

GLIAL TÜMÖRLERDE GENETİK ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI*

Tümör Kültürü Çalışması

E.Oğul**, S. Akçalar***, E. Korfalı****, A. Bekar****, Ş.Tolunay*****, F. Turan**, S. Artan*****

Bu çalışmada klinik bulgulara ilave olarak CT ve MR gibi görüntüleme yöntemleri ile intra-kranial yer kaplayan kitle, histopatolojik olarak da glial tümör tanısı almış olan 35 olguda biyopsi materyalinden tümör kültürü hazırlanarak karyotip analizi yapıldı. 27 olguda tümör kültüründe üreme elde edilebildi. 6 olguda üreme olmadı. 2 olguda analiz yapmaya elverişli metafiz plağı elde edilemedi. 21 olguda 17p delesyonu saptandı. 2 olguda 17p delesyonuna ek olarak 22. kromozomda, 2 olguda 9. ve bir olguda da 10. kromozomda monosomi bulundu. 6 olguda floresan insitu hibridizasyon (FISH) tekniği ile p53 gen mutasyonu incelenmesi yapıldı ve dört olguda bu mutasyon saptandı.

Anabtar sözcükler: Glial tümör; doku kültürü, kromozom incelemesi

Investigation of genetic characteristics of glial tumors

In this study, 35 glial tumors diagnosed by CT, MR and histopathologically, were investigated for chromosomal aberration by caryotip analysis on tumor culture. In addition, p53 gene mutation was investigated by FISH technique on 6 glial tumors. 17p deletion was found on 21 cases. Besides monosomi was shown on chromosome 22, 10 and 9. P53 gene mutation was found by FISH technique on 4 of 6 glial tumor.

Key Words: Glial tumors, tumor tissue culture, chromosomal investigation

15 yıldan beri yapılan çok sayıda genetik çalışma sayesinde birçok hastalığın etyolojisine ışık tutacak kromozom anomalileri saptandı. Bu arada onkogenezis konusunda da yoğun gelişmeler kaydedildi. Çeşitli proto-onkogenler, onkogenler ve tümör supressor genler ortaya konuldu. Üzerinde yoğun çalışmalar yapıldığı tümörlerden biri de glial tümörlerdir.

Glial tümörlerde en sık görülen genetik bozukluk 17. kromozom delesyonları ve p53 gen mutasyonlarıdır. Tümör supressor bir gen olan p53 geni mutasyonunun nöroepitelyal tümörlerin genезisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (4,5,18). Bunun dışında özellikle yüksek grade'li glial tümörlerde (Glioblastoma multiforme ve anaplastik astrositoma) sıklıkla 9. ve 10.

kromozom anormalileri ile "epidermal growth factor" (EGF) reseptör, C-myc, N-myc, L-myc, Ha-ras, Kiras, N-ras ve Gli genlerinde amplifikasyonlar saptandı ve bunların tümör hücresi proliferasyonunu etkilediği ortaya kondu. Son yıllarda "platelet derived growth factor" (PDEF) ve mdm2 reseptör gen amplifikasyonları da bulundu (5,6,7,8).

1998 yılında glioblastoma multiforme, anaplastik menengioma, düşük grade'li astrositoma ve medulloblastoma gibi santral sinir sistemi tümörleri ile prostat ve meme kanseri olgularında 10q23.2 kromozomunda PTEN (MMAC1) adlı yeni bir tümör supressor gen mutasyonunun saptandığı bildirildi (2,3).

Bu çalışmanın amacı glial tümör biyopsi materyalinden tümör kültürü hazırlanarak karyotip analizi yapmak ve genetik bozukluk olup olmadığını incelemek, ayrıca floresan in-situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile p53 gen mutasyonunu araştırmaktır.

Materyal ve metod:

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ve Nöroşirurji kliniklerine başvuran ve CT, MR ve histolojik inceleme sonucunda glial tümör tanısı alan 35

*: 32. Ulusal Nöroloji Kongresinde tebliğ edildi. Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir (92/3).

** : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Bursa

*** : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Genetik laboratuvarı, Bursa

**** : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı, Bursa

***** : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Bursa

***** : Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi GENTAM, Eskişehir

Tablo-1: *Glial Tümörlerin histolojik tanıları*

Glioblastoma Multiforme	10 olgu
Astrocitoma grade III-IV	9 olgu
Astrocitoma grade I-II	8 olgu
Pilositik astrositoma	3 olgu
Medulloblastoma	3 olgu
Nörositoma	1 olgu
PİNET	1 olgu
Toplam	35 olgu

olgunun tümör materyali üzerinde yapılmıştır.

Olguların 19'u erkek (%54,2), 16'sı kadın (%45,8) olup, yaşları 4 ile 82 arasında değişmektedir (ortalama yaş 46). 27 olgu supratentoriyel, 8 olgu infratentoriyel lokalizasyonludur. Histopatolojik olarak 10 olgu glioblastoma multiforme, 3 olgu pilositik astrositoma, 8 olgu düşük gradeli astrositoma, 9 olgu yüksek gradeli (III-IV), 3 olgu medulloblastoma, 1 olgu primitif nöroektodermal tümör (PİNET) ve 1 olgu da nörositoma tanısı almıştır (Tablo-1)

Biyopsi ile alınan tümör materyelleri, doku kültürü yapılmak üzere transport besiyeri ile genetik laboratuvarına ve %10'luk formalin solüsyonu içinde de patoloji laboratuvarına gönderildi. Genetik laboratuvarında standart doku kültürü yöntemi ile üremeye bırakıldı. Üreme olan olgularda metafaz fazında durdurularak, Giemsa, tripsin-Giemsa ve C-Bant yöntemi ile sitogenetik inceleme yapıldı (14). Altı olguda fluoresan in-situ hib-

ridizasyon (FISH) tekniği ile p53 geni araştırılmak amacıyla, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Araştırma Merkezi (GENTAM) ile işbirliği yapıldı (1).

Bulgular:

35 glial tümörlü olgunun tümör doku örneklerinden yapılan tümör doku kültürlerinde 27'sinde üreme sağlandı. 6'sında üreme olmadı. 2'sinde kaliteli metafaz elde edilemedi. Üreme sağlanan olguların 21'inde 17p delesyonu, bu olguların 2'sinde 17p delesyonu ile birlikte 22. kromozomda monosomi, birinde 10. kromozomda, ikisinde 9. kromozomda monozomi, bir olguda ise sadece 22. kromozomda monozomi saptandı. 17p delesyonu gösteren 6 olguda p53 geni incelemesi yapıldı ve dördünde p53 geni mutasyonu bulundu.

Tablo-2'de doku kültüründe üreme elde edilen 22 glial tümörlü olgunun yaş dağılımı, histopatolojik tanısı ve kromozom anormallikleri belirtilmiştir.

Tartışma:

Beyin tümörlerinde oluşan genetik değişikliklerin öğrenilmesi ve geniş bilgi birikimi son 10 yılda olmuştur. Tümör başlangıcı ve gelişmesinde rol alan karmaşık genetik mekanizmalar tam olarak anlaşılmış değildir. Bu mekanizmaların öğrenilmesi gelecekte beyin tümörlerinin moleküler patogenezinin anlaşılması, klinik ve temel bilimlere bir ışık tutacaktır. Bu alanda en önemli çalışmalardan biri de tümör supressor genlerin ortaya çıkarılmasıdır. Ayrıca son çalışmalarda in vitro olarak izole tümör suppressor gen ve büyüme baskı-

Tablo-2: *Doku kültürlerinde üreme elde edilen glial tümörlü olgularda yaş dağılımı, histopatolojik tanıları ve kromozom anormallikleri (n=27)*

