

Aus dem Bereich Neurochirurgie  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar  
(Direktor: Prof. Dr. W.- I. Steudel)

**Untersuchung zur genetischen Heterogenität von Gliomen des Menschen  
mittels Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung  
an Interphasekernen und Chromosomen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2010

vorgelegt von: Melanie Schmitt  
geboren am 19. Januar 1983 in St. Wendel

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis .....	5
1 Zusammenfassung / Summary .....	7
2 Einleitung .....	13
2.1 Thematische Einführung .....	13
2.2 Tumorentstehung und genetische Veränderungen .....	13
2.3 Neuroepitheliale Tumoren.....	15
2.3.1 Epidemiologie, Klassifikation, Klinik, Therapie und Prognose von neuroepithelialen Tumoren.....	15
2.3.2 Genetische Aberrationen in Gliomen.....	27
2.3.3 Tumorgenese- bezogene Gene auf 1p36 und 19q .....	31
2.3.4 Tumorgenese- bezogene Gene auf den Chromosomen 7 und 10.....	33
2.3.5 Assoziation von genetischen Veränderungen und Tumormorphologie .....	36
2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	38
3 Material .....	40
3.1 Bezugsquellen der Materialien.....	40
3.2 Lösungen und Puffer .....	41
3.3 DNA- Sonden.....	42
3.4 Untersuchungsmaterial.....	43
3.4.1 Tumorgewebe.....	43
3.4.2 Kontrollgewebe .....	43
4 Methoden.....	44
4.1 Tumorzellkultur.....	44
4.1.1 Chromosomenpräparation und Gewinnung von Interphasekernen von Gliomen .....	44
4.1.2 CTG- Bänderung und Karyotypisierung .....	46
4.2 Kurzzeitkultur aus Blut und Chromosomenpräparation aus Lymphocyten.....	48
4.2.1 Blutkultur .....	48
4.2.2 Chromosomenpräparation aus Blutlymphocyten.....	48
4.3 Tumorausstrichpräparate .....	49
4.4 Markierung von DNA- Sonden .....	49
4.4.1 Nick- Translation.....	49

4.4.2	Dot- Blot.....	51
4.5	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung (FISH).....	52
4.5.1	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphase- Kernen von Gliom- Tumorzellen .....	54
4.5.2	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Tumorausstrichpräparaten .....	58
4.5.3	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Lymphocyten .....	58
4.6	Auswertung und Statistik .....	59
4.7	Geräte und Software .....	65
5	Ergebnisse .....	66
5.1	CTG- Bänderung und Karyotypisierung der Gliom- Zellkultur .....	66
5.2	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Gliom- Tumorzellen .....	70
5.3	Ergebnisvergleich zwischen Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung und Karyotypisierung von Gliomen .....	96
6	Diskussion .....	101
6.1	Methodendiskussion.....	101
6.1.1	Zytogenetische Untersuchung (Karyotypisierung) .....	101
6.1.2	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Gliomen .....	102
6.1.3	Methodenvergleich zwischen Zytogenetik und Molekularzytogenetik .....	104
6.2	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Gliomen.....	107
6.2.1	Heterogenität von Gliomen .....	108
6.2.2	Genetische Veränderungen in pilocytischen Astrocytomen .....	111
6.2.3	Genetische Veränderungen in diffusen und anaplastischen Astrocytomen ...	112
6.2.4	Genetische Veränderungen in Glioblastomen.....	114
6.2.5	Genetische Veränderungen in diffusen und anaplastischen Oligodendrogliomen .....	116
6.2.6	Genetische Veränderungen in diffusen und anaplastischen Oligoastrocytomen .	118
6.2.7	Genetische Veränderungen in Ependymomen .....	119
6.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	119
6.3	Genetik als Basis der Gliomklassifikation .....	122

6.4	Ausblick .....	124
7	Abbildungsverzeichnis .....	125
8	Literaturverzeichnis .....	127
9	Publikationen .....	144
10	Danksagung .....	145
11	Lebenslauf .....	146
12	Anhang .....	148

---

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Astrocytom
A. ampura	Aqua ampura
A. dest.	Aqua destillatum
5- ALA	5- Aminolävulinsäure
Anti- Dig- Cy3	Anti- Digoxygenin- Cy3
BCIP	5- Brom- 4- chlor- 3- Indolphosphat
Bio- Anti- Streptavidin	Bio: beschichtet mit biotinylierten Antikörpern
BSA	Bovines Serum Albumin
CGH	Comparative Genomic Hybridization/ Vergleichende Genomische Hybridisierung
CNA	Copy Number Aberrations/ Kopienzahlveränderungen
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4'-6'- Diamidino- 2- Phenylindol
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium“: Standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
DNase	Desoxyribonuklease
EtOH abs.	Alkohol absolut
FA	Formamid
fg	Femtogramm
FISH	Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GBM	Glioblastom
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOF	Körperoberfläche
LOH	Loss of Heterozygosity/ Verlust der Heterozygosität
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter

µg	Mikrogramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Natriumacetat	NaAC
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro Tetrazolium Blue Chloride
nm	Nanometer
OA	Oligoastrocytom
OD	Oligodendrogliom
PA	Pilocytisches Astrocytom
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerasekettenreaktion
PBmax	“Karyotyping Medium“: Basalmedium mit L- Glutamin, Gentamicinsulfat, fötalem Rinderserum und Phytohämagglutinin
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Picogramm
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
SDS- Page	Sodium- Dodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SSC	Standard Saline Citrate/ Standardisierte Salzlösung
TN- Puffer	Tris- HCL, NaCl
TRIS- Puffer	Tris (hydroxymethyl) aminomethan/ C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
TTP	Time To Progression/ Zeit bis zur Tumorprogression
WHO	World Health Organization/ Weltgesundheitsorganisation

Zeichen:

#	Chromosom
-	Deletion/ Verlust
+	Zugewinn

## 1 Zusammenfassung / Summary

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems stellen die häufigste Todesursache in mitteleuropäischen Ländern dar. Schon an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik stehen maligne Erkrankungen, wobei intrakranielle Tumoren – gemessen an der Gesamtzahl dieser Neoplasien – einen Anteil von etwa 5% ausmachen.

Mit einem Prozentsatz von 60% bilden die hirneigenen Gliome den Hauptanteil der Hirntumoren.

Die einzelnen Gliomentitäten werden nach einem Klassifikationssystem der Weltgesundheitsorganisation (WHO), das auf histomorphologischen Merkmalen basiert, in die WHO- Grade I bis IV eingeteilt.

Zahlreichen Arbeiten zufolge sind diese Tumoren neben der Histomorphologie auch durch genetische Besonderheiten charakterisiert:

So gelten beispielsweise Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q als typische Aberrationen in Oligodendrogliomen. Das Glioblastoma multiforme hingegen weist als genetische Besonderheit unter Anderem Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese oben genannten genetischen Aberrationen mit Hilfe der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung (FISH) ebenfalls nachgewiesen (Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie numerische Aberrationen der Chromosomen 7 und 10).

Es wurden hier nicht nur Glioblastome und Oligodendrogliome untersucht, sondern auch andere Gliomentitäten. Die einzelnen Subtypen teilten sich wie folgt auf (insgesamt 52 Gliome):

- Pilocyrtische Astrocytome (hier mit 5 Tumoren vertreten),
- diffuse und anaplastische Astrocytome (hier insgesamt 5 Tumoren),
- Glioblastome (hier 30 Tumoren),
- Oligodendrogliome (hier 6 Tumoren),
- Oligoastrocytome (hier 4 Tumoren),
- Ependymome (hier 2 Tumoren).

Zur Detektion der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q wurden locusspezifische Sonden eingesetzt, zum Nachweis der Chromosomen 7 und 10 Zentromersonden.

Aus diesen Hybridisierungen ergaben sich interessante Ergebnisse:

Deletionen des chromosomalen Bereiches 1p36 konnten am häufigsten in diffusen und anaplastischen Astrocytomen nachgewiesen werden (60% dieser Astrocytome), gefolgt von Glioblastomen mit 37%. Deletionen von 1p36 konnten hingegen nur in 20% der Oligodendrogliome detektiert werden, obgleich diese Aberration als typisch für diese Gliomentität gilt.

Deletionen der chromosomalen Region 19q – ebenfalls als charakteristisch für Oligodendrogliome beschrieben – traten mit jeweils etwa 60% in Oligodendrogliomen, Glioblastomen, diffusen und anaplastischen Astrocytomen auf. Diese Aberration ließ sich ebenfalls in 50% der Oligoastrocytome und in 40% der pilocytischen Astrocytome nachweisen.

Zugewinne von Chromosom 7 konnten in 37,5% der Glioblastome und in 33,3% der Oligodendrogliome dargestellt werden. In den übrigen Gliomentitäten, die in dieser Arbeit untersucht worden waren, zeigten sich keine Zugewinne dieses Chromosomes.

Deletionen von Chromosom 10 wurden, wie auch Zugewinne von Chromosom 7, nur in Glioblastomen und Oligodendrogliomen nachgewiesen. Diese Aberration wurde in 66,6% der Oligodendrogliome und in 62,5% der Glioblastome detektiert.

Folglich konnten genetische Aberrationen, wie sie in der Literatur für bestimmte Gliome beschrieben worden sind, auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, wenn auch mit einer anderen Häufigkeitsverteilung.

Weiterhin war auffällig, dass Deletionen der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q mit zunehmender Häufigkeit bei anaplastischen Tumorformen auftraten (neben ihrem Auftreten im Glioblastoma multiforme), was vermutlich im Zusammenhang mit den Tumorsuppressorgenen steht, die in diesen chromosomalen Bereichen lokalisiert sind.

Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 traten neben dem Glioblastom relativ häufiger in anaplastischen als in diffusen Oligodendrogliomen auf. Auch hierfür können Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, die auf diesen Chromosomen lokalisiert sind, verantwortlich sein.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu überprüfen, ob die Ergebnisse, die anhand der FISH ermittelt werden konnten, auch durch die zytogenetische Karyotypisierung nachweisbar waren. Dies ist von Bedeutung, da sich die FISH als Untersuchungsmethode bei der Gliomdiagnostik anbietet, wenn eine Karyotypisierung nicht möglich ist. Denn während für diese zytogenetische Methode aufwändige Zellkulturen

notwendig sind, kann eine FISH auch an Interphasekernen, beispielsweise in Form von Tumorausstrichpräparaten, durchgeführt werden.

20 der 52 Gliome, die an dieser Stelle untersucht worden waren, waren karyotypisiert worden. Beim Vergleich der Ergebnisse aus beiden Untersuchungstechniken ergab sich eine Übereinstimmung in 9/20 Fällen. Doch muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass sich bei Gliomen die einzelnen Zellen in ihrem genetischen Staus zum Teil stark voneinander unterscheiden. Diese für Gliome typische genetische Heterogenität führt dazu, dass mit verschiedenen Untersuchungsmethoden differente Ergebnisse ermittelt werden können, da stets unterschiedliche Zellkerne untersucht werden.

Prinzipiell jedoch können die genetischen Aberrationen, die in der vorliegenden Arbeit von Interesse waren, sowohl mittels FISH als auch durch Karyotypisierung nachgewiesen werden. Somit kann die Hybridisierungstechnik durchaus als sinnvolle Ergänzung zur Karyotypisierung eingesetzt werden.

Die enorme Heterogenität von Gliomen führt jedoch auch dazu, dass aktuell eine zuverlässige Einteilung von Gliomen auf genetischer Basis nicht erfolgen kann. Vielmehr bleibt die histomorphologische Klassifikation Methode der Wahl.

## Summary

### **Study of genetic heterogeneity of human gliomas using Fluorescence- In Situ-Hybridization of interphase nuclei and chromosomes**

Diseases of cardiovascular system constitute the main cause of death in central- European countries, followed by cancer- related diseases. At these, intracranial tumors – as measured by the total number of neoplasia – compose a part of 5%.

With a percentage of 60%, glioma, originating from brain tissue, form the greatest part of these tumors.

The several glioma subtypes are divided in a classification system of world's health organization (WHO), basing upon histomorphological features.

According to numerous publications, these tumors are in addition to histomorphology characterized by genetic particularities:

As an example, deletions of the chromosomal regions 1p36 and 19q are considered to be typical alterations in oligodendrogliomas. Glioblastomas on the contrary feature gains of chromosome 7 and losses of chromosome 10 as a genetic particularity.

In the present paper, these genetic aberrations could be detected by Fluorescence- In situ-Hybridization (FISH) (deletions of the regions 1p36 and 19q as well as aberrations of the chromosomes 7 and 10).

Beside glioblastomas and oligodendrogliomas, further glioma subtypes have been investigated (collectively 52 gliomas):

- Pilocytic astrocytomas (represented by 5 tumours)
- diffuse and anaplastic astrocytomas (represented by 5 tumours)
- glioblastomas (represented by 30 tumours)
- oligodendrogliomas (represented by 6 tumours)
- oligoastrocytomas (represented by 4 tumours)
- ependymomas (represented by 2 tumours)

To detect the chromosomal regions 1p36 and 19q, locus- specific probes were used, whereas centromer- secific probes were applied for detection of the chromosomes 7 and 10.

The hybridizations resulted in the following interesting findings:

Deletions of the chromosomal region 1p36 could be detected most frequently in diffuse and anaplastic astrocytomas (60% of these astrocytomas), followed by glioblastomas (37%).

Deletions of 1p36 appeared only in 20% of oligodendrogliomas, whereupon this alteration is said to be typical for this glioma subtype.

Deletions of the chromosomal region 19q – considered to be specific for oligodendrogliomas as well – appeared most often in oligodendrogliomas, glioblastomas, diffuse and anaplastic astrocytomas (in each case 60%). This genetic aberration could also be detected in 50% of oligoastrocytomas and in 40% of pilocytic astrocytomas.

Gains of chromosome 7 could be verified in 37.5% of glioblastomas and in 33.3% of oligodendrogliomas. Gains of this chromosome could not be detected in other glioma subtypes examined in the present paper.

Losses of chromosome 10 could be proved – similar to gains of chromosome 7 – only in glioblastomas and oligodendrogliomas. This aberration has been detected in 66.6% of oligodendrogliomas and in 62.5% of glioblastomas.

Consequently, genetic aberrations, which are – according to publications – considered to be distinctive for several gliomas, could be detected in the present paper, too, even though in a different frequency distribution.

Furthermore, it was striking, that deletions of the chromosomal regions 1p36 and 19q appeared with an increasing frequency in anaplastic tumorforms (in addition to their appearance in glioblastoma multiforme), what is probably correlated with tumor suppressor genes, being located in these chromosomal areas.

Gains of chromosome 7 and losses of chromosome 10 could be detected in addition to glioblastoma according to the statistics more frequently in anaplastic than in diffuse oligodendrogliomas. This might be due to several tumor suppressor genes or protooncogenes located on these chromosomes as well.

This paper was furthermore focusing on the question, whether the results, deriving from FISH, could be proved by cytogenetic karyotypisation.

This is of importance, because FISH could be used as a technical tool in glioma diagnostics, when karyotypization as cytogenetic tool cannot be performed. For karyotypization, complex cell culture is necessary, whereas FISH can be performed with interphase cell nucleus, e.g. as tumor smear preparations.

20 of collectively 52 gliomas had been examined by both FISH and karyotypization.

Comparing the results of both tools, an agreement has been demonstrated in 9/20 cases.

But at this point, it has to be referred to the fact, that the several glioma cells are very different regarding their genetic status. Due to this genetic heterogeneity, which is typical for gliomas, different results can be achieved by the several investigation techniques. Since by the different techniques, always different cells are examined.

Nevertheless, the genetic alterations, being of interest in the present paper, could be detected by both FISH and karyotypization.

Consequently, the hybridization technique can be applied as a reasonable addition to karyotypisation.

Yet, the enormous heterogeneity of gliomas leads to the fact, that a reliable classification of glioma, based on genetics, is currently not possible.

In fact, the histomorphological classification stays the manner of first choice.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Thematische Einführung**

An zweiter Stelle der Todesursachenstatistik der westlichen Welt stehen maligne Erkrankungen, die nur von Erkrankungen des Herz- Kreislauf- Systemes übertroffen werden. Gemessen an der Gesamtzahl dieser Neoplasien bilden intrakranielle Tumoren einen Anteil von etwa 2- 5% (Hofer et al., 1999; G. Reifenberger, V.P. Colins; 2004). Bei diesen Neubildungen handelt es sich mit fast 60% zum größten Teil um so genannte Gliome (Hofer et al., 1999), die aus Zellen der Astroglia und / oder Oligodendroglia entstehen. Statistiken zufolge sind Gliome für etwa 7% des tumorbedingten Verlustes an Lebensjahren verantwortlich (G. Reifenberger, V.P. Colins; 2004).

### **2.2 Tumorentstehung und genetische Veränderungen**

Heutigen Erkenntnissen zufolge entstehen Tumoren einerseits durch exogene Noxen, die zu akkumulierten Veränderungen des Genmaterials führen. Andererseits können sich Neoplasien durch genetisch determinierte Faktoren entwickeln.

Für die Tumorentstehung können Verluste von so genannten Tumorsuppressorgenen, die die Teilungsaktivität von Zellen hemmen und somit einer malignen Entartung vorbeugen, verantwortlich sein.

Ursächlich kommen aber auch Zugewinne von Proto- Onkogenen infrage, die die Zellproliferation positiv beeinflussen.

Durch den so verursachten Verlust der Regulationsfähigkeit des Zellzyklus immortalisieren die Zellen und es bilden sich Neoplasien. Bedingt durch Veränderungen der Oberflächenstruktur werden diese neoplastischen Zellen nicht durch das Immunsystem erkannt, oder aber es fehlen immunologische Angriffspunkte. Weiterhin erlangen einige dieser Zellen die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung.

## Geschichte der Tumorzytogenetik

Boveri stellte schon 1914 die Hypothesen auf, dass die Tumorentstehung Folge eines abnormen Chromosomensatzes sei, und eine Neoplasie entwickle sich aus einer einzelnen Zelle, die ursprünglich über einen normalen Chromosomensatz verfügte (Boveri, 1914).

Mit der Aufschlüsselung der Erbsubstanz durch Watson und Crick im Jahre 1953 und die Entwicklung der Zytogenetik mit Darstellung des menschlichen Chromosomensatzes wurde der Weg für die moderne Tumorzytogenetik gebahnt (Watson und Crick, 1953).

Die Grundlage für die Tumorzytogenetik bilden außerdem Bänderungstechniken, welche anfangs der 70er Jahre entwickelt wurden.

Mithilfe fortschrittlicher zytogenetischer und molekulargenetischer Methoden konnten Aberrationen innerhalb der Chromosomen wie beispielsweise Translokationen, Inversionen oder Deletionen optisch dargestellt werden.

Die Möglichkeiten dieser konventionellen Zytogenetik, die im Wesentlichen an die Lichtmikroskopie gebunden ist, werden jedoch durch unterschiedliche Faktoren begrenzt. Von technischer Seite her ist hier insbesondere das mikroskopische Auflösungsvermögen zu nennen. Aber auch der Kondensationsgrad der Chromosomen zum Zeitpunkt der Metaphase beeinflusst die Qualität von Bänderungstechniken und damit die optische Darstellung von Chromosomen maßgeblich.

Die hoch auflösende Methode der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung (FISH) als molekularzytogenetisches Verfahren, das Mitte der 80er Jahre entwickelt wurde, ermöglichte erstmals die detaillierte Analyse einzelner chromosomaler Regionen.

## 2.3 Neuroepitheliale Tumoren

### 2.3.1 Epidemiologie, Klassifikation, Klinik, Therapie und Prognose von neuroepithelialen Tumoren

#### Epidemiologie

Die Inzidenz von Hirntumoren liegt weltweit bei etwa 8- 9/ 100000 Einwohner, die Prävalenz bei 60/ 100000 Einwohnern.

Das männliche Geschlecht ist gegenüber dem weiblichen mit einem Verhältnis von 1,3:1 häufiger von dieser Erkrankung betroffen (G. Reifenberger, V.P. Colins; 2004).

Des Weiteren zeigt sich bei Gliomen eine altersabhängige Verteilung:

Im Kindes- und Jugendalter überwiegen bei den glialen Tumoren pilocytische Astrocytome und Ependymome, die in diesem Alter zu über 70% infratentoriell lokalisiert sind.

Bei Patienten zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr treten gehäuft Oligodendrogliome sowie diffuse und anaplastische Astrocytome auf, welche sich vorwiegend supratentoriell in den Großhirnhemisphären manifestieren. Das Glioblastoma multiforme wird weitestgehend nach dem 50. Lebensjahr apparent und ist ebenfalls vorwiegend supratentoriell lokalisiert.

#### Klassifikation

Moderne Therapieverfahren in der klinischen Neuroonkologie hängen im Wesentlichen von einer exakten Tumorklassifikation ab.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat ein Klassifikationssystem entwickelt, wonach Gliome histomorphologisch in sechs Gruppen eingeteilt werden:

	WHO- Gradeinteilung
<b>Astrocytäre Tumoren</b>	
Pilocytisches Astrocytom	I
Fibrilläres, gemistocytisches, diffuses Astrocytom	II
Anaplastisches Astrocytom	III
Glioblastom	IV
<b>Oligodendrogliale Tumoren</b>	II, III
<b>Ependymale Tumoren</b>	
Ependymom	I
Subependymom	I
<b>Choroidplexus- Tumoren</b>	
Plexuspapillome	I, II
<b>Pinealis- Tumoren</b>	I- IV
<b>Embryonale Tumoren</b>	
Medulloblastom	IV
Primitive neuroektodermale Tumoren (PNET)	IV

Ein weiteres Klassifikationssystem ist das nach Daumas- Duport (Daumas- Duport C, 1988), welches ebenfalls auf histologischen Merkmalen basiert. Hier zählen zu den Beurteilungskriterien beispielsweise nukleäre Atypie, mitotische Aktivität, Endothelproliferation und Nekrose. Diese Kriterien haben auch Eingang in die WHO-Klassifikation gefunden.

Das Klassifikationssystem nach Daumas- Duport ist im Folgenden tabellarisch dargestellt (Abbildung 1).

Gliatumoren	WHO	GradI	GradII	GradIII	GradIV
Histopathologie (Daumas-Duport)		keine Kriterien	1 Kriterium: nukleäre Atypie	2 Kriterien: nukleäre Atypie + mitotische Aktivität	3 Kriterien: nukleäre Atypie + Mitose + endotheliale Proliferation +/- Nekrosen
Astrocytäre Tumoren	Pilocytisches Astrocytom Astrocytom Anaplastisches Astrocytom Glioblastoma multiforme	+	+	+	+
Oligodendrogliale Tumoren	Oligodendrogliom anaplastisches OD*		+	+	
Mischgliome	Oligoastrocytom Anaplastisches OA*		+	+	

\* OD= Oligodendrogliom; OA= Oligoastrocytom

**Abbildung 1: WHO- Klassifikation und histopathologische Einteilung der Gliome; Modifiziert nach Hofer et al., 1999**

### Progressionsmodell

Das Tumorprogressionsmodell stellt eine Progression niedergradiger Gliome zu höhergradigen dar. Gemeint ist hiermit der Übergang von niedermalignen glialen Tumoren des WHO- Grades II in anaplastische Tumorformen (WHO- Grade III) oder zum Glioblastoma multiforme (WHO- Grad IV).

Eine solche Malignisierung tritt vor allem bei jüngeren Patienten auf.

Im Gegensatz zu diesem Progressionsmodell kann sich ein Glioblastom jedoch auch de novo entwickeln, ohne dass eine andere gliale Vorstufe vorlag. In diesem Fall spricht man von einem primären Glioblastom, bei Entstehung aus niedriggradigen oder anaplastischen Astrocytomen von einem sekundären.

Die Malignisierung zeigt sowohl auf histologischer als auch auf molekulargenetischer Ebene einige Besonderheiten:

Die Histologie zeichnet sich durch vermehrtes Auftreten von Neovaskularisationen, Zellproliferationen und Nekrosen als Zeichen des schnellen Zellwachstumes aus.

Vom genetischen Aspekt her spielt hierbei beispielsweise das Tumorsuppressorgen p53 eine entscheidende Rolle, welches nach Hofer et al (1999) bei De- Novo- Glioblastomen intakt ist, während es bei sekundären Glioblastomen in mutierter Form vorliegt.

Zum Allelverlust des Genes für p53 kann es unter Anderem durch Deletionen des kurzen Armes von Chromosom 17 (17p-) kommen.

Doch auch Veränderungen von weiteren Genen, die Zellzyklus oder Apoptose regulieren, kommt eine wichtige Bedeutung bei der Tumorprogression zu. Solche Gene, die sich auf den Chromosomen 7 und 10 sowie innerhalb der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q befinden, werden in den Kapiteln 2.3.3. und 2.3.4. erörtert.

### Morphologie und Klinik

Zu den Regionaleffekten von Gliomen gehören Kompression, Invasion und Destruktion von Hirngewebe. Die Parenchymfunktion wird durch tumorbedingte arterielle und venöse Hypoxie, Konkurrenz um Nährstoffe, metabolische Endprodukte und Zellmediatoren wie Zytokine gestört. Aus den oben genannten Regionaleffekten und aus der Störung der Parenchymfunktion resultiert die unterschiedliche klinische Symptomatik, wie sie bei Gliom-Patienten beobachtet werden kann.

#### *Pilocyrtische Astrocytome:*

Pilocyrtische Astrocytome zeichnen sich morphologisch durch eine umschriebene Infiltration von Hirngewebe aus.

Aus histologischer Sicht sind als Besonderheit die so genannten Rosenthal'schen Fasern und eosinophile Granularkörperchen zu erwähnen, die die pilocyrtischen Astrocytome charakterisieren.

Klinisch können aufgrund der vorwiegend infratentoriellen Lokalisation im Kleinhirn (im Kindesalter) Symptome wie Übelkeit, Erbrechen oder Ataxie überwiegen.

#### *Diffuse und anaplastische Astrocytome:*

Histologisch kann man drei Varianten von Astrocytomen unterscheiden (Bruce et al., 2001):

- Die protoplasmatische Form, die über ein prominentes Zytoplasma verfügt und vor allem kortikal entsteht.
- Das überwiegend in den Großhirnhemisphären lokalisierte gemistocytische Astrocytom ist gekennzeichnet durch große, runde Zellen und eosinophiles, exzentrisches Zytoplasma.
- Die häufigste histologische Variante stellt jedoch das fibrilläre Astrocytom dar. Es zeichnet sich durch schmale, ovale und gut differenzierte Zellen aus.

Anaplastische Astrocytome sind charakterisiert durch eine erhöhte Anzahl von Mitosen, vermehrtes Zytoplasma und zunehmende Zell- und Kernpolymorphien als Zeichen des aggressiven Wachstums.

Klinisch können sich diffuse und anaplastische Astrocytome durch fokalneurologische Defizite je nach Tumorlokalisierung manifestieren, ebenso durch Kopfschmerzen oder eine Depression des mentalen Status.

#### *Glioblastome:*

Histologisch handelt es sich hierbei um außerordentlich zellreiche Tumoren mit häufig mehrkernigen, anaplastischen Zellen und zahlreichen Kernatypien.

Das Glioblastoma multiforme kann wie die übrigen astrocytären Tumoren durch Kopfschmerzen, Krampfanfälle, fokalneurologische Defizite oder Veränderungen des mentalen Status manifest werden (Uddin et al., 2005).

#### *Oligodendrogliome:*

Oligodendrogliome stellen makroskopisch solide, relativ gut differenzierte Tumoren dar, welche vor allem im Marklager lokalisiert sind. Häufig kalzifizieren sie, aber auch zystische Umwandlungen, Hämorrhagien und Nekrosenbildung sind möglich.

Auf mikroskopischer Ebene sind die charakteristischen perinukleären Halos zu nennen, die von fixationsbedingter Autolyse zeugen.

Die rundlichen bis ovalen Zellkerne sind uniform. Zell- und Kernpolymorphien sowie eine verstärkte mitotische Aktivität, Nekrosen und Zellatypien treten vermehrt beim Übergang in die anaplastische Tumorform auf.

Aufgrund des langsamen Wachstums dieser Tumoren werden Symptome häufig erst nach Jahren manifest, wobei ein Grand- Mal- Anfall das häufigste Erstsymptom darstellt.

Aufgrund des intrakraniellen Wachstums und der hieraus resultierenden Erhöhung des intrakraniellen Druckes können sich fokalneurologische Defizite und Kopfschmerzen manifestieren (Peretti et al., 2004).

#### *Oligoastrocytome:*

Oligoastrocytome sind durch histomorphologische Merkmale von Oligodendrogliomen und Oligoastrocytomen gekennzeichnet. Klinisch können sie sich ähnlich wie diese beiden Tumorentitäten verhalten.

*Ependymome:*

Ependymome zeichnen sich durch ihre Rarität aus.

Die klinischen Zeichen von Ependymomen sind mit denen anderer Gliome vergleichbar.

Häufig treten Ependymome auch außerhalb des Kraniums im Spinalkanal (beispielsweise am Filum terminale) auf, was durch die Kompression von Rückenmark oder Nervenwurzeln symptomatisch werden kann (zum Beispiel in Form von radikulärer Symptomatik, Störungen der zentralen Blasenentleerung bis hin zum kompletten Querschnittssyndrom).

Therapie

Die Therapie maligner Gliome ist multidisziplinär und kann neben den Standardverfahren wie operative Versorgung, Radio- und Chemotherapie auch experimentelle Optionen wie Gentherapie oder Immunmodulation beinhalten.

Abbildung 2 stellt schematisch die verschiedenen Therapiekonzepte bei Gliomen dar (Pfeil nach oben bedeutet Vorzug geben). Anschließend sind die Ergebnisse nochmals im Text erläutert.

	<b>Primärtherapie</b>	<b>Rezidivtherapie</b>
<b>Diffuses Astrozytom WHO-Grad II</b>	Resektion oder Biopsie und Zuwarten oder Resektion oder Biopsie und Strahlentherapie (↑)	Resektion und Strahlentherapie oder Chemotherapie oder Zuwarten (↑)
<b>Oligodendrogliom und Oligoastrocytom WHO-Grad II</b>	Resektion oder Biopsie und Zuwarten oder Resektion oder Biopsie und Chemotherapie oder Strahlentherapie (↑)	Resektion und Chemotherapie oder Strahlentherapie oder Zuwarten (↑)
<b>Anaplastisches Astrozytom WHO- Grad III</b>	Resektion oder Biopsie und Strahlentherapie (↑↑) und/oder <sup>2</sup> Chemotherapie	Resektion und Chemotherapie oder Strahlentherapie (↑)
<b>Anaplastisches Oligodendrogliom und Oligoastrocytom WHO-Grad III</b>	Resektion oder Biopsie und Chemotherapie oder Strahlentherapie <sup>2</sup> (↑) oder kombinierte Behandlung <sup>3</sup>	Resektion und Chemotherapie oder Strahlentherapie (↑)
<b>Glioblastom WHO-Grad IV</b>	Resektion oder Biopsie und Strahlentherapie (↑↑) und Chemotherapie (↑)	Resektion und Chemotherapie oder Strahlentherapie (↑)

**Abbildung 2: Optionen für die Primär- und Rezidivtherapie der Gliome<sup>1</sup> ; Modifiziert nach: Stupp et al., 2005**

<sup>1</sup> Fragestellung der NOA-04-Studie

<sup>2</sup> Fragestellung der EORTC-Studie 26951

<sup>3</sup> Fragestellung der EORTC-Studie 26981/22981

*Operative Therapie von Gliomen:*

Zur Diagnosesicherung von Gliomen können sowohl eine Biopsie als auch eine Tumorresektion erfolgen.

Die operative Therapie in mikrochirurgischer Technik erfolgt in erster Linie als palliative Maßnahme, da Gliome zumindest mikroskopisch immer infiltrativ wachsen (Hofer et al., 1999). Die Tumorresektion zur Dekompression und histologischen Diagnosesicherung wird primär bei Patienten mit einem Karnofsky- Index von mindestens 60- 70 durchgeführt (siehe Abbildung 3).

Als Beispiel seien Oligodendrogliom- Patienten genannt, bei denen nach einigen Arbeiten eine Tumorresektion positiv mit der Prognose korreliert (Mork et al., 1985; Lindegaard et al., 1987; Shaw et al., 1992; Whitton et al., 1990; Puduvalli et al., 2003;).

Zur Optimierung der Tumorresektion insbesondere bei Glioblastomen kann die intraoperative Fluoreszenzdetektion mit 5- Aminolävulinsäure (5- ALA) erfolgen. Studien belegen, dass bei Glioblastom- Patienten eine Resektion des gesamten aufnehmenden Tumors das Überleben der Patienten verbessert (Stummer et al., 2008).

Die möglichst frühe postoperative kernspintomographische Kontrolle mit Kontrastmittel vom Gadolinium- Typ dient der Beurteilung des Resektionsausmaßes.

*Radiotherapie von Gliomen:*

Bei diffusen Astrocytomen, Oligodendrogliomen und Oligoastrocytomen, die als WHO- Grad II eingestuft werden, wird in der Regel nach bioptischer oder operativer Diagnosesicherung keine Radiatio angeschlossen. Denn bei diesen Gliomen führt eine Radiatio zwar zu einem positiven Effekt bezüglich der lokalen Tumorkontrolle, nicht aber hinsichtlich des 5- oder 10- Jahresüberlebens, wie sich aus der EORTC- Studie "22845" ergibt.

Auch in zuvor durchgeführten Studien bei Patienten mit Oligodendrogliomen des WHO- Grades II stellten sich für die Strahlentherapie häufig keine signifikanten Vorteile dar (Kros et al., 1988; Shaw et al., 1992; Nijjar et al., 1993; Sun et al., 1988; Fortin et al., 1999; Reedy et al., 1983; Westergaard et al., 1997).

Auch wegen der Gefahr der Leukenzephalopathie (Fortin et al., 1999) wird eine Radiatio bei diesen Gliomen folglich erst bei einer Tumorprogression in anaplastische Formen empfohlen (Walker et al., 2001).

Eine Radiatio kann aber durchgeführt werden, wenn eine Operation nicht möglich ist oder im Tumorrezidiv bei noch nicht erfolgter Bestrahlung.

Bei Gliomen des WHO- Grades III und IV hingegen ist die Radiotherapie mittlerweile als Standardbehandlung etabliert.

Bei Glioblastom- Patienten erfolgt nach Biopsie oder Resektion eine Radiatio der erweiterten Tumorregion in Kombination mit Chemotherapie (siehe unten).

Bei anaplastischen Oligodendrogliomen oder Oligoastrocytomen (WHO- Grad III) erfolgt eine Radiatio dann, wenn das Patientenalter über 65 Jahren liegt (ansonsten wird eine Chemotherapie durchgeführt).

Es gibt jedoch auch Studien, die den Benefit einer Radiatio bei Patienten mit anaplastischen Oligodendrogliomen anzweifeln. (Puduvalli et al., 2003).

Auch anaplastische Astrocytome können bestrahlt werden (in Kombination mit Chemotherapie).

Eine Radiatio bei Gliomen erfolgt mit einer Gesamtdosis von 60 Gy zu 2 Gy- Einzeldosen (an 5 Tagen in der Woche) über einen Zeitraum von insgesamt sechs Wochen. Die Fraktionierung der Strahlung (Einzeldosen zu 2 Gy) erfolgt zur Minderung der unerwünschten Strahlenwirkungen und zur Erhöhung der Gesamtstrahlendosis.

#### *Chemotherapie von Gliomen:*

Eine Tabelle, die die Abkürzungen der einzelnen Chemotherapeutika erläutern soll, ist an dieses Kapitel angefügt (Abbildung 3).

Als allgemeine Voraussetzung für eine Chemotherapie von Gliomen gelten ein Karnofsky-Index größer als 60 (siehe Abbildung 4), das Fehlen schwerwiegender pulmonaler und kardiovaskulärer Erkrankungen und im Referenzbereich liegende Leber- und Nierenwerte. Auch die hämatologischen Parameter müssen im Normbereich sein.

Desweiteren muss darauf hingewiesen werden, dass die Indikationsstellung zur Chemotherapie auf den individuellen Patienten und dessen klinischen Befund abgestimmt sein muss.

Bei *Gliomen des WHO- Grades II* besteht in der Regel keine Indikation zur Chemotherapie. Eine Indikationsstellung kann jedoch im Tumorrezidiv nach erfolgter Strahlentherapie auf individueller Basis erfolgen.

