

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. M. Glatzel

Expression und Genamplifikation des Epidermal Growth Factor
Receptors (EGFR) in 171 Gliomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:
Till Christopher Kamradt
aus Duisburg

Hamburg
(2012)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.12.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. M. Glatzel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. C. Hagel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:



Meiner Familie, insbesondere meinem verstorbenem Großvater



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Tumorproben	5
2.2 Tissue-Microarray Technik (TMA)	5
2.3 Immunhistochemie (IHC)	7
2.4 Fluorescent-in-situ-hybridisation (FISH)	8
2.5 Technische Aspekte	11
3. Ergebnisse	13
3.1 Demographie	13
3.2.1 Immunhistochemie (clone 31G7, Zymed)	13
3.2.2 Immunhistochemie (EGFRpharmDX Kit, DAKO)	15
3.3 FISH (Abbott/Vysis)	17
3.4 Korrelation zwischen Immunhistochemie und FISH	18
3.4.1 Korrelation Zymed-Antikörper/FISH	18
3.4.2 Korrelation PharmDX-Antikörper/FISH	21
4. Diskussion	25
5. Zusammenfassung	31
6. Literatur	32
7. Anhang (Übersichtstabellen)	36
8. Danksagung	42
9. Lebenslauf	43
10. Eidesstattliche Erklärung	44

1. Einleitung

Der epidermal growth factor receptor (EGFR oder erbB1/HER1) ist ein membranständiger Rezeptor und neben den Mitgliedern HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4) ein Bestandteil der erbB-Familie, einer Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Nach Bindung der Liganden (u.a. EGF und TGF-alpha) kommt es durch Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren der erbB-Familie zu einer Signaltransduktion, die letztendlich zu Zellproliferation, Migration und Differenzierung führt [1].

Deswegen findet man eine Überexpression bzw. Mutation des EGFR in einer grossen Anzahl von Tumorentitäten, u.a. nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, kolorektale Karzinome und Pankreaskarzinome, wobei diese Dysregulation mit einer schnellen Krankheitsprogression und schlechten Überlebensraten korreliert ist [2].

Eine Tumorentität, bei der der Nachweis von EGFR eine grosse Rolle spielt, sind die Gliome.

Tumoren des zentralen Nervensystems werden aufgrund ihrer histologischen und zytologischen Merkmale eingeteilt. Gliome bilden eine Gruppe von niedrig- und hochgradigen Gehirntumoren, die von den Gliazellen abstammen. Noch nicht geklärt ist, ob sie von transformierten neuronalen Vorläuferzellen oder von dedifferenzierten adulten Zellen, z.B. Astrozyten oder Oligodendrozyten ausgehen [3, 4].

Astrozytome und Glioblastome machen 75% aller Gliome aus, Oligodendrogliome circa 10% und die seltener vorkommenden Ependymome circa 5%[5].

Nachdem eine große Anzahl von verschiedenen Einteilungen für einige Verwirrung gesorgt hatte, ist seit 1993 die vierstufige WHO-Klassifikation am weitesten verbreitet und angewendet. In dieser Klassifikation werden die wichtigsten histologischen Merkmale berücksichtigt, unter anderem die Zunahme der Zellzahl, die Zunahme der Mitoserate, das Auftreten von Endothelproliferaten und Nekrosen [6].

Die Astrozytome werden demnach in (pilozytische) Astrozytome vom WHO-Grad I, die typischerweise gutartig sind, Astrozytome vom WHO-Grad II, die erhöhte Zelldichte und diffuse Infiltration auffallen, (anaplastische) Astrozytome vom WHO-Grad III mit erhöhter Mitoserate und Astrozytome vom WHO-Grad IV (Glioblastome) mit dem Nachweis von Endothelproliferation und Tumornekrosen, eingeteilt.

Astrozytome I° und II° werden unter den Kategorien low-grade Astrozytome, Astrozytome III° und Glioblastome unter high-grade Astrozytomen zusammengefasst [6].

Die pilozytischen Astrozytome (I°) stellen eine Ausnahmegruppe unter den Gliomen dar, da sie zum einen meist bei Kindern und Jugendlichen unter 20 Jahren vorkommen (71%) und zum anderen eine relativ gute Heilungsquote haben. Sie wachsen langsam und sind oft gut begrenzt, befinden sich oft im Kleinhirn oder dem Nervus Opticus und haben eine 10-Jahresüberlebensrate bei unter 20-jährigen Patienten von 81%. Sie sind kurativ operierbar und unterliegen im Gegensatz zu diffusen Astrozytomen selten einer anaplastischen Progression.

Auch die diffusen Astrozytome (II°) wachsen langsam und sind gut differenziert, infiltrieren jedoch, wie der Name schon sagt, diffus das Gehirn, meistens die Hemisphären von jungen Erwachsenen zwischen 20 und 40 Jahren. Die Hauptkomplikation dieser Tumoren ist die hohe Inzidenz von anaplastischen Veränderungen, welche direkt im frühen Tumorwachstum oder nach 5 bis 10 Jahren auftreten können. Dementsprechend variiert auch die mediane Überlebenszeit der Patienten und die Prognose ist ungewiß.

Haben die diffusen Astrozytome den anaplastischen Wandel durchgemacht, werden sie als III° eingestuft. Die Patienten sind bei Erstmanifestation durchschnittlich etwas älter als Patienten mit diffusen Astrozytomen II°. Die mediane Überlebenszeit beträgt oft weniger als 3 Jahre, 50% der Patienten überleben nicht länger als 1 Jahr.

Der WHO-Grad IV ist für die Glioblastome reserviert, die häufigsten primären intrakraniellen Tumoren in der Neuroonkologie bei Erwachsenen. Sie sind rapide wachsende, anaplastische Astrozytome mit Nekrosearealen und mikrovaskulärer Proliferation. Sie machen 60% aller Astrozytome aus, sind zu 70% in den frontalen und temporalen Hirnlappen gelegen und haben einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 50 und 70 Lebensjahr. Die Therapie bei Neudiagnose besteht standardmäßig aus einer chirurgischen Resektion plus einer Nachbehandlung mit Temozolomid, einem ankylisierenden Zytostatikum oder aus einer Radiotherapie in Kombination mit Temozolomid. Die mittlere Überlebensrate mit diesen Regimen beträgt 15 Monate, die 2-Jahresüberlebensrate 26% [7].

Oligodendrogliome sind der WHO-Klassifikation nach diffus infiltrierende Tumoren die als Tumoren II° und III° (anaplastische Oligodendrogliome) eingeteilt werden.

Oligodendrogliome II° treten häufig bei jungen Patienten unter 40 Jahren auf, während die anaplastischen Oligodendrogliome typischerweise bei über 40-Jährigen gefunden werden [8]. Durch eine primäre Resektion, bei anaplastischen Oligodendrogliomen kombiniert mit einer Radiotherapie und Chemotherapie nach dem PCV-Regime (Procarbazin, Vincristin und CCNU) kann eine 5-Jahres-Überlebensrate von 23-66% erreicht werden [9]. Auf molekularpathologischer Ebene findet sich bei bis zu 90% ein kombinierter Verlust der Allele auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) und dem langen Arm von Chromosom 19 (19q) [9-11]. Obwohl die Überexpression von EGFR sowohl bei II° als auch III° Oligodendrogliomen regelmäßig, in bis zu 80% der Fälle nachgewiesen wird [12-20], findet man nur relativ selten eine EGFR-Amplifikation [13, 14, 21, 22].

Aufgrund der Vielzahl der durch den Rezeptor ausgelösten Signaltransduktionswege und der damit verbundenen Effekte war es naheliegend eine Therapie zu entwickeln, die seine Funktion und damit auch die nachgeschalteten Signalwege inhibiert. Bisher wurden mehrere Tyrosinkinase-Inhibitoren und EGFR-Antikörper entwickelt und sind bereits, teilweise mit guten Ergebnissen, in klinischem Einsatz [23, 24].

Kommt es bei Glioblastomen nach obengenannten Kombinationen aus chirurgischer Resektion und Chemotherapie bzw. Radiochemotherapie zu einer Progression der Erkrankung ist ein Ansprechen auf eine erneute Chemotherapie unwahrscheinlich, ein Ansprechen im Sinne einer verhinderten weiteren Progression findet sich nur in 8-26% der Fälle, das mediane Überleben nach Diagnose der Progression beträgt nur 6 Monate [25-27].

Daher besteht ein dringender Bedarf an alternativen Therapien. Der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib wird in seit 2005 bei EGFR-überexprimierenden Bronchialkarzinomen als Zweitlinientherapie und seit 2007 bei EGFR-überexprimierenden Pankreaskarzinomen in Kombination mit Gemcitabin angewandt und seine Wirkung bei neudiagnostizierten Glioblastomen bzw. Krankheitsprogression ist seit einiger Zeit Bestandteil intensiver Forschung. Obwohl eindeutige Überlebensvorteile und der Bezug zur Überexpression von EGFR noch nicht eindeutig geklärt werden konnte ist der EGFR weiterhin einer der hoffnungsvollsten Angriffspunkte in der Suche nach neuen Therapien [28, 29].

Vor einer spezifische Therapie muss jedoch der zuverlässige Nachweis des Zielobjektes stehen. Standardmäßig wird die Überexpression von EGFR mit

immunhistochemischen Methoden nachgewiesen, deren Genauigkeit und Suffizienz jedoch Gegenstand von Diskussionen ist, da sie erstens sehr leicht durch externe Einflüsse, z.B. Änderungen des Protokolls, der Expositionszeit, der Dauer der Lagerung der in Parafin eingebetteten Tumoren sowie durch Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität der verwendeten Antikörper beeinflusst werden und zweitens als semiquantitativer Nachweis definitionsgemäß eine Variable in Form der Einschätzung und Expertise des Beobachters vorliegt [30-33].

In den letzten Jahren sind daher molekularbiologische Methoden zum quantitativen Nachweis von Amplifikationen des auf dem kurzen Arm des Chromosom 7 gelegenen Gens, das für den EGFR kodiert, in den Vordergrund gerückt. Eine der verwendeten Methoden ist die Fluoreszenz-in-situ-hybridization, kurz FISH, durch die mittels einer fluoreszierenden DNA-Sonde gezielt einzelne DNA-Bereiche sichtbar gemacht werden können [34-36].

Bei einigen Tumorentitäten wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, das regelmäßig eine Überexpression des HER2/c-neu (ErbB-2), bei dem es sich wie oben beschrieben ebenfalls einen Tyrosinkinase-Rezeptor und ein Mitglied der erbB-Unterfamilie handelt, aufweist, ist der Nachweis der Genamplifikation dieses Rezeptors mittels FISH bereits fester Bestandteil der prätherapeutischen Diagnostik und in die Leitlinien aufgenommen. So wird hier im Falle eines nicht eindeutig negativen bzw. nicht eindeutig positiven Ergebnisses der Immunhistochemie die Untersuchung auf eine Genamplifikation gefordert. Wird diese nachgewiesen, erfolgt eine Therapie mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen HER2/c-neu [37].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob analog dazu auch bei Gliomen bei nur mäßig positiven Färbungen in der Immunhistochemie der Nachweis einer Amplifikation durch FISH erfolgen sollte.

Zu diesem Zweck wurde aus einer großen Anzahl von in Paraffin eingebetteten repräsentativen Proben ein sogenannter Tissue-Microarray, kurz TMA erstellt und anschließend eine immunhistochemische Färbung mit zwei kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen EGFR durchgeführt und die Ergebnisse miteinander und mit einer ebenfalls durchgeführten FISH verglichen.

Die sogenannte Tissue-Microarray Technik, bei der repräsentative Gewebezylinder aus Primärtumorblöcken entnommen und in Empfängerblöcke aus Paraffin eingesetzt werden, ist mittlerweile Standard für molekulare Untersuchungen an einer großen

Anzahl von Gewebeproben [38-40]. Die Herstellung von TMAs wurde im Institut für Pathologie in Basel als eine ressourcensparende Methode entwickelt, um hunderte von Gewebeproben gleichzeitig zu untersuchen. Neben der Kosten- und Zeitersparnis bietet diese Methode den großen Vorteil, dass alle Proben exakt derselben Vorbehandlung und Konzentration von Reagenzien unterzogen werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Tumorproben

Es wurden insgesamt 171 formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorproben in dieser Studie verwendet. Die Gliome wurden nach dem WHO Grading System wie folgt eingeteilt: 30 Astrozytome I°, 30 Astrozytome II°, 27 Astrozytome III°, 30 Glioblastome, 28 Oligodendrogliome II° und 27 Oligodendrogliome III°. Die Proben wurden nach den lokalen Ethikstandards der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, die mit der Deklaration von Helsinki kongruent sind, anonymisiert.

