

Tab af heterozygositet på kromosom 1 og kromosom 19 i primære hjernetumorer

Reservelæge Pernille Wolder Born, overlæge Helle Broholm & overlæge Henning Laursen

H:S Rigshospitalet, Neuropatologisk Laboratorium, Afsnit 6301

Resume

Introduktion: Histologisk klassifikation af hjernetumorer, herunder gliomer, kan være svær, og genetiske ændringer får stigende betydning for klassifikation og behandling. Oligodendrogliomer er ofte forbundet med tab af heterozygositet af den korte arm af kromosom 1 (LOH 1p) og af den lange arm af kromosom 19 (LOH 19q), hvilket har betydning for behandlingsvalg og prognose. Formålet med studiet var at undersøge forekomsten af kombineret tab af 1p og 19q (LOH 1p/19q) i gliomer.

Materiale og metoder: Ti oligodendrogliomer (fem WHO-grad II og fem WHO-grad III), ti blandede gliomer (fem WHO-grad II og fem WHO-grad III), ti astrocytomer (fem WHO-grad II og fem WHO-grad III) og 11 glioblastomer (WHO-grad IV) blev undersøgt. Hippocampusvæv fra personer uden kendt sygdom blev brugt som kontrol. Formalinfikseret paraffinindstøbt væv blev undersøgt med fluorescens in situ-hybridisering med fluorokrom mærkede dobbeltstrengede DNA-prober for henholdsvis 1p og 19q.

Resultater: Der blev påvist signifikant LOH 1p/19q i oligodendrogliomer end i øvrige gliomer og kontrolmateriale. I astrocytomer fandtes selektivt tab af 19q. I glioblastomer sås isoleret tab af 1p, men også polyploidi.

Konklusion: Undersøgelsens resultater bekræfter forøget forekomst af LOH 1p/19q i oligodendrogliomer. Resultaterne af andre undersøgelser viser store variationer i LOH 1p/19q. Dette kan skyldes inter- og intraobservatorvariabilitet i den histologiske klassificering. En anden faktor kan være metodeforskelle. De fleste undersøgelser er lavet på imprint. Der savnes en standard for de benyttede metoder, herunder antallet af celler, som bør undersøges, og hvor stor den tilfældige variation må være.

Gliomer udgør ca. 50% af de primære intrakraniale tumorer og klassificeres histologisk ifølge WHO's kriterier i grad I-IV gliomer. Jo højere WHO-grad, jo mere malign og des kortere overlevelsesetid [1]. Den nuværende behandling af gliomer består overvejende i resektion og strålebehandling. Strålebehandling er neurotoksisk hos langtidsoverlevende patienter, hvilket er et argument for at undlade strålebehandling hos patienter med lavgradsgliomer [2]. To tredjedele af oligodendrogliomerne er følsomme for kemoterapeutisk behandling med procarbazine, lomustine (CCNU) og vincristine (PCV-regimenet) [3], men der er ingen sikker histologisk, immunhistokemisk eller klinisk metode, der kan anvendes, når man ønsker at skelne mellem kemoterapifølsomme og kemoterapiresistente tumorer.

Flere genetiske ændringer er påvist i gliomer, og stor interesse har samlet sig om LOH 1p, LOH 19q, LOH 17p, LOH 10q og *Tp53*-mutationer [4-8]. I oligodendrogliomer er LOH 1p forbundet med favorabel respons på kemoterapi, og kombineret LOH 1p/19q er korreleret med længere overlevelse [3, 4, 9-12]. I glioblastomer er LOH 1p/19q påvist at korrelere med længere overlevelse hos en lille gruppe patienter, muligvis på grund af oligodendrogliakomponenten [13]. Det er uvist, om samme forhold gør sig gældende i oligoastrocytomer og i astrocytomer.