Bei Patienten mit *anaplastischen Oligodendrogliomen oder Oligoastrocytomen* (WHO- Grad III) kann eine Chemotherapie durchgeführt werden.

Diese Tumoren haben sich schon in frühen Studien als besonders chemosensitiv erwiesen, eine operative Primärintervention sollte jedoch immer angestrebt werden (Cairncross et al., 1988; Hofer et al., 1999).

So liegt die Ansprechwahrscheinlichkeit von anaplastischen Oligodendrogliomen und Oligoastrocytomen auf eine PCV- Chemotherapie zwischen 60 und 80% (Glass et al., 1992; Kyritsis et al., 1993; Kim L et al., 1996; Cairncross et al., 2004).

Als Chemotherapeutika bei diesen Gliomen kamen neben dem PCV- Schema (Jellinger et al., 1993) auch die Wirkstoffe BCNU (Green et al., 1983), CCNU (Trojanowski et al., 1989) und Procarbazin (Green et al., 1983) zum Einsatz.

Auch bei jungen Patienten (Alter < 40 Jahre), die an einem *anaplastischen Astrocytom* leiden, wird zunehmend der Chemotherapie, meist nach dem PCV- Schema, der Vorzug gegenüber der Strahlentherapie gegeben.

Bei *Glioblastom*- Patienten erfolgt nach Biopsie bzw. Resektion zur sich anschließenden Radiatio eine parallele Chemotherapie mit Temozolomid (Temodal®; 75mg/m<sup>2</sup>/KOF) über den Zeitraum der Radiatio (6 Wochen). Nach einer 28- tägigen Pause schließen sich 6 Zyklen Temodal- Chemotherapie an (200mg/ m<sup>2</sup>/ KOF).

Eine Abweichung von diesem Protokoll und die Gabe alleiniger Chemotherapie ist in der Regel nur im Rahmen der NOA 8- Studie sinnvoll. Hier wird untersucht, ob bei Patienten, die älter als 65 Jahre sind, die Chemotherapie einer Radiatio der erweiterten Tumorregion gleichwertig ist.

Bei dem Wirkstoff Temozolomid (Handelsname Temodal®) handelt es sich um ein alkylierendes Zytostatikum (Stupp et al., 2005). Dieses hat gegenüber anderen Chemotherapeutika den Vorteil, nicht myelosuppressiv zu wirken (Cairncross et al., 1994; van den Bent et al., 2003; Brada et al., 2003; Chahlavi et al., 2003).

Wie Arbeiten von Stupp et al. (2005) belegen konnten, verlängert insbesondere eine Behandlung mit Temozolomid die Überlebenszeit bei Gliompatienten.

Bei der Rezidivtherapie des Glioblastoma multiforme werden die Substanzen Irinotecan (Handelsname: Campto®, Camptosar®) und Bevacizumab (Handelsname: Avastin®) eingesetzt, die eine effektive Therapiemöglichkeit bei moderater Toxizität darstellen (J.J. Vredenburgh et al., 2007).

Bei Irinotecan handelt es sich um einen Hemmer der Topoisomerase I, während Avastin ® einen monoklonalen Antikörper (IgG<sub>1</sub>) darstellt, der an den für die Angiogenese verantwortlichen Wachstumsfaktor VEGF bindet.

Hier soll noch darauf eingegangen werden, dass der genetische Status von Gliomen zum verbesserten Ansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika beitragen kann:

So ergibt sich aus Studien (Smith et al., 2000; Chahlavi et al., 2003), dass die Ansprechrate auf Temozolomid bei Patienten mit Oligodendrogliomen vom WHO- Grad II und III als auch mit Oligoastrocytomen 90% betrug, sofern diese Neoplasien einen Verlust des Chromosomenarmes 1p aufwiesen. Bei intakter Region sprachen lediglich ein Drittel der Patienten auf dieses Chemotherapeutikum an, obwohl Geschlecht, Alter und Tumorgrad bei den untersuchten Patienten vergleichbar waren (Smith et al., 2000; Chahlavi et al., 2003).

Cairncross et al. konnten bereits 1998 nachweisen, dass sich die Ansprechrate auf PCV-Chemotherapie bei anaplastischen Oligodendrogliomen mit Verlusten der chromosomalen Bereiche 1p und 19q verbessert.

Wemmert et al. (2005) gelang der Nachweis, dass Glioblastom- Patientin unter anderem mit einem Verlust von Chromosom 10 von einer Temozolomid- Chemotherapie profitieren.

<b>100%</b>	Der Patient äußert keine Beschwerden, keine Zeichen der Krankheit erkennbar.
<b>90 %</b>	Der Patient ist fähig zu normaler Aktivität, hat kaum oder nur geringe Symptome.
<b>80 %</b>	Normale Aktivität ist für den Patienten mit Anstrengung möglich; Symptome sind deutlicher.
<b>70 %</b>	Der Patient kann sich noch selbst versorgen, normale Aktivität oder Arbeit ist aber nicht möglich.
<b>60 %</b>	Der Patient benötigt Hilfestellung, ist aber noch in den meisten Bereichen selbständig.
<b>50 %</b>	Hilfe und medizinische Versorgung wird oft in Anspruch genommen.
<b>40 %</b>	Der Patient gilt durch seine Einschränkungen als behindert, qualifizierte Hilfe wird benötigt.
<b>30 %</b>	Erhebliche Einschränkungen behindern den Patienten schwer. Eine stationäre Aufnahme ist erforderlich.
<b>20 %</b>	Schwerkrank. Intensive medizinische Maßnahmen sind erforderlich.
<b>10 %</b>	Der Patient ist sterbend (moribund), der körperliche Verfall ist unaufhaltsam.
<b>0 %</b>	Tod.

**Abbildung 3: Karnofsky- Index**

<b>PCV</b>	<b>ACNU</b>	<b>BCNU</b>	<b>CCNU</b>	<b>VM26</b>
Procarbacin, Alkylanz; CCNU; Vincristin, Vincaalkaloid	Nimustin; 1-(4-Amino-2- methyl-5- pyrimidinyl)methyl- 3-(2-chloroethyl)-3- nitrosourea; Nitrosoharnstoff, Alkylanz	Carmustin; <b>Bis- Chloro-</b> Nitrosourea; Nitrosoharnstoff, Alkylanz	Limustin;  <b>Chloroethylecyclo-</b> hexylnitrosourea  Nitrosoharnstoff, Alkylanz	Tenoposid; Topoisomerase- II- Hemmer

**Abbildung 4: Abkürzungen der Chemotherapeutika**

## Prognose

### *Pilocytisches Astrocytom:*

Das pilocytische Astrocytom weist mit einer 5- Jahres- Überlebensrate von nahezu 100% und einer 10- Jahres- Überlebensrate von 96% eine exzellente Prognose auf (Reifenberger, Collins, 2004).

### *Astrocytome WHO- Grad II und III:*

Die Prognose von diffusen und anaplastischen Astrocytomen hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. So spielen das Patientenalter bei Diagnosestellung, Karnofsky- Index, Resektabilität sowie Gradeinteilung nach der Weltgesundheitsorganisation eine wichtige Rolle.

Die mediane Überlebenszeit beträgt bei Astrocytomen vom WHO- Grad II bei fehlender Therapie etwa fünf Jahre, bei anaplastischen Formen (WHO- Grad III) zwei bis drei Jahre (Reifenberger, Collins, 2004).

### *Glioblastoma multiforme:*

Die durchschnittliche Überlebenszeit beim untherapierten Glioblastom ist mit etwa einem Jahr infaust (0,7 bis 1 Jahr; Nigro et al., 2005).

### *Oligodendrogliome:*

Die postoperative Überlebenszeit von Oligodendrogliomen vom WHO- Grad II wird zwischen 3,5 Jahren (Dehghani et al., 1998) und 16,7 Jahren (Olson et al., 2000) angegeben, bei anaplastischen Oligodendrogliomen zwischen 0,9 Jahren (Dehghani et al., 1998) und 7,3 Jahren (Puduvalli et al., 2003).

Werden anaplastische Oligodendrogliome zusätzlich chemotherapeutisch und strahlentherapeutisch versorgt, verlängert sich die TTP (Time to Progression), die Zeit bis zur Tumorprogression, von 39 auf 86 Monate, das Gesamtüberleben von 46 auf 91 Monate und die 5- Jahres- Überlebensrate von 36 auf 80% (Felsberg et al., 2004).

Bei niedriggradigen Oligodendrogliomen verbessert sich die Prognose durch diese adjuvanten Therapieformen ebenfalls: Die progressionsfreie Zeit nimmt von 47 auf 57 Monate zu, die Gesamtüberlebenszeit von 105 auf 172 Monate und die 5- Jahres- Überlebensrate von 70 auf 92% (Felsberg, 2004).

### 2.3.2 Genetische Aberrationen in Gliomen

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zahlreiche Studien publiziert, die sich mit genetischen Aberrationen in Gliomen befassen haben.

Während über höhergradige astrocytäre Tumoren in den letzten Jahren zahlreiche molekular- und zytogenetische Arbeiten erschienen sind, ist über die Genetik von pilocytischen Astrocytomen noch vergleichsweise wenig bekannt.

Bisher wurden bei dieser Tumorentität in vielen Studien (Jenkins et al., 1989; Karnes et al., 1992; von Deimling et al., 1993) zytogenetisch unauffällige Karyotypen nachgewiesen.

Zu den genetischen Veränderungen, die in diesen Gliomen beschrieben wurden, zählen numerische Imbalancen der Chromosomen 7 und 8, seltener Veränderungen der Chromosomen 4, 11, 12, 15 und 20 (Collins, 1999).

Molekulargenetische Arbeiten zu pilocytischen Astrocytomen konzentrierten sich in erster Linie auf das Tumorsuppressorgen p53 (Kleihues et al., 1994; Hayes et al., 1999, Wemmert et al., 2006), wobei Hayes et al. in etwa der Hälfte dieser untersuchten Tumoren Mutationen von p53 darstellen konnten. Wemmert et al. (2006) konnten heterozygote Deletionen von p53 in allen untersuchten pilocytischen Astrocytomen nachweisen. Andere Arbeiten hingegen konnten keine p53- Mutationen in dieser Tumorentität detektieren (Kleihues et al., 1993; Ishii et al., 1998).

In diffusen Astrocytomen (WHO- Grad II) konnten Zugewinne von Chromosom 7 nachgewiesen werden, was auch als typisch für das Glioblastoma multiforme angesehen wird (Karnes et al., 1992; Thiel et al., 1993).

Reifenberger und Collins (2004) beschrieben eine Tri- beziehungsweise Polysomie des Chromosomes 7, die in 50% der untersuchten diffusen Astrocytome nachgewiesen werden konnte, sogar als häufigste Aberration in diesen Tumoren. Ebenso konnten Verluste von Chromosom 10 dargestellt werden, seltener Verluste von Chromosom 6 oder der Chromosomenarme 13q und 22q. Auch Zugewinne und Verluste von Chromosom 8 (Jenkins et al., 1989; Karnes et al., 1992) konnten in diesen Astrocytomen nachgewiesen werden. In diesen Astrocytomen vom WHO- Grad II konnten ebenso Sequenzverluste der chromosomalen Regionen 13q, 17p und 22q gezeigt werden (Collins VP, 1998), die bei einer Progression zu anaplastischen Tumoren (WHO- Grad III) vermehrt auftraten.

Neben den bereits in diffusen Astrocytomen nachgewiesenen Zugewinnen von Chromosom 7 sind anaplastische Astrocytome (WHO- Grad III) unter anderem gekennzeichnet durch

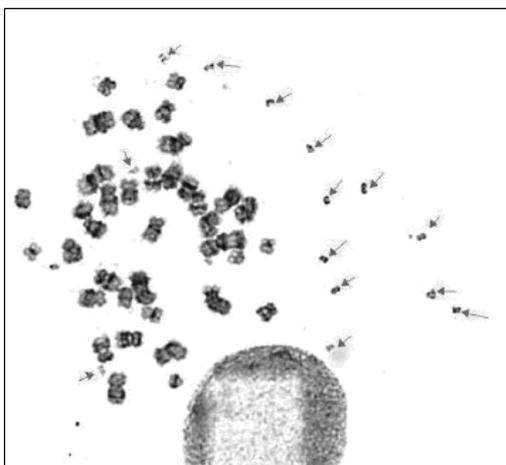
Verluste der Chromosomen 6 und 11 sowie der chromosomalen Regionen 9p und 22q (Collins VP, 1998).

Das Glioblastoma multiforme (WHO- Grad IV) wurde besonders häufig auf den genetischen Status hin untersucht. Typisch sind Kopienzahlvermehrungen der Chromosomen 7 und 10, auch CNAs oder Copy Number Aberrations genannt, wobei in der Regel Zugewinne von Chromosom 7 sowie Verluste von Chromosom 10 vorliegen (Smith et al., 2001; Loeper et al., 2001; Lopez-Gines C et al., 2005; Nigro et al., 2005).

Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 in Glioblastomen werden von Nigro et al. (2005) als schlechter prognostischer Faktor angesehen. Dies ist vermutlich unter anderem durch das EGFR- Gen bedingt, das auf Chromosom 7 (7p12) lokalisiert ist und für einen Rezeptor für Wachstumsfaktoren kodiert (Reifenberger, Collins, 2004).

Collins und Reifenberger konnten eine EGFR- Überexpression in 60% der primären Glioblastome nachweisen, seltener in sekundären Glioblastomen und in anderen astrocytären Gliomen.

Eine weitere Besonderheit in Glioblastomen ist das Auftreten so genannter Double- Minutes (Reifenberger, Collins, 2004; siehe hierzu Abbildung 5). Hierbei handelt es sich um kleine Fragmente extrachromosomaler DNA, die eine Manifestationsform von Genamplifikationen im Laufe der Tumorgenese sind. Double Minutes bestehen aus zirkulärer DNA und enthalten weder Zentromere noch Telomere. Häufig besitzen sie amplifizierte Onkogene, wodurch die Tumorzellen Wachstumsvorteile erlangen können (Barker, 1982).



**Abbildung 5: Karyogramm mit Darstellung von Double Minutes (s. Pfeile), Barker 1982**

Burton E et al. (2002) untersuchten den Zusammenhang zwischen genetischen Aberrationen in Glioblastomen und der Überlebenszeit der Patienten.

Bei den Patienten mit einer kürzeren Überlebenszeit fand man vor allem folgende genetische Veränderungen: Verluste von Chromosom 10 sowie der Chromosomenarme 6q und 9p und Zugewinne von 19q und 20q.

Bei Patienten mit längerer Überlebenszeit konnten Verluste von 19q detektiert werden, häufig in Kombination mit Verlusten von 1p.

Zugewinne von Chromosom 7 wurden bei 71% der Patienten mit kurzer Überlebenszeit und nur bei 46% der Langzeitüberlebenden detektiert.

Die häufigste Veränderung in Oligodendrogliomen des WHO- Grades II ist eine Kombination aus Verlusten der chromosomalen Regionen 1p und 19q (Hofer et al., 1999; Tews et al., 2006), die unter anderem mittels Mikrosatellitenanalyse und FISH detektiert werden konnten. Diese Deletionen konnten auch in anderen Arbeiten in bis zu über 90% dieser Tumoren vom WHO- Grad II nachgewiesen werden (von Deimling et al., 1992; Bello et al., 1994; Bello et al., 1995; Kraus et al., 1995; Reifenberger et al., 1994; Sasaki et al., 2002), jedoch seltener in anaplastischen Tumorformen (WHO- Grad III) (Reifenberger et al., 2003).

Felsberg et al (2004) wiesen Verluste der Heterozygotität dieser Regionen ebenfalls nach und hoben als besondere Kandidatenregionen die Loci 1p36.22-p36.31 sowie 1p34.2-p36.1 hervor.

Der kombinierte Verlust der Chromosomen 1 und 19 wurde auch von Scheie et al. (2006) beschrieben. Als Untersuchungstechnik wurde die Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung (FISH) angewandt, die sich als zuverlässig darstellte. Auch Gelpi et al. (2003) beschrieben die FISH als klassische Technik zum Nachweis von Alterationen der chromosomalen Bereiche 1p und 19q.

Doch auch mit anderen Methoden (wie beispielsweise Array- CGH, Comparative Genomic Hybridization) konnten Deletionen der Regionen 1p und 19q in Oligodendrogliomen nachgewiesen werden (Gaspar et al, 2004).

Louis et al. (2001) detektierten Alterationen von 1p und 19q in WHO- Grad II- wie auch Grad III- Oligodendrogliomen. Diese Arbeitsgruppe konnte ebenfalls nachweisen, dass Oligodendrogliom- Patienten mit einem Verlust von 1p besser auf Chemotherapeutika ansprachen. Eine Kombination aus Deletionen von 1p und 19q war auch bei Felsberg et al. (2004) mit längerem Überleben unter Radio-/ Chemotherapie assoziiert.

Auch Stupp et al. (2006) und Cairncross et al. (1998) zeigten, dass Oligodendrogliome mit dieser genetischen Alteration sensitiver für Chemo- sowie Radiotherapie sind.

Bei Oligodendrogliomen sowohl vom WHO- Grad II als auch vom WHO- Grad III gilt ein Heterozyositätsverlust des kurzen Armes von Chromosom 1 außerdem als Prädiktor für ein längeres Progressions- freies Überleben (Bauman et al., 2005) unter Therapie mit PCV- Chemotherapie und Radiatio.

Desweiteren ist ein Verlust der Heterozyosität auf den Chromosomen 1 und 19 mit einem prolongierten Gesamtüberleben assoziiert (Smith et al., 2000; Gaspar et al., 2004).

Für die kombinierte Deletion der chromosomalen Bereiche 1p und 19q, die für eine bessere Prognose und ein verlängertes Progressions- freies Überleben bei Oligodendrogliomen spricht, könnte eine Translokation  $t(1; 19)(q10; p10)$  verantwortlich sein. Eine solche kombinierte Translokation konnte in der Mehrheit von Oligodendrogliomen mit LOH 1/ 19 (Loss of Heterozyosity, Verluste der Heterozyosität) durch FISH nachgewiesen werden (Jenkins, 2006). Ähnliches wurde bei Magnani (Pohl et al., 1999) beobachtet.

Für eine schlechtere Prognose bei Patienten mit Oligodendrogliom sprachen genetische Aberrationen wie Zugewinne der chromosomalen Bereiche 1p, 8q, 8p, 10q, sowie Verluste von 3q, 9q und 12q (Gaspar et al., 2004).

Auch Veränderungen der Heterozyosität des langen Armes von Chromosom 10 und eine Deletion von CDKN2A werden in Oligodendrogliomen als negative Prädiktoren angesehen (Cairncross et al., 1998; Hoang- Xuan, 2001; Sanson, 2002).

Schlechter ist die Datenlage zu Oligoastrocytomen:

Shukla B et al. (2009) konnten Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p und 19q insbesondere in phänotypisch stark oligodendroglial geprägten Tumoren via Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung detektieren.

Auch zu Ependymomen gibt es recht wenige Literaturangaben:

Fouladi M et al. (2003) untersuchten Klarzellependymome im Hinblick auf Veränderungen der Loci 1p36 und 19q und konnten keine Deletionen dieser Regionen nachweisen. Dieser Befund zeigte sich auch bei Tong CY et al. (2001).

Bijlsma EK et al. (1995) hingegen konnten Deletionen von 1p36 und Verluste von Chromosom 10 detektieren.

### 2.3.3 Tumorgenese- bezogene Gene auf 1p36 und 19q

Wie in Kapitel 2.3.2. bereits erläutert, gelten Verluste der Heterozygotität von 1p und 19q als die häufigsten genetischen Alterationen in Oligodendrogliomen.

Dies legt die Vermutung nahe, dass auf diesen Chromosomenabschnitten potentielle Tumorsuppressorgene lokalisiert sein müssen (Tews B et al., 2006).

Besonders die chromosomalen Bereiche 1p36.22- 31 und 19q13.3 gelten in Oligodendrogliomen als Kandidatenregionen (Tews et al., 2006).

#### Gene auf 1p36

*CHD5* (Chromodomain Helicase DNA Binding Domain 5) ist ein solches potentielles Tumorsuppressorgen und auf 1p36 lokalisiert. Dieses Gen ist über den p19/ p53- Pathway an der Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Bagchi A et al., 2007).

CDH5 kodiert für Proteine, die am Remodeling von Nukleosomen und an der Deacetylierung von Histonen (NuRD) beteiligt sind. Es wird vor allem in Gehirn und Kleinhirn exprimiert (Thompson et al., 2003).

*MIG- 6*, Mitogen- inducible- Gene- 6 (Zhang YW et al., 2006) ist ein weiterer Kandidat für ein Tumorsuppressorgen und ebenfalls auf 1p36 lokalisiert. Es wurde bisher im Zusammenhang mit Lungenkrebs untersucht. Dieses Gen, auch Adapter- Protein- Gen 33 oder RALT genannt, reguliert die EGFR- Signalkette, indem es die EGFR- Autophosphorylierung verhindert und so die EGF- induzierte Aktivierung und/ oder Phosphorylierung von Ras, ERK, JNK, Akt/ PKB und des Retinoblastom- Proteines hemmt. Eine Überexpression von Gen 33 blockt im Experiment EGF- induziertes Protein sowie die DNA- Synthese komplett (Xu D et al., 2004).

Auch *CDKN2C*, ein Inhibitor- Gen für eine Cyclin- abhängige Kinase, ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert. Eine Alteration dieses potentiellen Tumorsuppressorgenes wurde in anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO- Grad III) nachgewiesen, nicht aber in WHO- Grad II- Tumoren, so dass die Vermutung nahe liegt, dass diese Veränderung zur malignen Progression in diesen Neoplasien beiträgt (Husemann et al., 1999; Pohl et al., 1999; He et al., 2000).

Das Gen *TP73* mit einer hohen Homologie zu dem Tumorsuppressorgen TP53 ist auf 1p36-3 lokalisiert.

### Gene auf 19q

In verschiedenen Arbeiten (Hartmann et al., 2002; Mukasa et al., 2002; Wolf et al., 2003) wird vermutet, dass es sich bei dem Locus 19q13 um einen genetisch haploinsuffizienten Bereich handelt, was zu einer reduzierten Expression von einem oder multiplen Kandidaten-Tumorsuppressorgen führt. Auch eine Hypermethylierung ist als möglicher Mechanismus zur Inaktivierung dieser Gene in Erwägung zu ziehen (Hartmann et al., 2002).

Die *PLA2G4C*, Cytosolische Phospholipase A2, auf 19q ist in anaplastischen Oligodendrogliomen signifikant niedriger exprimiert als in höher differenzierten Tumoren (Tews B et al., 2006). Sie ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung von Membranphospholipiden unter Oxidationsstress (Tews B et al., 2006).

Unter Mithilfe des Deacylierungs- Reacylierungs- Zyklus werden mitochondriale Schäden durch reaktive Sauerstoffprodukte sowie durch die Acyl- Coenzym A- abhängige Monolysocardiolipin- Acyltransferase regeneriert (Seleznov K et al., 2006).

*PLA2G4C* katalysiert die Hydrolyse von Glycerolipiden, um Lysophospholipide und Arachidonsäure zu produzieren. Letztere wird zu den biologisch aktiven Eicosanoiden umgewandelt, wovon hohe Konzentrationen in Gliomen verglichen mit gesundem Hirngewebe nachgewiesen wurden. Einzelne Eicosanoide sind verantwortlich für Zellüberleben, Stimulation der Zellproliferation, Modulation von Zelladhäsion und Angiogenese (Tews et al., 2006).

Drei weitere Gene auf 19q13, die ebenfalls in Oligodendrogliomen vermindert exprimiert sind und eine fragliche Rolle bei der Tumorgenese spielen, sind *RELB*, *ZNF114* und *NPAS* (Tews et al., 2006).

Für das *epitheliale Membranprotein 3*, welches auf 19q13.3 codiert ist, und das sowohl in der Zellproliferation als auch in der Zell- zu- Zell- Interaktion involviert ist, konnte in Gliomen eine inaktivierende Hypermethylierung nachgewiesen werden. Durch die Assoziation zur malignen Progression von Gliomen ist es naheliegend, dass es sich bei EMP3 ebenfalls um ein Tumorsuppressorgen handelt (Alaminos et al., 2005).

Auch das Genprodukt von *RPL18* (RPL18 ist lokalisiert auf 19q13.2-4) ist in Gliomen mit LOH 1/ 19 (loss of heterozygosity/ Verlust der Heterozygotität) vermindert exprimiert. Dieses Genprodukt ist für einen Teil der 60S- Untereinheit von Ribosomen essentiell. Wie dies im Genauen zur Pathogenese insbesondere von Oligodendrogliomen beiträgt, ist noch nicht bekannt (Tews, 2006).

Bei Alterationen der Chromosomen 1 und 19 ist auch *DBP* (D- site of Albumin promoter-binding proteine) geringer exprimiert. Es gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren und ist verantwortlich für Kontrolle von Zellzyklus, Karzinogenese und Apoptose (Kashima et al., 1993; Tews, 2005).

Auch die Isoprenylcystein- Carboxyl- Methyl- Transferase (*ICMT*) ist bei Verlusten der Heterozygotität der Chromosomen 1 und 19 vermindert exprimiert. Sie stimuliert die Zellproliferation durch Methylierung von carboxylterminalem Isoprenylcystein (Tews et al., 2006).

#### **2.3.4 Tumorgenese- bezogene Gene auf den Chromosomen 7 und 10**

##### Gene auch Chromosom 7

Die wohl bekannteste Genamplifikation auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 (7p11.2) ist die von *EGFR*, dem Epidermal Growth Factor Receptor.

Diese konnte in 30- 40% der bei Rossi MR et al. (2005) untersuchten Glioblastome nachgewiesen werden.

In anaplastischen Oligodendrogliomen hingegen konnte eine EGFR- Amplifikation nur selten detektiert werden (Bigner SH et al., 1999; Reifenberger J et al., 1996; Diedrich U et al., 1991; Wong AJ et al., 1994).

Dieser Transmembranrezeptor (EGFR) mit intrinsischer Tyrosinkinase- Aktivität wird durch extrazelluläre Bindung der Liganden Epidermal Growth Factor (EGF) und Transforming Growth Factor ( $TGF\alpha$ ) aktiviert (Kleihues P et al., 2000). Die Signale werden über Autophosphorylierung und die Rekrutierung von Signalmolekülen wie Akt/PKB, MEK oder STAT ins Zellinnere geleitet (Signaltransduktion). So wird letztendlich das Zellwachstum

stimuliert und der apoptotische Zelltod verhindert. Durch die Hochregulation dieses Rezeptors in Gliomen gerät das Zellwachstum außer Kontrolle.

Bei Expression des EGFR- Homologes v- ErbB konnte sich unter Kontrolle eines S100- Beta-Promoters die Entwicklung von Oligodendrogliomen im Tierexperiment an Mäusen nachweisen lassen (Weiss WA et al., 2003).

*DDX26*, die Humane DEAD- Box- Helicase 26, ist ein DEAD- Box- Protein und auf 7p12 lokalisiert. Sie gehört zu der Familie der ATP- abhängigen RNA- Helicasen (Camargo AA et al., 2001). RNA- Helicasen spielen eine Rolle bei unterschiedlichen Schritten des RNA- Metabolismus wie zum Beispiel bei Transkription, Prä- mRNA- Splicing, Ribosomenbiogenese, cytoplasmatischem Transport, Translation oder Initiation/ Elongation (Camargo AA et al., 2001).

Eine weitere Genamplifikation, die zur Tumorgenese beiträgt, ist die des *MET- Protoonkogenes* (Hepatocyte Growth Factor Receptor), lokalisiert auf 7q31-32 (Fischer U et al., 1995). Dieses Gen ist auch unter dem Namen C- Met- Protoonkogen bekannt (Moon YW et al., 2000). C- Met ist der Rezeptor für HGF, Hepatocyte Growth Factor, welcher als Motilitätsfaktor in Gliomzellen agiert.

Das humane *Beta2- Chimaerin* (7p15.3) wird vor allem in Pankreas und Hirngewebe exprimiert. Eine verminderte Expression konnte in Gliomen bei maligner Transformation nachgewiesen werden (Yuan S et al., 1995). Beta2-Chimaerin wirkt als Effektor des EGFR (Wang H et al., 2006).

## Gene auf Chromosom 10

*PTEN* (Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10) ist ein Tumorsuppressorgen, das auf dem langen Arm von Chromosom 10 lokalisiert ist. Es wird auch MMAC1 (Mutated In Multiple Advanced Cancers- 1) genannt.

Vor allem in Glioblastomen konnten LOHs und Mutationen dieses Genes nachgewiesen werden, was vermutlich zur Tumorprogression beiträgt (Zainuddin N et al., 2005).

PTEN und Akt sind wichtige Regulatoren des PI3K- (Phosphatidylinositol 3- Kinase) Pathways. Akt reguliert unter Anderem Zellzyklusprogression, Zellmigration, Invasion und Angiogenese. Eine verminderte Expression von PTEN als Akt- Antagonist und eine Überexpression des Akt- Protoonkogenes wurden neben anderen Tumoren auch im Glioblastom nachgewiesen (Koul D et al., 2007).

Im Folgenden sind weitere potentielle Tumorsuppressorgene aufgeführt mit zum Teil nicht ganz geklärten Funktionen:

Das für einen Transkriptionsfaktor kodierende *PAX6* mit Tumorsuppressionsfunktion ist im Glioblastoma multiforme vermindert exprimiert (Zhou YH et al., 2005).

*DMBT1* (Deleted in Malignant Brain Tumors) auf 10q25-26, ein Mitglied der SRCR-Superfamilie (Scavenger Receptor Cysteine- Rich) (Pang JC et al., 2003), zählt ebenfalls zu den Kandidatengenen.

Ebenfalls auf 10q26 ist *WDR11*, ein Mitglied der WD- Repeat- Genfamilie, lokalisiert (Chernova et al., 2001).

In einer Arbeit von Chernova OB et al. (Chernova et al., 1998) konnte ein neues Gen auf 10q24 detektiert werden: *LGII* (Leucine- Rich- Gene- Glioma- Inactivated).

Die Tatsache, dass dieses Gen in malignen Hirntumoren vermindert exprimiert und rearrangiert ist, lässt vermuten, dass es sich auch hierbei um ein Tumorsuppressorgen handelt.

*MXII*, lokalisiert auf dem langen Arm von Chromosom 10, ist ein weiteres potentielles Tumorsuppressorgen. Dieses fungiert im Zusammenhang mit Mitgliedern der C- Myc-Familie: Während Myc die Transkription und Zellproliferation aktiviert, beeinflusst MXII diese Schritte negativ (Wechsler DS et al., 1997).

### 2.3.5 Assoziation von genetischen Veränderungen und Tumormorphologie

Inwieweit genetische Veränderungen in Gliomen mit der Histologie dieser Neoplasien korrelieren, wurde nur in wenigen Arbeiten untersucht. Diese beziehen sich in erster Linie auf *oligodendrogliale Tumoren*.

So postulierten McDonald et al. (2005), dass eine Assoziation zwischen der klassischen Histologie von Oligodendrogliomen und einem Verlust der chromosomalen Regionen 1p und 19q besteht.

Auch Louis et al. (2001) setzten Verluste von 1p und 19q in Zusammenhang mit einer Differenzierung zum oligodendroglialen Phänotypen, was auch von Barbashina et al. (2005) berichtet wurde.

Auch bei *Oligoastrocytomen* war der Zusammenhang zwischen genetischen Aberrationen und Tumormorphologie untersucht worden. In einer Arbeit von Eoli et al. (2006) konnten LOHs des kurzen Armes von Chromosom 1 in 46% der untersuchten Oligoastrocytome nachgewiesen werden, LOHs von 19q in 45%. Diese genetischen Veränderungen wurden als Prädiktoren für astrocytäre und oligodendrogliale Merkmale in diesen Tumoren angesehen.

Bei Mischtumoren, die sowohl Merkmale von Oligodendrogliomen als auch von Oligoastrocytomen aufweisen, konnten durch FISH- Untersuchungen in etwa 10% der Fälle kombinierte Deletionen der Regionen 1p und 19q nachgewiesen werden, in etwa 20% lediglich Verluste von 19q (Fuller CE et al., 2003). Hier fand man in ungefähr einem Viertel der untersuchten Fälle Alterationen von PTEN/ DMBT1, in etwa 30% Alterationen von p16 und in etwa 10% EGFR- Amplifikationen.

Zur Assoziation von histologischem Erscheinungsbild von *Glioblastomen* und chromosomalem Status haben Homma et al. (2006) publiziert: Eine Amplifikation von EGFR stellte sich hierbei häufiger in kleinzelligen Glioblastomen dar als in nicht- kleinzelligen. Desweiteren gab es eine signifikante Assoziation zwischen dem Wildtyp- TP53 und dem Auftreten von Nekrosen im Glioblastoma multiforme.

Mittels Mikrosatellitenanalyse untersuchten Kraus JA et al. (2001) 13 Glioblastome, die Bereiche enthielten, die histologisch gesehen Merkmale von oligodendroglialer Differenzierung enthielten. Auch hier zeigten drei dieser Tumoren einen Verlust der Heterozygotität für 1p, ein Tumor zusätzlich eine Deletion von 19q. In drei dieser

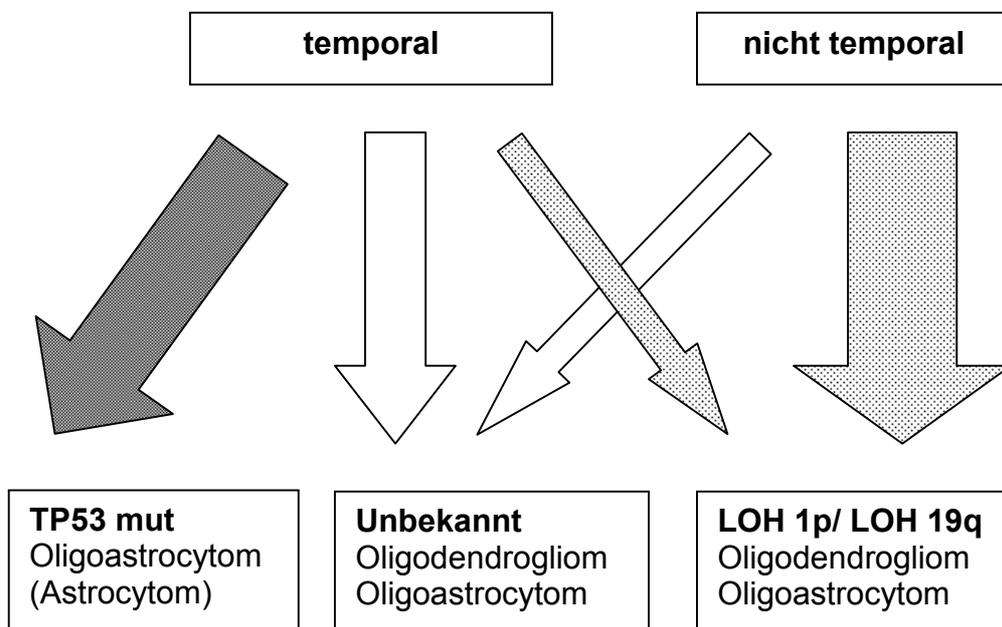
Glioblastome stellte sich zusätzlich eine Überexpression von EGFR dar, in einem eine PTEN-Mutation.

Auch zwischen genetischen Veränderungen und der Lokalisation von Gliomen scheint ein Zusammenhang zu bestehen, was in Abbildung 6 graphisch dargestellt wird:

Die Lokalisation von Oligodendrogliomen ist insbesondere mit Deletionen der Chromosomen 1 und 19 assoziiert, was beispielsweise Mueller W et al. (2002) nachweisen konnten. So waren die Tumoren, die nur wenige Verluste der Chromosomen 1 und 19 aufwiesen, eher im Temporallappen lokalisiert, während Oligodendrogliome mit einem hohen Anteil an Verlusten dieser Chromosomen eher frontal, parietal oder occipital auftraten.

Ähnliches konnte auch für Oligoastrocytome nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Oligoastrocytome, die im Temporallappen lokalisiert waren, signifikant mehr Mutationen von TP53 als in anderen Lokalisationen (Mueller W et al., 2002).

Bei Astrocytomen hingegen konnte bisher kein Zusammenhang zwischen Genetik und Lokalisation gezeigt werden (Mueller, W et al., 2002).