2.2 Tissue-Microarray Technik

Die Herstellung eines Tissue-Microarrays, kurz TMA, gab uns die Möglichkeit eine große Anzahl von Gewebeproben in kurzer Zeit Nachweisverfahren zu unterziehen. Bis zu 1000 Gewebeproben können in einen einzigen Paraffinblock eingebracht werden. Hierfür wurden die mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Schnitte der Tumoren von einem erfahrenem Neuropathologen mikroskopiert und das histologisch repräsentativste Gebiet markiert. Diese Markierung wurde auf den Tumorblock übertragen, eine Stanze mit Hilfe des Array-Stanzgerätes entnommen und in eine Paraffinblock eingebracht (Abbildung1).

Das Array-Stanzgerät hat einen schwenkbaren Arm, an dessen einem Ende ein 0,6 mm breiter Bohrer und ein an der Spitze geschärfter Hohlzylinder am anderen Ende angebracht sind. Ein spezieller TMA-Paraffinblock ("Peel-A-Way" Paraffin, Polysciences Inc., PA, USA), dessen Schmelztemperatur bei 55-58°C liegt, wurde eingespannt und mit dem 0,6 mm breiten Bohrer, der von einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wurde, wurden dünne Löcher im Abstand von 0,8 mm gefräst. Dann wurde mit dem Hohlzylinder, der an demselben Präzisionsgerät befestigt war und einen inneren Durchmesser von 0,6 mm hatte, eine Stanze aus dem markierten Bereich des Tumorblocks entnommen. Dank eines Stahldrahts im Inneren des Zylinders kann

die Stanze dann exakt in das vorher gefräste Loch eingeführt werden, wobei eine Stoppvorrichtung die konstante Länge der Stanzen und gefrästen Löcher sichert.

Der Block wurde in 2 Abschnitte (A/B) mit jeweils 10 Stanzen pro Reihe mit insgesamt 18 Reihen pro Abschnitt eingeteilt. Als Negativprobe und zur Orientierung wurden 3 Stanzen aus tumorfreiem Hirngewebe entnommen und oben links vor Abschnitt A eingebracht (Abbildung 2).

Anschließend wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 3 µm dünne Schnitte des TMA zur weiteren Analyse gewonnen.

Von jeder Tumorprobe wurden 2 Stanzen genommen um den Datenverlust bei dem Herauslösen von Proben während Probenaufbereitung, der in Einzelfällen unvermeidbar ist, als auch durch nicht auswertbare FISH-Resultate möglichst gering zu halten. Das bedeutet, dass jede Zeile jeweils Tumorproben von 5 Individuen enthielt, die Abschnitte wurden wie folgt eingeteilt: Abschnitt A Zeilen 1-6 Astrozytome I°, Zeilen 7-12 Astrozytome II°, Zeilen 13-18 Astrozytome III°; Abschnitt B Zeilen 1-6 Glioblastome, Zeilen 7-12 Oligodendrogliome II°, Zeilen 13-18 Oligodendrogliome III°.

Block A enthält 30 Astrozytome I°, 30 Astrozytome II° und 27 Astrozytome III°, Block B 29 Glioblastome, 28 Oligodendrogliome II° und 27 Oligodendrogliome III°.

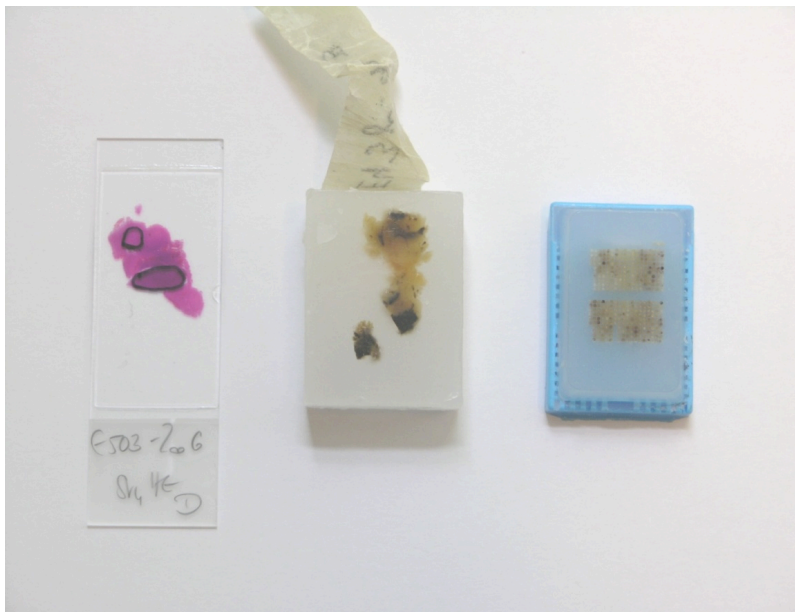


Abbildung 1. Schritte der TMA-Herstellung (von links nach rechts): Markierung des repräsentativsten Areals auf dem H&E gefärbtem Tumorschnitt, Übertragung der Markierung auf den in Parafin eingebetteten Tumorblock, fertiger TMA mit 0,6 mm Stanzen

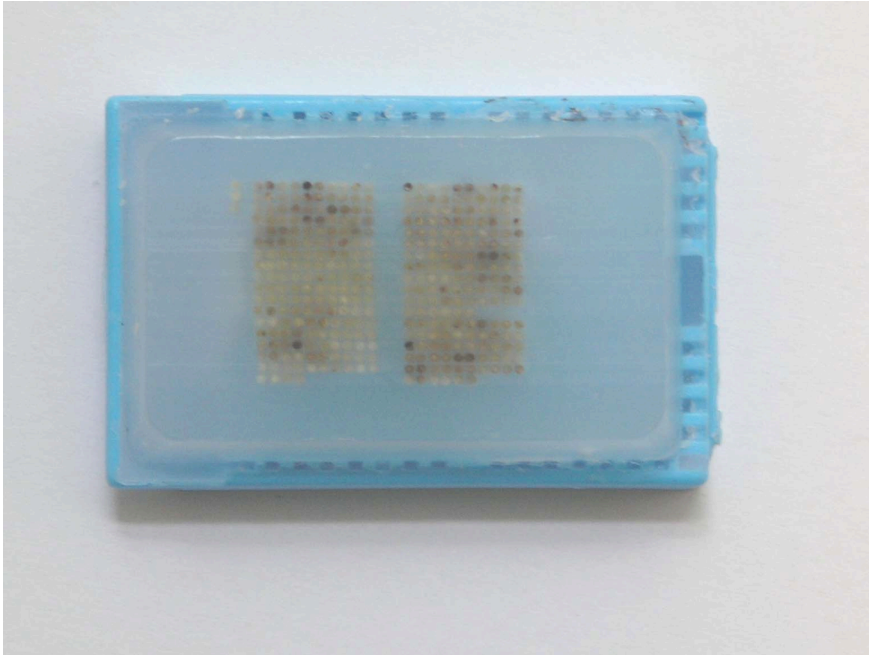


Abbildung 2. Kompletter TMA: links oben zu sehen die 3 Negativproben aus nicht tumorösem, gesundem Gewebe

2.3 Immunhistochemie

Zwei verschiedene monoklonale Antikörper, EGFRpharmDX Kit (in einer Verdünnung von 1:200, DAKO, Glostrup, Denmark) und clone 31G7 (in einer Verdünnung von 1:300, Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA), wurden zum Nachweis von EGFR-Protein verwendet.

Die TMA-Schnitte wurden zunächst 1 Stunde in Xylol deparaffiniert und danach in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest bei Raumtemperatur behandelt. Nach Anfertigung der Schnitte werden diese nach Mikrowellenbehandlung 5 min in TBS Pufferfertigmischung (DAKO, # S1968) eingeweicht. Es werden Objektträger in Shandon Coverplates (Thermo, # 7211013) eingesetzt und beides in die Shandon Coverplate Cassetten (Thermo, # 7331017) gegeben. Nun werden 100 µl 1. Antikörper hinzugegeben und über Nacht im Sequenza System (Thermo, #73310017) inkubiert, wobei die Antikörper in Blockierungslösung (1 Teil Ziegenserum (DAKO, # X 0907) + 9 Teile TBS (DAKO, # S1968)/Triton (Serva, # 37238) + 10 Teile Antibody Diluent Reagent Solution (Zymed, # 00.3218)) verdünnt werden. Anschließend wird das Sequenza System mit TBS (DAKO, # S1968) mit Hilfe einer Spritzflasche gespült. Nach 60 Minuten erfolgt die Inkubation mit unverdünntem Histofine Simple Stain Max PO (Nichirei Bioscience, # 414154 F). Erneute Spülung des Sequenza System mit TBS. Nun erfolgt die Färbung für 15 Minuten mit 100µl DAB-Reaktionslösung (Sigma, #

D5637) pro Objektträger. Dann werden die Objektträger aus den Coverplate Cassetten heraus genommen und in die Färbewiegen gestellt. Dann Wässern mit fließendem Wasser für 10 Minuten, bevor mit Mayers Haemalaun (Merck, # 1.09249.0500) für 20 Sekunden gefärbt wird. Dann Bläuen in Leitungswasser für 2 Minuten und Spülen in destilliertem Wasser. Nun aufsteigende Alkoholreihe Ethanol 50, 70, 96, 100% (Apotheke UKE). Abschließend Eindecken mit Eukitt (Kindler).

Für die Auswertung wurden nur membranöse EGFR-Anfärbungen berücksichtigt. Für jeden Tumor wurde die Zahl der positiven Zellen und die Intensität der Färbung (semiquantitativ entsprechend einem Score von 0 - 3+) geschätzt (Abbildung 3). Die Tumore wurden anschließend in folgende Kategorien eingeteilt: negativ (keine Färbung), stark positiv (100% - 50 % = 3+ oder 50% - 30% = 2+), schwachpositiv (1+, Immunfärbung vorhanden, aber ungenügend um die Kriterien für starke Positivität zu erreichen, also unter 30% der gesamten Zellen).

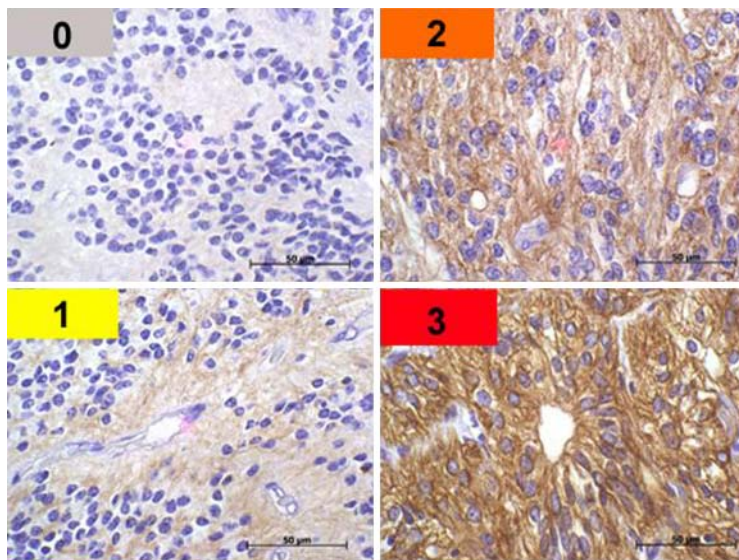


Abbildung 3. Beispiele der Färbungsintensitäten mit dem jeweiligen Score

2.4 FISH

Das Pretreatment, das für die formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten TMA-Schnitte durchgeführt wird, ist notwendig um zum Einen potentiell mit der Hybridisierung interferierende Proteine zu entfernen und zum Anderen um die Zellnuclei für die DNA-Sonden durchlässig zu machen.

Die TMA-Schnitte wurden vor der Hybridisation dem FISH pretreatment kit protocol (Abbott/Vysis, Downers Grove, IL, USA) entsprechend behandelt. Wir führten eine

zweifarbige FISH mit der Spectrum Orange-labeled EGFR Gensonde an 7p12 (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA). und einer Spectrum Green-labelled Zentromersonde (CEP7) for 7p11.1-q11.1 (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA) als Referenz aus. Die Hybridisation und die post-Hybridisationswaschungen erfolgten nach dem PathVysion Protocol. Die Schnitte wurden mit 10 µl 4',6-diamino-2-phenindole (DAPI) (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA) gegengefärbt.

Zur Vorbereitung wurden 250 mg Protease I* mit Protease Buffer 0,01 N HCL VP 2000* gelöst und in die Protease Buffer-Flasche gegeben. Das erste Wasserbad von GFL 1086 wurde auf 80 C vorgeheizt und eine Küvette mit 80 ml Pretreatment Reagent VP 2000 eingestellt. Das zweite Wasserbad von GFL wurde auf 37 C vorgeheizt und ins noch kalte Wasserbad eine Küvette mit 80 ml Protease-Lösung eingestellt. Die Heizplatte von Störk-Tronic/Präzitherm wurde auf 48°C vorgeheizt. Abbott Molecular, StatSpin und ThermoBrite wurden 5 Minuten auf 72 C erhitzt, dann über Nacht auf 37C vorgeheizt.

