3.1.2 Meningeome WHO-Grad II	38
3.1.3 Meningeome WHO-Grad III	40
3.2 Expression von CD45	43
3.2.1 Meningeome WHO-Grad I	43
3.2.2 Meningeome WHO-Grad II	45
3.2.3 Meningeome WHO-Grad III	47
3.3 Expression von MHCII	51
3.3.1 Meningeome WHO-Grad I	51
3.3.2 Meningeome WHO-Grad II	53
3.3.3 Meningeome WHO-Grad III	56
3.4 Expression von CD14	60
3.4.1 Meningeome WHO-Grad I	60
3.4.2 Meningeome WHO-Grad II	63
3.4.3 Meningeome WHO-Grad III	67
3.5 Expression von MRP8	72
3.5.1 Meningeome WHO-Grad I	72
3.5.2 Meningeome WHO-Grad II	74
3.5.3 Meningeome WHO-Grad III	78
3.6 Vergleich des Vorkommens von Mikroglia mit dem Vorhandensein von Basalmembran an der Hirn-Tumorgrenze	82
4 DISKUSSION	86
4.1 CD68	88
4.2 CD45	90

4.3 MHCII	92
4.4 CD14	95
4.5 MRP8	97
4.6 Morphopogische Aspekte von Mikroglia	99
4.7 Ödem als mögliche Ursache für mikrogliale Infiltration des Hirnparenchyms bei WHO-Grad I und II Meningeomen	101
4.8 Einordnung der Ergebnisse in die Intaktheit der Basalmembran und der Membrana gliae limitans	102
5 ZUSAMMENFASSUNG	106
6 LITERATURVERZEICHNIS	108
7 ANHANG	118

1 EINLEITUNG

1.1 Mikroglia

1.1.1 Geschichtlicher Überblick

Vor Beginn des 20. Jahrhunderts war die gängige Meinung, das Nervensystem bestehe aus zwei unterschiedlichen Komponenten, Nervenzellen und Neuroglia, die sich in Form und Funktion unterscheiden würden. 1841 beschrieb Gluge phagozytierende „Entzündungskügelchen“, die er bei Schädigungen des Hirns nachweisen konnte und als leukozytären Ursprungs ansah.

Virchow beschrieb 1846 mit Fett gefüllte Phagozyten als „Schaumzellen“.

Bei der Entdeckung der Mikroglia in ihrer heutigen Bedeutung gab es drei Schlüsselstellen: 1900 entdeckte W.F. Robertson durch Platinfärbungen, dass die Neuroglia aus zwei verschiedenen Teilen besteht, einem epiblastären, den er weiterhin Neuroglia nannte und einem mesoblastärem, den er als Mesoglia bezeichnete und phagozytäre Aufgaben zuschrieb.

Santiago Ramon y Cajal klassifizierte 1913 die Mesoglia als „drittes Element“ in der histologischen Betrachtung der Hirnstruktur, neben Nerven- und Gliazellen, die er als mesodermalen Ursprungs ansah.

Die größte Bedeutung bei der Beschreibung der Mikroglia kommt jedoch einem Schüler Cajals, Pio del Rio-Hortega zu, der auch als Vater der Mikroglia bezeichnet wird. Durch veränderte Silber-Imprägnierungen erkannte er 1919-1921, dass das „dritte Element“ aus zwei morphologisch, funktionell und auch ihrer Herkunft nach völlig unterschiedlichen Zellen bestand und nannte den neuroektodermalen Anteil Oligodendroglia und den mesodermalen Anteil Mikroglia. Del Rio-Hortega bestärkte somit die Dreiteilung nach Cajal, indem er die Mikroglia als echtes drittes Element identifizierte. Morphologisch beschrieb er mikrogliale Zellen während ihrer Migration durch das zentrale Nervensystem (ZNS) als rundliche Zellen mit Pseudopodien, die sich jedoch bei ihrer Ansiedelung im Gewebe verzweigen und frei, ohne Kontakt zu anderen neuroglialen Zellen, enden. Die physiologische Aufgabe der Mikroglia sah del Rio-Hortega, als Vertreter des retikulo-endothelialen Systems im zentralen Nervensystem, in der Phagozytose von Erythrozyten und Zelldetritus. Ebenso erkannte er ihre Beteiligung bei pathologischen Prozessen wie Entzündungen oder Nekrosen.

Histogenetisch schrieb del Rio-Hortega Mikroglia polyblastischen Zellen der Meningen zu, die um den Zeitpunkt der Geburt ins ZNS einwandern, oder auch Monozyten des Blutes, da das Einwandern mit der vaskulären und meningealen

Organisation korrelierte. Die morphologischen und funktionellen Beschreibungen del Rio-Hortegas wurden später von vielen Forschern in vielen verschiedenen Studien bestätigt, während die Histo- und Ontogenese der Mikroglia lange Gegenstand intensiver Forschung und Diskussion blieb (Reviewed von Rezaie und Male 2002).

1.1.2 Histogenese und Ontogenese

Bei der Diskussion um die mikrogliale Histo- und Ontogenese können vier Hauptrichtungen unterschieden werden (Reviewed von Ling und Wong 1993):

- Herkunft durch Invasion mesodermaler pialer Elemente:
Diese Erklärung wurde 1932 von del Rio-Hortega aufgestellt, der argentophile Zellen in der Pia beobachtete, die ins Hirngewebe einwanderten und während der Migration ihre Form von rundlich zu amöboid wandelten. Orte mit vermehrter mikroglialer Proliferation bezeichnete er als „fountains of proliferation“. Diese Theorie wurde von vielen Forschern angenommen und verfolgt.
- Herkunft aus Neuroektoderm:
Rydberg sah 1932 eine räumliche Beziehung zwischen dem Subependym der lateralen Ventrikel und ramifizierter Mikroglia, so dass er einen neuroektodermalen Ursprung annahm. Fujita und Kitamura teilten 1975 diese Ansicht.
- Herkunft von Perizyten:
Diese Theorie wurde 1969 von Mori und Leblond aufgestellt, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen Ähnlichkeiten zwischen Perizyten und Mikroglia entdeckten und so von einer Einwanderung der Perizyten ausgingen.
- Herkunft von Monozyten des Blutes:
Santha und Juba vertraten 1933 diese Erklärung, da sie einen zeitlichen Zusammenhang zwischen Vaskularisation und dem Erscheinen von Mikroglia entdeckten. Mehrere Studien konnten an Knochenmarkchimären zeigen, dass Donorzellen hämatopoetischen Ursprungs später im Gehirn lokalisiert waren (Ting et al 1983; Hickey und Kimura 1988).
Weitere Studien wiesen exogen markierte Monozyten im sich entwickelnden ZNS nach und zeigten immunhistochemisch, dass Monozyten die Fähigkeit besitzen sich in Mikroglia umzuwandeln (Ling 1981; Perry et al 1985).

Einen weiteren Hinweis auf die monozytäre Herkunft von Mikroglia leisten die Oberflächenantigene, die sonst hauptsächlich auf hämatopoetischen Zellen oder Makrophagen gefunden werden (Perry und Gordon 1988; Streit et al 1988). Die vielen Hinweise lassen diese Theorie heute als die wahrscheinlichste gelten.

1.1.3 Morphologische und funktionelle Aspekte

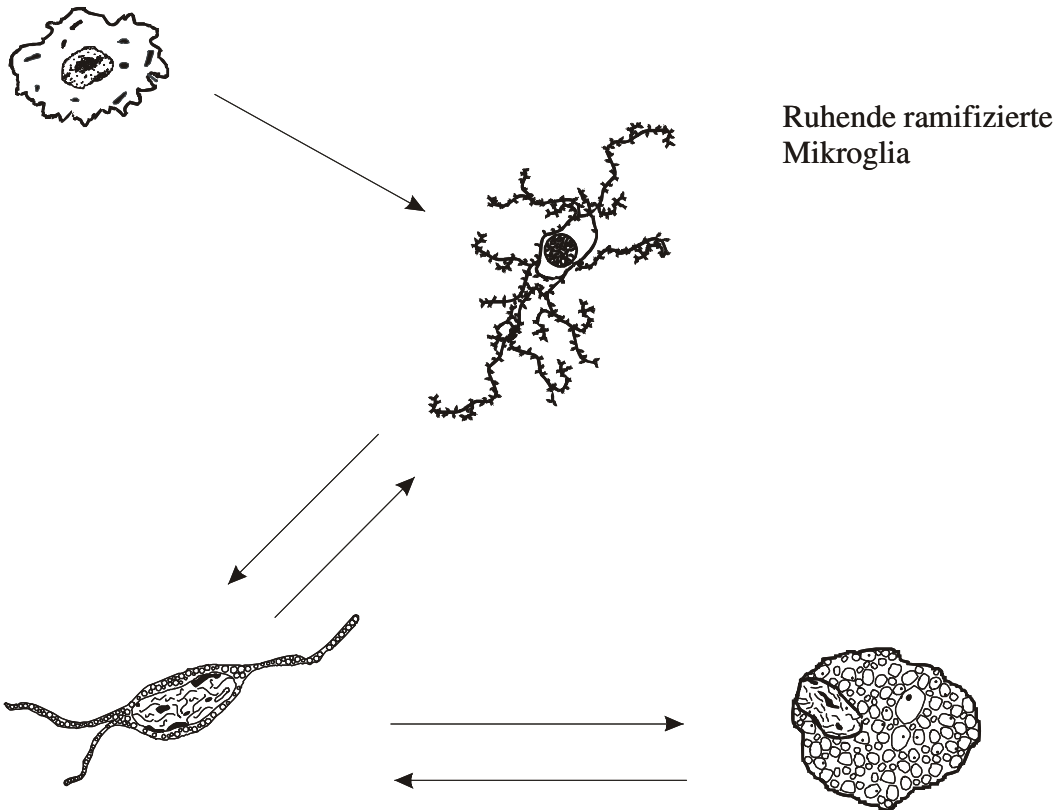
Mikroglia stammen der monozytär-phagozytierenden Zelllinie ab und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Immunantwort des zentralen Nervensystems (Graeber und Streit 1990). Dies ist bei den meisten pathologischen Prozessen der Fall, wie zum Beispiel Traumata, Ischämien, HIV-Encephalitis, M. Alzheimer und Tumoren (Beschorner et al 2000; Cosenza-Nashad et al 2006; Dickson et al 1993; Graeber et al 2002; Lassmann et al 1993)

Dabei besteht die mikrogliale Aktivierung aus Zellteilung, beziehungsweise Hyperplasie, Zellhypertrophie und Veränderungen des Immunphänotyps und der sekretorischen Aktivität der Zellen (Streit et al 2005).

Insgesamt können morphologisch fünf verschiedene Arten von Mikroglia unterschieden werden (Abb. 1):

- Amöboide Zellen
- Perivaskuläre Mikroglia (Abb. 2)
- Ruhende, ramifizierte Mikroglia (Abb. 3)
- Aktivierte, nicht phagozytierende Mikroglia mit verkürzten Fortsätzen und hypertrophiertem Zellkörper (Abb. 4)
- Phagozytierende Mikroglia, die auch als Gehirnmakrophagen bezeichnet werden (Graeber und Streit 1990; Kreutzberg 1996; Streit et al 1988)

Monozytäre Zelle



Aktivierte, hypertrophierte Mikroglia
mit verkürzten Fortsätzen

Phagozytierende Mikroglia
(Gehirnmakrophage) mit
granulärer Zellform

Abbildung 1: Funktionelle Plastizität und verschiedene Aktivierungszustände. Monozytäre Zellen können sich im Rahmen des mikroglialen Austausches in ortsständige, ramifizierte Mikroglia umwandeln. Unter pathologischen Bedingungen können Mikrogliazellen zu phagozytierenden Gehirnmakrophagen transformieren. Nach Beendigung der aktivierenden Stimuli ist eine Umwandlung in ruhende Mikroglia möglich. (Abbildung nach G. Albrecht und M. Mittelbronn, 2002)

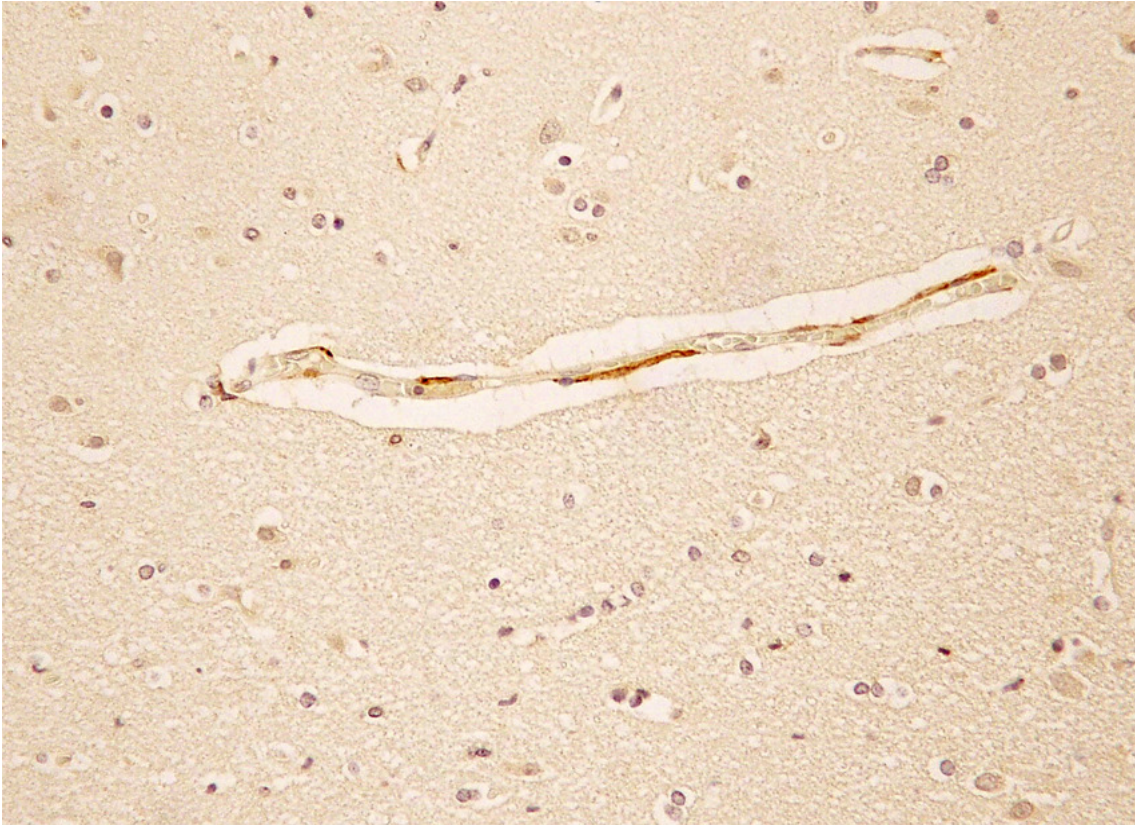


Abbildung 2: Perivaskuläre, durch CD14 dargestellte Mikroglia in einer Normalhirnpopulation.

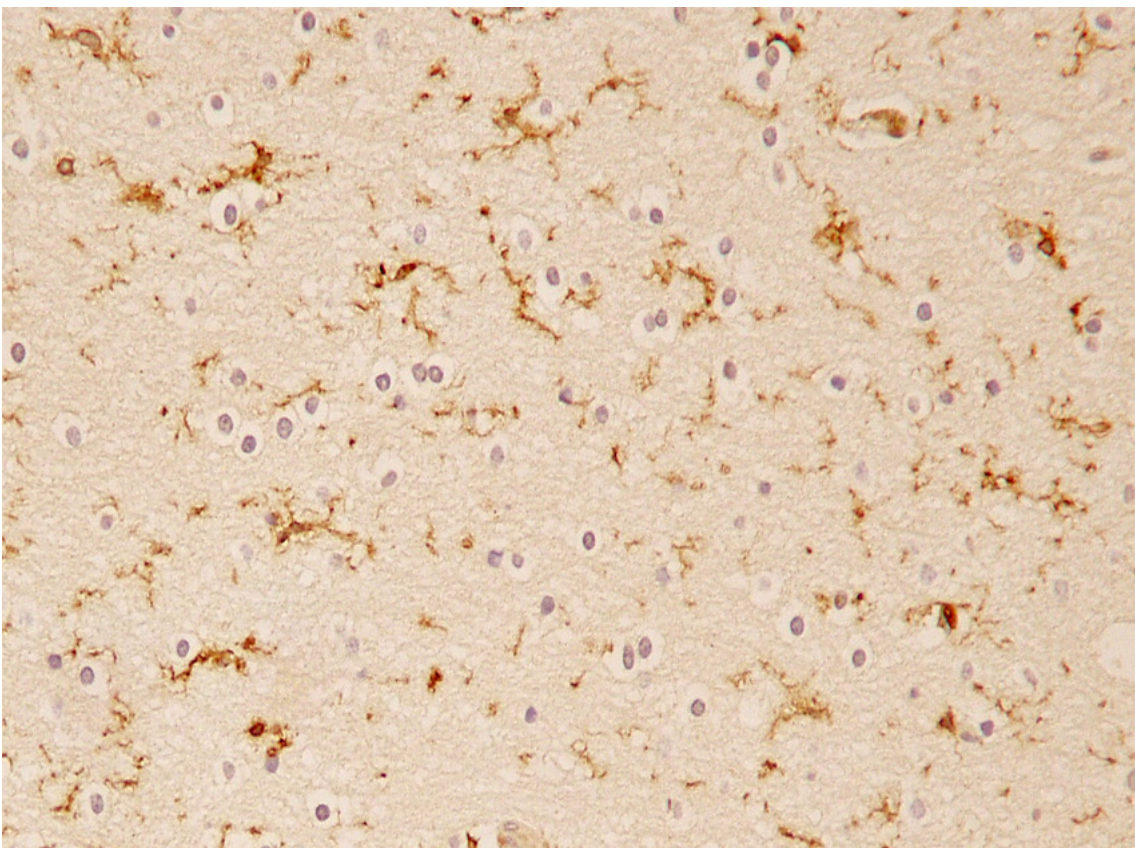


Abbildung 3: Ruhende, ramifizierte Mikroglia in einer Normalhirnpopulation. Darstellung durch CD45.

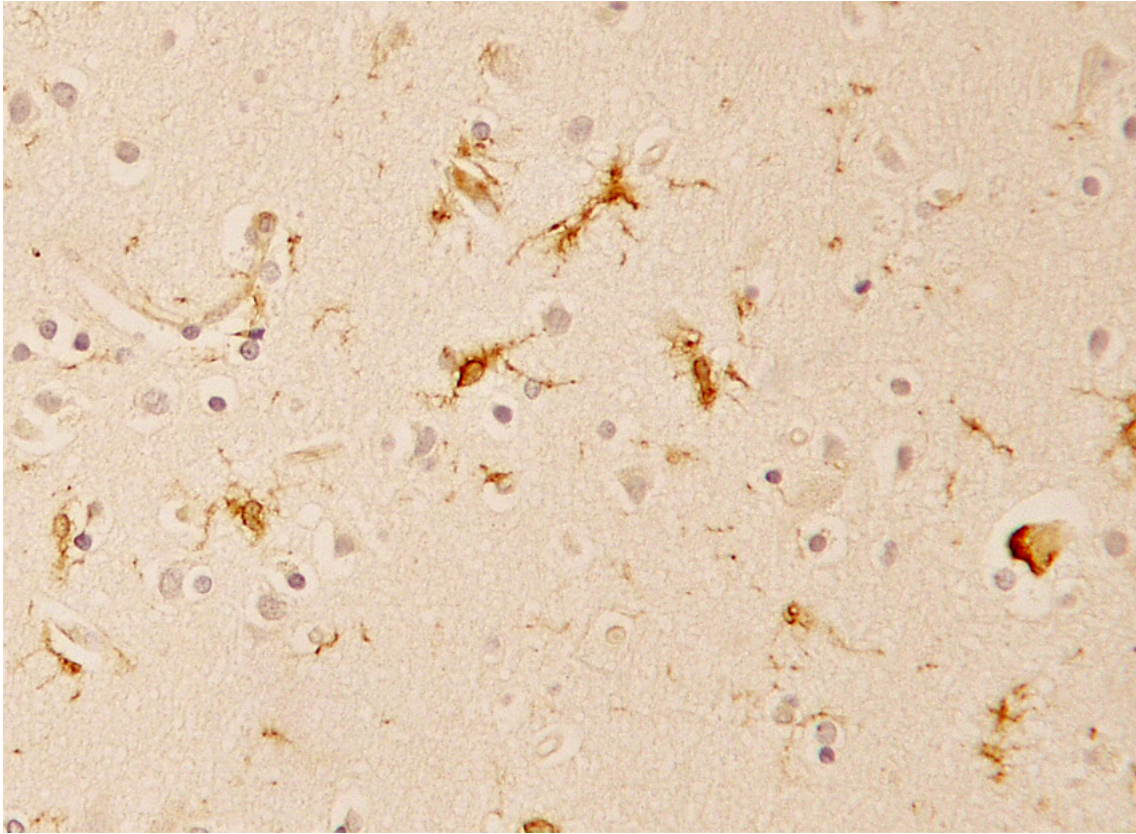


Abbildung 4: Aktivierte Mikroglia mit verkürzten Zellfortsätzen und hypertrophiertem Zellkörper.

Bei ihrer Transformation werden die mikroglialen Zellen durch neuronale Interaktion beeinflusst. So hemmen zum Beispiel verschiedene Neurotrophine, wie nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) oder Neurotrophin 3 (NT3) die mikrogliale Expression von MHC (major histocompatibility complex) II Molekülen auf ihrer Oberfläche (Neumann et al. 1998).

Auch Chemokine, Komplementrezeptoren und Zytokinrezeptoren sind bei der Regulation der mikroglialen Reaktion beteiligt. Besonders Interferon (IF) γ und Tumornekrosefaktor (TNF) α sind starke Aktivatoren der mikroglialen Phagozytose und Produktion von proinflammatorischen Mediatoren (Reviewed von Aloisi 2001; Hanisch 2002; Neumann 2001).

Eine weitere Funktion der Mikroglia ist neben der Phagozytose die Produktion von immunmodulatorischen und -regulatorischen Mediatoren, wie die proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL) 1 und TNF α , sowie die antiinflammatorischen Zytokine transforming growth factor (TGF) β , Interleukin 10 und Interleukin-Rezeptor Antagonist 1. Auch verschiedene Prostaglandine werden von aktivierter Mikroglia synthetisiert, die immunmodulatorische Effekte bei pathologischen Veränderungen des ZNS zeigen (Reviewed von Aloisi 2001).

Mikrogliale Zellen dienen neben Astrozyten auch der Antigenpräsentation für T-Zellen bei der Immunantwort im zentralen Nervensystem. Dies erfolgt durch Phagozytose und Prozessierung von Antigenen, die durch eine vermehrte Expression von MHCII Molekülen auf der Zelloberfläche den eingewanderten T-Zellen präsentiert werden (Frei et al. 1987; Matsumoto et al. 1992).

1.1.4 Immunhistochemische Marker für Mikroglia

Einen spezifischen Marker für ruhende Mikroglia gibt es nicht (Moore und Thanos 1996). Die Oberflächenproteine mikroglialer Zellen werden meist auch auf anderen Zellen der myelomonozytären Reihe exprimiert und sind stark abhängig vom Funktionszustand der Zellen. So nutzt man zur immunhistochemischen Detektion eine Reihe von Markern, die dem jeweiligen Funktions- und Aktivierungszustand entsprechen. Die in dieser Studie verwandten Marker sind:

1.1.4.1 CD14

CD14 wird vor allem auf Monozyten, Makrophagen und aktivierter Mikroglia exprimiert (Abb. 5). Es ist ein wichtiger Schlüssel des angeborenen Immunsystems und bei entzündlichen Prozessen wesentlich beteiligt. CD14 ist Rezeptor für Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien (Wright et al 1990), aber auch für Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien und Mykobakterien (Pugin et al 1994). Ebenso ist es an der Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren 2 und 4 beteiligt (Kirsching et al 1998; Ulevitch 1999), bei intrazellulären Signalwegen durch I κ B-Kinase NF κ B, sowie bei Signalwegen durch mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK), vor allem ERK1, ERK2, JNK und p53 (Guha und Mackmann 2001). Des Weiteren ist CD14 bei der Synthese von TNF α , Interleukin 1, 6, 8, 18 und nuclear factor κ B beteiligt (Dentener et al 1993; Manigold et al 2000; Meng und Lowell 1997). Da durch dieses Molekül auch die Phagozytose beeinflusst wird, spielt es eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, bei entzündlichen Reaktionen und bei der Gewebehomöostase. Ruhende Mikroglia exprimiert kein CD14 auf ihrer Oberfläche, deshalb dient CD14 als Marker aktivierter Mikroglia (Ulvestad et al 1994a). TNF α , IL 2, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin aktivieren Monozyten über CD14 (Bosco et al 1997; Nadeau und Rivest 2000; Wang et al 1998; Wang und Munford 1999).

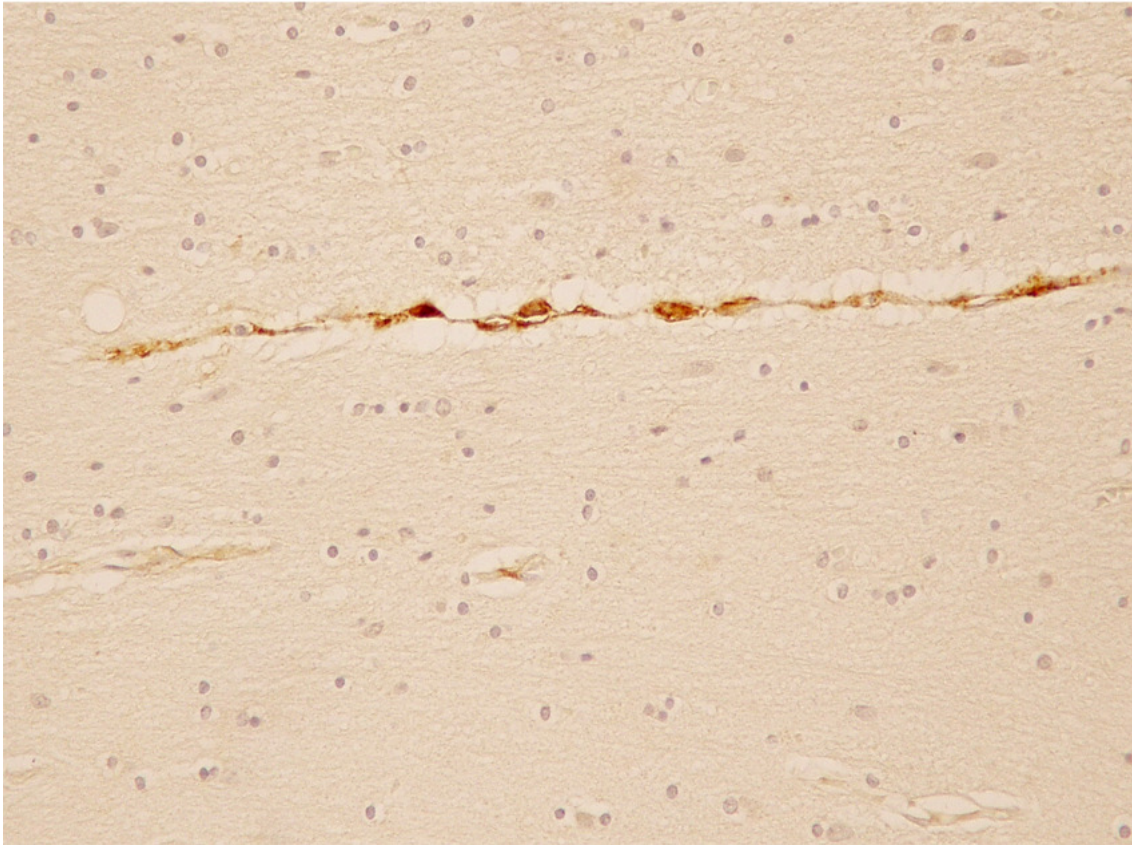


Abbildung 5: CD14-positive Zellen in einer Normalhirnpopulation, hier werden perivaskuläre Mikroglia dargestellt.

1.1.4.2 CD45

CD 45, auch LCA (leucocyte common antigen) bezeichnet, ist ein Marker für eine Tyrosin-Phosphatase auf der Membran kernhaltiger Zellen hämato-poetischen Ursprungs. CD45 dient der leukozytären Entwicklung und der Signaltransduktion (Altin und Sloan 1997; Irie-Sasaki et al 2003). Diagnostisch wird CD45 als Pan-Leukozytenmarker verwendet und markiert vor allem die Membranen lymphoider Zellen. Bei Aktivierungsvorgängen wurden ähnliche Expressionsmuster für CD45 auf Mikroglia, wie auf Lymphozyten entdeckt (Akiyama et al 1994) (Abb. 6). Perivaskuläre Zellen zeigen ebenso eine vermehrte Expression von LCA gegenüber parenchymaler Mikroglia auf der Einzelzellebene (Becher und Antel 1996). Makrophagen exprimieren CD45 in stärkerer Form auf ihrer Oberfläche als Mikroglia, so dass dies als Unterscheidungskriterium gewertet werden kann (Ulvestead et al 1994 a; Becher und Antel 1996). Neuere Studien ergaben eine vornehmliche Expression der RB-Isoform auf Mikroglia, was diese Form zum Marker ruhender Mikroglia machen könnte (Cosenza-Nashat et al 2006).

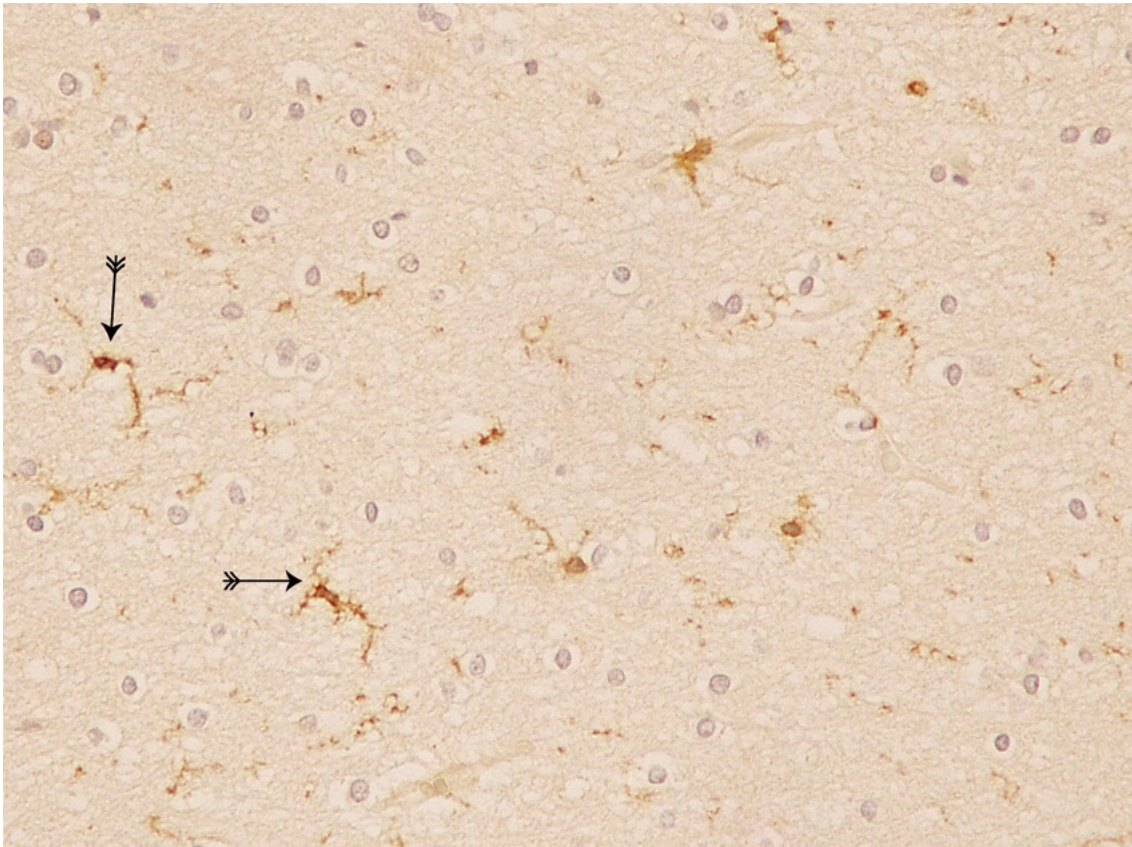


Abbildung 6: CD45 exprimierende, ramifizierte Mikroglia in einer Normalhirnpopulation.

1.1.4.3 CD68 (PGM1)

CD68 ist ein etwa 110 kDa schweres, stark glycosyliertes Protein, das vor allem auf lysosomalen Membranen, aber zu geringem Anteil auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Eine Expression von CD68 auf ruhender und aktivierter Mikroglia wurde in verschiedenen Studien festgestellt (Ulvestad et al 1994c; Wagner et al 1999). Es dient als Marker für Monozyten, Macrophagen und ruhender Mikroglia (Ulvestad et al 1994a) (Abb. 7).

1.1.4.4 MHCII (HLA-DP;-DQ;-DR)

MHCII (major histocompatibility complex class II) bezeichnet eine Familie humaner Leukozyten-Antigene, deren Subtypen glycosylierte Oberflächen-proteine darstellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation für CD4+ T-Zellen. Es herrscht eine stetige Diskussion darüber, ob MHCII als Marker aktivierter Mikroglia gelten kann, oder ob das Protein auch auf ruhenden Zellen exprimiert wird (Abb. 8). Während von einigen Arbeitsgruppen eine konstitutive Expression des Markers auf Mikroglia angenommen wird, sehen andere Gruppen diesen Marker als aktivierungsspezifisch an (Akiguchi et al 1997; Graeber et al 1992; Mattiace et al 1990; McGeer et al 1988).

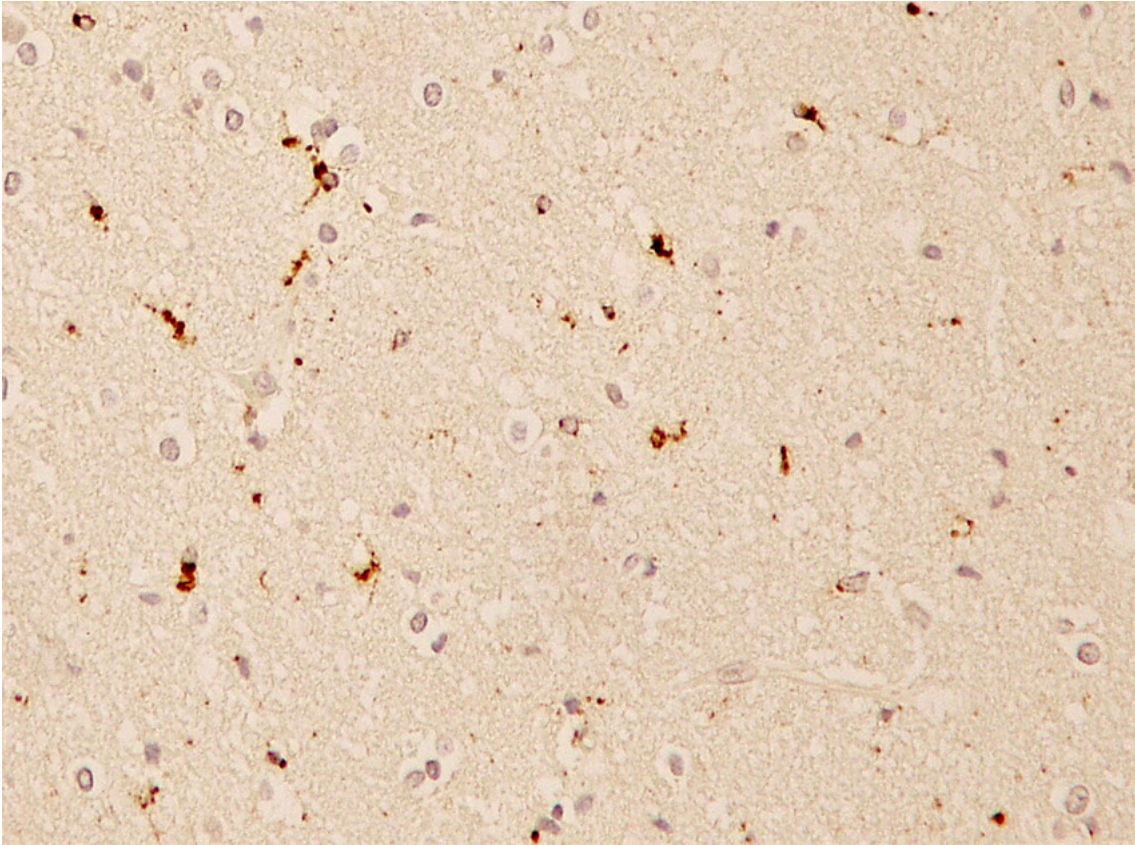


Abbildung 7: CD68 auf mikroglialen Zellen in einer Normalhirnpopulation

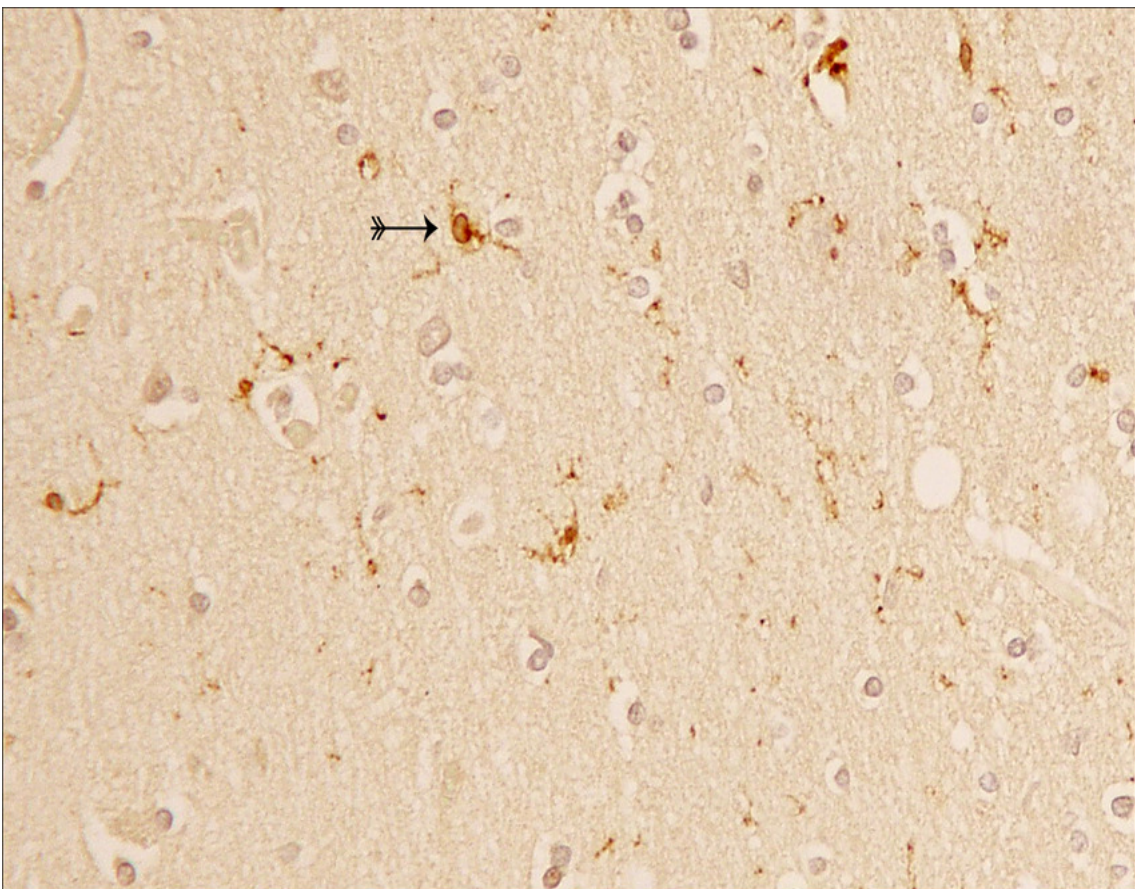


Abbildung 8: MHCII auf aktivierter Mikroglia in einer Normalhirnpopulation.

1.1.4.5 MRP8

MRP8 (macrophage inhibiting factor related protein 8) wird auch als S100A8 bezeichnet und ist ein Mitglied der S100-Protein Familie. Sie sind bei intrazellulären Calcium-abhängigen Aktivierungsprozessen beteiligt, wie Regulation der Zelldifferenzierung und Enzymaktivierung. Da eine Expression der S100-Proteine auf Mikroglia vor allem bei entzündlichen Prozessen, Traumata und Ischämien beobachtet wurde, gilt MRP8 als Marker aktivierter Mikroglia (Schluesener et al 1996; Postler et al 1997; Schluesener et al 1998; Beschorner 2000).

1.2 Meningeome

1.2.1 Pathologie der Meningeome

Meningeome entstehen aus neoplastischen Arachnoideadeckzellen (Kepes et al 1986) und zählen mit 13 bis 26% zu den häufigsten primär intrakraniellen Tumoren (Lantos et al 2002). Der Haupterkrankungszeitpunkt liegt im mittleren bis höheren Lebensalter, mit einem Gipfel zwischen der sechsten und siebten Dekade, wobei bei einer Geschlechterverteilung von 3:2, Frauen häufiger betroffen sind (Louis et al 2000). Durch ihr in der Regel langsames und scharf begrenztes Wachstum, gelten Meningeome in der Regel als gutartige Tumore, die oft asymptomatisch bleiben und einen Zufallsbefund darstellen können. Treten sie jedoch symptomatisch in Erscheinung, wird das Bild durch lageabhängige Kompressionsschäden der umliegenden Strukturen bestimmt, wie Hemiparesen, Gesichtsfeldausfälle, Aphasien, epileptische Anfälle und andere fokale Symptome (Black 1993). Meningeome können auch durch einen Verschluss venöser Sinus, oder durch die Invasion der Dura oder der Schädelkalotte auffällig werden (Burger et al 2002). Hirninvansion oder Verwachsungen mit umliegenden Strukturen finden eher selten statt, ihr Vorkommen ist allerdings meist mit einer Prognose-Verschlechterung assoziiert (Louis et al 2000). Meningeome können jedoch auch als maligne Neoplasien auftreten, die durch aggressives Wachstum mit starker Vaskularisierung gekennzeichnet sind.

Histologisch zeigen Meningeome ebenso ein stark variables Bild, wobei einige histologische Typen prognostisch von Bedeutung sind. Die World Health Organisation (WHO) unterscheidet drei Grade, die mit der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und dem Wachstumsverhalten korrelieren. Dabei werden dem weitgehend gutartigen WHO-Grad I die Subtypen meningotheliomatös, fibromatös, transitional, psammomatös, angiomatös, mikrozystisch, sekretorisch, lymphoplasmazellreich, und metaplastisch zugeordnet. Meningeome mit einem erhöhten Risiko eines Rezidives und aggressiveren Wachstums werden WHO-Grad II zugeordnet, mit den Subtypen atypisch, klarzellig und chordoid. Als WHO-Grad III werden Meningeome des Subtyps papillär, rhabdoid und anaplastisch bezeichnet (Kleihues et al 2002). Meningeome mit WHO-Grad I treten dabei in etwa 80% der Fälle auf, 15-20% der Meningeome werden WHO-Grad II zugeordnet und nur etwa 1-2% zeigen Charakteristika eines WHO-Grad III (Perry et al 1999). Meningeome können grundsätzlich an allen Stellen der kraniospinalen Achse auftreten, die häufigsten Lokalisationen intrakranieller Meningeome sind jedoch parasagittale Falxmeningeome (25%), Konvexitätsmeningeome (19%) und Keilbeinflügelmeningeome (17%) (Burger et al 2002).

1.2.2 Risikofaktoren und Onkogenese

Die Zuordnung potentieller Risikofaktoren ist, wie die Onkogenese, sehr vielschichtig. Eine eindeutige Assoziation mit dem späteren Auftreten von Meningeomen konnte nur bei radiologischer Bestrahlung mit schwacher, mittlerer und starker Dosis gefunden werden, wobei eine Tumormanifestation nach 35, 26 und 19-24 Jahren stattfand, die, wiederum altersabhängig, bei jüngeren Patienten schneller eintrat (Lantos et al 2002; Louis et al 2000). Als weitere Risikofaktoren werden Traumata oder Papovaviren diskutiert, hierbei ist die Studienlage allerdings kontrovers (Lantos et al 2002).