**Abbildung 6: Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und Tumorlokalisation;**  
 Modifiziert nach: Mueller W et al. (2002)

## 2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Für die moderne Therapie von Gliomen ist eine exakte Einteilung dieser Tumoren nach einem Klassifikationsschema der WHO unerlässlich, welches auf histomorphologischen Merkmalen basiert. Nur durch eine solche histologische Zuordnung kann eine gezielte und auf die einzelnen Gliomentitäten abgestimmte Therapie vorgenommen werden.

Mithilfe einer histomorphologischen Einteilung ist jedoch keine zufriedenstellende Vorhersage über das klinische und prognostische Verhalten dieser Tumoren bei den einzelnen Patienten zu treffen.

So wird die spezifische Therapie von Gliomen vermutlich zukünftig nicht nur von der histologischen Diagnose bestimmt werden, sondern auch von genetischen Besonderheiten innerhalb dieser Tumoren. Dies ist unter Anderem darauf zurückzuführen, dass nachgewiesen werden konnte, dass Gliome mit bestimmten genetischen Aberrationen ein unterschiedliches Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika zeigen. Weiterhin korreliert die Überlebenszeit von Gliompatienten mit der Genetik dieser Tumoren.

Da folglich zukünftig neben der konventionellen Gliomklassifikation auf histomorphologischer Basis eine genetische Einteilung dieser Tumoren vermutlich eine immer wichtigere Rolle spielen wird, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit diesem Thema.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien publiziert, die zeigten, dass sich die unterschiedlichen Gliome nicht nur durch morphologische Besonderheiten voneinander unterscheiden, sondern auch durch ganz bestimmte Aberrationen auf genetischer Ebene.

Zum Nachweis genetischer Veränderungen hat sich die Zytogenetik mit der Karyotypisierung etabliert.

Hiermit konnten beispielsweise im Glioblastoma multiforme als typische genetische Veränderungen Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 nachgewiesen werden.

Zunehmend wurden auch molekularzytogenetische Verfahren wie die Fluoreszenz- In Situ-Hybridisierung (FISH) zur Detektion genetischer Aberrationen in verschiedenen Gliomentitäten eingesetzt. Auch durch die FISH konnten die oben genannten numerischen Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 detektiert werden (Loeper et al. 2001; Nigro et al., 2005; Smith et al., 2001).

Aber auch beispielsweise in Oligodendrogliomen konnten signifikant häufig bestimmte Alterationen nachgewiesen werden: So gelten Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36

und 19q als charakteristisch für diese Tumoren (Von Deimling et al., 1992; Reifenberger et al., 1994; Sasaki et al., 2002).

Auch diese Arbeit beschäftigt sich mit Alterationen der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q sowie mit numerischen Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 in glialen Tumoren. Es wurden 52 Gliome molekularzytogenetisch mittels FISH untersucht (pilocytische Astrocytome, diffuse und anaplastische Astrocytome, Oligodendrogliome, Oligoastrocytome, Glioblastome und Ependymome).

Hierbei war es von Bedeutung, ob auch in der vorliegenden Arbeit die in der Literatur vorbeschriebenen genetischen Veränderungen in den verschiedenen Gliomsubtypen detektiert werden konnten.

Desweiteren wurde untersucht, wie charakteristisch die vorbeschriebenen genetischen Veränderungen für die einzelnen Gliomentitäten sind, und ob eine Klassifikation von Gliomen nicht nur auf histomorphologischer, sondern auch auf genetischer Basis erfolgen kann.

Weiterhin war folgender Sachverhalt von besonderem Interesse:

Während für die zytogenetische Karyotypisierung aufwändige Zellkulturen und das Auftreten von Mitosen notwendig sind, kann die FISH auch an Interphasekernen durchgeführt werden (beispielsweise an Tumorausstrichpräparaten).

So ergab sich als weitere Fragestellung, ob die FISH als sinnvolle Ergänzung zur zytogenetischen Diagnostik von Gliomen eingesetzt werden kann, insbesondere wenn für eine Zellkultivierung nicht ausreichend Tumormaterial vorhanden ist.

Deshalb wurden die Ergebnisse der durchgeführten FISH- Untersuchungen mit Befunden verglichen, die sich aus der Karyotypisierung der Gliome ergeben hatten.

Besonders hervorzuheben ist, dass in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Gliomentitäten untersucht wurden (pilocytische Astrocytome, diffuse und anaplastische Astrocytome, Glioblastome, Oligodendrogliome, Oligoastrocytome und zwei Ependymome, s.o.). Diese Tumoren befanden sich zum Teil auf unterschiedlichen Progressionsstufen und unterschieden sich so mitunter erheblich in ihrem Malignitätsgrad. Durch die Vielzahl einzelner Gliomsubtypen konnten die detektierten genetischen Aberrationen in den einzelnen Entitäten miteinander verglichen werden.

So wurde ein weiterer Schwerpunkt auf die Frage gelegt, ob die einzelnen Gliome beim Übergang zu einer höheren Malignitätsstufe zunehmend oder bestimmte genetische Aberrationen aufweisen.

### 3 Material

#### 3.1 Bezugsquellen der Materialien

Anti- Dig- Alkalische Phosphatase:	BIOZYM
Anti- Digoxin- Cy3:	DIANOVA
BCIP:	BIOMOL
Bio- Anti- Streptavidin:	LINARIS
Biotin- Translations- Mix:	ROCHE
BSA:	SIGMA
Colcemid:	GIBCO
Digoxygenin- Alkalische- Phosphatase:	ROCHE
Digoxygenin- Translationsmix:	ROCHE
Ethanol:	MERCK
Fixogum:	MARABU
Formamid:	MERCK
NBT:	BIOMOL
Nitrocellulosemembran:	AMERSHAM
Paraformaldehyd:	MERCK
Pepsin:	SERVA
RNAse:	SIGMA
Streptavidin- Alkalische- Phosphatase:	ROCHE
Streptavidin- FITC:	LINARIS
Triton X-100:	SIGMA
Vectashield Mounting Medium:	VEKTOR
Vectashield Mounting Medium mit DAPI:	VEKTOR

### 3.2 Lösungen und Puffer

Die Lösungen wurden unter möglichst reinen Bedingungen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  angesetzt.

Die speziellen Lösungen sind bei den jeweiligen Verfahren im Methodenteil aufgeführt.

- BCIP  
0,5g BCIP- Salz in 10ml Dimethylformamid gelöst
- DOT- Puffer:  
0,1M Tris, 0,1M NaCl, 0,05M  $\text{MgCl}_2$ , pH9,5
- Fixans  
Methanol : Essigsäure 3 : 1
- Formamid deionisiert  
pro 100ml Formamid 10g Mischbettionenaustauscher (BIORAD AG X- 108), 1h bei RT gerührt, filtriert
- NBT  
0,5g NBT- Salz in 10ml 70% Dimethylformamid gelöst
- Paraformaldehyd 4%  
4g Paraformaldehyd in 100ml PBS bei 70°C gelöst, filtriert
- 5x PBS  
1,0g KCl, 1,0g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 40g NaCl, 8,9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , add 1000ml A. dest.
- Pepsin  
10% Pepsin in A. dest. bei 37°C gelöst, Aufbewahrung bei -20°C
- RNase A  
50mg RNase in 5ml 2x SSC 10min gekocht, abgekühlt und Aufbewahrung in Aliquots von 100µl bei -20°C

- 20x SSC  
3,0M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7
- 4x SSC/ Triton  
4x SSC + 0,1% Triton X- 100
- TN- Puffer  
0,1M Tris pH 7,6, 0,15 M NaCl

### 3.3 DNA- Sonden

#### Sonde: 1p36

PONC 0136 -1p36 Midi Satellite- Green

#### Sonde: 19q

PTEL 19Q-R-Tel 19q DNA Probe red

<b>Sonde</b>	palpha7t1	pA10RP8
<b>Typ</b>	alphoid	alphoid
<b>Locus</b>		D10Z1
<b>Insertgröße</b>		1,35kB
<b>Vektor</b>	pUC9	pBS (plasmid)
<b>Referenz</b>	Waye und Willard (1987)	Devilee et al. (1988)

### **3.4 Untersuchungsmaterial**

#### **3.4.1 Tumorgewebe**

Die 52 untersuchten Gliome entstammen von Patienten unterschiedlichen Alters und Geschlechtes, die aufgrund der Verdachtsdiagnose einer neuroepithelialen Neoplasie in der Neurochirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums des Saarlandes operiert wurden.

Die Hirntumoren wurden über konventionelle operative Methoden reseziert und zur histologischen Diagnosesicherung an das Neuropathologische Institut gereicht. Hier wurden die Gliome entsprechend der WHO- Klassifikation in die einzelnen Gliomentitäten eingeteilt.

Teile des Resektates wurden unter sterilen Bedingungen in ein Transportmedium aus 10% DMEM überführt und im Zellkulturlabor des Humangenetischen Institutes der Universitätsklinik zytogenetisch und molekularzytogenetisch untersucht.

#### **3.4.2 Kontrollgewebe**

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob es sich bei den in den untersuchten Gliomzellen detektierten genetischen Aberrationen um repräsentative Befunde handelt und nicht teilweise um Artefakte, wurden gesunde Zellen als Referenz benötigt.

Hierzu wurde aus heparinisiertem Vollblut eines gesunden Spenders eine Kurzzeitblutkultur angelegt und Zellkerne wurden präpariert. Das Blut der gesunden männlichen und weiblichen Spender wurde über konventionelle Venenpunktion unter Verwendung von Lithium- Heparin-Monovetten entnommen.

## 4 Methoden

### 4.1 Tumorzellkultur

#### 4.1.1 Chromosomenpräparation und Gewinnung von Interphasekernen von Gliomen

Das Tumormaterial wurde unter sterilen Bedingungen zerkleinert und je nach Menge auf mehrere Kulturschalen verteilt. Dieses Gewebe wurde dann in jeder Kulturschale mit nur soviel Medium (10% DMEM) versetzt, dass sich die Gewebestückchen am Boden dieser Schalen absetzen konnten. Nur so war es möglich, dass die Zellen proliferieren und so einen dichten Zellrasen unter Inkubation bei 37°C ausbilden konnten.

Ein Wechsel des Mediums wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt.

Waren lichtmikroskopisch mehrere Mitosen nachweisbar, konnte mit dem so genannten Abernten von Zellen begonnen werden. Dies war in der Regel nach 7 bis 10 Tagen möglich.

Hierzu wurden zwei Tropfen Colcemid zu der Kultur hinzu gegeben und diese anschließend für 25 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei Colcemid handelt es sich um ein an Tubulin bindendes Gift, welches so die Ausbildung der Mitosespindel verhindert.

Nachfolgend wurde der Zellkulturüberstand abpipettiert und in einem gesonderten Röhrchen aufbewahrt, 2ml konzentriertes Trypsin wurden in das Falcon gegeben.

All diese Schritte erfolgten unter der Sterilbank, um eine Kontamination der Kultur zu vermeiden, sodass diese nach der Zellgewinnung weitergezüchtet werden konnte.

Nach Zugabe des Trypsins wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet und das Falcon leicht beklopft, sodass sich die Mitosen lösen konnten.

Die Einwirkdauer des Trypsins richtete sich danach, wann sich die Zellränder langsam einzuziehen begannen.

Wiederum wurde der Überstand entfernt und zu dem vorherigen hinzugefügt.

Mit 2ml 10%igem DMEM wurde die Zellkultur gewaschen, dann wurde das Medium ebenfalls abpipettiert. Dieser Schritt war notwendig, um Reste von Trypsin in der Kultur zu inaktivieren. Wurden 3ml frisches Medium auf die Kultur gegeben, konnte diese erneut bei 37°C inkubiert werden und mit der Zellkultur fortgefahren werden.

Der Überstand, der nun Zellen und Mitosen enthielt, wurde bei 172g 8 Minuten lang zentrifugiert.

Bei einer Luftfeuchte von mindestens 40% wurde dann der Überstand verworfen und das Sediment vorsichtig resuspendiert.

2ml Kaliumchlorid (KCL, wurde zuvor im 37°C- warmen Wasserbad aufgewärmt) wurden mit dem Zentrifugat vermischt und für weitere 8 Minuten zentrifugiert.

Dann wurde der Überstand nochmals verworfen und das Sediment in Fixans, bestehend aus 50% Methanol und 50% Essigsäure (Temperatur: -20°C), fixiert.

Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen auf Objektträger getropft, die zuvor bei -20°C in 50% Ethanol aufbewahrt worden waren.

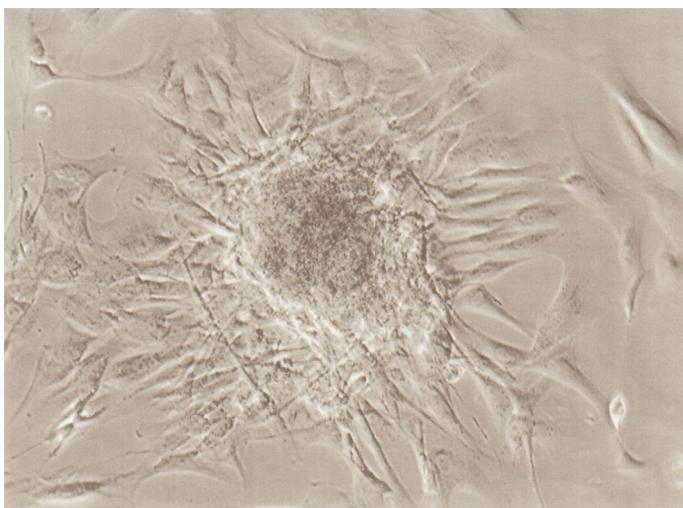
Nach dem Trocknen wurden die Präparate mikroskopisch begutachtet.

Hierbei war darauf zu achten, dass die Interphasekerne und Chromosomen gut an den Objektträgern hafteten und eine ausreichende Spreitung der Mitosen stattgefunden hatte. Ein Cytoplasma- Saum sollte nicht mehr zu erkennen sein.

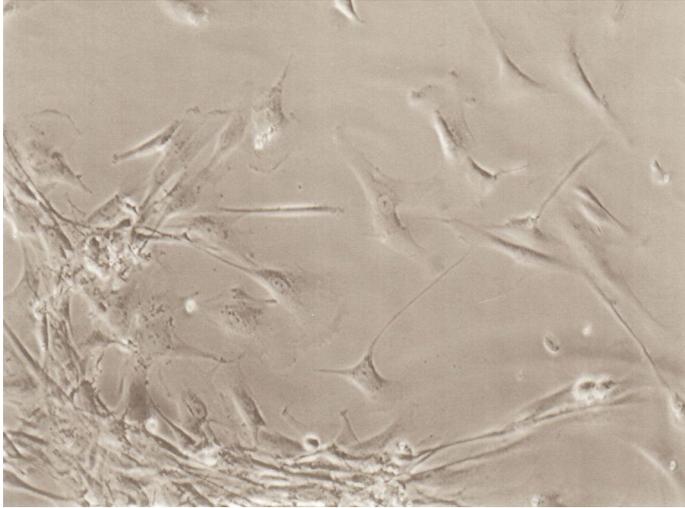
Entsprachen die Präparate diesen Kriterien, konnten sie für die Fluoreszenz- In- Situ- Hybridisierung verwendet werden.

Waren die Präparate für die CTG- Bänderung vorgesehen, war es unerlässlich, dass genügend Mitosen pro Objektträger vorhanden waren. Die Chromosomen sollten einzeln erkennbar sein und sich nicht überlagern. Der Kondensationsgrad beeinflusste die Bänderung der Chromosomen stark.

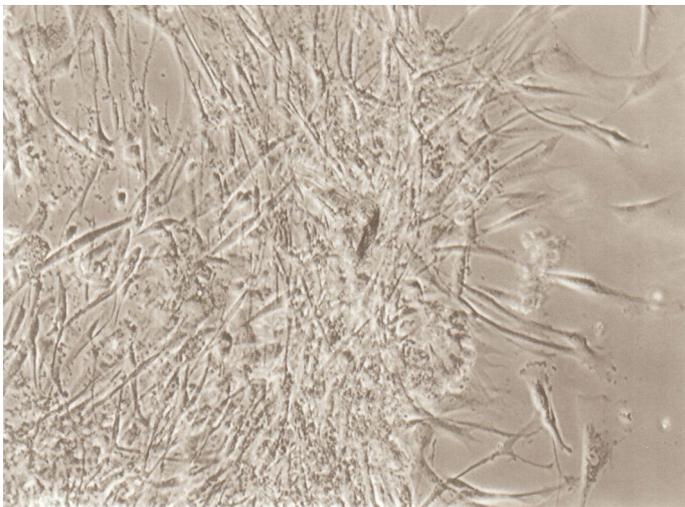
Nachfolgend sind beispielhaft Fotos einer Zellkultur dargestellt (T6321, Oligodendrogliom WHO- Grad II; siehe Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9).



**Abbildung 7: Auswachsen von Gliomzellen aus Tumorstück**



**Abbildung 8: Einzelne  
Gliomzellen**



**Abbildung 9: Dichter  
Zellrasen**

#### **4.1.2 CTG- Bänderung und Karyotypisierung**

Die gewonnenen Präparate wurden für 40 bis 45 Sekunden in eine Küvette mit 70 ml NaCl-Lösung mit 2ml Bactotrypsin gestellt. Dann wurden die Präparate zweimal in NaCl- Lösung gespült, um dann für 5 Minuten in Giemsa- Lösung zu färben.

Diese setzt sich aus 95ml Sörensen- Lösung und 5ml filtrierter Giemsa- Lösung zusammen.

Die Objektträger wurden anschließend zweimal in A. dest. gespült, getrocknet und mit Histokitt eingedeckt.

Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Begutachtung des Ergebnisses der CTG- Bänderung. War dies zufrieden stellend, konnte eine Karyotypisierung des Chromosomensatzes erfolgen. Hierzu wurde das Computerprogramm Ikaros verwendet, mit dessen Hilfe die Zuordnung der

Chromosomen durch unterschiedliche Bearbeitungstechniken wie beispielsweise eine Modifikation des Helligkeitskontrastes der einzelnen Banden unterstützt wird.

Pro Gliom wurden durchschnittlich 15 Mitosen karyotypisiert, um den zytogenetischen Befund zu erheben. Ein Beispiel für ein solches Karyogramm ist in Abbildung 10 dargestellt. Aberrationen sind rot markiert (Monosomie der Chromosomen 9, 13 und 17, Trisomie der Chromosomen 7 und 21 und fehlendes Y-Chromosom).

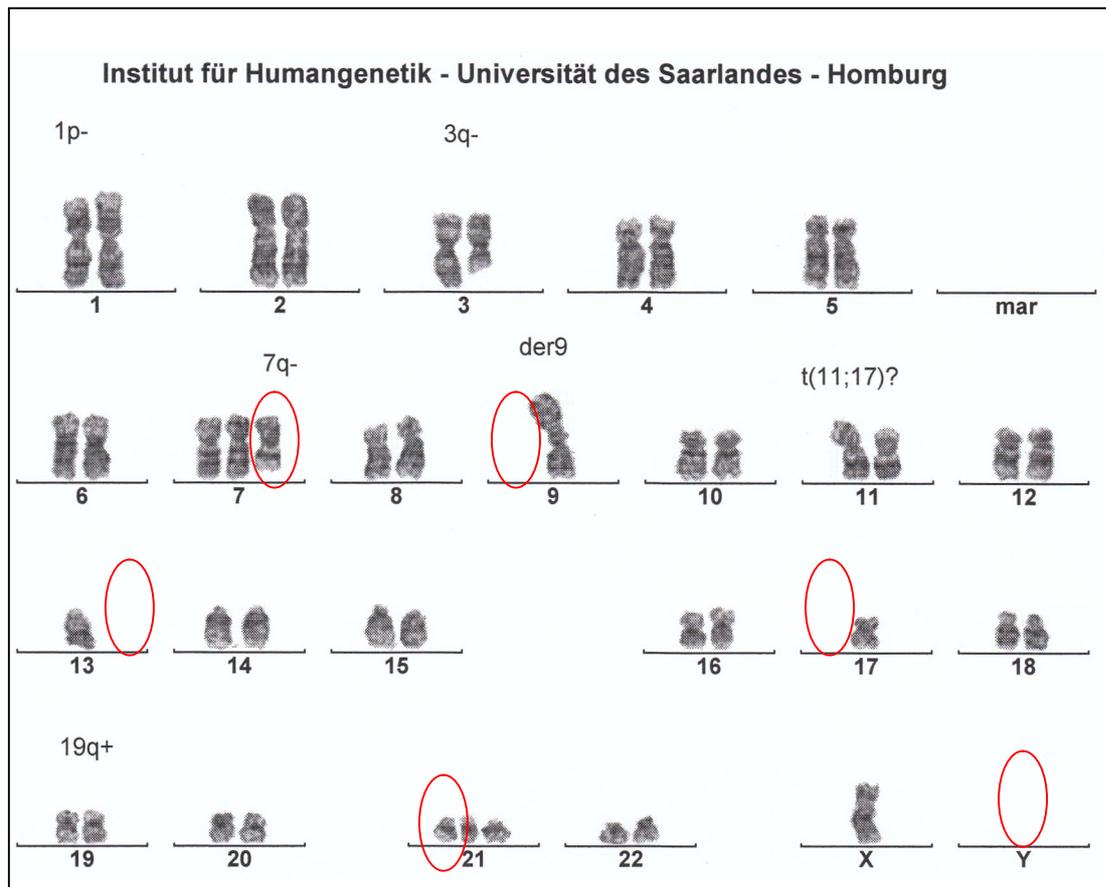


Abbildung 10: Karyogramm des Tumors T6336, Glioblastom

## **4.2 Kurzzeitkultur aus Blut und Chromosomenpräparation aus Lymphocyten**

### **4.2.1 Blutkultur**

Von gesunden Probanden wurde unter sterilen Bedingungen unter Verwendung von Lithium-Heparin- Monovetten über konventionelle Venenpunktion Vollblut entnommen.

Das Kulturgefäß wurde mit 8ml Nährmedium (hier: PBmax) und 0,8ml Blut befüllt, der Inhalt vorsichtig vermischt.

Die Kultur wurde für 70 bis 72 Stunden im Brutschrank (90% Luftfeuchtigkeit, 5%ige CO<sub>2</sub>-Begasung) inkubiert.

### **4.2.2 Chromosomenpräparation aus Blutlymphocyten**

Nach 70- stündiger Inkubation wurden der Blutkultur 0,2ml Colcemid (0,001%ige Lösung) hinzugefügt, vorsichtig vermischt und die Kultur für weitere 1,5 Stunden inkubiert.

Anschließend wurde der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 172g für 8 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 5ml von 37°C warmer 0,52%iger KCl-Lösung vermischt.

Die Lösung wurde dann für 8 Minuten bei 37°C inkubiert und im Folgenden erneut 8 Minuten zentrifugiert.

Von dem Zentrifugat wurde der Überstand erneut entfernt, -20°C- kaltes Fixans, bestehend aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1, wurde hinzu gegeben.

Die Fixationsdauer betrug eine Stunde bei -20°C, das Fixans wurde so häufig erneuert, bis das Sediment weißlich erschien.

Dann konnte das Sediment, das mit einigen Tropfen frischen Fixans vermischt wurde, auf gereinigte Objektträger getropft werden. Diese wurden bei -20°C in einer Lösung aus A. dest. und Ethanol im Verhältnis 1:1 aufbewahrt.

Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet waren, wurden sie lichtmikroskopisch beurteilt, wobei wiederum auf eine gute Spreitung von Mitosen, fehlenden Cytoplasma- Saum und ein ausreichendes Anhaften von Chromosomen und Interphasekernen zu achten war.

War das Ergebnis dementsprechend, konnten die hergestellten Präparate zur Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung oder zur zytogenetischen Beurteilung eingesetzt werden.

### **4.3 Tumorausstrichpräparate**

Das Tumormaterial wurde auf silanisierte Objektträger ausgestrichen und bei -20°C gelagert. Um diese Objektträger für die Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung verwenden zu können, wurden sie nach dem Auftauen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70- 80- 96%) für jeweils 5 Minuten dehydriert.

### **4.4 Markierung von DNA- Sonden**

#### **4.4.1 Nick- Translation**

Da die Sonden für die Chromosomenregionen 1p36 und 19q käuflich erworben wurden, ist dieser Schritt nur für die Sondenherstellung für die Chromosomen 7 und 10 notwendig.

Bei der Nick- Translation wird ein DNA- Strang als Matrize benutzt, um spezifisch markierte DNA- Sequenzen herzustellen. Hierzu wird das komplette Plasmid eingesetzt, bestehend aus Vektor und Insert.

Zu diesem Plasmid werden die Enzyme DNA- Polymerase I und DNase sowie markierte und unmarkierte Nukleotide hinzugegeben.

In Anwesenheit von Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ) setzt die DNase Lücken, sogenannte „nicks“, in den DNA- Doppelstrang.

Hier greift nun die DNA- Polymerase I an, deren 5'-3'- Exonukleaseaktivität Nukleotide in Syntheserichtung entfernt, und deren Polymeraseaktivität die entfernten Nukleotide wieder ersetzt. Hierzu werden markierte Nukleotide angeboten.

Als Haptene für die Markierung der Nukleotide werden Biotin und Digoxigenin eingesetzt.

Digoxigenin ist ein steroidal Naturfarbstoff aus Digitalispflanzen, wohingegen es sich bei Biotin um ein Vitamin handelt, das als Enzym- Cofaktor zur Übertragung von Carboxylresten fungiert.

Material

Bio- Nick- Translations- Mix

Dig- Nick- Translations- Mix

DNA- Sonden (#7, #10)

Ethanol absolut

NaAC 3M, pH 5,5

Durchführung

*Ansatz für die Sonde für Chromosom 10:*

#10, 830µg/ ml:        2µl Plasmid  
                              4µl Dig- Nick- Translations- Mix  
                              14µl Aqua absolut

*Ansatz für die Sonde für Chromosom 7:*

#7, 1380µg/ ml:        1µl Plasmid  
                              4µl Bio- Nick- Translations- Mix  
                              15µl Aqua absolut

Die Ansätze werden zusammenpipettiert und bei 15°C 90 Minuten inkubiert.

Durch Zugabe von 2µl NaAC und 50µl EtOH abs. wird die DNA bei -20°C mindestens zwei Stunden gefällt.

Bei 4°C und 18000g werden die Proben nun 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

Dann werden zu der Probe mit DNA von Chromosom 10 50µl A. ampura und zu der Probe mit DNA von Chromosom 7 40µl A. ampura hinzugegeben und bei 4°C mindestens eine Stunde gelöst.

Anschließend müssen die Sonden mithilfe der Dot- Blot- Technik auf ihre Markierung hin überprüft werden.

#### 4.4.2 Dot- Blot

Mithilfe dieser Technik wird überprüft, ob die Biotin- und Digoxigenin- markierten Nukleotide erfolgreich in die DNA eingebaut wurden.

Hierzu wird Nitrocellulose verwendet, die in der Lage ist, DNA zu binden.

Auf eine solche Nitrocellulose- Membran wird eine Verdünnungsreihe der Proben aufgetropft. Durch eine Behandlung der Membran mit BSA oder Magermilchpulver werden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt.

Die Membran wird mit Streptavidin- Alkalischer- Phosphatase und Digoxigenin- Alkalischer- Phosphatase inkubiert und anschließend mit TN- Puffer gewaschen.

Nachfolgend werden BCIP sowie der Farbstoffverstärker NBT hinzugegeben.

Über den Substratumsatz durch die Alkalische Phosphatase lässt sich die Einbaurate anhand des Präzipitates, ein violetter Farbstoffkomplex, feststellen.

#### Material

Anti- Dig- Alkalische- Phosphatase

Streptavidin- Alkalische- Phosphatase

Blockpuffer: 1% Magermilchpulver in 6x SSC

TN- Puffer: 0,1M Tris

0,15M NaCl

pH 7,6

Dot- Puffer: 0,1M Tris

0,1M NaCl

0,05M MgCl<sub>2</sub>

pH 9,5

#### Durchführung

Zunächst wird eine Verdünnungsreihe der Nick- translatierten Proben- DNA 1: 10 mit 6x SSC hergestellt, wovon aus jeder Verdünnungsreihe 2µl auf die Nitrocellulosemembran pipettiert werden.

Bei 80°C für 30 Minuten wird die Bindung der DNA an die Membran verstärkt, anschließend wird diese für weitere 30 Minuten mit 1% BSA/ 6x SSC geblockt.

Nachdem zweimal mit TN- Puffer gewaschen wurde, werden 3µl Streptavidin- Alkalische- Phosphatase und 3µl Anti- Dig- Alkalische- Phosphatase auf die Membran gegeben und diese 30 Minuten bei Raumtemperatur bewegt.

Wiederum wird zweimal mit TN- Puffer gewaschen, die Membran dann 10 Minuten mit DOT- Puffer bei Raumtemperatur bewegt.

Zur Färbelösung werden benötigt:

5,7ml DOT- Puffer
33µl NBT
25µl BCIP

In dieser Lösung wird die Nitrocellulosemembran zwischen 30 Minuten und drei Stunden im Dunkeln inkubiert, anschließend in 70%- igem Ethanol gespült und getrocknet.

#### Auswertung

DNA- Gehalt der Verdünnungsstufen: 1ng – 0,1ng – 10pg – 0,1pg – 10fg.

Markierte DNA sollte bis 1pg/ µl nachweisbar sein, damit die Sonden für eine Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung ausreichend markiert sind.

### **4.5 Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung (FISH)**

Das molekularzytogenetische Verfahren der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung geht ursprünglich auf Gall und Pardue (1969), John et al. (1969), Buongiorno- Nardelli und Amaldi (1970) (Chevalier, 1997) zurück. Es wurde von diesen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entwickelt.

Ziel der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung ist das Sichtbarmachen genetischer Veränderungen durch den Nachweis numerischer Aberrationen in Chromosomen sowie die Darstellung bestimmter chromosomaler Bereiche.

Das Prinzip der FISH basiert auf der Fähigkeit von Nukleinsäuren zur Hybridbildung. Das bedeutet, dass sowohl RNA als auch DNA in der Lage sind, sich mit komplementären Molekülen zu gemischten Doppelsträngen, sogenannten "Hybriden", zu renaturieren.

Durch die Einführung molekularbiologischer Klonierungstechniken und die Optimierung der Markierungsmethoden wurde diese Methode stetig verbessert.

Schließlich konnten Biotin- markierte Nukleotide zur Markierung von DNA- Sonden synthetisiert werden, wodurch es Manuelidis und Webster et al. (1982) erstmals gelang, repetitive DNA- Sequenzen nicht radioaktiv im zytologischen Präparat nachzuweisen.

Weitere Voraussetzungen für die Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung sind Proben, die spezifisch für die Zielsequenz sind.

Durch die simultane Hybridisierung von Zellen mit zwei verschiedenen Sonden erfolgt eine Kontrolle der Penetration der Sonden in den Zellkern.

Die Technik der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung stellt sich wie folgt dar: Ziel- DNA ist in Form von Interphasekernen oder Chromosomen auf einem Objektträger fixiert. Durch Erhitzen der DNA, gegebenenfalls in Kombination mit chemischen Verfahren, wird diese denaturiert. Durch diese Spaltung des DNA- Doppelstranges wird die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Molekülen ermöglicht.

Der Hybridisierungs- Mix enthält eine hohe Formamid- Konzentration, wodurch Mismatch- Hybride destabilisiert werden sollen.

Damit die markierten Proben, die Sonden, die Nukleinsäure erreichen können, muss das Präparat mittels Proteinase K oder Pepsin/ Salzsäure (HCl) vorbehandelt werden.

Nach der Hybridisierung muss ungebundene Probe entfernt werden, was durch das Stringenzwaschen in Salzlösung (SSC= standard saline citrate) erreicht wird.

Die Spezifität des Waschvorganges wird reguliert über die Salzkonzentration der Waschlösung (je geringer konzentriert, desto stringenter), die Formamid- Konzentration und auch die Temperatur.

Es gibt zweierlei Möglichkeiten der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung: Eine direkte und eine indirekte Form:

Bei der *direkten Variante* sind die Nukleotide an Proben gebunden, die mit Fluorochromen gekoppelt sind.

Bei der *indirekten Form* sind diese Nukleotide mit einem Reporter- Molekül gebunden.

Meist werden als Marker Biotin und Digoxigenin eingesetzt. Eine Detektion erfolgt über Fluoreszenz- markiertes Avidin oder Antikörper. Diese indirekte Markierung ermöglicht eine Signalamplifikation, also eine Signalverstärkung.

Nach der Detektion werden die Chromosomen und Kerne mit DAPI- Antifade (4'-6'- Diamidino- 2- Phenylindol) gegengefärbt. Diese DNA- interkalierende Substanz emittiert blaues Licht und das darin enthaltene "Antifade" reduziert das Ausbleichen der Präparate.

Diese werden bei +4°C im Dunkeln aufbewahrt oder können sofort unter Fluoreszenzlicht mikroskopiert und ausgewertet werden.

#### **4.5.1 Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphase- Kernen von Gliom- Tumorzellen**

##### **4.5.1.1 Vorbehandlung der Präparate aus der Zellkultur**

Die Präparate mit den zu hybridisierenden Interphasekernen und Chromosomen werden kurz in 2x SSC gestellt.

Bei 37°C in einer feuchten Kammer erfolgt der RNase- Verdau für 20 Minuten (RNase-Stammlösung 1: 100 in 2x SSC).

Im Anschluss werden die Objektträger dreimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC gewaschen.

Danach erfolgt ein dreiminütiger Pepsin- Verdau bei 37°C im Wasserbad. Die hierzu benötigte Lösung setzt sich wie folgt zusammen: 100ml A. dest., 50µl 10%iges Pepsin in 0,01N HCl (120µl 25%ige HCl).

Die Objektträger werden nachfolgend 5 Minuten in 5x PBS bei Raumtemperatur gewaschen und für 10 Minuten in 4% PFA/ PBS bei 4°C fixiert.

Nachdem erneut 5 Minuten lang in 5x PBS gewaschen wurde, erfolgt die Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70- 80- 96%) für jeweils 3 Minuten.

Sind die Präparate für mindestens 30 Minuten an der Luft getrocknet, erfolgt die Weiterbehandlung durch Denaturierung und Hybridisierung, die jedoch je nach verwendeten Sonden unterschiedlich durchgeführt werden.

## 4.5.1.2 Denaturierung und Hybridisierung

### 4.5.1.2.1 Denaturierung und Hybridisierung mit den Sonden für die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q (direkt markierte Sonden)

#### Denaturierung

100µl Denaturierungslösung, bestehend aus 70µl Formamid, 20µl 20x SSC und 10µl A. dest., werden auf das zu hybridisierende Areal der Objektträger gegeben und diese für 90 Sekunden auf der 72°C- heißen Heizplatte denaturiert.

Danach durchlaufen die Präparate eine -20°C- kalte Alkoholreihe (70- 80- 96%), was ein Renaturieren der DNA- Doppelstränge verhindert, um dann 30 Minuten an der Luft zu trocknen.

#### Hybridisierung

Zwischenzeitlich wird der Hybridisierungs- Mix angesetzt, der sich wie folgt zusammensetzt:

5µl der Sonde für 19q (rot markiert, Cy3),

5µl Hybridisierungs- Mix, der mit den Fertigsonden mitgeliefert wird,

5µl der Sonde für 1p36 (grün markiert, FITC)

pro Objektträger.

Dieser 10µl- Ansatz wird dann 10 Minuten bei 75°C im Wasserbad denaturiert und wird anschließend sofort auf Eis gestellt. Dieser Zwischenschritt ist notwendig, um ein spontanes Renaturieren des Doppelstranges zu verhindern.

Da die Sonden direkt mit Fluorochromen markiert sind, muss möglichst im Dunkeln gearbeitet werden.

Der Hybridisierungsansatz wird auf die markierten Präparate gegeben, die mit Deckgläschen und Fixogum abgedichtet werden. Über Nacht erfolgt die Hybridisierung in einer feuchten Kammer bei 37°C.

#### **4.5.1.2.2 Denaturierung und Hybridisierung mit den zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen 7 und 10 (indirekt markierte Sonden)**

Der Hybridisierungsansatz aus 6µl Formamid, 1µl 20x SSC, 5µl der markierten Sonde für Chromosom 7 oder 1,5µl der Sonde für Chromosom 10 wird auf die unter 4.6.1. vorbehandelten Präparate pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum luftdicht verschlossen.

Die simultane Denaturierung von Präparat und Hybridisierungsansatz erfolgt für 10 Minuten bei 80°C auf einer Heizplatte.

Im Anschluss werden die Präparate über ein bis zwei Nächte in der feuchten Kammer bei 37°C hybridisiert.