Am Tag 1 wurden die Paraffinschnitte auf Objektträger Superfrost plus bei 40°C über Nacht im Brutschrank gebacken, mit einem Diamantschreiber wurde das Areal markiert. Dann wurden die Schnitte 3 mal 10 Minuten in Xylol von J.T. Parker und 2 mal 5 Minuten in 96% Ethanol von Walter CMP GmbH&Co. KG entparaffiniert. Nachdem der Alkohol auf der Rückseite mit einem Tuch abgetupft wurde, wurden sie 3 Minuten auf der Heizplatte luftgetrocknet. Dann wurden die Schnitte 15 Minuten in das mit Pretreatment Reagent gefüllte und auf 80°C erhitzte erste Wasserbad gegeben. Anschließend wurden sie 2 Minuten mit 38,4°C warmen, demineralisierten Wasser gewaschen. Sie wurden dann in das zweite Wasserbad mit der Proteaselösung überführt und dort 150 Minuten angedaut, es erfolgte abermals eine Spülung mit Wasser für 2 Minuten, dann wurden für jeweils drei Minuten 70%, 80% und 96% Ethanol in die Küvette gegossen. Dann wurden die Schnitte wieder bei 48°C auf der Heizplatte luftgetrocknet, die Schnitte wurden dabei verschoben. Dann wurden 10 µl der DNA-Sonde* auf das Gewebe pipettiert, der Schnitt mit einem Deckgläschen eingedeckelt und mit Rubberzement versiegelt. Im Hybrite wurden die Schnitte dann bei 72°C für 5 Minuten denaturiert und danach bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am Tag 2 wurde ein Wasserbad mit Waschpuffer auf 72°C vorgeheizt und eine Küvette mit 2 mal SCC, 0,3% NP40, ph 7-7,5 gefüllt. Nachdem Kleber und Deckgläschen von den über Nacht inkubierten Schnitten vorsichtig entfernt wurden,

wurden die Schnitte bei Raumtemperatur in den Waschpuffer gestellt und gewartet bis das Wasserbad aufgeheizt ist.

Sie wurden dann 2 Minuten bei 72°C im Wasserbad belassen und anschließend kurz mit Wasser gewaschen. Dann erfolgte die Lufttrocknung im Dunkeln für mindestens 15 Minuten.

Während die DAPI auf Raumtemperatur vorgewärmt wird, werden die Schnitte an der Unterseite gesäubert. Dann werden 10 µl DAPI auf jeden Schnitt aufgetragen und ein Deckgläschen aufgesetzt.

Auswertung der FISH-Signale

Die Signalauswertung erfolgte ausschließlich manuell an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Firma Zeiss), das mit einem geeigneten Rot- und Grün-Multi-Bandpass-Filterset ausgestattet war.

Für jede Gewebeprobe auf den Tumorarrays wurde die Zahl der EGFR- und Centromer-7-Signale pro Tumorzellkern bei 1000-facher Vergrößerung (in Ölimmersion) geschätzt. Bei leichten Schwankungen der pro Zellkern sichtbaren Zentromere und Gen-Signale innerhalb einer Gewebeprobe wurde letztlich ein Wert für die größte Tumorzellpopulation (am häufigsten angetroffene Zentromer/Gensignal Kopiezahl-Konstellation) ermittelt. Dabei wurde für die Dokumentation folgende Schreibweise gewählt: Anzahl Signale für das EGFR-Gen/Anzahl Signale für Centromer-7, das heißt zum Beispiel für ein deutlich amplifiziertes Gliom einen Datensatz von >50/2. Für die nachfolgende Klassifizierung der Tumoren wurden sowohl die absolute Anzahl der EGFR-Kopiezahl als auch das Verhältnis (Ratio) von EGFR-Kopiezahl zur Zentromer-7-Kopiezahl herangezogen. Für die letztere Klassifikation der Tumoren entsprechend der relativen Genanzahl (Ratio) wurden 4 Kategorien definiert: Amplifikationen, Zugewinne, Polysomie und Normalbefunde. Wir gingen von einer EGFR-Amplifikation aus, wenn mindestens doppelt so viele EGFR-Signale als Zentromer-7-Signale vorlagen. Gewebeproben, die eine EGFR/Zentromer-7-Ratio von größer als 1,0 aber kleiner als 2,0 hatten, wurden als "EGFR-Zugewinn" bezeichnet. „Polysomie“ definierten wir als eine Signalauswertung, in der sowohl die EGFR- als auch die Zentromer-7-Signale gleichmäßig erhöht waren. Alle anderen Gewebeproben (EGFR/Zentromer-7-Ratio von $\leq 1,0$) betrachteten wir als normal.

Bei FISH-Untersuchungen an Gewebeschnitten können immer eine gewisse Menge von Zellen mit künstlich induzierten Deletionen oder Zugewinnen auftreten. Dies wird zum einen durch Zerschneiden von Tumorzellen verursacht (in Schnittpräparaten werden praktisch immer Tumorzellkerne oder zumindest Teile davon durch die Schnittführung "amputiert"), sodass nach dem Zufallsprinzip eines oder mehrere Zentromer- und/oder Gensignale fehlen können. Zum anderen können sich im Schnitt überlagernde Zellkerne irrtümlich als ein einziger Kern mit entsprechend falschem Zugewinn von Zentromer- und/oder Gensignalen interpretiert werden. Zudem kommt es bei ineffizienter Hybridisierung zu einer gewissen Menge von fehlenden Signalen (wobei dies häufiger zu künstlichen Deletionen als zu Zugewinnen führt). Im folgenden sind Beispielbilder für Normalbefunde, Amplifikationen und Polysomien der einzelnen Tumortypen aufgeführt (Abb. 4-6).

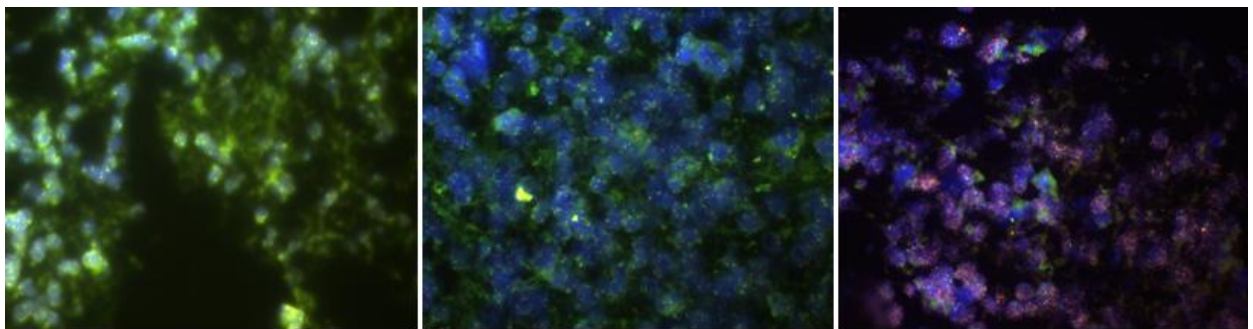


Abbildung 4 (von links nach rechts): Astrozytom I° nicht amplifiziert, Astrozytom III° polysom, Glioblastom hochgradig amplifiziert (Centromer-7 grün gefärbt, EGFR-Gen rot)

2.5 Technische Aspekte

Datenverlust

Wie unter Herstellung des TMA schon beschrieben kann es durch Schneiden mit dem Mikrotom zum Verlust von den jeweiligen Stanzenanteilen kommen, sogenannten "empty spots". Daher haben wir von jeder Tumorprobe zwei Stanzen auf dem TMA eingesetzt. Leider waren auf dem Schnitt mit der PharmDX-Antikörper-Färbung von 2 Tumorproben jeweils beide Stanzen nicht mehr vorhanden, nämlich A9/5-6 und A10/5-6, beides Astrozytome II°, womit sich die Anzahl der verwertbaren Astrozytome II° von 30 auf 28 verringerte.

Der Schnitt mit der Zymed-Antikörper-Färbung war erfreulicherweise vollständig.

Die FISH wurde zweimal durchgeführt um den Datenverlust durch sogenannte „empty spots“, im Rahmen der Vorbereitung und Durchführung der FISH verlorengegangene Stanzen, möglichst gering zu halten. In einem best-of-two Verfahren wurden jeweils die höchsten Werte gewählt.

Dennoch waren insgesamt von 13 Tumorproben jeweils beide Stanzen nicht vorhanden und bei einer Tumorprobe jeweils beide Stanzen nicht auswertbar, die Einzelheiten sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1 : Datenverlust bei FISH

	Astrozytome I°	Astrozytome II°	Astrozytome III°	Glioblastome	Oligodendrogliome II°	Oligodendrogliome III°
n=Tumorproben gesamt	30	30	27	29	28	27
n= Verlust beider spots	0	2	4	2	4	1
n= beide spots nicht verwertbar	0	0	0	0	1	0
n= verwertete Tumorproben	30	28	23	27	23	26

Anmerkung zur Berechnung der Ergebnisse

Die Ergebnisse und prozentualen Anteile für die beiden Antikörper und die FISH-Untersuchung wurden jeweils anhand der Gesamtzahl der auswertbaren Proben in dem Verfahren berechnet.

In die Korrelation der Ergebnisse wurden nur Tumorproben eingeschlossen, für die in allen Untersuchungen, d.h. in beiden immunhistochemischen Darstellungen und in der FISH, mindestens ein Ergebnis gewonnen werden konnte. Falls in einer der drei Untersuchungen eine Tumorprobe durch Verlust beider spots nicht auswertbar war, wurden dementsprechend auch die Proben desselben Tumors aus den anderen beiden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Dadurch divergieren die Gesamtzahlen in den einzelnen Untersuchungen und in der Korrelation der Ergebnisse.

3. Ergebnisse

3.1 Demographie

Im folgenden die demographische Verteilung für die einzelnen Tumorentitäten:

Astrozytome I°: n=30, medianes Alter 13,5 J., Altersdurchschnitt 14,6 J., m:w 14:16

Astrozytome II°: n=30, medianes Alter 40 J., Altersdurchschnitt 41,6 J., m:w 21:9

Astrozytome III°: n=27, medianes Alter 44,5 J., Altersdurchschnitt 43 J., m:w 19:8

Glioblastome: n=29, medianes Alter 63 J., Altersdurchschnitt 61,3 J., m:w 15:14

Oligodendrogliome II°: n=28, medianes Alter 42,5 J., Altersdurchschnitt 41,3 J., m:w 14:14

Oligodendrogliome III°: n=27, medianes Alter 47 J., Altersdurchschnitt 45,3 J., m:w 14:13

3.2.1 Immunhistochemie (clone 31G7, Zymed)

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der EGFR-Detektion bei Zymed-Antikörper

Tumortyp	EGFR-Expression/IHC-Score				Gewebeproben n=total
	negativ	positiv			
	0	1+	2+	3+	
Astrozytome I°	30 (100%)	0	0	0	30
Astrozytome II°	15 (55,6%)	11 (40,7%)	1 (3,7%)	0	27
Astrozytome III°	9 (40,1%)	7 (31,8%)	3 (13,6%)	3 (13,6%)	22
Glioblastome	6 (22,2%)	4 (14,8%)	5 (18,5%)	12 (44,4%)	27
Oligodendrogliome II°	0	5 (22,7%)	11 (50%)	6 (27,3%)	22
Oligodendrogliome III°	6 (24%)	4 (16%)	5 (20%)	10 (40%)	25

Es wurden insgesamt 153 Tumorproben untersucht. Die als Negativproben eingebrachten Stenzen aus tumorfreiem Hirngewebe wurden alle als negativ (0) bewertet. In der immunhistochemischen Untersuchung mit dem Zymed-Antikörper zeigten sich alle Astrozytome I° negativ für eine EGFR-Überexpression (0% positive (0 positive Tumoren von 30 (0/30)). Auch der Großteil (96,3%, 26/27) der Astrozytome II° zeigten ein negatives Ergebnis. Bei den Astrozytomen III° war ebenfalls noch ein Großteil (71,9%,16/22)) negativ, wohingegen bei den Glioblastomen 62,9% (17/27) eine EGFR-Überexpression zeigten. Sowohl bei den

Oligodendrogliomen II° (77,3%, (17/22)), als auch bei den Oligodendrogliomen III° (60%, (15/25)) fand sich in der Mehrheit ein positives Ergebnis (Tabelle 2 und 3).