Da in Meningeomzellen immunhistochemisch sowohl Vimentin, Cytokeratin und epitheliales Membranantigen (EMA) nachweisbar ist, ist sowohl ein epithelialer, als auch mesenchymaler Ursprung möglich (Lantos et al 2002). Auf genetischer Ebene konnten verschiedene Veränderungen nachgewiesen werden, die zu einer Tumorentstehung in den Arachnoideadeckzellen beitragen können. Eine eindeutige Veränderung, die zu einem malignen Wachstum führt, konnte nicht identifiziert werden. Momentan geht man von folgendem Stufenmodell aus:

Eine Mutation im Neurofibromatose (NF) Gen 2, oder ein Verlust des Chromosoms 22q führt zu einem Meningeom WHO-Grad I. Ein weiterer Verlust der Regionen 1p, 6q, 10q, 14q und 18q oder Verlängerungen in den Regionen 1q, 9q, 12q, 15q, 17q und 20q führen zur Entwicklung eines atypischen Meningeoms WHO-Grad II. Kommt zu diesen Mutationen nun ein Verlust der Regionen 6q, 9p, 10 und 14q, eine 17q Amplifikation, oder eine eher seltene Mutation im TP53 oder PTEN Gen, oder eine seltene Deletion im CDKN2A Gen hinzu, so führt dies zur Entstehung eines anaplastischen, malignen Meningeoms mit WHO-Grad III (Lamszus 2004; Louis et al 2000).

1.2.3 Prognose und prädiktive Faktoren

Die Prognose der Patienten mit Meningeomen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Da die einzige wirklich kurative Therapie eine Operation darstellt, ist die Rezidivrate stark vom Resektionsgrad abhängig. Bei einer subtotalen Resektion konnten Stafford und Mitarbeiter 1998 eine Rezidivhäufigkeit von 39% nach fünf Jahren feststellen, bei vollständiger Resektion betrug diese hingegen nur 12%. Auch Meningeome mit WHO-Grad II und III, ein hoher Proliferationsindex oder aggressive histologische Varianten wie klarzellige, chordoide und rhabdoide Meningeome sind negative prognostische Indikatoren. Ebenso haben genetische Veränderungen, die mit Progression assoziiert sind und jüngere Patienten allgemein eine schlechtere Prognose (Perry 2006).

Hirninvasion ist ebenso ein Prognose bestimmender Faktor, da auch histologisch benigne anmutende Typen ein atypisches Verhalten zeigen und mit einer höheren Rezidivrate einhergehen, ebenso spielt die schlechtere Resezierbarkeit bei Hirninvasion eine Rolle. Benigne Meningeome zeigen eine Rezidivrate von 7-20%, atypische Meningeome von 29-40% und anaplastische Meningeome rezidivieren mit einer Wahrscheinlichkeit von 50-78%, wobei die mittlere Überlebenszeit für diese Patienten mit bis zu zwei Jahren angegeben wird (Louis et al 2000).

1.2.4 Aufbau der Hirnhäute als natürliche Barriere

Das Hirnparenchym ist von den Meningen umgeben, die aus drei Anteilen bestehen: Der Dura mater, die der Schädelkalotte anliegt, der Arachnoidea und der Pia mater. Arachnoidea und Pia mater werden zusammen auch als Leptomeningen bezeichnet. Die Arachnoidea besteht aus zwei Zellschichten. Mit den duralen Fibroblasten steht sie über eine fünf bis sechs Zellschichten umfassende Duragrenzschicht in Verbindung. Dem zwischen Pia mater und Arachnoidea liegenden Subarachnoidalraum ist die Arachnoidealgrenzschicht zugewandt. In ihr sind die Zellen irregulär geformt und über tight junctions, gap junctions und Desmosomen miteinander verbunden.

Die Arachnoidea steht mit der Pia mater über Trabekel in Verbindung (Alcolado et al 1988). Die Pia mater ist aus einer fenestrierten Zellschicht und folgt dem Verlauf des Kortex. Sie liegt der pial-glialen Grenzbasalmembran auf, die von Astrozyten gebildet wird und kontinuierlich den gesamten Kortex bedeckt.

Die Membrana limitans gliae, die die oberste Schicht des Kortex bildet, besteht aus Astrozytenfortsätzen, die die pial-gliale Basalmembran synthetisieren (Lopes und Mair 1974a und b). Die Leptomeningen stellen ein natürliches Hindernis gegen Hirninvasion von Tumorzellen dar (Pedersen et al 1994).

1.2.5 Hirninvasion

Bei Tumoren in anderen Organen gilt die Invasion anderer Gewebe als sicheres Zeichen für hohe Malignität und ein fortgeschrittenes Stadium. Bei Meningeomen ist Hirninvasion nicht eindeutig mit diesen Kriterien assoziiert. Die Morphologie der Hirninvasion eines Meningeoms ist unterschiedlich zu der Morphologie der Invasion anderer Tumore. Meningeome zeigen eine Verschmelzung mit den Leptomeningen (Pedersen et al 1994) und entsenden meist dem Primärtumor anhaftende Tumorzellen ins Hirngewebe oder wachsen entlang perivaskulärer Räume ins Hirnparenchym ein (Burger et al 2002), so dass eine Invasion durch verstreute singuläre Zellen, wie bei anderen organischen Tumoren nur selten vorliegt. Die aktuelle WHO-Klassifikation definiert Hirninvasion als die Infiltration des Hirnparenchyms durch Meningeomzellen, ohne dazwischen liegende Leptomeningen und stuft hirninvasive Meningeome als WHO-Grad II ein (Louis et al 2007). Die Bedeutung der Hirninvasion für die Einstufung der Malignität eines Meningeoms war lange Gegenstand steter Diskussionen, da sowohl histologisch benigne, als auch atypische oder anaplastische Meningeome invasiv wachsen können. Da sich benigne invasive Meningeome biologisch wie atypische verhalten und auch mit einer höheren Rezidivrate vergesellschaftet sind, tendieren einige dazu diese der atypischen Gruppe zuzuordnen (Perry 2006). Genetische Veränderungen, die für höhergradige Malignität sprechen, wurden bei diesen Tumoren nicht gefunden (Louis et al 2000). Meningeome mit WHO-Grad II oder III sind häufiger mit Hirninvasion vergesellschaftet und haben dann auch eine erhöhte Rezidivrate (Lantos et al 2002).

1.2.6 Veränderte Biologie hirninvasiver Meningeome

Hirninvasive Meningeome zeigen gegenüber den nicht invasiven Spezies eine veränderte Expression verschiedener Enzyme. So konnten Sandberg-Nordqvist und Mitarbeiter 2001 nachweisen, dass invasive Meningeome verstärkt Matrix Metalloproteinase (MMP) 9 transkribieren (Sandberg-Nordqvist et al 2001). MMP9 ist eine Typ IV Kollagenase, die Kollagene der Basalmembran, sowie Gelatin und Elastin abbaut. Sie zeigten mit einer in situ Hybridisierung, dass das Ausmaß der Transkription von MMP9 mit dem Grad der Invasivität des Tumors korreliert. Für MMP2 konnten sie keine Korrelation feststellen.

Strojnik und Mitarbeiter konnten 2001 in einer immunhistochemischen Studie eine vermehrte Expression von Cathepsin B und L, zweier Cysteinproteinasen, in atypischen Meningeomen, im Vergleich zu benignen Meningeomen feststellen (Strojnik et al 2001).

Kitange und Mitarbeiter untersuchten 2000 die Expression von Ets-1, einem Transkriptionsfaktor, der im Zusammenhang mit der Aktivierung von urkinase-type plasminogen activator steht, bei invasiven und nicht invasiven Meningeomen (Kitange et al 2000). Dabei fanden sie einen Zusammenhang zwischen der Expression von Ets-1 in Meningeomen und dem Hirninvasionspotential dieser Tumore, unabhängig ihres WHO-Grades. Zeigte ein Tumor eine Expression von Ets-1 auf Tumorzellen, so waren meist auch hirninvasive Anteile vorhanden. Ebenso entdeckten sie eine Korrelation zwischen der Expression des Transkriptionsfaktors und den WHO-Graden der Meningeome. Je höhergradiger der Tumor, umso wahrscheinlicher war auch eine Expression von Ets-1.

Die genauen Mechanismen der Hirninvasion sind jedoch bis heute noch nicht komplett verstanden. Fritz und Mitarbeiter zeigten 2005 in einer immunhistochemischen Studie mit Antikollagen IV-Antikörpern gegen Basalmembrankollagen, dass Hirninvasion in Form von fingerartigen Einstülpungen des Tumors ins Hirnparenchym einem Durchbrechen der pial-glialen Basalmembran bei WHO-Grad I Meningeomen voran geht (Fritz et al 2005). Hierbei unterscheiden sich Meningeome von anderen Tumoren. Schittenhelm und Mitarbeiter zeigten 2006 in einer weiteren immunhistochemischen Studie mit Antikollagen IV Antikörpern eine inverse Korrelation von erhaltener pial-glialer Basalmembran und steigendem WHO-Grad invasiver Meningeome (Schittenhelm et al 2006). Dies macht deutlich, dass das Wachstumsmuster höhergradiger Meningeome dem anderer infiltrierender Karzinome entspricht.

1.2.7 Reaktionen des Hirnparenchyms auf Invasion

Die Reaktion des Hirnparenchyms auf Invasion anderer Zellen von den Leptomeningen ausgehend ist weitgehend unbekannt und nur wenige Studien haben sich mit diesem Thema beschäftigt.

1987 untersuchten Jamshidi und Mitarbeiter die Vorgänge im Hirn bei Invasion durch Meningiosis carcinomatosa an einem Rattenmodell (Jamshidi et al 1987). Sie induzierten dabei eine meningeale Carcinomatose in den Tieren und untersuchten anschließend immunhistochemisch die Veränderungen an der pial-glialen Membran und den darunter liegenden Astrozyten mit Anfärbungen durch anti-gliale fibrilläre Säureprotein (GFAP). Desweiteren untersuchten sie die Reaktion der Neurone durch Färbungen mit einem Antikörper gegen Tubulin, einer Untereinheit von Microtubuli. Dabei stellten Jamshidi und Mitarbeiter fest, dass die invadierenden Zellen eine Verdickung der pial-glialen Membran hervorrufen und eine reaktive Hypertrophie der darunter liegenden Astrozyten. In fortgeschritteneren Stadien der Invasion beobachteten sie eine Aufhebung der Kontinuität der pial-glialen Begrenzung. Eine Veränderung in den Neuronen konnten sie mit ihren Methoden nicht feststellen.

Zeltner und Mitarbeiter beschäftigten sich 2007 mit den Reaktionen des Hirns bei invasiven Meningeomen (Zeltner et al 2007). In einer immunhistochemischen Studie an invasiven Meningeomen aller WHO-Grade zeigten sie mit Färbungen von GFAP, SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine), und CD44, einem Molekül der Zell-Zell- und Zell-Matrix Adhäsion, dass die subpialen Astrozyten im Laufe der Invasion verschwinden. Sie konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Intaktheit der pial-glialen Basalmembran und dem Vorhandensein von subpialen Astrozyten bei WHO-Grad I Meningeomen zeigen.

1.3 Fragestellung und Ziel der Studie

Mikroglia stellen die zelluläre Immunantwort des Hirns auf pathologische Prozesse dar. Bei vielen Vorgängen werden mikrogliale Zellen aktiviert. Da es klare Zeichen für eine parenchymatöse Affektion des Hirns bei Invasion eines Meningeoms gibt, wollten wir mit dieser Studie die Reaktion der Mikroglia bei Hirninvasion untersuchen. Dieser Studie liegt die Annahme zu Grunde, dass die Hirninvasion durch Meningeome einen Stimulus für die Aktivierung von Mikrogliazellen an der Hirn-Tumorgrenze darstellt. In dieser immunhistochemischen Studie sollte eine Darstellung ruhender Mikroglia durch die Färbungen mit CD45, CD68 und MHCII erfolgen. Die Verteilung aktivierter Mikroglia wollten wir vor allem durch Färbungen mit CD14 und MRP8 darstellen. Insbesondere war es unser Ziel die mikroglialen Vorgänge an der Hirn-Tumorgrenze zu untersuchen, um Auskunft über die Verteilung und mögliche Aktivierung der Zellen bei Hirninvasion zu erhalten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientendaten

Für diese Arbeit wurden 38 Operationspräparate von Patienten aus dem Patientengut des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen ausgewählt. Diese Patienten waren in den Jahren 1985 bis 2006 an der Universitätsklinik Tübingen, Abteilung für Neurochirurgie, der Asklepios Klinik Schildautal in Seesen, dem Katharinenhospital Stuttgart oder der Universitätsklinik Magdeburg Abteilung für Neurochirurgie operiert worden. In diese Studie wurden Fälle aufgenommen, die histologisch als invasive Meningeome beurteilt wurden.

Als Invasion wurde gewertet:

- Fingerartige Tumorfortsätze ins anliegende Hirnparenchym
- Tumorinseln in umgebenden Hirngewebe
- Inseln mit Hirnparenchym in umgebendem Tumorgewebe

Als Mikrogliazellen wurden folgende Zellen morphologisch gewertet:

- Amöboide Zellen
- Perivaskuläre Mikroglia
- Ruhende, ramifizierte Mikroglia
- Aktivierte, nicht phagozytierende Mikroglia mit verkürzten Fortsätzen und hypertrophiertem Zellkörper
- Phagozytierende Mikroglia

Zur Klassifikation und Graduierung der Meningeome diente die zum Zeitpunkt der Entnahme jeweils aktuelle WHO-Klassifizierung. Es wurden sowohl invasive Primärtumore, als auch invasive Rezidive in diese Arbeit aufgenommen. Für die mikroskopische Beurteilung der mikroglialen Reaktion im infiltrierte Hirn musste ausreichend Hirngewebe im Operationspräparat enthalten sein. Eine standardisierte Mindestmenge wurde auf Grund mangelnder Durchführbarkeit nicht festgelegt. Es wurden alle WHO Grade untersucht, wobei 18 von 38 Proben (47%) als WHO-Grad I, 13 von 38 Proben (34%) als WHO-Grad II und 7 von 38 Proben (18%) als WHO-Grad III eingestuft worden waren (Tabelle 1). Der Altersdurchschnitt der Patienten lag bei 62,5 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter weiblicher Patienten 61,95 Jahre und das männlicher 63,1 Jahre betrug. Das Durchschnittsalter von Patienten mit einem WHO-Grad I Meningeom lag bei 60,8 Jahren, das von Patienten mit WHO-Grad II bei 66,3 Jahren und Patienten mit einem Meningeom des WHO-Grades III wiesen ein Durchschnittsalter von 59,9 Jahren auf.

2.1.1. Klinische Daten

Die klinischen Daten der Patienten finden sich auf Tabelle 1 im Anhang.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Primärantikörper

2.2.1.1 CD14

CD14 ist ein 55kDa schweres Molekül, das über einen Glycosylphosphatidyl-inositol-Anker in der Zellmembran myeloider Zellen, vor allem Monozyten, Makrophagen und aktivierter Microglia verankert ist.

CD14 ist bei der Synthese von Tumornekrosefaktor α , Interleukin 1, 2, 6, 8, 18 und nuclear factor κ B beteiligt (Dentener et al 1993; Manigold et al 2000; Meng und Lowell 1997). Da durch dieses Molekül die Phagozytose beeinflusst wird, spielt es eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, bei entzündlichen Reaktionen und bei der Gewebemöostase. Ruhende Mikroglia exprimiert kein CD14 auf ihrer Oberfläche, deshalb dient CD14 als Marker aktivierter Mikroglia (Ulvstead et al 1994a). TNF α , und IL 2, aktivieren Monozyten über CD14 (Bosco et al 1997; Nadeau und Rivest 2000; Wang et al 1998; Wang und Munford 1999). Hier wurde der monoklonale Antikörper gegen CD14 NCL-L-CD14-223 clone 7 (Novocastra, Newcastle, UK) in der Verdünnung 1:100 benutzt.

2.2.1.2 CD31

CD31, oder auch platelet endothelial cell adhesion molecule genannt, ist ein 130kDa schweres Glykoprotein, das auf den Membranen von Endothelzellen und myeloiden Zellen exprimiert wird. Es ist bei der Zelladhäsion, Integrin Aktivierung, dem Zellüberleben, bei der zellulären Signaltransduktion und bei der Mechanorezeption beteiligt (Reviewed von Fujiwara 2006; Newman 1997; Newman und Newman 2003). Da CD31 als relativ endothel-spezifisch gilt, wurde hier der Antikörper gegen CD31 Klon JC 70A (Dako) in der Verdünnung 1:50 als Marker für Endothelzellen gebraucht.

2.2.1.3 CD45

CD45, auch leucocyte common antigen bezeichnet, ist ein Marker für eine Tyrosin-Phosphatase auf der Membran kernhaltiger Zellen hämato-poetischen Ursprungs. Auf menschlichen Leukozyten gibt es fünf Isoformen, die durch alternatives Splicen entstehen. CD45 dient der leukozytären Entwicklung und der Signaltransduktion (Altin und Sloan 1997; Irie-Sasaki et al 2003). Diagnostisch wird CD45 als Pan-Leukozytenmarker verwendet und markiert vor allem die Membranen lymphoider Zellen. Makrophagen exprimieren CD45 in stärkerer Form auf ihrer Oberfläche als Mikroglia, so dass dies als Unterscheidungskriterium gewertet werden kann (Ulvestad et al 1994a; Becher und Antel 1996). Neuere Studien ergaben eine vornehmliche Expression der RB-Isoform auf Mikroglia, was diese Form zum Marker ruhender Mikroglia machen könnte (Cosenza-Nashat et al 2006). Der hier verwendete monoklonale Antikörper gegen CD45 stammt aus dem Klonen 2B11 und PD7/26 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) und wurde 1:100 verdünnt gebraucht.

2.2.1.4 CD68 (PGM1)

CD68 ist ein etwa 110 kDa schweres, stark glycosyliertes Protein, das vor allem auf lysosomalen Membranen, aber zu geringem Anteil auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Es dient als Marker für Monozyten, Makrophagen und ruhender Mikroglia (Ulvestad et al 1994a). Für die Detektion von CD68 wurde hier der monoklonale Antikörper Klon PG-M1 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) in der Verdünnung 1:500 genutzt.

2.2.1.5 MHCII (HLA-DP;-DQ;-DR)

MHCII bezeichnet eine Familie humaner Leukozyten-Antigene, deren Subtypen glycosylierte Oberflächen-proteine darstellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation für CD4+ T-Zellen und werden daher auf multiplen Antigen-präsentierenden Zellen, darunter auch ruhender Mikroglia, exprimiert (Ulvestad et al 1994b). Für diese Arbeit wurden die Subtypen HLA-DP, -DQ, -DR mit einem monoklonalen Antikörper des Klons CR3/43 (Dako) in der Verdünnung 1:50 nachgewiesen.

2.2.1.6 MRP8

MRP8 wird auch als S100A8 bezeichnet und ist ein etwa 10 kDa schweres Mitglied der S100-Protein Familie. Mitglieder dieser Familie besitzen zwei Calcium-Bindungsstellen, auch als EF-hands bezeichnet (Kligman und Hilt 1988). Sie sind bei intrazellulären Calcium-abhängigen Aktivierungsprozessen beteiligt, wie Regulation der Zelldifferenzierung und Enzymaktivierung. Ihre Expression auf Monozyten ist Calcium-abhängig und abhängig vom jeweiligen Differenzierungsgrad der Zellen (Roth et al 1993; Roth et al 1994). Da eine Expression der S100-Proteine auf Mikroglia vor allem bei entzündlichen Prozessen, Traumata und Ischämien beobachtet wurde, gilt MRP8 als Marker aktivierter Mikroglia (Schluesener et al 1996; Postler et al 1997; Schluesener et al 1998; Beschorner 2000). In dieser Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper gegen MRP8 des Klons 8-5C2 (BMA, Biomedicals AG, Augst, Switzerland) in der Verdünnung 1:100 genutzt.

2.2.1.7 Kollagen IV

Kollagen IV ist ein 400 nm langes Molekül, das in drei Isoformen vorkommt. Die $\alpha 1\alpha 2$ - Variante wird ubiquitär in allen Basalmembranen exprimiert, während die $\alpha 3\alpha 4$ -Variante und die $\alpha 5\alpha 6$ -Variante hauptsächlich in der Basalmembran der Glomeruli der Niere anzutreffen ist. Da auch die Astrozyten der Membrana limitans gliae dieses Molekül synthetisieren wurde hier ein monoklonaler Antikörper des Klons CIV 22 in der Verdünnung 1:100 benutzt, um die Basalmembran darzustellen (Quelle: Dako Cytomation). Dabei wurde auf bereits bestehende Färbungen aus der Arbeit von Lena Zeltner: „Astrozytäre Reaktion auf hirninvasive Meningeome“ (in Vorbereitung) zurückgegriffen.

2.2.2 Farbstoffreagenzien

- DAB
95mg DAB (3,3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid Quelle: Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden in 150 ml Aqua dest. gelöst und mit 20 ml Substratpuffer, sowie 66,6 μl H_2O_2 versetzt und mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt.
- Avidin-Biotin Komplex
5 μl Avidin und 5 μl biotinylierte Meerrettichperoxidase (pH 7,2) wurden mit 1 ml TBS Gebrauchslösung 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt.
Quelle: Dako, Glostrup, Dänemark

2.2.3 Lösungen

- TBS-Stammlösung
60,6g Tris Base und 163,6g NaCl wurden in 1,5l Aqua dest. gelöst und mit 25% HCl auf pH 7,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 2l aufgefüllt.
- TBS-Gebrauchslösung
TBS- Stammlösung wurde mit Aqua dest. 1:10 verdünnt.
- Zitratpuffer-Stammlösung
42,2g Zitronensäure (Merck, Darmstadt) wurden in 2l Aqua dest. gelöst und auf pH 6 eingestellt.
- Zitratpuffer-Gebrauchslösung
Zitratpuffer-Stammlösung wurde mit Aqua dest. 1: 10 verdünnt.
- Substratpuffer
21g Zitronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt), 34g Imidazol (Fluka, Neu-Ulm) und 29,2g NaCl wurden mit 400 ml Aqua dest. gelöst und auf pH 7,0 eingestellt. Danach wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.

2.2.4 Chemikalien

- Erythrosin B (Eosin)
Quelle: Merck, Darmstadt, Deutschland
- HCl/Ethanol
100ml 70% Ethanol und 1ml 25% HCl
Quelle: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mayers Hämalaun-Lösung
Quelle: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Permanentes Mikroskopier-Einschlussmittel HICO-MIC
Quelle: Hirz & Co, Köln

2.2.5 Herstellung der Schnitte

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom der Firma LEICA Typ 2040 in 3µm dicke Schnitte geschnitten und auf silanbeschichtete Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie in einem Wärmeschrank bei 55 °C getrocknet.

2.2.6 Hämatoxylin- Eosin Färbungen

Um eine Färbung der Gewebe mit Hämatoxylin- Eosin (HE) zu ermöglichen, wurden sie für 30 Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden die Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe der Konzentrationen 100%-100%-96%-70% für jeweils fünf Minuten rehydriert, bevor sie, nach kurzem Schwenken in Aqua destillata, für eine Minute in Hämatoxylin eingebracht wurden. Nach zehn- minütigem Spülen in Leitungswasser und kurzem Schwenken in Aqua destillata wurden die Gewebe für eine Minute in Erythrosin überführt. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe der Konzentrationen 70%-96%-100%-100% für jeweils fünf Minuten dehydriert und für 30 Minuten in Xylol getaucht. Zur Fertigstellung wurden die Schnitte mit dem Mikroskopier-Einschlussmittel HICO-MIC eingedeckelt

2.2.7 Vorbehandlung und immunhistochemische Färbung

Um eine immunhistochemische Färbung der Schnitte zu ermöglichen, war eine Entparaffinierung des Gewebes notwendig. Dies erfolgte durch 30-minütige Inkubation der Schnitte in Chloroform. Danach erfolgte eine Rehydratation des Gewebes durch eine absteigende Alkoholreihe bestehend aus 2 x 100% Alkohol, 1 x 96% Alkohol und 1 x 70% Alkohol, in den die Schnitte für jeweils 2 Minuten eingebracht wurden. Danach wurden sie in Aqua dest. überführt. Um eine Freilegung der Gewebsantigene zu erreichen war eine Demaskierungsvorbehandlung nötig. Diese erfolgte durch Erhitzen des Gewebes in Zitratpuffer in einer Mikrowelle bei 750 Watt. Die endogene Peroxidase wurde, nach einem Waschvorgang in Aqua dest. und TBS über 5 Minuten, durch Inkubation der Präparate in 250ml 100% Methanol und 5ml 30% H₂O₂ für 10 Minuten blockiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen mit Schweineserum, das im Verhältnis 1:10 mit TBS verdünnt worden war für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers über Nacht. Bei den mitgeführten Negativkontrollen wurde zum Ausschluss unspezifischer Bindungen kein Antikörper aufgebracht. Nach Spülen in TBS für fünf Minuten wurde der jeweils zur Klonalität des Primärantikörpers passende Sekundärantikörper für 30 Minuten aufgebracht. Da alle Primärantikörper maus-monoklonal waren, handelte es sich hier bei um biotinylierten Hase anti-Maus F(ab)₂ Antikörper (Dako Cytomation, Verdünnung 1:400). Anschließend wurde das Gewebe nach erneutem Waschen in TBS-Lösung mit Peroxidase-gekoppeltem Avidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten inkubiert (Dako Cytomation). Nach erneutem Spülen in TBS wurden die spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungsstellen mit 3,3 Diaminobenzidin als Chromogen sichtbar gemacht. Zur Kerndarstellung wurden die Schnitte mit Hämalaun-Lösung gegengefärbt, anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe und ein Bad in Xylol dehydriert und mit Deckgläsern versehen.

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung diente zur gleichzeitigen Darstellung zweier verschiedener Antigene. Dabei wurden die Schnitte ebenfalls entparaffiniert, rehydriert und in der Mikrowelle vorbehandelt. Die endogene Peroxidase wurde wie oben beschrieben mit Methanol und H_2O_2 blockiert. Nach Hemmung der unspezifischen Bindungsstellen wurde das Gewebe mit den polyklonalen Antikörpern für die jeweils spezifischen Antigene über Nacht inkubiert. Nach einem Waschvorgang in TBS inkubierten die Schnitte für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper, der entweder aus Schaf-, oder Esel hergestellt wurde (Sheep-Anti mouse; Donkey-Anti mouse, Dako; Verdünnung 1:400). Nach erneutem Waschen in TBS wurden die Präparate mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) als Chromogen versehen und eingedeckelt.

2.2.9 Auswertung und Auszählung

Die mikroskopische Auswertung der Präparate wurde mit einem Mikroskop der Marke Polyvar (Reichert und Jung, Wien, Österreich) durchgeführt. Zuerst wurde dabei das Expressionsmuster des jeweiligen Markers morphologisch an Hand der Lage und Verteilung der markierten Mikroglia im Hirn beurteilt. Es wurde besonders auf spezielle Verteilungsmuster der detektierten Zellen an der Hirn-Tumor Grenze geachtet. In einem weiteren Schritt wurde die Verteilung der CD14 exprimierenden Zellen ausgezählt. Dabei wurde zwischen Gefäß-assoziierten Zellen und parenchymalen Zellen im Hirn unterschieden. Es wurden jeweils 200 Zellen eines Falles ausgezählt. Die in dieser Arbeit gezeigten fotografischen Aufnahmen wurden auf einer Digitalkamera der Marke Olympus Typ E20 gemacht.

2.3 Statistische Methoden

Für die jeweiligen Färbungen mit Antikörpern gegen CD68, CD45, MHCII, CD14 und MRP8 wurde, getrennt nach WHO-Graden, die Aktivität der Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze und im Hirn ausgewertet und mit der Aktivität der Zellen in den anderen WHO-Graden in einer Kontingenzanalyse verglichen. Die Reaktionen der CD68-, MHCII- und CD14-positiven Zellen an der Hirn-Tumorgrenze wurden mit dem Vorhandensein von Collagen 4 als Marker der Basalmembran verglichen und in einer Kontingenzanalyse korreliert. Die Signifikanz wurde jeweils durch den Pearson-Test bestimmt. Dabei wurden Werte unter $p=0,05$ als signifikant angesehen. Die Zellzählungen CD14-positiver Mikroglia mit oder ohne Gefäßassoziation wurden durch den Student-t-Test beurteilt. Auch hier wurde das Signifikanzniveau unter $p=0,05$ festgelegt. Zur Auswertung der Daten verwendeten wir das statistische Software-Programm JMP 6.0.0 (SAS-Software; www.jmp.com).

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden hier von Markern für ruhende Mikroglia wie CD68 und CD45 ausgehend, zu Markern für aktivierte Mikroglia wie CD14 und MRP8 übergehend, dargestellt. MHCII nimmt, da es sowohl auf aktivierter, als auch auf ruhenden Mikrogliazellen exprimiert wird eine Zwischenstellung ein.

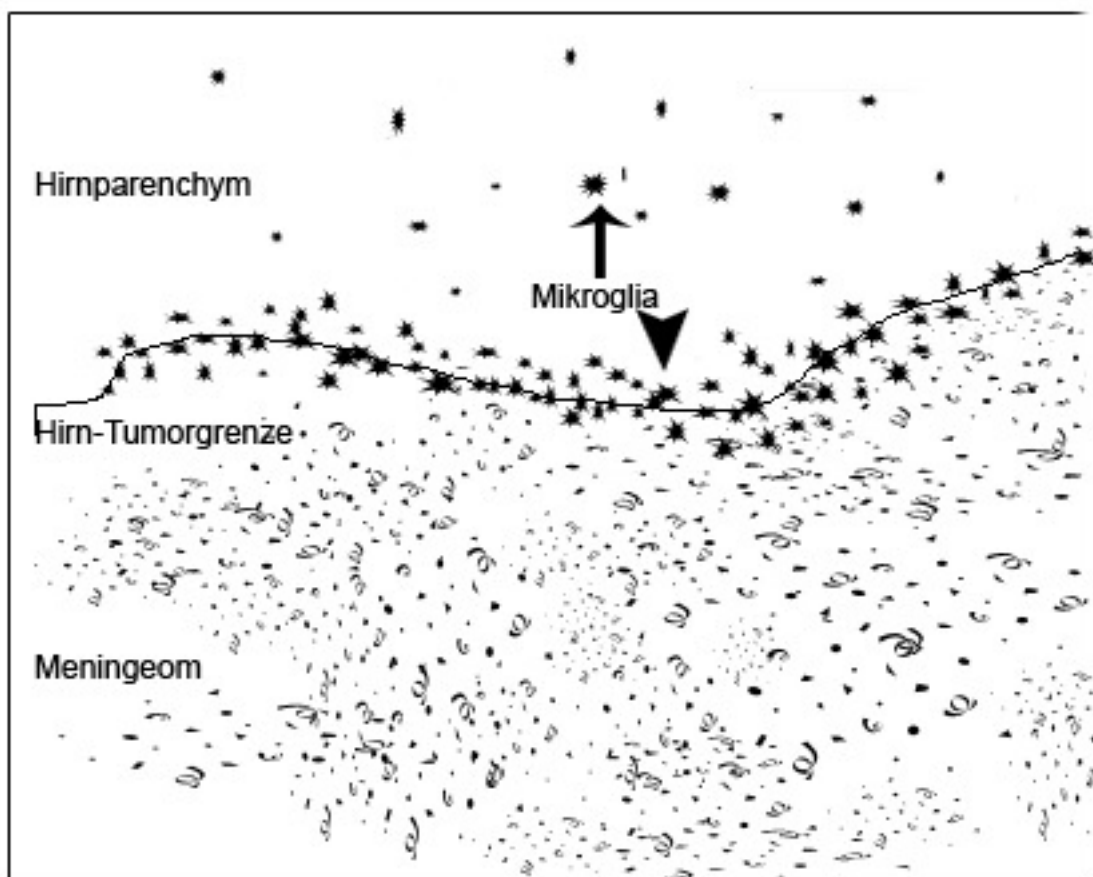


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Verhältnisse an der Hirn-Tumorgrenze bei positiver Reaktion der Mikrogliazellen. Die Grenze ist hier sowohl auf Hirn, als auch auf Tumorseite von Mikroglia besetzt (Pfeilspitze). Im Hirnparenchym finden sich diffus verteilte positiv reaktive Zellen (Pfeil).

3.1 Expression von CD68 (PGM1)

CD68 ist ein Marker ruhender Mikroglia, der als glycosyliertes Protein vor allem auf lysosomalen Membranen und der Zelloberfläche exprimiert wird. Neben Mikroglia werden auch Monozyten und Makrophagen von diesem Marker detektiert. Bei den hier vorhandenen Proben zeigten sowohl perivaskuläre, fortsatzlose, als auch frei im Gewebe liegende Mikroglia mit Fortsätzen eine CD68 Expression. Auch monozytäre Zellen in Einblutungen zeigten das Antigen auf ihrer Oberfläche, was jedoch als Normalbefund zu werten ist. Bei den als Kontrollgruppe untersuchten Normalhirnen zeigte sich in einem Fall eine geringe Expression von CD68 auf Mikroglia diffus im Gewebe, in den anderen Fällen konnten keine Zellen mit diesem Protein auf ihrer Oberfläche nachgewiesen werden.

3.1.1 Meningeome WHO-Grad I

Alle untersuchten Hirnanteile der 18 Grad I Meningeome waren für CD68-exprimierende Mikroglia positiv, wobei die ramifizierten Zellen in einem diffusen Verteilungsmuster im Hirnparenchym verstreut lagen, wie auch in der schematischen Darstellung gezeigt wird (Abb. 9; Abb. 10). Sechs Proben wiesen jedoch nur eine sehr geringe Expression auf, so dass nur vereinzelt reaktive Zellen im Gewebe detektierbar waren (Abb. 12). Der Hirnparenchymsaum umfasste bei allen untersuchten Meningeomen nur wenige Millimeter, die Hirntumorgrenze wurde als direkte Front zwischen Hirn und Tumor aufgefasst.

Die Hirn-Tumorgrenze selbst wies keine vermehrte Anzahl von Mikroglia auf, eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze wurde bei Meningeomen des WHO-Grades I, im Gegensatz zu der Hirn-Tumorgrenze in der oben dargestellten Schemazeichnung, nicht beobachtet (Abb. 11).

In 17 WHO-Grad I Meningeomen selbst war CD68-positive Mikroglia vorhanden, die oft ein diffuses Verteilungsmuster innerhalb der Tumormasse zeigte. In zwei Biopsien lagen die angefärbten Zellen nicht in den Tumormassen, sondern in bindegewebigen Septen, die einzelne Anteile von einander trennten. In vier Fällen war auch eine vermehrte Expression an perivaskulärer Mikroglia im Tumor zu erkennen. Ein Meningeom wies keine durch CD68 nachweisbaren Monozyten im Tumor auf.

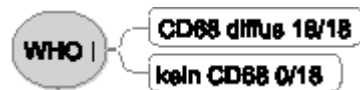


Abbildung 10: Darstellung der Expression von CD68 auf WHO-Grad I Meningeomen. Alle der 18 Meningeome zeigten CD68-positive Zellen in einem diffusen Verteilungsmuster im angrenzenden Hirnparenchym.



Abbildung 11: Darstellung der Expression von CD68-positiver Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze von Meningeomen WHO-Grad I. Keine der untersuchten Grenzflächen zeigte eine Akzentuierung durch mikrogliale Zellen.

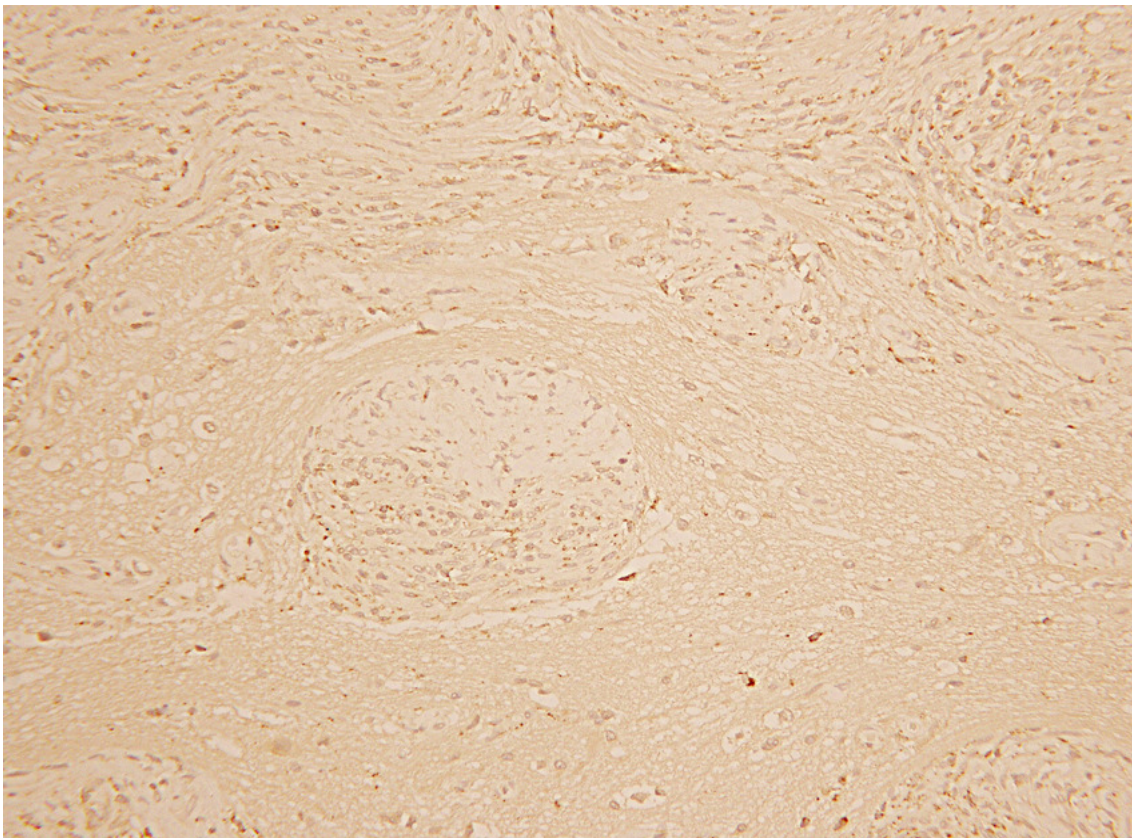


Abbildung 12: Geringe Expression von CD68 auf Mikroglia im umgebenden Hirngewebe eines WHO-Grad I Meningeoms. Die Hirn-Tumorgrenze ist nicht betont. Abbildung von Fall 5.

3.1.2 Meningeome WHO-Grad II

In allen 13 WHO-Grad II Meningeomen konnte CD68-positive Mikroglia in den Hirnanteilen nachgewiesen werden, die ein gleichmäßig diffus im Gewebe liegendes Verteilungsbild aufwies (Abb. 13; Abb. 15). Auch an Gefäßen oder in Gefäßnähe konnte häufig eine verstärkte Expression wahrgenommen werden. Zwei Biopsien wiesen sehr wenige CD68-reaktive Zellen auf, so dass diese nur stark vereinzelt im Hirnparenchym nachweisbar waren.

Die Hirn-Tumorgrenze (Abb. 14) zeigte keine vermehrte mikrogliale Reaktion, so dass keine Betonung der Grenze bei WHO-Grad II Meningeomen vorlag. Auch die Tumoranteile zeigten stets diffus verteilte CD68-positive Mikroglia im Gewebe, wobei die allgemeine Expressionsstärke eher gering war. Selten konnten einzelne Herde mit einer vermehrten Zellzahl beobachtet werden. Drei Meningeome imponierten dagegen durch ihr dichtes Erscheinungsbild mikroglialer Zellen, wobei eine definitive Unterscheidung von CD68-exprimierenden mikroglialen Zellen und CD68-positiven Tumorzellen durch das dichte Expressionsmuster in einem Fall sehr schwierig war. In einem Meningeom konnte keine CD68-positive Mikroglia nachgewiesen werden.

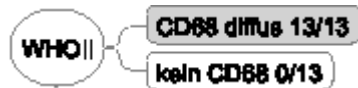


Abbildung 13: Darstellung der Expression von CD68 in WHO-Grad II Meningeomen. Alle der untersuchten Meningeome zeigten CD68-exprimierende Zellen in einem diffusen Verteilungsmuster im angrenzenden Hirngewebe.



Abbildung 14: Expression von CD68 auf Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze von invasiven Meningeomen WHO-Grad II. Auch hier findet sich keine Betonung der Grenze durch Mikroglia.

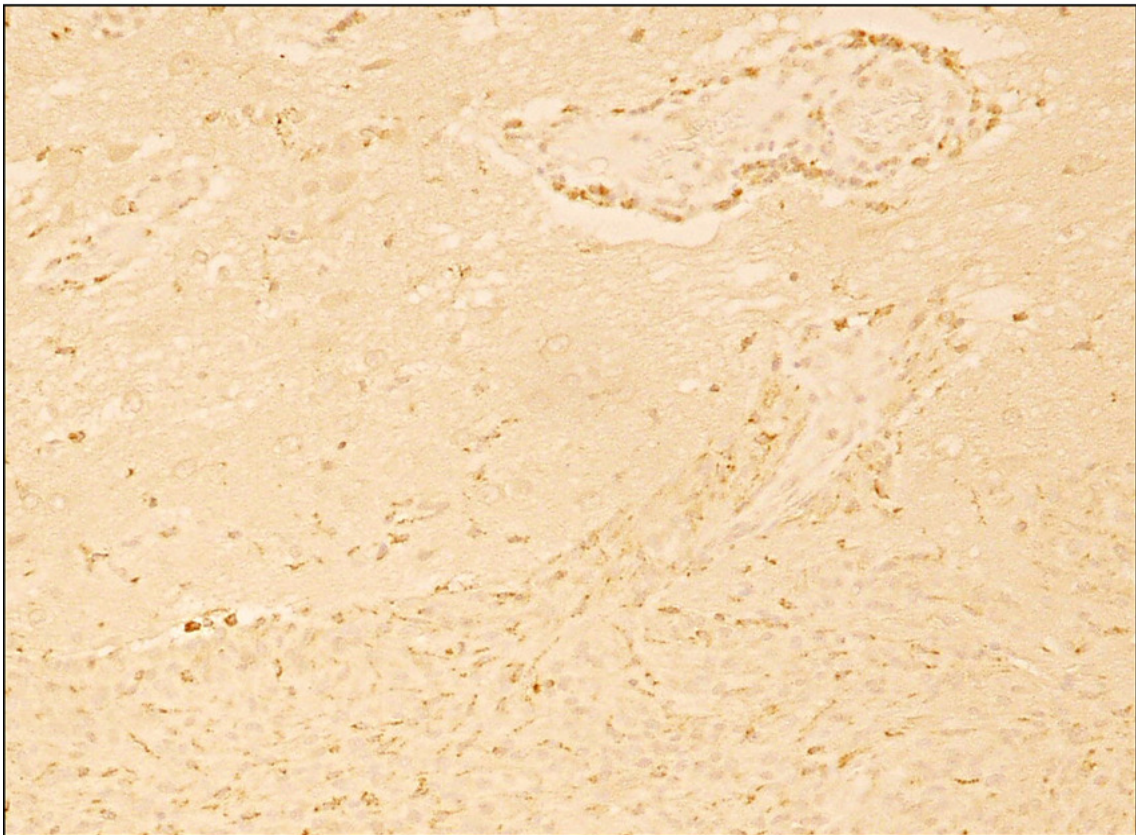
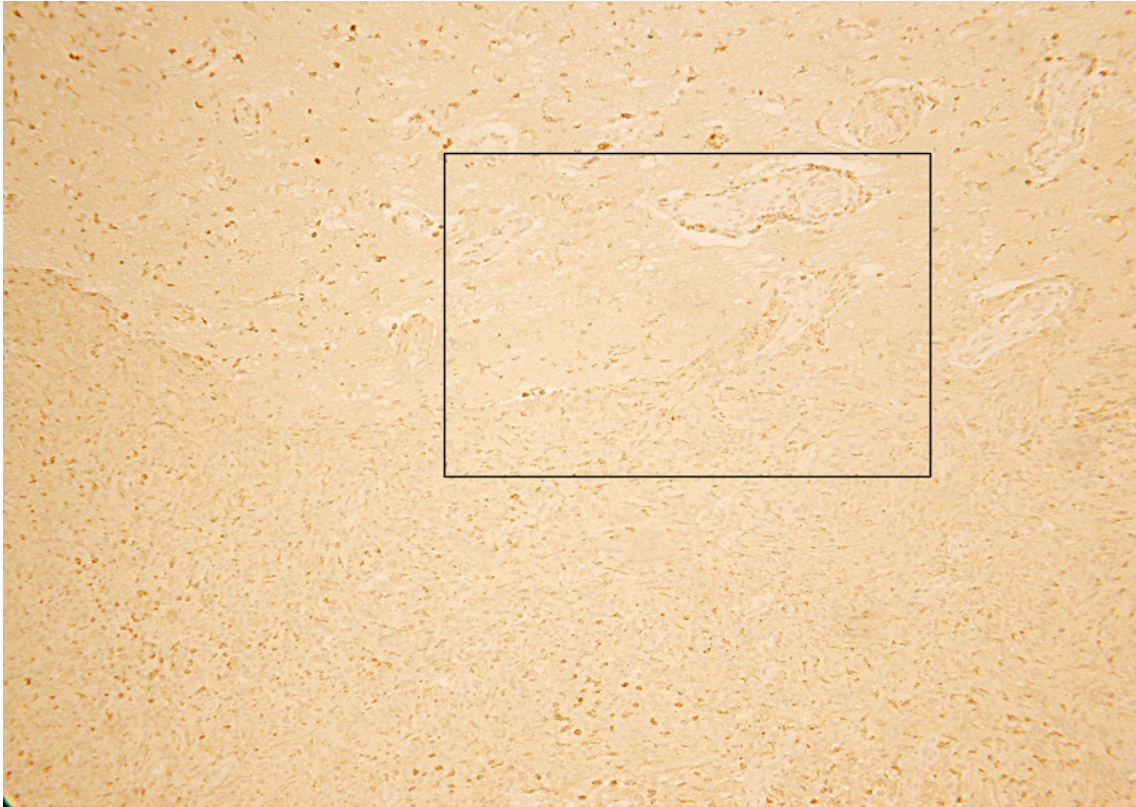


Abbildung 15: Expression von CD68 auf mikroglialen Zellen im Hirnparenchym eines WHO-Grad II Meningeoms. Es zeigt sich ein diffuses Verteilungsmuster der Zellen ohne Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze. Aufnahme von Fall 26.