Yaş grubu	Olgu sayısı	Histopatolojik tanı	Kromozom anormallikleri
0-10	4	Pil. Astrositom (3 olgu) Medulloblastom (1 olgu)	46xx 17p- (2 olgu) 46xx 17p-, 22 mono. (1 olgu)
11-20	2	Astrocitoma-grade II (1 olgu) Glioblastoma Multiforme (1 olgu)	46xy 17p-, 10 mono. (1 olgu) 46xy 17p-, p53 mut. (1 olgu)
21-30	4	Astrocitoma Grade III-IV (2 olgu) Medulloblastom (1 olgu) PİNET (1 olgu)	46xy 17p-, 10 mono.p53 mut (1 olgu) 46xy 17p-, p53 mut. (1 olgu) 46xy 17p- (1 olgu)
31-40	2	Astrocitoma-grade II (2 olgu)	46xx 17p- (1 olgu) 46xx 17p- (2 olgu)
41-50	1	Dermoblastik medulloblastoma (1 olgu)	46xy 17p- (1 olgu)
51-60	6	Glioblastoma Multiforme (4 olgu) Astrositoma Grade III-IV (1 olgu) Nörositoma (1 olgu)	46xx 17p- (3 olgu) 46xx 17p- (1 olgu) 46xy 17p- (1 olgu)
61-70	5	Glioblastoma Multiforme (5 olgu)	46xy 17p- (3 olgu) 46xx 17p-, p53 mut, 22 mono. (2 olgu)
>71	3	Astrocitoma Grade II (3 olgu)	46xy 17p- (3 olgu)

Kısaltmalar: Pil: Pilositik, Mut. Mutasyon, Mono. Monosomi

layıcı genin ("Growth-inhibiting gene") subkromozomal fragmanlarla transfer edilebildiği ve tümör gelişimini durdurduğu görülmüştür (12).

Astrositik beyin tümörlerinde en sık görülen 17p delesyonudur. P53 tümör supressor gen 17 p de lokalizedir ve çoğu astrositik tümörlerde 17 p delesyonu p53 mutasyonu ile birlikte olur (5,9). P53 genin inaktivasyonu astrositomun başlamasında veya progresyonunda önemli olabilir. Klinik olarak p53 mutasyonu olan glioblastomlardan çok erken başlangıçlı olanların survivininin daha iyi olduğu gözlenmiştir (5).

Gliyal tümörlerde ikinci sıklıkta 10. kromozomda kayıp görülmüştür. Bu 10. kromozom üzerinde bir tümör supressor gen olması ihtimalini düşündürmüştür. Nitekim çok yeni olarak 1998 yılında malign santral sinir sistemi tümörleri ile prostat ve meme Ca'da 10. kromozomda PTEN (MMCA 1) adlı bir tümör supressör gen bulundu (2,3). Glioblastoma multiforme'de %80 olguda 10. kromozom kaybı görülür (8-11,13). Daha nadir olarak 9, 10, 22 kromozomlarda anomali görülür (15-19).

Bizim bulgularımızda glioblastoma multiforme ve grade III-IV astrositomlarda ve özellikle yaşlılarda 17. kromozomun kısa kolunda delesyon ve 2 olguda 22. kromozomda monosomi saptandı. Gençlerde ve düşük grade olgularda kromozomal anomali daha az görüldü.