Im folgenden die Ergebnisse der Färbeskala:

Tabelle 3: EGFR-Expression detektiert mit Zymed-Antikörper

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Astrozytome I°
2	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	Astrozytome I°
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Astrozytome I°
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Astrozytome I°
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	Astrozytome I°
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Astrozytome I°
7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	Astrozytome II°
8	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	Astrozytome II°
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	Astrozytome II°
10	0	0	0	1	-	0	1	1	1	1	Astrozytome II°
11	0	1	0	0	1	1	2	1	1	1	Astrozytome II°
12	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	Astrozytome II°
13	0	0	0	1	2	3	1	1	0	0	Astrozytome III°
14	0	1	1	1	2	2	2	1	3	3	Astrozytome III°
15	0	1	1	2	3	3	3	3	1	1	Astrozytome III°
16	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	Astrozytome III°
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Astrozytome III°
18	1	-	0	0							Astrozytome III°
1	-	2	0	0	2	3	2	2	3	3	Glioblastome
2	3	3	3	3	-	3	0	1	3	3	Glioblastome
3	0	0	1	3	3	3	2	-	2	3	Glioblastome
4	1	0	0	0	1	1	3	3	2	2	Glioblastome
5	3	3	3	-	3	3	0	0	3	1	Glioblastome
6	-	1	0	0	2	2	0	0	3	3	Glioblastome
7	1	1	0	1	1	1	2	3	1	1	Oligodendrogliome II°
8	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	Oligodendrogliome II°
9	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	Oligodendrogliome II°
10	1	0	2	2	2	2	3	3	1	0	Oligodendrogliome II°
11	1	1	1	1	2	2	2	1	2	3	Oligodendrogliome II°
12	3	3	2	1	1	1					Oligodendrogliome II°
13	3	2	3	3	2	2	2	3	1	1	Oligodendrogliome III°
14	1	1	3	1	1	1	2	2	0	0	Oligodendrogliome III°
15	3	3	3	3	0	0	1	1	2	2	Oligodendrogliome III°
16	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	Oligodendrogliome III°
17	0	0	0	1	2	2	3	3	2	-	Oligodendrogliome III°
18	0	0	-	0	-	0					Oligodendrogliome III°

3.2.2 Immunhistochemie (EGFRpharmDx Kit, DAKO)

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der EGFR-Detektion mit PharmDX-Antikörper

Tumortyp	EGFR-Expression/IHC-Score		negativ		positiv		Gewebeproben n=total
	0	1+	2+	3+			
Astrozytome I°	15 (50%)	1 (3,3%)	7 (23,3%)	7 (23,3%)	30		
Astrozytome II°	2 (8%)	4 (16%)	4 (16%)	15 (60%)	25		
Astrozytome III°	1 (4,5%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)	16 (72,7%)	22		
Glioblastome	1 (3,7%)	2 (7,4%)	3 (11,1%)	21 (77,7%)	27		
Oligodendrogliome II°	0	0	3 (13,6%)	19 (86,3%)	22		
Oligodendrogliome III°	2 (8%)	1 (4%)	3 (12%)	19 (76%)	25		

Es wurden insgesamt 151 Gliome untersucht (bei 2 Gewebeproben Verlust beider Spots). Die als Negativproben eingebrachten Stenzen aus tumorfreiem Hirngewebe wurden alle als negativ (0) bewertet. Der PharmDX-Antikörper zeigte in der Detektion einer EGFR-Überexpression knapp die Hälfte (46,6%) der Astrozytome I° positiv. Alle anderen Tumortypen wurden mehrheitlich als positiv bewertet, Astrozytome II° mit 76%, Astrozytome III° mit 86,3%, Glioblastome mit 88,8%, Oligodendrogliome II° mit 100% und Oligodendrogliome III° mit 88% (Tab. 4 und 5).

Im folgenden die Ergebnisse der Färbeskala:

Tabelle 5 : EGFR-Detektion mit Pharm-DX-Antikörper

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	2	2	3	3	1	0	0	0	3	3	Astrozytome I°
2	0	-	3	2	0	0	0	0	3	3	Astrozytome I°
3	3	3	0	0	0	0	2	0	0	0	Astrozytome I°
4	2	2	3	1	2	1	0	0	1	2	Astrozytome I°
5	0	0	2	0	0	0	3	3	-	0	Astrozytome I°
6	2	-	0	0	0	0	-	0	0	0	Astrozytome I°
7	3	3	1	1	2	2	3	3	1	0	Astrozytome II°
8	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	Astrozytome II°
9	3	3	2	2	-	-	2	3	3	3	Astrozytome II°
10	1	1	3	3	-	-	2	2	1	1	Astrozytome II°
11	3	2	1	2	3	2	3	3	2	2	Astrozytome II°
12	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Astrozytome II°
13	0	0	1	2	3	-	2	2	1	1	Astrozytome III°
14	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Astrozytome III°
15	3	1	2	1	3	3	3	3	3	3	Astrozytome III°
16	3	3	1	1	3	3	3	3	1	1	Astrozytome III°
17	3	3	0	0	2	3	3	3	3	3	Astrozytome III°
18	3	-	3	3							Astrozytome III°
1	-	3	2	2	3	3	3	3	3	3	Glioblastome
2	3	3	3	3	-	3	1	1	3	3	Glioblastome
3	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3	Glioblastome
4	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	Glioblastome
5	1	1	3	3	3	3	2	3	3	3	Glioblastome
6	3	3	2	2	3	3	2	3	3	3	Glioblastome
7	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	Oligodendrogliome II°
8	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Oligodendrogliome II°
9	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	Oligodendrogliome II°
10	3	1	3	3	3	3	3	3	2	2	Oligodendrogliome II°
11	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	Oligodendrogliome II°
12	3	3	3	3	3	3					Oligodendrogliome II°
13	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	Oligodendrogliome III°
14	3	3	3	3	2	2	3	3	0	0	Oligodendrogliome III°
15	-	3	3	3	0	0	3	3	3	3	Oligodendrogliome III°
16	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	Oligodendrogliome III°
17	2	1	3	3	3	3	1	1	2	-	Oligodendrogliome III°
18	3	3	3	3	3	3					Oligodendrogliome III°

3.3 FISH

Tabelle 6: FISH-Ergebnisse mit prozentualer Verteilung des EGFR-Status

Tumortyp	EGFR-Status			Proben n=total	
	normal	Polysomie	Zugewinn		Amplifikation
Astrozytom I°	22 (73,3%)	8 (26,7%)	0	0	30
Astrozytom II°	11 (39,3%)	15 (53,6%)	1 (3,6%)	1 (3,6%)	28
Astrozytom III°	5 (21,7%)	15 (65,2%)	1 (4,3%)	2 (8,7%)	23
Glioblastom	6 (22,2%)	6 (22,2%)	0	15 (55,6%)	27
Oligodendrogliome II°	13 (56,5%)	9 (39,1%)	0	1 (4,3%)	23
Oligodendrogliome III°	14 (53,8%)	10 (38,5%)	0	2 (7,7%)	26

Wie bereits unter 2.5 angegeben, konnten insgesamt 14 Tumorproben des FISH-Schnittes durch Verlust während Aufarbeitung oder aus anderen Gründen nicht untersucht werden. Damit wurden 157 Gliome in die Bewertung mit aufgenommen, 30 Astrozytome I°, 28 Astrozytome II°, 23 Astrozytome III°, 27 Glioblastome, 23 Oligodendrogliome II° und 26 Oligodendrogliome III°.

Die als Negativproben eingebrachten Stenzen aus tumorfreiem Hirngewebe zeigten alle einen Normalbefund (2/2).

Wie in Tabelle 6 aufgeführt fanden wir bei Astrozytomen I° keine einzige EGFR-Amplifikation, in 26,7% (8/30) jedoch eine Polysomie, die übrigen 73,3% (22/30) zeigten Normalbefunde.

Bei den Astrozytomen II° lag in 42,9% (12/28) ein Normalbefund, in 50% (14/28) eine Polysomie vor. Jeweils eine Gewebeprobe zeigte einen Zugewinn und eine Amplifikation (3,6%, (1/28)).

Nur wenig mehr erhöhte EGFR-Vermehrungen fanden sich bei den Astrozytomen III°, die in 4,34% (1/23) der Fälle einen Zugewinn und in 8,69% (2/23) eine Amplifikation zeigten. 21,73% (5/23) zeigten einen Normalbefund, 65,21% (15/23) eine Polysomie.

Bei den Glioblastomen zeigten jeweils 22,2% (6/27) einen Normalbefund bzw. eine Polysomie, amplifiziert waren 55,6% (15/27) der Fälle.

Ein Normalbefund fand sich in einem Großteil der Oligodendrogliome II° (56,52%, 13/23), 39,13% (9/23) zeigten eine Polysomie, es fand sich eine Amplifikation (4,34%, 1/23).

Annähernd genauso viele Normalbefunde (53,84%, 14/26) und Polysomien (38,46%, 10/26) fanden sich bei den Oligodendrogliomen III°, bei denen sich in 7,69% (2/26) eine Amplifikation nachweisen ließ.

3.4 Korrelation zwischen Zymed-AK/FISH und PharmDX-AK/FISH

3.4.1 Korrelation Zymed-AK/FISH

Die Ergebnisse zur Korrelation, Sensitivität und Spezifität sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst. Für die einzelnen Tumorentitäten fanden wir:

Astrozytome I°

Alle Proben wurden als negativ (0) bewertet, inklusive der acht Tumoren mit Polysomie.

Astrozytome II°

90,9% der nicht-amplifizierten Proben wurden als negativ bewertet (54,5% mit 0, 36,4% mit 1+), eine positiv mit 2+ (Nr. 54). Alle acht polysomen Tumore wurden negativ gewertet, in 53,3% der Fälle mit 0 und in 46,6% der Fälle mit 1+.

Eine Amplifikation (Nr.56) mit einer Ratio von 2.0 wurde mit einem Score von 0 bewertet, ein Zugewinn (Nr.34) mit 1+.

Astrozytome III°

Von den fünf nicht-amplifizierten Proben wurden 80% negativ bewertet, jeweils zwei mit 0 bzw. mit 1+, eine Probe wurde mit 2+ bewertet (Nr.69). Von den 15 Proben mit Polysomie wurden 80% negativ, 46,6% mit 0 und 33,3% mit 1+, 20% (Nr. 63,70,72) wurden positiv bewertet, davon zwei mit 3+ (Nr. 63,70). Ein Zugewinn (Nr. 68) wurde mit 2+ positiv, von den zwei amplifizierten Proben wurde eine (Nr.74) positiv mit 3+ und eine negativ mit 1+ (Nr. 86, Ratio >15.0) bewertet.

Glioblastome

Vier der sechs nichtamplifizierte Proben wurden negativ, jeweils zwei mit 0 und 1+, zwei mit 2+ positiv bewertet (Nr. 88, 114). Von den sechs Proben mit Polysomie wurden 50% mit 0 und 50% (Nr. 99, 111, 116) mit 3+ bewertet.

Drei Amplifikationen wurden negativ bewertet, eine mit einem Score von 0 (Nr. 98, Ratio 4.0), zwei mit einem Score von 1+ (Nr. 102, Ratio 15.0 und Nr.104, Ratio 5.0).

Oligodendrogliome II°

Die einzige amplifizierte Tumorprobe wurde mit 1+ negativ bewertet (Nr. 136, Ratio 2.5). 69,1% der nichtamplifizierten Proben wurden positiv bewertet, drei (27,3%) mit 3+.

Alle neun Tumorproben mit Polysomie wurden positiv bewertet, 55,6% mit 2+ und 44,4% mit 3+.

Oligodendrogliome III°

Beide amplifizierten Proben wurden positiv bewertet, Nr. 156 mit einer Ratio von >25.0 mit 3+ und Nr. 159 mit einer Ratio von 2.0 mit 2+. Von den 14 nichtamplifizierten Tumorproben wurden 57% positiv bewertet, sechs (42,8%) mit 3+. Die 10 polysomen Tumorproben wurden zu jeweils 50% negativ bzw. positiv bewertet, 40% mit 0 und 30% mit einem Score von 3+.