3.1.3 Meningeome WHO-Grad III

Alle Meningeome mit WHO-Grad III zeigten diffus verteilte CD68-positive Mikroglia in ihren Hirnanteilen (Abb. 16). Vier der sieben Biopsien zeigten an der Hirn-Tumorgrenze eine Akzentuierung, wie sie auch in der vorhergehenden schematischen Darstellung gezeigt wurde (Abb. 9; Abb. 17). Davon konnte die Anreicherung mikroglialer Zellen bei einem Fall, im Gegensatz zu der Schemadarstellung nur auf der Hirnseite lokalisiert werden (Abb. 18). Hier war eine lokale Vermehrung von Mikroglia, die sich jedoch nicht über die ganze Grenze erstreckte. Bei zwei weiteren Tumoren konnte man eine mikrogliale Anreicherung auf der Tumorseite feststellen, wobei bei einem eine fokale, flächige Vermehrung der Zellen über Teile der Grenze (Abb. 19) und bei einem weiteren über die ganze Grenzstrecke, wie auch schon schematisch dargestellt, zu verzeichnen war (Abb. 9). In einem anderen Tumor war die Akzentuierung auf beiden Seiten der Grenze vorhanden, auf der Tumorseite flächiger, auf der Hirnseite jedoch breiter gestreut. Das vermehrte Auftreten von Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze bei Meningeomen mit WHO-Grad III gegenüber WHO-Grad I und II ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). Die Hirn-Tumorgrenze ist also bei Meningeomen mit WHO-Grad III häufiger von Mikroglia besetzt, als bei Meningeomen mit niedrigeren Malignitätsgraden. In den eigentlichen Meningeomen war immer CD68-exprimierende Mikroglia vorhanden. Das meist diffuse Verteilungsbild wurde oft mit lokalen Herden oder in Gefäßnähe akzentuiert.



Abbildung 16: Darstellung der Expression von CD68 bei Meningeomen mit WHO-Grad III. Alle Meningeome hatten diffus CD68 positive Mikroglia im umgebenden Hirngewebe.



Abbildung 17: Darstellung der Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze bei Meningeomen des WHO-Grades III. Vier der untersuchten Präparate zeigten eine vermehrte Expression von CD68 auf Mikroglia an der Grenzfläche.

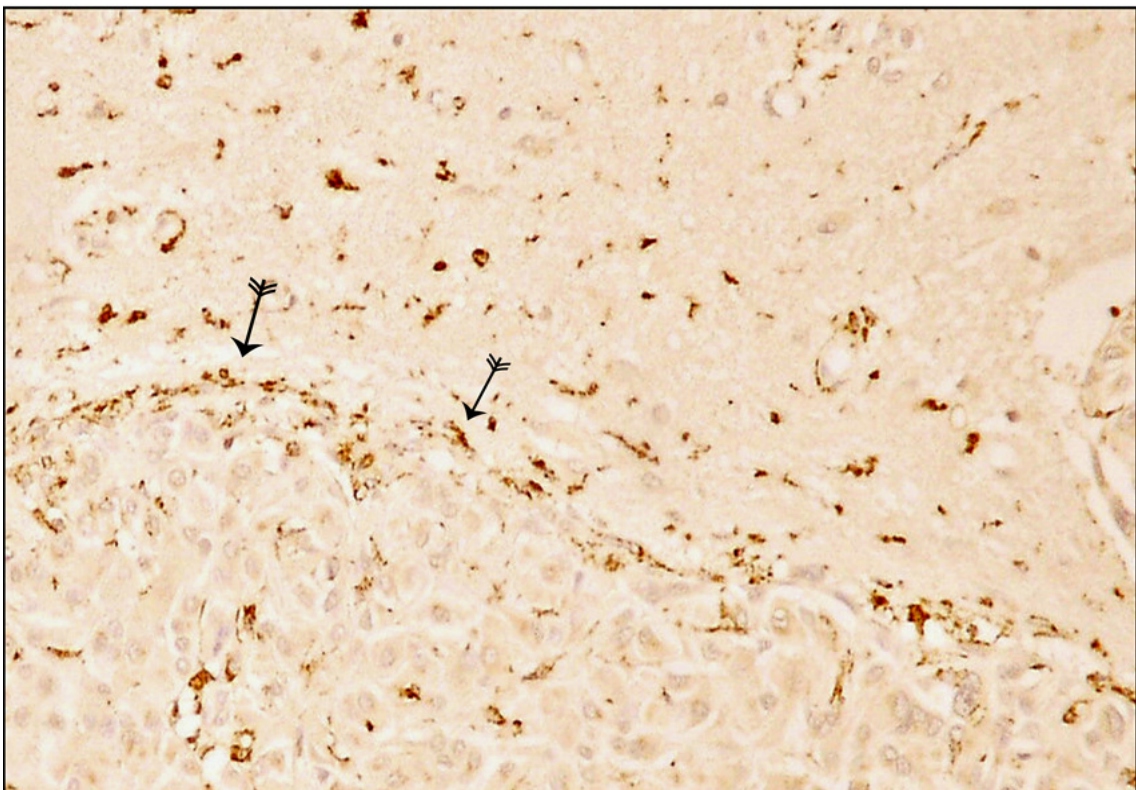


Abbildung 18: Diffuse Expression von CD68 auf mikroglialen Zellen im Hirngewebe eines WHO-Grad III Meningeoms. Die Grenze zwischen Tumor und Hirnparenchym ist durch CD68-positive Zellen auf der Hirnseite akzentuiert. Abbildung von Fall 33.

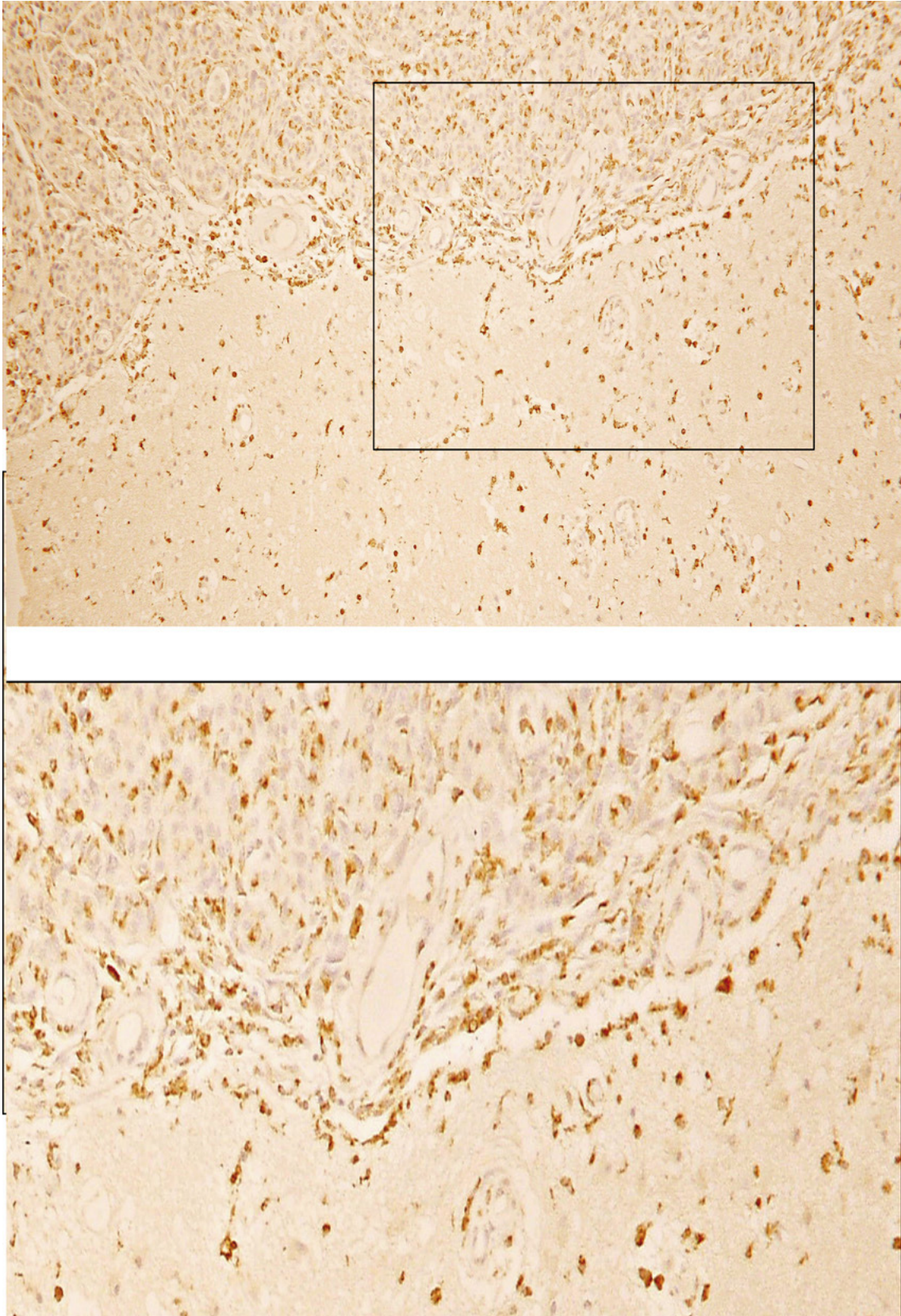


Abbildung 19: Diffuse Verteilung von CD68-positiven mikroglialen Zellen im Hirngewebe eines WHO-Grad III Meningeoms. Die Hirn-Tumorgrenze ist fokale durch Mikroglia auf der Tumorseite betont. Abbildung von Fall 32.

3.2 Expression von CD45

Der Pan-Leukozytenmarker CD45 markiert eine Tyrosin-Phosphatase auf den Membranen kernhaltiger Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Altin und Sloan 1997). Somit wurden durch ihn sowohl Mikroglia, Makrophagen, als auch Lymphozyten angefärbt. Dabei konnten die einzelnen Spezies morphologisch durch ihre Form, Größe und Kerngröße unterschieden werden. Eine vermehrte Reaktion von Lymphozyten bei der Hirninvansion von Meningeomen wurde allerdings bereits in Hämatoxilin-Eosin-Färbungen ausgeschlossen. Lymphozyten können in Gefäßen und Einblutungen vorkommen. Mikrogliale Zellen zeigten sich stark ramifiziert mit kleinem Zellkörper. In unserer Normalhirn-Population war fokal an sehr wenigen Stellen in drei von vier Fällen eine geringe Detektion CD45-positiver, ramifizierter Mikroglia möglich, in Gefäßen zeigten sich vereinzelt in zwei von vier Biopsien angefärbte Lymphozyten. Insgesamt wies die Kontrollgruppe sehr wenig Expression auf. In Gefäßen des Hirngewebes stellte sich eine Expression von CD45 Lymphozyten des Blutes dar, was einem Normalbefund darstellt

3.2.1 Meningeome WHO-Grad I

Neun von 18 Meningeomen WHO-Grad I wiesen CD45-exprimierende Mikroglia in den benachbarten Hirnanteilen auf, wobei die stark ramifizierte Mikroglia diffus im Hirnparenchym verteilt und fokal verschieden stark ausgeprägt war (Abb. 9; Abb. 20). Acht der positiven Biopsien wiesen insgesamt nur eine leichte Expressionsstärke auf, wohingegen eine Biopsie durch ihre starke Expression hervorstach (Abb. 22). Bei neun Biopsien wurde, im Gegensatz zur obigen schematischen Darstellung, keine CD45-positive Mikroglia im Hirn gefunden. Statistisch war die Anzahl von Grad I Meningeomen, die diffuse, CD45-positive Mikroglia in ihrem Hirngewebe aufwiesen gegenüber den anderen WHO-Graden nicht signifikant erhöht. Frei im Hirnparenchym liegende Lymphozyten wurden in vier Biopsien festgestellt, allerdings war ihr Vorhandensein immer mit Einblutungen verbunden. An der Hirn-Tumorgrenze konnte keine Akzentuierung durch CD45-positive Mikroglia festgestellt werden (Abb. 21). Im Tumor wurde keine Expression von CD45 auf ramifizierter oder aktivierter Mikroglia beobachtet, allerdings zeigte sich in allen Grad I Meningeomen eine Anfärbung von Lymphozyten und Makrophagen, die ein diffuses Verteilungsmuster im Gewebe aufwiesen. Insgesamt war im Tumor jedoch nur eine sehr geringe Expressionsrate nachzuweisen.



Abbildung 20: Darstellung der Expression von CD68 und CD45. Alle untersuchten Meningeome zeigten eine Expression von CD68, jedoch zeigten nur neun von 18 auch eine Expression von CD45 auf mikroglialen Zellen im angrenzenden Hirngewebe. Neun Meningeome wiesen keine Expression auf.



Abbildung 21: Expression von CD68 und CD45 an der Hirn-Tumorgrenze von invasiven Meningeomen WHO-Grad II. Es zeigte sich auch keine Betonung der Grenze durch CD45-positive Mikroglia.

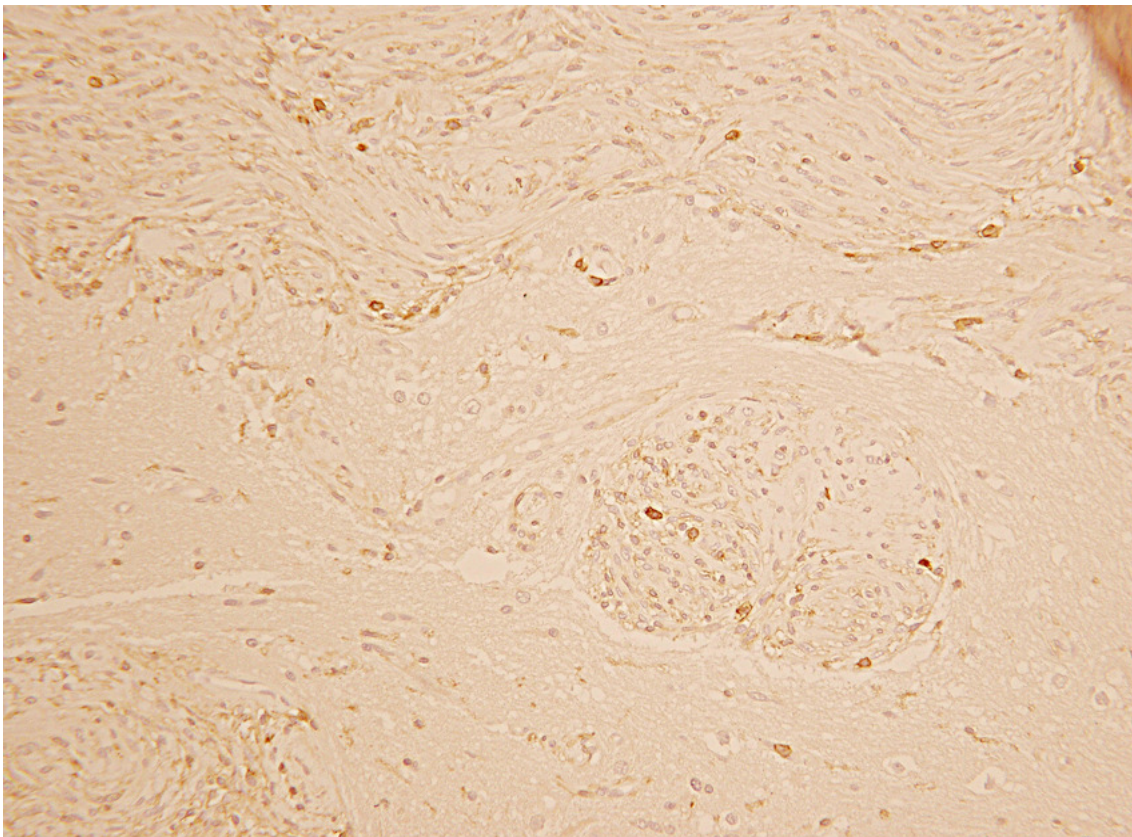


Abbildung 22: Geringe, diffuse Expression von CD45 auf Mikroglia in einem WHO-Grad I Meningeom. Die Hirn-Tumorgrenze ist nicht vermehrt mit mikroglialen Zellen besetzt. Aufnahme von Fall 5.

3.2.2 Meningeome WHO-Grad II

Von 13 Meningeomen WHO-Grad II zeigten fünf eine Expression von CD45 auf Mikroglia (Abb. 23). Diese Zellen waren stark ramifiziert und diffus im Hirnparenchym verteilt, wobei fokale Unterschiede in der Dichte vorhanden waren (Abb. 25). An wenigen Stellen konnte eine herdartige Vermehrung mikroglialer Zellen im Gewebe erkannt werden (Abb. 26). Auch bei den Meningeomen des WHO-Grades II ließ sich gegenüber den anderen Malignitätsgraden keine vermehrte Anzahl von Biopsien feststellen, die CD45-positive Zellen im Hirnanteil aufwiesen. An der Hirn-Tumorgrenze war auf der Hirnseite keine Aktivität von Mikroglia feststellbar (Abb. 24), keine der untersuchten Präparate wies Mikroglia an der Grenzfront zwischen Hirn und Tumorgewebe auf. Die WHO-Grad II Meningeome selbst zeigten in vier Fällen eine Expression von CD45 auf aktivierter Mikroglia, wobei die positiven Zellen eine diffuse Verteilung im Gewebe aufwiesen. Alle Tumore wiesen wenige CD45-positive Lymphozyten und Makrophagen, diffus im Gewebe verteilt, auf. Insgesamt war auch bei den Meningeomen mit Malignitätsgrad II nur eine geringe Expression von CD45 auf Mikroglia sowohl in Hirn, als auch im Tumor zu verzeichnen. Frei im Hirngewebe vorkommende Lymphozyten waren in zwei Fällen erkennbar, desweiteren zeigten sechs Biopsien Lymphozyten in Gefäßen und drei Biopsien wiesen Lymphozyten in Einblutungen auf.



Abbildung 23: Darstellung der Expression von CD68 und CD45. Alle Meningeome zeigten CD68-positive Mikroglia, jedoch konnte CD45-positive Mikroglia nur bei fünf von 13 untersuchten Fällen dargestellt werden. Acht Meningeome zeigten keine Expression von CD45 auf mikroglialen Zellen im umgebenden Hirnparenchym.

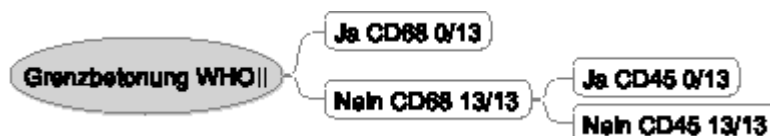


Abbildung 24: Expression von CD68 und CD45 auf Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze von Meningeomen WHO-Grad II. Es konnte keine Expression dieser Marker auf mikroglialen Zellen in der Grenzregion nachgewiesen werden.

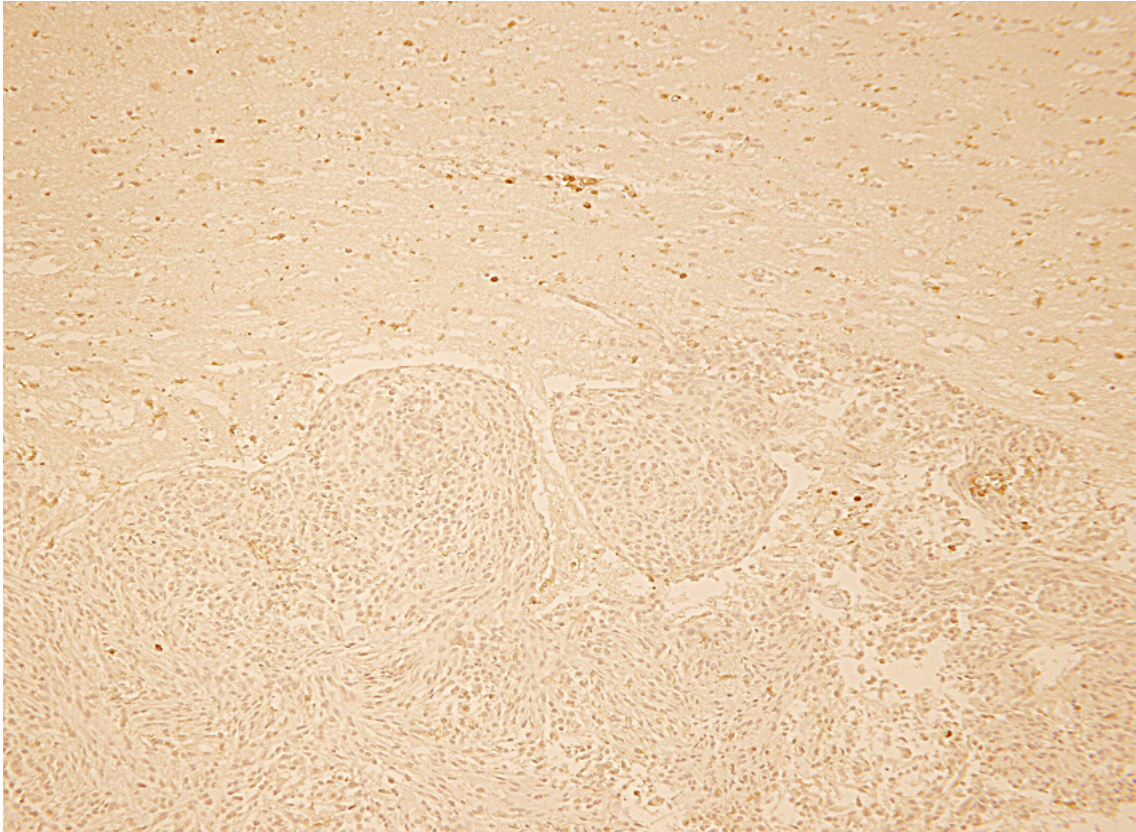


Abbildung 25: Geringe Expression von CD45 auf mikroglialen Zellen im Hirnparenchym eines WHO-Grad II Meningeoms, hier Fall 21.

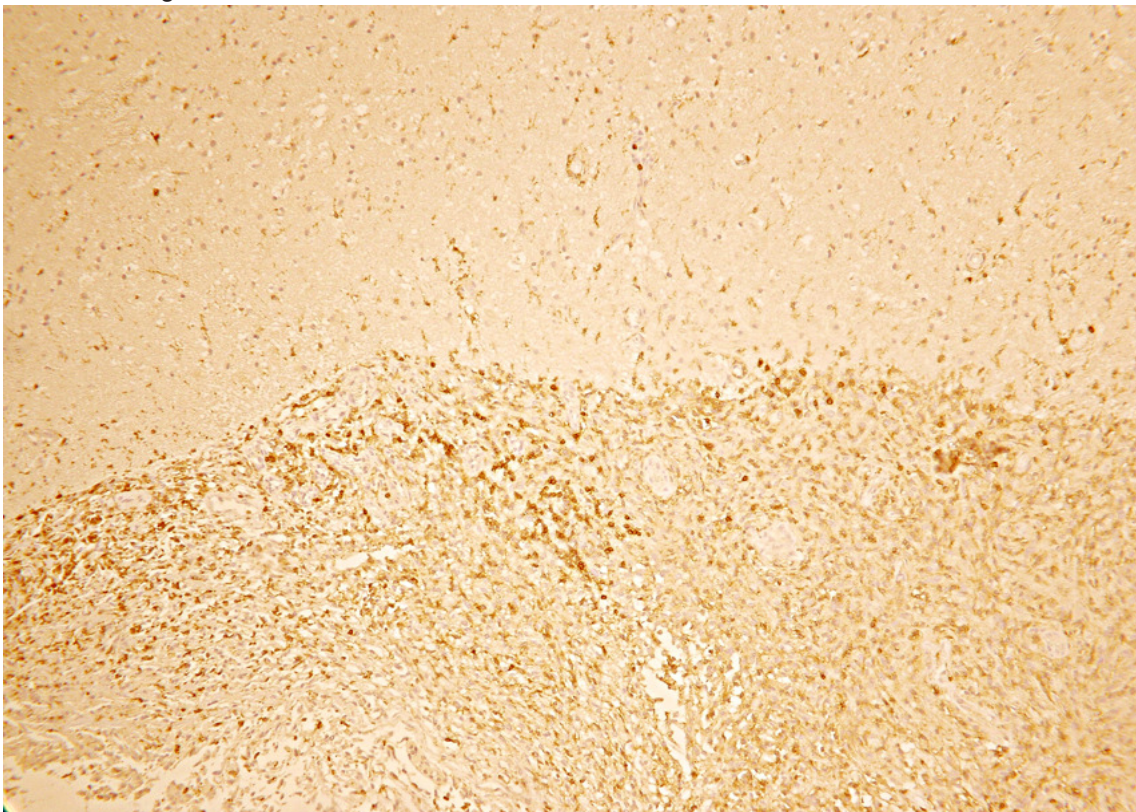


Abbildung 26: Expression von CD45 auf Mikroglia bei einem WHO-Grad II Meningeom. Im Hirnparenchym sind viele CD45-positive Zellen vorhanden, die eine starke Expression zeigen. Die Hirn-Tumorgrenze ist auch hier nicht betont. Dargestellt ist Fall 26.

3.2.3 Meningeome WHO-Grad III

Sieben Meningeome unserer Untersuchung konnten WHO-Grad III zugeordnet werden, wovon vier CD45-positive Mikroglia im invadierten Hirn aufwiesen (Abb. 27; Abb. 29). Bei zweien lagen die Zellen diffus im Parenchym verteilt, bei den zwei anderen war sowohl eine diffuse Verteilung in Hirn, als auch eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze an einigen Stellen sichtbar (Abb. 28). Dabei war die Grenze des Hirns zum Tumor durch ein vermehrtes Auftreten von CD45-positiver Mikroglia stellenweise besonders hervorgetreten. Bei einem Fall konnte dies über die ganze Fläche der Hirn-Tumorgrenze beobachtet werden, wobei die Vermehrung mikroglialer Zellen auf der Tumorseite stärker war, als auf der Hirnseite, jedoch waren auf beiden Seiten reaktive Zellen zu finden, wie auch in der obigen schematischen Darstellung der Verhältnisse an der Hirn-Tumorgrenze gezeigt wird (Abb. 9; Abb. 30). Ein weiterer Fall zeigte streckenweise Unterbrechungen in der mikroglialen Front, so dass die Hirn-Tumorgrenze nicht komplett von Mikroglia besetzt war (Abb. 31). Das vermehrte Auftreten von Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze von Meningeomen mit WHO-Grad III, gegenüber der Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze durch Mikroglia bei WHO-Grad I und II wurde durch statistische Tests als signifikant bestätigt ($p=0,0022$), eine vermehrte diffuse Verteilung von Mikroglia im Hirnparenchym war nicht signifikant. Im Tumor zeigten drei Meningeome eine geringe, fokal gehäufte Expression von CD45, bei einem Tumor konnte keine CD45-tragende Zelle nachgewiesen werden. Alle Tumoren wiesen jedoch eine Expression von CD45 auf wenigen frei liegenden Lymphozyten im Gewebe auf. Frei im Hirnparenchym wurden keine Lymphozyten angetroffen, jedoch waren bei zwei Biopsien Lymphozyten in Gefäßlumina und bei einer Biopsie in einer Einblutung zu finden.



Abbildung 27: Expression von CD68 und CD45 auf Meningeomen WHO-Grad III. Alle Biopsien zeigten eine Expression von CD68, wobei nur bei vier von sieben auch eine Expression von CD45 nachgewiesen werden konnte. Drei von sieben zeigten keine Expression von CD45 auf mikroglialen Zellen.



Abbildung 28: Expression von CD68 und CD45 in der Grenzregion invasiver Meningeome WHO-Grad III. Bei zwei der bereits durch CD68-positiver Mikroglia betonten Hirn-Tumorgrenzen konnte auch eine Betonung durch Expression von CD45 auf mikroglialen Zellen nachgewiesen werden.

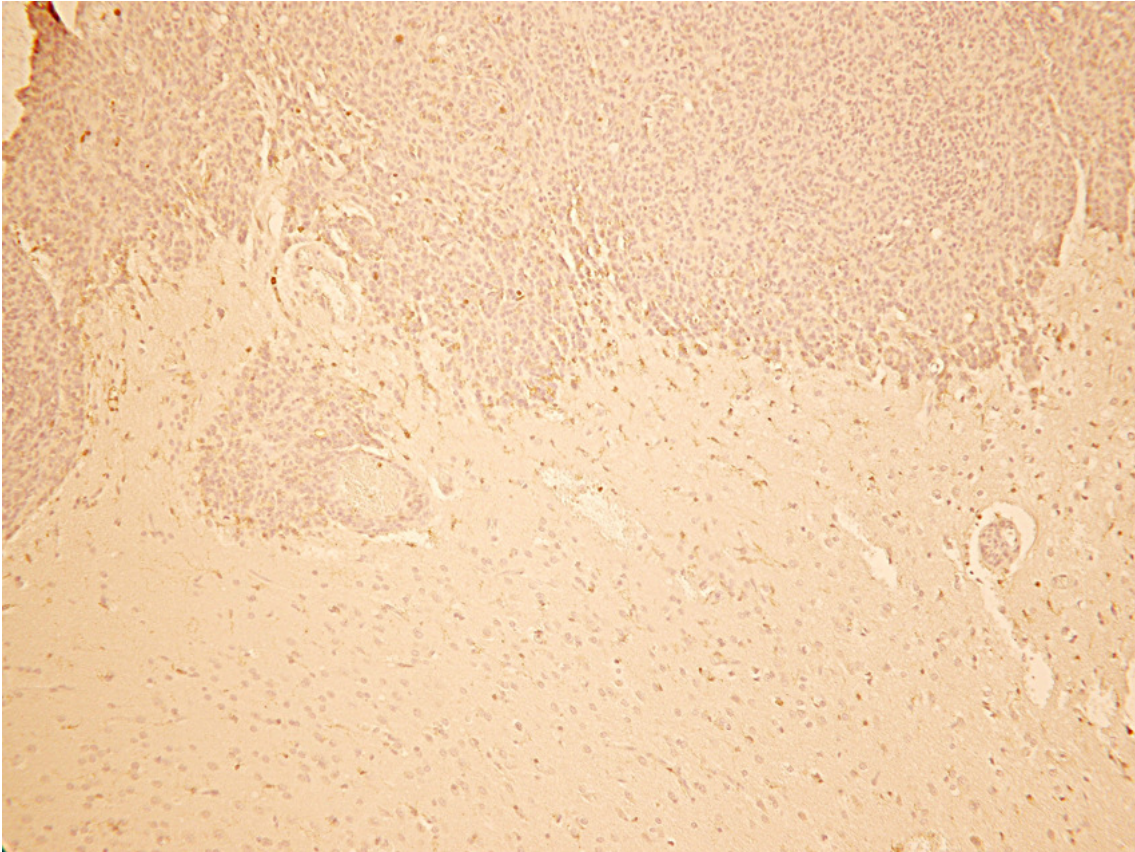


Abbildung 29: Fehlende Expression von CD45 auf Mikroglia im Hirnparenchym eines WHO-Grad III Meningeoms. Dargestellt ist Fall 35.

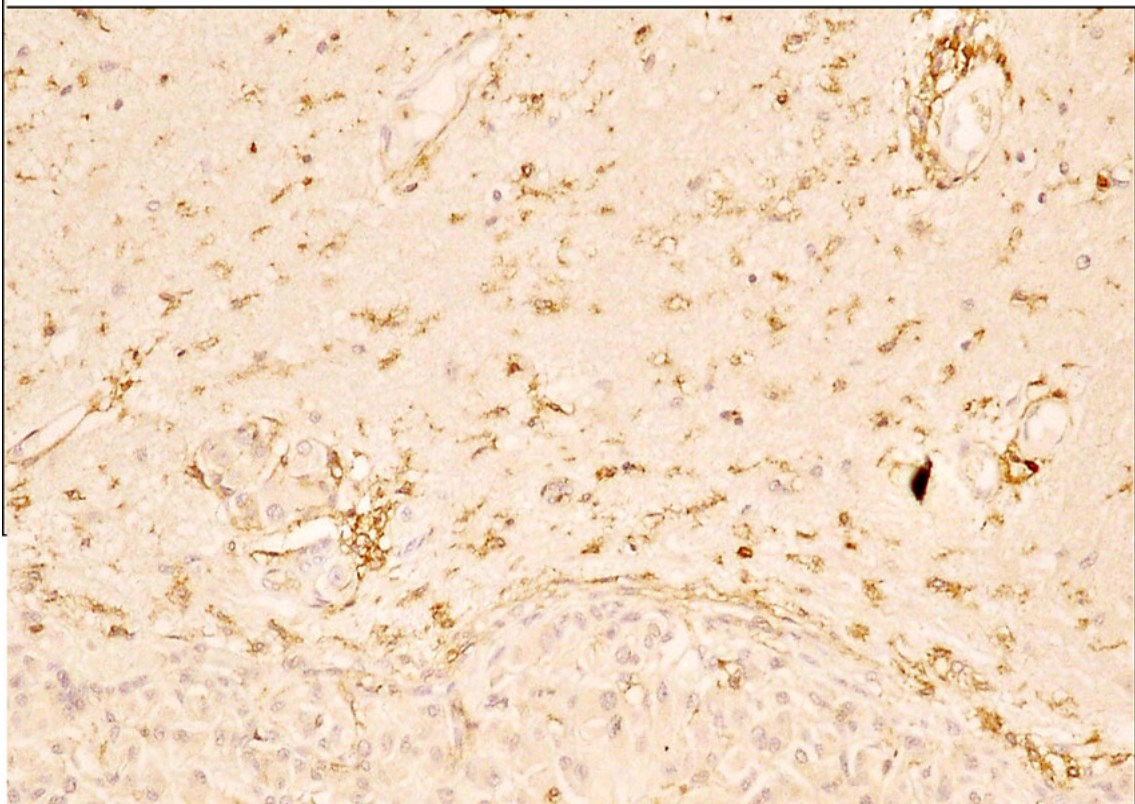
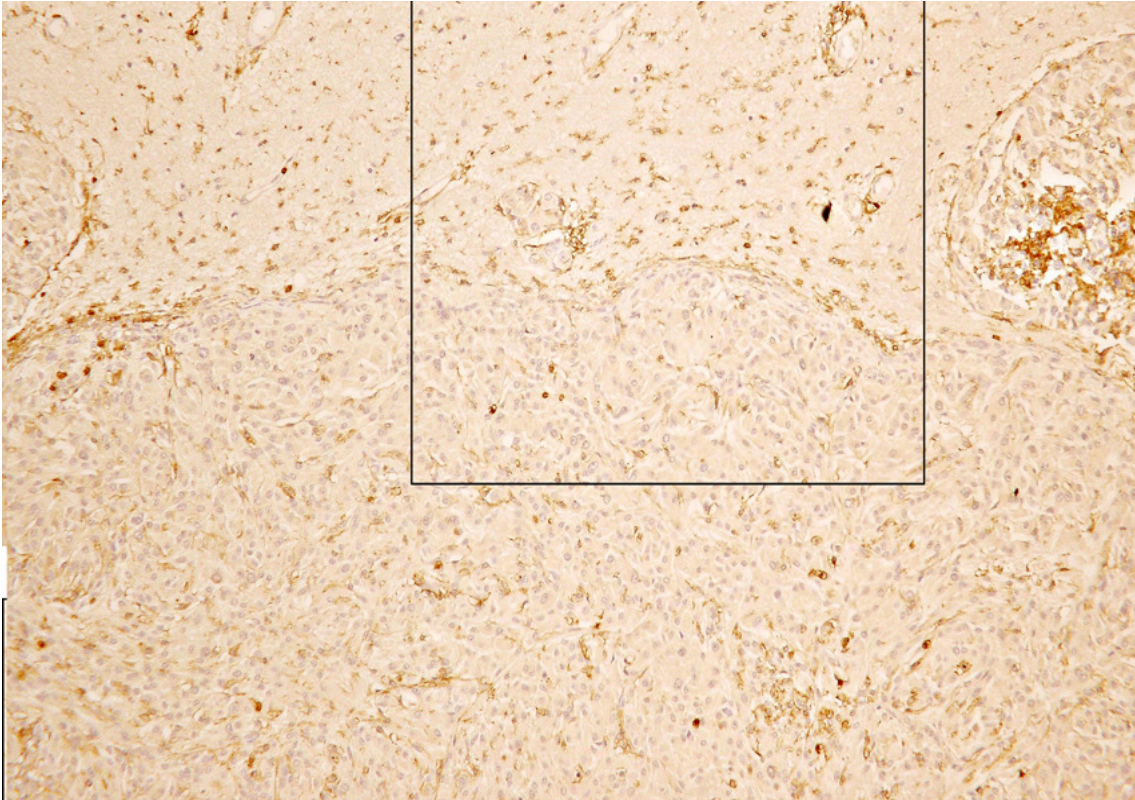


Abbildung 30: Diffuse Expression von CD45 auf mikroglialen Zellen im Hirngewebe eines WHO-Grad III Meningeoms. Die CD45-positiven Zellen sind im Gewebe vermehrt und betonen die Hirn-Tumorgrenze auf ihrer ganzen Fläche. Abbildung von Fall 33.

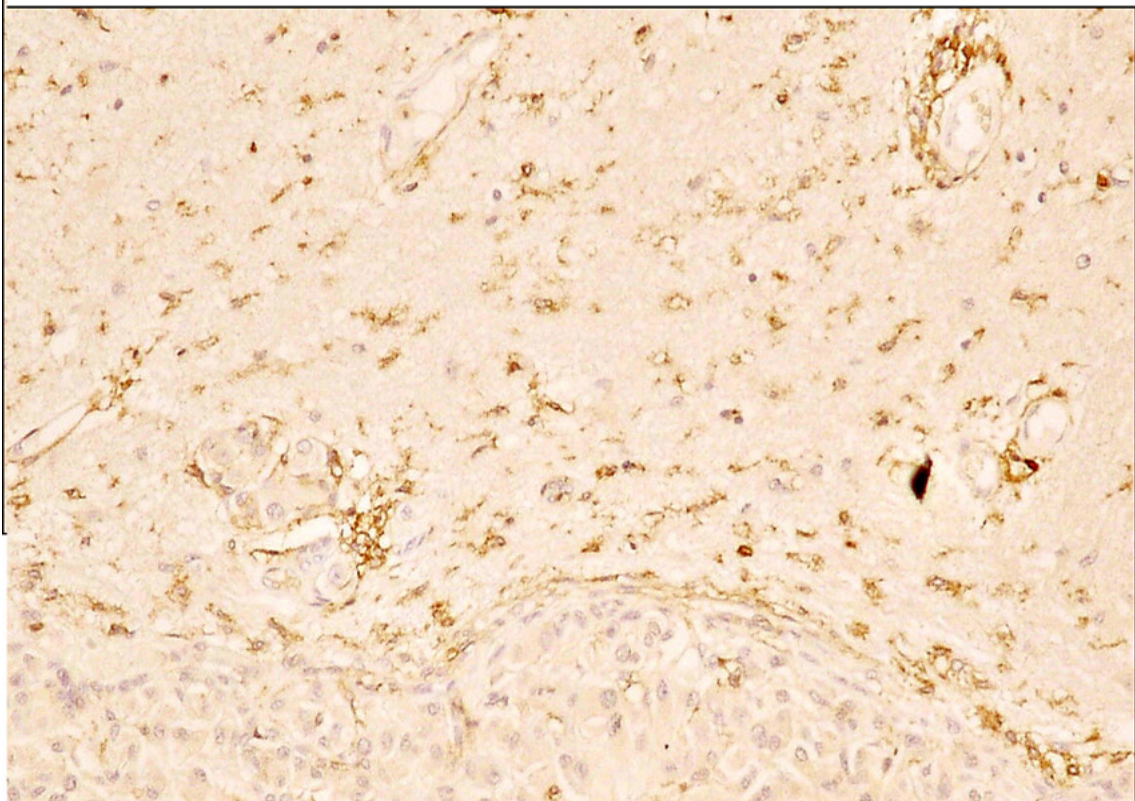
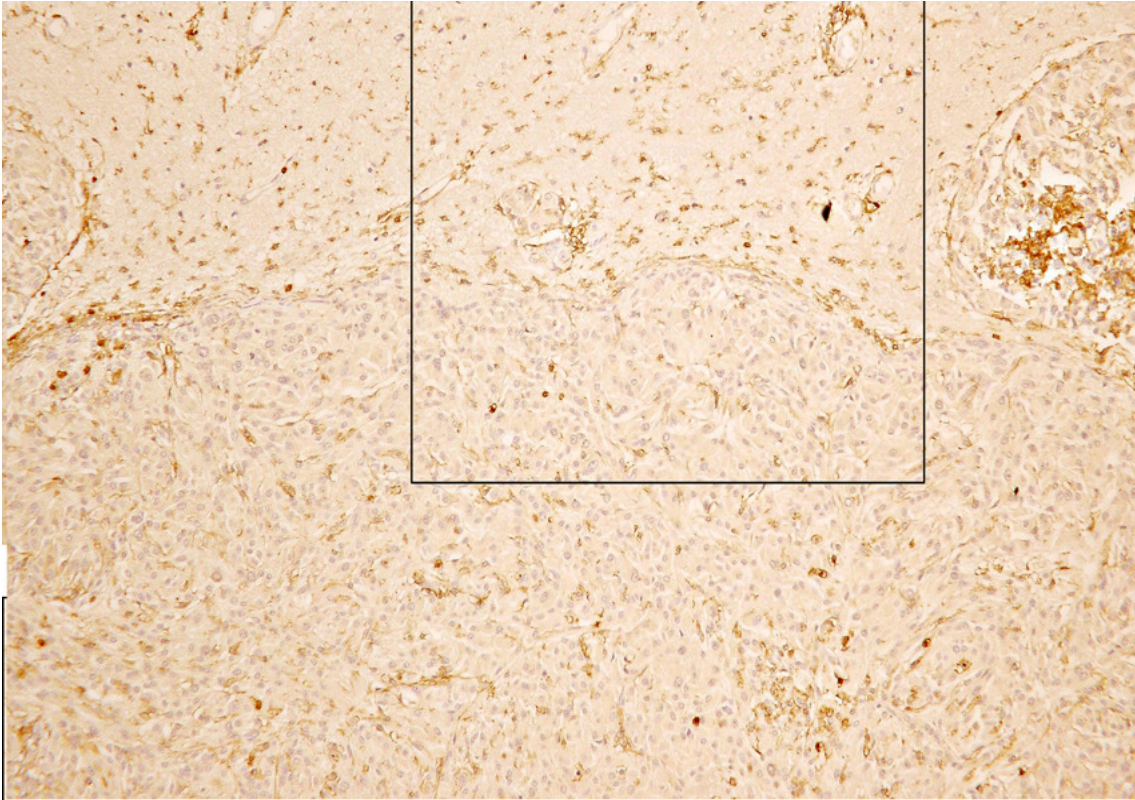


Abbildung 31: CD45-positive Mikroglia im Hirnparenchym eines WHO-Grad III Meningeoms. Die Zellen liegen diffus im Gewebe verteilt und sind an der Hirn-Tumorgrenze vermehrt, so dass diese fokal akzentuiert wird. Aufnahme von Fall 32.

