

Barbara Rosa Schütz  
Dr. med.

## **Kartierung chromosomaler Imbalanzen bei primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) mit Hilfe der „Vergleichenden Genomischen Hybridisierung“**

Geboren am 25.11.1973 in New York

Reifeprüfung am 19.05.1992 in Heidelberg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis WS1998/99

Physikum am 29.08.1994 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg und London, Großbritannien (St. George's Hospital Medical School)

Praktisches Jahr in Heidelberg und Paris, Frankreich (Hôpital Necker, Enfants Malades)

Staatsexamen am 05.05.1999 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. P. Lichter

Bei den primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) handelt es sich um die häufigsten bösartigen Hirntumoren im Kindesalter. Nach der Lokalisation des Tumors lassen sich verschiedene Unterformen unterscheiden: der „klassische“ PNET ist das im Kleinhirn lokalisierte Medulloblastom, in selteneren Fällen kann der Tumor jedoch auch im Großhirn oder im Rückenmark lokalisiert sein, man spricht dann von supratentoriellen bzw. von spinalen PNETs. Die Tumoren treten meist im Kindesalter auf, der Altersgipfel liegt bei ca. 2-6 Jahren. Erwachsene werden nur selten betroffen. Trotz radikaler Tumorchirurgie und der Weiterentwicklung von Chemo- und Strahlentherapie ist die Prognose dieser Tumoren nach wie vor äußerst ungünstig und die Folgeschäden der Therapie sind meist hoch.

Über die Ätiologie dieser Tumoren ist bisher nur sehr wenig bekannt. Da die Bedeutung genetischer Veränderungen bei der Entstehung und Progression verschiedenster Tumoren nachgewiesen werden konnte, ist es durchaus denkbar, daß chromosomale Aberrationen auch bei der Genese der PNETs eine Rolle spielen. Zytogenetische Studien an diesen Tumoren sind jedoch relativ rar. Dies ist sicher zum Teil darauf zurückzuführen, daß es äußerst schwierig ist, aus solidem Tumormaterial für die Karyotypisierung geeignete Metaphasepräparate zu gewinnen. Mit Hilfe der in dieser Studie angewandten Methode der „Vergleichenden Genomischen Hybridisierung“ (engl.: „Comparative Genomic Hybridization“, CGH) kann dieses Problem umgangen werden. Im Gegensatz zu zytogenetischen Methoden, wie der G-Bänderung, und Interphase-zytogenetischen Methoden, wie der „klassischen“ Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), werden keine Chromosomen-Spreitungen aus Tumor-Zellen benötigt, sondern man verwendet gleichsam das gesamte Fluoreszenzfarbstoff-markierte Tumor-Genom als „Sonde“, die auf Metaphase-Spreitungen aus Lymphozyten gesunder Probanden hybridisiert wird. Verwendet man nun mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA aus normalen Zellen als Referenz, die mit der Tumor-DNA auf dieselbe Metaphase kohybridisiert wird, so kann man die Fluoreszenz-Intensitäten der beiden Fluorochrome mit Hilfe selektiver Filter unter dem Fluoreszenzmikroskop vergleichen und erhält so Aussagen über die statistische Verteilung der gebundenen DNA. Mittels eines speziellen

Bildanalyse-Softwareprogramms kann dann entlang jedes einzelnen Chromosoms ein Profil erstellt werden, welches den Quotienten aus den Intensitäten der beiden unterschiedlichen Fluorochrome darstellt, welche Tumor- bzw. Referenz-DNA repräsentieren. Man erhält so ein Profil, aus dem man Unter- und Überrepräsentationen im Tumor-Genom ablesen und der entsprechenden Chromosomen-Region zuordnen kann.

In der vorliegenden Studie wurden 18 PNETs mit Hilfe der CGH untersucht. In fünf Fällen wurde die CGH erfolgreich mit einer universellen Polymerasekettenreaktion, der sogenannten DOP-PCR kombiniert, die es ermöglicht, selbst kleinste Mengen DNA für die CGH-Analyse zu verwenden.

Mit Hilfe der CGH konnten in der vorliegenden Studie chromosomale Veränderungen in 15 der 18 untersuchten PNETs detektiert werden. Die häufigste Aberration betraf den Verlust chromosomalen Materials auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 in vier Fällen. In zwei dieser Fälle war er mit einem Gewinn genetischen Materials auf 17q vergesellschaftet. Dieser Befund ist kompatibel mit dem Vorhandensein eines Isochromosoms 17q, welches die bisher beim Medulloblastom am häufigsten beschriebene chromosomale Veränderung darstellt. Besonders interessant sind desweiteren die „high level“ Amplifikationen, die mittels CGH in drei der Fälle auf 8q24 und in einem Fall auf 2p24 lokalisiert werden konnten. 8q24 enthält das Proto-Onkogen MYC (c-myc), 2p24 das Proto-Onkogen MYCN (N-myc). In einem der Fälle mit Amplifikation auf 8q24 reichte das Tumormaterial aus, um eine Southern Blot Analyse anzuschließen, und es zeigte sich tatsächlich eine „high level“ Amplifikation des MYC-Gens. Weitere Imbalancen betrafen den Gewinn chromosomalen Materials auf den terminalen Anteilen von 4p, 5p, 5q, 7q und 9p in jeweils drei Fällen und auf dem terminalen Anteil von 9q in zwei Fällen. Die möglicherweise betroffenen Kandidatengene in diesen Regionen wurden diskutiert.

Der Vergleich der in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde mit Daten aus der Literatur zeigt das Chromosom 17 betreffend Übereinstimmung. „High level“ Amplifikationen der Regionen 2p24 und 8q24 waren jedoch deutlich häufiger als zuvor beschrieben.

Die vorliegende Studie lieferte Hinweise darauf, daß eine Amplifikation des MYC-Gens eine ungünstige Prognose der PNETs bedingt. Dies konnte in einer anschließenden Studie bestätigt werden. Die Notwendigkeit eines verlässlichen prognostischen Faktors, insbesondere für die kindlichen Hirntumoren, wurde diskutiert.

Es konnte gezeigt werden, daß sich die CGH als Screening-Methode für die Identifizierung chromosomaler Aberrationen bei primitiven neuroektodermalen Tumoren sehr gut eignet. Durch das Genom-weite Screening mittels CGH konnten Kandidatenregionen beschrieben werden, die dann mit Hilfe spezifischer molekulargenetischer Untersuchungen genauer unter die Lupe genommen werden können.