Tabelle 7: Korrelation zwischen Zymed-AK (IHC) und FISH

	EGFR-Amplifikation	EGFR-Protein-Expression				
		0	1+	2+	3+	Total
Astrozytome I°	keine	22 (100%)	0	0	0	22 (73,3%)
n=30	gain	0	0	0	0	0
	Amplifikation	0	0	0	0	0
	Polysomie	8 (100%)	0	0	0	8 (26,7%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	30 (100%)	0	0	0	30/30 (100%)
Astrozytome II°	keine	6 (54,54%)	4 (36,36%)	1 (9,09%)	0	11 (39,28%)
n=28	gain	0	1 (100%)	0	0	1 (3,57%)
	Amplifikation	1 (100%)	0	0	0	1 (3,57%)
	Polysomie	8 (53,33%)	7 (46,66%)	0	0	15 (53,57%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	14 (53,84%)	11 (42,30%)	1 (3,84%)	0	26/28 (92,85%)
Astrozytome III°	keine	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	0	5 (21,73%)
n=23	gain	0	0	1 (100%)	0	1 (4,34%)
	Amplifikation	0	1 (50%)	0	1 (50%)	2 (8,69%)
	Polysomie	7 (46,66%)	5 (33,3%)	1 (6,66%)	2 (13,33%)	15 (60,86%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	9 (45%)	7 (35%)	2 (10%)	2 (10%)	20/23 (86,95%)
Glioblastome	keine	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3)	0	6 (22,2%)
n=27	gain					0 (0%)
	Amplifikation	1 (6,7%)	2 (13,3%)	3 (20%)	9 (60%)	15 (55,6%)
	Polysomie	3 (50%)	0	0	3 (50%)	6 (22,2%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	5 (41,7%)	2 (16,6%)	2 (16,6%)	3 (25%)	12/27 (44,44%)
Oligodendro-gliome II°	keine	0	4 (30,76%)	6 (46,15%)	3 (23,07%)	13 (56,52%)
n=23	gain	0	0	0	0	0 (0%)
	Amplifikation	0	1 (100%)	0	0	1 (4,34%)
	Polysomie	0	0	5 (55,55%)	4 (44,44%)	9 (39,1%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	0	4 (18,18%)	11 (50%)	7 (31,81%)	22/23 (95,65%)
Oligodendro-gliome III°	keine	2 (14,28%)	4 (28,57%)	2 (14,28%)	6 (42,85%)	14 (52%)
n=26	gain	0	0	0	0	0 (0%)
	Amplifikation	0	0	1 (50%)	1 (50%)	2 (7,69%)
	Polysomie	4 (40%)	1 (10%)	2 (20%)	3 (30%)	10 (38,46%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	6 (25%)	5 (20,83%)	4 (16,66%)	9 (37,5%)	24/26 (92,3%)

Tabelle 8: Sensitivität/Spezifität des Zymed-Antikörpers für EGFR-Amplifikationen

Sensitivität	richtig-positiv	richtig-negativ	Ratio der Amplifikation	falsch-negativ Score 0	falsch-negativ Score 1+	Pharm-DX ebenfalls falsch-negativ	Sensitivität %
Astrozytome I°							
Astrozytome II°	0	1	2.0	1		0	0
Astrozytome III°	1	1	>15.0		1	0	50
Glioblastome	12	3	4.0, 5.0, 15.0	1	2	1	80
Oligodendrogliome II°	0	1	2.5		1	0	0
Oligodendrogliome III°	2	0					100
Spezifität	richtig-negativ	falsch-positiv		falsch-positiv 2+	falsch-positiv 3+	Pharm-DX ebenfalls falsch-positiv	Spezifität %
Astrozytome I°	30						100
Astrozytome II°	25	1		1		1	96,2
Astrozytome III°	16	4		2	2	4	80
Glioblastome	7	5		2	3	5	58,3
Oligodendrogliome II°	4	18		11	7	18	18,2
Oligodendrogliome III°	11	13		4	9	12	45,8

3.4.2 Korrelation PharmDX-AK/FISH

Die Ergebnisse zur Korrelation, Sensitivität und Spezifität sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengefasst. Für die einzelnen Tumorentitäten fanden wir:

Astrozytome I°

59,1% der 22 nichtamplifizierten Proben wurden positiv bewertet, sechs (27,3%) mit 3+. Von den 8 Proben mit Polysomie wurden 87,5% mit 0 negativ bewertet, eine Probe (Nr.10) mit 3+ (Tabellen 9 und 10).

Astrozytome II°

Von den 11 nichtamplifizierten Proben wurden 81,8% als positiv bewertet, sieben (66,3%) mit 3+. Die einzige amplifizierte Probe wurde mit 3+ bewertet (Nr. 56, Ratio 2.0). Von den 13 Proben mit Polysomie wurden 69,2% positiv bewertet, sechs (46,2%) mit 3+ (Tabellen 9 und 10).

Astrozytome III°

80% der 5 nichtamplifizierten Proben wurden mit 3+ positiv bewertet, eine Probe mit 1+ negativ. Die Probe mit Zugewinn (Nr. 68) und die beiden Proben mit Amplifikation (Nr. 74, 86) wurden jeweils mit 3+ positiv bewertet. Von den 13 Proben mit Polysomie wurden 86,6% positiv bewertet, 66,6% mit 3+ (Tabellen 9 und 10).

Glioblastome

83,3% der sechs nichtamplifizierten Glioblastome wurden mit 3+ positiv bewertet, eines mit 1+. Von den 15 amplifizierten Proben wurden 86,6% mit 3+ positiv, zwei negativ mit 1+ (Nr. 107, Ratio >25.0) und 0 (Nr. 98, Ratio 4.0) bewertet. Alle sechs Proben mit Polysomie wurden positiv bewertet, jeweils 50% mit 2+ und 3+ (Tabellen 9 und 10).

Oligodendrogliome II°

Alle 13 nichtamplifizierten Proben wurden positiv bewertet, 84,6% mit 3+. Die einzige Amplifikation wurde mit 2+ positiv bewertet, alle neun polysomen Proben positiv mit 3+ (Tabellen 9 und 10).

Oligodendrogliome III°

Von den 14 nichtamplifizierten Proben wurden 92,8% positiv bewertet, 85,7% mit 3+. Die beiden amplifizierten Proben (Nr. 156, Ratio >50/2 und Nr. 159, Ratio 2.0) wurden mit 3+ positiv bewertet. 80% der zehn polysomen Fälle erhielten einen positiven Score, 50% mit 3+ (Tabellen 9 und 10).

Tabelle 9: Korrelation zwischen PharmDX-AK (IHC) und FISH

	EGFR- Amplifikation	EGFR- Protein- Expression				
		0	1+	2+	3+	Total
Astro- zytome I°	keine	8 (36,4%)	1 (4,5%)	7 (31,8%)	6 (27,3%)	22 (73,3%)
n=30	gain	0	0	0	0	0
	Amplifikation	0	0	0	0	0
	Polysomie	7 (87,5%)	0	0	1 (12,5%)	8 (26,7%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	15 (50%)	1 (3,3%)	7 (23,3%)	7 (23,3%)	30/30 (100%)
Astro- zytome II°	keine	1 (9,09%)	1 (9,09%)	2 (18,18%)	7 (63,63)	11 (40,74%)
n=27	gain	0	0	0	1 (100%)	1 (3,70%)
	Amplifikation	0	0	0	1 (100%)	1 (3,70%)
	Polysomie	1 (7,69%)	3 (23,07%)	3 (23,07%)	6 (46,15%)	13 (48%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	2 (8,33%)	4 (16,66%)	5 (20,83%)	13 (54,16%)	24/27 (88,88%)
Astro- zytome III°	keine	0	1 (20%)	0	4 (80%)	5 (21,73%)
n=23	gain	0	0	0	1 (100%)	1 (4,34%)
	Amplifikation	0	0	0	2 (100%)	2 (8,69%)
	Polysomie	1 (6,66%)	1 (6,66%)	3 (20%)	10 (66,66%)	15 (65,21%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	1 (5%)	2 (10%)	3 (15%)	14 (70%)	20/23 (86,95%)
Glio- blastome	keine	0	1 (16,66%)	0	5 (83,33%)	6 (22,22%)
n=27	gain	0	0	0	0	0 (0%)
	Amplifikation	1 (6,66%)	1 (6,66%)	0	13 (86,66%)	15 (55,55%)
	Polysomie	0	0	3 (50%)	3 (50%)	6 (22,22%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	0	1 (8,33%)	3 (25%)	8 (66,6%)	12/27 (44,4%)
Oligodendro- gliome II°	keine	0	0	2 (15,38%)	11 (84,61%)	13 (59,9%)
n=23	gain	0	0	0	0	0 (0%)
	Amplifikation	0	0	1 (100%)	0	1 (4,34%)
	Polysomie	0	0	0	9 (100%)	9 (39,13%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	0	0	2 (9,09%)	20 (90,90%)	22/23 (95,65%)
Oligodendro- gliome III°	keine	1 (7,14%)	0	1 (7,14%)	12 (85,71%)	14 (53,84%)
n=26	gain	0	0	0	0	0 (0%)
	Amplifikation	0	0	0	2 (100%)	2 (7,69%)
	Polysomie	1 (10%)	1 (10%)	3 (30%)	5 (50%)	10 (38,46%)
	Keine + Polysomie= nicht ampl.	2 (8,33%)	1 (4,16%)	4 (16,66%)	17 (70,83%)	24/26 (92,30%)

Tab. 10: Sensitivität/Spezifität des PharmDX-Antikörpers für EGFR-Amplifikationen

Sensitivität	richtig-positiv	richtig-negativ	Ratio der Amplifikation	falsch-negativ Score 0	falsch-negativ Score 1+	Zymed ebenfalls falsch-negativ	Sensitivität %
Astrozytome I°							
Astrozytome II°	2	0				1	100
Astrozytome III°	1	0				1	100
Glioblastome	13	2	4, 0, 25, 0	1	1	3	87
Oligodendrogliome II°	1	0				1	100
Oligodendrogliome III°	2	0				0	100
Spezifität	richtig-negativ	falsch-positiv		falsch-positiv 2+	falsch-positiv 3+	Zymed ebenfalls falsch-positiv	Spezifität %
Astrozytome I°	16	14		7	7	0	53,3
Astrozytome II°	6	18		2	16	1	25
Astrozytome III°	3	17		3	14	4	15
Glioblastome	1	11		3	8	5	8,3
Oligodendrogliome II°	0	22		2	20	18	0
Oligodendrogliome III°	3	21		4	17	13	12,5

4. Diskussion

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit die Genamplifikation und Überexpression von EGFR in 171 Gliomen mittels FISH und Immunhistochemie unter der Fragestellung, ob die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen bezüglich der Überexpression von EGFR noch durch eine FISH-Analyse bestätigt werden müssen, untersucht. Dazu wurde ein TMA mit Gewebestücken aus von erfahrenen Neuropathologen als repräsentativ identifizierten Tumorarealen hergestellt. Für die Immunhistochemie kamen zwei verschiedene, kommerziell erhältliche Antikörper, Clone 31G7 (Zymed Laboratories, Inc.) und EGFR pharmDX (DakoCytomation) zum Einsatz. Die kostengünstige Immunhistochemie ist aktuell die routinemäßig durchgeführte Screening-Untersuchung zur Erhebung des EGFR-Status bei soliden Tumoren, jedoch geben divergierende Ergebnisse unterschiedlicher kommerziell erhältlicher Antikörper immer wieder Anlass zur Diskussion [30, 32, 41-43]. Die FISH hat als quantitative Untersuchung den Vorteil untersucherunabhängige Ergebnisse zu erbringen. Durch Überexpression des EGFR oder dessen Mutation kommt es zu einem Zustand der kontinuierlichen Aktivierung der folgenden Signalwege, hauptsächlich Ras/Raf/MEK/ERK sowie PI3K/PTEN/AKT, und damit zu Tumorwachstum, Angiogenese und Inhibition der Apoptose [44]. Es verwundert daher nicht, dass man eine Überexpression und Genamplifikationen in vielen Tumorentitäten regelmäßig vorfindet, u.a. bei Bronchialkarzinomen, kolorektalen und renalen Karzinomen und zerebralen Tumoren [14, 15, 17, 31, 42, 45, 46].

Konkordant mit der Literatur fanden wir bei den Astrozytomen I° keine und bei den Astrozytomen II° (7,1%, n=2, Nr. 34 Ratio 1.5, Nr. 56 Ratio 2.0) und Astrozytomen III° (13%, n=3, Nr. 68 Ratio 1.5, Nr. 74 Ratio 10.0, Nr. 86 Ratio >10.0) nur in Einzelfällen Zugewinne oder Amplifikationen. In der IHC mit dem Zymed-Ak zeigte sich keine Überexpression für die Zugewinne/Amplifikationen bei den Astrozytomen I° (Nr. 34 Score 1+, Nr. 56 Score 0). Bei den Astrozytomen III° fanden sich positive Ergebnisse für den Fall mit dem Zugewinn (Nr. 68 Score 2+) und in einem der zwei amplifizierten Fälle (Nr. 74 Score 3+), Nr. 86 (Ratio >15.0) wurde mit 1+ negativ bewertet. Der Dako-Ak fand alle Zugewinne/Amplifikationen der Astrozytome II° und III° mit 3+ positiv.