Çalışmamızın büyük bir kısmını oluşturan gliyal tümörlü olgularımızdan üreme elde edilen 21 olguda 17 p delesyonu ile 9, 10, ve 22. kromozomlarda monosomiler saptandı. FISH tekniği ile p53 geni incelemesi yapılan 6 olgunun dördünde p53 geni mutasyonu bulundu. P53 geni mutasyon tespit edilen olgulardan ikisi glioblastoma multiforme, ikisi astrositom III-IV'dür. Bu bulgular literatür bulguları ile uyumluluk göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tip klinik takip ile koordineli şekilde yapılan genetik incelemelerin hem tümörün onkogenезisine, hem de olguların erken tedavi ve sürvi'sine büyük ölçüde katkıda bulunduğu, ayrıca birinci derece hasta yakınlarında tümöre yatkınlığın saptanmasına yardımcı olabileceği söylenebilir. Moleküler biyoloji ve genetik bilgilerimiz arttıkça gelecek yıllarda yapılacak yeni çalışmalarla her bir tümör tipi için ayrı projeler yapılmak suretiyle daha detaylı bilgiler elde etmek ve beyin tümörlerinin tanı ve tedavisine ışık tutacak bilgilere ulaşmak mümkün olabilecektir. Elde edilecek bu bilgiler gelecek için umut vaat eden gen terapilerine de yön verecektir.

Kaynaklar

1- Başaran N, Acar H, Artan S. Teorik ve pratik floresan in-situ hibridizasyon. Osmangazi Üniv. Tıp Fak. Rektörlüğü, Eskişehir-1990; 67: 76.

- 2- Boström J, Cobbers JMJJL, Wolter M, et al. Mutation of the PTEN (MMCA1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 11q1. *Cancer Res*-1998;58:29-33.
- 3- Chiarella E, Roz L, Albarosa R, et al. PTEN/MMCA1 mutation in primary glioblastomas and short-term cultures of malignant gliomas. *Oncogene*-1998;16: 541-545.
- 4- Chung R, Whaley J, Kley N, et al. P53 gene mutations and 17p deletions in human astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer*-1991;3:323-331.
- 5- Chung RY, Whaley JM, Anderson KM, et al. P53 gene mutations in human glioblastomas associated with early age onset and better survival. *Proc Am As Cancer Res*-1990;31:6 [abstract].
- 6- Dalrymple SJ, Jenkins RB. Molecular genetics of astrocytomas and meningiomas. *Curr Op Neurol*-1994;7:477-483.
- 7- Felix Ca, Slave I, Dunn M, Straus EA. P53 gene mutation in pediatric brain tumors. *Med Pediatr Oncol*-1995;25: 431-436.
- 8- Fujimoto M, Fults DIV, Thomas GA et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Genomics*-1989;1: 210-211.
- 9- Fults D, Brockmeyer d, Tullous MW, et al. P53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res*-1992;52:674-679.
- 10- Fults D, Pedone CA, Thomas GA, White R. Allelotype of human malignant astrocytoma. *Cancer Res*-1990;50:5781-5789.
- 11- James CD, Carlom E, Dumanski JP, et al. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res*-1988;48:5516-5551.
- 12- Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, et al. Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science*-1993;260:361-364.
- 13- Leon Sp, Zhu J, Black PM. Genetic aberrations in human brain tumors. *Neurosurgery*-1994;34:708-722.
- 14- Lülecı G, Başaran S, Bağcı B. Sitogenetik uygulama yöntemleri, Meteksan-Ankara- 1990; 1-53.,
- 15- Mikkelsen T. Genetics of astrocytic tumor progression. *Mol. Genet. Med.*-1993;3:69-94.
- 16- Rasheed BKA, Fuller GN, Friedman AH, et al. Loss of heterozygosity for 10 q loci in human gliomas. *Genes Chromosomes Cancer*-1992;5:75-82.
- 17- Schmidek HH. Molecular genetic events in some primary human brain tumors. In *Brain Tumor* ed by Mosantz RA and Walsh JW-Marcel Dekker Co, New York-1993;173-179.
- 18- Wong AJ, Zoltick PW, Moscatello DK. The molecular biology and molecular genetics of astrocytic neoplasms. *Semin Oncol*-1994;21: 139-140.
- 19- Yung WKA. Molecular biology, genetic and CNS neoplasms. *Curr Opin Neurol*-1994;7:475-476.