#### **4.5.1.3 Stringenzwaschung und Detektion der Proben**

##### **4.5.1.3.1 Stringenzwaschung und Detektion der Proben bei der direkten Fluoreszenz-In Situ- Hybridisierung**

Nachdem Fixogum und Deckglas entfernt wurden, erfolgt die Stringenzwaschung der Präparate bei 65°C in 0,5x SSC/ 0,1% SDS.

Nach 5 Minuten in 1x PBS bei Raumtemperatur durchlaufen die Objektträger zwecks Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe (70- 80- 96%) und trocknen anschließend für mindestens 30 Minuten an der Luft.

Dann werden die Präparate mit DAPI- Antifade eingedeckt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt oder unter dem Fluoreszenz- Mikroskop begutachtet.

#### **4.5.1.3.2 Stringenzwaschung und Detektion der Proben bei der indirekten Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung**

##### Stringenzwaschung

Fixogum und Deckgläschen werden von den hybridisierten Objektträgern entfernt und diese dann 2- bis 3-mal für 5 Minuten in 2x SSC bei 42°C gewaschen.

Anschließend werden die Präparate dreimal 5 Minuten in 57% FA/ 2x SSC bei 42°C eingestellt.

##### Detektion der Proben

Zunächst erfolgt die Einstellung der Objektträger in 4x SSC/ 0,1% Triton bei Raumtemperatur für 5 Minuten.

In der feuchten Kammer werden die Präparate wiederum bei Raumtemperatur 10 bis 20 Minuten lang mit 5% BSA/ 4x SSC geblockt.

In der feuchten Kammer bei 37°C erfolgt die Detektion via Streptavidin- FITC für 45 bis 60 Minuten. Hierzu benötigt man pro Objektträger 100µl 5% BSA/ 4x SSC und 0,5µl SA- FITC (1: 200).

Nochmals wird 3x 5 Minuten in 4x SSC/ TritonX- 100 (0,1%) bei 42°C gewaschen.

Jetzt erfolgen die Amplifikation des FITC- Signals und gleichzeitig die Detektion der Digoxigenin- markierten Sonde.

Zuvor werden die Präparate ein weiteres Mal geblockt. Anschließend wird im 37°C- Wärmeschrank die Inkubation mit Bio- anti- Streptavidin (1:200) und anti- Dig- Cy3 (1: 400) in 5% BSA/ 4x SSC 30 bis 45 Minuten durchgeführt.

An das dreimal 5- minütige Waschen mit 4x SSC/ TritonX- 100 bei 42°C schließt sich ein erneutes Blocken an.

Nach der Detektion mit Streptavidin- FITC (1: 200) und Goat- anti- mouse- Cy3 (1: 400) in 5% BSA/ 4x SSC für 30 bis 45 Minuten werden die Präparate nochmals 3x 5 Minuten in 4x SSC/ TritonX- 100 bei 42°C gewaschen.

Nach dem Dehydrieren in der aufsteigenden Alkoholreihe (70- 80- 96%) und nach mindestens 30- minütigem Lufttrocknen werden die Objektträger mit DAPI- Antifade eingedeckt und entweder sofort unter dem Fluoreszenz- Mikroskop betrachtet oder im Dunkeln bei +4°C aufbewahrt.

#### **4.5.2 Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Tumorausstrichpräparaten**

Die bei -20°C gelagerten Präparate werden bei Raumtemperatur aufgetaut, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70- 80- 96%) dehydriert und für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet (s.o.).

Die weitere Vorbehandlung erfolgt wie zuvor beschrieben für Zellkulturpräparate, allerdings mit einem verlängerten Pepsinverdau von 4-5 Minuten, da bei den Ausstrichpräparaten neben den Tumorzellen noch andere Gewebereste auf den Objektträgern haften und das Penetrieren der Sonden in die Tumorzellkerne erschweren.

Denaturierung und Hybridisierung sowie Stringenzwaschung und Probedetektion erfolgen analog zu den Schritten bei der Hybridisierung von Zellkulturpräparaten.

#### **4.5.3 Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Lymphocyten**

Bei der Vorbehandlung von Lymphocyten beträgt der Pepsinverdau nur 1 bis 2 Minuten, ansonsten entspricht sie der Vorbehandlung der Präparate aus der Zellkultur.

Auch hier sind die weiteren Schritte identisch mit denen bei Tumorpräparaten aus der Zellkultur.

#### 4.6 Auswertung und Statistik

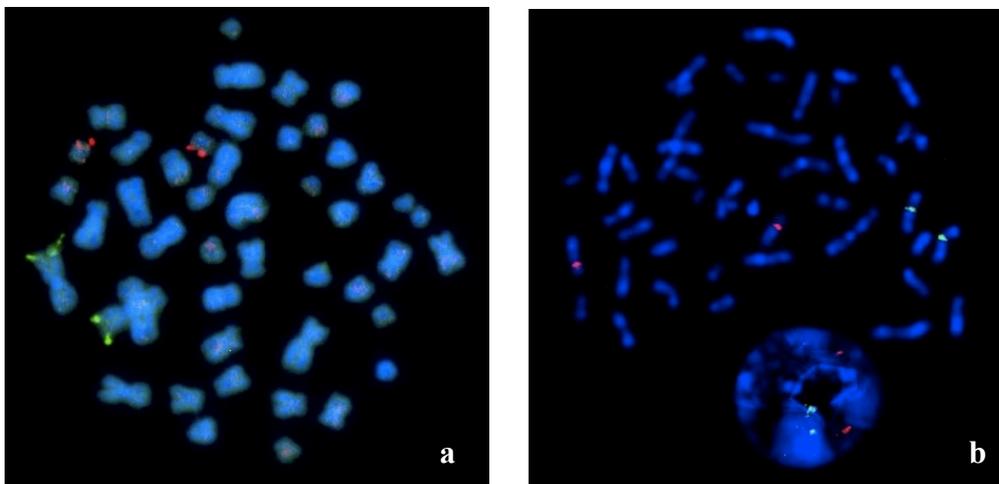
Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse wurde an dem Fluoreszenzmikroskop BX60 von Olympus vorgenommen.

Dieses Mikroskop verfügt über die Filter MWIG für DAPI (360- 370nm), MWIBA für FITC-Signale (460- 490nm) und MWIG für Cy3- Signale (520- 550nm).

Außerdem ist es mit einem Simultanfilter MF für FITC- und Cy3 Signale (480- 500/ 550- 575nm) ausgerüstet.

Wenn die Qualität der Zellkerne es zuließ, wurden pro Präparat in 200 Interphasekernen die Anzahl der Fluoreszenzsignale detektiert.

Zur Kontrollhybridisierung wurden Blutlymphocyten benutzt. Der weitaus größte Teil dieser Zellen zeigte für die eingesetzten Sonden jeweils zwei Signale, wie es für einen diploiden Chromosomensatz zu erwarten ist. Als Beispiele sind in **Abbildung 11** Hybridisierungsergebnisse von gesunden Blutlymphocyten mit Sonden für die Chromosomen 7 und 10 sowie für die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q dargestellt:



**Abbildung 11: a) 1p36 (FITC) und 19q (Cy3), Blutlymphocyten, Mitose; b) #7 (FITC) und #10 (Cy3), Blutlymphocyten, Mitose und Zellkern**

Dennoch zeigte sich um diesen oben genannten Erwartungswert eine Streuung. Dies ist unter Anderem auf Fehlhybridisierungen oder somatische Chromosomenpaarung zurückzuführen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Faktoren auch in den Tumorpräparaten zum Tragen kommen und somit eine Streuung der gleichen Größenordnung um den tatsächlichen Wert der Zählergebnisse zeigen.

Um beurteilen zu können, ob die in den einzelnen Gliomen nachgewiesenen Aberrationen signifikant sind, wurde dieser Streuwert in die Auswertung miteinbezogen.

Dazu wurden sowohl die Mittelwerte (in Prozent) aus den Ergebnissen des Kontrollmaterials (Blutlymphocyten) als auch die Standardabweichung als Maß für die Streuung ermittelt.

#### Berechnung des Mittelwertes

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

#### Berechnung der Standardabweichung

$$s_X := \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die dargestellten Aberrationen signifikant sind, wurde für die Signalanzahl pro Zellkern von Lymphocyten als Referenz ein Intervall berechnet, innerhalb dessen ein Wert als normal angesehen werden kann.

Um die Ober- bzw. Untergrenze der einzelnen Intervalle festzulegen, wurde vom berechneten Mittelwert jeder Einheit die doppelte Standardabweichung addiert bzw. subtrahiert.

Im Folgenden sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 die Hybridisierungsergebnisse der Lymphocyten dargestellt.

#### 19q

	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1	0
2	0	2	188	0	0	0
3	0	0	3	0	0	0
4	0	0	0	1	5	0
8	0	0	0	0	0	0

#### 1p36

19q

	0	1	2	3	4	8
0	0	1	0	1	1	0
1	0	0	0	0	0	0
2	2	0	182	0	2	0
3	0	0	0	2	0	0
4	0	2	3	0	3	0
8	0	0	0	0	0	1

1p36

19q

	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	194	2	0	0
3	0	2	0	0	0	0
4	0	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	0	0

1p36

#10

	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	2	192	0	0	0
3	0	0	2	0	0	0
4	0	0	0	1	3	0
8	0	0	0	0	0	0

#7

#10

	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1	0
2	0	3	188	0	0	0
3	0	2	2	0	0	0
4	0	0	0	3	1	0
8	0	0	0	0	0	0

#7

#10

	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	2	0	0
2	0	0	184	0	0	0
3	0	3	4	0	0	0
4	0	0	0	1	6	0
8	0	0	0	0	0	0

#7

Abbildung 12: Hybridisierungsergebnisse der Lymphocyten als Referenzgewebe, Auszählung

Prozentualer Anteil der Signale in Lymphozytenkernen

19q

%	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0,5	0
2	0	1,0	94,0	0	0	0
3	0	0	1,5	0	0	0
4	0	0	0	0,5	2,5	0
8	0	0	0	0	0	0

1p36

19q

%	0	1	2	3	4	8
0	0	0,5	0	0,5	0,5	0
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	91,0	0	1,0	0
3	0	0	0	1,0	0	0
4	0	1,0	1,5	0	1,5	0
8	0	0	0	0	0	0,5

1p36

19q

%	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0,5	0	97	1,0	0	0
3	0	1,0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0,5	0
8	0	0	0	0	0	0

1p36

#10

%	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	1,0	96,0	0	0	0
3	0	0	1,0	0	0	0
4	0	0	0	0,5	1,5	0
8	0	0	0	0	0	0

#7

#10

%	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0,5	0
2	0	1,5	94	0	0	0
3	0	1,0	1,0	0	0	0
4	0	0	0	1,5	0,5	0
8	0	0	0	0	0	0

#7

#10

%	0	1	2	3	4	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1,0	0	0
2	0	0	92,0	0	0	0
3	0	1,5	2,0	0	0	0
4	0	0	0	0,5	3,0	0
8	0	0	0	0	0	0

#7

Abbildung 13: Hybridisierungsergebnisse der Lymphocyten als Referenzgewebe, prozentualer Anteil

Die Ergebnisse der Berechnungen zeigt Abbildung 14.

1p36/ 19q	
MW	94%/ 6%
SD	2,45
2SD	4,9
MW +/- SD	3,55 - 8,45
MW +/- 2SD	1,1 - 10,9

#7/ #10	
MW	94%/ 6%
SD	1,63
2SD	3,26
MW +/- SD	4,37 - 7,63
MW +/- 2SD	2,74 - 9,26

Abbildung 14: Ergebnisse der Berechnungen von Mittelwert und Standardabweichung

Als sog. Cutt- Off wurde sowohl für die Single- copy- Sonden 1p36 und 19q als auch für die Zentromersonden für die Chromosomen 7 und 10 ein Wert von 6% berechnet.

Bei der Auswertung der Tumorzellkerne wurden Werte >6% nicht als signifikant angesehen. Eine Signifikanz besteht also bei Werten >6%.

#### 4.7 Geräte und Software

<b>Brutschrank, begast</b>	Metasystems, Altlusheim
<b>Fluoreszenzmikroskop AX 70</b>	Olympus, Hamburg
<b>ISIS Software Version 3.1. (FISH)</b>	Metasystems, Altlusheim
<b>Kamera Colourview 12</b>	Olympus, Hamburg
<b>Mikroskop BX 61</b>	Olympus, Hamburg
<b>Sterilbank Laminair</b>	Heraeus, Hanau
<b>Waage H110</b>	Satorius, Göttingen
<b>Wasserbäder</b>	GFL, Großburgwedel
<b>Zentrifuge, Rotina</b>	Hettich, Tuttlingen

## 5 Ergebnisse

### 5.1 CTG- Bänderung und Karyotypisierung der Gliom- Zellkultur

In dieser Arbeit wurden insgesamt 52 Gliome molekularzytogenetisch mit Hilfe der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung auf genetische Veränderungen hin untersucht. Hierbei wurden Sonden für die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie für die Chromosomen 7 und 10 eingesetzt.

Nur zu 20 dieser Tumoren existierten zytogenetische Befunde in Form von Karyogrammen (Mitwirkung: Humangenetisches Institut des Universitätsklinikums Homburg/ Saar, Fr. U. Lindemann).

Dies hat zwei Ursachen:

- 1) Einerseits war es nicht möglich, alle Tumoren so lange in Zellkultur zu züchten, dass der für die Karyotypisierung notwendige Mitoseschub stattfinden konnte.

Die FISH jedoch kann auch an Interphasekernen angewendet werden. Metaphasechromosomen, wie sie für die CTG- Bänderung erforderlich sind, sind hier nicht nötig.

Auch bei geringen Mengen an Tumormaterial, die für eine Zellkultur nicht ausreichend waren, konnten FISH- Untersuchungen vorgenommen werden, da hierfür einzelne Tumorzellen ausreichend sind.

- 2) Andererseits wurden die Tumorpräparate, die als Ausstrichpräparate gewonnen wurden, nicht kultiviert.

Somit existieren in dieser Arbeit generell für die Gliome, deren Tumornummern mit der Ziffer "5" beginnen, keine zytogenetischen Befunde.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Karyotypisierungen zusammenfassend dargestellt. Die für diese Arbeit relevanten Befunde sind rot unterlegt.

Tumornr.	Tumor	Karyotyp
T6266	GBM- Rez.	68-80,XY,+1,+1,-2,+3,+4,+4,+5,+6,+7,+8,-9,- 11,+12,+12,+12,+14,+16
T6281	OAII- Rez.	41,XY,-5,-13,-16,-19,-22[1] 35,-X,Y,-3,-7,-8,-10,-11,-12,-14,-14,-17,-19[1] 91,XXYY,-1,-7,+10,-17,+18,-19,+mar[1]
T6296	OAIII	44,XY,12,-13[1] 45,XY,-19,+20,-21[1] 44,XY,-4,-10,del(1)(p22)[1]
T6298	A	46,XX 90,XXX,-X,-19[1]
T6304	GBM	38,X,-Y,-10,-12,-16,-18,-19,-20,-20,-[1] 77,XXYY,-1,-2,-3,-3,+5,-6,-11,-11,-11,-11,-12,-12,-13,-13,-16,- 20,-20[1]
T6321	OII	42-45,XY,-10,-16,-19,-20,-22[cp9]
T6327	OAIII	45,XX,+9,-10,-13[X][cp7] 45,XX,-4,+9,-19[1]
T6332	AII	47,XY,+9[4] 45,XY,-22[cp3]
T6336	GBM	41-47,X,-X,1p-,3q-,+7q,-9,der9,-13,-17,+19q,- 20,+21,+mar,+mar[cp11]
T6337	GBM	56-67,XX,del(1)(q31),+6,+9,+9q,der9,-13,+22,+5~7mar [cp2]
T6355	GBM	43-48,XX,t(1;11)(p31;q25?),+7,del(9)(p21),-10,-22,dmin
T6361	GBM	48,XY,+17,+21,dmins[1] 87,-X,-2,-5,+9,del(9)(p21),-10,+13,-19,-21[1]
T6379	PA	45,X,-Y
T6387	GBM	72,XY,+1,+3,+4,+6,+7,+8,+9,-10,+12,-13,-14,-19,+22 37,X,-Y,-10,-11,-13,-14,+14,-18,-21
T6389	PA	46,XY
T6392	GBM	72-99,XXY,+1,+del(1)(p11),-2,- 2,+3,+6,+6,del(6)(q21),+7,+7,+7,+7, del(9)(p21),+10,+10,-13,-14,-15,+16,+16,+17,+18,+19,- 21,+22,+22, 8-15mar,+dmin[p9]

T6400	GBM	46,XY[2] 47,XY,+2,+7,-10,+20,+20,-22,-22[1]
T6433	GBM	46,XX,-1,+der6,+7,-9,-10,-11,-14,-16,+18,+20[cp8] 88-92,XXXX,+6,+7,+7,+7,-10,-10,-14,-14,-16,-16,+,+18,+20,+20,- 22,-22, 1-12mar[cp5]
T6441	PA	46,XY,[3] 47,XY,+7[2] 44,XY,-10,-21[1]
T6448	GBM	82-91,XXXX,+7,+7,+7,-8,-9,-10,-11,+12,-13,-14,-15,+17,+17,-18 +1~4mar, dmin[cp5]

Abbildung 15: Tabellarische Übersicht über die zytogenetischen Befunde

### Pilocytische Astrocytome

Karyogramme wurden zu 3 der hier untersuchten pilocytischen Astrocytome angefertigt.

Zwei dieser Tumoren (T6379 und T6389) zeigten keine Veränderungen auf zytogenetischer Ebene.

In dem Tumor T6441 stellen sich Zugewinne von Chromosom 7 sowie Verluste von Chromosom 10 dar.

### Diffuse und anaplastische Astrocytome

Von zwei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Astrocytomen (T6298, T6332) waren Karyogramme angefertigt worden.

Während der Karyotyp des Tumors T6332 unauffällig war, zeigte das Astrocytom T6298 einen Verlust von Chromosom 19.

### Glioblastome

Etwa ein Drittel (11/30) der in dieser Arbeit molekularzytogenetisch untersuchten Glioblastome waren zuvor zytogenetisch karyotypisiert worden.

In 8/11 dieser Glioblastome zeigten sich Zugewinne von Chromosom 7, was annähernd zwei Drittel ausmacht (T6266, T6336, T6355, T6387, T6392, T6400, T6433, T6448).

Verluste von Chromosom 10 konnten in sieben der untersuchten Glioblastome nachgewiesen werden, also in über 60% (T6304, T6355, T6361, T6387, T6400, T6433, T6448).

Verluste von Chromosom 1 zeigten sich in 3/11 Glioblastomen (T6304, T6336, T6433), wobei erwähnt werden muss, dass in dem Tumor T6336 der kurze Arm von Chromosom 1 deletiert war (1p-).

Chromosom 19 hingegen war ebenfalls in 3/11 Glioblastomen in verminderter Anzahl nachzuweisen (T6304, T6361, T6387).

### Oligodendrogliome

Zu einem Oligodendrogliom existierte der zytogenetische Befund. In diesem Tumor (T6321) waren die Chromosomen 10 und 19 numerisch aberrant im Sinne einer verminderten Anzahl.

### Oligoastrocytome

3/4 Oligoastrocytomen wurden karyotypisiert.

Alle Tumoren wiesen Deletionen der Chromosomen 10 und 19 auf.

Der Tumor T6281 wurde als WHO- Grad II eingestuft, die beiden Oligoastrocytome T6296 und T6327 als WHO- Grad III.

### Ependymome

Die beiden Ependymome aus der vorliegenden Arbeit waren nicht zytogenetisch untersucht worden.

Im Folgenden ist beispielhaft ein Ergebnisauszug aus den Karyotypisierungen wiedergegeben (Abbildung 16). Rot markiert sind die folgenden Aberrationen: Monosomie 5 und 10, Trisomie 9 und 12 sowie fehlendes Y- Chromosom.

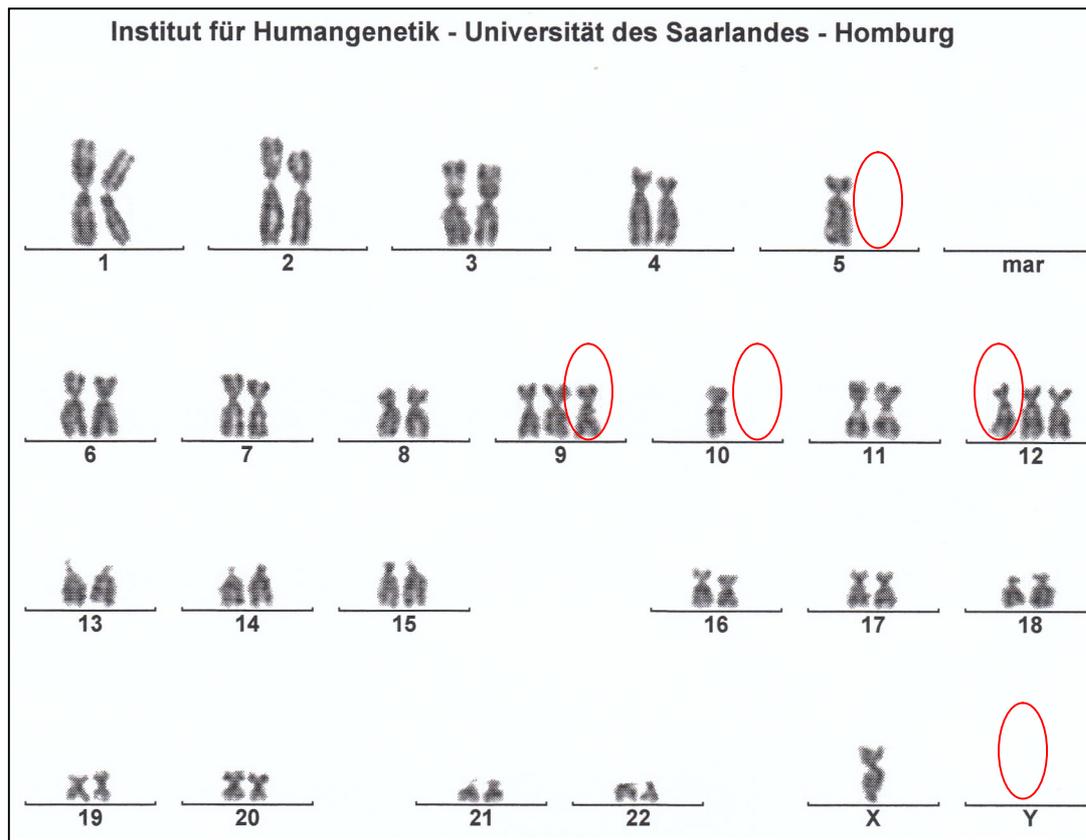


Abbildung 16: Karyogramm des Tumors T6327, Oligoastrocytom III°

## 5.2 Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Gliom- Tumorzellen

- mit locusspezifischen Sonden für 1p36 und 19q
- mit Zentromersonden für die Chromosomen 7 und 10

Mittels FISH wurden 52 Gliome, die in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Homburg/ Saar reseziert worden waren, auf genetische Aberrationen hin untersucht.

Mithilfe von Zentromersonden wurden numerische Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 detektiert, während für die Darstellung der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q Locus- spezifische Sonden zum Einsatz kamen.

Die verwendeten Präparate wurden einerseits aus Zellkulturen gewonnen, andererseits wurden auch Tumorausstrichpräparate verwendet.

Die Aberrationen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz- Mikroskopes detektiert, über ein Zählprogramm wurden die Ergebnisse in tabellarischer Form dokumentiert. Sofern ausreichend intakte Zellkerne vorhanden waren, die die Kriterien der Auswertung erfüllten, wurden jeweils 200 Tumorzellkerne untersucht.

Besonderes Interesse galt Deletionen der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q sowie Zugewinnen von Chromosom 7 und Verlusten von Chromosom 10.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden dargestellt.

Gewertet wurden Veränderungen, die mit einer Häufigkeit von mindestens 10% auftraten (Cut Off: 6%, aus Reliabilitätsgründen: doppelte Standardabweichung, für die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q 10,9%, für die Chromosomen 7 und 10 9,26%, Kapitel 4.6.).

Die Ergebnisse zu den einzelnen Gliomentitäten sind jeweils in tabellarischer und graphischer Form dargestellt (siehe Abbildung 17 bis Abbildung 29).

### Pilocyrtische Astrocytome

#### *Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q*

Es wurden fünf pilocytische Astrocytome mit Hilfe der FISH auf Alterationen der Bereiche 1p36 und 19q hin untersucht.

Eine Deletion des chromosomalen Bereiches 1p36 konnte in keinem der hier untersuchten pilocytischen Astrocytome nachgewiesen werden.

Ein Verlust von 19q hingegen wurde in 2/5 pilocytischen Astrocytomen detektiert (T6408, T6441), was einem prozentualen Anteil von 40% entspricht. Es zeigten sich homozygote und heterozygote Verluste von 19q.

Bei der Untersuchung zeigten sich außerdem in 60% (3/5) dieser Gliomentität tetrasome Zellkerne für 1p36 und 19q (T5836, T6379, T6389).

#### *Veränderungen der Chromosomen 7 und 10:*

Von den fünf pilocytischen Astrocytomen in dieser Arbeit konnte der Tumor T6441 nicht auf Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 hin untersucht werden.

In den vier untersuchten pilocytischen Astrocytomen zeigte sich kein signifikanter Zugewinn von Chromosom 7, auch ein signifikanter Verlust von Chromosom 10 konnte nicht nachgewiesen werden.

Das pilocytische Astrocytom T6389 zeigte tetrasome Zellkerne für die Chromosomen 7 und 10.

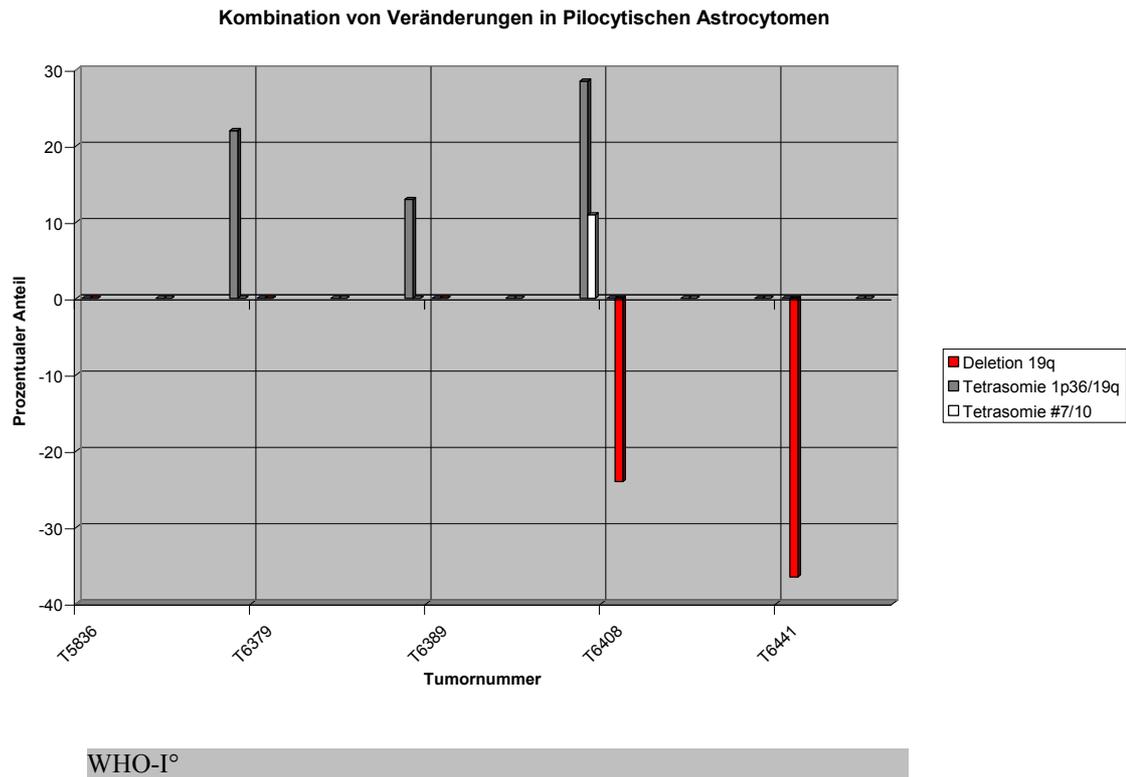
*Kombination von Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie der Chromosomen 7 und 10:*

4/5 pilocytischen Astrocytomen konnten sowohl mit Sonden für die Regionen 1p36 und 19q als auch mit Sonden für die Chromosomen 7 und 10 hybridisiert werden.

Das pilocytische Astrocytom T6389 zeigte sowohl tetrasome Zellkerne für 1p36 und 19q als auch für die Chromosomen 7 und 10.

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozent. Anteil
<b>WHO- Grad I</b>	<b>T5836</b>	2	1	6%	2	1	8,5%
		4	2	8%			
		4	4	22%			
	<b>T6379</b>	2	0	7%	3	3	7%
		2	1	9%	4	4	9%
		4	4	13%			
	<b>T6389</b>	4	2	7,5%	4	4	11%
		4	4	28,5%			
	<b>T6408</b>	2	0	11,5%	2	1	7,5%
		2	1	12,5%	4	4	8,5%
		3	2	6%			
	<b>T6441</b>	1	0	6%			
		2	0	36,5%			
		2	1	9,5%			

**Abbildung 17: Tabellarische Übersicht über Alterationen in pilocytischen Astrocytomen**



**Abbildung 18: Graphische Übersicht über Alterationen in pilocytischen Astrocytomen**

### Diffuse und anaplastische Astrocytome

#### *Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q:*

3 diffuse Astrocytome (T5865, T6322, T6332; WHO- Grad II) und zwei anaplastische Astrocytome (T6298, T6307; WHO- Grad III) konnten mit Sonden für 1p36 und 19q hybridisiert werden.

Eine Deletion von 1p36 wurde in 60% der Astrocytome (3/5) detektiert (T6322, T6298, T6307).

Bei den beiden letzteren Tumoren handelt es sich um Astrocytome des WHO- Grades III, das Astrocytom T6322 wurde als WHO- Grad II eingestuft.

Bei den WHO- Grad III- Astrocytomen wurden nur homozygote Verluste von 1p36 nachgewiesen, während für den Tumor des WHO- Grades II auch heterozygote Verluste detektiert werden konnten.

Die chromosomale Region 19q war in einem Astrocytom vom WHO- Grad II deletiert (T5865) und in zwei Grad III- Tumoren (T6298, T6307). Es konnten homozygote wie heterozygote Verluste nachgewiesen werden.

Tetrasome Zellkerne zeigten sich in dem Tumor T6298 (WHO- Grad III; 1/5).

*Veränderungen der Chromosomen 7 und 10:*

Nur das Astrocytom T5856 (WHO- Grad II) konnte mit Zentromersonden für die Chromosomen 7 und 10 untersucht werden.

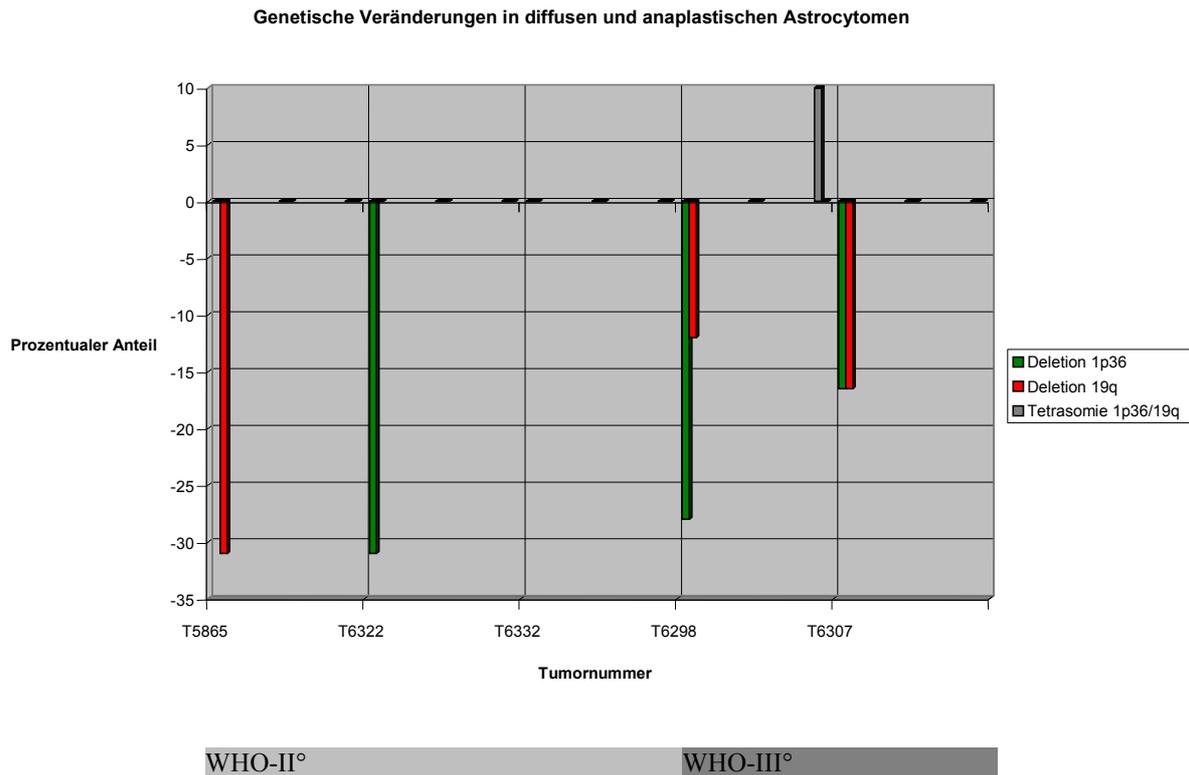
Ein Zugewinn von Chromosom 7 oder ein Verlust von Chromosom 10 wurden in diesem Tumor nicht nachgewiesen.

*Kombination von Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie der Chromosomen 7 und 10:*

Auffällig war, dass in beiden Tumoren des WHO- Grades III Deletionen von 1p36 mit Deletionen von 19q kombiniert waren.

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozent. Anteil
<b>WHO- Grad II</b>	<b>T5865</b>	2	0	13%	2	3	7%
		2	1	18%	4	4	8,5%
	<b>T6322</b>	0	2	16,5%			
		1	2	14,5%			
		2	4	6,5%			
		4	4	8%			
	<b>T6332</b>	1	2	6%			
<b>WHO- Grad III</b>	<b>T6298</b>	0	0	12%			
		0	2	16%			
		0	4	8%			
		4	4	10%			
	<b>T6307</b>	0	0	16,5%			

**Abbildung 19: Tabellarische Übersicht über Alterationen in diffusen und anaplastischen Astrocytomen**



**Abbildung 20: Graphische Übersicht über Alterationen in Astrocytomen**

### Glioblastome

#### *Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q:*

Von insgesamt 30 Glioblastomen konnten 27 Tumoren mit locuspezifischen Sonden für 1p36 und 19q untersucht werden.

Deletionen des chromosomalen Bereiches 1p36 wurden in 10 der 27 Glioblastome detektiert (T5706, T6313, T6337, T6400, T6410, T6426, T6427, T6432, T6433, T6448). Dies entspricht einem prozentualen Anteil von annähernd 40%.

Homo- und heterozygote Verluste waren in etwa gleich häufig zu verzeichnen.

Häufiger als Deletionen von 1p36 zeigten sich solche von 19q.

Etwa 60% (16/27) der Glioblastome wiesen homo- oder heterozygote Verluste dieser chromosomalen Region auf (T5789, T5800, T5809, T5845, T5856, T5872, T5892, T6336, T6355, T6362, T6410, T6426, T6427, T6432, T6433, T6448).

Tetrasome Tumorzellkerne für 1p36 und 19q konnten in einem Drittel (9/27) der Glioblastome detektiert werden (T5706, T5809, T5858, T5892, T6266, T6361, T6387, T6392, T6394).

Jeweils 8 Signale für die Loci 1p36 und 19q ließen sich in den Glioblastomen T6266 und T6392 nachweisen.

Ein Sonderfall ergibt sich bei den Glioblastomen T5706 und T6362:

In dem Tumor T5706 zeigten sich Zellkerne mit 2 Signalen für 1p36 bei 3 Signalen für 19q.

Der Tumor T6362 wies Kerne auf mit 3 Signalen für 1p36 und fehlendem Signal für 19q auf.