Oligodendrogliomer viser typisk tab af hele armen på både 1p og 19q, mens astrocytomer har en tendens til interstitielle deletioner, dvs. deletioner, der er mindre og ikke nødvendigvis indbefatter hele den telomere ende af kromosomarmen [5, 14-16]. Ved tab af hele den kromosomale arm og dermed også den telomere ende, er det muligt at påvise tabet med kommercielt fremstillede telomere dobbeltstrengede DNA-prober.

For at vurdere forekomsten af LOH 1p/19q i gliomer med henblik på bedre klassifikation og behandlingsvalg blev oligodendrogliomer, oligoastrogliomer, astrocytomer og glioblastomer undersøgt for LOH 1p/19q med fluorescens in situ-hybridisering (FISH) på formalinfikseret paraffinindstøbt tumurvæv med fluorokrommærkede dobbeltstrengede DNA-prober rettet mod henholdsvis 1p og 19q.

Materiale og metoder

Formalinfikseret paraffinindstøbt tumurvæv fra histologisk veldefinerede gliomer, undersøgt på Neuropatologisk Laboratorium, Rigshospitalet, i perioden 1997-2002, blev anvendt, og diagnoserne blev uafhængigt konfirmeret af to af forfatterne. Der blev inkluderet fem oligodendrogliomer, WHO-grad II (OII), fem anaplastiske oligodendrogliomer (AOIII), fem blandede oligoastrocytomer (OAI), fem anaplastiske blandede oligo-astrocytomer, WHO-grad III (AOAIII), fem astrocytomer WHO-grad II (AII), fem anaplastiske astrocytomer, WHO-grad III (AAIII) og 11 glioblastomer, WHO-grad IV (GBMIV). Hippocampus fra fem raske hjerner blev benyttet som kontrolmateriale, idet celletæthed og kernestørrelse i fascia dentata i nogen grad kan sammenlignes med forholdene i tumurvæv.

Hybridisering

Fire my tykke paraffinsnit blev skåret og farvet med hematoxylin-eosin, Klüver-Barrera og immunhistokemisk for GFA, CD57, Mib-1, MAP-2 med henblik på konfirmering af den histologiske diagnose i overensstemmelse med WHO's klas-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

sifikation [1]. Til FISH blev der skåret to my tykke snit. Til påvisning af LOH blev der benyttet kommercielt fremstillet telomerprober fra Vysis (1p:#40218; 19q:#38967). Proberne er dobbeltstrengede DNA-prober, hvor 1p-proben er mærket med spektrum green og 19q-proben med spektrum orange. Vævet blev forbehandlet med paraffin pretreatment kit II fra Vysis (#40724).

Proceduren var som følger:

- Afparaffinering: opvarmning til 56°C i 16 timer. Afparaffinering i xylen efterfulgt af ethanol 99% × 2.
- Forbehandling: 0,2 N HCL i 20 minutter, wash-buffer (#39791) i tre minutter, pretreatment-opløsning (#39788) 80°C i 30 minutter. Wash-buffer i fem minutter × 2.
- Proteasebehandling: protease (#39790) ved 37°C i 20 minutter. Wash-buffer i fem minutter × 2. Snittene dehydreredes i stigende koncentrationer af ethanol.
- Hybridisering: probemix blandedes som angivet af Vysis. Hybridiseringsbuffer (#38327). Vævet og probens DNA denatureredes simultant ved 85°C i tre minutter. Herefter foregik hybridiseringen ved 37°C i 16 timer i en HYBrite (Vysis).
- Posthybridiseringsvask: Overskydende probe blev fjernet med posthybridiseringsvaskebuffer (2X SSC/0,3% NP-40) ved stuetemperatur maksimum fem minutter efterfulgt af en vask ved 72°C i 2-5 minutter. Snittene lufttørredes.
- Visualisering: Alle cellerne i vævssnittene blev kernefarvet med DAPI II (4,6-diamidino-2-phenylindol).
- Trin 4 til 6 blev foretaget i »mørke«, og snittene blev mikroskopert samme dag.