3.3 Expression von MHCII

Major Histocompatibility Complex II steht für eine Familie glykosylierter Oberflächenproteine auf humanen Leukozyten, die eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation für CD4-positive T-Lymphozyten spielen (für weitere Informationen zu den molekularen Vorgängen siehe Übersichtsarbeiten von Villadangos 2001). MHCII wird von multiplen Antigen-präsentierenden Zellen, darunter auch ruhender und aktivierter Mikroglia exprimiert. Im hier untersuchten Gewebe zeigte sich eine Expression von MHCII auf den Zellkörpern und den Fortsätzen mikroglialer Zellen. Es konnte eine Expression auf frei im Gewebe liegenden, ramifizierten Zellen, perivaskulären Zellen und Makrophagen in Gefäßnähe festgestellt werden. Bei einer Hirngewebeprobe der Kontrollgruppe war eine mäßige Expression von MHCII-Molekülen auf mikroglialen Zellen feststellbar, in den anderen Fällen war lediglich in Gefäßnähe eine Detektion des Markers möglich, die generelle Expression war jedoch sehr gering.

3.3.1 Meningeome WHO-Grad I

MHCII-exprimierende mikrogliale Zellen wurden bei allen, mit Ausnahme von einem der 18 untersuchten Meningeome WHO-Grad I in den Hirnanteilen gefunden (Abb. 9; Abb. 32; Abb. 34). Die Zellen zeigten dabei ein diffuses Verteilungsmuster im Parenchym. Die Expressionsstärke variierte stark, wobei jedoch innerhalb des jeweiligen Hirns kaum Unterschiede in der Stärke und der Dichte der mikroglialen Zellen auftraten. In einer Biopsie konnten keine MHCII-positiven Zellen im Hirn nachgewiesen werden. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber den anderen WHO-Graden in Bezug auf diffuse Mikroglia im Hirnparenchym feststellen.

Die Hirn-Tumorgrenze war bei einem Tumor durchgehend auf ihrer ganzen Front durch vermehrtes Auftreten mikroglialer Zellen betont, wie auch in der Schemadarstellung gezeigt wurde (Abb. 9). Bei diesem Tumor waren auch im Hirnparenchym liegende Tumoreinseln besonders stark von vermehrter Mikroglia umgeben. Bei einer weiteren Biopsie war die Hirn-Tumorgrenze an einer Stelle betont, jedoch in diesem Fall nicht durchgehend auf ihrer ganzen Länge, sondern lediglich in Form eines lokalen Herdes (Abb. 33). Die Tumore zeigten alle MHCII-positiv Mikroglia, wobei auch diese Zellen meist diffus im Gewebe verteilt waren. Oft zeigte sich eine Häufung entlang Tumoranteile-septierender Gefäße, so dass ein straßenartiges Bild entstand. Dieses Bild zeigten sechs der WHO-Grad I Meningeome. Lediglich zwei der 18 Grad I Meningeome zeigten nur eine sehr geringe bis nicht vorhandene Expression MHCII-positiver Mikroglia.

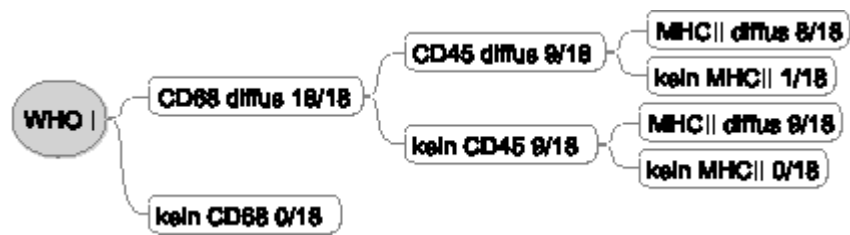


Abbildung 32: Expression von CD68, CD45 und MHCII bei Meningeomen WHO-Grad I. Von neun Meningeomen, die eine Expression von CD45 aufwiesen, zeigten acht auch eine Expression von MHCII auf mikroglialen Zellen im Hirnparenchym. Bei einem Meningeom konnte keine MHCII-positive Mikroglia im Hirngewebe detektiert werden. Von den neun Meningeomen, die keine CD45 Expression aufwiesen, zeigten alle eine Expression von MHCII auf mikroglialen Zellen.

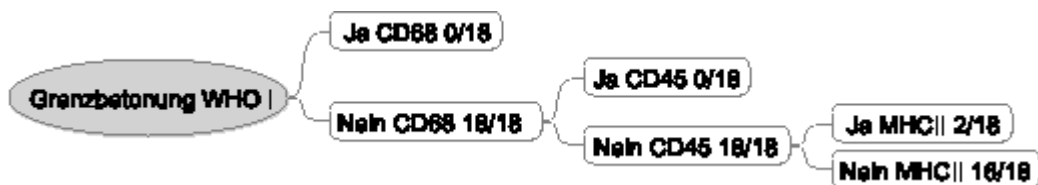


Abbildung 33: Expression der Marker CD68, CD45 und MHCII an der Hirn-Tumorgrenze invasiver Meningeome WHO-Grad I. An zwei von 18 Grenzen konnte eine Betonung durch MHCII-reaktive Mikroglia dargestellt werden.

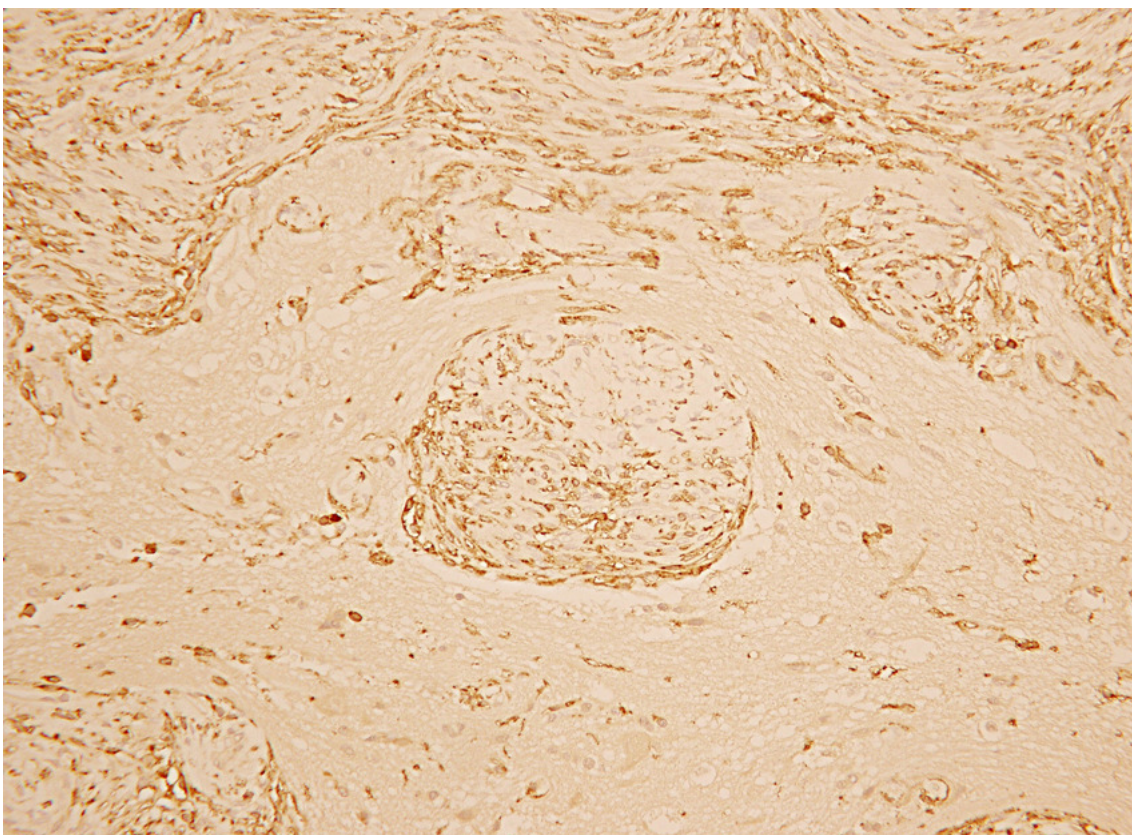


Abbildung 34: Diffuse Verteilung MHCII-positiver Mikroglia im Hirnparenchym eines WHO-Grad I Meningeoms. Die Hirn-Tumorgrenze ist nicht betont. Dargestellt ist Fall 5.

3.3.2 Meningeome WHO-Grad II

Elf der 13 Meningeome mit WHO-Grad II zeigten eine Expression von MHCII auf mikroglialen Zellen im invadierten Hirnparenchym, wie in der Schemazeichnung (Abb. 9; Abb. 35). Hierbei zeigten die angefärbten Zellen ein im Gewebe frei liegendes, diffuses, aber gleichmäßiges Verteilungsmuster (Abb. 37). Lediglich zwei der WHO-Grad II Meningeome wiesen keine Expression auf Mikrogliazellen im Hirnparenchym auf. Diese zeigten eine MHCII Expression nur vereinzelt an perivaskulären mikroglialen Zellen. Auch für Meningeome mit WHO-Grad II ließen sich statistisch keine Unterschiede bezüglich diffuser, MHCII-positiver Mikroglia in den Hirnanteilen gegenüber den anderen Malignitätsgraden nachweisen. Die Hirn-Tumorgrenze war in einer Biopsie von einem WHO-Grad II Meningeom an drei Stellen herdförmig durch vermehrte mikrogliale Zellen betont, jedoch nicht auf der ganzen Länge, so dass die mikrogliale Front, im Gegensatz zu obiger Schemazeichnung, Lücken aufwies (Abb. 9; Abb. 36; Abb. 38).

Alle Tumoranteile wiesen eine MHCII Expression auf, wobei auch hier die Zellen diffus im Gewebe verteilt waren. Wie bereits in den WHO-Grad I Meningeomen beobachtet, zeigte sich entlang Tumormassen-septierender Gefäße ein gehäuftes Auftreten von reaktiven Zellen. Drei der 13 Grad II Meningeome zeigten eine extrem starke Expression von MHCII, so dass man den Eindruck einer Expression von MHCII durch Tumorzellen gewinnen konnte. Ebenso könnte es auf eine sehr starke Infiltration mikroglialer Zellen zurückzuführen sein, durch die hohe Expressions- und Zelldichte war dies nicht eindeutig zu differenzieren.

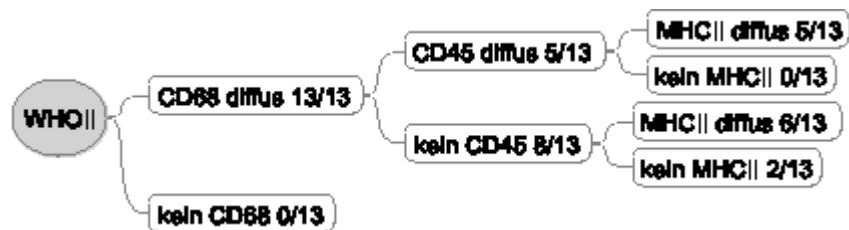


Abbildung 35: Expression von CD68, CD45 und MHCII auf Meningeomen WHO-Grad II. Alle Meningeome, die eine Expression von CD45 aufwiesen, zeigten auch MHCII-positive Mikroglia im Hirnparenchym. Von den acht Meningeomen, bei denen kein CD45 nachgewiesen werden konnte, wiesen zwei auch keine Expression von MHCII auf. Sechs Biopsien zeigten jedoch eine diffuse Verteilung MHCII-positiver Mikroglia im Hirngewebe.

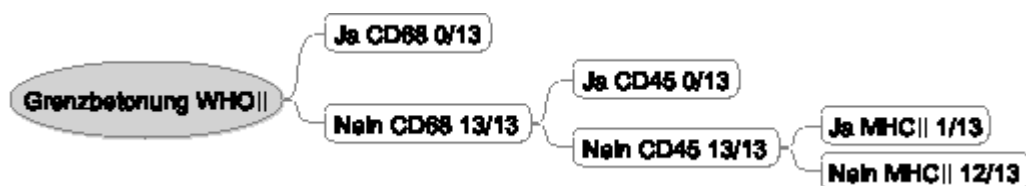


Abbildung 36: Grenzakkzentuierung mit CD68, CD45 und MHCII reaktiver Mikroglia bei invasiven Meningeomen WHO-Grad II. In einem Präparat konnte eine Betonung der Grenze durch MHCII-exprimierende Zellen gefunden werden.

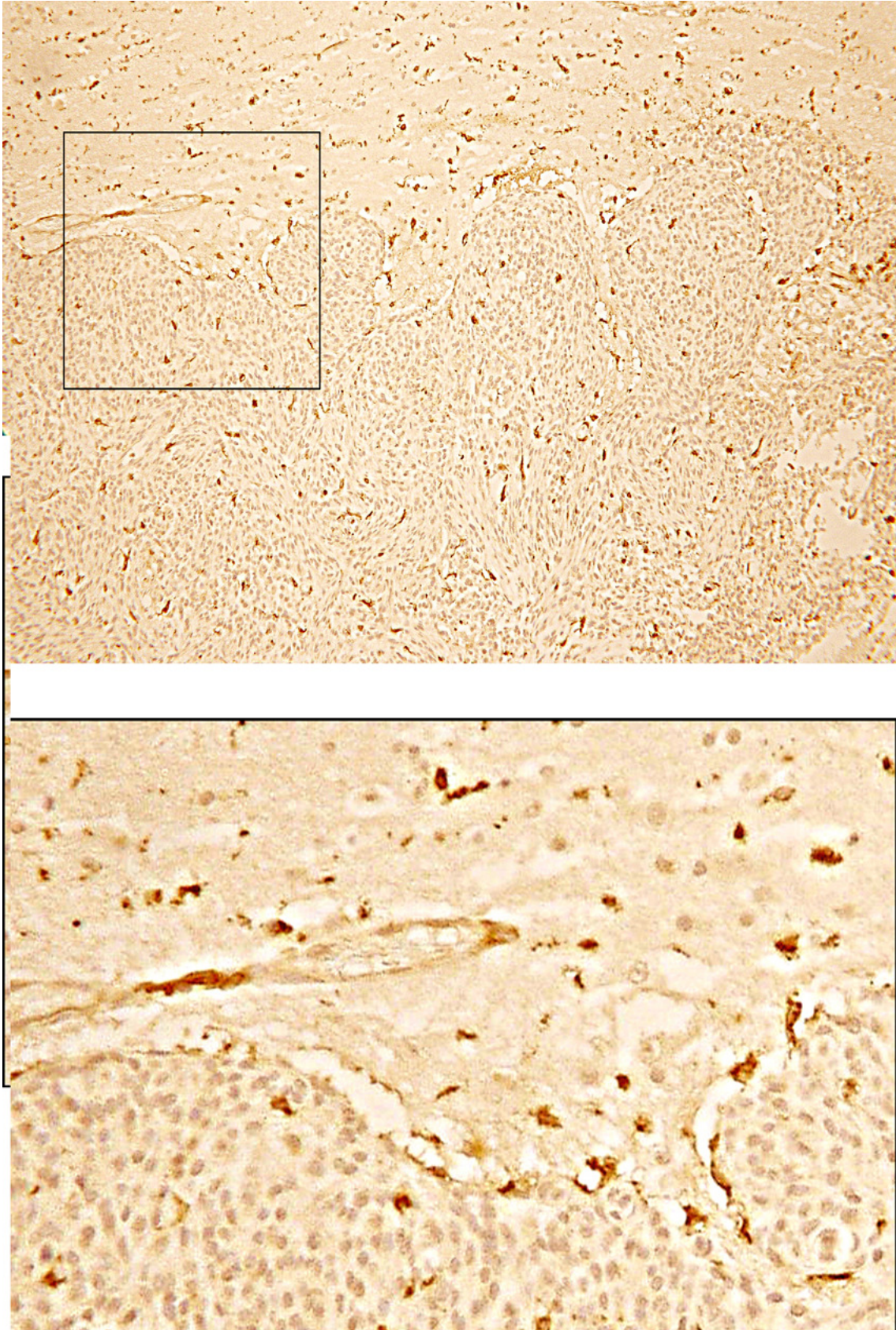


Abbildung 37: Diffuse Expression von MHCII auf mikroglialen Zellen im Hirngewebe eines Meningeoms mit WHO-Grad II. Die Hirn-Tumorgrenze ist nicht betont. Darstellung von Fall 21.

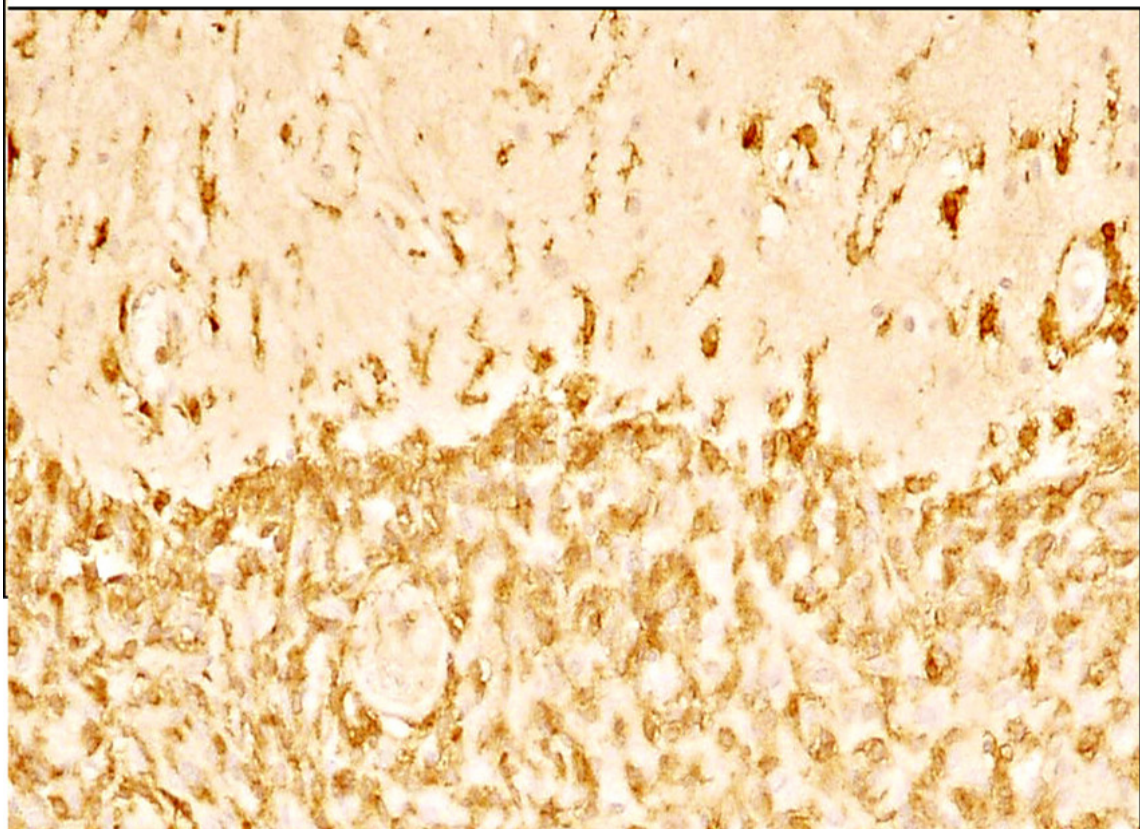
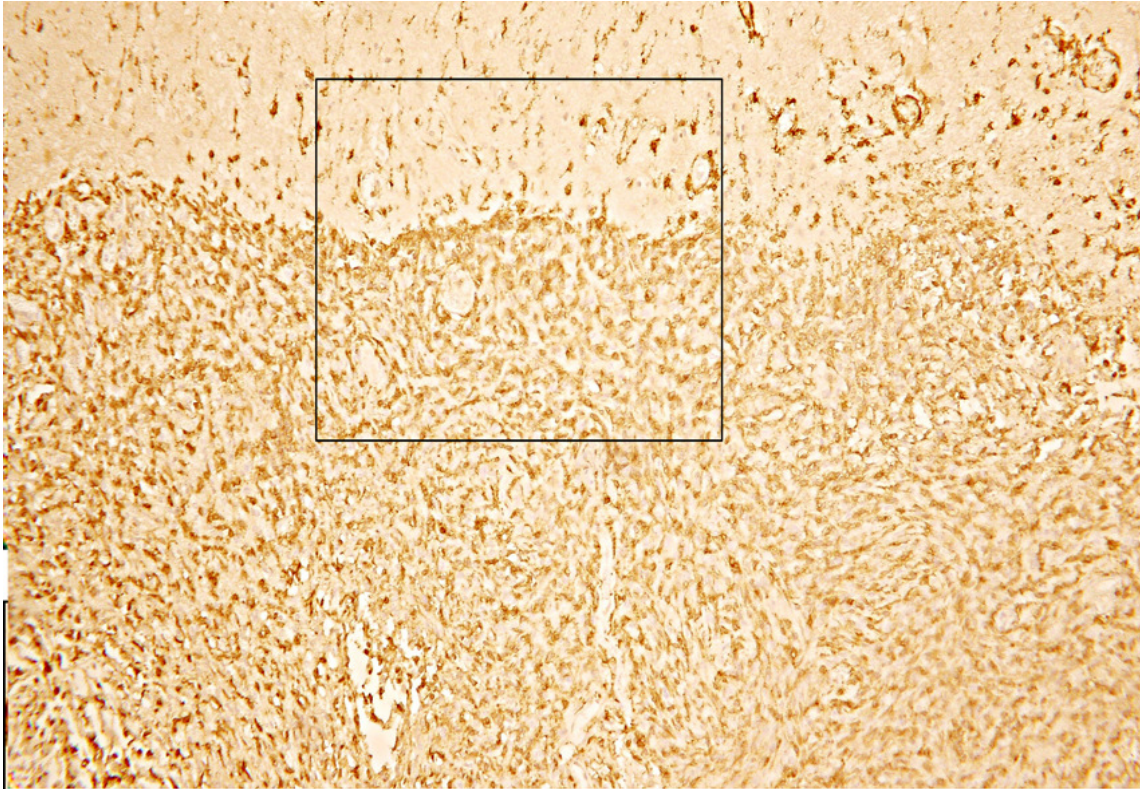


Abbildung 38: Starke Expression von MHCII auf mikroglialen Zellen mit diffuser Verteilung im Hirnparenchym. Um Gefäße zeigt sich eine verstärkte Expression. Die Hirn-Tumorgrenze ist verstärkt von MHCII-positiven Zellen besetzt. Abgebildet ist Fall 26.

3.3.3 Meningeome WHO-Grad III

Bei allen sieben WHO-Grad III Tumoren konnten MHCII-exprimierende mikrogliale Zellen, wie in der schematischen Darstellung gezeigt, in den anliegenden Hirnteilen nachgewiesen werden (Abb. 9; Abb. 39). Die Zellen zeigten dabei eine weitgehend gleichmäßige, diffuse Verteilung, mit fokalen Herden in Gefäßnähe (Abb. 41). Statistisch lies sich jedoch keine signifikant vermehrte Anzahl MHCII-positiver Biopsien für WHO-Grad III gegenüber den anderen Malignitätsgraden bezüglich diffuser Mikroglia im Parenchym des ZNS nachweisen. Sechs Biopsien wiesen eine besonders starke Expression von MHCII an der Hirn-Tumorgrenze auf, was durch ein vermehrtes Vorhandensein mikroglialer Zellen erklärt werden konnte (Abb. 40). Dabei waren bei drei Meningeomen die gesamten Grenzflächen durch Mikroglia besetzt, wobei meistens die Tumorseite stärker von Mikroglia besetzt war, als die Hirnseite, diese jedoch auch eine Vermehrung der Zellen aufwies, wie auch in der obigen Schemazeichnung dargestellt ist (Abb. 9; Abb. 42). Drei weitere Meningeome wiesen an ihren Grenzflächen, im Gegensatz zur schematischen Darstellung, stellenweise Unterbrechungen im mikroglialen Verbund auf, so dass dort zum Teil keine Betonung der Grenze vorlag (Abb. 43). Die Mikroglia trat dabei vor allem auf der Tumorseite vermehrt auf, aber auch auf der Hirnseite war eine Häufung zu sehen. Ein Tumor zeigte keine Betonung der Grenze. Das vermehrte Auftreten von Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze bei WHO-Grad III gegenüber WHO-Grad I und II konnte statistisch als hoch signifikant bestätigt werden ($p < 0,0001$). Alle Meningeome hatten MHCII-positive Mikroglia in ihren Tumoranteilen, hierbei war wieder ein diffuses Verteilungsmuster mit gehäufterem Auftreten entlang Gefäßen und um Tumorinseln zu beobachten.

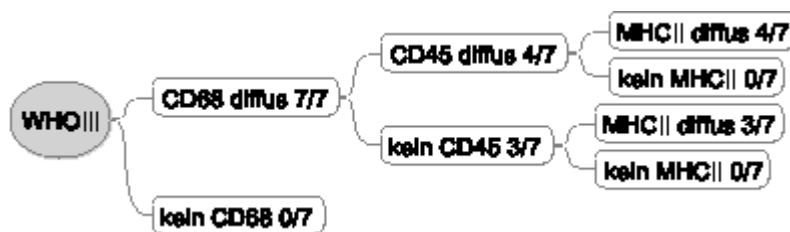


Abbildung 39: Darstellung der Expression von CD68, CD45 und MHCII bei WHO-Grad III. Alle Tumore, die eine Expression von CD45 zeigten, wiesen auch eine Expression von MHCII auf mikroglialen Zellen in ihrem Hirnparenchym auf. Auch die Tumore, bei denen keine CD45-positiven Zellen nachgewiesen werden konnten, zeigten alle eine Expression von MHCII auf Mikroglia.

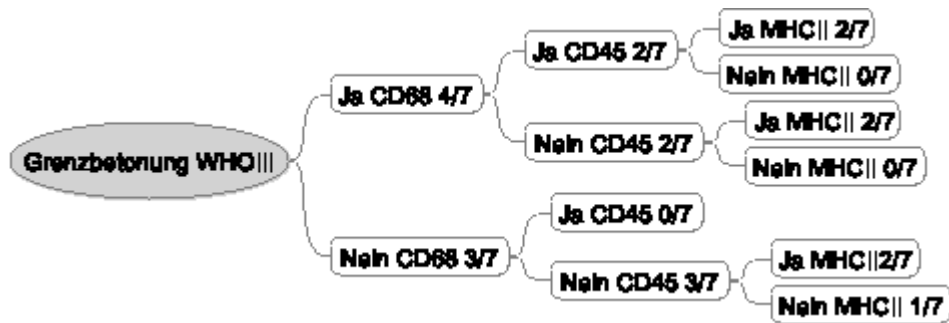


Abbildung 40: Darstellung der Expression von CD68, CD45 und MHCII auf reaktiven Zellen an der Hirn-Tumorgrenze des WHO-Grades III. Sechs der sieben untersuchten Grenzregionen zeigten eine Akzentuierung durch MHCII-exprimierende Mikroglia. Dabei waren zwei der Grenzen bereits durch eine Expression von CD45 und vier bereits durch eine Expression von CD68 auf mikroglialen Zellen betont gewesen.

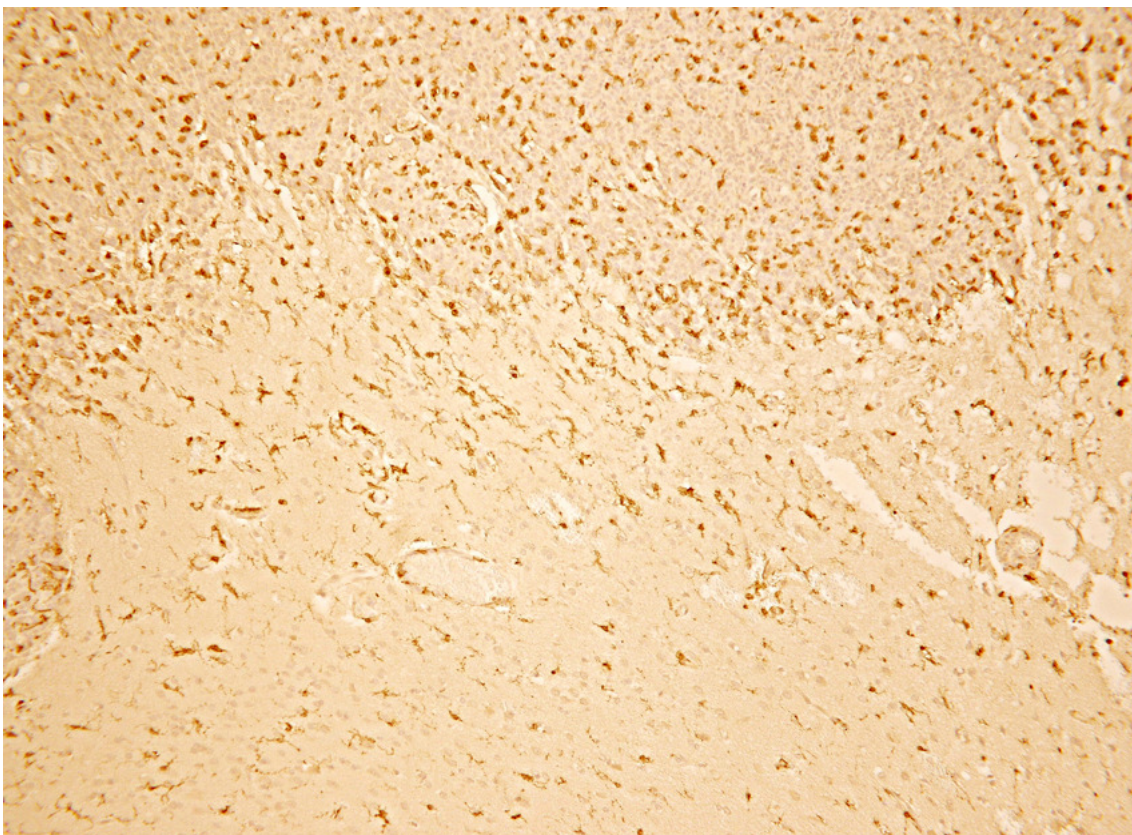


Abbildung 41: Starke Expression von MHCII auf Mikroglia im umgebenden Hirnparenchym eines WHO-Grad III Meningeoms. Die detektierten Zellen zeigen eine diffuse Verteilung und eine verstärkte Expression in Gefäßnähe. Die Hirn-Tumorgrenze ist nicht akzentuiert. Dargestellt ist Fall 35.

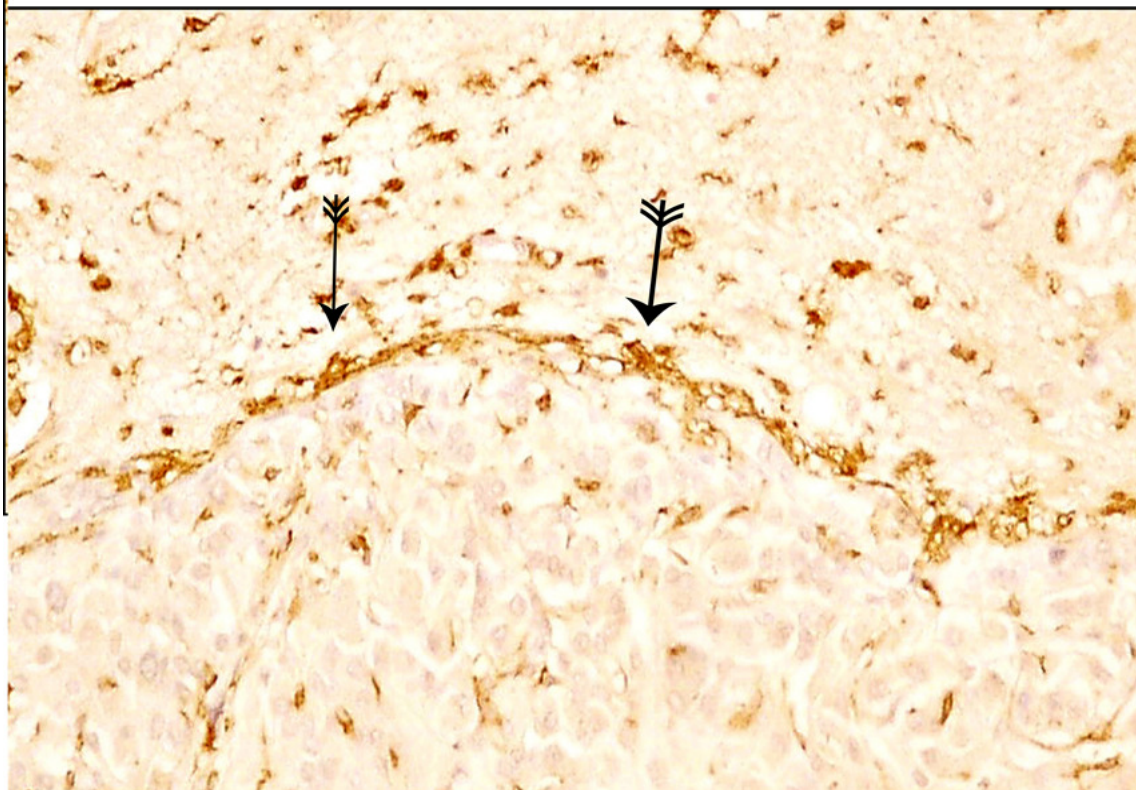
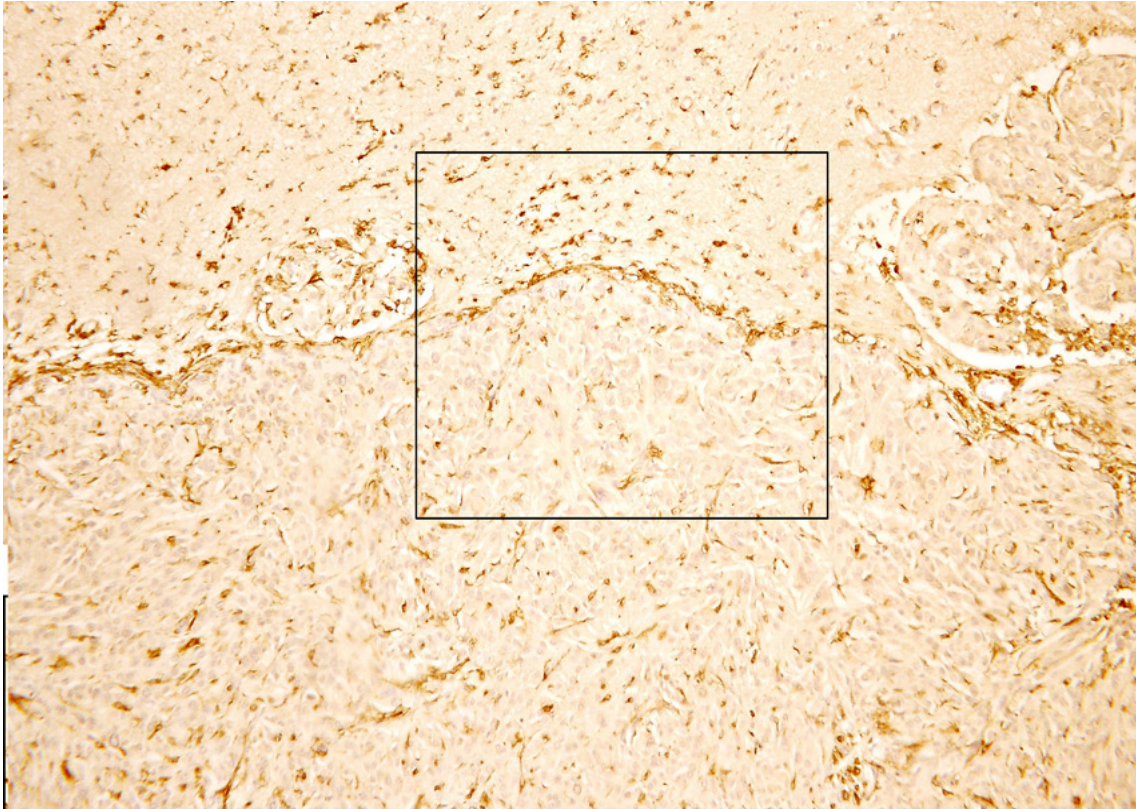


Abbildung 42: MHCII-positive Mikroglia im Hirngewebe eines WHO-Grad III Meningeoms. Das Hirnparenchym zeigt ein diffuses Verteilungsmuster der Zellen, die Hirn-Tumorgrenze ist durchgängig durch MHCII-positive Zellen betont. Abbildung von Fall 33.

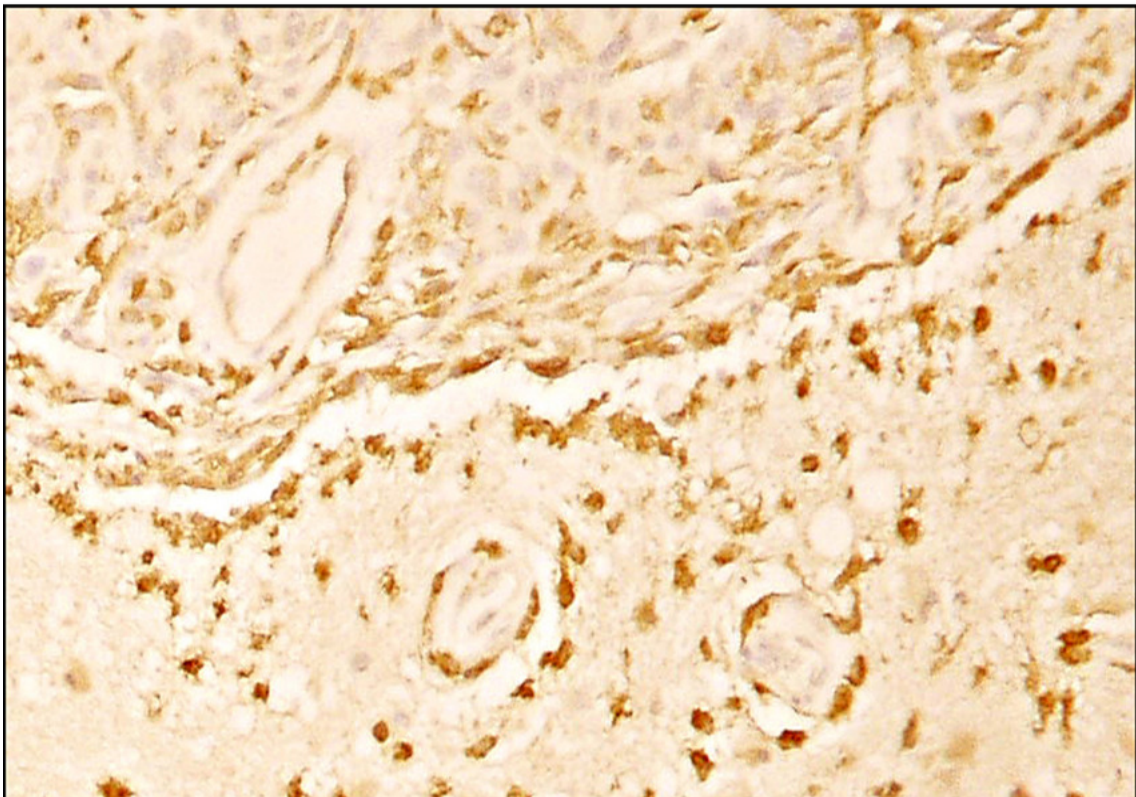
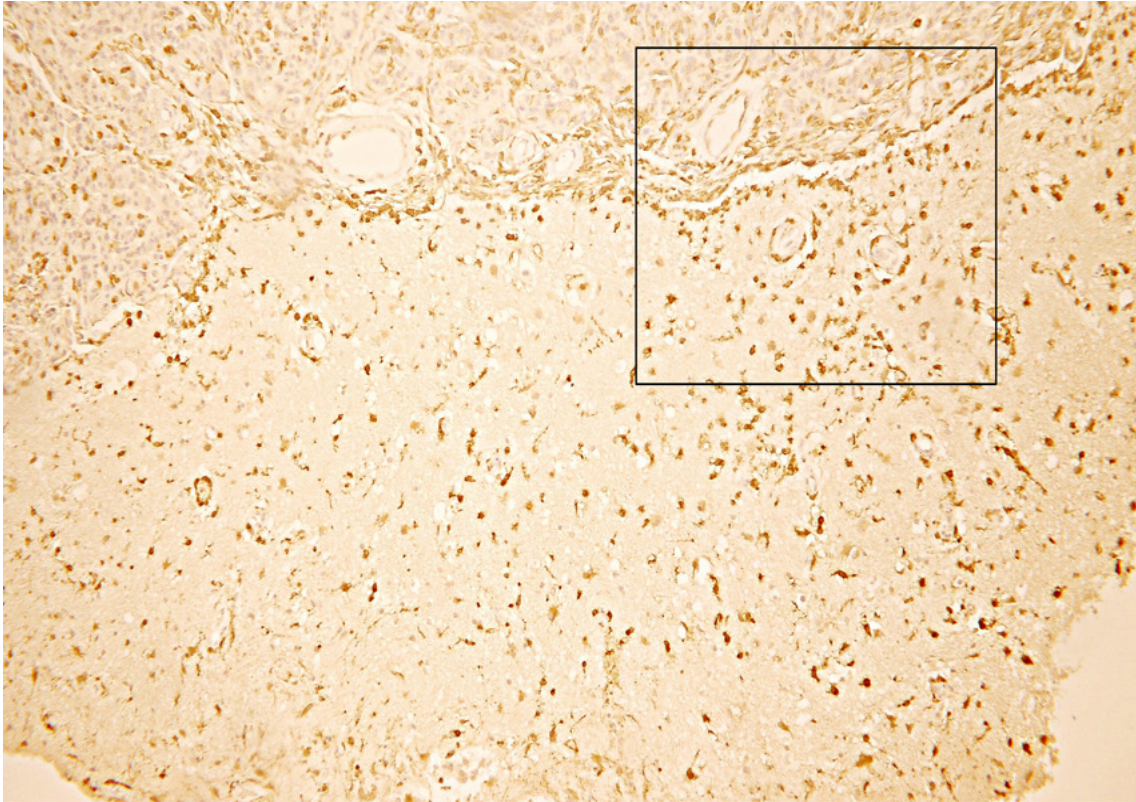


Abbildung 43: Stellenweise Betonung der Hirn-Tumorgrenze in einem WHO-Grad III Meningeom. Das Hirnparenchym weist eine diffuse Verteilung MHCII-positiver Zellen auf. Hier eine Abbildung von Fall 32.