Auffällig war, dass die amplifizierten Fälle der Astrozytome III° (Nr. 74, 86) mit 65,5 J. deutlich über dem Altersdurchschnitt der Gruppe (44,5 J.) lag, während in allen

anderen Gruppen, insbesondere bei den Glioblastomen, die amplifizierten Fälle nicht älter waren als der Durchschnitt. Zudem fanden wir in unserer Serie bei den Astrozytomen II° und III° eine Männlich-Weiblich-Verteilung von etwas mehr als 2:1, während in allen anderen Subgruppen die Verteilung etwa 1:1 betrug.

Wir fanden einen mit der Entdifferenzierung zunehmenden Grad der Polysomie, bei den Astrozytomen I° 26,6%, bei den Astrozytomen II° 53,6% und bei den Astrozytomen III° in 65,2%. Der Zymed-Ak zeigte bei allen polysomen Fällen der Astrozytome I° und II° einen negativen Befund, bei den Astrozytomen I° durchgehend Scores von 0 und bei den Astrozytomen II° in 53,3% einen Score von 0 und in 46,7% eine Score von 1+. Erst bei den polysomen Astrozytomen III° finden sich positive Befunde in 20%, 2/3 davon jedoch mit 3+ deutlich positiv (Tabellen 7 und 8). Der Dako-Ak zeigte bei den polysomen Astrozytome I° bereits 12,5% (alle 3+), bei den Astrozytomen II° und III° in 69% bzw. 86% positiv, in der Mehrheit mit einem Score von 3+. Jedoch wurden auch knapp 60% der Astrozytome I°, 80% der Astrozytome II° und 80% der Astrozytome III° mit normaler Anzahl von Genkopien als positiv bewertet, jeweils zu großen Anteilen bzw. deutlicher Mehrheit mit einem Score von 3+ (Tabellen 9 und 10).

Zusammenfassend sind somit die Ergebnisse des Dako-Ak nicht akkurat. Auch wenn alternative Wege der Aktivierung sicherlich existieren, als mögliche Ursachen einer solchen Überexpression von EGFR bei fehlender Genamplifikation nennen Buckley et al. zum Beispiel eine erhöhte Ligandenkonzentration, aktivierende Mutationen oder eine Rezeptorheterodimerisation mit anderen Tyrosinkinaseinhibitoren wie zum Beispiel Her-2 [46], ist dies zu einem so hohen Prozentsatz unwahrscheinlich. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine EGFR-Amplifikation immer oder zumindest in einem hohen Prozentsatz mit einer EGFR-Expression einhergeht [47-52] und dass es eine Überexpression von EGFR ohne Amplifikation nur in einer geringen Anzahl von Gliomen gibt [49, 51].

Eine mit dem Entdifferenzierungsgrad zunehmende Überexpression ohne Genamplifikation aufgrund anderer genetischer Veränderungen, wie durch den Zymed-Ak gezeigt, ist eher anzunehmen. Während mit diesem Antikörper alle polysomen Fälle der Astrozytome I° und II° als negativ bewertet wurden und nur ein Fall mit normaler Anzahl von Genkopien positiv bewertet wurde (Nr. 54 Score 2+), wurden jeweils 20% der polysomen Fälle als auch der Fälle mit normaler Anzahl von Genkopien positiv

bewertet. Das ist ein Hinweis darauf, dass bei Astrozytomen die Überexpression wie o.g. über alternative Wege unabhängig von der Polysomie aktiviert wurde.

Das wirft die Frage auf, ob bei dem Dako-Ak eventuell eine „Kreuzreaktion“ auf andere Oberflächen-Antigene stattfindet. In den USA ist er für Bestimmung von EGFR-Überexpression bei kolorektalen Karzinomen durch die FDA zugelassen, validierte und mit der Genzahl korrelierte Ergebnisse bei Hirntumoren gibt es unseres Wissens nicht.

Das häufige Vorkommen von EGFR-Amplifikationen in Glioblastomen, in der Literatur mit 35-73% [16, 47, 49, 50, 52, 53] angeben, konnten wir bestätigen. Wir fanden, dass eine EGFR-Genamplifikation in 55,6% der Fälle vorlag, wobei in 64,3% (9/14) eine diffuse Verteilung der EGFR-Signale bestand und in 35,7% (5/14) Cluster in den amplifizierten Zellkernen gesehen wurden. 75% der amplifizierten Gliome zeigten zusätzlich eine Polysomie, dies ist ebenfalls von Sauter et al. [53] beschrieben worden. Nur 22% zeigten einen Normalbefund, die übrigen 22% zeigten zumindest eine Polysomie, d.h. 50% der nichtamplifizierten Glioblastome waren polysom für Chromosom 7 (Tabelle 6). Der Zymed-Ak zeigte für zwei von sechs (33%) der nichtamplifizierten Fälle eine Positivität von 2+, von den 15 amplifizierten Fällen wurden 12 (80%) positiv bewertet, 60% mit 3+. Von den als negativ gewerteten amplifizierten Fällen wurde einer (Nr. 98, Ratio 2.0) ebenfalls durch den Dako-Ak negativ bewertet, die beiden anderen Fälle (Nr. 102 Ratio >15.0, Nr. 104 Ratio 5.0) wurden durch den Dako-Ak mit 3+ deutlich positiv bewertet. Problematisch gestaltet sich der Vergleich zwischen Dako-Ak aufgrund der Tatsache, dass insgesamt 88,8% aller Glioblastome positiv bewertet wurden, einschließlich 83,3% der nichtamplifizierten und 100% der polysomen Fälle. Eine negativ bewertete Amplifikation wurde wie oben genannt ebenfalls vom Zymed-Ak als negativ bewertet (Nr. 98), die andere (Nr. 107 Ratio >25.0) wurde vom Zymed-Ak mit 3+ positiv bewertet (Tabellen 8 und 10).

Wir fanden, dass nur ein geringer Teil der zweit- und drittgradigen Oligodendrogliome (4,3% und 7,7%) eine Amplifikation aufwies (Tabelle 6), können also die in der Literatur angegebenen Werte bestätigen [14, 16]. Auffällig war, dass bei den Oligodendrogliomen II° 39,1% und bei den Oligodendrogliomen III° 38,5% eine Polysomie aufwiesen. Von den polysomen Fällen der Oligodendrogliome II° wurden durch den Zymed-Ak alle neun (100%) als positiv erkannt, von den nichtamplifizierten

Fällen wurden 69,2% positiv bewertet, die einzige Amplifikation mit 1+ negativ. Bei den Oligodendrogliomen III° wurden 50% der polysomen Fälle, 57,1% der nichtamplifizierten Fälle und die beiden Amplifikationen positiv bewertet. Der Dako-Ak zeigte für alle Oligodendrogliome II°, sowie für 92,8% der nichtamplifizierten und 80% der polysomen Oligodendrogliome III° ein positives Ergebnis (Tabellen 7-10).

McLendon et al. fanden in ihrer immunohistochemischen Untersuchung einer Serie von 50 Oligodendrogliomen eine Überexpression von 90%, jedoch ausschließlich EGFRwt [19]. Es wurde jedoch ein anderer Antikörper (Ab No-207M; Bio-Genex, San Ramon, CA) zum Nachweis von EGFRwt verwendet. Reifenberger et al. fanden in 13 Oligodendrogliomen II° und 20 Oligodendrogliomen mittels Northern Blot ebenfalls in fast allen Fällen eine EGFR-Überexpression, wobei nur ein Oligodendrogliom III° eine Amplifikation aufwies [14].

In der Literatur finden sich keine Studien größeren Umfangs in denen verschiedenen Antikörper bei Gliomen verglichen wurden. Vergleiche kommerzieller Antikörper wurden vor allem bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) und metastasierten kolorektalen Karzinomen (mCRC) durchgeführt, bei diesen Tumorentitäten ist die Therapie mit EGFR-Ak bzw. Thyrosinkinaseinhibitoren klinischer Alltag.

So fanden Lee et al. in einer Untersuchung an einer Serie NSCLC mittels Immunhistochemie mit vier verschiedenen EGFR-Antikörpern (Clone 31G7 (Zymed), pharmDx kit (Dako), Clone H11 (Dako) und Clone EGFR 113 (Novocastra) und FISH zum einen, dass der Zymed-Ak etwas häufiger als der Dako-Ak ein positives Ergebnis erbrachte (56% vs. 51%), während die anderen Antikörper nur in 5% bzw. 18% eine Positivfärbung zeigten. Zum anderen wurde in dieser Studie eine deutliche Korrelation zwischen Veränderung des EGFR-Genstatus in Form einer Polysomie bzw. Amplifikation und der Überexpression von EGFR gesehen [42].

Von Hirsch et al. wurden der Dako-Ak und der Zymed-Ak ebenfalls an einer Serie von über 350 NSCLC getestet und ihre Aussagekraft bezüglich des Überlebens unter Gefitinib bewertet. Neben der Feststellung, dass beide Antikörper eine ähnliche Positivrate zeigten (69% vs. 72%), aber nur in 75% der Fälle übereinstimmten, fanden sie dass der Dako-Ak in Korrelation mit den klinischen Verläufen eine bessere Vorhersage zum Überlebensvorteil erbringen könnte [54]. Mathieu et al. haben an einer Serie von 634 NSCLC gezeigt, dass der Dako-Ak und der Zymed-Ak in etwa gleich

viele positive Ergebnisse erbringen, von zwei weiteren getesteten Antikörpern erbrachte einer ebenfalls ähnliche Ergebnisse, während der andere in 10% weniger Fällen ein positives Ergebnis zeigte. Eine Untersuchung des Genstatus fand nicht statt. Es zeigte sich auch, dass die höchsten Positivraten an Biopsien von Primärtumoren gefunden wurden [55].

Buffet et al. verglichen drei verschiedene kommerziell erhältliche EGFR-Antikörper (Pharm DX (Dako), 31G7 (VentanaTM) und 111.6 (Labvision Neomarkers)) an kolorektalen Karzinomen und NSCLC und fanden deutlich divergierende Ergebnisse für Positivfärbungen (86% vs. 77% vs. 52%) [41].

Bei mCRC konnten Buckley et al. von divergierenden Ergebnissen der Antikörper von Zymed und DAKO bei der Bewertung von EGFR-Überexpression bei kolorektalen Karzinomen berichteten, hier zeigte der Zymed-Ak eine höhere Positivrate als der Dako-Ak [45]. Penault-LLorca et al. konnten dies in einem Vergleich von drei Antikörpern (31G7 (Zymed), PharmDX (Dako) und 3C6 (Ventana) bei mCRC bestätigen, in dem sich zeigte, dass die Antikörper von Zymed und Ventana ebenfalls häufiger positive Ergebnisse erbrachten als der Dako-Ak (86% und 93% vs. 75%).

Zusammenfassend zeigten sich in dieser Arbeit die Ergebnisse mit den Literaturangaben zur Häufigkeit der EGFR-Amplifikation bei Gliomen konkordant.

Von den beiden Antikörpern zeigte sich der Zymed-AK bezüglich der klinischen Gebrauchbarkeit überlegen, da der PharmDX-AK in unserer Untersuchung eine zu geringe Spezifität aufwies. Die teils deutlich positiven Befunde in den niedriggradigen, nichtamplifizierten Astrozytomen sind unter oben genannten Gesichtspunkten nicht glaubwürdig, bei Oligodendrogliomen ist eine häufige EGFR-Überexpression ohne Genamplifikation beschrieben, doch auch hier sind die positiven Ergebnisse des PharmDX-Ak mit 100% bei den Oligodendrogliomen II° als nicht realistisch einzustufen.

Der Antikörper von Zymed zeigte eine deutlich bessere Spezifität, bezüglich der Sensitivität fiel auf, dass er teils auch hoch amplifizierte Gliome mit einer Ratio von 15.0 (n=2, Nr. 86, Nr. 102) negativ bewertete und teils die Amplifikationen mit einer Ratio von 2.0-5.0 eher niedriggradig (n=6, Nr. 34, Nr. 56, Nr. 68, Nr. 98, Nr. 104, Nr. 136) waren. Nur zwei Amplifikationen wurden jedoch mit einem IHC-Score von 0 bewertet (Nr. 56, Ratio 2.0 und Nr. 98, Ratio 4.0).

Dies spricht dafür, dass zumindest der Zymed-Antikörper zum Screening des EGFR-Status herangezogen werden kann und analog zu den Leitlinien beim Mammakarzinom [37] bei grenzwertig positiven Befunden eine FISH zur Verifizierung des Ergebnisses durchgeführt werden sollte. Insgesamt zeigt die Studienlage mit der großen Bandbreite unterschiedlicher Ergebnisse, die durch die unterschiedlichen Antikörper und Anwender entstehen, dass eine Standardisierung der Immunohistochemie kaum möglich sein wird und daher in-situ-Methoden bei therapierelevanten Entscheidungen herangezogen werden müssen.