#### *Veränderungen der Chromosomen 7 und 10:*

Bei 6/30 Glioblastomen war die Hybridisierung mit Sonden für die Chromosomen 7 und 10 aufgrund von Materialmangel nicht möglich.

Signifikante Zugewinne von Chromosom 7 konnten in annähernd 40% der Glioblastome nachgewiesen werden (9/24: T5787, T5800, T5856, T5858, T6355, T6361, T6362, T6392, T6433).

Häufiger aber als Zugewinne von Chromosom 7 waren Verluste von Chromosom 10, die sich in 15 der 24 untersuchten Glioblastome zeigten (T5706, T5800, T5809, T5856, T5858, T6304, T6337, T6355, T6361, T6362, T6387, T6392, T6400, T6415, T6433). Dies macht einen prozentualen Anteil von über 60% aus.

Hierbei konnten neben Monosomien von Chromosom 10 und Verlusten dieses Chromosomes bei tetraploidem Chromosomensatz auch Nullisomien (T5706, T6304, T6337, T6355) dargestellt werden. Auf diesen Sachverhalt wird im Kapitel Diskussion unter "Heterogenität von Gliomen" nochmals eingegangen.

Tetrasome Tumorzellkerne für die Chromosomen 7 und 10 wurden in einem Viertel der Glioblastome nachgewiesen (6/24: T5709, T6266, T6394, T6426, T6427, T6433).

Zwei Glioblastomen (T6426, T6427) muss im Kapitel Diskussion unter "Heterogenität von Gliomen" besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden: Bei diesen Tumoren scheint es sich um Verluste von Chromosom 7 zu handeln.

*Kombination von Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie der Chromosomen 7 und 10:*

22 der insgesamt 30 Glioblastome konnten mit allen Sonden hybridisiert werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus den einzelnen Hybridisierungen war auffällig, dass in mehr als 20% der Glioblastom- Tumorzellen Deletionen der chromosomalen Region 19q mit Verlusten von Chromosom 10 kombiniert waren (5/22: T5800, T5856, T6355, T6362, T6433).

Alle Glioblastomzellen, in denen Deletionen von 19q mit Verlusten von Chromosom 10 kombiniert waren, wiesen auch Zugewinne von Chromosom 7 auf (T5800, T5856, T6355, T6362, T6433).

Deletionen von 1p36 und 19q traten zu mehr als 20% als Kombination in den gleichen Glioblastomzellen auf (6/27: T6410, T6426, T6427, T6432, T6433, T6448).

Ein gemeinsames Auftreten von Zugewinnen von Chromosom 7 und Verlusten von Chromosom 10 in der gleichen Tumorzelle konnte in einem Drittel der Fälle nachgewiesen werden (8/24: T5800, T5856, T5858, T6355, T6361, T6362, T6392, T6433).

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozent. Anteil
<b>WHO-IV°</b>	<b>T5706</b>	2	3	10%	2	0	11%
		3	3	8%	2	1	9%
		2	4	16,5%	4	2	7%
		3	4	6,5%	3	3	11%
		4	4	19,5%	4	3	7%
					4	4	8%
	<b>T5709</b>				4	2	8%
					4	4	16%
	<b>T5787</b>				3	2	10,5%
					4	2	7%
					4	4	8%
	<b>T5789</b>	2	0	29,5%			
		2	1	27,5%			

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozent. Anteil
<b>WHO IV°</b>	<b>T5800</b>	2	0	19,5%	2	1	13,5%
		4	0	12%	4	2	13%
		4	2	14%	5	3	10,5%
		4	4	7%			
	<b>T5809</b>	4	4	22%	2	1	14%
		4	2	6,5%			
	<b>T5845</b>	2	0	58%			
		2	1	22,5%			
	<b>T5856</b>	2	0	77,5%	2	1	14%
		2	1	9%	3	1	31%
					3	2	19%
	<b>T5858</b>	3	2	6,5%	2	0	9,5%
		2	4	8,5%	2	1	12%
		3	4	8%	3	1	7,5%
		4	4	17%	3	2	13%
		3	3	6,5%	4	2	9%
	<b>T5872</b>	2	0	9,5%			
		4	0	15%			
		2	1	14%			
		3	1	6%			
		4	1	20%			
		4	2	15,5%			
	<b>T5892</b>	4	0	7%			
		4	2	12%			
		4	4	27%			
	<b>T6266</b>	4	4	45,5%	2	0	6,5%
		8	8	11,5%	2	4	7,5%
					4	4	19,5%
	<b>T6304</b>	2	1	6,5%	0	0	10%
		4	4	7%	1	0	19%
					2	0	25%
					2	1	19%
	<b>T6313</b>	0	2	15%	0	0	0%
		1	2	15,5%	0	0	0%
		4	4	6,5%	0	0	0%

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozent. Anteil
<b>WHO-IV°</b>	<b>T6336</b>	1	0	8,5%	2	1	6,5%
		2	0	23,5%			
		2	1	19%			
	<b>T6337</b>	0	2	15,5%	0	0	6%
		1	2	13%	2	0	33%
					2	1	22%
	<b>T6355</b>	2	1	12,5%	3	0	23,5%
					2	1	6,5%
					3	1	38%
					3	2	11%
					4	2	6%
	<b>T6361</b>	4	4	50,5%	4	1	12%
					4	2	11%
					5	2	25%
					5	3	18%
	<b>T6362</b>	2	0	41,5%	3	2	16%
		3	0	37,5%	4	2	53,5%
		4	0	7,5%			
	<b>T6387</b>	4	4	26%	2	1	16,5%
					3	2	9%
	<b>T6392</b>	4	2	8,5%	4	2	10%
		4	3	7,5%	5	2	7%
		4	4	21%	5	3	12%
		8	8	15%	4	4	7%
					5	4	10%
					8	8	9,5%
	<b>T6394</b>	4	3	8%	4	4	10,5%
		4	4	16%			
	<b>T6400</b>	2	1	8%	2	1	12%
		1	2	14%	4	1	17%
		2	3	6%	4	2	16%
		2	4	6%			

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozent. Anteil
<b>WHO-IV°</b>	<b>T6410</b>	0	0	8,5%	2	1	9,5%
		1	0	15,5%	3	2	6%
		2	0	14,5%			
		0	1	10%			
		1	1	10%			
		0	2	10%			
	<b>T6415</b>				2	1	9%
					4	2	25%
					4	4	7%
	<b>T6426</b>	0	0	40%	2	3	11%
		1	0	18%	2	4	25,5%
		2	0	20%	3	4	7%
		1	1	8%	4	4	14,5%
	<b>T6427</b>	1	0	11%	2	3	10,5%
		2	0	25%	2	4	41,5%
		1	1	7,5%	3	4	7%
		2	1	20%	4	4	10,5%
	<b>T6432</b>	0	0	11%			
		1	0	15%			
		2	0	15%			
		4	0	6%			
		2	1	10%			
		4	2	7,5%			
	<b>T6433</b>	1	0	8%	3	1	6%
		2	0	47%	4	1	14,5%
		4	0	6%	3	2	10%
		2	1	8%	4	2	31,5%
		0	2	12%	4	4	16,5%
	<b>T6448</b>	0	0	6%			
		1	0	11,5%			
		2	0	13%			
		2	1	8%			
		4	1	6,5%			
		4	4	6,5%			

Abbildung 21: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Glioblastomen

### Genetische Veränderungen in Glioblastomen

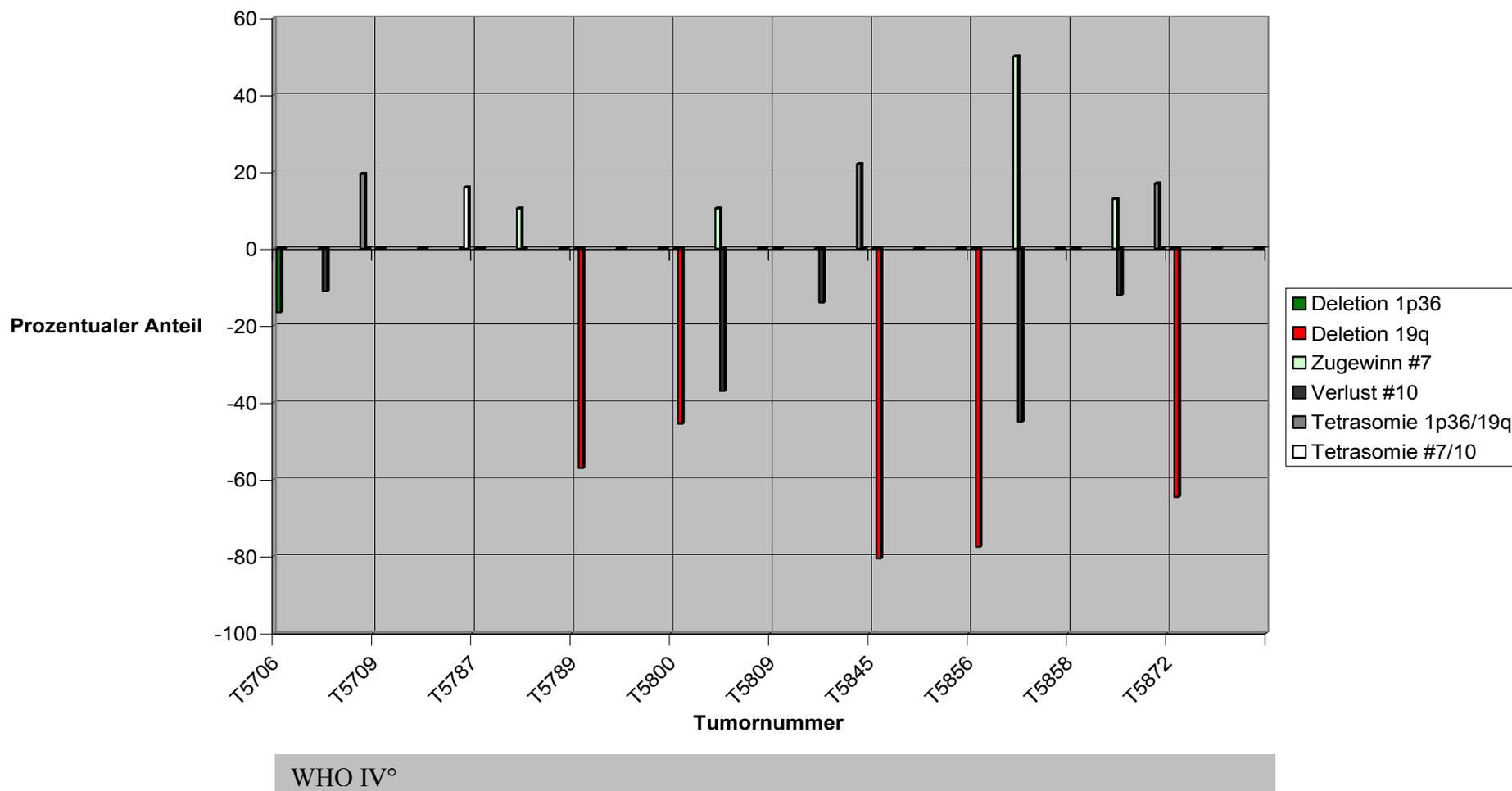
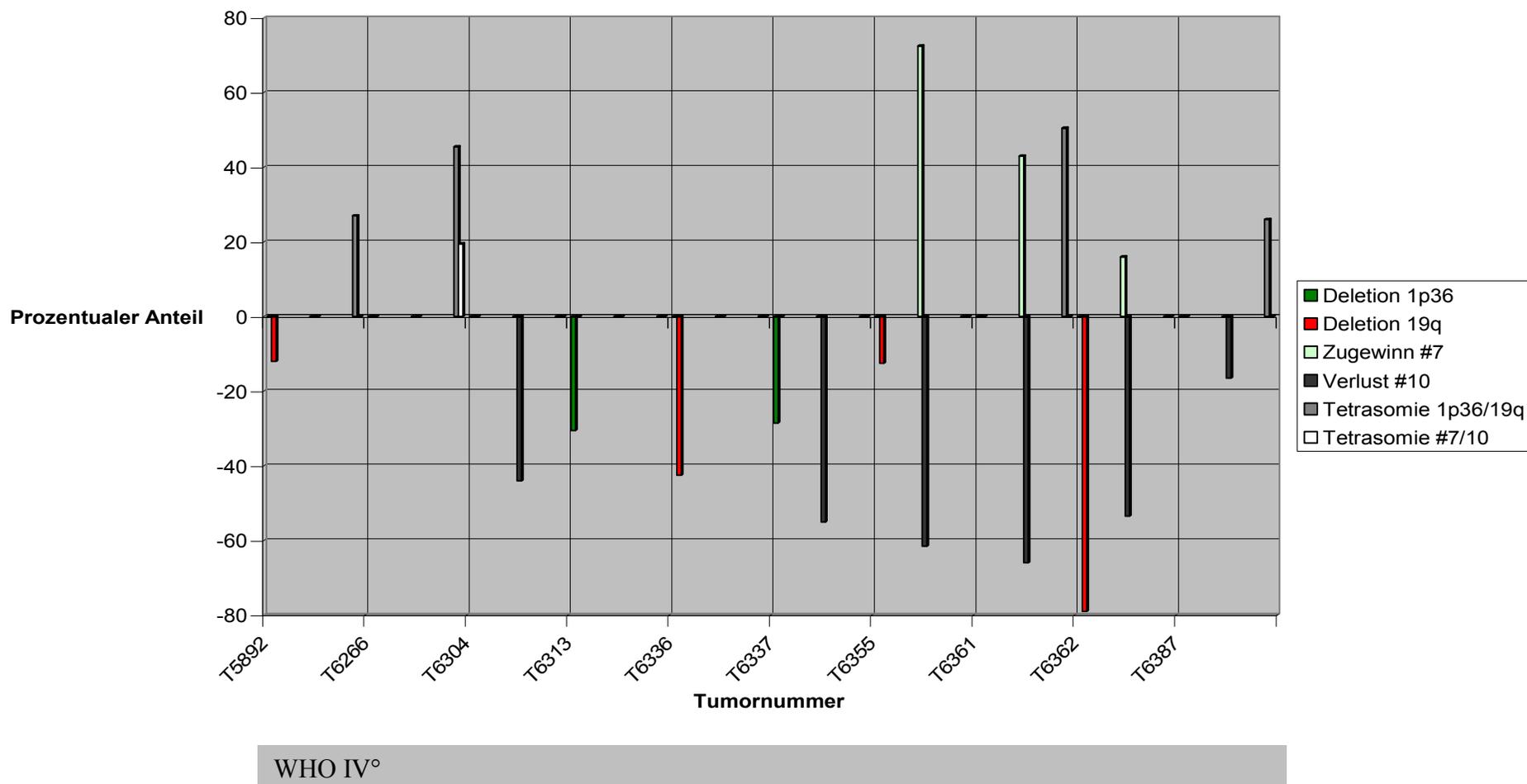


Abbildung 22: Graphische Übersicht über Alterationen in Glioblastomen

### Genetische Veränderungen in Glioblastomen



WHO IV°

Abbildung 23: Graphische Übersicht über Alterationen in Glioblastomen

### Genetische Veränderungen in Glioblastomen

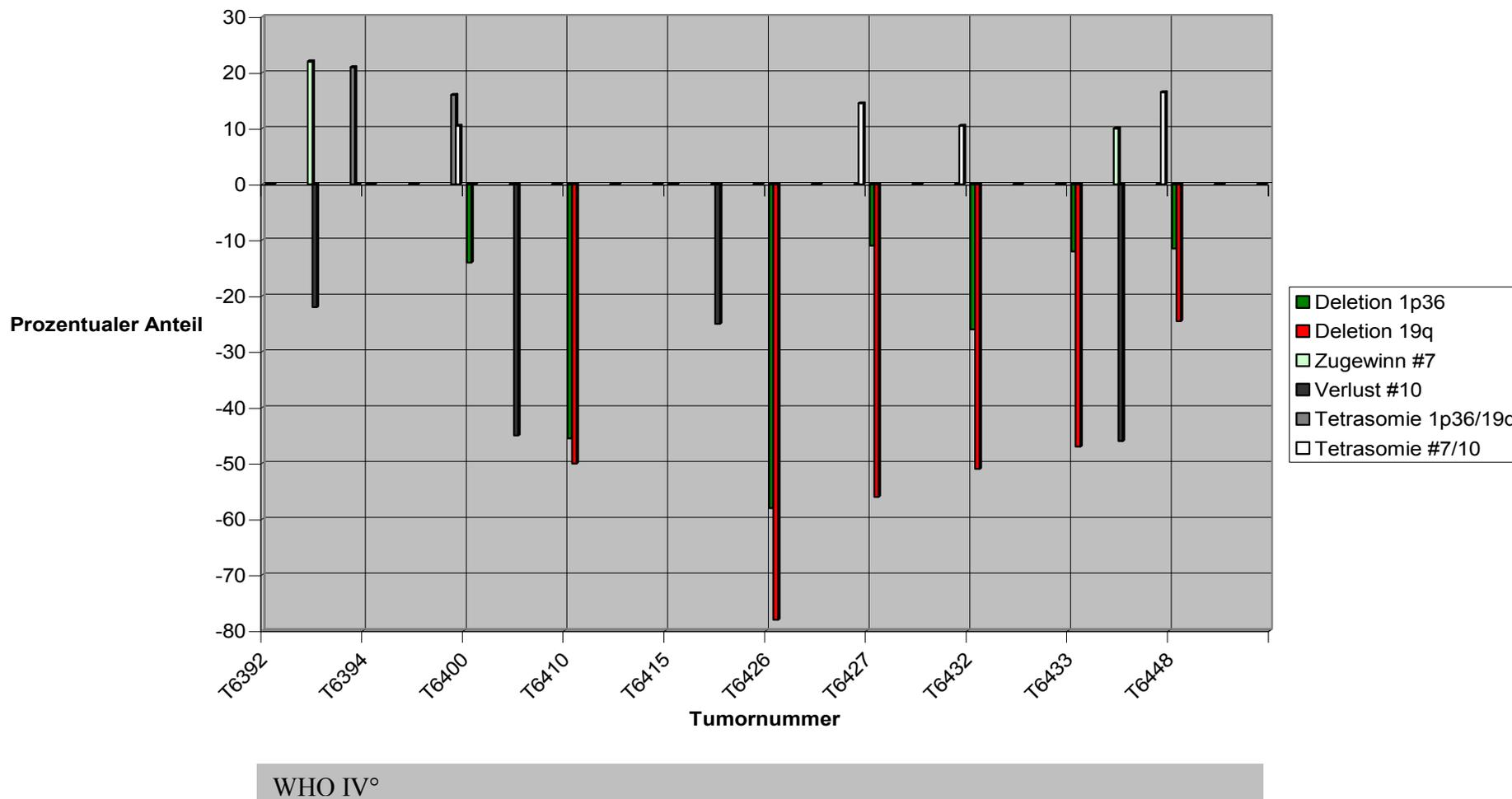


Abbildung 24: Graphische Übersicht über Alterationen in Glioblastome

## Oligodendrogliome

### *Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q:*

5 der 6 Oligodendrogliome dieser Arbeit konnten mit locusspezifischen Sonden für die Regionen 1p36 und 19q untersucht werden.

Eine Deletion von 1p36 zeigte sich in dem Tumor T5799 (WHO- Grad III), was einem prozentualen Anteil von 20% entspricht.

Signifikant häufiger konnten Verluste der chromosomalen Region 19q dargestellt werden: 60% der Oligodendrogliome, darunter beide Tumoren des WHO- Grades III (T5799, T5877) und ein Tumor des WHO- Grades II (T6328), wiesen homo- wie auch heterozygote Deletionen dieses Bereiches auf.

Das Oligodendrogliom T6349 (WHO- Grad II) zeigte tetrasome Zellkerne für 1p36 und 19q.

### *Veränderungen der Chromosomen 7 und 10:*

Sechs oligodendrogliale Tumoren wurden mit Zentromersonden für die Chromosomen 7 und 10 molekularzytogenetisch untersucht.

Ein Drittel der Tumoren (2/6: T5886, T5877; WHO- Grad II und –III) zeigten Zugewinne von Chromosom 7.

Verluste von Chromosom 10 wurden ebenfalls in einem Drittel der Oligodendrogliome detektiert (T5886, T6328, beide WHO- Grad II).

### *Kombination von Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie der Chromosomen 7 und 10:*

In beiden Oligodendrogliomen, die als WHO- Grad III eingestuft worden waren (T5799, T5877) sowie in dem Tumor T6328 (WHO- Grad II) war ein gemeinsames Auftreten von

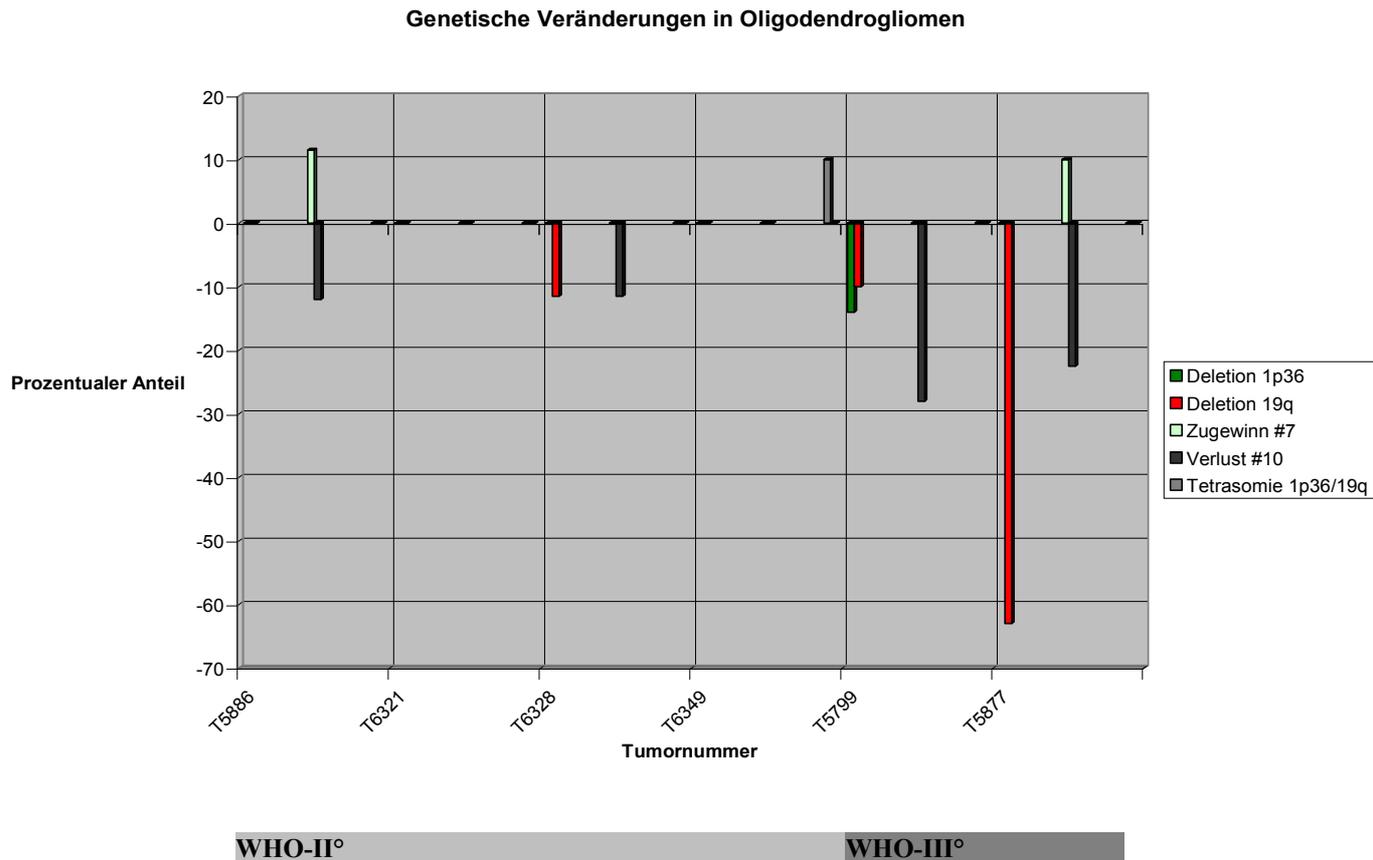
Deletionen von 19q und Verlusten von Chromosom 10 in den gleichen Tumorzellkernen zu verzeichnen. Dies macht einen prozentualen Anteil von 60% der Oligodendrogliome aus.

Eine Kombination von Deletionen der Regionen 1p36 und 19q in den gleichen Tumorzellkernen konnte in dem Oligodendrogliom T5799 (WHO- Grad III) detektiert werden.

Die Tumoren T5886 (WHO- Grad II) und T5877 (WHO- Grad III) zeigten in den gleichen Zellkernen ein gemeinsames Auftreten von Zugewinnen von Chromosom 7 bei Verlusten von Chromosom 10.

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozentualer Anteil
<b>WHO- Grad II</b>	<b>T5886</b>				2	1	12%
					3	2	11,5%
					4	4	9,5%
	<b>T6321</b>	4	4	7,5%	2	0	9,5%
				2	1	9,5%	
				1	2	9,5%	
	<b>T6328</b>	2	0	7,5%	2	1	11,5%
		2	1	11,5%			
		4	2	7,5%			
	<b>T6349</b>	1	2	9%	4	4	9,5%
		4	4	10%			
<b>WHO- Grad III</b>	<b>T5799</b>	2	0	10%	1	0	6%
		2	4	14%	2	0	12%
		4	2	6%	2	1	16%
	<b>T5877</b>	2	0	19,5%	2	0	12,5%
		2	1	43,5%	2	1	10%
					3	2	10%
				4	4	6%	

Abbildung 25: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Oligodendrogliomen



**Abbildung 26: Graphische Übersicht über Alterationen in Oligodendrogliomen**

### Oligoastrocytome

#### *Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q:*

Vier Oligoastrocytome wurden auf Alterationen der Regionen 1p36 und 19q hin untersucht.

Deletionen des Locus 1p36 konnten nicht detektiert werden.

50% der Oligoastrocytome (2/4) zeigten jedoch Deletionen von 19q: Der Tumor T5707 wurde als Oligoastrocytom des WHO- Grades III eingestuft, der Tumor T6281 als WHO- Grad II. Homozygote Deletionen traten häufiger auf als heterozygote.

Tetrasome Zellkerne für 1p36 und 19q stellten sich in 1/4 Oligoastrocytomen dar (T6296, WHO- Grad II).

Auffallend war der Tumor T5707 (WHO- Grad III), bei dem signifikant häufig (18,5%) 5 Signale für die 1p36- Region detektiert werden konnten.

*Veränderungen der Chromosomen 7 und 10:*

Von den vier an dieser Stelle untersuchten Oligoastrocytomen konnten drei Tumoren auf Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 hin untersucht werden.

Zugewinne von Chromosom 7 oder Verluste von Chromosom 10 ließen sich jedoch an dieser Stelle nicht nachweisen.

Das Oligoastrocytom T6327 (WHO- Grad III) zeigte jedoch mit einer Häufigkeit von bis zu 40% Zellkerne mit Verlusten von Chromosom 7 im Sinne einer Nullisomie, was im Kapitel Diskussion unter “Heterogenität von Gliomen“ erläutert wird.

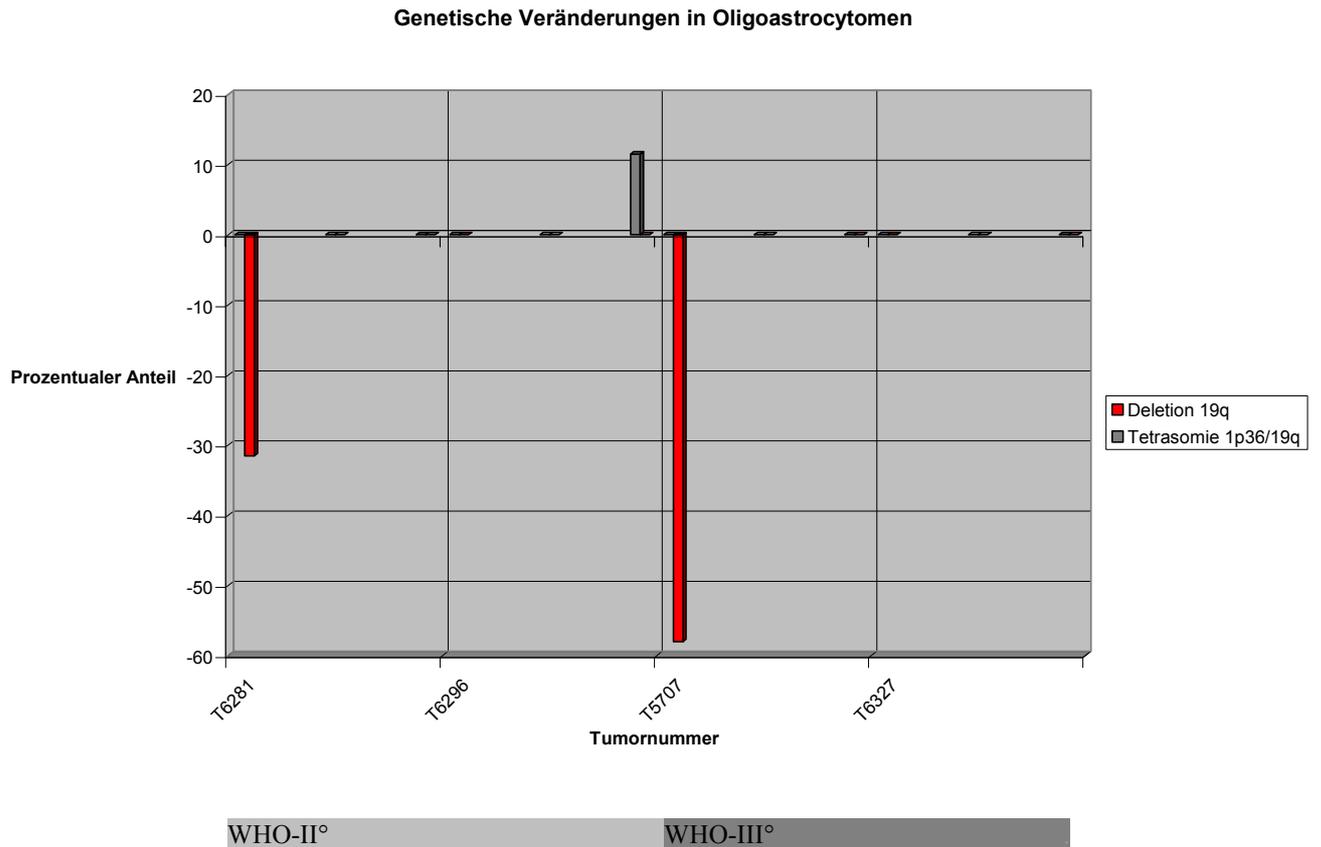
*Kombination von Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie der Chromosomen 7 und 10:*

Drei Oligoastrocytome konnten mit allen Sonden hybridisiert wurden.

Hierbei zeigten sich jedoch keine auffälligen Kombinationen aus genetischen Veränderungen.

	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozentualer Anteil
<b>WHO-Grad II</b>	<b>T6281</b>	0	0	9%	2	0	7,5%
		2	0	15,5%	2	1	6,5%
		2	1	16%	4	2	7,5%
					4	4	7,5%
	<b>T6296</b>	3	2	6,5%	0	2	8,5%
		4	4	11,5%	1	2	7%
					2	4	8,5%
					4	4	6%
<b>WHO-Grad III</b>	<b>T5707</b>	2	0	39,5%			
		5	0	18,5%			
		2	1	9,5%			
		4	2	7,5%			
	<b>T6327</b>	0	0	6,5%	0	2	40%
		3	2	6,5%	0	4	28,5%
		1	2	8%			
		4	4	6,5%			

Abbildung 27: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Oligoastrocytomen



**Abbildung 28: Graphische Übersicht über Alterationen in Oligoastrocytomen**

### Ependymome

#### *Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q:*

Ein Ependymom konnte mit locusspezifischen Sonden für 1p36 und 19q untersucht werden: Deletionen dieser beiden Loci ließen sich jedoch nicht nachweisen.

Es zeigten sich in signifikanter Häufigkeit tetra- und oktasome Zellkerne für die Regionen 1p36 und 19q.

#### *Veränderungen der Chromosomen 7 und 10:*

Zwei Ependymome wurden auf Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 hin untersucht. Zugewinne von Chromosom 7 oder Verluste von Chromosom 10 wurden jedoch nicht detektiert.

*Kombination von Veränderungen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie der Chromosomen 7 und 10:*

Tetra- und oktasome Kerne für Chromosom 7 und 10 waren in beiden Ependymomen in signifikanter Anzahl darstellbar.

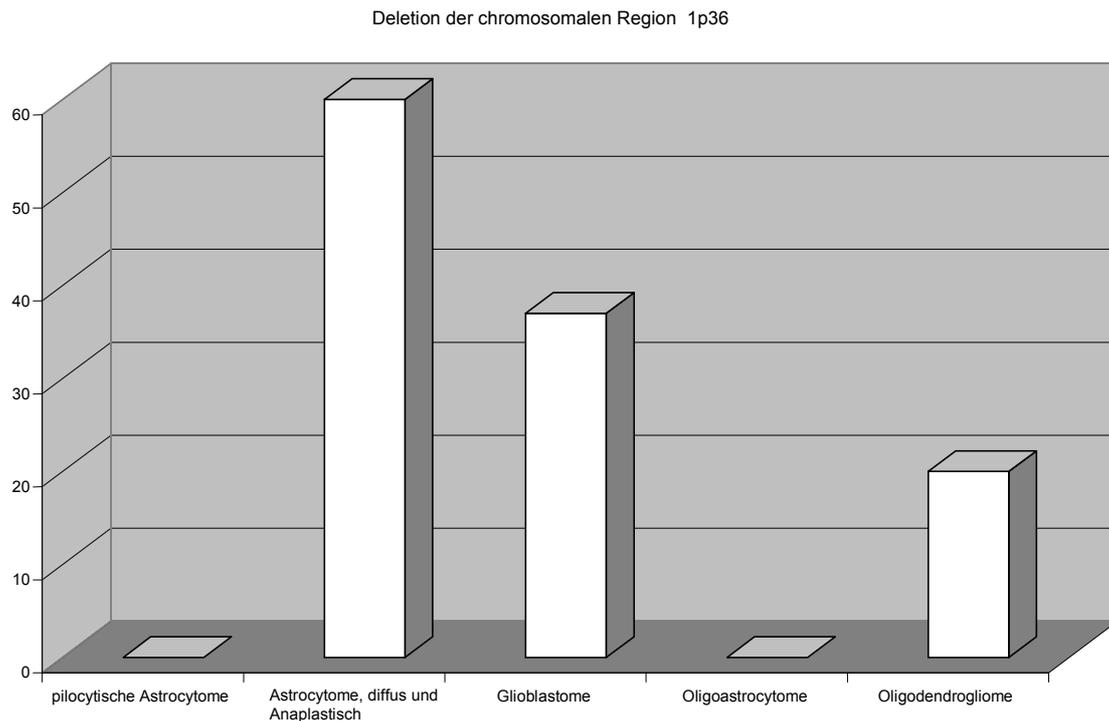
	Tumornummer	Signale für 1p36	Signale für 19q	Prozentualer Anteil	Signale für #7	Signale für #10	Prozentualer Anteil
<b>WHO-Grad II</b>	<b>T5786</b>				4	3	7%
					3	4	6%
					4	4	39,5%
	<b>T6334</b>	4	4	22%	4	2	7%
		8	8	16%	4	4	15%
					8	8	10%
					2	1	6%

**Abbildung 29: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Ependymomen**

### Zusammenfassung der molekularzytogenetischen Ergebnisse

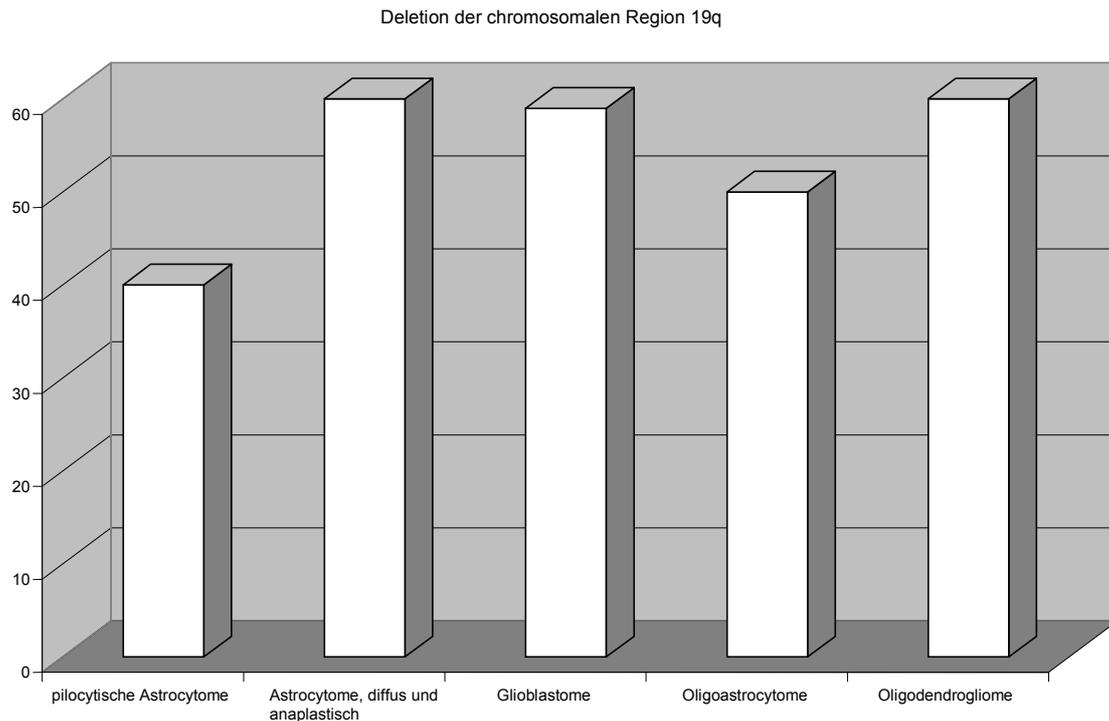
In den folgenden Abbildungen (Abbildung 30 bis Abbildung 33) werden die genetischen Veränderungen in den einzelnen Gliomsubtypen zusammenfassend dargestellt.