Celletælling

FISH-analyserne blev foretaget på et Leica fluorescensmikroskop (Leica DMRXA) udstyret med et filter for spektrum

green, et for spektrum orange og et kombinationsfilter for begge. Herudover var der et filter for DAPI II. Fra 150 til 250 ikkeoverlappende hybridiserede tumorkerner blev klassificeret i hver enkelt tumor. Kerner, der var tomme med ødelagte eller uklare cellegrænser, blev ekskluderet. Cellekernerne blev allokert til ni kategorier efter kombinationen af prober: to orange og to grønne (2O2G), to orange og en grøn (2O1G), to orange (2O), en orange (1O), en orange og en grøn (1O1G), en grøn (1G), to grønne (2G), to grønne og en orange (2G1O) og andet. Kategorien andet dækker over celler, der indeholdt tre eller flere prober af samme farve.

Statistik

Fordelingen af cellekernerne i de forskellige tumorgrupper blev sammenlignet ved nonparametrisk variansanalyse (Kruskal-Wallis test). Af hensyn til den statistiske sikkerhed blev oligodendrogiale tumorer behandlet under et, blandede gliomer under et, astrogliale tumorer under et og glioblastomer under et. I de grupper, der signifikant afveg fra hinanden med Kruskal-Wallis test, blev der supplerende foretaget sammenligning mellem kontrolvævet og de enkelte tumorgrupper med Mann-Whitneys nonparametriske rang-sum-test. 5% blev valgt som signifikansniveau.

Resultater

Ved Kruskal-Wallis test var der signifikant forskel i grupperne 2O2G (p=0,012), 2O (p=0,022), 1O1G (p=0,011), 1G (p=0,030), 2G (p=0,009) og 2G1O (p=0,013) (Tabel 1).

Ved Mann-Whitneys test (Tabel 2) havde de oligodendrogiale tumorer signifikant færre celler med 2O2G (p=0,001) og 2G 1O (p=0,005) og signifikant flere celler med 1O (p=0,008), 1O1G (p=0,013), 1G (p=0,001) end kontrolgruppen. Både de astrogliale tumorer (p=0,028) og de blandede oligoastrogliale tumorer (p=0,008) havde signifikant færre celler med 2G1O

Tabel 1. Den procentvise fordeling af cellernes reaktion for 1p- og 19q-prober undersøgt ved fluorescerende in situ-hybridisering. 1p-proberne fremstår grønne i fluorescensmikroskopet, og 19q-proberne fremstår orange. Gruppen 2O2G indeholder således to eksemplarer af proben for 1p og to eksemplarer af proben for 19q. De efterfølgende grupper indeholder færre end to orange og to grønne prober. Gruppen andet indeholder flere end to orange eller to grønne prober, hvilket tages som udtryk for polyploid. Kontrolmaterialet består af væv fra normal hippocampus. O II-III er oligodendrogliomer, OA II-III er blandede oligoastrocytomer, gruppen A II-III er astrocytomer, og gruppen GBM IV er glioblastomer. Tallene er angivet som medianværdien og spændvidde. Der er benyttet Kruskal-Wallis nonparametriske variansanalyse. Statistisk signifikans: p < 0,05.

1p19q	2O2G	2O1G	2O	1O	1O1G	1G	2G	2G1O	Andet
Kontrol	37,4 29,5-39	13,4 8,8-15,8	2,3 1,6-8,8	3,1 1,5-4	15 11,5-17,5	4,1 2,7-7,9	4,6 1,1-6,3	22,1 14,8-25	1,5 0-2,3
O II-III	16,3 0-29,9	9,9 1,9-20,9	2,2 0-10,1	10,4 1,9-17,3	26,5 15-66,7	12,1 5,3-25,8	4,8 1-8,2	8,8 0,6-18,4	0,5 0-7,3
OA II-III	30,7 0-46,1	12,4 1,3-23,4	2,0 0-86	3,7 0-31,7	19,4 9-65,8	7,5 2,4-20	2,1 0-3,8	12,3 3,4-21,8	1,5 0-21,4
A II-III	28,5 5,8-46,4	11,8 5,2-17,2	5,3 0-13,9	6,0 2-12,3	12,4 5,3-45,2	5,2 1,3-23,2	6,1 2,6-7,2	12,9 5,8-21,3	2,1 0-30,7
GBM IV	28,3 10,7-43,5	14,8 6,7-26,9	4,9 2,1-9,3	4,3 2,3-8,3	13,3 7,4-31,5	6,4 2,8-10,1	5,4 2-10,5	14,6 5,5-23,8	4,5 0-13,6
p-værdi	0,012	0,527	0,022	0,056	0,011	0,030	0,009	0,013	0,09

VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

Tabel 2. Tabellen viser p-værdien for parvis sammenligning mellem de enkelte tumorgrupper og kontrolmaterialet. I de mørkegrå felter blev der påvist færre celler i tumorgrupperne end i kontrolmaterialet. I de lysegrå felter fandtes der flere celler i tumorgrupperne end i kontrolmaterialet. Kontrolmaterialet består af væv fra normal hippocampus. O II-III er oligodendrogliomer, OA II-III er blandede oligoastrocytomer, gruppen A II-III er astrocytomer, og gruppen GBM IV er glioblastomer. Der er benyttet Mann-Whitneys rang-sum-test. Statistisk signifikans: $p < 0,05$.

1p19q	2O2G	2O1G	2O	1O	1O1G	1G	2G	2G1O	Andet
O II-III	0,001	0,513	0,679	0,008	0,013	0,001	0,594	0,005	0,679
OA II-III	0,513	0,513	0,371	0,165	0,254	0,594	0,165	0,008	0,371
A II-III	0,254	0,768	0,371	0,594	0,859	0,206	0,129	0,028	0,859
GBM IV	0,038	0,441	0,090	0,038	1,00	0,180	0,583	0,052	0,027

end kontrolgruppen. Glioblastomerne (GBM IV) havde signifikant færre celler med 2O2G ($p=0,038$) og 2G1O ($p=0,052$); og de havde signifikant flere celler med 1O ($p=0,038$) og i kategorien andet ($p=0,027$) end kontrolgruppen.

Diskussion

Metoden

Formålet med arbejdet var at undersøge 1p/19q-tab i gliale tumorer ved FISH-teknik i paraffinsnit, så tumorens histologiske og cytologiske struktur var bevaret efter hybridisering. Ønsket var at vurdere den kromosomale status i forskellige områder af vævet og samtidig sikre, at det var tumorvæv, der blev vurderet. Der blev endvidere benyttet telomere prober for 1p og 19q på det samme vævssnit. Formålet med at bruge to telomere prober på samme snit var at vurdere, om tabet var kombineret i de enkelte celler.

Ulempen ved at arbejde med hele paraffinsnit er, at skæring af vævet medfører, at en del af kernerne skæres igennem, og en del celler som mangler den ene eller den anden probe kan have været udsat for et metodebetinget tab. Man kan alternativt benytte cellesuspensioner med oprensede celler, men herved ødelægges vævets arkitektur. Ydermere er probebindingen reversibel, så der altid vil være et vist antal celler uden bunden probe, selv om kromosomarmen er til stede.

I vores kontrolmateriale, som var normalt væv fra hippocampus, manglede mere end 60% af cellerne som minimum en af proberne. Trods dette kunne der påvises en signifikant forskel mellem kontrolmaterialet og tumorgrupperne.

Tumorerne

Oligodendrogliomer

I oligodendrogliomerne var der færre celler i grupperne 2O2G og 2G1O og flere cellerne i grupperne 1O, 1O1G og 1G. Sammenfattende må resultaterne betyde tab af både 1p og 19q, og i en stor del af cellerne er dette tab kombineret. Disse fund er i overensstemmelse med fundene i andre undersøgelser, hvor det er vist, at oligodendrogliomer er associeret med 1p/19q-tab [1, 6, 7, 17, 18]. Man har i undersøgelser påvist, at 50-80% af oligodendrogliomerne er associerede med tab af 19q, og i 40-92% af tumorerne er der fundet tab af 1p [1, 6]. Næsten alle tumorer, der har tab af 1p, har også tab af 19q [1, 6].

Hos patienter, hvis oligodendrogliomer har 1p/19q-tab, er der fundet en gennemsnitsoverlevelse på ca. ti år, mens patienter uden 1p/19q-tab havde en gennemsnitsoverlevelse på omkring to år [17]. Betydningen for overlevelsen af det kombinerede 1p/19q-tab er uafhængigt af WHO-tumorgraden [6].

Astrocytomer

For astrocytomerne fandtes et lavere antal celler i gruppen 2G1O, hvilket må fortolkes som et tab 19q. Derimod var der ingen forandringer i grupperne for den korte arm 1p.

Astrocytomer er karakteriseret ved et kontinuum af genetiske ændringer [1, 19, 20]. Blandt andet ses tab af 10q hos 60% og tab af 19q hos 40% af patienterne [1, 19, 20]. Det sidste er i overensstemmelse med vores fund. Progressionen til glioblastom tager gennemsnitligt syv år, men hvis tumoren har en oligodendrogliom komponent kan progressionstiden være længere [1]. I vores undersøgelse var der imidlertid ikke statistisk holddepunkt for tab af 1p i de tumorer, som histologisk var klassificeret som astrocytomer.

Blandede oligoastrocytomer

I de blandede gliomer fandt vi samme forhold som i astrocytomgruppen, dvs. tab af 19q og ingen ændringer i 1p. I litteraturen er der beskrevet forandringer i 1p og 19q i 30-50% af de blandede oligoastrocytomer [6]. 30% af tumorerne havde genetiske ændringer, der var forenelige med astrocytær oprindelse, dvs. Tp53-mutation og 17p-tab [1, 20]. Tab af 1p/19q er beskrevet både i den oligodendrogliale og i den astrocytære komponent, hvilket peger mod at oligoastrocytomer er klonale tumorer, der stammer fra en enkelt celletype [7, 8].

Glioblastomer

I glioblastomerne var der færre celler i 2O2G- og 2G1O-grupperne og flere celler i 1O-gruppen, hvilket indikerer tab af 1p. Samtidig fandtes der flere celler i gruppen andet, som indeholdt celler med mere end to kopier af hver probe. Øget anaplasigrad er karakteriseret ved bizarre mitoser og mangekernede celler, og forandringerne må derfor antages at skyldes polyploidi i tumorcellerne. Glioblastomer er enten primære, det vil sige opstået de novo, eller sekundære som følge

VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

af dedifferentiering af astrocytomer. De to former er kendetegnet ved forskellige genetiske ændringer [1]. I primære glioblastomer findes bl.a. amplifikation af *EGF*-receptoren og af *MDM2*. I sekundære glioblastomer ses *Tp53*-mutationer og overekspression af *PDGF-A*. Sekundære glioblastomer har ligesom astrocytomer tab af 19q, mens dette ikke ses i de novo-glioblastomer [1]. I denne undersøgelse har vi ikke skelnet mellem primære og sekundære glioblastomer.

Som nævnt har glioblastomerne et signifikant forøget antal celler med 10, og dermed tab af 1p. Det ville være interessant at holde dette fund op mod patienternes overlevelsestid for at se, om 1p-tab har samme prognostiske betydning for patienter med glioblastomer som for patienter med oligodendrogliomer.

Konklusion

Vi har påvist, at man med kommercielle telomere prober og FISH kan visualisere kromosomale ændringer af 1p og 19q i paraffinsnit fra gliale tumorer. Vi har i lighed med andre påvist LOH 1p/19q i oligodendrogliale, tab af 19q i astrocytomer og tab af 1p i glioblastomer. I andre undersøgelser er der vist mere favorable sygdomsforløb og behandlingseffekt af kemoterapi hos patienter med oligodendrogliomer med LOH 1p/19q, men sådanne data mangler for f.eks. glioblastomer. Vores undersøgelse åbner for en prospektiv undersøgelse, der involverer kliniske aspekter, såsom tumorens lokalisation, respons på kemoterapi og anden behandling samt postoperativ overlevelse, så sammenhæng mellem klinik og genetik kan belyses.

Gennemgangen af litteraturen har vist, at sammenligning med og fortolkning af andres resultater er vanskelig, da de benyttede metoder varierer meget, og især da der meget sjældent foreligger specifikke informationer for de analytiske/diagnostiske kriterier. Standardisering af metoderne og herunder validering med andre molekylærbiologiske teknikker er nødvendig, før undersøgelserne kan implementeres i rutinemæssig diagnostik og postoperative behandlingsstrategi.

Korrespondance: Henning Laursen, Afsnit 6301, Neuropatologisk Laboratorium, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: hlaursen@rh.dk

Antaget: 24. februar 2006
Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelse: Bioanalytiker Pia Vest takkes for et meget stort arbejde med præparering og farvning af de mange histologiske snit. Arbejdet er sponsoreret af Kræftens Bekæmpelse med et skolarstipendium til dengang stud.med. Pernille Wolder Born.

Litteratur

1. Kleihues P, Cavaneer WK, editors. WHO's classification of tumours, tumours of the nervous system. Lyon: IARC press, 2000:10-21.
2. Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. Clin Cancer Res 2000;7:839-45.
3. Wong AJ, Padarathsingh M, Louis DN et al. New approaches to the molecular biology, classification, and therapy of the nervous system tumors. Am J Pathol 2001;159:1971-74.
4. Jenkins RB, Curran W, Scott CB et al. Pilot evaluation of 1p and 19q in ana-

- plastic oligodendrogliomas collected by a national cooperative cancer treatment group. Am J Pathol 2001;24:506-8.
5. Smith JS, Tachibana I, Lee HK et al. Mapping of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. Genes Chromosom Cancer 2000;29:16-25.
6. Smith JS, Perry A, Borell TJ et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. J Clin Oncol 2000;18:636.
7. Bigner SH, Matthews MR, Wiltshire RN et al. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1999;155:375-86.
8. Smith JS, Alderete B, Minn Y et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. Oncogene 1999;18:4144-52.
9. Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification, a molecular reappraisal. Am J Pathol 2001;159:779-86.
10. Fallon KB, Cheryl A, Palmer MD et al. Prognostic value of 1p, 19q, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. J Neuropathol Exp Neurol 2004;63:314-22.
11. Ueki K. Oligodendroglioma: impact of molecular biology on its definition, diagnosis and management. Neuropath 2005;25:247-53.
12. McDonald JM, See SJ, Tremont IW et al. The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. Amer Canc Soc 2005. www.interscience.wiley.com/aug. 2005.
13. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N et al. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. J Neuropathol Exp Neurol 2002;61:321-8.
14. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. J Natl Cancer Inst 1998;267:2582-7.
15. Rosenberg JE, Lisle DK, Burwick JA et al. Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval. Oncogene 1996;13:2483-5.
16. Giannini C, Scheithauer BW, Weaver AL et al. Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. J Neuropathol Exp Neurol 2001;60:248-62.
17. Bello MJ, Vaquero J, Campos JMDC et al. Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. Int J Cancer 1994;57:172-5.
18. Burger PC, Minn Y, Smith JS et al. Losses of chromosomal arm 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. Mod Pathol 2001;14:842-53.
19. Okamoto Y, Di Patre P-L, Burkhard C et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. Acta Neuropathol 2004;108:49-56.
20. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol 2005;64:479-89.