Zumindest bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zeigte sich jedoch nicht die EGFR-Überexpression mit einem guten Ansprechen auf die Therapie mit Cetuximab korreliert, sondern die Amplifikation des EGFR-Gens [56-61]. Inwiefern hieraus Rückschlüsse auf die Gliome zu ziehen sind ist nicht sicher zu sagen, dennoch spricht auch dies für die routinemäßige quantitative Bestimmung der Genkopie-Anzahl mittels FISH.

Auch wenn die bisherigen klinischen Studien mit gegen EGFR gerichteten Antikörpern bzw. Inhibitoren keine guten Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens erbringen konnten, wofür u.a. die Hochregulierung von alternativen pathways als auch das Problem der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke der Grund sein könnte, wird man aufgrund der desolaten Ergebnisse der konventionellen Therapien und der relativ nebenwirkungsarmen Anti-EGFR-Therapien weiter in diesem Feld forschen und gegebenenfalls mehrere Präparate kombinieren [29].

Analog zur Her2-neu-Diagnostik bei Mammakarzinomen ist die Durchführung einer FISH im Falle einer mittelmäßigen (1+) Färbung in der IHC zu empfehlen, da sonst eventuell geringgradige Amplifikationen unerkannt bleiben. Fraglich ist hier jedoch, inwiefern Gliome mit einer geringgradigen Amplifikation auf eine gegen EGF bzw. EGFR gerichtete Therapie reagieren und somit klinische Relevanz besteht.

Dies kann man nur durch Studien untersuchen, in denen der EGFR-Status mit den klinischen Verlaufsparemtern unter Therapie korreliert wird.

Wenn möglich sollte immer eine FISH durchgeführt werden, da diese quantitative Ergebnisse bezüglich der EGFR-Amplifikation erbringt und zu einem hohen Prozentsatz Rückschlüsse auf die EGFR-Expression zulässt.

5. Zusammenfassung

Wir haben an 171 Gliomen (30 Astrozytome I°, 28 Astrozytome II°, 23 Astrozytome III°, 27 Glioblastome, 23 Oligodendrogliome II° und 26 Oligodendrogliome III°) die Genamplifikation und Überexpression des EGFR mittels Fluorescent-in-situ-Hybridization und Immunhistochemie mit zwei kommerziell erhältlichen Antikörpern (Zymed-Antikörper, PharmDX-Antikörper) untersucht und die Ergebnisse korreliert.

Eine Genamplifikation fanden wir in 55,6% der Glioblastome, in allen anderen Tumorentitäten kam diese nur sporadisch vor, wir konnten wir die in der Literatur vorherrschenden Angaben zur Häufigkeit also bestätigen. Die zunehmende Entdifferenzierung der Astrozytome I-III° korrelierte mit einer vermehrten Häufigkeit einer Polysomie 7 (27%, 54% beziehungsweise 65%), bei den Oligodendrogliomen II° und III° zeigte sich ebenfalls eine häufige Polysomie, jedoch gab es hier keine mit der Entdifferenzierung korrelierenden Unterschiede (39% beziehungsweise 38%).

In unserer Untersuchung fanden sich in der Immunhistochemie erhebliche Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Antikörpern, wobei der Zymed-Antikörper eine deutlich bessere Spezifität für EGFR-Amplifikationen bei den Astrozytomen und Glioblastomen aufwies. Bei den Oligodendrogliomen zeigte sich die gute Spezifität nicht, dies könnte jedoch durch den hohen Anteil an Polysomie in dieser Tumorentität bedingt sein. Im Gegensatz dazu zeigte der PharmDX-Antikörper durchgehend eine schlechte Spezifität für eine EGFR-Amplifikation.

Jedoch wurden auch von dem Zymed-Antikörper zwei hochamplifizierte Glioblastome sowie sechs eher niedriggradig amplifizierte Astrozytome bzw. Glioblastome als negativ bewertet, in zwei Fällen sogar als komplett unauffällig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zum EGFR-Screening verwendeten Antikörper sorgsam ausgewählt und im Zweifelsfall durch eine quantitative Untersuchung, z.B. die FISH, verifiziert werden sollten, wenn daraus eine Therapieentscheidung erwächst.

6. Literatur

1. Wells, A., *EGF receptor*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(6): p. 637-43.
2. Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, *EGFR and cancer prognosis*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S9-15.
3. Hadjipanayis, C.G. and E.G. Van Meir, *Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy*. J Mol Med, 2009. **87**(4): p. 363-74.
4. Hadjipanayis, C.G. and E.G. Van Meir, *Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies*. Trends Mol Med, 2009. **15**(11): p. 519-30.
5. Buckner, J.C., et al., *Central nervous system tumors*. Mayo Clin Proc, 2007. **82**(10): p. 1271-86.
6. Kleinhues P, C.W., *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. 2nd edition ed. ed2000, Lyon: IARC Press.
7. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
8. Ludwig, C.L., et al., *A clinicopathological study of 323 patients with oligodendrogliomas*. Ann Neurol, 1986. **19**(1): p. 15-21.
9. Hartmann, C. and A. von Deimling, *Oligodendrogliomas: impact of molecular genetics on treatment*. Neurol India, 2005. **53**(2): p. 140-8.
10. Reifenberger, J., et al., *Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1175-90.
11. Bello, M.J., et al., *Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors*. Int J Cancer, 1995. **64**(3): p. 207-10.
12. Reifenberger, G., et al., *Epidermal growth factor receptor expression and growth fraction in human tumours of the nervous system*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1989. **414**(2): p. 147-55.
13. Diedrich, U., et al., *Amplification of the c-erbB oncogene is associated with malignancy in primary tumours of neuroepithelial tissue*. J Neurol, 1991. **238**(4): p. 221-4.
14. Reifenberger, J., et al., *Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors*. Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 29-35.
15. Torp, S.H., et al., *Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas*. Anticancer Res, 1991. **11**(6): p. 2095-8.
16. Ekstrand, A.J., et al., *Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo*. Cancer Res, 1991. **51**(8): p. 2164-72.
17. Hawkins, R.A., et al., *Epidermal growth factor receptors in intracranial and breast tumours: their clinical significance*. Br J Cancer, 1991. **63**(4): p. 553-60.
18. Schwechheimer, K., P. Gass, and H.H. Berlet, *Expression of oligodendroglia and Schwann cell markers in human nervous system tumors. An immunomorphological study and western blot analysis*. Acta Neuropathol, 1992. **83**(3): p. 283-91.
19. McLendon, R.E., et al., *Glioma-associated antigen expression in oligodendroglial neoplasms. Tenascin and epidermal growth factor receptor*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(8): p. 1103-10.

20. Broholm, H., et al., *Immunohistochemical investigation of p53 and EGFR expression of oligodendrogliomas*. Clin Neuropathol, 1999. **18**(4): p. 176-80.
21. Wong, A.J., P.W. Zoltick, and D.K. Moscatello, *The molecular biology and molecular genetics of astrocytic neoplasms*. Semin Oncol, 1994. **21**(2): p. 139-48.
22. Bigner, S.H., et al., *Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol, 1999. **155**(2): p. 375-86.
23. Laskin, J.J. and A.B. Sandler, *Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(1): p. 1-17.
24. Baselga, J. and C.L. Arteaga, *Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(11): p. 2445-59.
25. Yung, W.K., et al., *A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse*. Br J Cancer, 2000. **83**(5): p. 588-93.
26. Wong, E.T., et al., *Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials*. J Clin Oncol, 1999. **17**(8): p. 2572-8.
27. Prados, M.D., et al., *A phase 2 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study*. Neuro Oncol, 2006. **8**(2): p. 189-93.
28. Yung, W.K., et al., *Safety and efficacy of erlotinib in first-relapse glioblastoma: a phase II open-label study*. Neuro Oncol. **12**(10): p. 1061-70.
29. Thaker, N.G. and I.F. Pollack, *Molecularly targeted therapies for malignant glioma: rationale for combinatorial strategies*. Expert review of neurotherapeutics, 2009. **9**(12): p. 1815-36.
30. Atkins, D., et al., *Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(7): p. 893-901.
31. Langner, C., et al., *Are heterogenous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation?* J Clin Pathol, 2004. **57**(7): p. 773-5.
32. Kersting, C., et al., *Pitfalls in immunohistochemical assessment of EGFR expression in soft tissue sarcomas*. J Clin Pathol, 2006. **59**(6): p. 585-90.
33. Derecskei, K., et al., *Protocol modifications influence the result of EGF receptor immunodetection by EGFR pharmDx in paraffin-embedded cancer tissues*. Pathol Oncol Res, 2006. **12**(4): p. 243-6.
34. Guillaudeau, A., et al., *Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization*. Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry, 2009. **17**(3): p. 220-6.
35. Fallon, K.B., et al., *Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2004. **63**(4): p. 314-22.
36. Fischer, I., et al., *Utility of chromogenic in situ hybridization (CISH) for detection of EGFR amplification in glioblastoma: comparison with fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B, 2008. **17**(4): p. 227-30.

37. Wolff, A.C., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(1): p. 18-43.
38. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
39. Bubendorf, L., et al., *Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies*. J Pathol, 2001. **195**(1): p. 72-9.
40. Kallioniemi, O.P., et al., *Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 657-62.
41. Buffet, W., et al., *EGFR-immunohistochemistry in colorectal cancer and non-small cell lung cancer: comparison of 3 commercially available EGFR-antibodies*. Acta gastro-enterologica Belgica, 2008. **71**(2): p. 213-8.
42. Lee, H.J., et al., *Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study*. Lung cancer, 2010. **68**(3): p. 375-82.
43. Marquez, A., et al., *Evaluation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy*. Diagn Mol Pathol, 2004. **13**(1): p. 1-8.
44. Baselga, J., *The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S16-22.
45. Buckley, A.F. and S. Kakar, *Comparison of the Dako EGFR pharmDx kit and Zymed EGFR antibody for assessment of EGFR status in colorectal adenocarcinoma*. Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry, 2007. **15**(3): p. 305-9.
46. Buckley, A.F., et al., *Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma*. American journal of clinical pathology, 2008. **129**(2): p. 245-51.
47. Chaffanet, M., et al., *EGF receptor amplification and expression in human brain tumours*. European journal of cancer, 1992. **28**(1): p. 11-7.
48. Ekstrand, A.J., et al., *Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo*. Cancer research, 1991. **51**(8): p. 2164-72.
49. Yoon, K.S., et al., *p53 mutation and epidermal growth factor receptor overexpression in glioblastoma*. Journal of Korean medical science, 2001. **16**(4): p. 481-8.
50. Wong, A.J., et al., *Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(19): p. 6899-903.
51. Coulibaly, B., et al., *Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression*. Human pathology, 2010. **41**(6): p. 815-23.
52. Schlegel, J., et al., *Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 1994. **56**(1): p. 72-7.

53. Sauter, G., et al., *Patterns of epidermal growth factor receptor amplification in malignant gliomas*. The American journal of pathology, 1996. **148**(4): p. 1047-53.
54. Hirsch, F.R., et al., *Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer*. Cancer, 2008. **112**(5): p. 1114-21.
55. Mathieu, A., et al., *Comparison of four antibodies for immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer*. Lung cancer, 2010. **69**(1): p. 46-50.
56. Martin, V., L. Mazzucchelli, and M. Frattini, *An overview of the epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridisation challenge in tumour pathology*. Journal of clinical pathology, 2009. **62**(4): p. 314-24.
57. Chung, K.Y., et al., *Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2005. **23**(9): p. 1803-10.
58. Saltz, L.B., et al., *Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2004. **22**(7): p. 1201-8.
59. Cunningham, D., et al., *Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer*. The New England journal of medicine, 2004. **351**(4): p. 337-45.
60. Cappuzzo, F., et al., *EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2008. **19**(4): p. 717-23.
61. Hirsch, F.R., et al., *Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2008. **26**(20): p. 3351-7.