Die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ependymome wurden an dieser Stelle vernachlässigt.



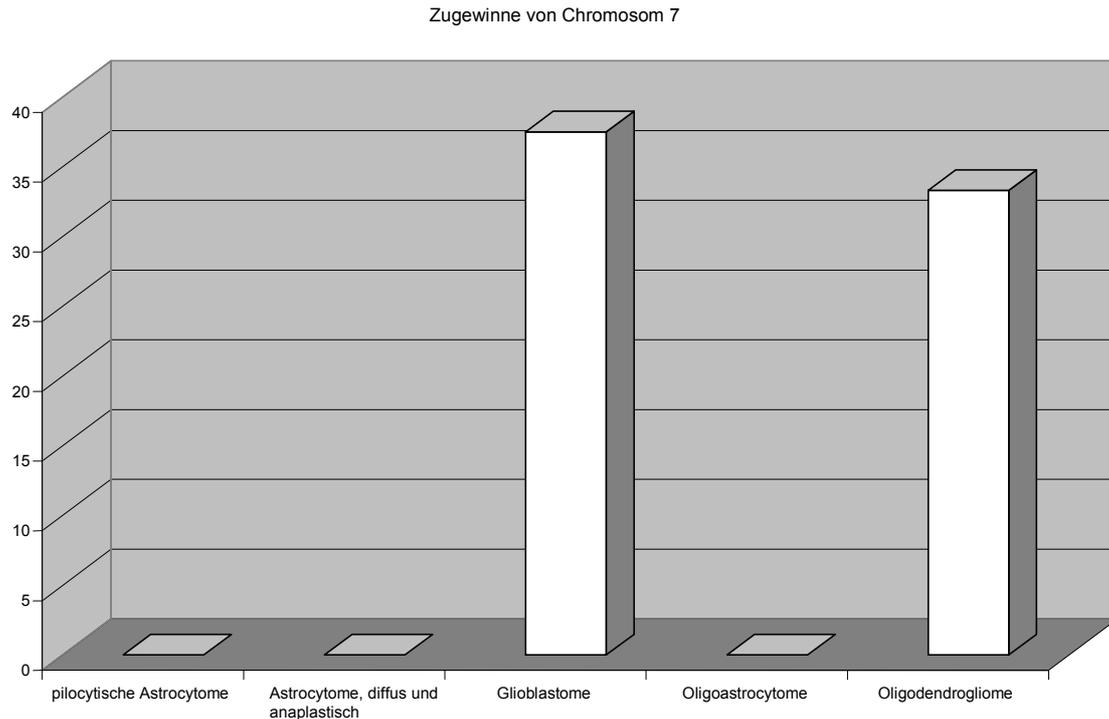
**Abbildung 30: Deletionen von 1p36**

Mit einem prozentualen Anteil von 60% ist eine Deletion des chromosomalen Bereiches 1p36 in dieser Arbeit am häufigsten in diffusen und anaplastischen Astrocytomen nachgewiesen worden, gefolgt von Glioblastomen (37%) und Oligodendroglionen (20%).



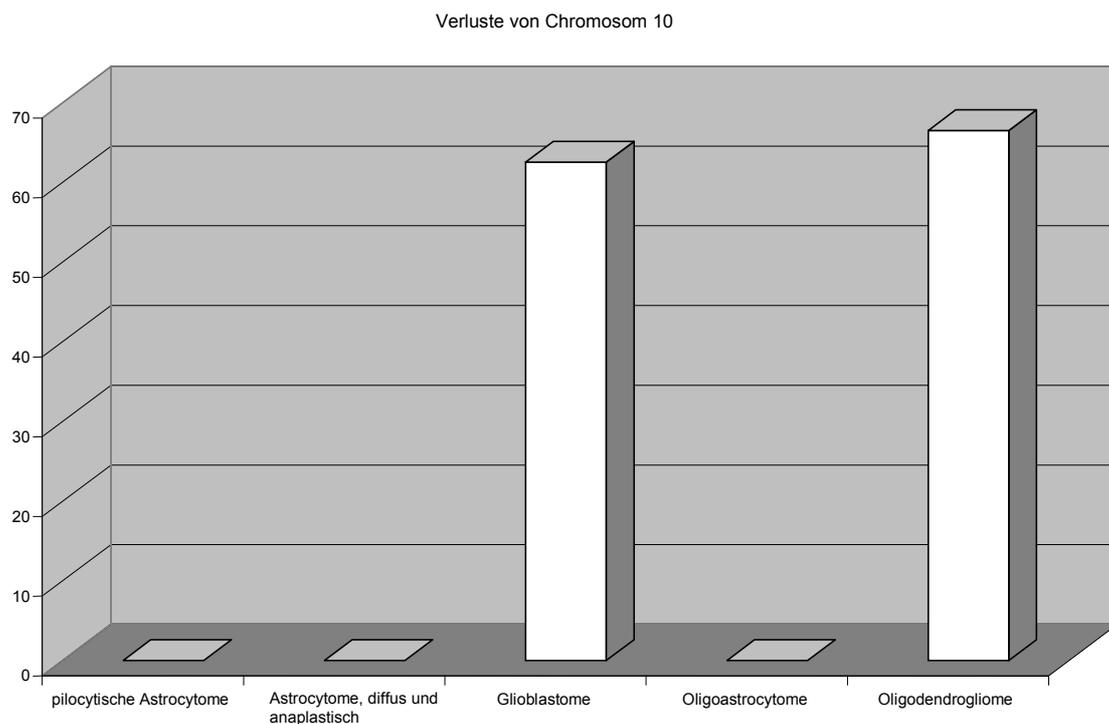
**Abbildung 31: Deletionen von 19q**

Deletionen des chromosomalen Bereiches 19q traten mit jeweils etwa 60% am häufigsten in diffusen und anaplastischen Astrocytomen, Oligodendroglionen und Glioblastomen (59%) auf. An zweiter Stelle folgten mit 50% die Oligoastrocytome, anschließend die pilocytischen Astrocytome mit 40%.



**Abbildung 32: Zugewinne von Chromosom 7**

Mit 37,5% waren Zugewinne von Chromosom 7 am häufigsten in Glioblastomen nachzuweisen. Sonst konnte diese numerische Aberration mit 33,3% nur in Oligodendroglionen nachgewiesen werden.



**Abbildung 33: Verluste von Chromosom 10**

Verluste von Chromosom 10 konnten mit 66,6% am häufigsten in Oligodendrogliomen detektiert werden.

Daneben zeigte sich diese Aberration nur in Glioblastomen (62,5%)

Die folgende Seite zeigt beispielhaft Ergebnisse der FISH (Fotographien; Abbildung 34).

Abbildung 34a) zeigt einen Verlust von Chromosom 10 (Monosomie 10) bei vier Signalen für Chromosom 7 in dem Glioblastom T6433.

In dem Oligodendrogliom T5795 ( 34b) ) wurden ebenfalls Verluste von Chromosom 10 bei Zugewinnen von Chromosom 7 detektiert. Es handelt sich hierbei um ein Tumorausstrichpräparat. Abbildung 34c) zeigt eine Mitose des Glioblastomes T6448 mit einem Signalverlust für 19q und bei nur einem Signal für 1p36. Dieser Tumor ist nochmals in Abbildung 34d) dargestellt (Zellkerne), wo sich ebenfalls die Deletion 19q zeigt.

In den Abbildungen 34e) und 34f) sind im Detail Deletionen von 19q bei vermehrter Anzahl des chromosomalen Bereiches 1p36 dargestellt. Es handelt sich um 2 Glioblastome (T6408 und T6355).

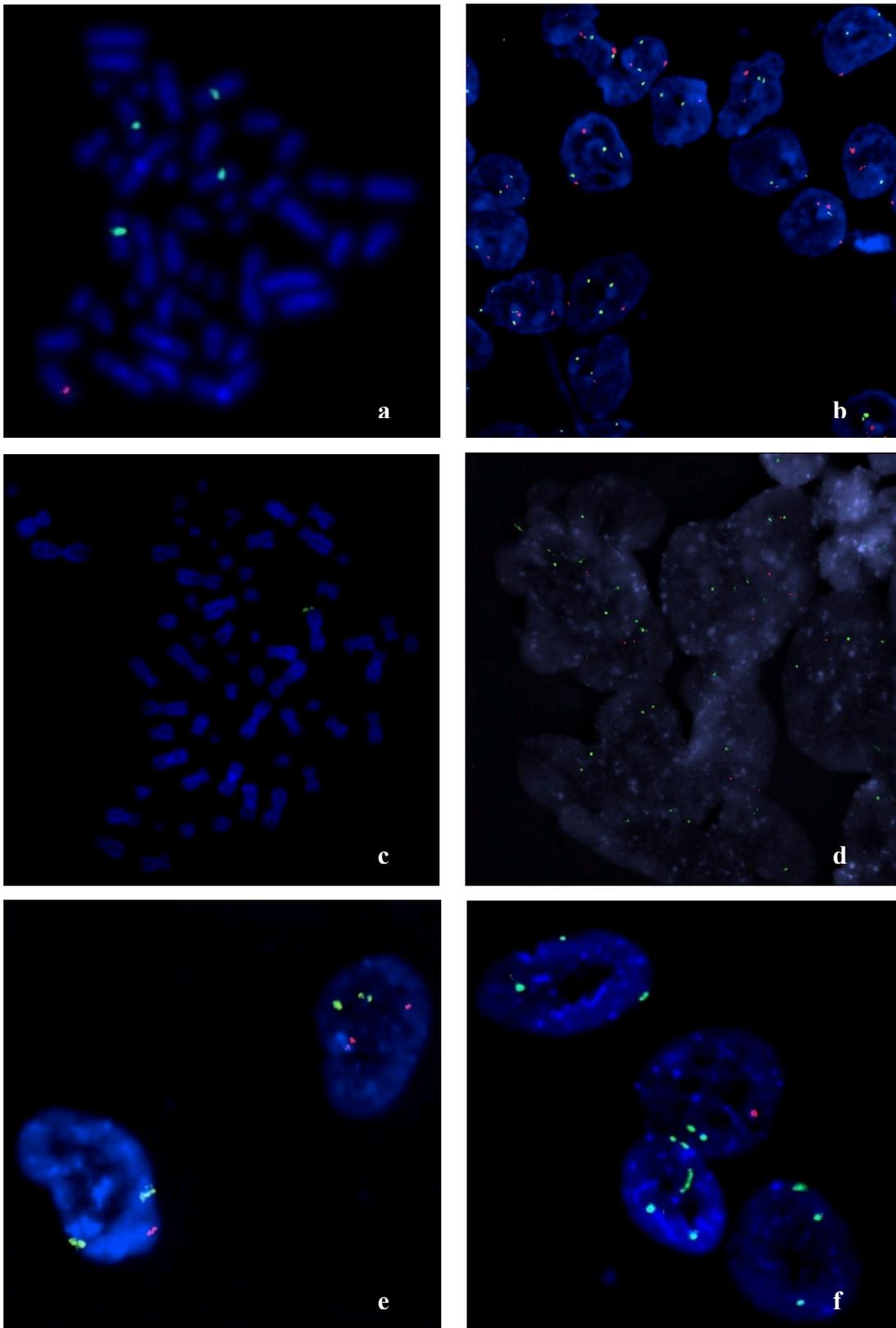


Abbildung 34: a) T6433, GBM, #7 (FITC) und #10 (Cy3); b) T5795, OD, #7 (FITC) und #10 (Cy3); c) T6448, GBM, 1p36 (FITC) und 19q (Cy3); d) T6448, GBM, 1p36 (FITC) und 19q (Cy3); e) T6408, GBM, #7 (FITC) und #10 (Cy3); f) T6355, GBM, #7 (FITC) und #10 (Cy3)

### 5.3 Ergebnisvergleich zwischen Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung und Karyotypisierung von Gliomen

An dieser Stelle wurden zwei Techniken zur Untersuchung des genetischen Status von Gliom-Tumorzellen miteinander verglichen: Die Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung und die Karyotypisierung.

Ziel war es, nähere Aussagen darüber treffen zu können, ob die FISH als sinnvolles Verfahren zur Ergänzung der genetischen Gliomdiagnostik eingesetzt werden kann. Dies könnte beispielsweise von Bedeutung sein, wenn nur wenig Tumormaterial für diese Diagnostik zur Verfügung steht und so eine Zellkultivierung, wie sie für die Karyotypisierung notwendig ist, erschwert ist.

Allerdings treten bei diesem Vergleich folgende Hauptprobleme auf:

- 1) Zum einen wurde für Hybridisierung und Karyotypisierung nicht immer das gleiche Tumormaterial verwendet.  
Dieses unterscheidet sich beispielsweise zum Teil erheblich im Alter. So ist es möglich, dass Material des gleichen Tumors schon nach kurzer Zellkulturdauer für die zytogenetische Untersuchung verwendet wurde und erst nach längerer Kultivierungsdauer für die FISH.  
Dies kann bedeuten, dass sich im Rahmen der längeren Kultivierungszeit sekundäre genetische Veränderungen ausbilden konnten.
- 2) Mit Hilfe der FISH können genetische Veränderungen auf molekularzytogenetischer Ebene detektiert werden wie beispielsweise Veränderungen einzelner chromosomaler Bereiche. Aufgrund des geringeren Auflösungsvermögens können durch konventionelle zytogenetische Verfahren (Karyotypisierung) nur numerische und bestimmte strukturelle Aberrationen untersucht werden.
- 3) Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass bei der Karyotypisierung der gesamte Chromosomensatz der Tumorzellkerne beurteilt werden kann, während bei der FISH nur bestimmte chromosomale Regionen untersucht werden.

- 4) Weiterhin war es nicht immer möglich, die Gliome aus der vorliegenden Arbeit mit beiden Sondenpaaren (1p36/ 19q; #7/#10) zu hybridisieren, was einen repräsentativen Vergleich zusätzlich erschwert.

Dennoch soll mit Verweis (insbesondere auf Punkt 2) ein Vergleich zwischen FISH und Karyotypisierung auch für die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q (beziehungsweise die Chromosomen 1 und 19) gezogen werden.

Von den insgesamt 52 Gliomen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht worden waren, konnten 20 Gliome karyotypisiert werden. Das bedeutet, dass in weniger als der Hälfte dieser Fälle ein Methodenvergleich möglich war.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse dieses Vergleichs dargestellt.

Berücksichtigt für die Auswertung wurden Deletionen der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q (beziehungsweise Verluste der Chromosomen 1 und 19) sowie Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10.

	<b>Tumornummer</b>	<b>FISH</b>	<b>Karyotypisierung</b>
<b>Pilocytische Astrocytome</b>	T6379	nicht signifikant	- #19 - #10
	T6389	nicht signifikant	----- -
	T6441	-19q	- #10
<b>Astrocytome</b>	T6298 (III°)	-1p36 -19q	- #19
	T6332 (II°)	nicht signifikant	- #1
<b>Glioblastome</b>	T6266	nicht signifikant	+ #7
	T6304	- #10	- #1 - #19 - #10
	T6336	-19q	-1p +7q
	T6337	-1p36 - #10	

	<b>Tumornummer</b>	<b>FISH</b>	<b>Karyotypisierung</b>
<b>Glioblastome</b>	T6355	-19q + #7 - #10	+ #7 - #10
	T6361	+ #7 - #10	- #19 - #10
	T6387	- #10	- #19 + #7 - #10
	T6392	+ #7 - #10	+ #7
	T6400	-1p36 - #10	+ #7 - #10
	T6433	-1p36 -19q + #7 - #10	- #1 + #7 - #10
	T6448	-1p36 -19q	+ #7 - #10
<b>Oligodendrogliome</b>	T6321 (II°)	nicht signifikant	- #10
<b>Oligoastrocytome</b>	T6281 (II°)	-19q	- #19 - #10
	T6296 (II°)	nicht signifikant	-----
	T6327 (III°)	nicht signifikant	- #19

Abbildung 35: Ergebnisvergleich zwischen FISH und Karyotypisierung

### Vergleich der molekularzytogenetischen und zytogenetischen Ergebnisse

In 9/20 Gliomen, die hier miteinander verglichen wurden, konnten durch beide Untersuchungstechniken gleiche Ergebnisse ermittelt werden.

Wie oben bereits erwähnt, wurde ein Ergebnis auch dann als gleich gewertet, wenn bei der FISH eine Deletion von 1p36 oder 19q vorlag und im Karyogramm ein Verlust der Chromosomen 1 und 19.

Drei pilocytische Astrocytome konnten miteinander verglichen werden.

In dem Tumor T6379 zeigten sich in der FISH keine signifikanten Aberrationen, während sich zytogenetisch Deletionen der Chromosomen 10 und 19 nachweisen ließen.

Bei dem pilocytischen Astrocytom T6389 konnten weder durch FISH noch durch Karyotypisierung signifikante Aberrationen detektiert werden.

Von den beiden Astrocytomen, die mit beiden Techniken untersucht worden waren, zeigte der anaplastische Tumor (T6298) Deletionen von 19q beziehungsweise von Chromosom 19 in beiden Untersuchungen.

Das Astrocytom T6332 (WHO- Grad II) wies im Karyogramm Verluste von Chromosom 1 auf, in der FISH jedoch keine signifikanten Veränderungen.

In 3/11 Glioblastomen wurden durch beide Untersuchungstechniken Zugewinne von Chromosom 7 detektiert (T6355; T6392; T6433).

In 6/11 Glioblastomen konnten sowohl zytogenetisch als auch molekularzytogenetisch Verluste von Chromosom 10 nachgewiesen werden (T6304; T6355; T6361; T6387; T6400; T6433).

Für das Glioblastom T6433 konnten Deletionen von 1p36 beziehungsweise von Chromosom 1 mit beiden Methoden nachgewiesen werden.

In den übrigen Glioblastomen, bei denen beide Untersuchungsmethoden miteinander verglichen werden konnten, zeigten sich bei beiden Techniken Zugewinne von Chromosom 7 sowie Verluste der Chromosomen 1 (bzw. des Bereiches 1p36), 19 (bzw. des Bereiches 19q) und 10.

Das Oligodendrogliom T6321, von dem FISH- Untersuchungen und Karyogramme angefertigt worden waren, zeigte keine signifikanten Hybridisierungsergebnisse, während im Karyogramm ein Verlust von Chromosom 10 vorlag.

Von den drei an dieser Stelle miteinander verglichenen Oligoastrocytomen zeigte der Tumor T6281 eine Deletion von 19q in der FISH und einen Verlust von Chromosom 19 im Karyogramm.

Die beiden anderen Tumoren (T6296, WHO- Grad II und T6327, WHO- Grad III) wiesen keine signifikanten Hybridisierungsergebnisse auf.

## 6 Diskussion

### 6.1 Methodendiskussion

#### 6.1.1 Zytogenetische Untersuchung (Karyotypisierung)

Die zytogenetische Analyse des Chromosomensatzes bietet sowohl Vorteile als auch Nachteile:

So ist die Tatsache, dass der vollständige Chromosomensatz einer Zelle mikroskopisch beurteilt werden kann, von besonderem Wert. Dadurch kann eine Aussage über jedes Chromosom in der zu beurteilenden Mitose in der Metaphase gemacht werden, wenn auch nur in begrenztem Ausmaß. Denn durch die zytogenetische Karyotypisierung können, bedingt durch das Auflösungsvermögen, numerische und bestimmte strukturelle Aberrationen nachgewiesen werden. Die genaue Analyse bestimmter chromosomaler Regionen bleibt jedoch anderen Methoden vorbehalten wie beispielsweise der molekularzytogenetischen Methode der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung.

Von Nachteil bei der Zytogenetik ist außerdem die Tatsache, dass eine Kultivierung von Tumorzellen notwendig ist. Eine solche Zellkultur ist jedoch nicht immer möglich:

- Nicht immer wurden ausreichende Mengen an Tumormaterial reseziert, um sowohl eine histopathologische Diagnosesicherung zu ermöglichen als auch eine Zellkultivierung für die genetische Gliomdiagnostik.

Unter Umständen musste zugunsten von ausreichend Tumormaterial für die histomorphologische Beurteilung auf eine zytogenetische Diagnostik verzichtet werden.

- Des Weiteren war es möglich, dass trotz allen Bemühens um ein steriles Arbeiten die Zellkulturen verunreinigt wurden und aus diesem Grund verworfen werden mussten. Hauptsächlich Hefepilze trugen hierzu bei, aber auch bakterielle Erreger.
- Auch wenn die Zellkultur unter optimalen Bedingungen angelegt wurde, begannen einige Tumorzellen nicht, auszuwachsen.

Dafür konnte unter Anderem eine zu geringe Menge intakter Tumorzellen verantwortlich sein, was zum Beispiel durch den intraoperativen Einsatz der elektronischen Blutstillung Zustände kam (Zelltod durch die Elektrokoagulation).

Auch ist für die Karyotypisierung ein Vorhandensein ausreichend vieler Mitosen in der Metaphase unerlässlich.

Außerdem muss bei der Herstellung von Metaphasepräparaten für die Karyotypisierung darauf geachtet werden, dass beim Auftropfen (siehe Kapitel 4.1.1.) eine ausreichende Spreitung der Chromosomen gelungen ist und sich die einzelnen Chromosomen nicht überlagern. Nur so können diese nach der Bänderung eindeutig beurteilt werden.

Desweiteren erfordert die Karyotypisierung eine enorme Erfahrung auf diesem Gebiet der Zytogenetik, nur durch ein geschultes Auge können die Chromosomen richtig zugeordnet werden.

### **6.1.2 Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Gliomen**

Aufgrund der hohen Auflösung dieser Methode können genetische Alterationen auf molekularzytogenetischer Ebene zuverlässig nachgewiesen werden.

Die Sensitivität der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung (FISH) liegt deutlich über dem Auflösungsvermögen anderer molekularzytogenetischer Methoden wie zum Beispiel der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH).

Außerdem sind für Techniken wie die CGH weitaus reinere Tumorproben erforderlich als für die FISH.

Ein weiterer Vorteil der FISH liegt darin, dass diese Methode auch an Interphasekernen durchgeführt werden kann, Metaphasechromosomen sind nicht erforderlich. Somit können für diese Hybridisierungstechnik auch einzelne Tumorzellen, zum Beispiel in Form von Tumorausstrichpräparaten, herangezogen werden. Eine oft langwierige Zellkultivierung ist also nicht erforderlich, so dass auch die schnelle Handhabung für die FISH spricht.

Weiterhin können mit der FISH nicht nur einzelne Chromosomen detektiert werden, sondern auch die absolute DNA- Kopienzahl am untersuchten Locus, was einen entscheidenden Vorteil bedeutet.

Aber bei der FISH sind auch Fehlinterpretationen möglich.

So kann es zum vermeintlichen Signalverlust bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung kommen. Dies kann durch einen zu starken Pepsinverdau bei der Vorbehandlung der Präparate oder ein zu stringentes Waschen der Präparate bedingt sein (siehe Kapitel 4.5.).

Aber auch ein vermeintlicher Signalgewinn ist beispielsweise durch unzureichende Stringenz beim Waschen möglich (Hopman et al., 1992; zur Stringenzwaschung siehe Kapitel 4.6.).

Auch eine Mithybridisierung von Normalgewebe kann zum vermeintlichen Zugewinn von Signalen führen. Denn bei der Resektion von Gliomen kann eine Mitentnahme von gesundem Hirnparenchym oder Gefäßendothel nicht definitiv ausgeschlossen werden (siehe auch Tumorausstrichpräparate).

Dieses Problem stellt sich jedoch auch bei der zytogenetischen Karyotypisierung.

Um die oben genannten Fehler bei der FISH zu minimieren, ist es notwendig, Kontrollhybridisierungen an gesunden Blutlymphocyten durchzuführen und mit den Ergebnissen für das Tumorgewebe zu vergleichen (siehe Bestimmung des sogenannten "Cut Off", s. Kapitel 4.6.). Auch durch die simultane Hybridisierung mit zwei Sonden, hier mit den Sonden für 1p36 und 19q in Kombination sowie den Sonden für die Chromosomen 7 und 10 in Kombination, ist eine zusätzliche Kontrolle für die Penetranz der Sonden in die Zellkerne gewährleistet: Treten Signale für eine Sonde im Normalgewebe (hier in gesunden Lymphocyten) regelmäßig auf, während sie für die zweite verwendete Sonde fehlen, sind die Versuchsbedingungen zu überprüfen.

Ein Nachteil der FISH besteht auch in der Tatsache, dass mit dieser Methode ausschließlich die Chromosomen oder chromosomalen Bereiche beurteilt werden können, für die spezifische Sonden eingesetzt worden sind.

Aus diesem Grund bleiben bei dieser molekularzytogenetischen Untersuchungsmethode strukturelle oder numerische Aberrationen anderer Chromosomen unbemerkt.

Auch wurden in dieser Arbeit zwar die Chromosomen 7 und 10 auf Veränderungen hin untersucht, allerdings kann durch den Einsatz von Zentromersonden – wie in der vorliegenden Arbeit – nicht beurteilt werden, ob zum Beispiel Deletionen bestimmter Chromosomenabschnitte vorliegen.

Dies impliziert, dass vor der Durchführung einer FISH bereits der Verdacht auf bestimmte chromosomale Veränderungen vorliegen muss. Oder aber man nutzt diese Methode zur Verifizierung genetischer Aberrationen, die bereits mit anderen Methoden nachgewiesen wurden (zum Beispiel durch die Karyotypisierung).

Bei der mikroskopischen Auswertung einiger Gliom- Hybridisierungen in dieser Arbeit zeigten sich Ergebnisse, die nur knapp über dem an gesunden Blutlymphocyten ermittelten Cut Off von 6% lagen.

Dieser Sachverhalt kann darauf zurückzuführen sein, dass eine zu starke Verdauung der Zellkerne stattgefunden hat und dadurch Signale verloren gehen (siehe auch oben).

Aber auch Pseudo- Monosomien durch somatische Paarungen der Chromosomen, wie sie bei Arnoldus et al. (1992) für das Chromosom 17 beschrieben wurden, sind denkbar.

Genauso können Vermehrungen genetischen Materiales, deren Werte nur knapp oberhalb des Cut Off von 6% lagen, auf Artefakte zurückzuführen sein, wobei hier an erster Stelle sicherlich der vermeintliche Signalgewinn durch eine unzureichende Stringenzwaschung oder durch die Hybridisierung von Zell- Mischpopulationen steht.

Um vor diesem Hintergrund Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Auswertung der FISH- Ergebnisse nur solche Ergebnisse als signifikant gewertet, die mit einer Häufigkeit von mehr als 10% auftraten (siehe Berechnung der doppelten Standardabweichung: Für die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q 10,9%, für die Chromosomen 7 und 10 9,26%, bei einem Cut off von 6%; Kapitel 4.6.).

### **6.1.3 Methodenvergleich zwischen Zytogenetik und Molekularzytogenetik**

Beim Vergleich von Karyotypisierung und FISH muss nochmals auf folgendes essentielles Problem hingewiesen werden:

Bei der FISH werden Sonden für bestimmte Chromosomen oder chromosomale Bereiche eingesetzt. Die Karyotypisierung hingegen zeichnet sich dadurch aus, dass alle Chromosomen einer mitotischen Zelle dargestellt werden können.

Dieser Sachverhalt erschwert einen direkten Methodenvergleich.

Für die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass die molekularzytogenetischen wie die zytogenetischen Ergebnisse für die Chromosomen 7 und 10 verglichen werden können.

Mit den Chromosomen 1 und 19 verhält es sich folgendermaßen: Hier können durch die FISH die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q detektiert werden. Durch die Karyotypisierung können sich Hinweise auf Alterationen solcher Bereiche ergeben, jedoch können diese nicht mit einer solchen Genauigkeit wie bei der FISH nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 52 Gliome durch die FISH auf genetische Aberrationen hin untersucht. Zu 20/52 Gliomen waren Karyogramme angefertigt worden.

Dass weniger als die Hälfte der Tumoren mit beiden Techniken untersucht wurden, begründet sich folgendermaßen:

1. Alle Gliome mit einer Tumornummer, die mit der Ziffer "5" beginnen, wurden als Tumorausstrichpräparate gewonnen. Da von diesen Tumoren keine Zellkulturen angelegt worden waren, war eine Karyotypisierung nicht möglich.
2. Andere Gliome zeigten in Zellkultur keine ausreichende mitotische Aktivität, welche aber Voraussetzung für das Anfertigen von Karyogrammen ist.

Da die FISH hingegen auch an Interphasekernen durchgeführt werden kann, konnte eine Hybridisierung dennoch erfolgen.

Aus dem Ergebnisteil 5.3. ergibt sich, dass nicht in allen Gliomen durch beide Methoden das gleiche Ergebnis ermittelt werden konnte.

Die Ursache für diese Diskrepanz wird im Folgenden erörtert.

Sicherlich spielt die extreme Heterogenität der Gliome hierbei die wichtigste Rolle:

Durch FISH und Zytogenetik werden immer einzelne Tumorzellen untersucht, jedoch nie die gleichen.

Daher bedeuten die nachgewiesenen Ergebnisse nicht, dass die beiden Methoden keine verlässlichen oder differente Ergebnisse liefern. Vielmehr werden die genetischen Aberrationen in unterschiedlichen Zellkernen detektiert, die bei Gliomen genetisch sehr heterogen sein können. Im Routinebetrieb der neuroonkologischen Arbeitsgruppe können jedoch die gleichen Veränderungen nachgewiesen werden.

Auch die nachstehend aufgelisteten Möglichkeiten können eine Diskrepanz der Ergebnisse bei beiden Techniken erklären:

Eine Besonderheit bei Gliomen liegt darin, dass zahlreiche Zellen einen genetisch unauffälligen Chromosomensatz aufweisen, in dem eventuell allenfalls die Geschlechtschromosomen aberrant sind (Lindström et al., 1991).

Da es keine definierten morphologischen Kriterien für die Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe gibt, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass es sich bei Zellen mit unauffälligem genetischem Status um Zellen aus Normalgewebe handelt und nicht um Gliomzellen. Da bei der Tumorresektion die Mitentnahme beispielsweise von Gefäßendothel oder gesundem Hirngewebe nicht ausgeschlossen werden kann, lassen sich so

falsch- negative Ergebnisse erklären. Hier erzielt beispielsweise die histopathologische Untersuchung sicherere Ergebnisse.

Es kann also auch durch die mögliche Hybridisierung von Zell- Mischpopulationen bedingt sein, dass mit einer der beiden hier angewendeten Methoden Veränderungen nachgewiesen werden konnten und mit der anderen nicht.

Auch eine klonale Selektion kann zu Artefakten führen:

Unter den artifiziellen Wachstumsbedingungen, wie sie in der Tumorzellkultur herrschen, können bestimmte Zellklone in ihrem Wachstum gefördert oder gehemmt werden.

Dies kann auch dazu führen, dass Zellen von Normalgewebe bevorzugt gegenüber Tumorzellen wachsen.

Durch diese artifiziellen Wachstumsbedingungen in der Gliom- Zellkultur können sich auch neue Mutationen ausbilden, die in den primären Zellen noch nicht vorhanden waren, was schließlich zu einem unterschiedlichen Ergebnis der beiden Untersuchungsmethoden führen kann.

Da die zytogenetische Untersuchung an das Vorliegen von Metaphasechromosomen gebunden ist, müssen die Tumorzellen so lange in Zellkultur wachsen, bis ausreichend viele Mitosen vorliegen. In dieser Zeit können sich neue Mutationen ausbilden.

In der Zwischenzeit kann jedoch von dieser Kultur schon Tumorzellmaterial abgezweigt werden für die FISH- Untersuchung.

Das bedeutet, dass das Material, das durch die Hybridisierung untersucht wurde, unter Umständen jünger ist als das Material, das zur Karyotypisierung eingesetzt wurde.

Umgekehrt ist es aber auch möglich, dass ein Tumor, wenn er gut und schnell in Kultur wuchs, zuerst zytogenetisch untersucht wurde und später erst molekularzytogenetisch (FISH), woraus sich wieder ein unterschiedliches Materialalter ergibt.

Für das – wie oben beschrieben – bevorzugte Wachstum bestimmter Zellklone in Kultur können auch genetische Aberrationen verantwortlich sein, die sich positiv auf den Selektionsdruck auswirken.

So wurde beispielsweise diskutiert, dass eine Trisomie 7 eine solche Selektion begünstigt. Diese Aberration wurde von mehreren Arbeitsgruppen in einem sehr hohen Prozentsatz in unterschiedlichen Gliomen nachgewiesen (Bigner et al., 1988; Thiel et al., 1992).

Dass ein Zugewinn von Chromosom 7 einen Wachstumsvorteil darstellen kann, würde auch erklären, dass Zellen gesunden Hirngewebes in Arbeiten von Heim et al. (1989) oder

Lindström et al. (1991) mit dieser Aberration (Zugewinn von Chromosom 7) bevorzugt wuchsen.

Da für die FISH keine Zellkultivierung nötig ist, spielt für diese Methode die klonale Selektion im Gegensatz zur Zytogenetik eine geringere Rolle, sofern kein Tumormaterial aus Kultur verwendet wird.

So kann mit Hilfe der FISH der initiale genetische Status besser beurteilt werden als durch die Karyotypisierung.

Als Résumé kann gesagt werden:

Genetische Veränderungen in Gliomen können durch FISH und Karyotypisierung zuverlässig nachgewiesen werden, insofern deren Limitierungen berücksichtigt werden.

Eine Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob die FISH als sinnvolle Ergänzung zur Zytogenetik eingesetzt werden kann, wenn zum Beispiel eine Karyotypisierung eines Gliomes aufgrund von Mangel an Tumormaterial nicht möglich ist. In diesem Fall kann stattdessen eine FISH zur Detektion von genetischen Aberrationen durchgeführt werden. Allerdings können dann nur Veränderungen von Chromosomen und chromosomalen Bereichen untersucht werden, für die Sonden eingesetzt wurden. Nur das Karyogramm bietet einen Überblick über den gesamten Chromosomensatz einer Zelle.

Genetische Aberrationen, die sich im Karyogramm darstellen, können durch die Hybridisierungsmethode im Detail untersucht werden.

## **6.2 Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung an Chromosomen und Interphasekernen von Gliomen**

Es muss berücksichtigt werden, dass die einzelnen Gliomsubtypen zum Teil nur in sehr kleiner Fallzahl vertreten waren. Dies ist unter Anderem auf die Rarität bestimmter Gliome, wie beispielsweise der Ependymome, zurückzuführen.

Zumeist hat jedoch ein Mangel an Tumormaterial zu der geringen Fallzahl geführt. Denn zu Gunsten der für die Therapie essentiellen histopathologischen Diagnostik musste auf eine genetische Untersuchung von Gliomen oft verzichtet werden.

### 6.2.1 Heterogenität von Gliomen

Gliome weisen eine enorme Heterogenität ihrer Zellkerne auf. Folglich muss gesagt werden, dass eine einzelne Gliomzelle und deren genetischer Status nicht für den gesamten untersuchten Tumor repräsentativ sein muss.

Da durch die FISH immer nur einzelne Tumorzellkerne molekularzytogenetisch untersucht werden, kann also von einem Nichtauftreten einer erwarteten genetischen Aberration nicht darauf zurückgeschlossen werden, dass diese Veränderung in einem untersuchten Gliom nicht vorliegt.

Als Beispiel konnten in der vorliegenden Arbeit durch die FISH Deletionen des chromosomalen Bereiches 1p36 nur in einem Oligodendrogliom detektiert werden (T5799), wengleich diese genetische Alteration als charakteristisch für diese Gliomentität gilt. Wäre es an dieser Stelle möglich gewesen, weitaus mehr Tumorzellkerne von Oligodendrogliomen zu untersuchen, insbesondere bei einer höheren Fallzahl, wäre es denkbar, dass diese Deletion der Region 1p36 vermehrt detektabel gewesen wäre.

Neben der Heterogenität stellt auch die Tetra- oder Polyploidisierung einen äußerst häufigen Mechanismus bei Gliomen dar.

Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass bei der Auswertung der FISH-Ergebnisse das Auftreten von beispielsweise vier Signalen für ein Chromosom oder einen chromosomalen Bereich durch tetrasome Zellkerne bedingt ist.

Konnten vier Signale sowohl für die chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q als auch für die Chromosomen 7 und 10 detektiert werden, lag vermutlich eine tetraploide Gliomzelle vor.

Daher wurde beispielsweise das Auftreten von vier Signalen für Chromosom 7 und drei Signalen für Chromosom 10 als Verlust von Chromosom 10 bei tetraploidem Chromosomensatz gewertet. Gleiches gilt für die chromosomalen Regionen 1p36 und 19q.

An dieser Stelle soll noch auf eine Besonderheit eingegangen werden, die sich in der vorliegenden Arbeit bei der Auswertung der Ergebnisse aus der FISH zeigte:

In einzelnen Gliomzellkernen konnten keine Signale für Chromosom 10 detektiert werden. Betrag der prozentuale Anteil hierbei nur etwas mehr als 10%, was als Signifikanzgrenze angesehen wurde, handelte es sich hier vermutlich um Artefakte, beispielsweise durch eine zu stringente Waschung. Als Beispiel hierfür sei das Glioblastom T5706 genannt, wo eine Nullisomie 10 in 11% der Tumorzellkerne detektiert werden konnte.

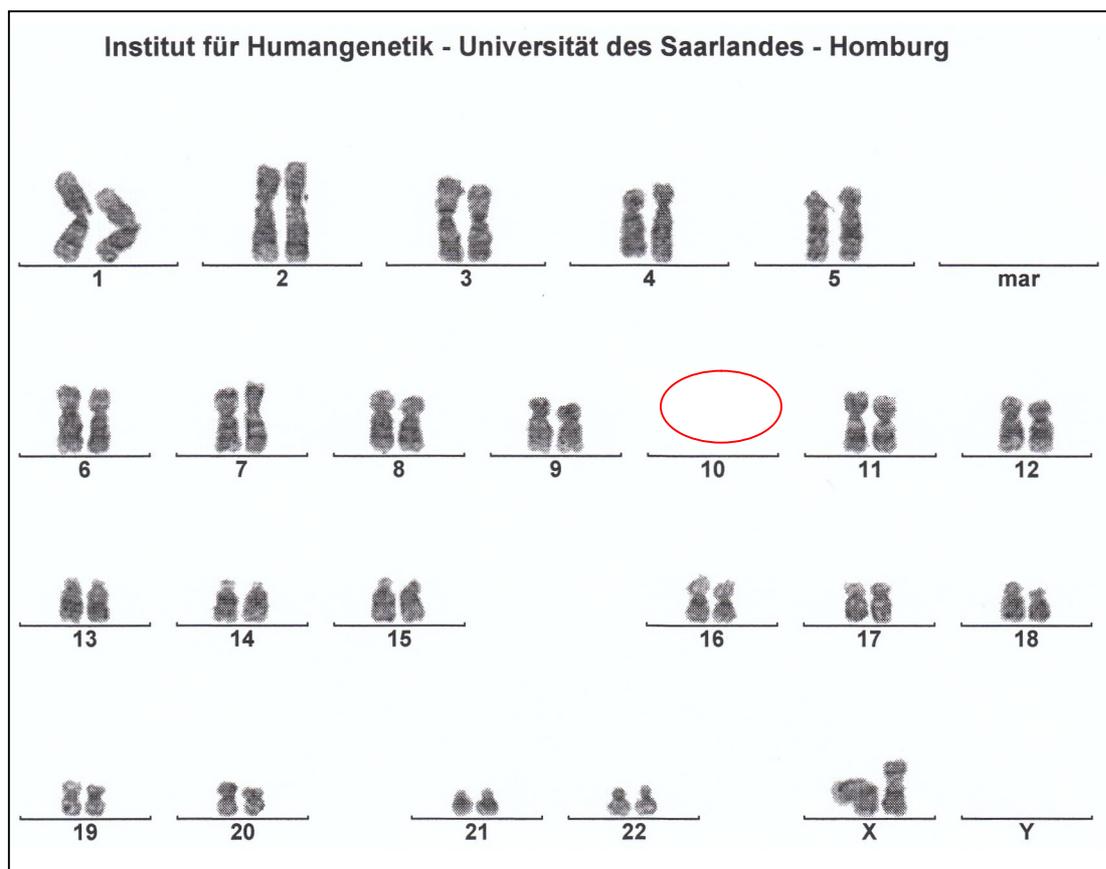
In anderen Tumoren jedoch konnte eine Nullisomie 10 in signifikanter Anzahl nachgewiesen werden: Dies war beispielsweise der Fall in den Glioblastomen T6304 (19- 25% der Zellkerne mit Nullisomie 10), T6337 (33%) und T6355 (23,5%), oder aber in dem Oligoastrocytom T6327 (WHO- Grad III, 28,5- 40%).

Dieser Befund ist schwer zu erklären, da sich bei Zellen mit einer Nullisomie eines Chromosomes die Frage nach der Lebensfähigkeit dieser Zelle stellt.

Aus diesem Grund liegt zunächst der Verdacht nahe, dass in diesen genannten Gliomen die Hybridisierungsmethode nicht suffizient funktioniert hat und dies der Grund für das Fehlen von Signalen von Chromosom 10 ist.

Erstaunlicherweise konnte eine solche Nullisomie 10 jedoch auch durch eine Karyotypisierung von Zellkernen dargestellt werden, beispielsweise in dem Oligoastrocytom T6327 (WHO- Grad III). Ein Karyogramm hierzu ist in Abbildung 36 dargestellt. Außer der Nullisomie 10 wies diese Mitose keine weiteren Aberrationen auf.

Folglich ist zu erwägen, ob Gliomzellen mit dieser genetischen Aberration im Gegensatz zu gesunden menschlichen Zellen eben doch lebensfähig sind.



**Abbildung 36: Karyogramm mit Darstellung eines Verlustes von Chromosom 10; T6327, Oligoastrocytom III°**

Eine weitere Besonderheit zeigte sich in der vorliegenden Arbeit bei der molekularzytogenetischen Untersuchung der Glioblastome T6426 und T6427:

Hier konnten bei vermutlich tetraploidem Chromosomensatz mit signifikanter Häufigkeit (25-41%) Verluste von Chromosom 7 detektiert werden, wenngleich diese Gliomentität durch einen Zugewinn dieses Chromosomes charakterisiert ist.

Allerdings trat diese genetische Aberration insgesamt gesehen nur in etwas mehr als 8% der hier untersuchten Glioblastome auf (2/24). Dies kann auf die enorme Heterogenität der Gliomzellen zurückzuführen sein.

Ähnliches gilt für das Oligoastrocytom T6327, bei dem in bis zu 40% der Tumorzellkerne eine Nullisomie 7 nachgewiesen werden konnte. Auch hier sollte anhand von weiteren Karyogrammen überprüft werden, ob auch durch die zytogenetische Karyotypisierung dieser Befund bestätigt werden kann (siehe oben am Beispiel von Chromosom 10).

Zusammenfassend:

Gliome sind eine stark heterogene Tumorentität. Aus diesem Grund ist es keineswegs verwunderlich, dass neben den erwarteten genetischen Aberrationen wie Verlusten der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q oder Zugewinnen von Chromosom 7 und Verlusten von Chromosom 10 weitere Veränderungen detektiert werden konnten.

Traten zusätzliche Aberrationen jedoch mit einer Häufigkeit auf, die nur gering über der Signifikanzgrenze von 10% lag, ist zu erwägen, ob es sich hier um Artefakte handelt. So kann es zu einem vermeintlichen Signalzugewinn durch Hybridisierung und Auswertung von gesunden Zellen oder durch eine unzureichend stringente Waschung bei der FISH kommen. Eine zu hohe Stringenz beim Waschen der FISH- Präparate oder ein zu starker Pepsinverdau der Zellkerne hingegen können zum vermeintlichen Signalverlust führen.

## 6.2.2 Genetische Veränderungen in pilocytischen Astrocytomen

Wie eingehend erläutert, stellen pilocytische Astrocytome unter den Gliomen eine besondere Tumorentität dar.

In dieser Arbeit konzentrierte man sich auf Veränderungen der Chromosomen 7 und 10 sowie der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q.

Zu Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 in pilocytischen Astrocytomen existieren nur wenige Arbeiten. Veränderungen von Chromosom 7 konnten in Form numerischer Imbalancen von Collins et al. (1999) nachgewiesen werden. Ebenso konnten Wemmert et al. (2006) sowohl Verluste als auch Zugewinne dieses Chromosomes in pilocytischen Astrocytomen darstellen.

Publikationen zum Nachweis von Alterationen der beiden chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q mittels FISH in pilocytischen Astrocytomen sind rar.

In einem Fallbericht von Kan P et al. (2004) konnte eine Deletion dieser Regionen nicht nachgewiesen werden. Auch von Arslantas et al. (2007) konnten Verluste der Bereiche 1p36 und 19q nicht in pilocytischen Astrocytomen detektiert werden, sondern nur in höhergradigen Astrocytomen.

Es stellte sich die Frage, ob auch in der vorliegenden Arbeit Zugewinne von Chromosom 7 in signifikanter Anzahl durch eine FISH- Untersuchung detektiert werden können. Dies war jedoch nicht der Fall.

Während auch in dieser Arbeit keine Deletion der chromosomalen Region 1p36 nachgewiesen werden konnte, zeigte sich jedoch ein Verlust von 19q in 2/5 pilocytischen Astrocytomen.

Zusammenfassend konnten hier also im Gegensatz zu früheren Arbeiten Deletionen der chromosomalen Region 19q mit signifikanter Häufigkeit (40%) detektiert werden.

Diese genetische Alteration gilt als typisch für Oligodendrogliome (Hofer et al., 1999; Tews et al., 2006), die nach WHO- Schema im Gegensatz zu den pilocytischen Astrocytomen (WHO- Grad I) als Grad II- oder Grad- III- Tumoren eingestuft werden.

Somit tritt eine Deletion von 19q in völlig unterschiedlichen Gliomentitäten auf. Es bleibt zu klären, ob Patienten mit pilocytischem Astrocytom, das diese genetische Alteration aufweist, eine schlechtere Prognose haben, und ob solche pilozytischen Astrocytome häufiger zu Astrocytomen des WHO- Grades II oder III malignisieren. Denn ein solcher Tumorprogress

könnte durch den Verlust von Tumorsuppressorgen zurückzuführen sein, die im chromosomalen Bereich 19q lokalisiert sind. Bei dem epithelialen Membranprotein 3 (EMP3) beispielsweise, das auf 19q13.3 codiert ist, könnte es sich um ein solches Tumorsuppressorgen handeln. Für dieses in der Zellproliferation involvierte Protein konnte in Gliomen eine inaktivierende Hypermethylierung nachgewiesen werden, was mit einer malignen Progression dieser Tumoren assoziiert war (Alaminos et al., 2005).

Auch bei der ebenfalls auf 19q codierten Cytosolischen Phospholipase A2 (PLA2G4C) beispielsweise könnte es sich um ein Tumorsuppressorgen handeln, da diese in anaplastischen Oligodendrogliomen signifikant niedriger exprimiert war als in höher differenzierten Tumoren (Tews B et al., 2006).

### **6.2.3 Genetische Veränderungen in diffusen und anaplastischen Astrocytomen**

Es stellt sich die Frage, ob sich diffuse und anaplastische Astrocytome neben den histomorphologischen Kriterien, die für eine Zuordnung als WHO- Grad II- oder Grad III-Tumor essentiell sind, auch durch genetische Veränderungen unterscheiden.

Der Literatur zufolge gelten sowohl in diffusen als auch in anaplastischen Astrocytomen Verluste von Chromosom 10 als typische genetische Aberration (Arslantas et al., 2007).

Karnes et al. (1992) oder Thiel et al. (1993) wiesen in diffusen Astrocytomen außerdem als häufigste Veränderung Zugewinne von Chromosom 7 nach, was auch durch Reifenberger und Collins (2004) bestätigt werden konnte.

Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 gelten auch als häufigste genetische Aberration im Glioblastoma multiforme (Smith et al., 2001, Loeper et al., 2001; Nigro et al., 2005; Lopez- Gines et al., 2005).

Die hingegen für Oligodendrogliome als typisch bezeichneten Deletionen der Regionen 1p36 und 19q (von Deimling et al., 1992; Bello et al., 1994; Reifenberger et al., 1994; Bello et al., 1995; Kraus et al., 1995; Hofer et al., 1999; Sasaki et al., 2002; Tews et al., 2006) sind nach Arbeiten von Barbashina et al. (2005) in diffusen und anaplastischen Astrocytomen ebenfalls nachweisbar, wenn auch seltener als in oligodendroglialen Tumoren.

Arslantas et al (2007) hingegen sahen Deletionen von 1p und 19q sogar als spezifisch für hochgradige (anaplastische) Astrocytome an.

Wie in jener Arbeit (Arslantas et al., 2007) konnten auch in der vorliegenden Arbeit Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q in beiden untersuchten anaplastischen Astrocytomen nachgewiesen werden.

In den niedriggradigen Astrocytomen (WHO- Grad II) konnte eine Deletion von 1p36 in 1/3 Tumoren und von 19q ebenfalls in 1/3 Tumoren detektiert werden.

Die Tatsache, dass Deletionen dieser chromosomalen Bereiche (1p36 und 19q) zunehmend in anaplastischen und somit höhergradigen Astrocytomen nachgewiesen werden konnten, lässt wiederum an potentielle Tumorsuppressorgene denken, die innerhalb dieser Bereiche lokalisiert sind.

Hierzu gehört unter Anderem CHD5 (Chromodomain Helicase DNA Binding Domain 5); lokalisiert auf 1p36, das an der Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose beteiligt ist (Bagchi A et al., 2007). Auch EMP3 beispielsweise (epitheliales Membranprotein 3), codiert auf 19q13.3, ist in der Zellproliferation involviert (Alaminos et al., 2005). Weitere potentielle Tumorsuppressorgene, die innerhalb der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q lokalisiert sind, sind in Kapitel 2.3.3. aufgelistet.

Durch einen Verlust solcher Tumorsuppressorgene durch eine Deletion der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q kann eine Tumorprogression in anaplastische Formen erklärt werden. Weiterhin ist auffällig, dass in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten anaplastischen Astrocytomen nur homozygote Deletionen des chromosomalen Bereiches 1p36 detektiert werden konnten, wohingegen in diffusen Astrocytomen homozygote und heterozygote Verluste nachweisbar waren. Auch dieser Sachverhalt spricht dafür, dass sich anaplastische Tumorformen durch den Verlust oben genannter Tumorsuppressorgene ausbilden.

Der Literatur zufolge (Reifenberger und Collins, 2004) konnten in diffusen wie in anaplastischen Astrocytomen Aberrationen von Chromosom 7 nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nur das Astrocytom T5865 (WHO- Grad II) mit Zentromersonden für die Chromosomen 7 und 10 untersucht werden, wobei keine numerischen Aberrationen dieser Chromosomen detektiert werden konnten.

Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass es sich hier um ein diffuses Astrocytom handelt und sich genetische Aberrationen wahrscheinlich zunehmend in anaplastischen Tumorformen ausbilden. So konnte beispielsweise Collins VP (1998) einen ähnlichen Sachverhalt nachweisen: Sequenzverluste der chromosomalen Regionen 13q, 17p

und 22q traten zwar in diffusen Astrocytomen auf, konnten jedoch bei einer Progression zu anaplastischen Tumorformen vermehrt detektiert werden.

Allerdings muss die Frage, ob auch Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 häufiger bei anaplastischen als bei diffusen Astrocytomen auftreten, an einer größeren Fallzahl überprüft werden.

#### **6.2.4 Genetische Veränderungen in Glioblastomen**

Unzählige Arbeiten beschreiben numerische Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 (+ #7/ - #10) als charakteristische genetische Veränderung in Glioblastomen (u.a. Smith et al., 2001; Loeper et al., 2001; Nigro et al., 2005; Lopez-Gines C et al., 2005).

Alterationen der Regionen 1p36 und 19q, wie sie für Oligodendrogliome als typisch beschrieben worden sind, konnten beispielsweise von Krex D et al. (2007) auch im Glioblastoma multiforme detektiert werden, wenn auch in geringerer Anzahl als in Oligodendrogliomen.

Auch in dieser Arbeit konnten im Glioblastoma multiforme die vorbeschriebenen numerischen Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 in signifikanter Anzahl nachgewiesen werden: Zugewinne von Chromosom 7 wurden in 9/24, Verluste von Chromosom 10 in 15/24 Glioblastomen detektiert.

Die Tatsache, dass Zugewinne von Chromosom 7 insbesondere in Glioblastomen (WHO-Grad IV- Tumoren) detektiert werden können, ist vermutlich auf das Gen für EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor; 7p11.2) zurückzuführen (Reifenberger, Collins, 2004).

EGFR ist ein Transmembranrezeptor und mitverantwortlich für die Stimulation von Zellwachstum und Verhinderung von apoptotischem Zelltod (Kleihues P et al, 2000).

Ein Tumorsuppressorgen, das hingegen auf Chromosom 10 lokalisiert ist und im Zusammenhang mit Glioblastomen mit am häufigsten untersucht wurde, ist PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue Deleted On Chromosome 10; Zainuddin N et al., 2005; Koul D et al., 2007). PTEN ist unter Anderem an der Regulation des Zellzyklus beteiligt.

Durch den Verlust von Chromosom 10 und somit von PTEN kann der Zellzyklus außer Kontrolle geraten. Dadurch könnte zum Beispiel die Entstehung eines sekundären Glioblastomes aus anderen Gliomvorläufern bei Verlust von Chromosom 10 erklärt werden.

So wurden in der vorliegenden Arbeit Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 häufiger in anaplastischen als in diffusen Oligodendrogliomen detektiert. Diese Tumoren sind eventuell im Prozess der Malignisierung zu einem sekundären Glioblastom.

Deletionen der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in signifikanter Häufigkeit in dieser Tumorentität nachgewiesen werden: Deletionen von 1p36 wurden in 10/27 Glioblastomen detektiert, Deletionen von 19q in 16/27 Glioblastomen.

Auch Kraus JA et al. (2001) konnten einen Verlust der Heterozygotie insbesondere für 1p in Glioblastomen nachweisen, die histologisch gesehen Merkmale von oligodendroglialer Differenzierung enthielten.

Um sicher differenzieren zu können, ob Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q allgemein mit signifikanter Häufigkeit in dieser Tumorentität auftreten oder insbesondere in Glioblastomen mit oligodendroglialen Charakteristika oder solchen, die als sekundäre Glioblastome aus Oligodendrogliomen entstanden sind, sind weiterführende Arbeiten notwendig. Dabei sollte die Histologie dieser Tumoren zusammen mit dem genetischen Status untersucht werden. Diese Fragestellung ist auch interessant in Bezug auf Kapitel 6.2.3.: Bei anaplastischen Astrocytomen waren lediglich homozygote Deletionen des chromosomalen Bereiches 1p36 detektabel, während in diffusen Tumorformen homozygote wie auch heterozygote Verluste nachgewiesen werden konnten. Vor diesem Hintergrund wurde die Vermutung geäußert, dass der Verlust der auf 1p36 lokalisierten Tumorsuppressorgenen zu einer Tumormalignisierung führt. Daher stellt sich die Frage, ob bei sekundären Glioblastomen, die sich aus niedergradigen Vorläufergliomen entwickelt haben, bevorzugt homozygote Deletionen von 1p36 vorliegen. Auch dies sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit im Glioblastoma multiforme etwa gleich häufig homozygote und heterozygote Deletionen von 1p36 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ergibt sich aus der molekularzytogenetischen Untersuchung von Glioblastomen, dass sich Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q, wie sie für Gliome des WHO- Grades II und III charakteristisch sind, mit hoher Signifikanz auch im Glioblastoma multiforme detektieren lassen. Diese Deletionen traten fast genauso häufig in Glioblastomen auf wie die für diese Tumorentität als typisch bezeichneten Zugewinne von

Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 (in Glioblastomen: -1p36: 37%; -19q: 59%; +7: 37,5%; -10: 62,5%). Vermutlich führt der Verlust von Tumorsuppressorgen durch Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q (zum Beispiel CHD5 und MIG-6 auf 1p36, PLA2G4C auf 19q oder EMP-3 auf 19q13.3) zur malignen Transformation von Gliomzellen in Richtung Glioblastom (siehe oben).

Daraus ergibt sich aber, dass Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 nicht mehr als genetische Hauptcharakteristika für Glioblastome angesehen werden können.

### **6.2.5 Genetische Veränderungen in diffusen und anaplastischen Oligodendrogliomen**

Wie eingehend erläutert, gelten Deletionen der chromosomalen Regionen 1p36 und 19q als typische genetische Aberrationen in dieser Tumorentität (Reifenberger et al., 1994; Bello et al., 1994; Bello et al., 1995; Kraus et al., 1995; Hafer et al., 1999; Sasaki et al., 2002; Reifenberger et al., 2003; Felsberg et al., 2004; Tews et al., 2006).

Diese Deletionen konnten der Literatur zufolge teilweise in über 90% dieser Tumoren vom WHO- Grad II nachgewiesen werden, aber auch in Grad III- Oligodendrogliomen konnten diese Alterationen detektiert werden.

Untersuchungen zu numerischen Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 sind für Oligodendrogliome nur in geringerer Anzahl vorhanden: Die für Glioblastome typische Kombination aus Zugewinnen von Chromosom 7 und Verlusten von Chromosom 10 konnten auch in oligodendroglialen Tumoren nachgewiesen werden. Hierbei konnten Verluste des langen Armes von Chromosom 10 (10q) insbesondere in anaplastischen Oligodendrogliomen detektiert werden (Cairncross et al., 1998; Sasaki H et al., 2001; Hoang- Xuan, 2001; Sanson et al., 2002).

Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Deletion von 1p36 nur in 1/5 Oligodendrogliomen. Hierbei (T5799) handelt es sich um einen anaplastischen Tumor.

Allerdings muss an dieser Stelle nochmals auf die kleine Fallzahl sowie auf die Heterogenität der Gliome hingewiesen werden (siehe 6.2.1 Heterogenität von Gliomen).

Die Tatsache, dass der chromosomale Bereich 1p36 in der vorliegenden Arbeit nur in einem anaplastischen Tumor deletiert war, erinnert an Befunde, die unter anderem von Husemann et al. (1999), Pohl et al. (1999) oder He et al. (2000) publiziert worden waren.

Diese Arbeitsgruppen konnten Alterationen des potentiellen Tumorsuppressorgenes *CDKN2C* (Inhibitor- Gen für eine Cyclin- abhängige Kinase) nur in anaplastischen Oligodendrogliomen nachweisen, nicht aber in diffusen Tumorformen. Dieser Befund lässt vermuten, dass ein Verlust von 1p36 und damit unter Anderem von *CDKN2C* zur malignen Progression von Oligodendrogliomen beiträgt.

Ähnliches gilt für das potentielle Tumorsuppressorgen *CHD5* (Chromodomain Helicase DNA Binding Domain 5), das an der Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose beteiligt ist (Bagchi A et al., 2007). *CHD 5* ist ebenfalls auf 1p36 lokalisiert.

Verluste der Region 19q hingegen wurden in 3/5 Oligodendrogliomen detektiert, und zwar in beiden anaplastischen Tumoren (WHO- Grad III), die untersucht worden waren, und in einem diffusen Oligodendrogliom (WHO- Grad II).

Auch in dem chromosomalen Bereich 19q sind potentielle Tumorsuppressorgene lokalisiert. Somit könnte ein Verlust dieses Bereiches zur malignen Transformation von Oligodendrogliomen beitragen, was zu dem Befund passt, dass diese Alteration häufiger in anaplastischen als in diffusen Oligodendrogliomen detektabel war.

So ist beispielsweise das Gen für *PLA2G4C*, die Cytosolische Phospholipase A2, auf 19q lokalisiert. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung von Membranphospholipiden unter Oxidationsstress (Tews B et al., 2006).

Tews B et al. (2006) konnten nachweisen, dass die *PLA2G4C* in anaplastischen Oligodendrogliomen signifikant niedriger exprimiert ist als in höher differenzierten Tumoren. Alaminos et al. (2005) wiesen eine inaktivierende Hypermethylierung für das epitheliale Membranprotein 3, welches auf 19q13.3 codiert ist, nach. Dieses Protein ist unter Anderem an der Zellproliferation beteiligt. Diese Arbeitsgruppe sah eine Assoziation zwischen der inaktivierenden Hypermethylierung und der malignen Progression von Gliomen, weshalb vermutet wird, dass es sich bei *EMP3* ebenfalls um ein Tumorsuppressorgen handelt.

Dies würde in der vorliegenden Arbeit das vermehrte Auftreten von Deletionen von 19q in anaplastischen Oligodendrogliomen erklären.

Ursprünglich lag die Vermutung nahe, dass bei einem Upgrading der Oligodendrogliome zunehmend genetische Aberrationen auftreten, wie sie für das Glioblastoma multiforme (+ #7 und - #10) als charakteristisch beschrieben worden sind:

In dieser Arbeit zeigten sich Zugewinne von Chromosom 7 in 2/6 Oligodendrogliomen, darunter ein diffuser und ein anaplastische Tumor.

Verluste von Chromosom 10 wurden ebenfalls in 2/6 Oligodendrogliomen detektiert, in beiden Fällen handelt es sich um diffuse Tumoren.

Folglich traten an dieser Stelle numerische Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 unabhängig von der Progressionsstufe auf. Allerdings muss dieser Befund anhand einer größeren Fallzahl überprüft werden.

### **6.2.6 Genetische Veränderungen in diffusen und anaplastischen Oligoastrocytomen**

Es stellt sich die Frage, ob Oligoastrocytome neben den charakteristischen histomorphologischen Merkmalen auch genetisch gesehen Typika von Oligodendrogliomen und Astrocytomen aufweisen.

Demnach müssten in dieser Tumorentität Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q sowie numerische Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 detektabel sein.

Kitange G et al. (2005) konnten in einer CGHa- Studie (array- based comparative genomic hybridization) Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q in Oligodendrogliomen und in Oligoastrocytomen Mischtumoren nachweisen.

In einer Untersuchung von Shukla et al. (2009) an Oligodendrogliomen, Astrocytomen und Oligoastrocytomen konnten Deletionen der Bereiche 1p36 und 10q in 65% der Oligodendrogliome und in 66,6% der Oligoastrocytome detektiert werden.

Dies bestätigt die Vermutung, dass die für oligodendrogliale Tumoren charakteristischen genetischen Aberrationen auch in den oligoastrocytären Mischtumoren auftreten.

Während in den vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten Oligoastrocytomen keine Deletionen von 1p36 detektiert werden konnten, zeigten sich Verluste von 19q sowohl in einem WHO- Grad II- als auch in einem WHO- Grad III- Tumor.

Aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Arbeit werden mit Oligoastrocytomen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssen, um zu überprüfen, ob auch Deletionen des Bereiches 1p36 nachgewiesen werden können.

Zugewinne von Chromosom 7 oder Verluste von Chromosom 10 konnten an dieser Stelle jedoch entgegen der Erwartungen nicht nachgewiesen werden.

In der Literatur finden sich Studien zu Veränderungen der Chromosomen 7 und 10 vor allem in diffusen und anaplastischen Astrocytomen und in Glioblastomen (Thiel et al., 1993; Reifenberger und Collins, 2004; Smith et al., 2001; Nigro et al., 2005; Lopez- Gines C et al.).

In Bezug auf die hier mituntersuchten Mischtumoren ist die Datenlage schlechter. Auch hier werden weiterführende Arbeiten folgen müssen, die sich mit Zugewinnen von Chromosom 7 und Verlusten von Chromosom 10 in dieser Tumorentität befassen.

### **6.2.7 Genetische Veränderungen in Ependymomen**

Zu den seltenen Ependymomen sind nur wenige Publikationen erschienen, die sich mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Aberrationen beschäftigen.

In Arbeiten von Tong CY et al. (2001) und Fouladi M et al. (2003) wurden Ependymome auf Deletionen der Regionen 1p36 und 19q hin untersucht, wobei diese Alterationen nicht nachgewiesen werden konnten.

Bijlsma EK et al. (1995) hingegen konnten Verluste von Chromosom 10 und Deletionen von 1p36 detektieren.

In der vorliegenden Arbeit konnten lediglich tetra- oder oktasome Zellkerne für diese Regionen beziehungsweise Chromosomen nachgewiesen werden.

Allerdings muss an dieser Stelle nochmals auf die geringe Fallzahl bezüglich dieser Tumorentität hingewiesen werden, welche im Wesentlichen durch die Rarität dieser Gliomentität bedingt ist.

### **6.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Der Literatur zufolge gelten insbesondere Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q bei Oligodendrogliomen (Hafer et al., 1999; Tews et al., 2006; von Deimling et al. 1992; Reifenberger et al., 1994) sowie numerische Aberrationen der Chromosomen 7 und 10 in Glioblastomen (Nigro et al., 2005; Loeper et al., 2001; Smith et al., 2001; Lopez- Gines C et al., 2005) als charakteristische genetische Veränderungen in diesen Gliomentitäten. In diffusen und anaplastischen Astrocytomen konnten bisher die gleichen genetischen Veränderungen wie in Oligodendrogliomen und Glioblastomen nachgewiesen werden.

Folglich stellt sich die Frage, ob anhand der vorliegenden Arbeit diese Befunde bestätigt werden können, und ob diese Befunde, für den Fall dass sie bestätigt werden können, repräsentativ für einzelne Gliomentitäten sind.

*Deletionen von 1p36 und 19q:*

Bei der Untersuchung dieser chromosomalen Bereiche zeigte sich ein interessantes Ergebnis: *Deletionen von 1p36* ließen sich – prozentual gesehen – am häufigsten in diffusen und anaplastischen Astrocytomen detektieren. Am zweit häufigsten wurde diese Alteration in Glioblastomen nachgewiesen und erst an dritter Stelle in Oligodendrogliomen. Laut Literatur gelten diese Alterationen von 1p36 und 19q jedoch als charakteristisch für Oligodendrogliome (Hafer et al., 1999; Tews et al., 2006; von Deimling et al. 1992; Reifenberger et al., 1994). Um eine der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit zu beantworten, nämlich die Frage, ob Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q so charakteristisch für Oligodendrogliome sind, dass eine Tumoreinteilung alleine auf dieser Basis erfolgen kann, so muss dies für 1p36 (und s.u. auch für 19q) verneint werden.

Betrachtet man die Gradeinteilung dieser Tumoren nach WHO, so zeigten sich Deletionen von 1p36 in zwei Astrocytomen, die als WHO- Grad III eingestuft worden waren (2/2), und in einem WHO- Grad II- Astrocytom (1/3). In Oligodendrogliomen war dieser Bereich in einem Tumor des WHO- Grades III deletiert (1/2). Da diese Alteration häufiger bei anaplastischen als bei diffusen Tumorformen auftritt und außerdem sehr häufig im Glioblastoma multiforme, wirft dies die Frage auf, inwiefern Deletionen dieser chromosomalen Bereiche zur malignen Transformation von Gliomen beitragen.

Um dies zu beantworten, sollten nochmals Gene herangezogen werden, die in dem Bereich 1p36 lokalisiert sind: Bei CHD 5 (Chromodomain Helicase DNA Binding Domain 5; Bagchi A et al., 2007), MIG- 6 (Mitogen inducible- Gene 6; Zhang YW et al., 2006) oder CDKN2C (Husemann et al., 1999; Pohl et al., 1999; He et al., 2000) handelt es sich um potentielle Tumorsuppressorgene, die das Tumorwachstum negativ beeinflussen. Der Verlust solcher Gene kann eine maligne Transformation erklären.

Eine *Deletion von 19q* konnte am häufigsten in diffusen und anaplastischen Astrocytomen und Oligodendrogliomen detektiert werden, dicht gefolgt von Glioblastomen. Somit kann auch eine Alteration von 19q ebenso wie eine solche von 1p36 (s.o.) nicht als alleiniges genetisches Kriterium für die Einteilung als Oligodendrogliom dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verlust von 19q in zwei Astrocytomen vom Grad III nachgewiesen (2/2) und in einem Grad II- Astrocytom (1/3). In Oligodendrogliomen ließ sich eine Deletion von 19q nur in einem anaplastischen Tumor detektieren (1/2).

In Oligoastrocytomen konnte diese Veränderung in einem Grad II- wie auch in einem Grad III- Tumor dargestellt werden.

Insgesamt gesehen sind also auch Deletionen des chromosomalen Bereiches 19q häufiger in anaplastischen Tumorformen nachgewiesen worden. Auch hier soll ein Gen aufgezeigt werden, das in dem Bereich 19q lokalisiert ist: Bei dem epithelialen Membranprotein 3 handelt es sich vermutlich ebenfalls um ein Tumorsuppressorgen (Alaminos et al., 2005). Durch den Verlust dieses Genes könnte auch hier eine maligne Transformation von einem WHO- Grad II- Tumor zu einem Grad III- Tumor erklärt werden.

Weitere potentielle Tumorsuppressorgene innerhalb der Bereiche 1p36 und 19q sind in Kapitel 2.3.3. beschrieben.

#### *Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10:*

*Zugewinne von Chromosom 7* gelten als typisch für Glioblastome. Diese numerische Aberration wurde auch in der vorliegenden Arbeit am häufigsten in dieser Tumorentität nachgewiesen.

Daneben war ein Zugewinn von Chromosom 7 nur in Oligodendrogliomen detektierbar.

Ähnliches gilt für *Verluste von Chromosom 10*: Diese waren nur in Glioblastomen und Oligodendrogliomen nachweisbar, allerdings in letzteren dezent häufiger als in Glioblastomen.

Da Zugewinne von Chromosom 7 sowohl bei diffusen als auch bei anaplastischen Oligodendrogliomen detektiert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass sich schon auf einer frühen Entwicklungsstufe der Gliome genetische Veränderungen ausbilden, die eine maligne Transformation begünstigen.

Dies gilt auch für Verluste von Chromosom 10, die nur in diffusen Oligodendrogliomen detektiert werden konnten.

Auffallend war also, dass sich insbesondere Glioblastome und Oligodendrogliome ähnlich verhalten, was die genetischen Aberrationen betrifft: Nur in diesen beiden Gliomentitäten waren in der vorliegenden Arbeit Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 zu verzeichnen, in beiden Gliomen ließen sich Deletionen von 1p36 und insbesondere von 19q detektieren.

Bezüglich der Ähnlichkeit von Oligodendrogliomen und Glioblastomen gibt es neben dieser Untersuchung auf molekularzytogenetischer Ebene auch eine Arbeit von Kraus JA et al.

(2001), die sich mit der Histomorphologie dieser Tumoren beschäftigt. Hier konnte gezeigt werden, dass Glioblastome, bei denen mittels Mikrosatellitenanalyse ein Verlust der Heterozygotie für 1p und geringer auch für 19q nachgewiesen werden konnte, histologisch auch oligodendrogliale Merkmale vorlagen.

Folglich ist es denkbar, dass sich Oligodendrogliome und Glioblastome ähnlicher sind, als bisher angenommen.

### **6.3 Genetik als Basis der Gliomklassifikation**

#### **– Basierend auf den Ergebnissen der Fluoreszenz- In situ- Hybridisierung –**

In der vorliegenden Arbeit konnten zusammenfassend die gleichen genetischen Aberrationen nachgewiesen werden, wie sie für bestimmte Gliomentitäten als charakteristisch angesehen werden.

Allerdings ließen sich diese Veränderungen erstaunlicherweise auch in anderen Gliomsubtypen mit signifikanter Häufigkeit darstellen.

So konnten beispielsweise Deletionen des chromosomalen Bereiches 1p36 in Astrocytomen und Glioblastomen häufiger als in Oligodendrogliomen nachgewiesen werden.

Um die Frage zu beantworten, wie charakteristisch die einzelnen genetischen Aberrationen für die jeweiligen Gliomsubtypen sind, muss Folgendes gesagt werden:

Durch das signifikante Auftreten der verschiedenen Aberrationen in den unterschiedlichsten Gliomsubtypen erweist sich eine Klassifikation von Gliomen alleine auf genetischer Basis als äußerst schwierig.

In jedem Fall trägt auch die enorme Heterogenität der Gliome hierzu bei: Aufgrund dieser Tatsache unterscheiden sich die einzelnen Gliom- Tumorzellen teilweise stark in ihrem genetischen Status. Auch daraus ergibt sich, dass eine Karyotypisierung oder Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierung von einzelnen Gliomtumorzellen nicht zur alleinigen Gliomdiagnostik im Sinne einer Subtypen- Zuordnung eingesetzt werden kann.

Hier erweisen sich histomorphologische oder histochemische Klassifikations- Methoden als weitaus sicherer.

Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich jedoch, dass bei einer Tumorprogression zu höheren Malignitätsstufen zunehmend homozygote genetische Aberrationen auftreten. Dieser

Sachverhalt kann als Entscheidungshilfe bei der Gliomdiagnostik und –klassifikation genutzt werden.

Ist es jedoch möglich, neben der histomorphologischen Diagnostik zusätzlich den genetischen Status der Gliome zu untersuchen, ergibt sich ein weiterer Vorteil: Auf diese Weise könnten beispielsweise Aussagen über das Ansprechverhalten auf Chemotherapeutika getroffen werden. So zeigten Studien diesbezüglich unter Anderem, dass Oligodendrogliom- und Oligoastrocytom- Patienten ein verbessertes Ansprechen auf Temozolomid- Chemotherapie zeigen, wenn ein Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 nachgewiesen werden konnte (Smith et al., 2000; Chahlavi et al., 2003). Bei diesen Patienten verbesserte sich auch die Ansprechrate auf PCV- Chemotherapie, sofern in den Tumoren Deletionen der Bereiche 1p und 19q vorlagen (Cairncross et al., 1998). Wemmert et al. (2005) konnten nachweisen, dass Glioblastom- Patienten mit Verlusten von Chromosom 10 beziehungsweise mit Deletionen von 10q signifikant von einer Therapie mit Temozolomide (TMZ, Temodal®) profitieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich eine Klassifikation von Gliomen auf genetischer Basis nicht zuletzt aufgrund der enormen Heterogenität der Tumorzellkerne als schwierig erweist. Dennoch können Karyotypisierung wie auch FISH als sinnvolle Techniken zur weiterführenden Diagnostik bei Gliomen eingesetzt werden.

## 6.4 Ausblick

Aufgrund der teilweise sehr geringen Fallzahlen einzelner Gliomentitäten in der vorliegenden Arbeit werden weiterführende Untersuchungen mit größeren Fallzahlen notwendig sein, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

Ferner ist es von Interesse, ob es – sofern diese Ergebnisse reproduzierbar sind – andere genetische Aberrationen als die in dieser Arbeit untersuchten gibt, die für die einzelnen Gliomsubtypen spezifischer sind.

So können beispielsweise Deletionen der chromosomalen Bereiche 1p36 und 19q nicht als Differenzierungsmerkmale für eine Einteilung als “Oligodendrogliom“ im Rahmen einer Klassifikation auf genetischer Basis eingesetzt werden, wenn diese Alterationen bisher auch als charakteristisch für diese Tumorentität galten. Denn in dieser Arbeit konnten Deletionen des Bereiches 1p36 häufiger in diffusen und anaplastischen Astrocytomen und in Glioblastomen als in Oligodendrogliomen detektiert werden. Auch Deletionen von 19q traten in diffusen und anaplastischen Astrocytomen, Glioblastomen und Oligodendrogliomen etwa gleich häufig auf. Folglich werden, sofern eine Gliomklassifikation auf genetischer Basis angestrebt werden soll, andere genetische Charakteristika als Alterationen dieser beiden chromosomalen Bereiche benötigt.

Da in der vorliegenden Arbeit Zugewinne von Chromosom 7 und Verluste von Chromosom 10 nur in Glioblastomen und Oligodendrogliomen detektiert werden konnten, sollten nicht zuletzt auch weitere histologische Untersuchungen zu diesen Tumorentitäten folgen, um auch auf histologischer Ebene Augenmerk auf weitere gemeinsame Merkmale dieser beiden Gliomsubtypen zu lenken. Auch weitere Charakteristika auf genetischer Basis, die Glioblastome und Oligodendrogliome betreffen, sollten erforscht werden.

Auf die vorliegende Arbeit aufbauend wäre es von sehr großem klinischem Interesse, ob die genetischen Veränderungen der Gliome, die hier nachgewiesen werden konnten, beispielsweise mit der Überlebenszeit von Patienten korrelieren.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: WHO- Klassifikation und histopathologische Einteilung der Gliome; Modifiziert nach Hofer .....	17
Abbildung 2: Optionen für die Primär- und Rezidivtherapie der Gliome <sup>1</sup> ; Modifiziert nach: Stupp et al., 2005 .....	21
Abbildung 3: Karnofsky- Index .....	25
Abbildung 4: Abkürzungen der Chemotherapeutika .....	25
Abbildung 5: Karyogramm mit Darstellung von Double Minutes (s. Pfeile), Barker 1982 ....	28
Abbildung 6: Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und Tumorlokalisation; .....	37
Abbildung 10: Karyogramm des Tumors T6336, Glioblastom .....	47
Abbildung 11: a) 1p36 (FITC) und 19q (Cy3) an Blutlymphocyten, Mitose; b) #7 (FITC) ...	59
Abbildung 12: Hybridisierungsergebnisse der Lymphocyten als Referenzgewebe, Auszählung .....	62
Abbildung 13: Hybridisierungsergebnisse der Lymphocyten als Referenzgewebe, prozentualer Anteil .....	64
Abbildung 14: Ergebnisse der Berechnungen von Mittelwert und Standardabweichung .....	64
Abbildung 15: Tabellarische Übersicht über die zytogenetischen Befunde .....	68
Abbildung 16: Karyogramm des Tumors T6327, Oligoastrocytom III° .....	70
Abbildung 17: Tabellarische Übersicht über Alterationen in pilocytischen Astrocytomen ....	72
Abbildung 18: Graphische Übersicht über Alterationen in pilocytischen Astrocytomen.....	73
Abbildung 19: Tabellarische Übersicht über Alterationen in diffusen und anaplastischen Astrocytomen .....	74
Abbildung 20: Graphische Übersicht über Alterationen in Astrocytomen .....	75
Abbildung 21: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Glioblastomen.....	80
Abbildung 22: Graphische Übersicht über Alterationen in Glioblastomen .....	81
Abbildung 23: Graphische Übersicht über Alterationen in Glioblastomen .....	82
Abbildung 24: Graphische Übersicht über Alterationen in Glioblastome .....	83
Abbildung 25: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Oligodendrogliomen .....	85
Abbildung 26: Graphische Übersicht über Alterationen in Oligodendrogliomen .....	86
Abbildung 27: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Oligoastrocytomen.....	88
Abbildung 28: Graphische Übersicht über Alterationen in Oligoastrocytomen .....	89
Abbildung 29: Tabellarische Übersicht über Alterationen in Ependymomen .....	90

---

Abbildung 30: Deletionen von 1p36 .....	91
Abbildung 31: Deletionen von 19q .....	92
Abbildung 32: Zugewinne von Chromosom 7 .....	93
Abbildung 33: Verluste von Chromosom 10 .....	93
Abbildung 34: a) T6433, GBM, #7 (FITC) und #10 (Cy3); b) T5795, OD, #7 (FITC) und #10 (Cy3); c) T6448, GBM, 1p36 (FITC) und 19q (Cy3); d) T6448, GBM, 1p36 (FITC) und 19q (Cy3); e) T6408, GBM, #7 (FITC) und #10 (Cy3); f) T6355, GBM, #7 (FITC) und #10(Cy3) .....	95
Abbildung 35: Ergebnisvergleich zwischen FISH und Karyotypisierung .....	98
Abbildung 36: Karyogramm mit Darstellung eines Verlustes von Chromosom 10; T6327, Oligoastrocytom III° .....	109

**8 Literaturverzeichnis**

1. Alaminos M, Dávalos V, Ropero S, Setién F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M (2005) EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res* 65:2565-2571.
2. Arnoldus EP, Wolters LB, Voormolen JH, van Duinen SG, Raap AK, van der Ploeg M, Peters AC (1992) Interphase cytogenetics: a new tool for the study of genetic changes in brain tumors. *J Neurosurg* 76:997-1003
3. Arslantas A, Artan S, Oner U, Müslümanoglu MH, Ozdemir M, Durmaz R, Arslantas D, Vural M, Cosan E, Atasoy MA (2007) Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res* 13:39-46
4. Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA (2007) CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell* 128:459-475
5. Bamberg M, Sauerwein W, Scherer E (1982) Methods and results of radiotherapy in case of medulloblastoma. *Strahlentherapie* 158:71-75
6. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M (2005) classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* 11:1119-1128
7. Barker PE (1982) Double minutes in human tumor cells. *Cancer Genet Cytogenet* 5:81-94
8. Bauman GS, Ino Y, Ueki K, Zlatescu MC, Fisher BJ, Macdonald DR, Stitt L, Louis DN, Cairncross JG (2000) Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48:825-830

9. Bello MJ, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Saez-Castresana J, Pestana A, Rey JA (1994) Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 57:172-175
10. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Pestaña A, Rey JA (1995) Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 64:207-210
11. Bigner SH, Mark J, Burger PC, Mahaley MS, Bullard DE, Muhlbaier LH, Bigner DD (1988) Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* 48:405-411
12. Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH, Stenzel TT, Dawes DM, McLendon RE, Bigner DD (1999) Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 155:375-386
13. Bignold LP, Coghlan BLD, Jersmann HPA (2006) Hansemann, Boveri, chromosomes and the gametogenesis-related theories of tumours. *Cell Biology International* 640-644
14. Bijlsma EK, Voesten AM, Bijleveld EH, Troost D, Westerveld A, Mérel P, Thomas G, Hulsebos TJ (1995) Molecular analysis of genetic changes in ependymomas. *Genes Chromosomes Cancer* 13:272-277
15. Brada M, Viviers L, Abson C, Hines F, Britton J, Ashley S, Sardell S, Traish D, Gonsalves A, Wilkins P, Westbury C (2003) Phase II study of primary temozolomide chemotherapy in patients with WHO grade II gliomas. *Ann Oncol* 14:1695-1696
16. Bruce J, Senatus PB, Elder JB, Brown MD, Parsa T, Anderson RC (2001) Astrocytoma. *eMedicine*
17. Buongiorno-Nardelli M, Amaldi F (1970) Autoradiographic detection of molecular hybrids between RNA and DNA in tissue sections. *Nature* 225:946-948

18. Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD (2002) Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* 62:6205-6210
19. Cairncross JG, Macdonald DR (1988) Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol* 23:360-364
20. Cairncross G, Macdonald D, Ludwin S, Lee D, Cascino T, Buckner J, Fulton D, Dropcho E, Stewart D, Schold C, et al. (1994) Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. *J Clin Oncol* 12:2013-2021
21. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90:1473-1479
22. Camargo AA, Nunes DN, Samaia HB, Liu L, Collins VP, Simpson AJ, Dias-Neto E (2001) Molecular characterization of DDX26, a human DEAD-box RNA helicase, located on chromosome 7p12. *Braz J Med Biol Res* 34:1237-1245
23. Chahlavi A, Kanner A, Peereboom D, Staugaitis SM, Elson P, Barnett G (2003) Impact of chromosome 1p status in response of oligodendroglioma to temozolomide: preliminary results. *J Neurooncol* 61:267-273
24. Chernova OB, Somerville RP, Cowell JK (1998) A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 17:2873-2881
25. Chernova OB, Hunyadi A, Malaj E, Pan H, Crooks C, Roe B, Cowell JK (2001) A novel member of the WD-repeat gene family, WDR11, maps to the 10q26 region and is disrupted by a chromosome translocation in human glioblastoma cells. *Oncogene* 20:5378-5392

26. Chevalier J, Yi J, Michel O, Tang XM (1997) Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy in situ hybridization probes: where do we stand? *J Histochem Cytochem* 45:481-491
27. Collins VP (1998) Gliomas. *Cancer Surv* 32:37-51
28. Collins VP (1999) Progression as exemplified by human astrocytic tumors. *Semin Cancer Biol* 9:267-276
29. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62:2152-2165
30. Dehghani F, Schachenmayr W, Laun A, Korf HW (1998) Prognostic implication of histopathological, immunohistochemical and clinical features of oligodendrogliomas: a study of 89 cases. *Acta Neuropathol* 95:493-504
31. Devilee P, Kievits T, Wayne JS, Pearson PL, Willard HF (1988) Chromosome-specific alpha satellite DNA: isolation and mapping of a polymorphic alphoid repeat from human chromosome 10. *Genomics* 3:1-7
32. Diedrich U, Soja S, Behnke J, Zoll B (1991) Amplification of the c-erbB oncogene is associated with malignancy in primary tumours of neuroepithelial tissue. *J Neurol* 238:221-224
33. Eoli M, Bissola L, Bruzzone MG, Pollo B, Maccagnano C, De Simone T, Valletta L, Silvani A, Bianchessi D, Broggi G, Boiardi A, Finocchiaro G (2006) Reclassification of oligoastrocytomas by loss of heterozygosity studies. *Int J Cancer* 119:84-90

- 
34. EORTC European Organisation für Research and Treatment of Cancer  
EORTC 26981/ 22981:  
Concomitant and adjuvant Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme. Randomized phase III study.  
EORTC 22845:  
Phase III randomized comparison of early vs no or late radiotherapy in adult patients with grade I/II supratentorial astrocytomas and oligodendrogliomas.  
EORTC 26951:  
Randomized phase III study of adjuvant PCV chemotherapy in patients with highly anaplastic oligodendroglioma.
  
  35. Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G (2004) Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 14:121-130
  
  36. Fischer U, Müller HW, Sattler HP, Feiden K, Zang KD, Meese E (1995)  
Amplification of the MET gene in glioma. *Genes Chromosomes Cancer* 12:63-65
  
  37. Fortin D, Cairncross GJ, Hammond RR (1999) Oligodendroglioma: an appraisal of recent data pertaining to diagnosis and treatment. *Neurosurgery* 45:1279-1291
  
  38. Fouladi M, Helton K, Dalton J, Gilger E, Gajjar A, Merchant T, Kun L, Newsham I, Burger P, Fuller C (2003) Clear cell ependymoma: a clinicopathologic and radiographic analysis of 10 patients. *Cancer* 98:2232-2244
  
  39. Fuller CE, Schmidt RE, Roth KA, Burger PC, Scheithauer BW, Banerjee R, Trinkaus K, Lytle R, Perry A (2003) Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/ astrocytic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1118-1128
  
  40. Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:378-383

41. Gelpi E, Ambros IM, Birner P, Luegmayr A, Drlicek M, Fischer I, Kleinert R, Maier H, Huemer M, Gatterbauer B, Anton J, Rössler K, Budka H, Ambros PF, Hainfellner JA (2003) Fluorescent in situ hybridization on isolated tumor cell nuclei: a sensitive method for 1p and 19q deletion analysis in paraffin-embedded oligodendroglial tumor specimens. *Mod Pathol* 16:708-715
42. Glass J, Hochberg FH, Gruber ML, Louis DN, Smith D, Rattner B (1992) The treatment of oligodendrogliomas and mixed oligodendroglioma-astrocytomas with PCV chemotherapy. *J Neurosurg* 76:741-745
43. Green SB, Byar DP, Walker MD, Pistenmaa DA, Alexander E, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, Mealey J, Odom GL, Paoletti P, Ransohoff J, Robertson JT, Selker RG, Shapiro WR, Smith KR, Wilson CB, Strike TA (1983) Comparisons of carmustine, procarbazine, and high-dose methylprednisolone as additions to surgery and radiotherapy for the treatment of malignant glioma. *Cancer Treat Rep* 67:121-132
44. Hartmann C, Johnk L, Kitange G, Wu Y, Ashworth LK, Jenkins RB, Louis DN (2002) Transcript map of the 3.7-Mb D19S112-D19S246 candidate tumor suppressor region on the long arm of chromosome 19. *Cancer Res* 62:4100-4108
45. Hayes VM, Dirven CM, Dam A, Verlind E, Molenaar WM, Mooij JJ, Hofstra RM, Buys CH (1999) High frequency of TP53 mutations in juvenile pilocytic astrocytomas indicates role of TP53 in the development of these tumors. *Brain Pathol* 9:463-467
46. He J, Hoang-Xuan K, Marie Y, Leuraud P, Mokhtari K, Kujas M, Delattre JY, Sanson M (2000) P18 tumor suppressor gene and progression of oligodendrogliomas to anaplasia. *Neurology* 55:867-869
47. Heim S, Mandahl N, Jin Y, Strömblad S, Lindström E, Salford LG, Mitelman F (1989) Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. *Cytogenet Cell Genet* 52:136-138

48. Hoang-Xuan K, He J, Huguet S, Mokhtari K, Marie Y, Kujas M, Leuraud P, Capelle L, Delattre JY, Poirier J, Broet P, Sanson M (2001) Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology* 57:1278-1281
49. Hofer S, Roelcke U, Herrmann R (1999) Neue Aspekte der interdisziplinären Therapie maligner Gliome des Erwachsenenalters. *Schweiz Med Wochenschr* 129:1332–1341
50. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H (2006) Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:846-854
51. Husemann K, Wolter M, Büschges R, Boström J, Sabel M, Reifenberger G (1999) Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1041-1050
52. Ishii N, Sawamura Y, Tada M, Daub DM, Janzer RC, Meagher-Villemure M, de Tribolet N, Van Meir EG (1998) Absence of p53 gene mutations in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a p53 functional assay. *Int J Cancer* 76: 797-800
53. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS (2007) Bevacizumab Plus Irinotecan in Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 25
54. Jellinger K, Kothbauer P, Volc D, Vollmer R, Weiss R (1979) Combination chemotherapy (COMP protocol) and radiotherapy of anaplastic supratentorial gliomas. *Acta Neurochir* 51:1-13
55. Jenkins RB, Kimmel DW, Moertel CA, Schultz CG, Scheithauer BW, Kelly PJ, Dewald GW (1989) A cytogenetic study of 53 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 39:253-279

56. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC (2006) A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 66:9852-9861
57. John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNS-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587
58. Kan P, Gottfried O, Blumenthal DT, Townsend JJ, Drozd-Borysiuk E, Brothman AR, Jensen RL (2004) Oligodendroglioma and juvenile pilocytic astrocytoma presenting as synchronous primary brain tumors. Case report with histological and molecular differentiation of the tumors and review of the literature. *J Neurosurg* 100:700-705
59. Karnes PS, Tran TN, Cui MY, Raffel C, Gilles FH, Barranger JA, Ying KL (1992) Cytogenetic analysis of 39 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 59:12-19
60. Kashima T, Tiu SN, Merrill JE, Vinters HV, Dawson G, Campagnoni AT (1993) Expression of oligodendrocyte-associated genes in cell lines derived from human gliomas and neuroblastomas. *Cancer Res* 53:170-175
61. Kitange G, Misra A, Law M, Passe S, Kollmeyer TM, Maurer M, Ballman K, Feuerstein BG, Jenkins RB (2005) Chromosomal imbalances detected by array comparative genomic hybridization in human oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 42:68-77
62. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3:255-68
63. Kleihues P, Lubbe J, Watanabe K, von Ammon K, Ohgaki H (1994) Genetic alterations associated with glioma progression. *Verh Dtsch Ges Pathol* 78:43-47
64. Kleihues P, Ohgaki H (2000) Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol* 28:164-170

65. Koul D, Shen R, Shishodia S, Takada Y, Bhat KP, Reddy SA, Aggarwal BB, Yung WK (2007) PTEN down regulates AP-1 and targets c-fos in human glioma cells via PI3- kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biochem* 300:77-87
66. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:91-95
67. Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, Beck M, Wolter M, Sabel M, Krex D, Klockgether T, Reifenberger G, Schlegel U (2001) Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol* 101:311-320
68. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G (2007) Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130:2596-2606
69. Kros JM, Troost D, van Eden CG, van der Werf AJ, Uylings HB (1988) Oligodendroglioma. A comparison of two grading systems. *Cancer* 61:2251-2259
70. Kyritsis AP, Yung WK, Bruner J, Gleason MJ, Levin VA (1987) The treatment of anaplastic oligodendrogliomas and mixed gliomas. *Neurosurgery* 32:365-371
71. Lindegaard KF, Mork SJ, Eide GE, Halvorsen TB, Hatlevoll R, Solgaard T, Dahl O, Ganz J (1987) Statistical analysis of clinicopathological features, radiotherapy and survival in 170 cases of oligodendroglioma. *J Neurosurg* 67:224-230
72. Lindström E, Salford LG, Heim S, Mandahl N, Strömblad S, Brun A, Mitelman F (1991) Trisomy 7 and sex chromosome loss need not to be representative of tumor parenchyma cells in malignant glioma. *Genes Chromosomes Cancer* 3:474-479
73. Loeper S, Romeike BF, Heckmann N, Jung V, Henn W, Feiden W, Zang KD, Urbchat S (2001) Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet* 94:1-8

- 
74. Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Callaghan R, Benito R, Roldan P, Piquer J, Llacer J, Barbera J (2005) Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. *Clin Neuropathol* 24:209-218
  
  75. Louis DN, Holland EC, Cairncross JG (2001) Glioma classification – A molecular reappraisal. *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 3
  
  76. McDonald JM, See SJ, Tremont IW, Colman H, Gilbert MR, Groves M, Burger PC, Louis DN, Giannini C, Fuller G, Passe S, Blair H, Jenkins RB, Yang H, Ledoux A, Aaron J, Tipnis U, Zhang W, Hess K, Aldape K (2005) The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. *Cancer* 104:1468-1477
  
  77. Moon YW, Weil RJ, Pack SD, Park WS, Pak E, Pham T, Karkera JD, Kim HK, Vortmeyer AO, Fuller BG, Zhuang Z (2000) Missense mutation of the MET gene detected in human glioma. *Mod Pathol* 13:973-977
  
  78. Mork SJ, Lindegaard KF, Halvorsen TB, Lehmann EH, Solgaard T, Hatlevoll R, Harvei S, Ganz J (1985) Oligodendroglioma: incidence and biological behaviour in a defined population. *J Neurosurg* 63:881-889
  
  79. Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A (2002) Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *Am J Pathol* 161:313-319
  
  80. Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, Asai A, Kirino T, Aburatani H (2002) Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene* 21:3961-3968

81. Nigro JM, Misra A, Zhang L, Smirnov I, Colman H, Griffin C, Ozburn N, Chen M, Pan E, Koul D, Yung WK, Feuerstein BG, Aldape KD (2005) Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res* 65:1678-1686
  
82. Nijjar TS, Simpson WJ, Gadalla T, McCartney M (1993) Oligodendroglioma. The Princess Margaret Hospital experience (1958-1984) *Cancer* 71:4002-4006
  
83. Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, Sasaki K (1998) Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21:340-346
  
84. NOA-4 (Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft)  
Sequentielle Radiochemotherapie oligoastrozytärer Tumoren des WHO-Grades III mit PCV oder Temozolomid  
Randomisierte Phase-III-Studie  
NOA-8 (Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft)  
Temodal vs. Radiatio bei Patienten mit GBM > 65 Jahre  
Prospektive, multizentrische, randomisierte Phase- III- Studie
  
85. Olson JD, Riedel E, DeAngelis LM (2000) Long-term outcome of low-grade oligodendroglioma and mixed glioma. *Neurology* 54:1442-1448
  
86. Pang JC, Dong Z, Zhang R, Liu Y, Zhou LF, Chan BW, Poon WS, Ng HK (2003) Mutation analysis of DMBT1 in glioblastoma, medulloblastoma and oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 105:76-81
  
87. Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:600-604
  
88. Peretti P, Brunel H, Barrié M, Chinot O (2004) Oligodendroglioma. *eMedicine*

89. Pohl U, Cairncross JG, Louis DN (1999) Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol* 9:639-643
90. Puduvalli VK, Hsahmi M, Mc Allister LD, Levin VA, Hess KR, Prados M, Jaeckle KA, Yung WK, Buys SS, Bruner JM, Townsend JJ, Davis R, Sawaya R, Kyritsis AP (2003) Anaplastic oligodendrogliomas: prognostic factors for tumour recurrence and survival. *Oncology* 65:259-266
91. Reedy DP, Bay JW, Hahn JF (1983) Role of radiation therapy in the treatment of cerebral oligodendroglioma: an analysis of 57 cases and a literature review. *Neurosurgery* 13:499-503
92. Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:111-126
93. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 145:1175-1190
94. Reifenberger J, Reifenberger G, Ichimura K, Schmidt EE, Wechsler W, Collins VP (1996) Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol* 149:29-35
95. Reifenberger G, Collins VP (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82:656-670
96. Rey JA, Pestaña A, Bello MJ (1992) Cytogenetics and molecular genetics of nervous system tumors. *Oncol Res* 4:321-331
97. Sanson M, Leuraud P, Aguirre-Cruz L, He J, Marie Y, Cartalat-Carel S, Mokhtari K, Duffau H, Delattre JY, Hoang-Xuan K (2002) Analysis of loss of chromosome 10q, DMBT1 homozygous deletions, and PTEN mutations in oligodendrogliomas. *J Neurosurg* 97:1397-1401

98. Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Johnk LB, Cutone AN, Cairncross JG, Louis DN (2002) Histopathological-molecular genetic correlations in referral pathologist-diagnosed low-grade "oligodendroglioma". *J Neuropathol Exp Neurol* 61:58-63
99. Scheie D, Andresen PA, Cvancarova M, Bo AS, Helseth E, Skullerud K, Beiske K (2006) Fluorescence in situ hybridization (FISH) on touch preparations: a reliable method for detecting loss of heterozygosity at 1p and 19q in oligodendroglial tumors. *Am J Surg Pathol* 30:828-837
100. Schröck E, Thiel G, Lozanova T, du Manoir S, Meffert MC, Jauch A, Speicher MR, Nürnberg P, Vogel S, Jänisch W, et al. (1994) Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* 144:1203-1218
101. Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Tazelaar HD, Davis DH (1992) Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. *J Neurosurg* 76:428-434
102. Shukla B, Agarwal S, Suri V, Pathak P, Sharma MC, Gupta D, Sharma BS, Suri A, Halder A, Sarkar C (2009) Assessment of 1p/19q status by fluorescence in situ hybridization assay: A comparative study in oligodendroglial, mixed oligoastrocytic and astrocytic tumors. *Neurol India* 57:559-566
103. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB (2000) Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 18:636-645
104. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 93:1246-1256

105. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Oppel F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T (2008) Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 62:564-576
106. Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, Cairncross JG (2006) Changing paradigms - an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist* 11:165-180
107. Sun ZM, Genka S, Shitara N, Akanuma A, Takakura K (1988) Factors possibly influencing the prognosis of oligodendroglioma. *Neurosurgery* 22:886-891
108. Tews B, Felsberg J, Hartmann C, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P (2006) Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer* 11:792-800
109. Thiel G, Lozanova T, Vogel S, Kintzel D, Janisch W, Witkowski R (1993) Age-related nonrandom chromosomal abnormalities in human low-grade astrocytomas. *Hum Genet* 91:547-550
110. Thompson PM, Gotoh T, Kok M, White PS, Brodeur GM (2003) CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene* 22:1002-1011
111. Tong CY, Zheng PP, Pang JC, Poon WS, Chang AR, Ng HK (2001) Identification of novel regions of allelic loss in ependymomas by high-resolution allelotyping with 384 microsatellite markers. *J Neurosurg* 95:9-14
112. Trojanowski T, Peszynski J, Turowski K, Markiewicz P, Goscinski I, Bielawski A, Bendarzewska B, Szymona J, Dabrowska A, Lopatkiewicz J, et al. (1989) Quality of survival of patients with brain gliomas treated with postoperative CCNU and radiation therapy. *J Neurosurg* 70:18-23

113. Uddin S, Jarmi T (2010) Glioblastoma Multiforme: Differential Diagnoses & Workup Apr 19, 2010.
114. van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Brandes AA, Menten J, Stupp R, Frenay M, Chinot O, Kros JM, van der Rijt CC, Vecht ChJ, Allgeier A, Gorlia T (2003) Phase II study of first-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglial tumors: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study 26971. *J Clin Oncol* 21:2525-2528
115. Van Meir EG (1998) Absence of p53 gene mutations in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a p53 functional assay. *Int J Cancer* 76:797-800
116. Von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR (1992) Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res* 52:4277-4279
117. Walker DG, Kaye AH (2001) Diagnosis and management of astrocytomas, oligodendrogliomas and mixed gliomas: a review. *Australas Radiol* 45:472-482
118. Wang H, Yang C, Leskow FC, Sun J, Canagarajah B, Hurley JH, Kazanietz MG (2006) Phospholipase Cgamma/ diacylglycerol- dependent activation of beta2-chimaerin restricts EGF- induced Rac signaling. *EMBO J* 25:2062-2074
119. Wayne JS, Willard HF (1987) Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes. *Nucleic Acids Res* 15:7549-7569
120. Webster HF, Lamperth L, Favilla JT, Lemke G, Tesin D, Manuelidis L (1987) Use of a biotinylated probe and in situ hybridization for light and electron microscopic localization of *P<sub>0</sub>* mRNA in myelin-forming Schwann cells. *Histochemistry* 86:441-444

121. Wechsler DS, Shelly CA, Petroff CA, Dang CV (1997) MXI1, a putative tumor suppressor gene, suppresses growth of human glioblastoma cells. *Cancer Res* 57:4905-4912
122. Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA (2003) Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. *Cancer Res* 63:1589-1595
123. Wemmert S, Ketter R, Rahnenfuhrer J, Beerenwinkel N, Strowitzki M, Feiden W, Hartmann C, Lengauer T, Stockhammer F, Zang KD, Meese E, Steudel WI, von Deimling A, Urbschat S (2005) Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. *Neoplasia* 7:883-893
124. Wemmert S, Romeike BF, Ketter R, Steudel WI, Zang KD, Urbschat S (2006) Intratumoral genetic heterogeneity in pilocytic astrocytomas revealed by CGH-analysis of microdissected tumor cells and FISH on tumor tissue sections. *Int J Oncol* 28:353-360
125. Westergaard L, Gjerris F, Klinken L (1997) Prognostic factors in oligodendrogliomas. *Acta Neurochir* 139:600-605
126. Whitton AC, Bloom HJ (1990) Low grade glioma of the cerebral hemispheres in adults: a retrospective analysis of 88 cases. *Int J Oncol Biol Phys* 18:783-786
127. Wiltshire RN, Rasheed BK, Friedman HS, Friedman AH, Bigner SH (2000) Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification. *Neuro Oncol* 2:164-173
128. Wolf RM, Draghi N, Liang X, Dai C, Uhrbom L, Eklöf C, Westermarck B, Holland EC, Resh MD (2003) p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3. *Genes Dev* 17:476-487

129. Wong AJ, Zoltick PW, Moscatello DK (1994) The molecular biology and molecular genetics of astrocytic neoplasms. *Semin Oncol* 21:139-148
130. Xu D, Makkinje A, Kyriakis JM (2005) Gene 33 is an endogenous inhibitor of epidermal growth factor (EGF) receptor signaling and mediates dexamethasone-induced suppression of EGF function. *J Biol Chem* 280:2924-29833
131. Yuan S, Miller DW, Barnett GH, Hahn JF, Williams BR (1995) Identification and characterization of human beta2- chimaerin: association with malignant transformation in astrocytoma. *Cancer Res* 55:3456-3461
132. Zainuddin N, Jaafar H, Isa MN, Abdullah JM (2005) Malignant glioma: the involvement of loss of allelic heterozygosity and PTEN mutations in a group of Malay patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36:748-756
133. Zhou YH, Hess KR, Liu L, Linskey ME, Yung WK (2005) Modeling prognosis for patients with malignant astrocytic gliomas: quantifying the expression of multiple genetic markers and clinical variables. *Neuro Oncol* 7:485-494

## 9 Publikationen

Im Folgenden sind Publikationen aufgelistet, die aus der vorliegenden Arbeit hervorgehen:

Abstract für die 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC):

Molekularzytogenetische Diagnostik – eine Methode zur Klassifizierung unterschiedlicher Gliom- Subtypen?

Is molecular cytogenetic diagnostic a solid tool to classify the several glioma subtypes?

Autoren:

Schmitt M., Ketter R., Wemmert S., Urbschat S., Steudel W. I. (Neurochirurgische Abteilung des Universitätsklinikums Homburg/Saar)

Posterpräsentation auf der 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC):

Molekularzytogenetische Diagnostik – eine Methode zur Klassifizierung unterschiedlicher Gliom- Subtypen?

Is molecular cytogenetic diagnostic a solid tool to classify the several glioma subtypes?

Autoren:

Schmitt M., Ketter R., Wemmert S., Urbschat S., Steudel W. I. (Neurochirurgische Abteilung des Universitätsklinikums Homburg/Saar)

## 10 Danksagung

Für die Unterstützung und Zusammenarbeit bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe,  
insbesondere bei  
Frau PD Dr. S. Urbchat, Frau Dr. S. Wemmert  
und bei  
Herrn PD Dr. R. Ketter.

Frau PD Dr. S. Urbchat und Frau Dr. S. Wemmert danke ich außerdem für zahlreiche  
Anregungen und Verbesserungsvorschläge.

Besonderen Dank möchte ich Frau U. Lindemann aussprechen, die mich nicht nur mit den  
Karyogrammen tatkräftig unterstützt hat, sondern auch durch Ratschläge, die weit über den  
fachlichen Hintergrund hinausgingen.

Ich danke meiner Familie und U. Welsch  
für die liebevolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Melanie Schmitt  
 Anschrift: Steinhübel 12  
 66424 Homburg/ Saar  
 Geburtsdatum: 19. 01. 1983  
 Geburtsort: St. Wendel  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Vater: Hermann- Josef Schmitt, Elektrotechniker  
 Mutter: Doris- Anna- Elisabeth Schmitt, geb. Backes,  
 Steuergehilfin  
 Geschwister: ein Bruder

### Schulische Ausbildung:

1989- 1993: Grund- und Hauptschule, Oberthal  
 1993- 2002: Katholische Privatschule Arnold- Janssen- Gymnasium,  
 St. Wendel  
 Leistungsfächer: Französisch, Englisch, Biologie  
 Abschlussnote: 1.4

### Medizinische Ausbildung:

August bis Oktober 2002: Krankenpflagedienst in Hinblick auf das Medizinstudium  
 Oktober 2002 bis Dezember 2008: Studium der Humanmedizin an der Universität des  
 Saarlandes, Homburg/ Saar  
 August 2007 bis Juli 2008: Praktisches Jahr  
 (1. Tertial: Wahlfach Neurochirurgie am  
 Universitätsklinikum Homburg/ Saar;  
 2. Tertial: Innere Medizin am Universitätsklinikum  
 Homburg/ Saar;  
 3. Tertial: Orthopädie und Viszeralchirurgie am Hôpital  
 de Martigny/ Centre hospitalier du Centre du Valais/  
 CHCVs; Schweiz)  
 11. Dezember 2008: Ärztliche Prüfung

22. Januar 2009:                      Approbation als Ärztin
- Seit 1. Februar 2009:               Assistenzärztin in der Klinik für Neurochirurgie/  
  Universitätsklinikum des Saarlandes,  
  Facharztweiterbildung
- Seit Januar 2010:                   Mitglied eines Forschungsprojektes des  
  Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF)

## **12 Anhang**

Im Folgenden sind in tabellarischer Form die Auswertungsergebnisse der Fluoreszenz- In Situ- Hybridisierungen angegeben (in absoluten Werten und als Prozentangaben).