3.4 Expression von CD14

CD14 ist ein, über einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker, in der Membran der Zellen gelegenes Molekül, das bei der Signaltransduktion und der Phagozytose eine wichtige Rolle spielt. Da ruhende Mikroglia kein CD14 auf ihrer Oberfläche exprimieren, dient es als Marker aktivierter Mikroglia. In den hier untersuchten Geweben zeigten sowohl frei im Gewebe liegende Zellen, als auch perivaskuläre Mikroglia eine Aktivierung, sowohl in den Hirnanteilen, als auch im eigentlichen Tumorgewebe. Die Hirn-Tumorgrenze war in einigen Fällen vermehrt mit aktivierter Mikroglia besetzt. Mikrogliale Expression von CD14 auf der Zelloberfläche konnte in keinem Fall im untersuchten, nicht pathologisch alterierten Hirngewebe festgestellt werden. Lediglich ein geringes Auftreten CD14-positiver, aktivierter Zellen um Gefäße konnte in einem Fall festgestellt werden.

3.4.1 Meningeome WHO-Grad I

In den Hirnanteilen von sieben WHO-Grad I Meningeomen konnte aktivierte Mikroglia festgestellt werden (Abb. 44). Diese Zellen lagen dabei, wie auch in der Schemazeichnung, diffus im Gewebe verstreut (Abb. 9). Eine verstärkte Aktivierung lag dabei vor allem bei perivaskulärer Mikroglia vor, so waren an Gefäßen oder in Gefäßnähe in allen Biopsien Aktivierungsherde zu finden. Elf invadierte Hirnanteile wiesen keine aktivierte Mikroglia frei im Gewebe auf. Allerdings zeigte sich auch bei fehlender Aktivierung freier Zellen immer eine Aktivierung perivaskulärer Mikroglia. Statistisch konnten keine Unterschiede bezüglich diffuser Mikroglia bei WHO-Grad I Meningeomen gegenüber den anderen Malignitätsgraden ermittelt werden. Zellzählungen von jeweils 200 CD14-positiven Zellen ergaben für im Mittel 124,7, also 62% der Zellen eine Gefäßassoziation (Standardabweichung 13,2). Während bei den meisten Biopsien eine schwache bis mäßige Anzahl CD14-positiver mikroglialer Zellen vorlag, stachen zwei Biopsien durch ihre hohe Anzahl aktivierter Mikroglia im Gewebe hervor.

Die Grenze zwischen invasivem Meningeom und Hirn war in zwei Fällen von aktivierter Mikroglia vermehrt besetzt, wobei in einem Fall im Hirn liegende Tumorzellen akzentuiert waren, nicht jedoch die ganze Grenze (Abb. 45). Bei einem weiteren Fall war die Grenze fokal auf beiden Seiten mit aktivierter Mikroglia besetzt, im Gegensatz zur Schemadarstellung auf der Tumorseite jedoch stärker als auf der Hirnseite. Im Tumorgewebe war immer ein diffuses Bild aktivierter Mikroglia zu sehen, wobei auch hier Mikroglia vermehrt an Gefäßen auftrat. Oft waren diese Gefäße Septen-ähnlich zwischen soliden Tumormassen gelegen. Lediglich in einem Meningeom konnte man keine Mikroglia im Gewebe erkennen.

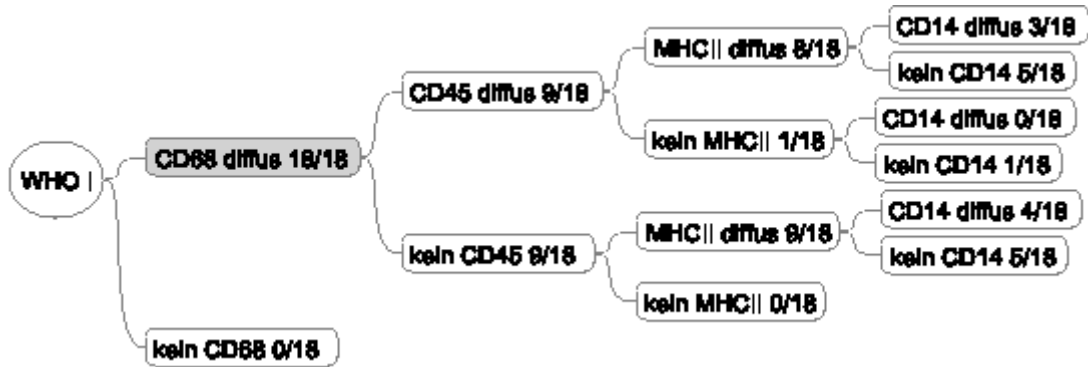


Abbildung 44: Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 bei Meningeomen WHO-Grad I. Von den CD45- und MHCII-positiven Biopsien zeigten drei auch ein Expression von CD14. Bei fünf Biopsien konnten keine CD14-positiven mikroglialen Zellen im Hirngewebe dargestellt werden. Der Tumor der CD45, jedoch kein MHCII aufgewiesen hatte, zeigte auch kein CD14. Vier der neun Tumore, die kein CD45, jedoch MHCII in ihrem Hirngewebe zeigten, wiesen auch eine diffuse Verteilung CD14-positiver Mikroglia auf. Fünf zeigten keine Expression von CD14.

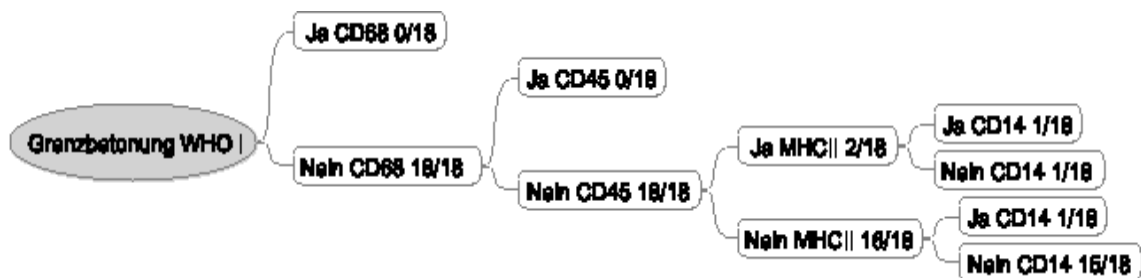


Abbildung 45: Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 an der Hirn-Tumorgrenze invasiver Meningeome WHO-Grad I. Zwei zeigen eine Betonung durch CD14-reaktive Mikroglia, wobei eine bereits durch eine vermehrte Expression von MHCII akzentuiert war.

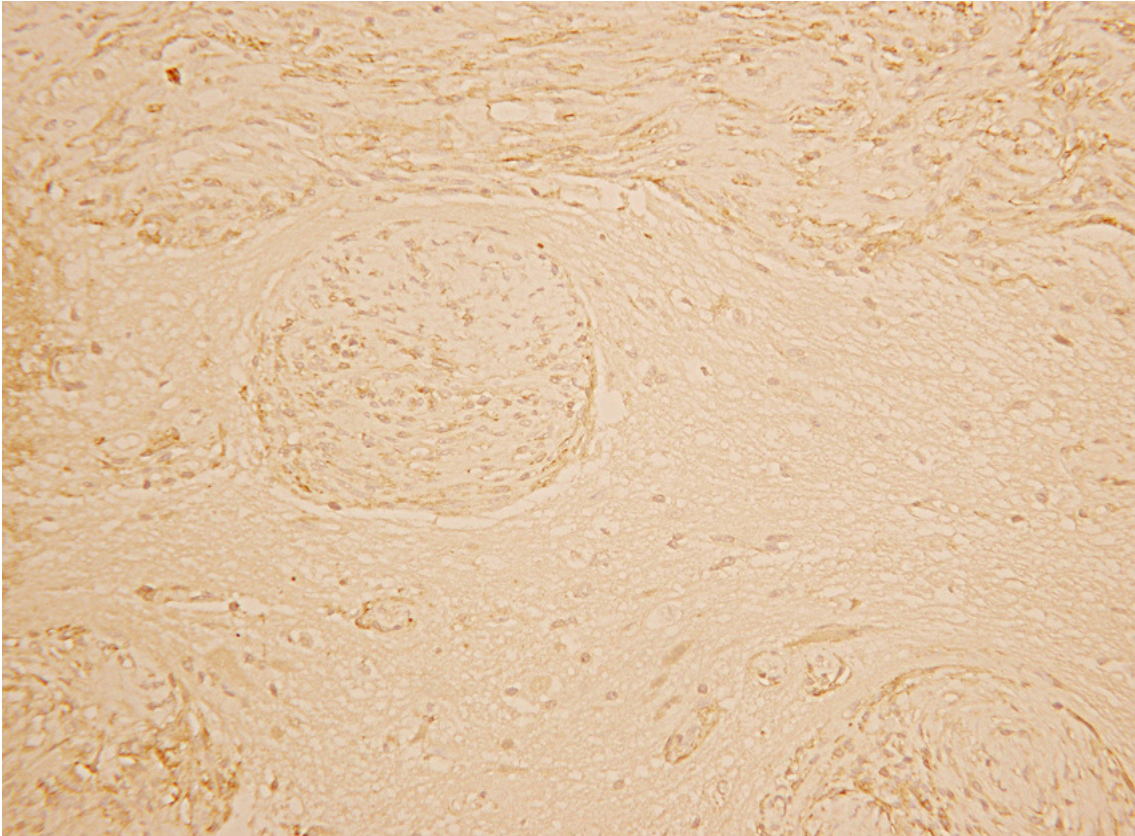


Abbildung 46: Keine Expression von CD14 auf diffuser Mikroglia im Hirnparenchym eines WHO-Grad I Meningeoms. Gefäß-assoziierte Mikroglia zeigt eine Expression des Markers CD14. Dargestellt ist Fall 5

3.4.2 Meningeome WHO-Grad II

Von dreizehn Grad II Meningeomen waren in sieben Hirnanteilen aktivierte mikrogliale Zellen zu finden (Abb. 47). Auch hier erschienen sie diffus im Gewebe liegend, wobei fokale Herde um Gefäße sichtbar waren. Zellzählungen bezüglich der Lage in Gefäßnähe der Zellen ergab, dass 137,7 von 200 Zellen, also 69% aller aktivierten mikroglialen Zellen in Gefäßnähe oder an Gefäßen lagen (Standardabweichung 8,1) (Abb. 49). Die Streubreite lag dabei zwischen 64% und 74%. In sechs Biopsien konnte keine aktivierte Mikroglia im Hirnparenchym detektiert werden. Besonders auffällig war die Expressionsstärke des Markers innerhalb der verschiedenen Biopsien. Drei wiesen eine geringe bis mäßige Anzahl reaktiver Zellen auf, während vier durch eine sehr hohe Zahl CD14-positiver Zellen im Gewebe imponierten. Signifikante Unterschiede von Präparaten mit diffuser Mikroglia konnten auch bei den untersuchten Grad II Meningeomen gegenüber den anderen Malignitätsgraden nicht festgestellt werden.

Die Grenze zwischen Hirn und Tumorfläche war bei zwei Biopsien besonders akzentuiert, wobei dies in einem Fall durch einen, im Gegensatz zu Schemazeichnung, nur auf der Hirnseite liegenden mikroglialen Herd hervorgerufen wurde (Abb. 9; Abb. 48; Abb. 50). Hierbei war die Grenze jedoch nur fokal, nicht durchgehend betroffen. In einer weiteren Biopsie waren auf der Tumorseite der Grenze vermehrt Mikroglia, die, wie auch in der schematischen Darstellung, eine durchgehende Grenzfront bildeten. In den Tumorgeweben zeigten alle Meningeome aktivierte Mikroglia, wobei vier Tumore die Zellen vermehrt an septierenden Gefäßen und Bindegewebssträngen zwischen soliden Tumormassen aufwiesen. Die anderen Meningeome zeigten ein diffuses Verteilungsmuster der aktivierten Zellen, mit verstärkter Aktivierung der perivaskulären Mikroglia.

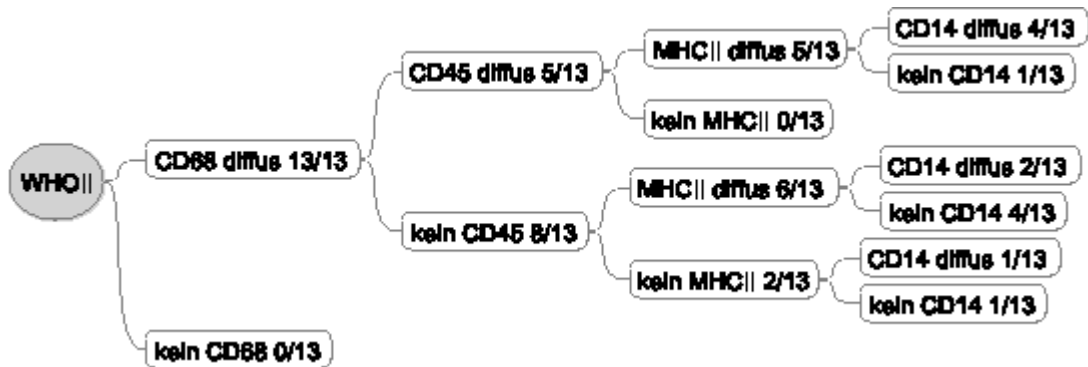


Abbildung 47: Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14. Von den fünf Meningeomen, die CD45- und MHCII-positive Mikroglia aufwiesen, zeigten vier auch CD14-positive Zellen im Hirnparenchym. Bei einem Tumor davon konnte keine Expression von CD14 nachgewiesen werden. Bei zwei der Biopsien, die kein CD45, jedoch MHCII exprimierten, konnten auch CD14-positive Zellen im Hirngewebe nachgewiesen werden. Vier dieser Tumore zeigten keine Expression von CD14. Ein Tumor, bei dem keine CD45- und MHCII-positiven Zellen detektiert werden konnten zeigte auch keine Expression.

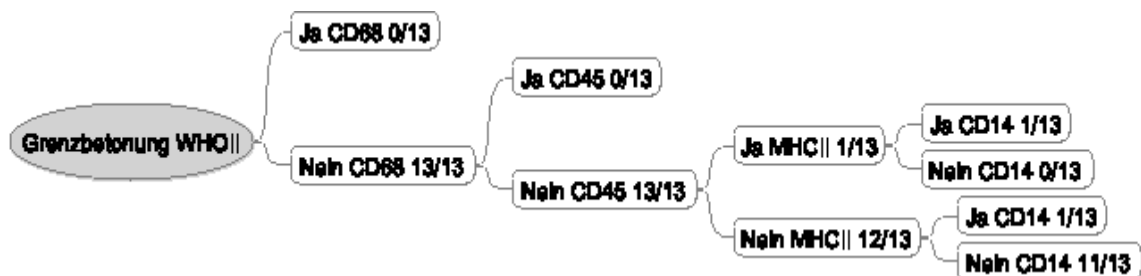


Abbildung 48: Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 an der Hirn-Tumorgrenze invasiver Meningeome WHO-Grad II. Zwei Grenzregionen zeigen eine vermehrte Expression von CD14 auf aktivierten mikroglialen Zellen, wobei eine Grenze bereits vermehrte Expression von MHCII auf Mikroglia gezeigt hatte.

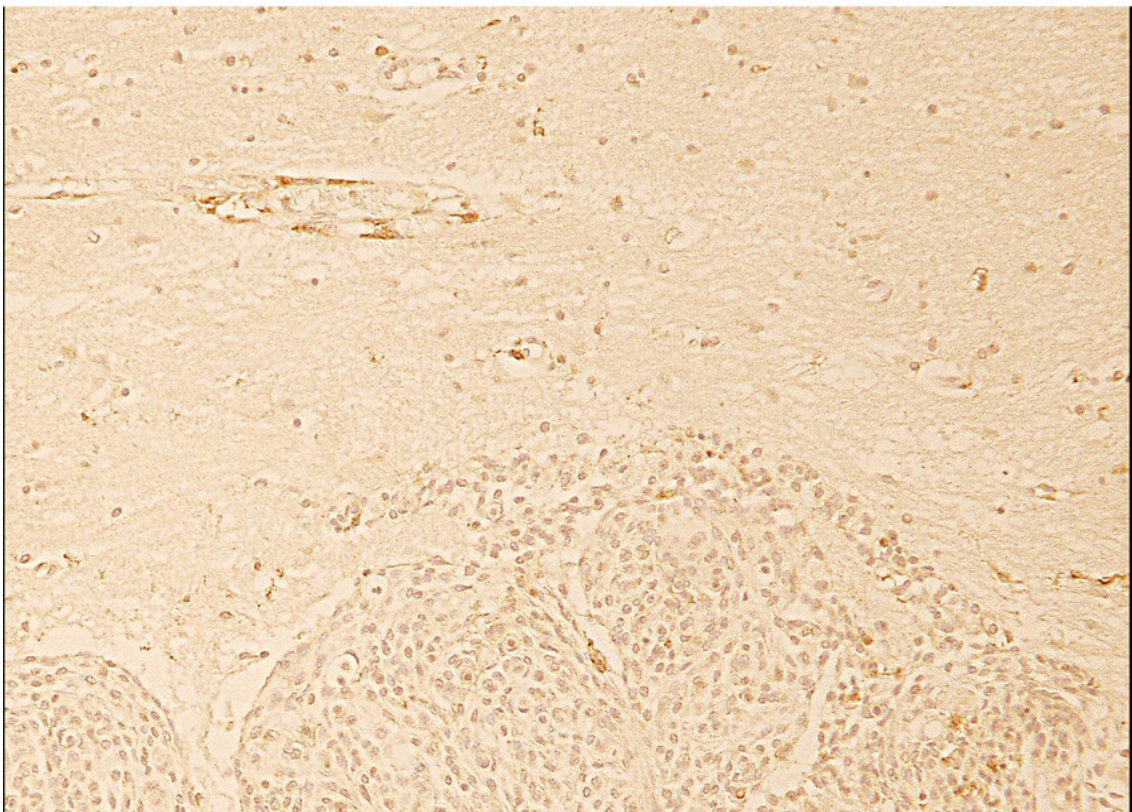
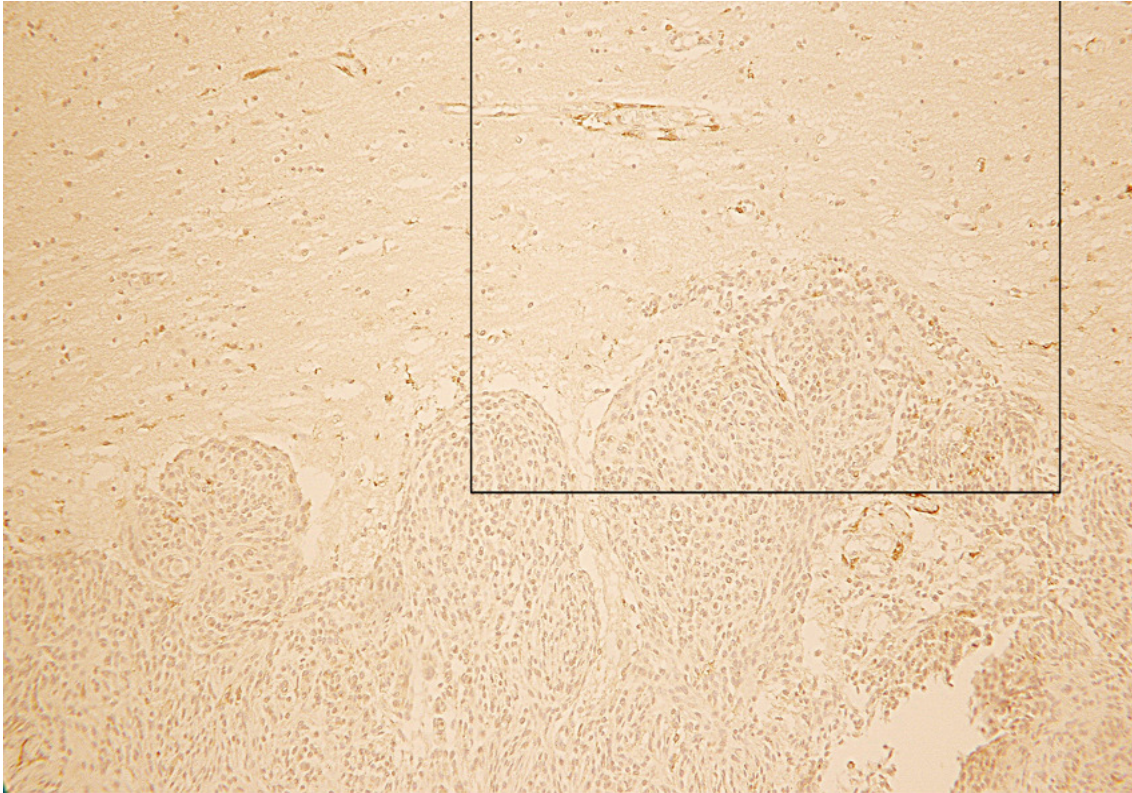


Abbildung 49: Keine Expression von CD14 auf frei im Gewebe liegender Mikroglia, jedoch starke Expression von CD14 auf gefäßassoziiierter Mikroglia bei einem WHO-Grad II Meningeoms. Hier eine Darstellung von Fall 21.

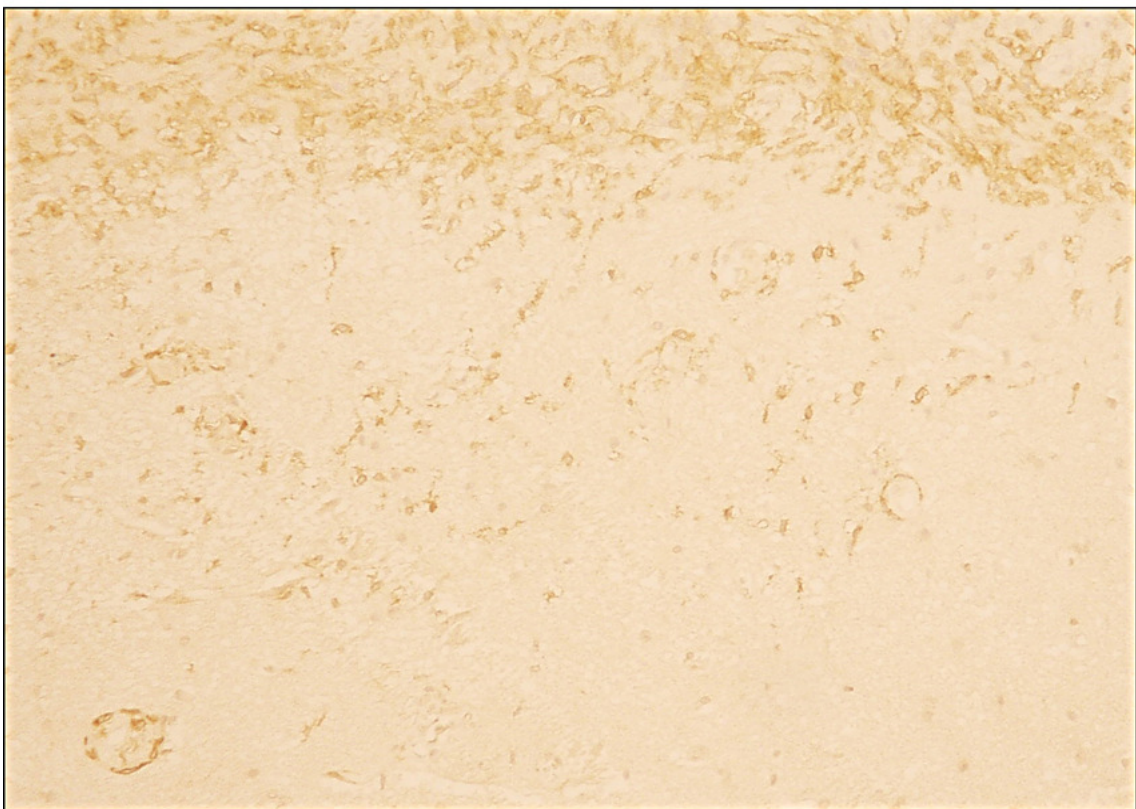
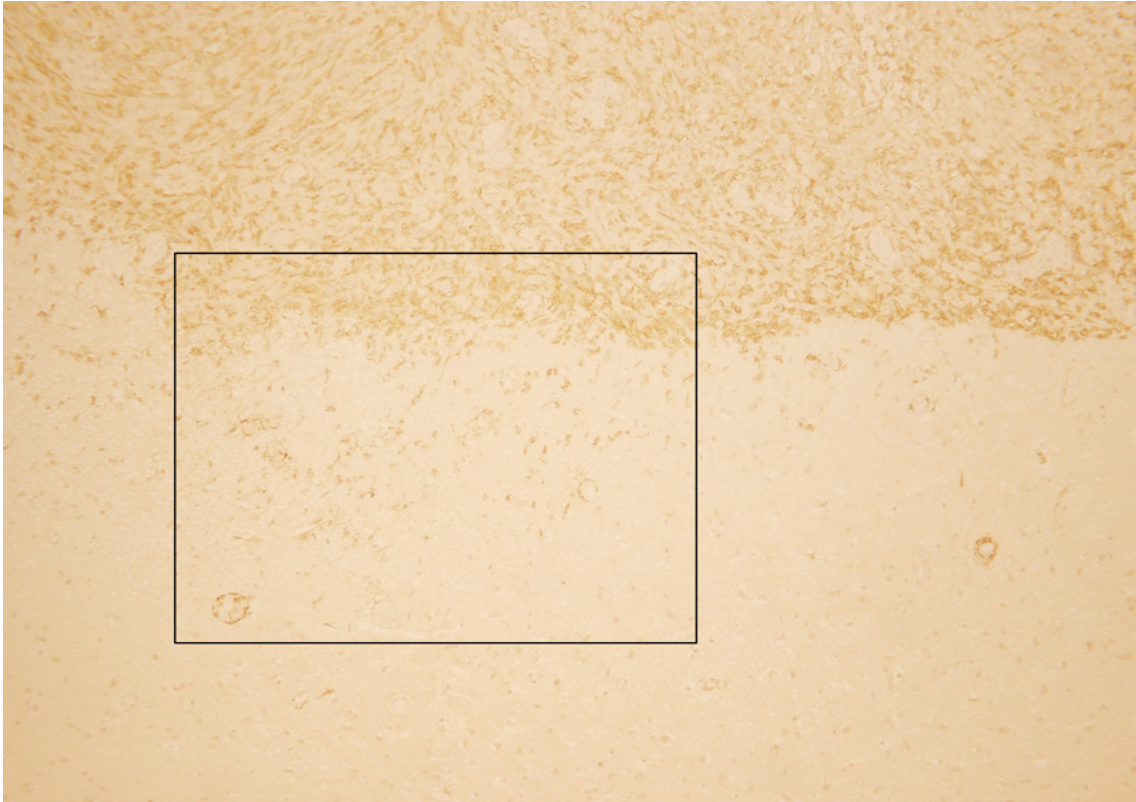


Abbildung 50: Diffuse Expression von CD14 auf mikroglialen Zellen im Hirngewebe eines WHO-Grad II Meningeoms. Die aktivierten Zellen liegen gehäuft in Gefäßnähe. Eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze mit aktivierter Mikroglia ist fokal vorhanden. Abbildung von Fall 26.

3.4.3 Meningeome WHO-Grad III

Aktivierete Mikroglia war in sechs der sieben Hirnanteile der WHO-Grad III Meningeome vorhanden (Abb. 51). Lediglich in einem Hirnanteil konnten keine aktivierten Zellen gefunden werden (Abb. 53). Das Verteilungsbild war, wie auch in den anderen WHO-Graden meist diffus, mit fokalen Herden in Gefäßnähe. Statistisch ergaben sich keine Unterschiede gegenüber den anderen WHO-Graden bezüglich aktivierter, diffus verteilter Mikroglia in den anliegenden Hirnanteilen.

Auch bei den WHO-Grad III Meningeomen ergaben Zellzählungen eine vermehrte Expression von CD14 auf Mikroglia bei Gefäßassoziation. So lagen im Mittel 130,8 von 200 gezählten Zellen, also 65% der aktivierten Zellen, um Gefäße (Standardabweichung 13,0).

Die Anzahl aktivierter Mikroglia im Hirnparenchym erschien bei den WHO-Grad III Meningeomen vermehrt im Vergleich zu den WHO-Graden I und II, da lediglich in einem Fall eine geringe Expression vorlag. Die anderen zeigten eine mäßige bis starke Existenz aktivierter Zellen im Gewebe. Statistisch ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Präparaten mit diffuser Mikroglia im Hirn zwischen den einzelnen WHO-Graden feststellen. Da jedoch die jeweilige Anzahl von aktivierten Zellen in den Biopsien nicht quantifiziert wurde, bleibt der Eindruck von vermehrter Mikroglia bestehen.

An der Hirn-Tumorgrenze konnte in fünf Biopsien eine erhöhte Anzahl aktivierter mikroglialer Zellen festgestellt werden (Abb. 52). Ein Meningeom zeigte über die ganze Grenzfront vermehrt Mikrogliazellen, die durchgehend, wie auch in der Schemazeichnung eine hirnseitige Akzentuierung schufen (Abb. 9; Abb. 54). Bei zwei Meningeomen waren in das Hirn ragende Tumorausläufer, oder im Hirn liegende Tumoreinseln von einer Schicht aktivierter Zellen umgeben. Zwei weitere Biopsien zeigten auf der Tumorseite eine flächige Vermehrung aktivierter mikroglialer Zellen, die, mit Unterbrechungen, für eine Betonung der Grenze sorgten (Abb. 55). Bei diesen beiden Tumoren zeigte sich auch auf der Hirnseite vermehrt Mikroglia an der Grenze, jedoch überwog die Akzentuierung auf der Tumorseite.

Auch bei den Färbungen mit Anti-CD14 Antikörpern konnte das verstärkte Auftreten aktivierter Zellen an der Hirn-Tumorgrenze von Meningeomen mit Malignitätsgrad III gegenüber Tumoren niedrigeren Grades als statistisch signifikant nachgewiesen werden ($p=0,0010$). Aktivierte Zellen traten vermehrt an der Hirn-Tumorgrenze von Meningeomen mit hohem Malignitätsgrad auf. In den Tumorgeweben selbst waren immer aktivierte Mikroglia zu finden, in drei Meningeomen vor allem an septierenden Gefäßen zwischen den Tumormassen, in vier war eine diffuse Verteilung innerhalb der Tumormasse zu sehen.

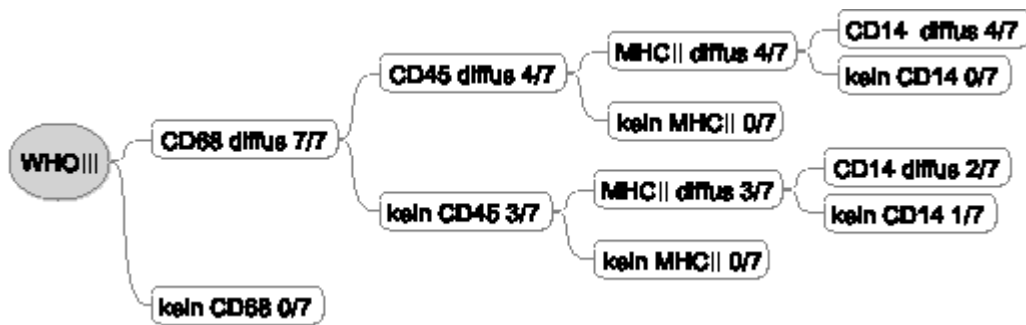


Abbildung 51: Darstellung der Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14. Alle Meningeome mit WHO-Grad III, die eine Expression von CD45 und MHCII auf mikroglialen Zellen zeigten, zeigten auch eine Expression von CD14 auf Mikroglia. Von den drei Tumoren, die keine Expression von CD45 aufwiesen, jedoch eine Expression von MHCII, zeigten zwei auch eine Expression von CD14 auf mikroglialen Zellen. Bei einem Meningeom konnte keine CD14-positive Mikroglia im Hirnparenchym dargestellt werden.

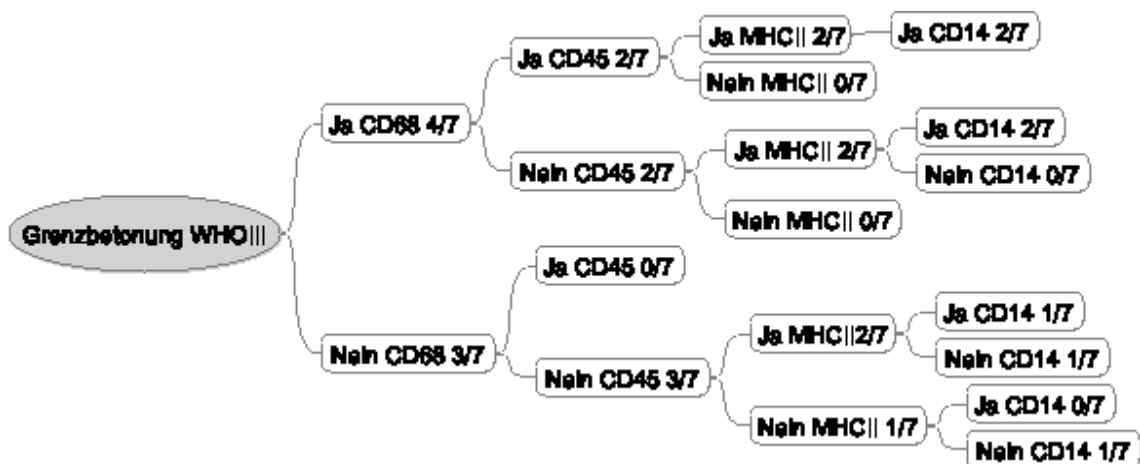


Abbildung 52: Darstellung der Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 in der Grenzregion invasiver Meningeome WHO-Grad III. Fünf von sieben untersuchten Meningeomen zeigen eine vermehrte Expression von CD14 auf aktivierter Mikroglia, wobei diese Grenzen auch durch MHCII-exprimierende Mikroglia akzentuiert waren. Zwei dieser Grenzen zeigten auch eine vermehrte Expression von CD45 und vier Grenzen von CD68 auf Mikroglia in dieser Region.

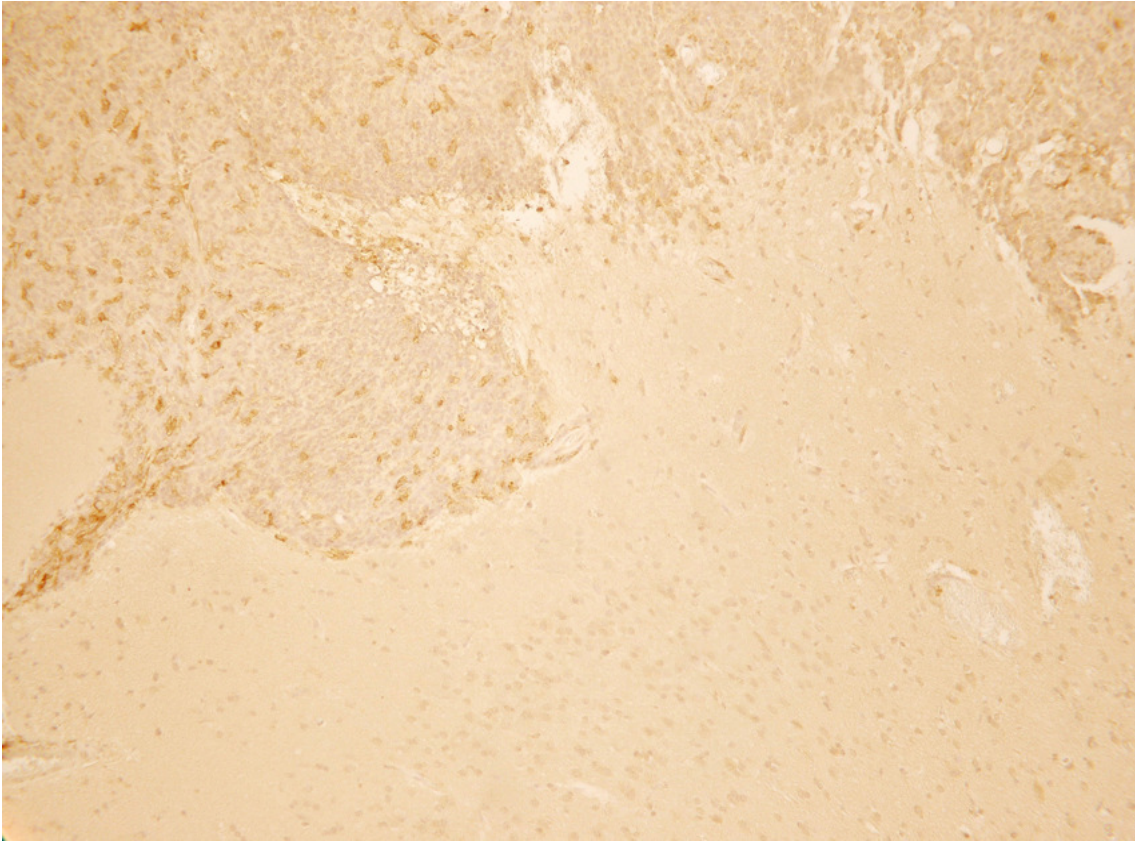


Abbildung 53: Fehlende Expression von CD14 auf mikroglialen Zellen im umgebenden Hirnparenchym eines WHO-Grad III Meningeoms. Abbildung von Fall 35.

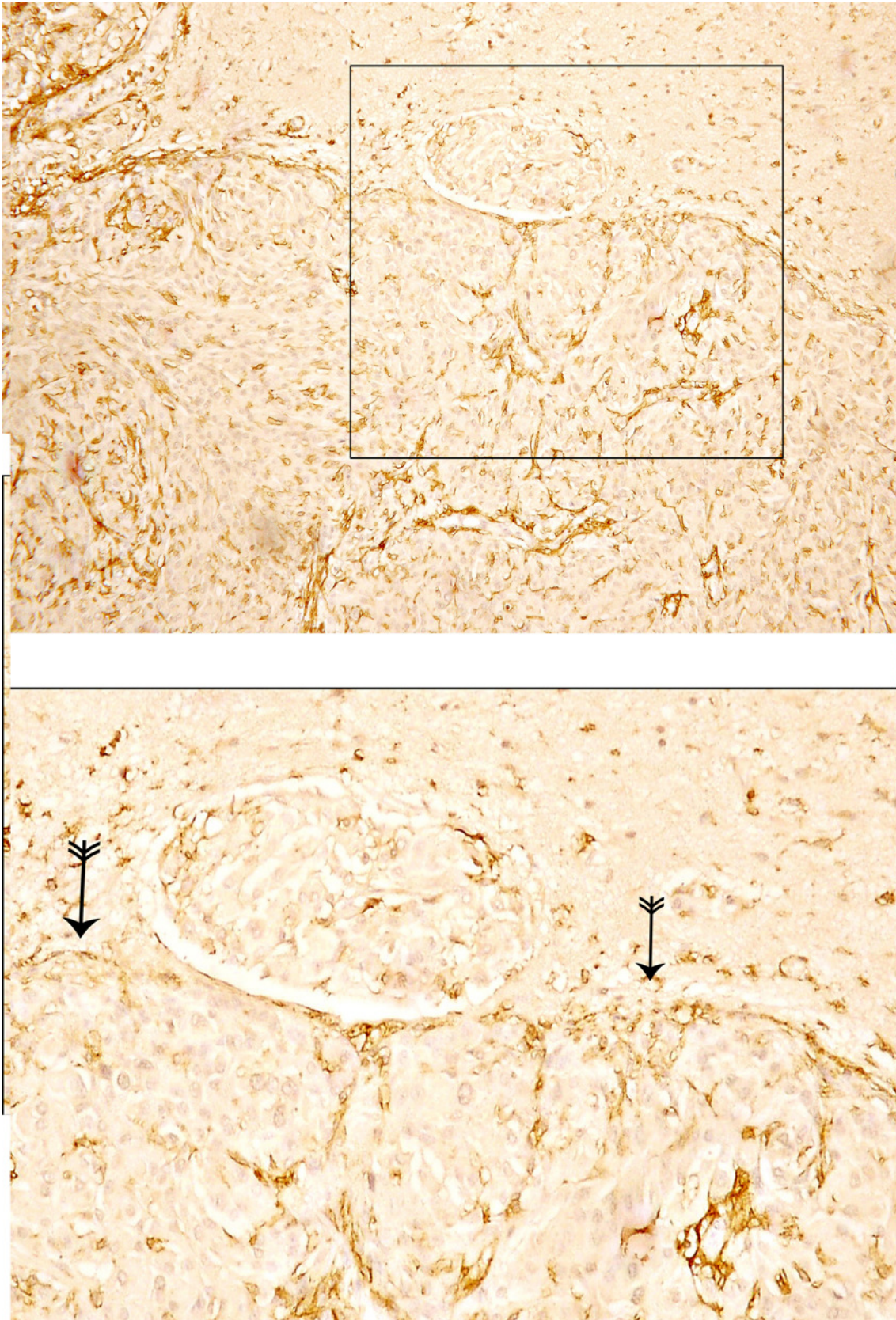


Abbildung 54: Diffuse Verteilung CD14-positiver, aktivierter Mikroglia im Hirngewebe eines WHO-Grad III Meningeoms. Die Zellen zeigen eine starke Expression des Markers. Die Hirn-Tumorgrenze ist durchgehend akzentuiert. Hier ist Fall 33 abgebildet.

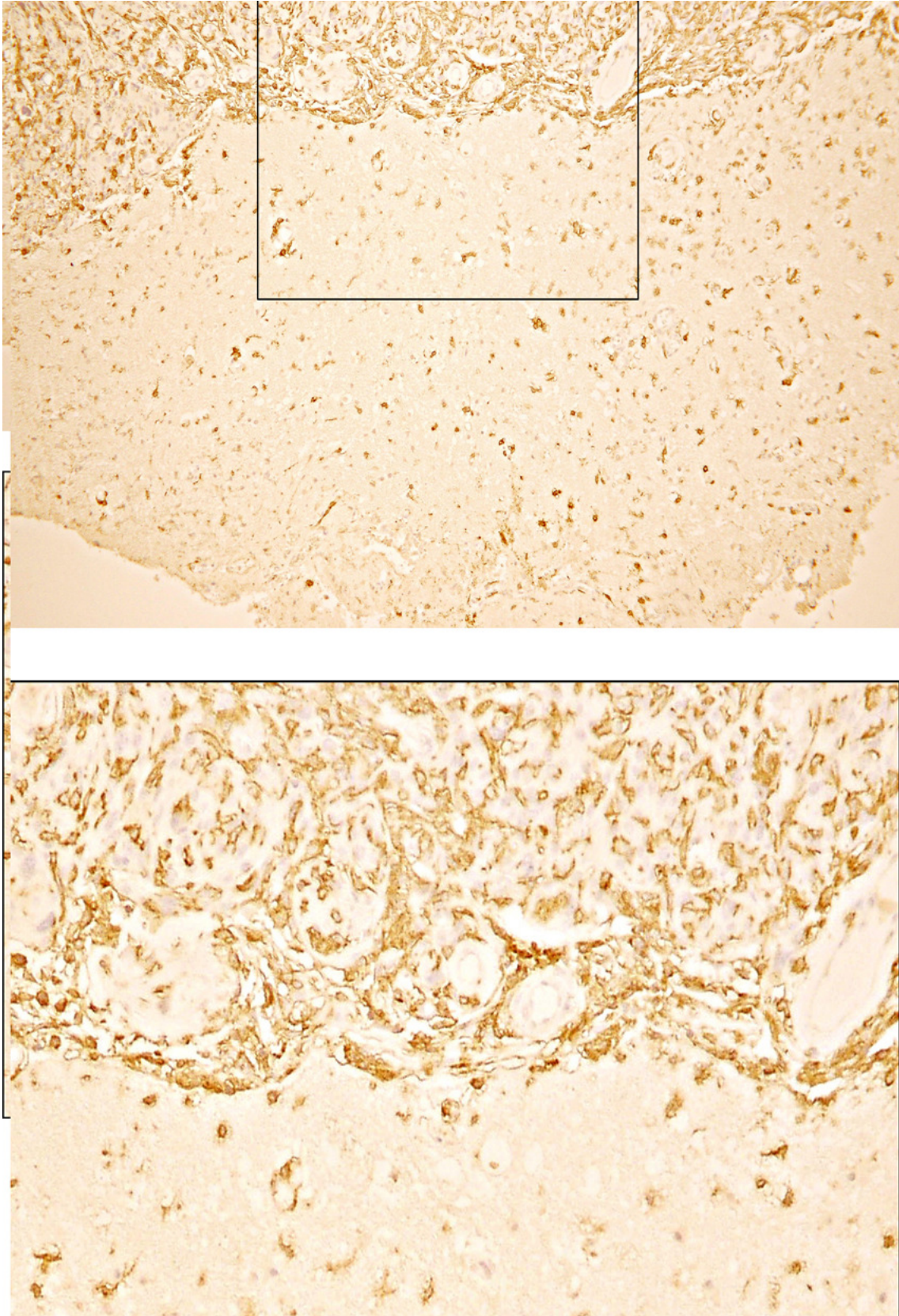


Abbildung 55: Expression von CD14 auf Mikroglia im Hirngewebe eines WHO-Grad III Meningeoms. Das Parenchym zeigt eine diffuse Verteilung aktivierter Zellen, die Hirn-Tumorgrenze ist fokal akzentuiert. Abbildung von Fall 32.

3.5 Expression von MRP8

Macrophage inhibiting factor related protein 8 ist ein Calcium abhängiges Protein, das auf Mikroglia vor allem bei entzündlichen Veränderungen, Ischämien oder anderen pathologischen Prozessen im Gewebe exprimiert wird und somit als Marker aktivierter Mikroglia gilt (Schluesener et al 1998). In den hier untersuchten Geweben exprimierten den Marker mikrogliale Zellen im Gewebe, aber auch Monozyten in Blutgefäßen oder Einblutungen, was als interne Kontrolle diente. Die Expressionshäufigkeit von MRP8 auf Mikroglia im Gewebe der Meningeome oder im invadierten Hirn war jedoch sehr gering. Es gab keine MRP8 Expression auf mikroglialen Zellen im Hirngewebe der untersuchten Kontrollgruppe. Nur in Gefäßen des Hirnparenchyms war eine Expression auf Zellen der myelomonozytären Zellreihe vorhanden, was einem Normalbefund entspricht und auch hier der internen Kontrolle diente.

3.5.1 Meningeome WHO-Grad I

In angrenzenden Hirnbereichen an die WHO-Grad I Meningeome konnte nur in einem Fall MRP8-positive, aktivierte Mikroglia frei im Gewebe liegend gefunden werden (Abb. 56). Dabei lagen die ramifizierten Zellen stark vereinzelt im Hirnparenchym. Die Anzahl dieser Zellen war jedoch nur sehr gering. In den restlichen Biopsien war keine MRP8-exprimierende Mikroglia im Gewebe nachweisbar, die internen Kontrollen durch Monozyten in Blutgefäßen zeigten jedoch eine erfolgreiche Farbreaktion (Abb. 58).

An der Hirn-Tumorgrenze, die hier ja besonders im Fokus stehen sollte, fand sich keine Reaktion (Abb. 57). Im Tumorgewebe der Meningeome fand sich in einem Fall eine diffuse Verteilung aktivierter Mikroglia, die sich über die ganze Tumorfläche ausbreitete. In einer weiteren Biopsie konnten einzelne Herde aktivierter Zellen gefunden werden. In den restlichen 16 Biopsien stellte sich keine Nachweisbarkeit von aktivierter, MRP8-positiver Mikroglia ein.

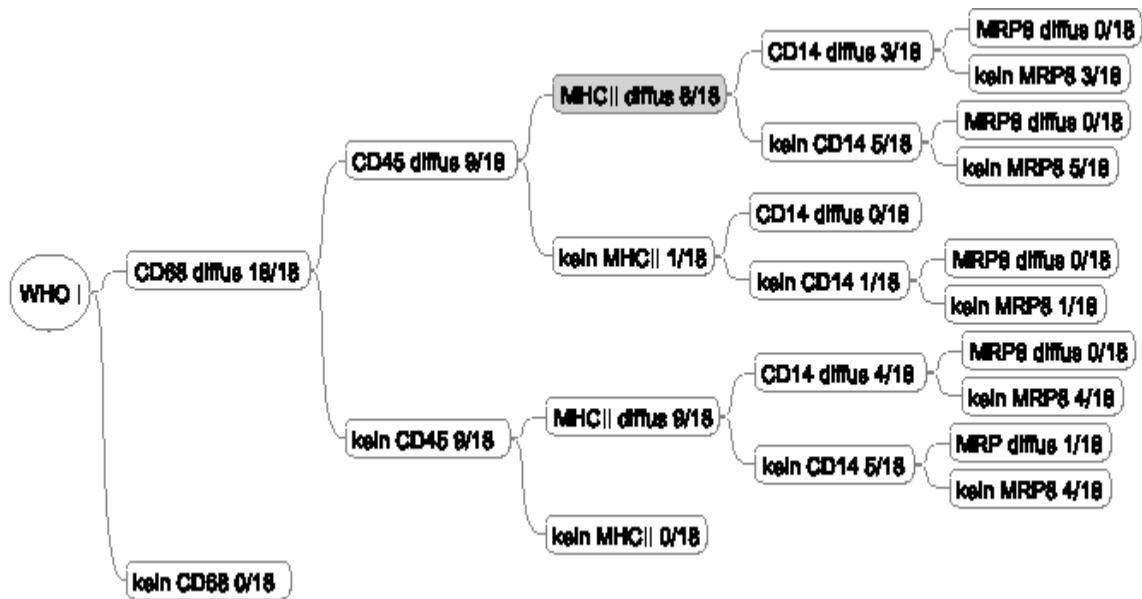


Abbildung 56: Expression von CD68, CD45, MHCII, CD14 und MRP8 bei WHO-Grad I. Lediglich ein Meningeom mit diffuser Expression von MHCII und CD14 zeigte auch eine diffuse Expression von MRP8 auf mikroglialen Zellen im Hirnparenchym. Alle anderen Biopsien zeigten unabhängig von der Expression der anderen Marker keine Expression von MRP8.

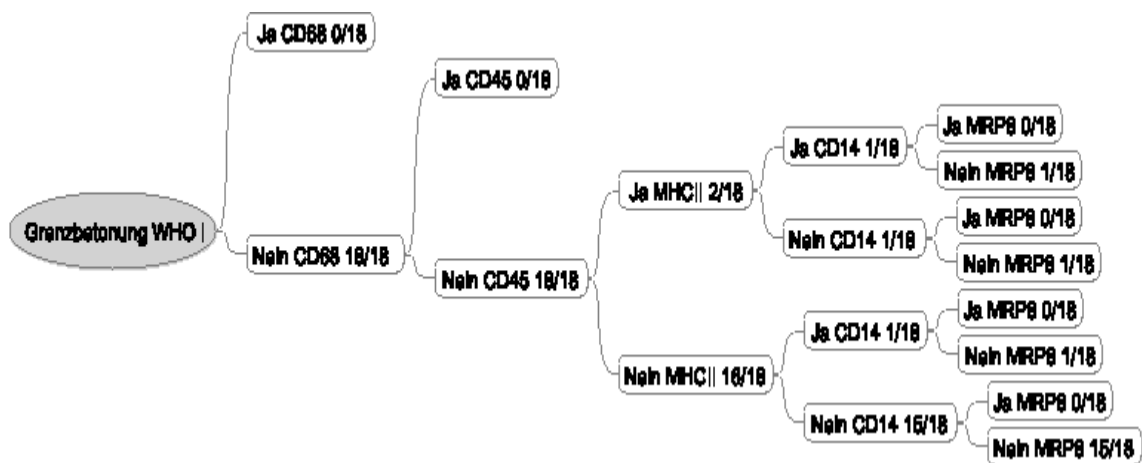


Abbildung 57: Darstellung der Expression von CD68, CD45, MHCII, CD14 und MRP8 in der Grenzregion invasiver Meningeome WHO-Grad I. Es konnte keine vermehrte Expression von MRP8 in der Grenzregion auf Mikroglia gefunden werden.

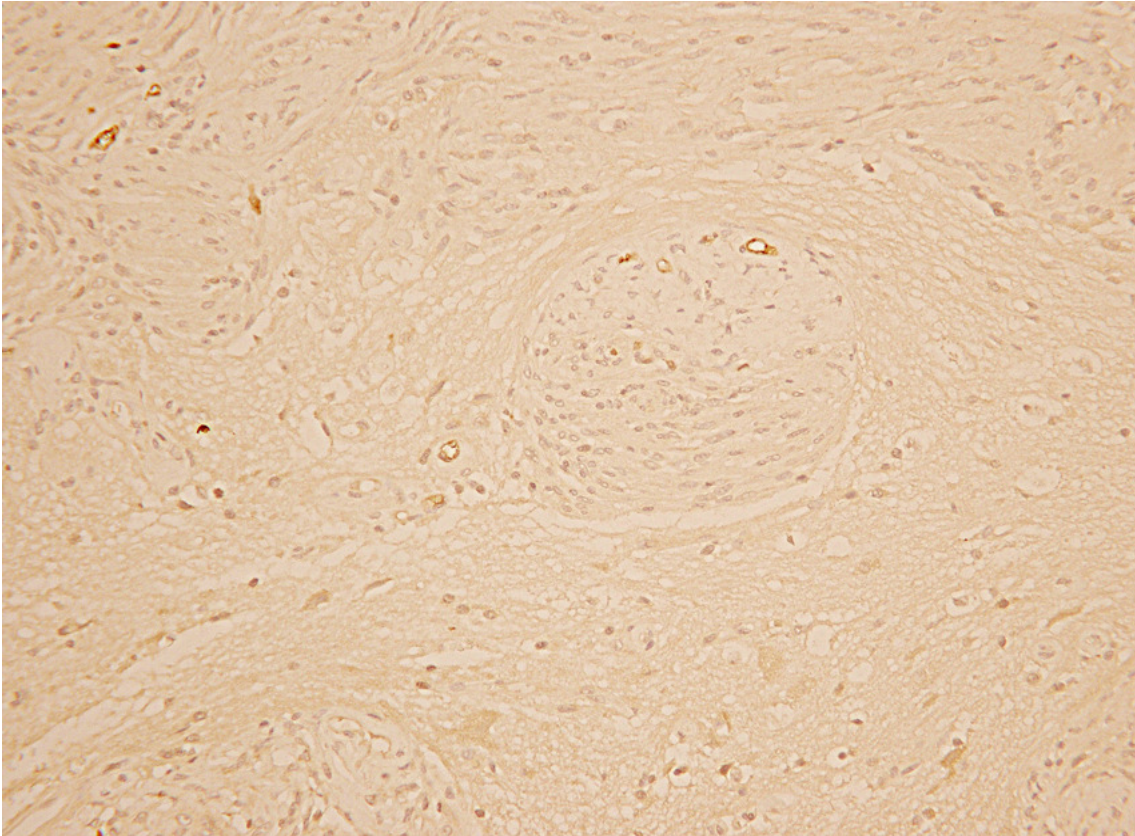


Abbildung 58: Fehlende Expression von MRP8 auf Mikroglia im Hirnparenchym eines WHO-Grad I Meningeoms. Die Expression an Gefäßen gilt als schnittinterne Kontrolle. Abbildung von Fall 5.

3.5.2 Meningeome WHO-Grad II

Auch bei den Grad II Meningeomen war in einem Fall frei im Hirngewebe liegende Mikroglia nachweisbar, die MRP8 auf ihrer Oberfläche exprimierte (Abb. 59; Abb. 61). Dabei zeigten sich fokale Stellen mit einer erhöhten mikroglialen Zelldichte, die herdartig, frei im Gewebe lagen (Abb. 62). Eine diffuse Verteilung über das ganze ZNS-Gewebe lag, im Gegensatz zur Schemadarstellung nicht vor (Abb. 9).

An der Grenzfläche zwischen Hirn und Tumor war keine erhöhte mikrogliale Zelldichte oder Reaktion nachweisbar (Abb. 60). In vier der 13 Meningeome selbst, waren aktivierte Zellen mit MRP8 Expression vorhanden. Ein Tumor wies vereinzelt Herde mit vermehrter Zelldichte aktivierter Mikroglia auf. Bei drei Meningeomen war eine diffuse Verteilung der Zellen über die ganze Tumorfläche zu sehen.

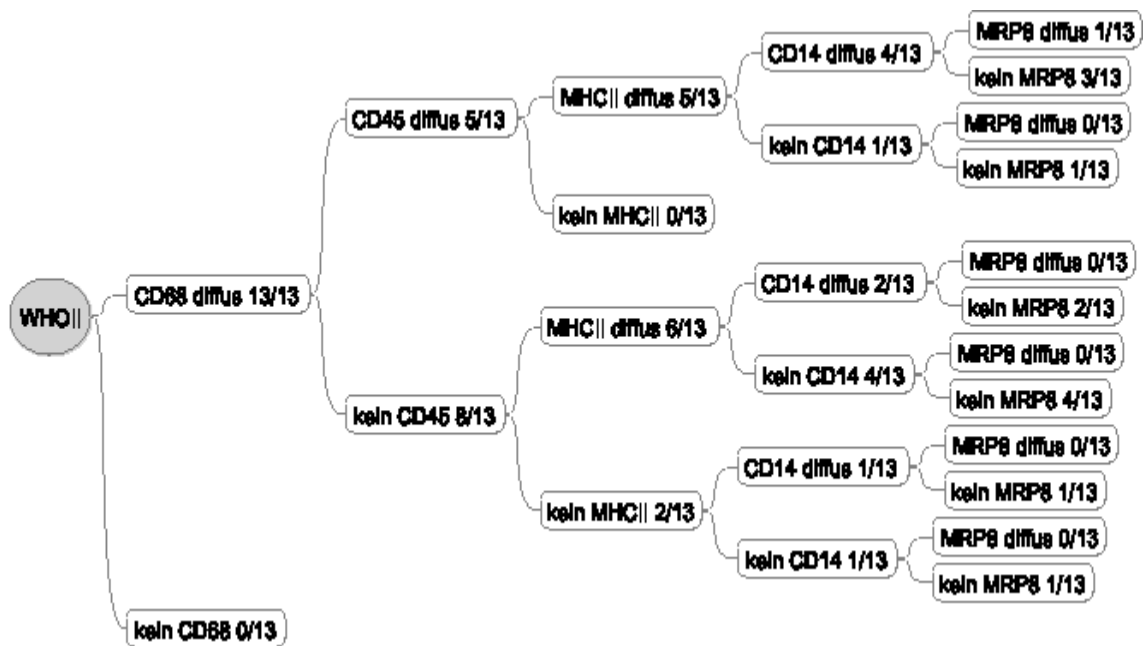


Abbildung 59: Expression von CD68, CD45, MHCII, CD14 und MRP8 bei WHO-Grad II. Nur ein Meningeom mit einer diffusen Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 wies auch eine Expression von MRP8 auf mikroglialen Zellen im Hirngewebe auf. Alle anderen untersuchten Biopsien zeigten unabhängig von der Expression der anderen Marker keine Expression von MRP8 auf Mikroglia.

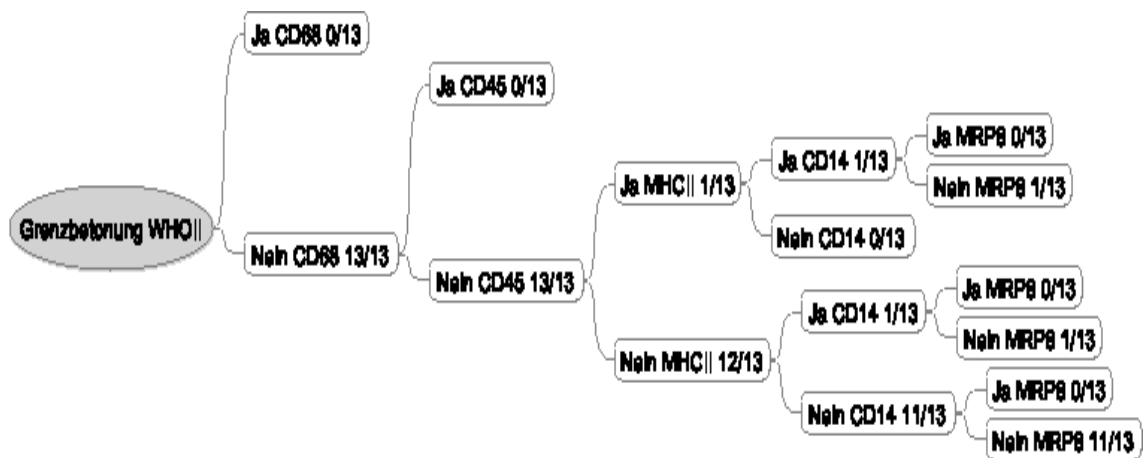


Abbildung 60: Darstellung der Expression von CD68, CD45, MHCII, CD14 und MRP8 auf mikroglialen Zellen an der Hirn-Tumorgrenze invasiver Meningeome WHO-Grad II. Es zeigte sich keine vermehrte Expression von MRP8 auf aktivierten Zellen in dieser Region.

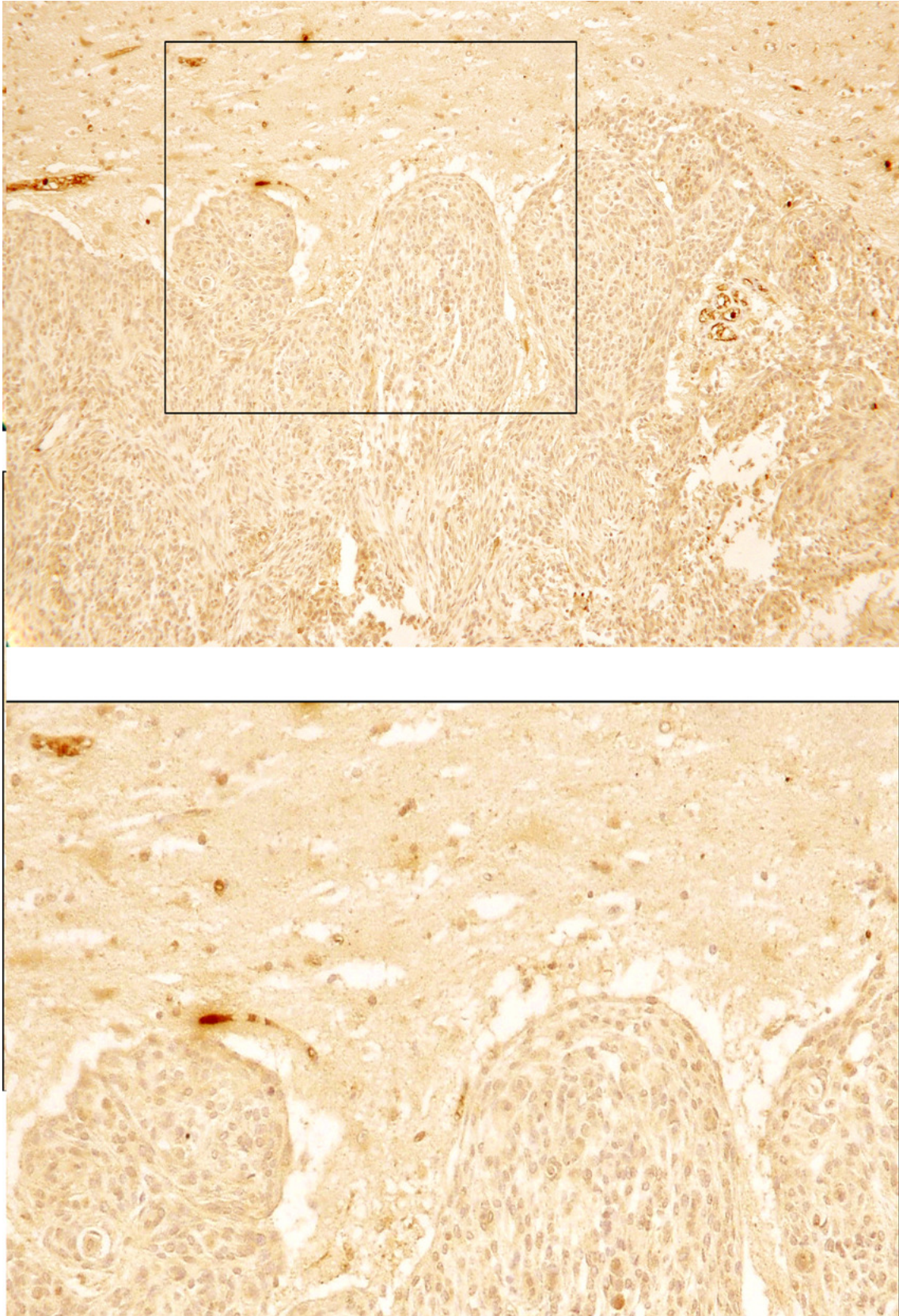


Abbildung 61: Keine Expression von MRP8 auf mikroglialen Zellen im umgebenden Hirngewebe eines WHO-Grad II Meningeoms. Die interne Kontrolle in den Gefäßen zeigt eine positive Farbreaktion. Abbildung von Fall 21.

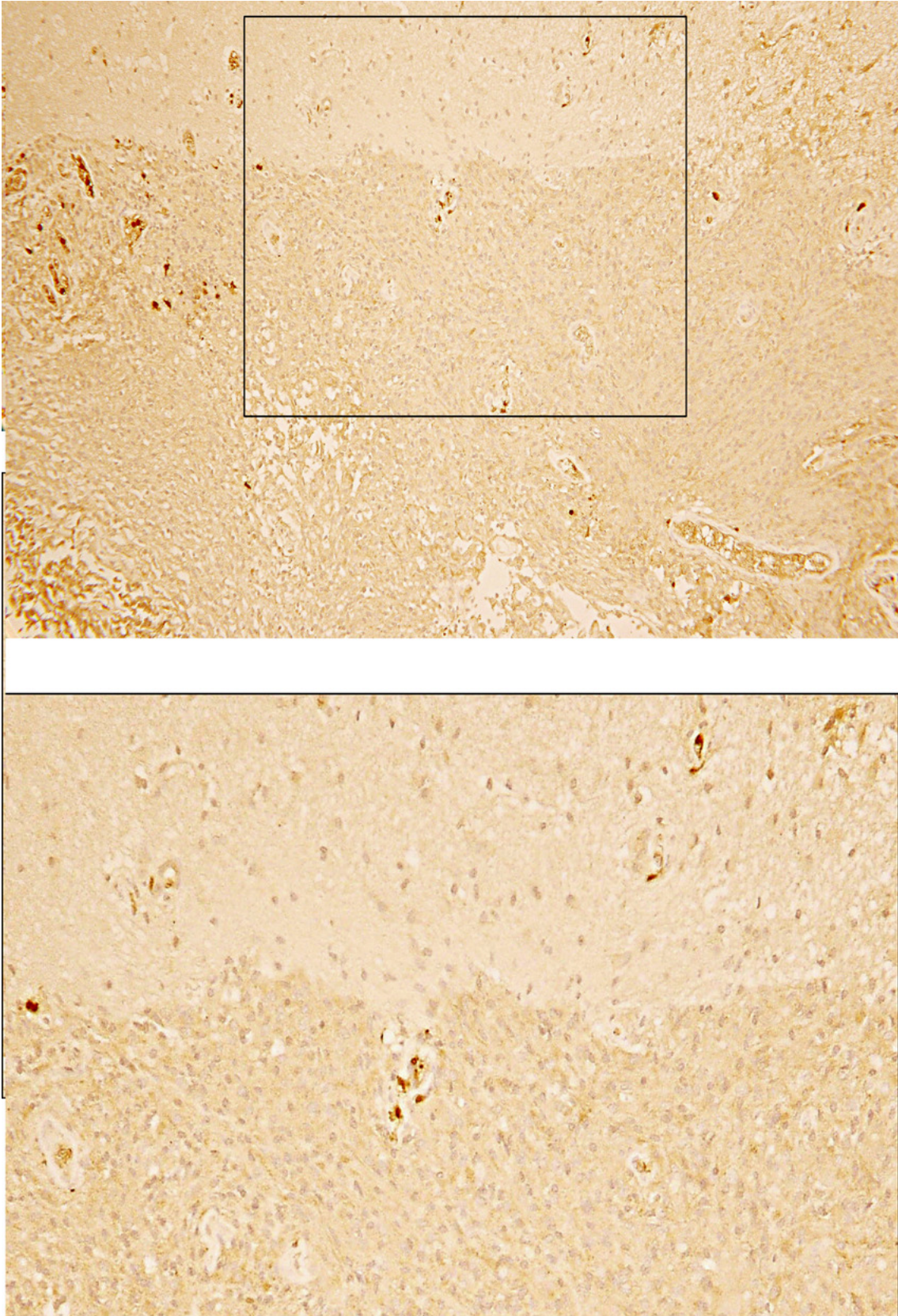


Abbildung 62: Stark vereinzelte Expression von MRP8 auf mikroglialen Zellen im Hirngewebe eines WHO-Grad II Meningeoms. Dargestellt ist Fall 26.

3.5.3 Meningeome WHO-Grad III

Von sieben WHO-Grad III Meningeomen konnte in den invadierten Hirnanteilen von vier Tumoren MRP8-positive Mikroglia nachgewiesen werden (Abb. 63). Aktivierte Zellen lagen im Hirngewebe flächig verstreut, wobei die Zelldichte in verschiedenen Hirnregionen und innerhalb der einzelnen Hirnbiopsien unterschiedlich war. Zwei Meningeome wiesen nur eine geringe Zahl aktivierter Zellen im Hirnparenchym auf, zwei weitere zeigten eine höhere mikrogliale Zelldichte (Abb. 65). Die Meningeome mit WHO-Grad III wiesen bei unseren Untersuchungen der Expression von MRP8 auf diffuser Mikroglia eine signifikant höhere Zahl auf als Grad I und II Tumore ($p=0,0009$).

Ein vermehrtes mikrogliales Auftreten an der Hirn-Tumorgrenze, die bei unserer Untersuchung von besonderem Interesse war, konnte in drei Fällen beobachtet werden (Abb. 64). Hierbei war bei einer Biopsie, im Gegensatz zur Schemazeichnung, eine Akzentuierung nur auf der Hirnseite der Grenze zu sehen, die durch eine flächige Erhöhung der mikroglialen Zelldichte zu Stande kam (Abb. 9; Abb. 66). Diese erstreckte sich, nicht wie in der Schemadarstellung, über die ganze Grenzfront, sondern brach nach einer herdartigen Ansammlung von Zellen ab. In einem zweiten Fall war die Grenze stellenweise fokal sowohl auf Hirn-, als auch Tumorseite mit Mikroglia vermehrt flächig besetzt. Ein drittes Meningeom wies auf der Tumorseite der Grenze an zwei Stellen eine Akzentuierung durch ein erhöhtes Aufkommen mikroglialer Zellen auf. So war auch bei den Untersuchungen mit MRP8 eine signifikante Vermehrung der Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze gegenüber den WHO-Graden I und II zu verzeichnen ($p=0,0022$).

Sechs der sieben Meningeome zeigten in ihren Tumoranteilen aktivierte Mikroglia, wobei in einem Fall lediglich die Grenze durch mikrogliale Zellen betont war. Ein weiterer Tumor wies einzelne Herde mit aktivierten Zellen in seiner Tumormasse auf, vier Tumore zeigten ein diffuses Verteilungsmuster mikroglialer Zellen über das ganze Tumorgewebe.

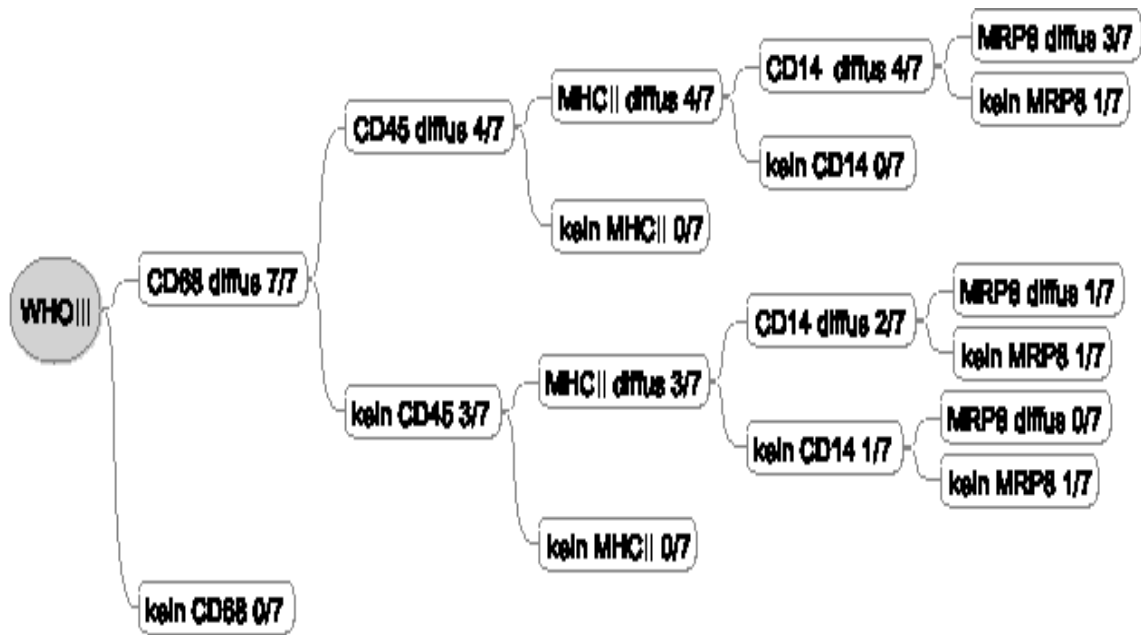


Abbildung 63: Expression von CD68, CD45, MHCII, CD14 und MRP8 bei Meningeomen mit WHO-Grad III. Drei Meningeome, die auch eine diffuse Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 aufwiesen, zeigten auch eine diffuse Expression von MRP8 auf Mikroglia im Hirngewebe. Ein weiterer Tumor, der keine CD45-positive Mikroglia, jedoch MHCII- und CD14-positive Zellen aufwies, zeigte auch eine diffuse Expression von MRP8 auf mikroglialen Zellen im Hirnparenchym. Die anderen Biopsien zeigten keine Expression von MRP8 auf Mikroglia.

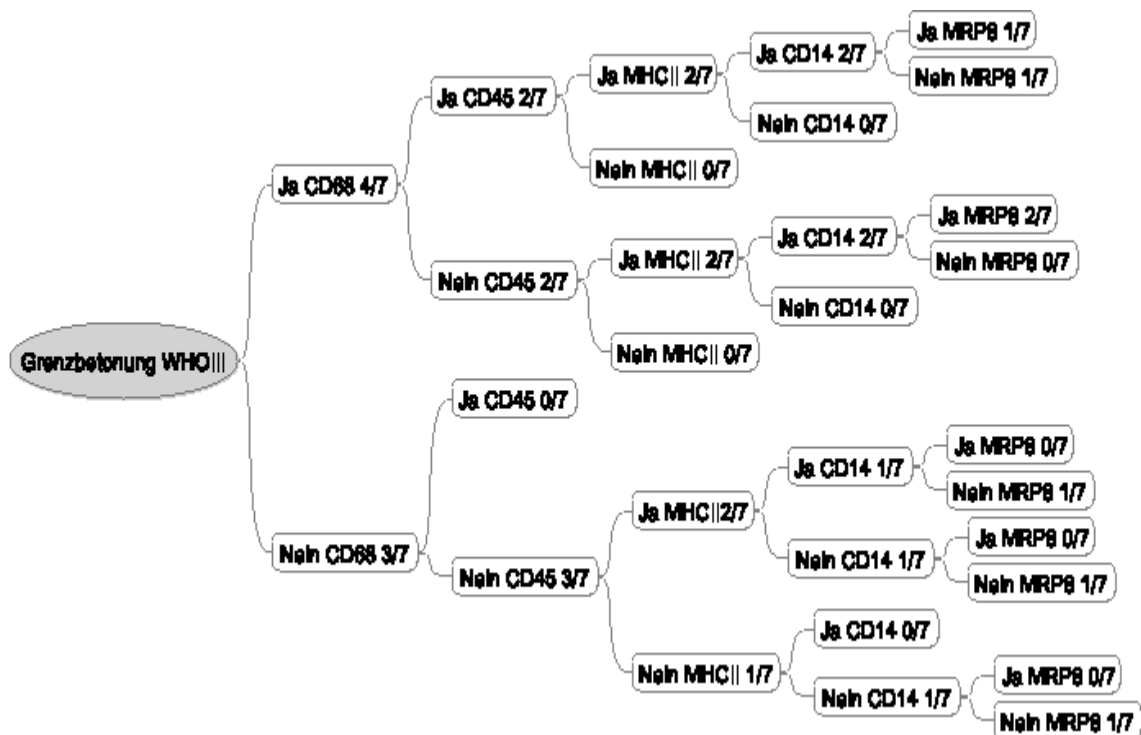


Abbildung 64: Darstellung der Expression von CD68, CD45, MHCII, CD14 und MRP8 an der Hirn-Tumorgrenze invasiver Meningeome WHO-Grad III. Bei drei der untersuchten Meningeome konnte eine vermehrte Expression von MRP8 an der Grenze auf aktivierter Mikroglia festgestellt werden. Eine dieser Grenzen hatte dabei auch eine Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 gezeigt. Bei den beiden anderen Präparaten konnte keine Betonung der Grenze durch CD45, jedoch durch CD68, MHCII und CD14 nachgewiesen werden.

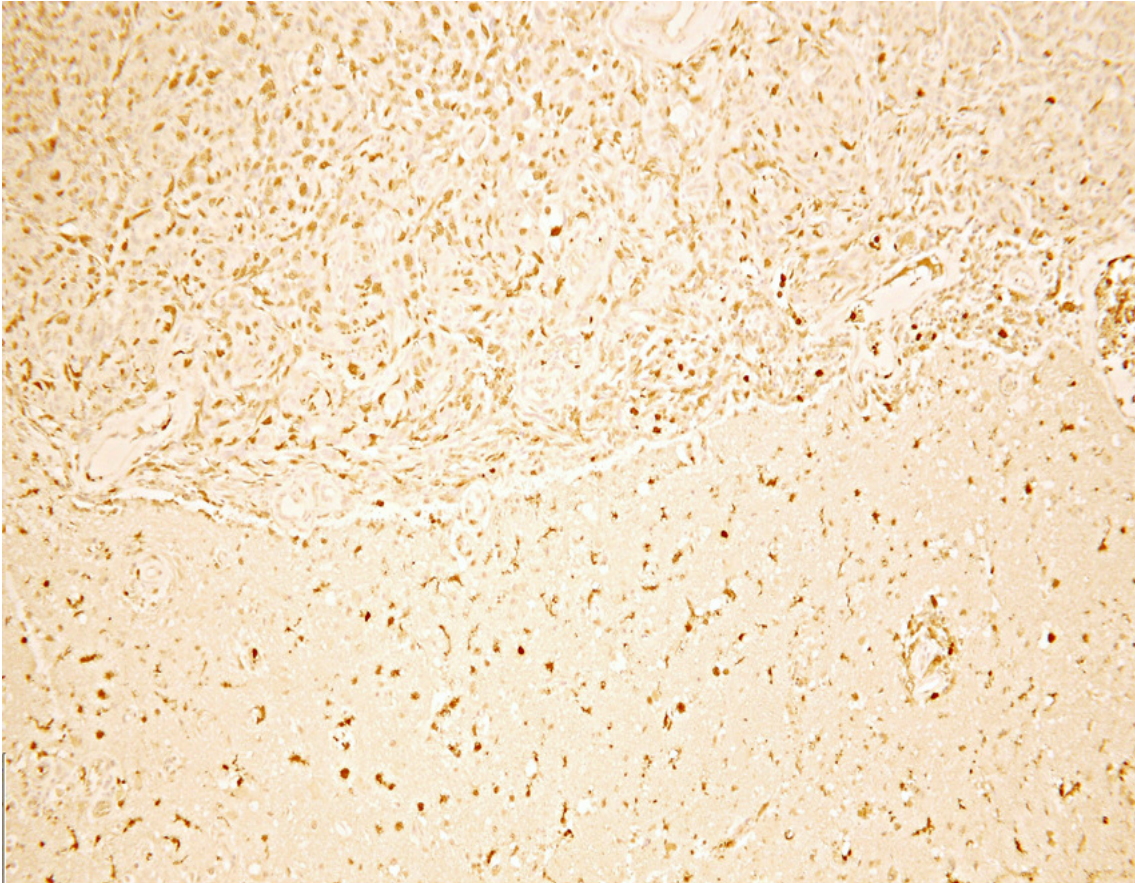


Abbildung 65: Starke Expression von MRP8 auf frei im Hirngewebe liegender Mikroglia bei einem WHO-Grad III Meningeom. Die Hirn-Tumorgrenze ist nicht betont. Abgebildet ist hier Fall 32.

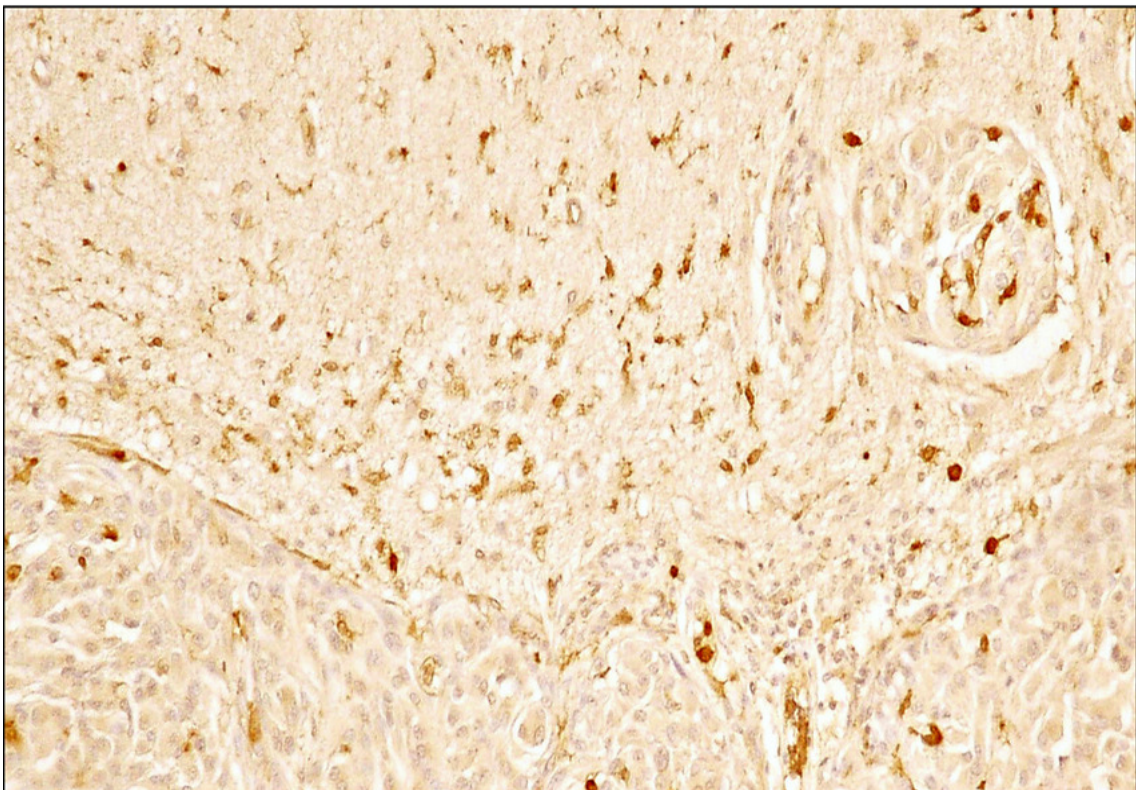
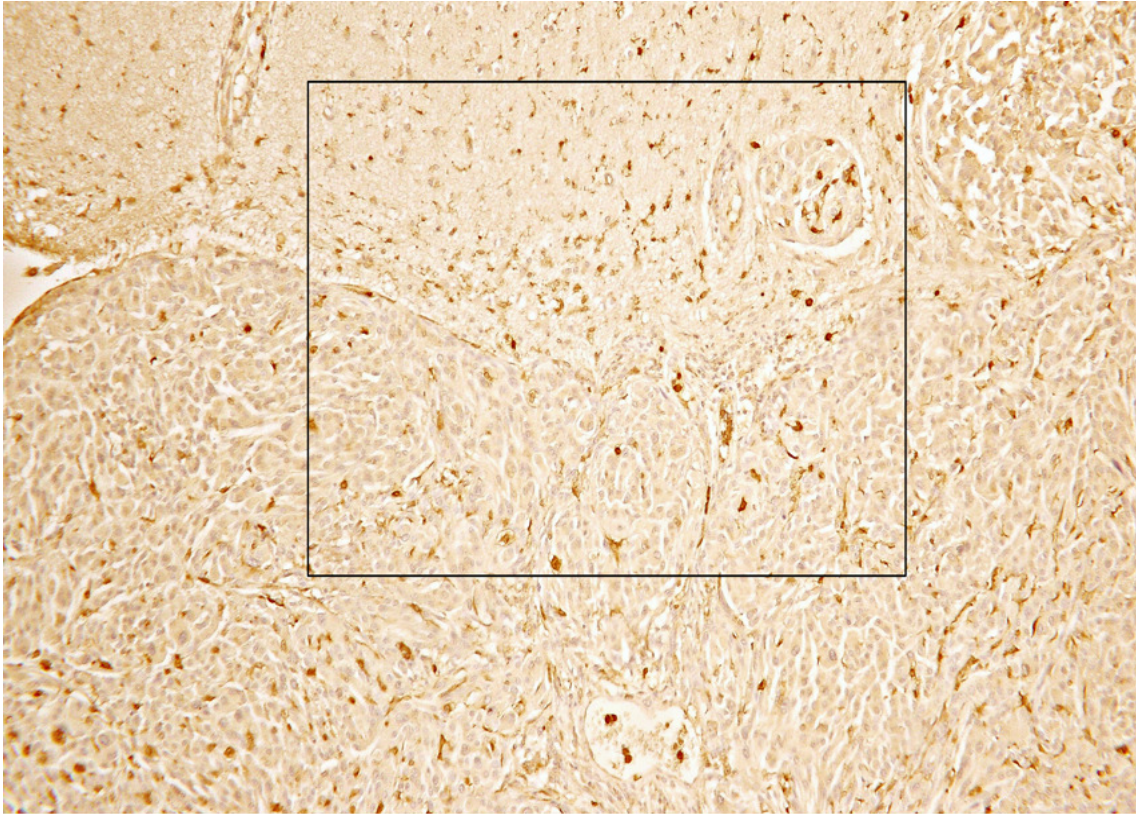


Abbildung 66: Expression von MRP8 auf aktivierter Mikroglia im Hirngewebe eines WHO-Grad III Meningeoms. Die Zellen zeigen eine diffuse Verteilung im Gewebe, die Hirn-Tumorgrenze ist durch ein vermehrtes Auftreten aktivierter Zellen im Hirnparenchym leicht akzentuiert. Aufnahme von Fall 33.

3.6 Vergleich des Vorkommens von Mikroglia mit dem Vorhandensein von Basalmembran an der Hirn-Tumorgrenze

Die Schnitte mit Färbungen gegen CD68, MHCII und CD14 wurden mit Färbungen gegen Kollagen IV verglichen, um eine Korrelation des Vorkommens von Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze mit dem Vorhandensein von Basalmembran an der selben Stelle zu ermöglichen. Dabei stellte sich eine inverse Korrelation von positiver Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze mit dem Vorhandensein von Kollagen IV heraus. Mikrogliazellen waren also häufiger anzutreffen, wenn keine Basalmembran mehr an der Hirn-Tumorgrenze vorhanden war. Dabei ergab sich für CD68-positive Mikroglia eine signifikante Korrelation mit dem Fehlen von Basalmembran ($p < 0,01$). Das Ergebnis für MHCII-positive Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze korrelierte hoch signifikant mit dem Fehlen von Basalmembran ($p < 0,001$) (Abb. 67; Abb. 69; Abb. 70; Abb. 72), ebenso die Untersuchung für CD14-positive Mikroglia ($p < 0,001$) (Abb. 67, Abb. 68; Abb. 70; Abb. 71) .

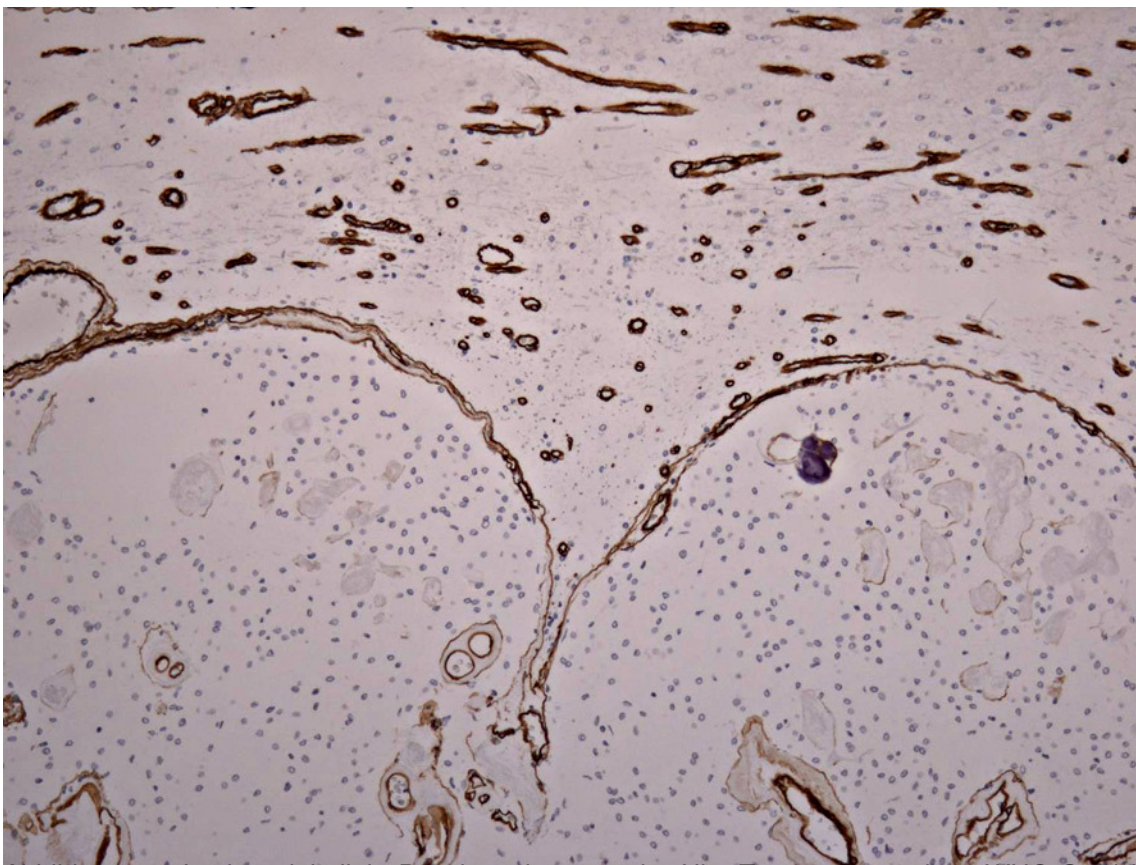


Abbildung 67: Intakte pial-gliale Basalmembran an der Hirn-Tumorgrenze eines WHO-Grad I Meningeoms, hier dargestellt durch Färbung gegen Kollagen IV. Abbildung von Fall 9.

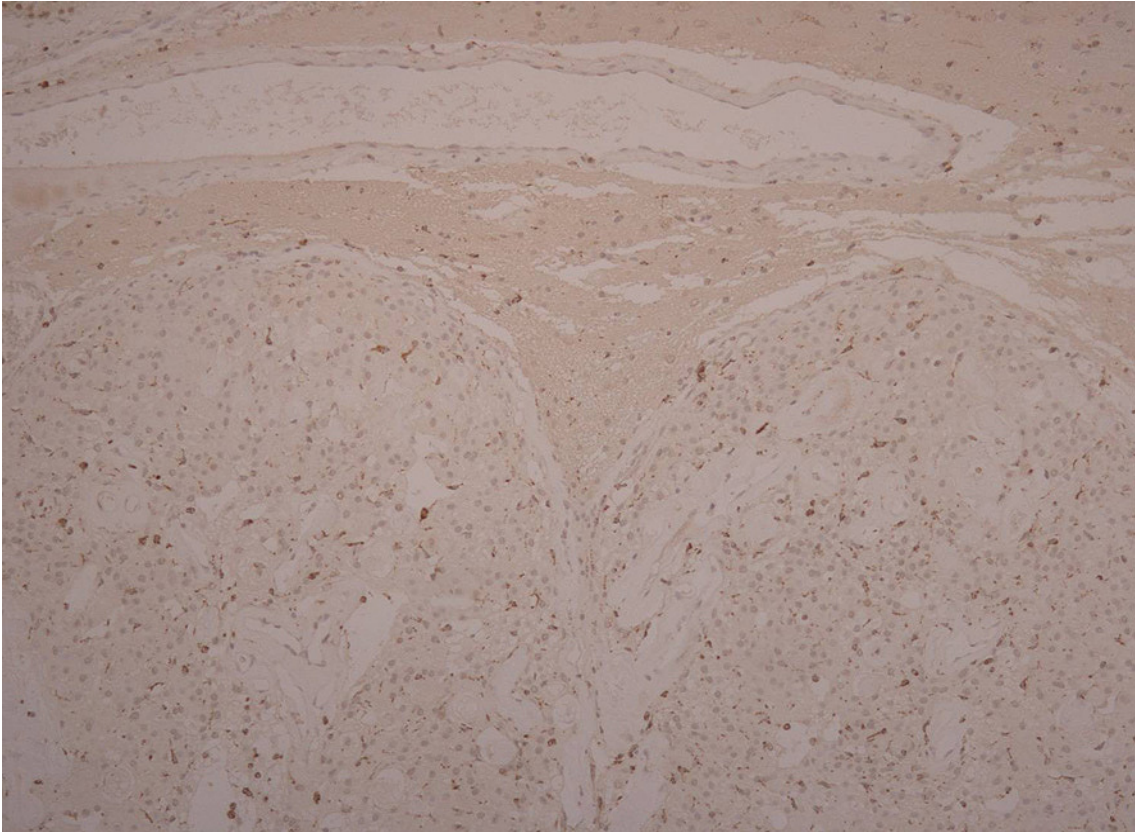


Abbildung 68: Fehlende Expression von CD14 auf Mikrogliazellen an der Hirn-Tumorgrenze eines WHO-Grad I Meningeoms. Die Basalmembran ist intakt. Abbildung von Fall 9.

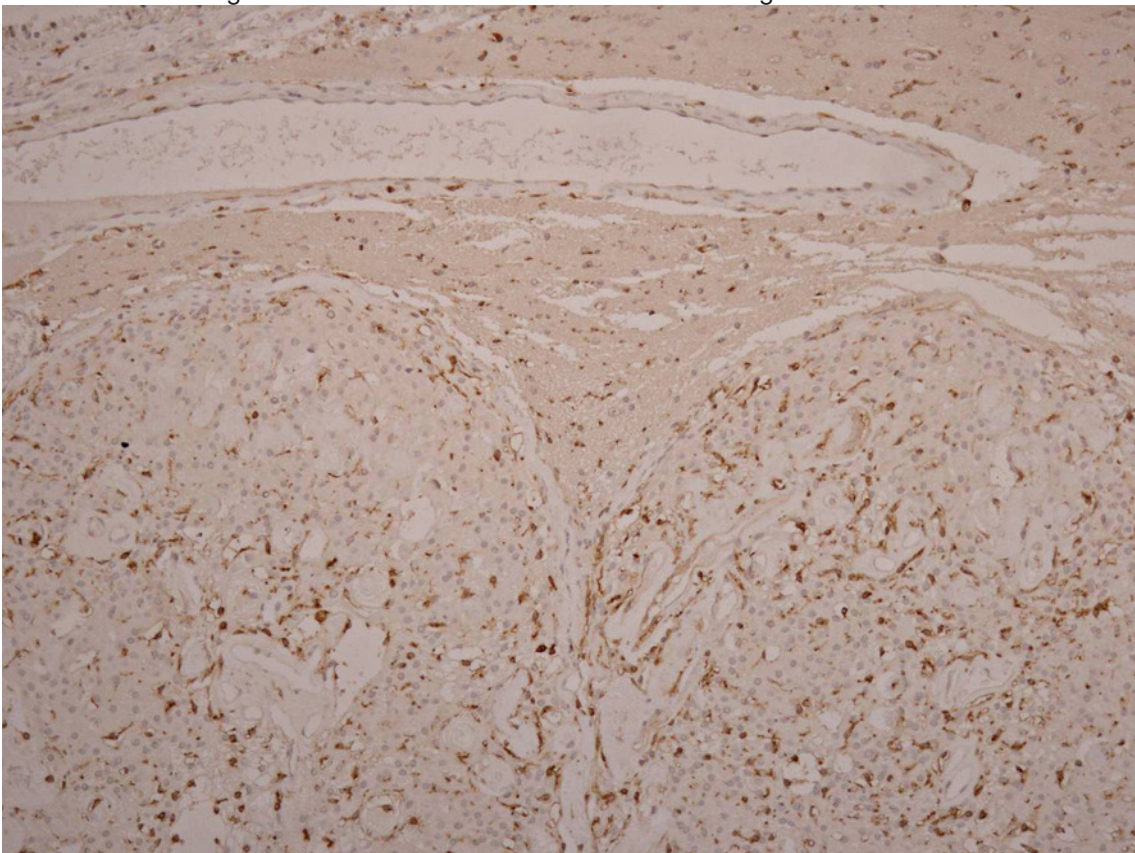


Abbildung 69: Darstellung der Hirn-Tumorgrenze eines WHO-Grad I Meningeoms. Es ist keine MHCII-positive Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze vorhanden. Abbildung von Fall 9

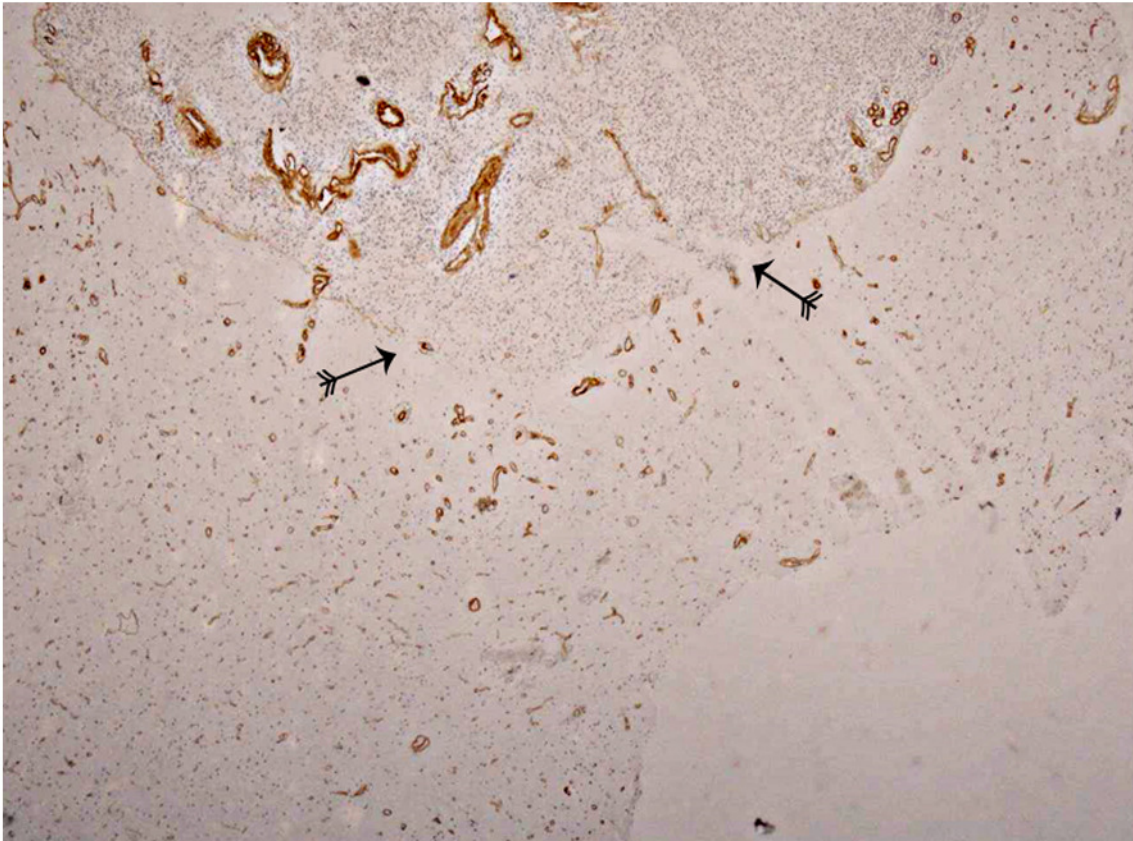


Abbildung 70: Darstellung der Hirn-Tumorgrenze eines Meningeoms WHO-Grad III. Die Basalmembran ist unterbrochen (Pfeile). Färbung mit Anti-Kollagen IV, Abbildung von Fall 36.

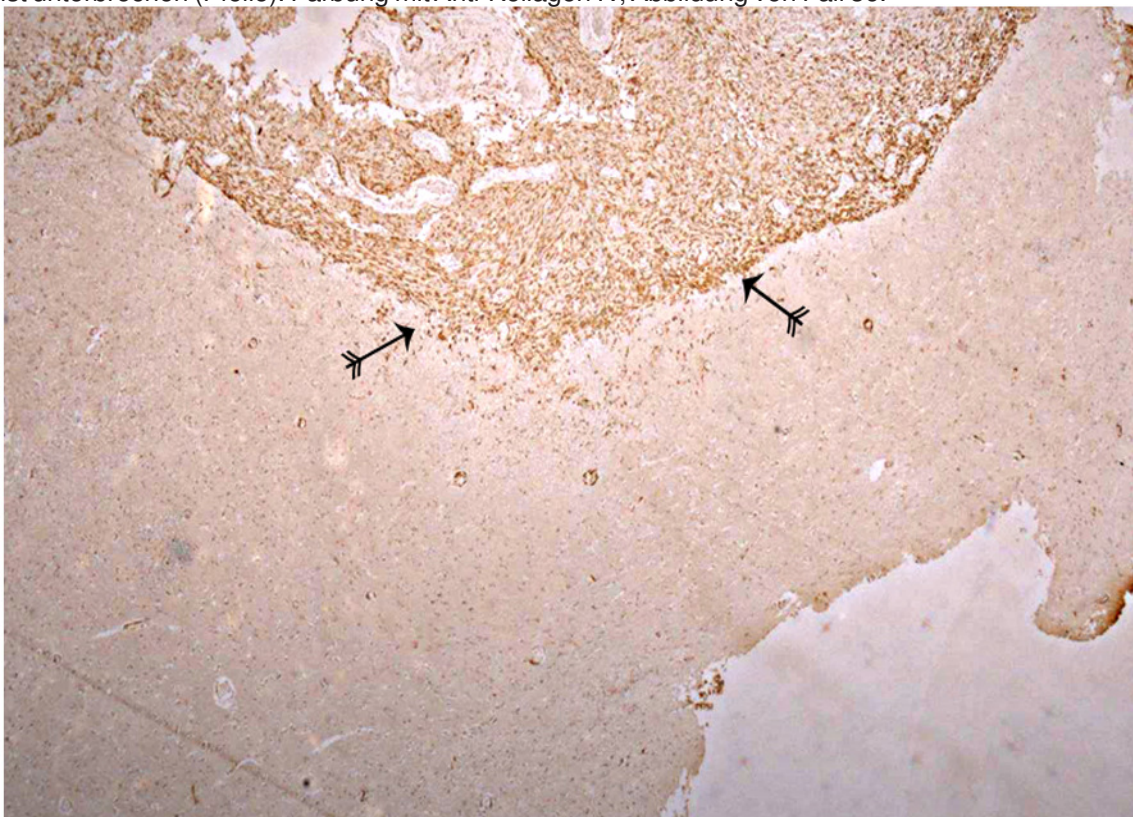


Abbildung 71: Vermehrte Expression von CD14 auf reaktiver Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze eines Meningeoms mit WHO-Grad III. Die Basalmembran ist an dieser Stelle unterbrochen. Abbildung von Fall 36.

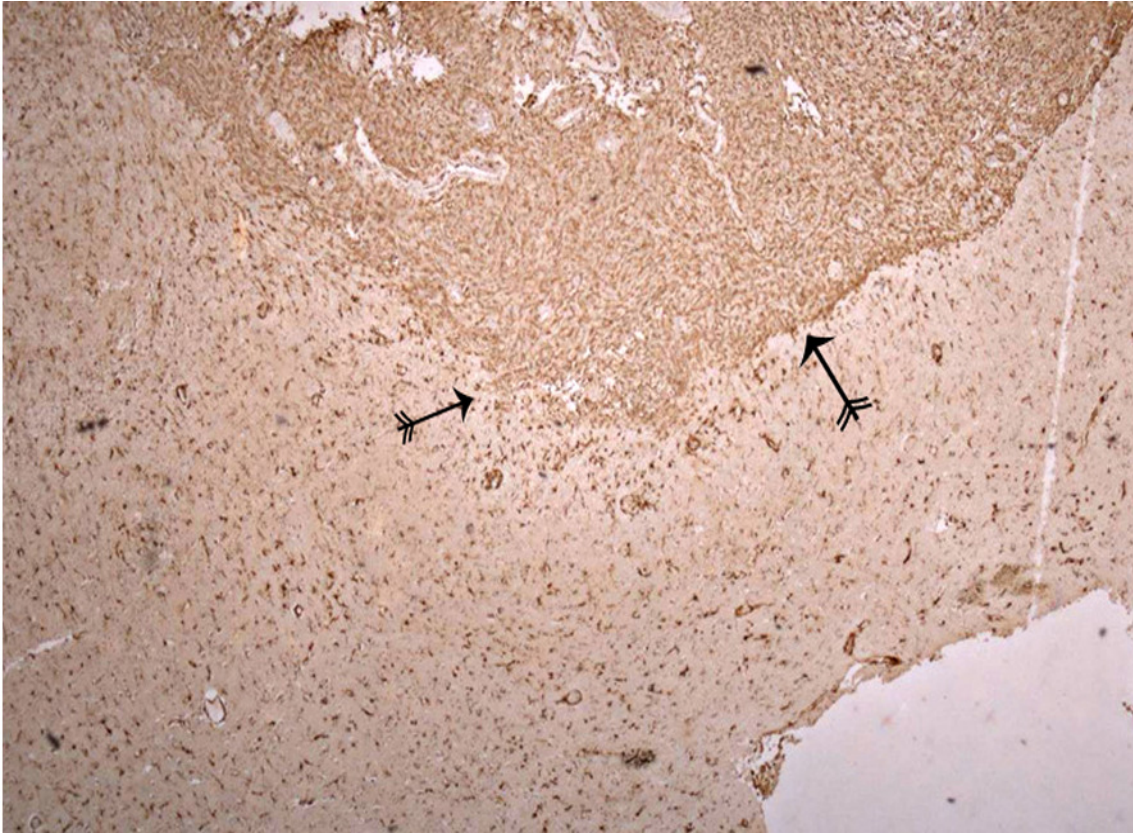


Abbildung 72: Expression von MHCII an der Hirn-Tumorgrenze eines WHO-Grad III Meningeoms. Die Zahl der MHCII-exprimierenden Zellen scheint gegenüber der Umgebung nicht erhöht zu sein. Darstellung von Fall 36.

4 DISKUSSION

Die meisten bekannten pathologischen Vorgänge im ZNS gehen mit einer Aktivierung oder Vermehrung der Mikroglia einher, wobei das mikrogliale Verhalten bei den verschiedenen pathologischen Vorgängen im Hirn sehr unterschiedlich ist. Bei akuten Prozessen wie Traumata oder Ischämien (Beschorner et al 2000; Cosenza-Nashad et al 2006) sind die Mikrogliazellen Teil der Entzündungsreaktion des Hirns. Auch eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Alterung wird diskutiert (Graeber et al 2002; Streit 2002).

Die erste Untersuchung mikroglialer Zellen bei Hirntumoren stammt von Wilder Penfield und beschreibt sehr detailliert ihre morphologische Reaktion innerhalb von Gliomen (Penfield 1925). Auch bei späteren Studien zur mikroglialen Reaktion bei Hirntumoren lag der Fokus der meisten Forscher auf glialen Tumoren. In diesem Zuge entdeckten mehrere Gruppen, dass monozytäre Infiltrate etwa ein Drittel der Tumormasse aller Gliome ausmachen (Hitchcock et al 1988; Morimura et al 1990; Wood and Morantz 1979).

Morimura und Mitarbeiter stellten 1990 eine Korrelation zwischen der Anzahl der monozytären Zellen in Gliomen und der Wachstumsrate fest, jedoch konnten sie keine Korrelation zu dem histologischen Malignitätsgrad feststellen, was sich mit Befunden von Hitchcock und Mitarbeitern von 1988 deckte (Hitchcock et al 1988 ; Morimura et al 1990). Jedoch fanden Graeber und Mitarbeiter 2002 in ihren Untersuchungen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Immunphänotyp der Mikrogliazellen und den histologischen Graden der von ihnen untersuchten Astrozytome (Graeber et al 2002).

Die eigentliche Rolle der tumorassoziierten Mikroglia ist jedoch gegenwärtig Gegenstand der Diskussion, da sowohl das Tumorgewebe, als auch die Mikroglia Wachstumsfaktoren, beziehungsweise Wachstums-Inhibitoren produzieren kann und sie sich so gegenseitig in ihrer Proliferation beeinflussen können.

Schartner und Mitarbeiter fanden 2005, dass Stimulation mit Interferon γ und Lipopolysacchariden zwar zu einer vermehrten Anzahl mikroglialer Zellen in Gliomen führt, nicht jedoch zu einer vermehrten MHCII Expression, wie es in normalem Hirn der Fall war (Schartner et al 2005). Dies legt eine veränderte Reaktion der Mikroglia in Folge einer Kontrolle durch Tumorzellen nahe. Auch konnte bei Patienten mit Hirntumoren ein verändertes Milieu, z.B. eine erhöhte Konzentration von Interleukin 10 (IL-10) im Liquor nachgewiesen werde. IL-10 gilt als Suppressor von Mikrogliazellen und könnte somit ein weiterer Faktor einer Dominanz des Tumors gegenüber immunologischen Abwehrreaktionen sein (Frei et al 1994).

Andererseits konnte monozytären Zellen auch eine Tumorwachstum fördernde Rolle, z.B. durch die Produktion von epidermal growth factor (EGF) zugeschrieben werden (Fries et al 1996).

Leung und Mitarbeiter stellten 1997 fest, dass Astrozytomzellen monocyte chemoattractant protein (MCP) 1 sezernieren und somit monozytäre Zellen anziehen. Somit erscheint das Verhältnis zwischen Tumor und Mikroglia eher eine Art Zusammenspiel zu sein, dessen Ergebnis vom Überwiegen einzelner Faktoren abhängt. Über andere Hirntumorarten als Gliome gibt es bisher weniger Studien. Die Reaktion des Hirnparenchyms bei Invasion von Meningeomen ist weitgehend ungeklärt und dabei insbesondere das Verhalten von Mikroglia. Unsere Studie ging von der Voraussetzung aus, dass die Mikroglia bei Hirninvasion von Meningeomen eine Abwehrreaktion unternimmt und hatte zum Ziel das Verhalten der Mikrogliazellen und die Vorgänge an der direkten Grenzfront der Hirn-Tumorgrenze, sowie die Vorgänge im anschließenden Hirngewebe zu beschreiben. Dabei werden wir in der Diskussion von Markern ruhender Mikroglia, wie CD68 und CD45 ausgehen, um einen Eindruck über das Verhalten der Mikroglia zu erlangen. Im weiteren Verlauf sollen Marker aktivierter Mikroglia, wie MHCII, CD14 und MRP8 diskutiert werden, um Unterschiede in der Reaktion und des Aktivierungsmusters von aktivierten Zellen gegenüber ruhender Mikroglia abgrenzen zu können. Desweiteren werden wir die Morphologie der Zellen in den verschiedenen Zuständen besprechen und auf weitere Aspekte bei Hirninvasion von Meningeomen, wie Ödembildung, Zerstörung der pial-glialen Grenzmembran oder der von Astrozyten gebildeten Membrana gliae limitans eingehen.

4.1 CD68 (PGM1)

Die verschiedenen WHO-Grade zeigten große Ähnlichkeiten hinsichtlich der Expression von CD68 auf Mikroglia im Hirnparenchym (Abb. 10; Abb. 13; Abb. 16). Alle Malignitätsgrade hatten Fälle mit eher schwacher Expression, jedoch zeigten Meningeome mit WHO-Grad I ein schwächeres Bild als Grad III Meningeome (Abb. 12; Abb. 19).

Grad II Meningeome verhielten sich ähnlich wie Grad I Meningeome, beide zeigten eine diffuse Verteilung mikroglialer Zellen in ihren Hirn- und Tumoranteilen. Da die Anzahl der Mikrogliazellen in den Hirnanteilen nicht quantifiziert wurde, kann dies jedoch nur als Eindruck gewertet werden. Ein Unterschied in der Anzahl der Biopsien, die CD68-positive Mikrogliazellen im Hirnparenchym aufwiesen bestand zwischen den einzelnen WHO-Graden nicht.

Eine Akzentuierung der Grenze wurde in keiner Biopsie mit WHO-Grad I oder II beobachtet (Abb. 11; Abb. 14).

CD68 als Marker ruhender, nicht aktivierter Mikroglia ist auch im nicht pathologisch veränderten Hirngewebe diffus anzutreffen. Mittelbronn und Mitarbeiter untersuchten 2001 die Verteilung von Mikroglia in einer Population nicht pathologisch alterierter Hirne und beobachteten dabei starke Unterschiede in der lokalen Verteilung der Zellen (Mittelbronn et al 2001). Das eher diffuse Erscheinungsbild der Mikrogliazellen und die fehlende Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze bei WHO-Grad I und II Meningeomen spricht nicht für eine akute Vermehrung mikroglialer Zellen bei Hirninvasion von Meningeomen dieser Grade, die beobachteten Unterschiede könnten eher auf eine verschieden starke Verteilung zurück zu führen sein, wie sie auch physiologisch im Hirn beobachtet werden kann.

Die Expression von CD68 auf diffuser Mikroglia im Hirn- oder Tumorgewebe war bei den untersuchten WHO-Grad III Meningeomen relativ im Vergleich zu Grad I und II Meningeomen vermehrt. Da die Zahl der Mikrogliazellen nicht quantifiziert wurde kann dies nur aus dem histologischen Bild gedeutet werden. Ein statistischer Unterschied in der Anzahl der für diffuse Mikroglia positiven Biopsien bestand für WHO-Grad III Meningeome gegenüber den anderen Malignitätsgraden nicht. Allerdings wiesen vier von sieben WHO-Grad III Meningeomen eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze auf, was sonst bei keinem der anderen Malignitätsgrade der Fall war (Abbildung 17). Dieser Unterschied konnte statistisch gegenüber den anderen Malignitätsgraden als hoch signifikant bestätigt werden ($p < 0,0001$).

Bei den WHO-Grad III Meningeomen ist also eine vermehrte Anzahl mikroglialer Zellen an der Hirn-Tumorgrenze und in den angrenzenden Hirnanteilen zu erkennen, was für eine aktivierte Immunantwort des Hirns sprechen könnte, jedoch nicht an Hand der Darstellung von CD68 allein entschieden werden kann.

Mosnier und Mitarbeiter beschrieben in einer Studie die konstitutive Expression von CD68, Klon KP1, auf Tumorzellen von Meningeomen und auf Zellen normaler Leptomeningen (Mosnier et al 2000). Eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze durch Expression von CD68 auf Tumorzellen ist bei unseren Biopsien jedoch weitgehend auszuschließen, da hier die Morphologie der gefärbten Zellen bei der Auswertung berücksichtigt wurde. Die mit CD68 positiver Mikroglia akzentuierten Grenzen der vier WHO-Grad III Meningeome wiesen auch bei anderen Markern eine Akzentuierung der Grenze auf, was im Folgenden diskutiert werden soll.

4.2 CD45

Auch die Expression von CD45 war, wie schon bei CD68 beobachtet, bei den verschiedenen WHO-Graden im Hirnparenchym sehr ähnlich. In allen WHO-Graden gab es eine Gruppe von Biopsien mit CD45 positiver Mikroglia in den Hirnanteilen und eine Gruppe ohne Expression von CD45 auf Mikroglia im Hirn, wobei die Anzahl der einzelnen Biopsien in den Gruppen etwa gleich war (Abb. 20; Abb. 23; Abb. 27). Die Expression von CD45 auf Mikrogliazellen war eher gering, so dass oft keine oder nur vereinzelt positive Zellen im Hirnparenchym zu finden waren.

Die WHO-Grade I und II waren sehr ähnlich in ihrem Bild, wie auch schon bei CD68 beobachtet. Sie zeigten nur sehr geringe Expression von CD45 im Hirnparenchym, wobei die positiven Zellen vereinzelt, diffus im Gewebe lagen (Abb. 22; Abb. 25).

Auch die Meningeome WHO-Grad III zeigten eine schwache Expression von CD45 auf mikroglialen Zellen. Relativ war jedoch die Anzahl positiver Zellen in den invadierten Hirnanteilen der Biopsien im Vergleich zu den anderen Malignitätsgraden erhöht. Da auch hier die Anzahl der Mikrogliazellen nicht quantifiziert wurde, konnte dies nur aus dem histologischen Bild entnommen werden. Eine vermehrte Anzahl positiver Präparate für CD45-exprimierende, diffuse Mikroglia konnte auch für WHO-Grad III Meningeome statistisch nicht nachgewiesen werden.

Bei zwei Fällen der Grad III Meningeome gab es eine leichte Akzentuierung der Grenze gegenüber den in CD68 nachgewiesenen vier Präparaten mit aktivierter Hirn-Tumorgrenze (Abb. 28). Diese Akzentuierung fand in den beiden Biopsien jedoch nur auf einem sehr geringen Expressionsniveau statt (Abb. 30; Abb. 31). Die vermehrte Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze konnte bei WHO-Grad III Meningeomen gegenüber den anderen Malignitätsgraden als statistisch signifikant bestätigt werden ($p=0,0022$).

CD45 als Marker ruhender Mikroglia scheint also nur von einer Subpopulation der Zellen exprimiert zu werden, da CD68, ebenso als Marker ruhender Mikroglia eine stärkere Expression aufwies. Dadurch wird eine Beurteilung der Reaktion der Mikrogliazellen bei Hirninvansion mit CD45 erschwert, da nur ein Teil der ruhenden Zellen detektiert wird und somit eine quantitative Beurteilung der Zellen mit Anti-CD45-Färbungen allein kaum möglich ist.

Das in unserer Studie gefundene diffuse Verteilungsmuster der Mikroglia in den Hirnanteilen der WHO-Grade I und II und eine fehlende Expression an der Hirn-Tumorgrenze spricht nicht für eine akute Vermehrung von Mikroglia bei Hirninvansion dieser Meningeome.

CD45 positive Mikroglia ist auch bei WHO-Grad III Meningeomen im Vergleich zu WHO-Grad I und II relativ im histologischen Bild vermehrt, was für eine aktivierte Immunantwort in diesen Meningeomen bei Invasion sprechen könnte.

Die Betonung der Hirn-Tumorgrenze, die bei vier WHO-Grad III Meningeomen durch eine Expression von CD68 beobachtet werden konnte, konnte nur bei zwei Meningeomen in den Färbungen mit CD45 wiedergefunden werden. Dies spricht wiederum für eine Expression von CD45 lediglich auf einer Subpopulation der Zellen. Diese Beobachtung machten auch schon Mittelbronn und Mitarbeiter 2001 bei ihrer immunhistochemischen Untersuchung der mikroglialen Verteilung im gesunden Hirngewebe (Mittelbronn et al 2001). Unsere Beobachtungen spiegeln diese Ergebnisse wieder.

4.3 MHCII

In allen betrachteten Biopsien konnte unabhängig von ihrem WHO-Grad eine Expression von MHCII auf Mikroglia in den anschließenden Hirnanteilen der Meningeome festgestellt werden (Abb. 32; Abb. 35; Abb. 39). Lediglich eine Biopsie mit WHO-Grad I und zwei mit WHO-Grad II wiesen keine Expression von MHCII auf. In den anderen Meningeomen war die Expression jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Alle WHO-Grade zeigten zum Teil eine geringe, zum Teil eine verstärkte Expression von MHCII auf diffus im Hirnparenchym verteilten Zellen. Dabei wiesen Meningeome WHO-Grad I und II ein ähnliches Bild auf, sie zeigten eine diffuse Verteilung in ihren Hirn- und Tumoranteilen (Abb. 34; Abb. 37). Allgemein war eine verstärkte Expression von MHCII auf Mikroglia im Vergleich zu CD68 und CD45 zu verzeichnen.

MHCII gilt als Marker aktivierter Mikroglia, wird jedoch auch auf ruhender Mikroglia exprimiert, was die vermehrte Expression durch die Zellen erklärt, da hier erstmals aktivierte und ruhende Zellen erfasst wurden (Akiguchi et al 1997; Graeber et al 1992; Mattiace et al 1990; McGeer et al 1988).

Mit diesem Marker ergibt sich also eine geringe Vermehrung von Mikroglia in einigen Hirnanteilen bei Hirninvansion von Meningeomen, die sich aus dem histologischen Bild ergab. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Präparate für diffuse, MHCII-positive Mikroglia zwischen den einzelnen Malignitätsgraden.

Die vermehrte Aktivierung scheint jedoch nicht bei allen Tumoren im gleichen Maß zu geschehen, da die Expression von MHCII innerhalb des gleichen WHO-Grades stark variierte.

Bei diesem Marker konnte auch eine Betonung der Hirn-Tumorgrenze bei zwei WHO-Grad I Meningeomen festgestellt werden, die in den Färbungen mit CD68 und CD45 keine Akzentuierung aufgewiesen hatten (Abb. 32). Da diese Betonung der Hirn-Tumorgrenze bei der Untersuchung der ruhenden Zellen nicht vorhanden gewesen war, scheint sie durch aktivierte Zellen zu erfolgen.

Auch eine Biopsie eines WHO-Grad II Meningeoms wies eine vermehrte Expression von MHCII auf aktivierten Zellen an der Hirn-Tumorgrenze auf (Abb. 36; Abb. 38).

Die WHO-Grad III Meningeome wiesen alle eine Expression von MHCII auf diffus verteilten Zellen im Hirnparenchym auf, wobei auch hier im histologischen Bild mehr positive Zellen vorlagen, als in den WHO-Graden I und II. Dies wurde auch schon bei

den Markern für ruhende Mikroglia beschrieben, wobei auch bei den Meningeomen des WHO-Grades III mit MHCII ruhende und aktivierte Zellen angefärbt wurden, so dass mehr Zellen eine Expression aufwiesen gegenüber den selektiven Markern für ruhende Mikroglia.

Alle Meningeome des WHO-Grades III, bis auf eines, wiesen eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze mit MHCII-positiver Mikroglia auf, was gegenüber den Malignitätsgraden I und II als hoch signifikant vermehrt nachgewiesen werden konnte ($p < 0,0001$) (Abb. 40).

Zwei dieser Grenzen waren dabei schon bei den Marker CD68 und CD45 betont gewesen, was auch eine Betonung durch ruhende Mikroglia möglich macht (Abb. 42; Abb. 43). Zwei weitere Grenzen zeigten eine Expression von CD68 und MHCII, nicht aber von CD45, was man auf eine Subpopulation zurückführen könnte. Zwei Meningeome zeigten eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze ohne Betonung durch CD68 oder CD45, was auf eine vermehrte Zahl aktivierter Mikroglia hinweist.

Allgemein konnte, wie auch schon in den vorhergehenden Markern dargelegt, eine signifikant verstärkte Reaktion mikroglialer Zellen in WHO-Grad III Meningeomen an der Hirn-Tumorgrenze nachgewiesen werden. Allerdings weist die stark schwankende Expression in den WHO-Graden I und II auf einen von den Malignitätsgraden unabhängigen Pathomechanismus zur Aktivierung von Mikroglia hin. Es scheint viel mehr ein tumorspezifischer Prozess zu sein.

Sato und Mitarbeiter untersuchten 1995 die Korrelation von Makrophagen in der Tumormasse von Meningeomen mit der Stärke von monocyte chemoattractant protein (MCP) 1 in diesen Meningeomen (Sato et al 1995). Dabei stellten sie eine positive Korrelation dieser beiden Parameter fest. Je mehr MCP 1 in den Tumoren vorhanden war, umso mehr Makrophagen befanden sich in der Tumormasse. Allerdings stellten sie auch eine große Variabilität in der Expression von MCP 1 fest, da es zu gleichen Anteilen Tumoren mit großer, mäßiger oder keiner Expression dieses Proteins gab, was sich auch in der Anzahl von Mikroglia widerspiegelte. Diese starke Variabilität ist auch eine mögliche Erklärung für die großen Unterschiede der mikroglialen Expression von MHCII auf diffusen Zellen in unserer Studie.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Reaktion der Mikroglia auf Hirninvasion eines Meningeoms mit WHO-Grad I oder II eher gering ausfällt. Bei WHO-Grad III Meningeomen ist eine vermehrte Reaktion der Mikroglia zu erkennen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die sehr variable Expression von MHCII auf Mikroglia bei hirninvasiven Meningeomen liefern Suzumura und Mitarbeiter 1993.

Sie untersuchten in einer in vitro Studie die Effekte des Wachstumsfaktors transforming growth factor β auf Mikroglia und stellten dabei fest, dass die Expression von MHCII auf Mikroglia dosisabhängig durch TGF β gehemmt wird (Suzumura et al 1993).

Verschiedene Studien fanden eine konstitutive Sekretion von TGF β durch Meningeome (Boyle-Walsh et al 1996; Johnson et al 1992; Nitta et al 1991). Auch hier könnte ein Zusammenhang mit dem in dieser Studie vorgefundenen Expressionsmuster von MHCII auf diffuser Mikroglia liegen, da dies weniger durch Hirninvasion geprägt zu sein scheint.

4.4 CD14

Die Expression von CD14, einem Marker aktivierter Mikroglia, zeigte sich, im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Markern, in den anschließenden Hirnarealen hirninvasiver Meningeome oder an der Hirn-Tumorgrenze in allen WHO-Graden sehr heterogen (Abb.44; Abb. 47; Abb. 51).

Von den Meningeomen mit WHO-Grad I zeigten elf von 18 Tumoren keine Expression auf Mikrogliazellen (Abb. 46). Das Verteilungsmuster der Mikroglia in den sieben positiven Präparaten war diffus, jedoch in Gefäßnähe war eine vermehrte Anzahl dieser aktivierten Zellen zu finden. Bei drei dieser Tumore konnten auch schon CD68-, CD45- und MHCII-positive Mikrogliazellen im Hirnparenchym nachgewiesen werden. Vier wiesen CD68 und MHCII auf, jedoch kein CD45. Von den 17 MHCII-positive Mikroglia aufweisenden Tumoren zeigten zehn keine Reaktivität für CD14 (Abbildung 44).

Das unterschiedliche Verteilungsmuster dieser beiden Marker für aktivierte Mikroglia legt nahe, dass jeweils andere Subpopulationen von den beiden Markern erfasst werden.

Bei den WHO-Grad II Tumoren zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei WHO-Grad I. Bei sieben von 13 Tumorpräparaten konnten CD14-reaktive Mikroglia im Hirnparenchym festgestellt werden. In vier dieser Tumoren waren auch schon CD68-, CD45- und MHCII-positive Zellen nachgewiesen werden. Zwei zeigten CD68 und MHCII Expression auf Mikroglia, nicht jedoch CD45, ein Tumor wies lediglich CD68- und CD14-reaktive Zellen in seinem Hirnparenchym auf. Von den Tumoren, die MHCII-positive Mikroglia gezeigt hatten, zeigten fünf keine Reaktivität für CD14 (Abb. 47). Allgemein war die Zahl aktivierter, CD14 -exprimierender Zellen im histologischen Bild höher als die Zahl der ruhenden Mikroglia, die durch CD68 und CD45 beurteilt wurde.

Bei den Meningeomen mit WHO-Grad III konnte in allen Präparaten, bis auf eines, durch CD14 aktivierte Mikroglia nachgewiesen werden (Abb. 51). Diese hatten alle auch bereits eine CD68 und MHCII Expression gezeigt, nur bei zwei wurden keine CD45 reaktiven Zellen im Hirnparenchym vorgefunden. Auch in den Untersuchungen auf durch CD14 aktivierten Zellen konnte in den WHO-Grad III Meningeomen eine relative Vermehrung der Zellen gegenüber WHO-Grad I und II im histologischen Bild festgestellt werden.

Die Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze mit aktivierter Mikroglia war bei WHO-Grad III Meningeomen signifikant stark vermehrt gegenüber den anderen Malignitätsgraden ($p=0,0022$). Bei WHO-Grad I und II konnten jeweils zwei Tumore beschrieben werden, die eine Betonung der Grenze mit aktivierten Zellen aufwiesen (Abb. 45; Abb. 48; Abb. 50). Bei den untersuchten WHO-Grad III Meningeomen war dies an der Hirn-Tumorgrenze von fünf Präparaten der Fall. Dieselben Präparate hatten auch eine Vermehrung von MHCII exprimierenden Zellen an den Hirn-Tumorgrenzen gezeigt (Abb. 52). Dies spricht für eine vermehrte Immunreaktion durch Mikroglia bei Hirninvansion von WHO-Grad III Meningeomen.

Besonders augenfällig war das Verteilungsmuster der CD14-reaktiven Zellen. Hier lag eine deutliche Häufung dieser Zellen in Gefäßnähe vor (Abb. 46; Abb. 49; Abb. 50).

Eine immunhistochemische Studie von Ulvestad und Mitarbeitern 1994a, die an Mikroglia in situ und in vitro durchgeführt wurde ergab, dass, bei Verwendung von Kaninchen-Serum zur Hemmung unspezifischer Bindungen, lediglich perivaskuläre Mikroglia angefärbt wurde, jedoch keine parenchymalen Zellen. Bei Färbungen ohne Hemmung der unspezifischen Bindungen mit Tier-Serum konnten auch im Hirngewebe liegende, parenchymale Mikroglia mit dem Antikörper für CD14 detektiert werden (Ulvestad et al 1994a). Hinsichtlich dieser Ergebnisse könnte das hier vorgefundene Verteilungsmuster lediglich eine Art Artefakt darstellen, das in einigen Präparaten aufgetreten ist.

Jedoch stellten verschiedene in vitro Studien, die das Transformationspotential CD14 positiver Makrophagen zu Endothelzellen untersucht haben fest, dass sich CD14 exprimierende Zellen unter angiotropen Bedingungen in Endothel ähnliche Zellen umwandeln können und sich sogar zu Strängen formieren können (Bruno et al 2006; Harraz et al 2001; Pujol et al 2000; Schmeisser et al 2001; Zhang et al 2005).

Da Pistolesi und Mitarbeiter in einer Studie 2003 ein spezifisches Gefäßmuster für WHO-Grad III Meningeome feststellten, könnte hier ein weiterer Aspekt für das Wachstumsmuster, die Aggressivität und die Invasivität von Meningeomen liegen (Pistolesi et al 2003). Um genauere Informationen über das Transformationspotential von Mikroglia zu Endothelzellen zu erlangen, bedarf es jedoch weiterer Studien.

Bezüglich der Reaktion von Mikrogliazellen auf Hirninvansion von Meningeomen lässt sich durch unsere Untersuchungen von CD14-reaktiven Zellen eine signifikant vermehrte Reaktion bei WHO-Grad III Meningeomen feststellen, bei Meningeomen der WHO-Grade I und II scheint diese Reaktion geringer auszufallen.

4.5 MRP8

Die Expression von MRP8 auf diffusen Mikrogliazellen in den hier untersuchten Meningeomen zeigte ein relativ einheitliches Bild bei Meningeomen mit WHO-Grad I und II (Abb. 56; Abb. 59; Abb. 63). Weder an der Hirn-Tumorgrenze, noch im Hirnparenchym der untersuchten Fälle, exprimierten Mikrogliazellen dieses Protein häufig auf ihrer Oberfläche. Weder bei den Meningeomen mit WHO-Grad I noch bei WHO-Grad II konnte eine Expression von MRP8 auf diffus verteilten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 56; Abb. 58; Abb. 59; Abb. 61). Allerdings zeigten in Blutgefäßen liegende Monozyten eine Anfärbung, was als schnittinterne Kontrolle diente.

Bei hirninvasiven Meningeomen des WHO-Grades III zeigten vier Präparate eine herdartige Verteilung von MRP8 positiver Mikroglia im Hirnparenchym. Dies konnte als signifikant vermehrt gegenüber den anderen WHO-Graden statistisch nachgewiesen werden ($p=0,0009$). Bei drei dieser Tumore konnte auch schon eine Expression von CD68, CD45, MHCII und CD14 gezeigt werden. Ein weiterer Tumor mit Expression von MRP8 wies zwar eine Expression von CD68, MHCII und CD14 auf, nicht jedoch von CD45 (Abb. 63; Abb. 65). Meningeome des WHO-Grades III zeigten somit eine signifikant vermehrte Zahl diffuser, reaktiver Mikroglia in ihren Hirnanteilen gegenüber den anderen WHO-Graden.

Eine Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze konnte bei drei Meningeomen des WHO-Grades III festgestellt werden. An einer dieser Grenzen konnte auch eine Betonung durch CD68-, CD45-, MHCII- und CD14-exprimierende Mikrogliazellen gezeigt werden (Abb. 66). Zwei weitere Grenzen wiesen ebenso eine vermehrte Anzahl CD68-, MHCII- und CD14-positiver Mikroglia auf, es konnte jedoch keine CD45 Expression nachgewiesen werden (Abb. 64). Die Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze durch MRP8-exprimierende Zellen war somit signifikant vermehrt bei Tumoren des WHO-Grades III gegenüber den anderen WHO-Graden.

Vorhergehende Studien zeigten eine Expression von MRP8 bei verschiedenen pathologischen Vorgängen im zentralen Nervensystem, wie zum Beispiel bei Neurotrauma, Ischämien und entzündlichen Prozessen (Beschorner et al 2000; Postler et al 1997; Schluesener et al 1996; Schluesener et al 1998). Die schon erwähnte Studie von Mittelbronn und Mitarbeitern 2001 beschäftigte sich mit der Oberflächenexpression verschiedener Marker auf Mikroglia im Hirnparenchym von

Normalhirnen. Die dabei untersuchten mikroglialen Zellen zeigten keine Expression von MRP8, was Mittelbronn und Mitarbeiter zu dem Schluss führte, dass MRP8 ein sehr spezifischer Marker für aktivierte Mikroglia sei, da dieser nicht konstitutiv, wie zum Beispiel MHCII exprimiert würde (Mittelbronn et al 2001).

Bei unserer Studie der mikroglialen Prozesse bei Hirninvasion lässt sich bei WHO-Grad I und II keine Expression von MRP8 nachweisen. Die signifikant vermehrte Expression von MRP8 bei Meningeomen des Malignitätsgrades III sowohl von diffuser Mikroglia im Hirnparenchym, als auch an der Hirn-Tumorgrenze spricht für eine vermehrte Immunantwort bei Hirninvasion von Grad III Meningeomen. Dieser sehr spezifische Marker für aktivierte Mikroglia zeigte in unseren Untersuchungen kaum eine Expression auf Mikroglia bei Meningeomen der WHO-Grade I und II. Die signifikant vermehrte Expression bei WHO-Grad III zeigt, dass von diesen Tumoren ein stärkerer Stimulus zur Immunreaktion ausgeht als von den niedrigeren Malignitätsgraden.

4.6 Morphologische Aspekte der Mikroglia

Die morphologische Erscheinung der Mikroglia spielt bei der Bewertung der Aktivitätszustände eine große Rolle, da jedem Zustand ein entsprechendes Aussehen der Zellen zugeordnet werden kann.

In dieser Studie zeigte der Antikörper für CD45 eine Expression hauptsächlich auf sehr stark ramifizierter Mikroglia, was dem Bild eines Markers für ruhende Mikroglia entspricht (Abb. 30). Dies konnte schon in früheren Studien gezeigt werden und wird durch unsere Ergebnisse bekräftigt (Cosenza-Nashat et al 2006).

CD68-reaktive Zellen wiesen ein heterogenes Bild auf. Ein Teil der Zellen war ramifiziert, einige wiesen eine leichte Ramifizierung mit hypertrophiertem Zellkörper auf, einige waren fortsatzlos und zeigten einen großen Zellkörper (Abb. 18). Somit stellte sich CD68 hier als Marker für ruhende Mikroglia, aber zum Teil auch aktivierte Mikroglia oder zum Teil sogar für Hirnmakrophagen dar. Diese Heterogenität wurde schon in verschiedenen Studien festgestellt, so dass unsere Ergebnisse diesen entsprechen (Guillemin und Brew 2004; Ulvestad et al 1994a; Ulvestad et al 1994c; Wagner et al 1999).

Die Morphologie MHCII-positiver Zellen war durch zwei Phänotypen gekennzeichnet. Der eine war stark ramifiziert und hatte einen kleinen Zellkörper, der andere hatte eine geringe Ramifizierung und zeigte einen hypertrophierten Zellkörper (Abb. 41). Durch dieses Bild lässt sich schließen, dass eine Expression von MHCII sowohl auf ruhender Mikroglia konstitutiv, als auch auf aktivierten Zellen stattfindet. Während frühere Studien eine konstitutive Expression von MHCII weitgehend ausgeschlossen haben, sehen neuere Studien die Möglichkeit eine konstitutiven Expression von MHCII auf Mikroglia, mit einer Aufregulation bei Aktivierung. Unsere Studie bekräftigt diesen Aspekt (Akiguchi et al 1997; Graeber et al 1992; Guillemin und Brew 2004; Mattiace et al 1990; McGeer et al 1988).

Bei unserer Untersuchung CD14 auf ihrer Oberfläche exprimierender Mikroglia konnten wir verschiedene morphologische Gruppen differenzieren. Einerseits wurden perivaskuläre Zellen mit wenigen Fortsätzen und einem ovalen Zellkörper gefunden, die als perivaskuläre Mikroglia bezeichnet werden können (Abb. 49). Andererseits wurden frei im Gewebe liegende Zellen mit hypertrophiertem Zellkörper und wenigen Zellfortsätzen gefunden, die zu aktivierter Mikroglia gezählt werden können (Abb. 50). Letzter Fund steht im Gegensatz zu einer Publikation von Guillemin und Brew 2004, die die fehlende Expression von CD14 auf aktivierter Mikroglia zum Unterscheidungsmerkmal von Makrophagen machen.

Wenn eine Expression von MRP8 auf Mikroglia vorlag, so zeigten sich diese Zellen meist als ovale, hypertrophierte Zellkörper mit wenigen Fortsätzen, was auf eine Aktivierung der Zellen schließen lässt (Abb. 65). Da MRP8 als spezifischer Marker für aktivierte Mikroglia gilt, stimmt dieses Ergebnis mit vorherigen Studien überein (Beschoner 2000; Mittelbronn et al 2001; Postler et al 1997; Schluesener et al 1996; Schluesener et al 1998).

4.7 Ödem als mögliche Ursache für mikrogliale Infiltration des Hirnparenchyms bei WHO-Grad I und II Meningeomen

An Hand der Ergebnisse unserer Studie lässt sich eine geringe Aktivität von Mikroglia bei Hirninvasion von Meningeomen der WHO-Grade I und II feststellen. Bei Meningeomen des WHO-Grad III ist eine stärkere Immunreaktion durch Mikrogliazellen zu beobachten. Da allerdings aktivierte Zellen auch im Hirnparenchym bei WHO-Grad I und II nachgewiesen werden konnten, stellt sich nun die Frage nach einer weiteren Ursache für diese Infiltration. Shinonaga und Mitarbeiter untersuchten in einer immunhistochemischen Studie 1988 die Korrelation von Hirnödemen und mikroglialer Infiltration in verschiedenen Hirntumoren und stellten dabei fest, dass bei Meningeomen eine starke Korrelation dieser beiden Parameter besteht (Shinonaga et al 1988). Zeigte ein Tumor ein starkes Ödem, so war auch eine hohe Zahl von Mikrogliazellen im Tumor zu finden. In dieser Studie wurde jedoch nicht zwischen invasiven und nicht invasiven Meningeomen unterschieden. Vielleicht könnte auf Grund der Ergebnisse für mikrogliale Infiltration eines Tumors ein Zusammenhang zwischen der in unserer Studie gefundenen Mikrogliazellen im Hirnparenchym und dem, den Tumor umgebendem Hirnödem bestehen. In einer Studie von Caffo und Mitarbeitern 2005, die nur an sekretorischen Meningeomen durchgeführt wurde, konnte allerdings kein Zusammenhang von mikroglialer Infiltration im Tumor und Hirnödemen gefunden werden (Caffo et al 2005). Auch diese Studie berücksichtigte eine mögliche Hirninvasion jedoch nicht.

4.8 Einordnung der Ergebnisse in die Intaktheit der Basalmembran und der Membrana gliae limitans

In unseren Ergebnissen zeigte sich eine geringe mikrogliale Reaktion an der Hirn-Tumorgrenze in den WHO-Graden I und II, wohingegen bei Meningeomen mit WHO-Grad III eine vermehrte Aktivierung von Mikroglia in der Grenzregion zwischen Hirnparenchym und Tumor festzustellen war (Abb. 57; Abb. 60; Abb. 64). Unsere Untersuchungen bezüglich des Vorhandenseins von Basalmembran an der Hirn-Tumorgrenze und dem Vorkommen von Mikroglia ergab, dass eine mikrogliale Reaktion auf Hirninvasion erst nach dem Wegfall von Basalmembran vermehrt auftritt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon bei anderen Untersuchungen der pial-glialen Basalmembran oder von Astrozyten bei Hirninvasion von Meningeomen gemacht (Fritz et al 2005; Schittenhelm et al 2006; Zeltner et al 2007).

Ein Schritt bei der Hirninvasion von Meningeomen ist der Durchbruch der pial-glialen Basalmembran. Fritz und Mitarbeiter (2005) stellten in einer immunhistochemischen Studie an invasiven Meningeomen des WHO-Grades I 2005 fest, dass die Hirninvasion im Sinne einer fingerartigen Verzahnung zwischen Hirn- und Tumorgewebe dem Durchbruch der Basalmembran vorausgeht (Fritz et al 2005).

Schittenhelm und Mitarbeiter untersuchten 2006 in einer immunhistochemischen Studie die Basalmembran an der Hirn-Tumorgrenze invasiver Meningeome verschiedener WHO-Grade. Dabei beschrieben sie eine zunehmend mangelnde Intaktheit der pial-glialen Basalmembran bei steigendem WHO-Grad (Schittenhelm et al 2006). Unsere Ergebnisse zeigen eine nur geringe Reaktion der Mikroglia in den WHO-Graden I und II. Bei diesen Malignitätsgraden ist die pial-gliale Basalmembran meist weitgehend intakt, so dass dies als Ursache einer weniger ausgeprägten Aktivierung der Mikrogliazellen gewertet werden konnte, da auch unsere Untersuchungen der Basalmembran meist eine intakte Front zeigten. Bei hirninvasiven Meningeomen des WHO-Grades III war die mikrogliale Reaktion auf Hirninvasion in unserer Studie verstärkt, was sich durch eine vermehrte Akzentuierung der Hirn-Tumorgrenze durch aktivierte Mikroglia in diesem WHO-Grad darstellte. Da bei diesem Grad auch die Basalmembran meist bereits durchbrochen ist, scheint der Durchbruch der Basalmembran ein wesentliches Kriterium für eine Reaktion der Mikroglia auf Hirninvasion zu sein. Unsere Untersuchungen der Basalmembran von Meningeomen des WHO-Grades III, bei denen eine vermehrtes Auftreten von Mikroglia mit den Markern CD68, MHCII und CD14 nachgewiesen werden konnte, zeigte eine hoch signifikante Korrelation mit dem Fehlen von Basalmembran an dieser

Stelle (Abb. 70; Abb. 71; Abb. 72). Invasive Meningeome des WHO-Grades III zeigen also ein ähnlich aggressives Wachstumsverhalten wie invasive Tumore anderer Organe, da sie die sie umgebenden Organgrenzen überschreiten und somit eine stärkere Abwehrreaktion durch Mikroglia hervorrufen.

Auch andere Zellen in ihrer Umgebung scheinen invasive Meningeome des WHO-Grades III stärker zu beeinflussen als die anderen Malignitätsgrade. Zeltner und Mitarbeiter beschrieben in einer immunhistochemischen Studie an hirninvasiven Meningeomen aller WHO-Grade eine Korrelation zwischen der Zerstörung der Basalmembran und dem Vorhandensein von Astrozyten der Glia limitans (Zeltner et al 2007). Diese Astrozyten scheinen im Verlauf der Hirninvasion von Meningeomen und der Zerstörung der pial-glialen Basalmembran zu Grunde zu gehen. Da bei unserer Untersuchung der Mikroglia bei Hirninvasion die Aktivierung dieser Zellen, vor allem auch an der Hirn-Tumorgrenze, erst sehr spät, nach der Zerstörung der Basalmembran, einsetzt, scheint es auch eine reziproke Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Astrozyten und Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze zu geben. Eine Reaktion der Mikroglia auf Hirninvasion scheint erst nach der Auflösung der Basalmembran und nach, oder zumindest zeitgleich, mit dem Verschwinden der Astrozyten von der Hirn-Tumorgrenze in vollem Ausmaß möglich zu sein. In Anbetracht der in diesen Studien gefundenen Ergebnisse ergibt sich ein Zusammenhang der verschiedenen Wachstumsmuster zwischen den jeweiligen WHO-Graden und den bei uns gefundenen mikroglialen Aktivierungsmustern.

Mehrere Studien befassten sich mit dem Auftreten von SPARC, einem Protein, das im Zusammenhang mit der Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix steht, bei invasiven Meningeomen (Rempel et al 1999; Schittenhelm et al 2006).

Rempel und Mitarbeiter hatten dabei diesen Marker als invasionsspezifisch gedeutet, da sie keine Expression von SPARC bei nicht invasiven Meningeomen feststellen konnten.

Schittenhelm und Mitarbeiter befassten sich 2006 mit der Expression von SPARC an der Hirn-Tumorgrenze von Meningeomen aller WHO-Grade. Beide Gruppen stellten dabei eine Expression dieses Proteins hauptsächlich an der Grenzfront zwischen Hirn- und Tumorgewebe, auf Tumorzellen, fest. Schittenhelm und Mitarbeiter (2006) beschrieben dabei eine inverse Korrelation zu dem Vorhandensein von pial-glialer Basalmembran und Spindelzellen mit SPARC Expression.

Die Hirninvasion von Meningeomen mit WHO-Grad I und II scheint nur einen geringen Reiz für eine mikrogliale Aktivierung darzustellen, was auch im Zusammenhang mit der geringen Expression von SPARC auf Tumorzellen stehen könnte. Da Meningeome mit WHO-Grad III dieses Protein verstärkt exprimieren, und auch weniger pial-gliale Basalmembran aufweisen, scheint dadurch ein stärkerer Reiz für die Aktivierung von Mikrogliazellen und einer damit verbundenen Immunantwort einher zu gehen.

Eine ähnliche Reaktion der Mikroglia wurde auch schon bei immunhistochemischen Untersuchungen zum Verhalten von Mikrogliazellen bei Hirnmetastasen beobachtet. Zhang und Olsson (1995) stellten mit einer Ferritin-Färbung fest, dass aktivierte Mikroglia um Hirnmetastasen verschiedener Primärtumore einen großen Anteil der reaktiven Gliose ausmacht (Zhang und Olsson 1995). Sie beschrieben dabei, dass die aktivierten, hypertrophierten Mikrogliazellen ein perifokales Band um die Hirnmetastasen bilden. In der gleichen Studie wurden auch Astrozyten mit einer Endothelin-Färbung untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass auch Astrozyten wallartig um die Hirnmetastasen herum liegen.

Eine weitere Studie von He und Mitarbeitern 2006 untersuchte ebenso immunhistochemisch die Reaktion der Mikroglia bei Hirnmetastasen von Lungentumoren. Dabei stellte auch diese Gruppe mit einer Antigenfärbung gegen ionized calcium binding adaptor molecule (iba) 1 fest, dass Mikrogliazellen einen Wall um die Hirnmetastasen bilden und somit eine deutlich abgrenzbare Demarkationslinie zwischen Hirn und Metastase bilden (He et al 2006). Dieselbe Gruppe untersuchte dabei auch die möglichen zytotoxischen oder phagozytotischen Funktionen der Mikrogliazellen in diesem Wall. Dabei stellten sie fest, dass diese Zellen kaum inducible nitric oxide synthetase (iNOS) oder Tumornekrosefaktor a exprimieren, somit also in diesen Funktionen eher inaktiv sind. In einer in vitro Studie der gleichen Gruppe zeigte aktivierte Mikroglia jedoch ein tumorzerstörendes Potential. He und Mitarbeiter folgern daraus, dass die Mikroglia von den Tumorzellen in ihrer Aktivität beeinflusst werden kann. In geringeren Konzentrationen konnten in dieser Studie jedoch auch trophische Effekte der Mikroglia auf Hirnmetastasen festgestellt werden, was einer weiteren Beeinflussung durch die Tumorzellen entsprechen könnte (He et al 2006).

Für unsere Studie lässt sich daraus ableiten, dass Meningeome des WHO-Grades III in ihrem Verhalten eher einem aggressivem Tumor anderer Organe entsprechen, da, wie auch in den Hirnmetastasen, keine Basalmembran mehr den Tumor umgibt und somit leichter eine mikrogliale Abwehrreaktion stattfinden kann. Die insuffiziente Abwehr des Meningeoms durch die Mikroglia könnte auch auf eine Beeinflussung der Mikrogliazellen durch die Meningeomzellen zurückzuführen sein.

Damit ordnen sich unsere Ergebnisse folgendermaßen ein: Die geringe Reaktion von Mikroglia auf Hirninvasion von Meningeomen des WHO-Grades I und II kann durch die noch intakte pial-gliale Basalmembran erklärt werden, wie auch unsere Untersuchungen diesbezüglich zeigen. Zu diesem Zeitpunkt sind auch noch Astrozyten an der Hirn-Tumorgrenze vorhanden. Ebenso stellt die geringe Expression von SPARC auf Tumorzellen einen fehlenden Reiz für eine Aktivierung der Mikrogliazellen bei diesen Malignitätsgraden dar.

Bei WHO-Grad III Meningeomen ist die Reaktion der Mikroglia stärker, da hier die pial-gliale Basalmembran bereits aufgelöst ist. Die Astrozyten der Glia limitans sind bei diesem Malignitätsgrad weitestgehend verschwunden, so dass eine verstärkte Reaktion der Mikroglia auf die Hirninvasion möglich zu sein scheint. Auch die vermehrte Expression von SPARC auf den Tumorzellen könnte einen Reiz für die starke Reaktion der Mikroglia, besonders an der Hirn-Tumorgrenze darstellen. Zur Identifizierung der Moleküle, die die Interaktion zwischen Meningeomzellen und Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze vermitteln, bedarf es jedoch weiterer Studien.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hirninvasion von Meningeomen stellt ein seltenes, aber prognostisch ungünstiges Verhalten dieser Tumore dar. Die Mikroglia ist ein empfindlicher Sensor für pathologische Prozesse im ZNS und mitverantwortlich für deren Abwehr. Da die genauen Vorgänge bei Hirninvasion nur wenig untersucht sind und keine Arbeiten zur mikroglialen Reaktion dabei bestanden, war das Ziel unserer Studie die Reaktion der Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze und im anliegenden Hirnparenchym zu untersuchen.

Als Probengut wählten wir 18 invasive Meningeome des WHO-Grads I, 13 invasive Meningeome des WHO-Grades II und 7 invasive Meningeome des WHO-Grades III und untersuchten diese Präparate immunhistochemisch auf Reaktionen der Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze und im darauf folgenden ZNS-Gewebe. Färbungen mit Anti-CD68 und -CD45 dienten der Detektion ruhender Mikroglia, während Anti-CD14 und -MRP8 aktivierte Mikroglia anfärbten. MHCII nahm als Oberflächenmolekül auf ruhender und aktivierter Mikroglia eine Zwischenstellung ein. Um eine Korrelation mit dem Vorhandensein von Basalmembran an der Hirn-Tumorgrenze und dem Vorhandensein von Mikrogliazellen zu ermöglichen, wiesen wir Basalmembran anhand Färbungen mit Anti-Collagen 4 Antikörpern nach.

Dabei stellten wir fest, dass in allen von uns untersuchten ZNS-Arealen um die Meningeome herum, unabhängig von dem jeweiligen Malignitätsgrad, ruhende, CD68-positive Mikrogliazellen in einem diffusen Verteilungsmuster vorkommen. Bei den Markern für aktivierte Mikroglia, wie MHCII, CD14 und MRP8 war die Zahl der Mikrogliazellen im Hirnparenchym geringer, aber auch hier gab es keine signifikante Unterschiede zwischen den WHO-Graden.

Die Untersuchung der Hirn-Tumorgrenze, die hier im Vordergrund stehen sollte, zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Malignitätsgraden. Sowohl bei den Markern für ruhende Mikroglia, wie CD68 und CD45, als auch bei den Markern für aktivierte Mikroglia, wie MHCII, CD14 und MRP8 war die mikrogliale Aktivität an der Hirn-Tumorgrenze bei Meningeomen des WHO-Grades III stets signifikant stärker ausgeprägt als an der Hirn-Tumorgrenze von Meningeomen mit WHO-Grad I oder II. Bei den Meningeomen des Malignitätsgrades III bildeten Mikrogliazellen eine gut abgrenzbare Demarkationslinie zwischen Meningeom und ZNS-Gewebe, so dass die Hirn-Tumorgrenze deutlich hervortrat. Daraus lässt sich ableiten, dass Hirninvasion eines Grad III Meningeoms einen stärkeren pathologischen Stimulus auf die Mikroglia ausübt als die Invasion niedrig maligner Meningeome.

Unsere Untersuchungen bezüglich des Vorhandenseins von Basalmembran und dem vermehrten Auftreten von Mikroglia an der Hirn-Tumorgrenze ergaben eine signifikante Korrelation zwischen dem Fehlen von Basalmembran und einer verstärkten mikroglialen Reaktion an der Hirn-Tumorgrenze, die durch die Marker CD68, MHCII und CD14 nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse reihen sich in vorhergehende Untersuchungen zur Intaktheit der Basalmembran von Fritz und Mitarbeitern 2005 und Schittenhelm und Mitarbeitern 2006 ein (Fritz et al 2005; Schittenhelm et al 2006). Demnach bedeutet Hirninvasion eines Meningeoms mit WHO-Grad III eine frühe Zerstörung der Basalmembran, während die Hirninvasion eines Meningeoms mit WHO-Grad I und II zunächst eine intakte Basalmembran beinhaltet. Diese Studien und unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Durchbruch der Basalmembran einer mikroglialen Reaktion an der Hirn-Tumorgrenze vorausgehen muss, wie es vermehrt bei Meningeomen mit WHO-Grad III der Fall ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Akiguchi I, Tomimoto H, Suenaga T, Wakita H, Budka H (1997): Alterations in glia and axons in the brains of Binswanger 's disease patients. *Stroke* 28:1423-1429
2. Akiyama H, Ikeda K, Katoh M, McGeer EG, McGeer PL (1994): Expression of MRP14, 27E10, interferon-alpha and leukocyte common antigen by reactive microglia in post-mortem human tissue. *J Neuroimmunol* 50:195-201
3. Alcolado R, Weller RO, Parrish EP, Garrod D (1988): The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14:1-17
4. Aloisi F (2001): Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179
5. Altin JG, Sloan EK (1997): The role of CD45 and CD45 associated molecules in T-cell activation. *Immunol Cell Biol* 75:430-445
6. Becher B, Fedorowicz V, Antel JP (1996): Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *J Neurosci Res* 45:375-381
7. Becker I, Roggendorf W (1989): Immunohistological investigation of mononuclear cell infiltrates in meningiomas. *Acta Neuropathol* 79:211-216
8. Beschorner R, Engel S, Mittelbronn M, Adjodah D, Dietz K, Schluesener H, Meyermann R (2000): Differential regulation of the monocytic calcium-binding peptides macrophage-inhibiting factor related protein-8 (MRP8/S100A8) and allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathol* 100:627-634
9. Black P McL (1993): Meningiomas. *Neurosurgery* 32, 643-657
10. Bo L, Mork SJ, Nyland H (1992): An immunohistochemical study of mononuclear cells in meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18:548-558
11. Bosco MC, Espinoza D, I, Rowe TK, Malabara MG, Longo DL, Varesio L (1997): Functional role for the myeloid differentiation antigen CD14 in the activation of human monocytes by IL-2. *J Immunol* 159:2922-2931
12. Boyle-Walsh E, Birch M, Gallagher JA, Speirs V, White MC, Shenkin A, Fraser WD (1996): RT-PCR detection of cytokine transcripts in a series of cultured human meningiomas. *J pathol* 178:442-446
13. Bruno S, Bussolati B, Scacciatelle P, Marra S, Sanavio F, Tarella C, Camussi G (2006): Combined administration of G-CSF and GM-CSF stimulates monocyte-derived pro-angiogenic cells in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine* 34:56-65
14. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS (2002): Surgical pathology of the nervous system and it's coverings. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia 49-71

15. Caffo M, Caruso G, Germano A, Galatioto S, Meli F, Tomasello F (2005): CD68 and CR3/43 immunohistochemical expression on secretory Meningiomas. *J Neurosurg* 57:551-557
16. Cosenza-Nashat MA, Kim MO, Zhao ML, Lee SC (2006): CD45 expression in microglia and inflammatory cells in HIV-1 Encephalitis. *Brain Pathol* 16:256-265
17. Dentener MA, Bazil V, Asmuth EJ von, Ceska M, Buurmann WA (1993): Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 150:2885-2891
18. Devit A, Moffat OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD (1998): Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505-509
19. Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C (1993): Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer,s disease. *Glia* 7: 75-83
20. Ferrero E, Goyert SM (1988): Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen CD14. *Nucleic Acids Res* 16:4173
21. Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1987): Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol* 17:1271-1278
22. Frei K, Malipiero U, Piani D, Fontana A (1994): Microglia and tumor rejection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:206-208
23. Fries G, Perneckzy A, Kempfski O (1996): Glioblastoma-associated circulating monocytes and the release of epidermal growth factor. *J Neurosurg* 85:642-647
24. Fritz J, Roser F, Tatagiba M, Bornemann A (2005): The basement membrane at the tumour-brain interface of brain-invasive grade I meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:339-342
25. Fujita S, Kitamura T (1975): Origin of brain macrophages and the nature of so-called microglia. *Acta Neuropathol Suppl* VI: 291-296
26. Fujiwara K (2006): Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells. *J Intern Med* 259:373-380
27. Graeber MB, Streit WJ (1990): Microglia: Immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1:2-5
28. Graeber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW (1992): Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:303-11
29. Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW (2002): Microglia in brain tumors. *GLIA* 40: 252-259

30. Guha M, Mackmann N (2001): LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94
31. Guillemin GJ, Brew BJ (2004): Microglia, macrophages, perivascular macrophages and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75:388-397
32. Han J, Bohuslav J, Jiang Y, Kravchenko VV, Lee JD, Li ZJ, Mathison J, Richter B, Tobias P, Ulevitch RJ (1998): CD14 dependent mechanisms of cell activation. *Prog Clin Biol Res* 397:157-168
33. Hanisch UK (2002): Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155
34. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC (2001): CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 19:304-312
35. He BP, Wang JJ, Zhang X, Wang M, Bay BH, Chang AY (2006): Differential reactions of microglia to brain metastasis in lung cancer. *Mol Med* 12:161-170
36. Hickey WF, Kimura H (1988): Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292
37. Hitchcock ER, Morris CS (1988): Mononuclear cell infiltration in central portions of human astrocytomas. *J Neurosurg* 68:432-437
38. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Penninger JM (2003): CD45 regulate signaling pathways. *Curr Top Med Chem* 3:783-796
39. Jamshidi J, Yoshimine T, Ushio Y, Hayakawa T, Morimoto K, Mogami H (1987): Pathology of the brain parenchyma in meningeal carcinomatosis ; Immunohistochemical study with astroprotein (GFAP) and Tubulin. *J Neurooncol* 5:65-71
40. Johnson MD, Federspiel CF, Gold LI, Moses HL (1992): Transforming growth factor- β and transforming growth factor β -receptor expression in human meningioma cells. *Am J Pathol* 141:633-642
41. Kepes JJ (1986): Presidential Address: The Histopathology of Meningiomas. A Reflection of Origin and Expected Behaviour? *J Neuropathol Exp Neurol* 45:95-107
42. Kirsching CJ, Wesche H, Merrill AT, Rothe M (1998): Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 188:2091-2097
43. Kitange G, Tsunoda K, Anda T, Nakamura S, Yasunaga A, Naito S, Shibata S (2000): Immunohistochemical expression of Ets-1 transcription factor and the urokinase-type plasminogen activator is correlated with the malignant and invasive potential in Meningiomas. *Cancer* 89:2292-2300
44. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002): The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:215-225

45. Kligmann D, Hilt DC (1988): The S-100 protein family. *Trends Biochem Sci* 13:437-433
46. Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318
47. Lamszus K (2004): Meningioma Pathology, Genetics, and Biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:275-286
48. Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P (2002): Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (Hrsg): *Greenfield's Neuropathology*, 7. Aufl. Arnold, London, New York, New Delhi 767-980
49. Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF (1993): Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7:19-24
50. Leung SY, Wong MP, Chung LP, Chan AS, Yuen ST (1997): Monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 93:518-527
51. Ling EA (1981): The origin and nature of microglia. In: Fedoroff S, Hertz L: *Advances in cellular neurobiology*; Academic Press, New York, 33-82
52. Ling EA, Wong WC (1993): The Origin and Nature of Ramified and Amoeboid Microglia: A historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18
53. Lopes CAS, Mair WGP (1974a): Ultrastructure of the arachnoid membrane in man. *Acta Neuropathol (Berl)* 28:167-173
54. Lopes CAS, Mair WGP (1974b): Ultrastructure of the outer cortex and the pia mater in man. *Acta Neuropathol (Berl)* 28:79-86
55. Louis DN, Oghaki H, Wiestler O, Cavennee WK, Burger PC, Jouvett A, Scheithauer BW, Kleihues P: The WHO Classification of tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* (2007) 114:97-109
56. Manigold T, Böcker U, Traber P, Dong ST, Kurimoto M, Hanck C, Singer MV, Rossol S (2000): Lipopolysaccharid/endotoxin induces IL-18 via CD14 in human peripheral blood cells in vitro. *Cytokine* 12:1788-1792
57. Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M (1992): Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology* 76:209-216
58. Mattiace LA, Davies P, Dickson DW (1990): Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors. *Am J Pathol* 136:1101-1114
59. McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG (1988): Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol* 76:550-557

60. Meng F, Lowell CA (1997) Lipopolysaccharide induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr and Lyn. *J Exp Med* 185:1661-1670
61. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001): Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 101:249-255
62. Moore S, Thanos S (1996): The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol* 48:441-460
63. Morantz RA, Wood GW, Foster M, Clark M, Gollahon K (1979): Macrophages in experimental and human brain tumors Part 2: Studies of the macrophage content of human brain tumors. *J Neurosurg* 50:305-311
64. Mori S, Leblond CP (1969): Identification of microglia in light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 135:57-80
65. Morimura T, Neuchrist C, Kitz K, Budka H, Scheiner O, Kraft D, Lassmann H (1990): Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol* 80:287-294
66. Mosnier JF, Perret AG, Scoazec JY, Brunon J (2000): Expression of $\beta 2$ integrins and macrophage-associated antigens in meningeal tumours. *Virchows Arch* 436:131-137
67. Nadeau S, Rivest S (2000): Role of the microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxia. *J Neurosci* 20:3456-3468
68. Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H (1998): Neurotrophins inhibit major histocompatibility complex class II inducibility of microglia: Involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5779-5784
69. Neumann H (2001): Control of immune function by neurons. *Glia* 36:191-199
70. Newman PJ (1997): The Biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99(1):3-8
71. Newman PJ, Newman DK (2003): Signal transduction pathways mediated by PECAM-1, new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:953-964
72. Nitta T, Sato K, Okumura K (1991): Transforming Growth Factor (TGF)- β like activity of intracranial meningioma and its effect on cell growth. *J Neurol Sci* 101:19-23
73. Pedersen PH, Rucklidge GJ, Mork SJ, Terzis AJA, Engebraaten O, Lund-Johansen M, Blacklund EO, Laerum OD, Bierkvig R (1994): Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion. *J Natl Cancer Inst* 86:1593-1599
74. Penfield W (1925): Microglia and the process of phagocytosis in gliomas. *Am J Pathol* 1:77-97

75. Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985): Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326
76. Perry VH, Gordon S (1988): Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11:273-277
77. Perry A (2006): Meningiomas. In: Lendon Mc R, Rosenblum MK, Bigner DD (Hrsg) *Russel and Rubinstein's Pathology of the nervous system* 7. Auflg. Verlag?????
78. Pistolesi A, Boldrini L, Giefredi S, Leso De K, Camacci T, Canaglia M, Lupi G, Leocata P, Basolo F, Pinigitore R, Parenti G, Fontanini G (2004): Angiogenesis in intracranial meningiomas: immunohistochemical and molecular study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:118-125
79. Postler E, Lehr A, Schluesener H, Meyermann R (1997): Expression of the S-100 proteins MRP8 and MRP14 in ischemic brain lesions. *Glia* 19:27-34
80. Prinz M, Kann O, Draheim Hj, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK (1999): Microglial activation by components of Gram-positive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1078-1089
81. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ (1994): CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1:509-516
82. Pujol BF, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsässer HP, Müller R, Havemann K (2000): Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 65:287-300
83. Rempel SA, Ge S, Gutierrez JA (1999): SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res* 5:237-241
84. Rezaie P, Male D (2002): Mesoglia and microglia- a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci* 11(4):325-74
85. Rio-Hortega del P (1932): Microglia. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. (W. Penfield, ed.), pp 482-534, Vol 2, Hoeber Verlag, New York
86. Roggendorf W, Strupp S, Paulus W (1996): Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol* 92:288-293
87. Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB (1987): Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 74:269-277

88. Roth J, Burwinkel F, Bos van den C, Goebeler M, Vollmer E, Sorg C (1993): MRP8 and MRP14, S-100 like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium dependent-manner. *Blood* 82:1875-1883
89. Roth J, Goebeler M, Wrocklage V, Bos van den C, Sorg C (1994): Expression of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in monocytes is regulated by a calcium-induced suppressor mechanism. *Biochem J* 301:655-660
90. Rydberg E (1932): Cerebral injury in newborn children consequent on birth trauma, with an injury into the normal and pathological anatomy of the neuroglia. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 10:1-247
91. Sandberg Nordqvist AC, Smurawa H, Mathiesen T (2001): Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in meningiomas associated with different degrees of brain invasiveness and edema. *J Neurosurg* 95:839-844
92. Santha K, Juba A (1933): Weitere Untersuchungen über die Entwicklung der Hortegaschen Mikroglia. *Arch Psychiat Nervenkr* 98:598-613
93. Sato K, Kuratsu JI, Takeshima H, Yoshimura T, Ushio Y (1995): Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in meningioma. *J Neurosurg* 82:874-878
94. Schartner JM, Hagar AR, Handel van M, Zhang L, Nadkarni N, Badie B (2005): Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. *GLIA* 51:279-285
95. Schittenhelm J, Mittelbronn M, Roser F, Tatagiba M, Mawrin C, Bornemann A (2006): Patterns of SPARC expression and basement membrane intactness at the tumour-brain border of invasive meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32:525-531
96. Schluesener H, Seid K, Kretzschmar J, Meyermann R (1996): Leucocyte chemotactic factor, a natural ligand to CD4 is expressed by lymphocytes and microglial cells of the MS plaque. *J Neurosci Res* 44:606-611
97. Schluesener H, Kremsner P, Meyermann R (1998): Widespread expression of MRP8 and MRP14 in human cerebral malaria by microglial cells. *Acta Neuropathol* 96:575-580
98. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG (2001): Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 49:671-680
99. Shinonaga M, Chang CC, Suzuki N, Sato M, Kuwabara T (1988): Immunohistological evaluation of macrophage infiltrates in brain tumors: Correlation with peritumoral edema. *J Neurosurg* 68:259-265
100. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988): Functional plasticity of microglia: A review. *GLIA* 1:301-307
101. Streit WJ (2002): Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *GLIA* 40:133-139

102. Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE, Mariani CL (2005): Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res* 27:685-691
103. Strojnik T, Zidanik B, Kos J, Lah TT (2001): Cathepsins B and L are markers for clinically invasive types of meningiomas. *J Neurosurg* 48:598-605
104. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T (1993): Transforming growth factor- α suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 151:2150-2158
105. Ting JP, Nixon DF, Weiner LP, Frelinger JA (1983): Brain Ia antigens have a bone marrow origin. *Immunogenetics* 17:295-301
106. Ulevitch RJ (1999): Endotoxin opens the Tollgates to innate immuncity. *Nat Med* 5:144-145
107. Ulvestad E, Williams K, Mork S, Antel J, Nyland H (1994a): Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:492-501
108. Ulvestad E, Williams K, Bo L, Trapp J, Antel J, Mork S (1994b): HLA class 2 molecules (HLA-DR,-DP,-DQ) on cells in the human CNS studies in situ and in vitro. *Immunology* 82:533-541
109. Ulvestad E, Williams K, Mork S, Antel J, Nyland H (1994c): Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:492-501
110. Villadangos JA (2001): Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Molecular Immunology*. 38:329-46
111. Virchow R (1846): Über das granulierte Aussehen der Windungen der Gehirnentrikel. *Allg Z Psychiat* 3:242-250
112. Wagner S, Czub S, Greif M, Vince GH, Suss N, Kerkau S, Rieckmann P, Roggendorf W, Roosen K, Tonn JC (1999): Microglial/Macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int J cancer* 82:12-16
113. Wang PY, Munford RS (1999): CD14-dependent internalization and metabolism of extracellular phosphatidylinositol by monocytes. *J Biol Chem* 274:23235-23241
114. Wang PY, Kitchens RL, Munford RS (1998): Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 273:24309-24313
115. Wood GW, Morantz RA (1979): Immunohistological evaluation of the lymphoreticular infiltrate in human CNS tumours. *J Natl Cancer Inst* 62:485-490
116. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433

117. Zeltner L, Schittenhelm J, Mittelbronn M, Roser F, Tatagiba M, Mawrin C, Kim YJ, Bornemann A (2007): The astrocytic response towards invasive Meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:163-168
118. Zang M, Olsson Y (1995): Reactions of astrocytes and microglial cells around hematogenous metastases of the human brain. Expression of endothelin-like immunoreactivity in reactive astrocytes and activation of microglial cells. *J Neurol Sci* 143:26-32
119. Zhang R, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C (2005): Acceleration of endothelial-like cell differentiation from CD14+ monocytes in vitro. *Exp Haematol* 33:1554-1563

7 ANHANG

Tabelle 1: Klinische Daten des Patientenguts

Fall	Alter (J)	Geschlecht	Lage des Meningeoms	Histologischer Subtyp	WHO-Grad
1	48	m	Rechter Keilbeinflügel	Transitionales Meningeom	1
2	46	w	Mediales Keilbein	Meningotheliomatöses Meningeom	1
3	57	w	Vordere Schädelgrube	Endotheliomatöses Meningeom	1
4	79	m	N. Okulomotorius	Meningotheliomatöses Meningeom	1
5	60	w	Falx	Meningotheliomatöses Meningeom	1
6	73	m	Falx	Transitionales Meningeom	1
7	63	w	Parasagital links	Transitionales Meningeom	1
8	79	w	Links Parieto-occipital	Mesotheliomatöses Meningeom	1
9	70	w	Fronto-Parietal	Meningotheliomatöses Meningeom	1
10	81	w	Links Frontal	Meningotheliomatöses Meningeom	1
11	38	w	Fissura Sylvii	Meningotheliomatöses Meningeom	1
12	54	m	Planum Sphenoidale	Meningotheliomatöses Meningeom	1
13	72	w	Falx	Meningotheliomatöses Meningeom	1
14	65	m	Keilbein rechts	Endotheliomatöses Meningeom	1
15	57	w	Rechts Frontal	Meningotheliomatöses Meningeom	1
16	30	m	Frontobasal	Meningotheliomatöses Meningeom	1
17	69	m	N. Olfaktorius	Meningotheliomatöses Meningeom	1
18	53	w	Rechts Parietal	Meningotheliomatöses Meningeom	1
19	79	w	Rechts Frontal	Atypisch endotheliomatöses Meningeom	2
20	75	m	Rechts Frontal	Atypisches Meningeom	2

21	81	m	Nicht bekannt	Atypisches Meningeom	2
22	57	m	Frontal extra axial	Chordoides Meningeom	2
23	65	m	Links Frontal	Atypisches Meningeom	2
24	68	m	Rechts fronto-parietal	Atypisches Meningeom	2
25	68	m	Rechts fronto-parietal	Atypisches Meningeom	2
26	44	w	Nicht bekannt	Atypisches Meningeom	2
27	76	w	Links occipital	Atypisches Meningeom	2
28	51	m	Rechts Parietal	Atypisches Meningeom	2
29	59	w	Falx	Atypisches Meningeom	2
30	64	w	Rechts Frontal	Atypisches Meningeom	2
31	75	w	Links Frontal	Atypisches Meningeom	2
32	53	w	Nicht bekannt	Anaplastisches Meningeom	3
33	55	w	Nicht bekannt	Anaplastisches Meningeom	3
34	67	m	Falx beidseits	Anaplastisches Meningeom	3
35	58	m	Nicht bekannt	Anaplastisches Meningeom	3
36	64	m	Links parietal	Anaplastisches Meningeom	3
37	64	m	Links parietal	Anaplastisches Meningeom	3
38	58	w	Rechts temporo-parietal	Anaplastisches Meningeom	3

ABKÜRZUNGEN

BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CD	cluster of differentiation
EMA	epitheliales Membranantigen
GFAP	glial fibrillary acid protein
HIV	human immune deficiency virus
iba	ionized calcium binding adaptor molecule
IF	Interferon
L	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthetase
kDa	Kilodalton
LCA	leucocyte common antigen
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinasen
MCP	monocyte chemoattractant protein
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRP	macrophage inhibiting factor related protein
NF	Neurofibromatose
NGF	nerve growth factor
NT-3	Neurotrophin 3
SPARC	secreted protein, acidid and rich in cystein
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

DANKSAGUNGEN

Frau Prof. Dr. med Antje Bornemann möchte ich herzlich für die Bereitstellung des Themas und die exzellente Betreuung danken. Es war sehr angenehm mit Ihnen zusammen zu arbeiten, Sie haben stets ein Gespräch möglich gemacht.

Dr. med Jens Schittenhelm danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei der Erstellung der statistischen Auswertung und die netten Ratschläge bei anderweitigen Fragen.

Prof. Dr. med. Richard Meyermann danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Institut durchführen zu können und dabei Labor, Archiv und Bibliothek nutzen zu dürfen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung danke ich für die herzliche Aufnahme und die entgegengebrachte Unterstützung.

Herrn Andreas Geiger danke ich herzlich für die stete Hilfe bei Computerfragen.

LEBENS LAUF

Stephanie Isabelle Grund

04.09.1983

geboren in Tuttlingen

1990-1994

Grundschule, Schlossschule Immendingen

1994-2003

Immanuel-Kant Gymnasium Tuttlingen

2003

Allgemeine Hochschulreife

2003-2009

Studium der Humanmedizin
Eberhard-Karls Universität Tübingen

2006-2009

Promotion am Institut für Hirnforschung
Universität Tübingen,
Doktormutter Frau Prof. Dr. med. A. Bornemann

28.10.2009

Ärztliche Prüfung (2.Staatsexamen)