7. Anhang

Übersichtstabellen

Tabelle 11, Ergebnisübersicht Astrozytome I^o: n=30, medianes Alter 13,5 J., Altersdurchschnitt 14,6 J.,

m:w 14:16

Nummer	WHO-Grad	Geschlecht	Alter	Zymed-AK	Dako-AK	FISH (best of two)
1	1	w	6	0/0	2/2	2/2+2/2
2	1	m	30	0/0	3/3	2/2+ES
3	1	m	15	0/0	1/0	2/2+2/2
4	1	m	20	0/0	0/0	2/2+2/2
5	1	w	25	0/0	3/3	2/2+2/2
6	1	m	3	0/ES	0/ES	2/2+2/2
7	1	m	14	0/0	3/2	2/2+2/2
8	1	m	13	0/0	0/0	2/2+2/2
9	1	m	12	0/0	0/0	2/2+2/2
10	1	w	12	0/0	3/3	3-4/3-4+3/4-3/4
11	1	w	28	0/0	3/3	2/2+2/2
12	1	w	15	0/0	0/0	2/2+2-5/2-5
13	1	m	4	0/0	0/0	2/2+2/2
14	1	m	8	0/0	2/0	ES+2/2
15	1	w	16	0/0	0/0	2-4/2-4+2-4/2-4
16	1	w	6	0/0	2/2	2/2+2/2
17	1	w	12	0/0	3/1	2/2+n.b.
18	1	w	16	0/0	0/0	2-3/2-3+2/2
19	1	w	6	0/0	2/0	ES+2/2
20	1	m	22	0/0	1/2	2/2+n.b.
21	1	w	15	0/0	0/0	2/2+2/2
22	1	w	28	0/0	2/0	2/2+2/2
23	1	m	13	0/0	0/0	2/2+3-4/3-4
24	1	m	14	0/0	3/3	1-2/1-2+2/2
25	1	w	13	0/ES	ES/0	2/2+ES
26	1	w	8	0/0	2/ES	2/2+2/2
27	1	w	17	0/0	0/0	2-4/2-4+2-4/2-4
28	1	m	33	0/0	0/0	1-3/1-3+2/2
29	1	w	2	0/0	ES/0	2-4/2-4+1-4/1-4
30	1	m	12	0/0	0/0	2/2+2/2

ES = empty spot; n.b. = nicht bewertbar

Tabelle 12, Ergebnisübersicht Astrozytome II°: n=30, medianes Alter 40 J., Altersdurchschnitt 41,6 J., m:w 21:9

Nummer	WHO-Grad	Geschlecht	Alter	Zymed-AK	Dako-AK	FISH (best of two)
31	2	m	31	0/0	3/3	2/2+2/2
32	2	w	43	0/0	1/1	2-4/2-4+2-4/2-4
33	2	m	40	0/0	2/2	2/2+2-3/2-3
34	2	m	40	1/1	3/3	5-6/3-4+ES
35	2	m	28	0/0	1/0	2/2+2/2
36	2	m	40	0/0	0/0	4-6/4-6+n.b.
37	2	m	15	0/0	0/0	2/2+2/2
38	2	m	58	1/1	3/3	2/2+4-5/4-5
39	2	m	18	1/1	3/3	2/2+2/2
40	2	w	46	1/1	3/3	2-4/2-4+2/2
41	2	m	43	0/0	3/3	2/2+2/2
42	2	w	33	0/0	2/2	2/2+1-3/1-3
43	2	w	22	0/0	ES/ES	1-6/1-6+1-4/1-4
44	2	m	24	0/0	2/3	2/2+2/2
45	2	w	52	1/1	3/3	2/2+2/2
46	2	m	57	0/0	1/1	2/2+2-8/2-8
47	2	m	52	0/1	3/3	ES+ES
48	2	m	44	ES/0	ES/ES	2-4/2-4+ES
49	2	m	43	1/1	2/2	ES+2/2
50	2	m	33	1/1	1/1	2-4/2-4+ES
51	2	w	51	0/1	3/2	ES+ES
52	2	m	37	0/0	1/2	2/2+2/2
53	2	w	78	1/1	3/2	2-4/2-4+ES
54	2	w	67	2/1	3/3	2/2+2/2
55	2	w	56	1/1	2/2	3-4/3-4+ES
56	2	m	39	0/0	3/3	4/2+2-4/2-4
57	2	m	39	0/1	3/3	2/2+2/2
58	2	m	38	0/0	3/3	2/2+2-4/2-4
59	2	m	30	1/1	3/3	n.b.+3-4/3-4
60	2	m	52	1/1	3/3	ES+3-4/3-4

ES = empty spot; n.b. = nicht bewertbar

Tabelle 13, Ergebnisübersicht Astrozytome III°: n=27, medianes Alter 44,5 J., Altersdurchschnitt 43 J., m:w 19:8

Nummer	WHO-Grad	Geschlecht	Alter	Zymed-AK	Dako-AK	FISH (best of two)
61	3	m	46	0/0	0/0	ES+ES
62	3	m	42	0/1	1/2	2-12/2-12+2-4/2/4
63	3	m	44	2/3	3/ES	2-8/2-8+ES
64	3	w	40	1/1	2/2	2-6/2-6+2-4/4-8
65	3	m	32	0/0	1/1	2-7/2-7+2-4/2-4
66	3	w	30	0/1	3/3	ES+ES
67	3	m	29	1/1	3/3	2-7/2-7+2-9/2-9
68	3	m	26	2/2	3/3	2-9/2-9+2-6/2-4
69	3	m	36	2/1	3/3	2/2+2/2
70	3	m	51	3/3	3/3	2-10/2-10+2-10/2-10
71	3	m	54	0/1	3/1	2-4/2+2/2
72	3	m	60	1/2	2/1	2-4/2-4+2-7/2-7
73	3	m	67	3/3	3/3	ES+ES
74	3	w	68	3/3	3/3	>20/2+>20/2
75	3	m	49	1/1	3/3	2-6/2-6+n.b.
76	3	w	33	0/0	3/3	2-4/2-4+2-4/2-4
77	3	m	55	0/0	1/1	2/2+2/2
78	3	w	25	1/1	3/3	3-4/3-4+3-4/3-4
79	3	m	71	1/1	3/3	ES+2/2
80	3	w	50	1/1	1/1	ES+ES
81	3	m	39	0/0	3/3	4/4+3-6/3-6
82	3	w	16	0/0	0/0	ES+3-4/3-4
83	3	m	52	0/0	2/3	4-8/4-8+3-5/3-5
84	3	m	39	0/0	3/3	2/2+2/2
85	3	w	43	0/0	3/3	2-3/2-3+3-4/3-4
86	3	m	63	1/ES	3/ES	>30/3-5+2/2
87	3	m	42	0/0	3/3	3-4/3-4+2/2

ES = empty spot; n.b. = nicht bewertbar

Tabelle 14, Ergebnisübersicht Glioblastome: n=29, medianes Alter 63 J., Altersdurchschnitt 61,3 J.,
m:w 15:14

Nummer	WHO-Grad	Geschlecht	Alter	Zymed-AK	Dako-AK	FISH (best of two)
88	4	m	74	ES/2	ES/3	2/2+2/2
89	4	m	51	0/0	2/2	3-4/3-4+3-4/3-4
90	4	w	68	2/3	3/3	>50/3-5+>50/3-5
91	4	w	66	2/2	3/3	4-6/3-5+15-20/10-12
92	4	m	72	3/3	3/3	ES+ES
93	4	m	57	3/3	3/3	>50/2+ES
94	4	w	48	3/3	3/3	>30/3-5+ES
95	4	w	59	ES/3	ES/3	ES+ES
96	4	m	63	0/1	1/1	2/2+2/2
97	4	w	62	3/3	3/3	>50/2-5+>50/2-5
98	4	w	50	0/0	0/0	2/2+8/2
99	4	w	45	1/3	2/2	3-4/3-4+4-5/4-5
100	4	m	55	3/3	3/3	>30/4-5+>30/2
101	4	w	44	2/ES	3/3	8/2+3-4/3-4
102	4	m	70	1/0	3/3	>30/2+>30/2
103	4	m	67	0/0	3/3	2/2+2/2
104	4	m	66	1/1	3/2	ES+>10/2
105	4	w	64	3/3	3/3	>20/2+>10/2
106	4	m	57	2/2	3/3	>30/3-5+>30/3-5
107	4	w	61	3/3	1/1	>50/2+2/2
108	4	m	71	3/ES	3/3	>50/2+>50/2
109	4	w	76	3/3	3/3	>20/3-4+>30/5-7
110	4	w	61	0/0	2/3	2-5/2-5+3-4/3-4
111	4	m	72	3/1	3/3	4-5/4-5+2-3/2-3
112	4	m	67	ES/1	3/3	2/2+2/2
113	4	m	74	0/0	2/2	4-5/4-5+4-5/4-5
114	4	w	57	2/2	3/3	2/2+2/2
115	4	w	38	0/0	2/3	2/2+2/2
116	4	m	66	3/3	3/3	3-4/3-4+3-4/3-4

ES = empty spot; n.b. = nicht bewertbar

Tabelle 15, Ergebnisübersicht Oligodendrogliome II°: n=28, medianes Alter 42,5 J.,

Altersdurchschnitt 41,3 J., m:w 14:14

Nummer	WHO-Grad	Geschlecht	Alter	Zymed-AK	Dako-AK	FISH (best of two)
117	2	m	40	1/1	2/2	ES+ES
118	2	w	17	0/1	2/2	2/2+2/2
119	2	m	35	1/1	2/2	ES+2/2
120	2	w	38	2/3	3/3	2/2+2/2
121	2	w	48	1/1	2/2	ES+ES
122	2	m	33	1/1	3/3	2/2+2/2
123	2	m	44	2/2	3/3	2/2+2/2
124	2	m	56	1/2	3/3	3-4/3-4+3-4/3-4
125	2	w	48	2/2	3/3	2-3/2-3+3-5/3-5
126	2	w	49	1/2	3/3	3-4/3-4+3-4/3-4
127	2	m	33	2/2	3/3	3-4/3-4+2/2
128	2	w	30	2/2	2/3	3-4/3-4+2/2
129	2	m	48	3/3	3/2	2/2+3-4/3-4
130	2	m	59	3/3	3/3	2-3/2-3+3-4/3-4
131	2	w	53	3/3	3/3	4-5/4-5+4/5+4/5
132	2	w	28	1/0	3/1	ES+ES
133	2	w	44	2/2	3/3	2/2+2/2
134	2	w	50	2/2	3/3	n.b.+2/2
135	2	m	41	3/3	3/3	2/2+2/2
136	2	w	46	1/0	2/2	4-5/2+2/2
137	2	m	33	1/1	3/3	2/2+2/2
138	2	m	32	1/1	1/1	n.b.+n.b.
139	2	w	47	2/2	3/3	2/2+2/2
140	2	w	44	2/1	3/3	2/2+2/2
141	2	m	48	2/3	3/3	2/2+2/2
142	2	m	41	3/3	3/3	4-5/4-5+3-4/3-4
143	2	m	35	2/1	3/3	2/2+2/2
144	2	w	36	1/1	3/3	ES+ES

ES = empty spot; n.b. = nicht bewertbar

**Tabelle 16, Ergebnisübersicht Oligodendrogliome III°: n=27, medianes Alter 47 J.,
Altersdurchschnitt 45,3 J., m:w 14:13**

Nummer	WHO-Grad	Geschlecht	Alter	Zymed-AK	Dako-AK	FISH (best of two)
145	3	m	34	3/2	3/3	2/2+n.b.
146	3	w	33	3/3	3/3	ES+2/2
147	3	m	34	2/2	3/3	2/2+2/2
148	3	w	48	2/3	3/3	3-4/3-4+2/2
149	3	m	41	1/1	3/2	2/2+ES
150	3	m	37	1/1	3/3	2/2+2/2
151	3	m	36	3/1	3/3	2/2+2/2
152	3	w	56	1/1	2/2	2/2+2/2
153	3	m	47	2/2	3/3	2/2+2/2
154	3	w	34	0/0	0/0	2/2+2/2
155	3	w	50	3/3	ES/3	2/2+2/2
156	3	w	46	3/3	3/3	>50/2+>50/2
157	3	m	13	0/0	0/0	4-5/4-5+3-4/3-4
158	3	m	59	1/1	3/3	3-4/3-4+3-4/3-4
159	3	m	57	2/2	3/3	4/2+ES
160	3	w	53	3/3	3/3	2/2+2/2
161	3	m	49	3/3	3/3	2/2+2/2
162	3	m	58	3/3	2/2	2/2+3-4/3-4
163	3	m	57	1/1	2/2	ES+ES
164	3	m	30	0/0	2/1	2-4/2-4+2/2
165	3	m	34	0/1	3/3	2/2+2/2
166	3	w	66	2/2	3/3	2/2+3-4/3-4
167	3	w	60	3/3	1/1	2/2+4-6/4-6
168	3	w	42	2/ES	2/ES	4-5/4-5+2/2
169	3	m	40	0/0	3/3	3-4/3-4+ES
170	3	w	50	ES/0	3/3	2/2+ES
171	3	w	65	ES/0	3/3	ES+2-3/2-3

ES = empty spot; n.b. = nicht bewertbar

8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlich danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

Mein ganz spezieller Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Glatzel, der mir durch seine fachlichen Rat aber auch durch seine geduldige Unterstützung diese Arbeit ermöglichte.

Des Weiteren danke ich meinen Betreuern Christian Bernreuther und Jakob Matschke. Ohne das Engagement des Laborteams, allen voran Ulrike Rumpf, Yvonne Pulkenat und Martin Haberkorn, hätte diese Arbeit nie durchgeführt werden können, ebenfalls an diese Adresse ein grosses Dankeschön.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: