

# **Bedeutung von Genotyp und Morphologie für die Prognose von Glioblastomen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von Sven Antweiler  
aus Köln

2007

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1.Gutachter: Prof. Dr. A. v. Deimling

2.Gutachter: Prof. Dr. R. Weber

Tag der Mündlichen Prüfung: 3. April 2007

Aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. T. Pietsch

(ehemals Direktor: Prof. Dr. Otmar D. Wiestler)

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Diese Arbeit ist meinen Eltern, Helga und Rudolf Antweiler gewidmet, die mich nicht nur bei deren Durchführung, sondern auch das ganze Studium über unterstützt und gefördert haben.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>1. Einleitung</b>	
1.1    Glioblastome .....	8
1.2 <i>TP53</i> .....	11
1.3 <i>PTEN</i> .....	12
<b>2. Material und Methoden</b>	
2.1    ZNS Tumoren und Patientendaten .....	14
2.2    Histopathologische und immunhistochemische Einteilung .....	14
2.3    Extraktion von DNA aus Blut und Tumoren .....	15
2.4    Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	15
2.5    SSCP Analyse .....	20
2.6    Silberfärbung .....	22
2.7    DNA – Isolierung .....	25
2.8    Sequenzierung .....	26
2.9    Chemikalien und Lösungen .....	29
2.10   Geräte .....	33
2.11   Statistische Analyse .....	34
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1    Klinische, histopathologische und immunhistochemische Bewertung .....	35
3.2    Analyse von <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> und LOH 10 .....	35
3.3    Zusammenhang von molekularen Parametern und Überlebenszeiten .....	36
3.4    Zusammenhang von molekularen und histopathologischen Daten .....	36
<b>4. Diskussion</b> .....	46
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	50
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	51
<b>7. Danksagung</b> .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Polyacrylamid
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
BAA	Bisacrylamid
BCNU	1,3-bis 2-chloroethyl-1-nitro-surea
bd	bidest
bp	Basenpaar
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cDNA	complementary DNA
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCTP	Desoxycytosintriphosphat
dNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
Ex	Exon
FAK	Focal Adhesion Kinase
GBM	Glioblastom
gcGBM	Giantcell Glioma
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
HPF	High Power Field
HPV	Humanes Papilloma Virus
JNK	Jun N-terminal protein kinase
LOH	Loss Of Heterocytosity
Lsg.	Lösung
<i>MDM2</i>	Mouse Double Minute 2 Homologe

---

<i>MMAC1</i>	Mutated in Multiple Advance Cancers-1, siehe auch PTEN
mRNA	Messenger RNA
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, siehe auch MMAC1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
R0 Resektion	Ohne makroskopischen Rest
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism Analysis
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
<i>WAF1</i>	Wildtype TP53-Activated Fragment 1
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Glioblastome

Glioblastome machen 15-20% der intrakraniellen Tumoren aus. Glioblastome stellen mit 50% die häufigsten Gliome dar (Mahaley, 1992; Russel, 1989; Zülch, 1986). Sie entsprechen astrozytären Gliomen Grad IV der Einteilung durch die WHO. Die mittlere Überlebenszeit von Glioblastompatienten wird in kontrollierten Studien mit ca. 9 Monaten angegeben (Nelson et al., 1985). Betrachtet man ein unselektioniertes Patientengut sinkt die Dauer sogar unter 30 Wochen (Winger et al., 1989). Verschiedene molekulargenetische Untersuchungen haben bereits zeigen können, daß histologisch gleichförmige Glioblastome tatsächlich unterschiedlichen biologischen Tumorguppen angehören können. So ist zum Beispiel die Prognose für Glioblastome, die aus maligner Progression entstanden sind, d.h. die sich aus vorbekannten niedriger malignen Astrozytomen entwickelt haben, günstiger als bei solchen, die neu aufgetreten sind.

Als histologische Varianten des Glioblastoms kennt die WHO-Klassifikation das Gliosarkom und das sogenannte Riesenzell-Glioblastom. Das Gliosarkom zeichnet sich durch ausgeprägte sarkomatöse Proliferation von Kapillarendothelzellen aus, die immunhistochemisch keine Expression von astrozytären Proteinen zeigen. Glioblastome können in jedem Lebensalter auftreten.

Das Häufigkeitsmaximum liegt im 5. und 6. Lebensjahrzehnt (Mahaley, 1992; Russel, 1989; Zülch, 1986). Zu den klinischen Symptomen der Erkrankungen gehören vor allem Zeichen des erhöhten intrakraniellen Druckes, wie Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit und Erbrechen. Ebenfalls auftreten können Zeichen von neurologisch fokalen Störungen, wie Hemiparese, Hemianopsie, Wesensveränderungen und Hirnwerkzeugstörungen. Seltener ist das Initialsymptom eines cerebralen Krampfanfalles (Mahaley, 1992).

Als typisches Korrelat des Glioblastoms in der Computertomographie gilt eine ringförmige Kontrastmittelanreicherung mit einem hypodensen Zentrum, das oft einer zentralen Nekrose entspricht. Außerdem entsteht ein perifokales Ödem, das sich fingerförmig in das umgebende Marklager ausbreiten kann. In der Magnetresonanztomographie stellt sich die Läsion im T1 gewichteten Bild als signalhyperintensiv, heterogen und gadoliniumaufnehmend dar. Im T2 gewichteten Bild ist ein ausgedehntes Ödem zu sehen. Glioblastome finden sich am Häufigsten in der Konvexität der Großhirnhemisphären und zu einem geringeren Anteil auch in den tiefen Mittellinienstrukturen mit Prädilektion in Richtung des Balkens. Über diesen können sich die Tumoren dann als sogenanntes Schmetterlingsgliom in beide Hemisphären ausdehnen.



Das Wachstum erfolgt wie bei allen malignen Tumoren infiltrativ. Metastasierungen sind jedoch ausgesprochen selten und können zum Beispiel als liquorogene Metastasen bei Anschluß an die Liquorräume auftreten. Da die Diagnostik beim Vorliegen entsprechender klinischer Symptomatik hauptsächlich über bildgebende Verfahren stattfindet, sind auch die Differentialdiagnosen überwiegend radiologisch. Die typische Darstellung der ringförmigen Kontrastmittelanreicherung tritt zum Beispiel auch bei entzündlichen Raumforderungen wie Abszessen oder isolierten Tuberkulomen auf. Dies bestätigt sich operativ oder klinisch selten. Häufiger sind singuläre Metastasen anderer Tumoren. Diese sind in solchen Fällen radiologisch meist kleiner und zeigen in der Regel nicht die typische ringförmige Kontrastmittelanreicherung. Bei periventrikulären, nativ hypodensen Raumforderungen muß auch ein Lymphom in Betracht gezogen werden.

Als Therapie des Glioblastoms stehen Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie zur Verfügung. Die operative Therapie dient in erster Linie zur histologischen Diagnosesicherung und zur Tumormassenreduktion. Obwohl nie durch eine kontrollierte randomisierte, prospektive Studie erwiesen wurde, daß eine chirurgische Therapie sinnvoll ist, besteht doch ein breiter Konsens darüber, daß Patienten mit einer R0-Resektion eine wesentlich günstigere Prognose haben (Black, 1993; Nazzarro und Neuwelt, 1990; Sawaya, 1991). Die Operationsmortalität beträgt dem gegenüber in erfahrenen Zentren weniger als 2% und die permanente Morbidität weniger als 5%. Verbindliche Operationsindikationen existieren nicht. Als nicht sinnvoll gilt eine chirurgische Intervention bei Vorliegen eines Schmetterlingsgliomes, dem Betroffensein von tiefen Mittellinienstrukturen oder der Inselregionen. Bei einer Lebenserwartung unter 6 Monaten oder einem hohen Lebensalter sollte von einer Operation Abstand genommen werden.

Durch eine Ganzhirnbestrahlung von 50 – 60 Gy kann die mittlere Überlebenszeit nach einer Operation von 17,5 auf 37,5 Wochen erhöht werden (Walker et al., 1980). Ab einer Dosis von 70 Gy ist das Auftreten von Strahlenspätchäden, insbesondere von Radionekrosen, signifikant häufiger (Leibel und Sheline, 1975). Bei einer Dosis von 60 Gy muß bereits mit dem Auftreten einer Leukenzephalopathie gerechnet werden. Die Anwendung lokaler Strahlentherapie, Radio-Neurochirurgie oder stereotaktischer Zielbestrahlung mit einem Linearbeschleuniger ist durch die Größe und das infiltrierende Wachstum des Tumors limitiert (Malkin, 1994; Ostertag, 1994). Natürlich ist auch eine konventionelle externe Strahlentherapie möglich. Sie entspricht im Wesentlichen dem Verfahren, das auch bei anaplastischen Astrozytomen eingesetzt wird (Walker et al., 1980).

Als Chemotherapie steht eine Behandlung mit dem Nitrosoharnstoff BCNU (Carmustin) sowie seit einiger Zeit auch mit Temozolomid (Temodal®) zur Verfügung. Diese kann als

adjuvante Therapie zu Operation und Radiatio eine statistisch signifikante Lebenszeitverlängerung von 36 bis zu 51 Wochen bewirken (Walker et al., 1980). Bei diesen Ergebnissen muß berücksichtigt werden, daß fast alle großen Therapiestudien anaplastische Gliome und Glioblastome zusammenfassen. Unterstellt man eine höhere Effektivität der Chemotherapie bei anaplastischen Astrocytomen (Chang et al., 1983; Fine, 1994; Levin et al., 1990) und berücksichtigt man, daß in großen Gliomstudien ca. 5% chemotherapiesensible oligodendrogliale Tumoren ebenfalls eingeschlossen sein könnten, so reduziert sich die Zahl möglicher Therapieresponder bei Glioblastomen noch weiter. Deshalb kann der Einsatz einer Chemotherapie nur im Einzelfall, z.B. bei jungen Patienten in gutem klinischen Zustand, erwogen werden. In letzter Zeit wird statt der Behandlung mit Nitrosoharnstoffen, immer häufiger erfolgreich auf eine Radio-Chemotherapie mit dem lipophilen Alkylans Temozolomid (Temodal®) zurückgegriffen. Es überwindet die Bluthirnschranke, erhöht die Strahlensensibilität von Tumoren bei simultaner Radiotherapie und ist gut verträglich. Die Effektivität der Chemotherapie läßt sich gegebenenfalls durch Immunoselektion mit Vaccinen noch weiter steigern. Die immuntherapeutischen oder immunmodulatorischen Therapieansätze z.B. mit Interferonen oder Antiöstrogenen sind noch nicht ausreichend klinisch getestet oder weisen in therapeutischer Dosierung eine hohe Toxizität auf. Daher kann eine grundsätzliche Therapieempfehlung hieraus nicht abgeleitet werden.

Die Therapie von Rezidiven beschränkt sich häufig auf eine antiödematöse Behandlung, z.B. mit Steroiden. Eine chirurgische Rezidivoperation muß im Einzelfall in Erwägung gezogen werden und richtet sich vor allem auch nach dem klinischen Zustand des Patienten. Nachgewiesen wirksam sind zum Beispiel lokale Strahlentherapieverfahren (Gutin et al., 1987; Loeffler et al., 1990a; Loeffler et al., 1990b; Ostertag, 1994).

Von mindestens ebenso entscheidender Bedeutung ist eine suffiziente palliative Therapie. Bei den hierbei auftretenden Problemen handelt es sich häufig um epileptische Anfälle, gesteigerten Hirndruck, Schmerzen, Schäden durch Immobilisation und hirnorganische Psychosyndrome. Eine entsprechende psychoagogische Führung, ggf. mit einer supportiven Psychotherapie, ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Palliation.

Aufgrund der schlechten Prognose der Hirntumoren wird von je her große Hoffnung in die Möglichkeit einer Gentherapie gesetzt. Der Gedanke ist naheliegend, daß bei einer Erkrankung, der eine Schädigung des Erbgutes zugrunde liegt, durch Reparatur der DNA eine kausale Heilmethode zur Verfügung stünde. Es existieren bereits mehrere funktionierende Ansätze in vitro, mit bestimmten Vektoren RNA- oder DNA-Fragmente in Zellen einzubringen und dort zu integrieren. Diese Technik ist bei industriellen Vorgängen, wie z.B. der Herstellung von

Vaccinen, heutzutage schon Standard. Leider gibt es noch keinen überzeugenden Therapieerfolg in vivo. Das betrifft auch die Therapie von Glioblastomen. Es treten immer wieder schwerwiegende Komplikationen durch immunologische Reaktionen auf die Vektoren oder unkontrollierte Mutationen auf. Die Frage der Ausbeute an rekombinierten Genen gerade bei derart hochmalignen Neoplasien wie den Glioblastomen ist ebenfalls von Bedeutung.

## 1.2 *TP53*

*TP53* ist das in Tumoren am häufigsten defekte Suppressorgen. Schätzungen nach soll es ungefähr in der Hälfte aller Fälle zu Veränderungen in seiner Funktion kommen (Harris und Hollstein, 1993). In der Neuropathologie spielt es ebenfalls eine große Rolle. So konnte gezeigt werden, daß in 25%-45% der häufigsten primären ZNS-Tumoren, Astrozytomen und Glioblastomen Mutationen des *TP53* Genes oder Schädigungen am *TP53* Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 vorliegen (Louis, 1994; Louis et al., 1993; Newcomb et al., 1993; von Deimling et al. 1993). Dabei sind Astrozytome der WHO Grade II und III mit etwa 50% und Glioblastome mit ca. 30% betroffen. (Louis, 1994; von Deimling et al., 1992). Seltener sind dahingegen Veränderungen von *TP53* in pilozytischen Astrozytomen, Oligodendrogliomen, Medulloblastomen, Ependymomen, Meningeomen und Neurinomen zu finden (Adesina et al., 1994; Lous, 1994; Ohgaki et al., 1991).

Das Gen, welches für ein offenes Leseraster von 393 Aminosäuren kodiert, ist in der Region 13.1 auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert. Seine Struktur besteht aus einer großen Betafaltblattstruktur, die als Gerüst für drei schleifenbildende Elementen fungiert. Die erste Schleife bindet an die große Furche der DNA, die zweite an die kleine Furche und die dritte stützt die zweite, um sie zu stabilisieren (Vogelstein und Kinzler, 1994). Die am häufigsten in Tumoren auftretenden Mutationen liegen in der Nähe dieser DNA-bindenden Regionen.

Zur Regulatorregion des Genes gehören zwei Promotoren (Reisman et al., 1988). Der erste liegt vor Exon 1 und ist verantwortlich für die Transkription der Haupt mRNA. Der Zweite liegt im ersten Intron, etwa 1000 bp abwärts von Exon 1. Die Expression von *TP53* kann durch Störung der Zellhomöostase und der daraus resultierenden DNA Schädigung induziert werden (Lee und Bernstein, 1993; Shieh et al., 1997).

Die Funktion des *TP53* Genes ist die eines Suppressorgenes. So ist es in der Lage, entweder direkt oder über die Induktion der Expression anderer Gene, wie zu Beispiel dem *WAF1* Gen (El-Deiry et al., 1993), den Zellzyklus in der G<sub>1</sub> Phase anzuhalten. Anschließend werden die notwendigen DNA Reparaturen eingeleitet.

Diese Funktion kann auf verschiedene Arten gestört werden. Dies kann durch eine Herabsetzung der *TP53* Menge der Fall sein, z.B. durch Allelverlust, Schädigung der Promotorregionen oder durch Nonsense-, bzw. Splice-Mutationen. Missense-Mutationen, die zu einem dominant-negativen Effekt führen, werden z.B. besonders häufig in Colon-, ZNS-, Lungen-, Brust-, Haut- und Blasen-tumoren gefunden (Vogelstein und Kinzler, 1992). Eine weitere Möglichkeit des Funktionsverlustes besteht in der funktionellen Inaktivierung durch Bindung an Produkte viraler Onkogene, wie dem *E6* Gen des HPV. Dieser Mechanismus spielt anscheinend bei bestimmten Formen des Halskrebses eine Rolle. Im Normalzustand wird die Expression von *TP53* durch negative Regulatorgene wie dem *JNK* oder dem *MDM2* Gen kontrolliert. Deshalb kann eine Amplifikation des *MDM2* Genes und eine damit verbundene Überexpression ebenfalls Ursache einer verminderten *TP53* Funktion sein. Dies ist vermutlich bei einer Vielzahl von Sarkomen der Fall (Oliner et al., 1992).

Durch die obengenannten Schäden kommt es zu dem Verlust der Kontrollpunkt-Funktion in der G<sub>1</sub> Phase. Es kann zur weiteren Anhäufung von Mutationen kommen, die letztendlich zu einer Malignisierung führen (Lane, 1992).

Darüber hinaus ist *TP53* ein wichtiges Enzym im Ablauf der Apoptose. Es ist in der Lage, die Transkription von redoxbezogenen Genen zu induzieren, die Bildung von Sauerstoffradikalen hervorzurufen und die Oxidation von Mitochondrienbestandteilen einzuleiten. Dies führt schließlich zum programmierten Zelltod (Polyak et al., 1997). Auch der Verlust dieser Eigenschaft kann zur Vermehrung der Tumorzellen beitragen.

Es sind nicht nur somatische Mutationen im *TP53* Gen bekannt. Dem dominant vererbten Li-Fraumeni Syndrom liegt eine Keimbahnmutation der Anhäufung familiärer Tumoren zu Grunde (Malkin et al., 1990). Die Betroffenen leiden gehäuft an multiplen Primärtumoren wie Weichteilsarkomen, Osteosarkomen, Mammakarzinomen, Gehirntumoren, Nebennierenrindenzinomen und Leukämien.

### 1.3 *PTEN*

Das *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) Gen kodiert für ein Produkt von 403 Aminosäuren Länge im offenen Leseraster. Sein Genlocus liegt bei 10q23. Mutationen dieses Genes sind zu einem hohen Anteil unter Prostatakarzinomen, Glioblastomen und Mammakarzinomen zu finden (Li et al., 1997).

Das auch als *MMAC1* (mutated in multiple advance cancers-1) bezeichnete Gen enthält Sequenzmotive mit hoher Ähnlichkeit zu katalytischen Domänen von Phosphatasen und dem Zytoskelettbestandteilen Tensin und Auxilin (Steck et al., 1997).

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von *PTEN* das Wachstum und die Malignität von Glioblastomzellen unterdrücken kann (Li und Sun, 1998). *PTEN* ist in der Lage, den Zellzyklus in der G<sub>1</sub> Phase durch Hemmung des PI3K/Akt Pathway zu unterbrechen und die Sensitivität für Apoptose zu erhöhen (Dahia et al., 1999). Es ist ferner in der Lage, die Bildung von hypoxieinduzierten, vasoendothelialen Wachstumsfaktoren zu unterdrücken und somit die Gefäßneubildung von malignen Tumoren zu verhindern (Wen et al. 2001; Zundel et al., 2000). Dies führt zur Herabsetzung deren Ausbreitungsfähigkeit. Eine weitere Möglichkeit, von *PTEN* die Verbreitung von Tumorzellen zu unterbinden besteht darin, die Phosphorylierung von FAK (Focal Adhesion Kinase) zu reduzieren und somit die Zellinteraktion mit der extrazellulären Matrix einzuschränken (Tamura et al., 1998).

Keimbahnmutationen des *PTEN* Genes können zur Ausbildung der Cowden Krankheit (Liaw et al., 1997; Nelen et al., 1997) oder des Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndromes (Arch et al., 1997; Marsh et al., 1997) führen. Das Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome äußert sich meist schon bei jungen Patienten und prädestiniert zu Makrozephalie, Lipomen, hamartösen intestinalen Polypen, vaskulären Malformationen, Hashimoto Thyreoiditis und einer gefleckten Pigmentation des Penis. Die Cowdensche Krankheit hingegen äußert sich in der Regel erst bei älteren Patienten. Sie geht sowohl mit der Bildung von Hamartomen in verschiedenen Organen als auch mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs (75% aller Frauen) oder Schilddrüsenkarzinomen zu erkranken einher. Typischerweise sind bei der Cowdenschen Krankheit alle Exone mit Ausnahme von 1,4 und 9 betroffen (Longy et al., 1998). Besonders häufig ist Exon 5 mutiert, welches die Phosphatase Region enthält (Marsh et al., 1998).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 ZNS Tumoren und Patientendaten**

Alle in dieser Studie verwendeten Tumoren und Patientendaten stammen aus einem Kollektiv von 97 Patienten, die in der Abteilung für Neurochirurgie der Universität Bonn zwischen Juli 1992 und April 1996 behandelt und operiert worden sind. Bei allen Patienten wurde histologisch nach den Richtlinien der WHO (Kleihues et al., 1993) die Diagnose eines Glioblastoma multiforme durch die Abteilung für Neuropathologie der Universität Bonn gestellt. Voraussetzungen für die Aufnahme in die Studie waren ein Alter von 18 Jahren oder mehr, die Verfügbarkeit von ausreichend frisch gefrorenem Material, entsprechenden Blutproben und Informationen über den weiteren Verlauf der Erkrankung während der nächsten zwei Jahre. Alle Patienten haben in die erweiterte morphologische und molekulardiagnostische Analyse ihrer Tumoren und der entsprechenden Blutproben eingewilligt. Die Ethikkommission der Universität Bonn hat dieser Studie zugestimmt. Es sind bereits teilweise Daten von 19 der 97 Patienten in vorangegangenen Studien veröffentlicht worden (Schmidt et al., 2002; von Deimling, 2000).

### **2.2 Histopathologische und immunhistochemische Einteilung**

Jeder Tumor wurde histologisch und immunhistochemisch nach seinem vorherrschenden Zelltyp, weiterem typischen Zellmuster und dem Vorhandensein von anderen Zelltypen eingeteilt. Nach der Einteilung in diese drei Kriterien ergaben sich folgende Klassifizierungen: kleinzellig undifferenziert, fibrillär, gemistozytisch, klarzellig, spindelzellig und oligodendrogial. Die Schnitte wurden außerdem nach Stellen höherer Differenzierung (nicht vorhanden, fibrillär, gemistozytisch, oligodendrogial, ependymal) durchsucht. Die Proliferation der Zellen wurde durch Zählung der Mitosen (0-5/HPF, 6-10/HPF und >10/HPF) und nach Bestimmung des Anteiles von MIB-1 positiven Nuklei (<2%, 2%-5%, 6%-10% und >10%) erfaßt. Das Vorhandensein von Nekrosen wurde in folgende vier Kategorien eingeteilt: nicht vorhanden, vereinzelte Zellen, bandförmig mit Bildung von Pseudopalisaden und ausgedehnt vorhandene Gebiete. Die mikrovaskuläre Proliferation wurde in folgende drei Kategorien eingeteilt: nicht vorhanden, mäßiggradig und glomeruloid/ausgedehnt. Ebenfalls erfaßt wurde sarkomatöses Wachstum (nicht vorhanden, vorhanden, vorherrschend, Gliosarkom). Die lymphatische Infiltration wurde in drei Grade eingeteilt: nicht vorhanden, mäßig/fokal, ausgedehnt. Das Auftreten von Thrombosen und Verkalkungen wurde registriert (nicht vorhanden, vorhanden).

Es wurde ebenfalls die Expression von *GFAP* untersucht: nicht vorhanden, vereinzelte Zellen, Zellgruppen, mehr als 30% der Tumorzellen.

### 2.3 Extraktion von DNA aus Blut und Tumoren

Die Extraktion von DNA erfolgte nach einem Protokoll von Sambrook et al. (1989). Das frisch entnommene Tumormaterial (ca. 100 µg) wurde mittels eines Kryostaten in 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese lassen sich bei -80 °C aufbewahren. Beim Schneidevorgang wurde regelmäßig histologisch kontrolliert, damit nicht versehentlich gesunde Anteile verwertet wurden. Um die DNA später herauslösen zu können wurden die Schnitte in flüssigen Stickstoff gegeben und 2,5 ml einer Saline-EDTA-Lösung dazugegeben.

Zur Gewinnung der DNA aus den Leukozyten der korrespondierenden Blutproben wurden 20 ml Citrat-Blut (bei geringeren Volumen mit 1x Warner's Solution aufgefüllt) im Verhältnis 1:1 mit 2x Sucrose-Lösung und 500 µl Nonidet-P40 gemischt und anschließend für eine Stunde bei 4000 UpM und 4 °C zentrifugiert (Minifuge GL). Dem Pellet wurde erneut 2,5 µl Saline-EDTA-Lösung zugesetzt. Dieser Lösung wurden 3,5 ml einer Mischung aus 2,7 ml Tumor-TNE, 600 µl 10% SDS-Lösung und 200 µl Proteinase K Lösung (10 mg/ml) zugesetzt und über Nacht bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Darauf folgte die Extraktion: 2x mit Phenol, 1x mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform. Die Proben wurden dabei jeweils 15 Minuten auf einem Rotator geschwenkt, anschließend bei 4000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues Röhrchen übernommen. Als letzter Schritt erfolgte die Fällung der DNA in 10 mM KCl und 2,5 Vol. 100% Ethanol. Die so erhaltene DNA kann mit einer Glaspipette aufgenommen und in einem TE Puffer gelöst werden.

Die DNA-Extraktion wurde freundlicherweise von Fr. O. Schmidt, MTA, durchgeführt.

### 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA Fragmente. Anfang und Ende der betreffenden Region werden hierbei durch ein Paar Primer (Oligonukleotide) bestimmt, die jeweils komplementär zu dem entsprechenden Hin- bzw. Rückstrang sein müssen. Die DNA muß, damit sich die Primer anlagern können, denaturiert sein. Dies erreicht man durch Erhöhung der Temperatur (Denaturierung). Wird die Temperatur danach wieder abgesenkt, lagern sich zuerst die kleineren Primeroligonukleotide an (Annealing).

Diese für jedes Primerpaar leicht unterschiedliche Temperatur wird daher auch als Annealing-Temperatur bezeichnet. In einem dritten Schritt wird die Temperatur auf das Optimum der Taq-Polymerase eingestellt. Dieses Enzym synthetisiert, ausgehend von den Primern, eine komplementäre Sequenz des jeweiligen Einzelstranges (Extension). Wird dieser Zyklus mehrfach durchlaufen, so vervielfältigt sich die Menge an DNA-Fragmenten exponentiell.

Die Primersequenzen für die Exone 5-8 des *TP53* Genes sind der Veröffentlichung von Gaidano et al. (1991) entnommen worden:

*TP53* Primersequenzen:

Primer	Exon	Sequenz
1107	5a forward	TCAACTCTGTCTCCTTCCTC
1108	5a reverse	CTGTGACTGCTTGTAGATGG
1109	5b forward	GTGGGTTGATTCCACACCCC
1110	5b reverse	AACCAGCCCTGTCGTCTCTC
1111	6 forward	AGGCCTCTGATTCCTCACTG
1112	6 reverse	AGAGACCCCAGTTGCAAACC
1113	7 forward	GGCCTCATCTTGGGCCTGTG
1114	7 reverse	GTGTGCAGGGTGGCAAGTGG
1115	8 forward	AATGGGACAGGTAGGACCTG
1116	8 reverse	ACCGCTTCTTGCCTGCTTG

Tab. 1: Primersequenzen für die Durchführung der *TP53* PCR wie oben beschrieben

Die PCR wurde in einem Reaktionsansatz von 10 µl durchgeführt. Dieser bestand jeweils aus einer Pufferlösung (10 mmol Tris/HCl pH 8,5, 50 mmol KCl, 0,1% Gelatine), je 200 µmol dATP, dGTP, dCTP, und dTTP, 1,0 bis 2,0 mmol MgCl<sub>2</sub> je 10 pmol Vor- und Rückprimer, 0,25 U Taq-Polymerase und ca. 10 ng der zu untersuchenden genomischen DNA. Der Reaktionsansatz wurde in ein Eppendorf Röhrchen pipettiert und abschließend mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet, um Volumenverlust durch Verdampfung zu unterbinden. Die Reaktion wurde auf



einem Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Das hierfür notwendige Programm bestand aus folgenden Schritten:

- I. Initiale Denaturierung für 3 Minuten bei 94 °C
- II. 25 - 30 Zyklen:
  - II.1. Denaturierung für 30 Sekunden bei 94 °C
  - II.2. Anlagerung der Primer für 50 Sekunden bei 61 bis 63 °C
  - II.3. Synthese für 50 Sekunden bei 72 °C
- III. Abschließender Verlängerungsschritt für 10 Minuten bei 72 °C

Die tatsächlichen Bedingungen sind für die speziellen Gegebenheiten im Labor empirisch bestimmt worden. Sie können von einer Vielzahl äußerer Faktoren beeinflusst und entsprechend eingestellt werden. Der Erfolg der PCR wurde auf einem Agarosegel semiquantitativ kontrolliert. Dazu wurden jeweils 2 µl einer Testprobe zusammen mit 5 µl eines Ladepuffers (0,25% Bromphenolblau und Xylencyanol mit 15% Ficoll 400 in H<sub>2</sub>O dd) auf ein 2%iges Agarosegel (70 ml 0,6x TBE, 1,4 g Agarose und 7,5 µg Ethidiumbromid) aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese dauert bei 150 V etwa 5 – 10 Minuten. Zur Identifizierung und zur Abschätzung der Intensität der Probe wurde ein Längenstandard (pUC19 DNA/Mspl(HpaII), MBI Fermentas ) mit aufgetragen. Als optimale Bedingung ist diejenige anzunehmen, bei der unter UV Licht die schärfste Bande mit der größten Intensität zu sehen ist.

Die so ermittelten Bedingungen waren für den verwendeten Versuchsaufbau wie folgt:

#### TP53 Primerbedingungen

Primer	TP53 Gen Exon	mmol MgCl <sub>2</sub>	Annealing Temperatur °C
1107 / 1108	5a	1,25	61
1109 / 1110	5b	1,25	63
1111 / 1112	6	1,5	61
1113 / 1114	7	1,25	61
1115 / 1116	8	1,25	61

Tab. 2: Bedingungen für die Durchführung der TP53 PCR wie oben beschrieben

Die Primer für die PCR des *PTEN* Genes wurden von der Firma MWG hergestellt. Die verwendeten Sequenzen waren wie folgt:

*PTEN* Primersequenzen

Primer	<i>PTEN</i> Gen Exon	Sequenz
1346	UT forward	GCCGTTCCGGAGGATTATTCG
1347	UT reverse	AGAGATGGCAGAAGCTGCTG
1423	1 forward	CCAGCAGCTTCTGCCATCTC
1424	1 reverse	AGGAGCAGCCGCAGAAATGG
1350	2 forward	GTTTGATTGCTGCATATTTCA
1351	2 reverse	TCTAAATGAAAACACAACATGAA
1318	3 forward	ATAGAAGGGGTATTTGTTGGA
1319	3 reverse	CCTCACTCTAACAAGCAGATA
1354	4 forward	ATTCAGGCAATGTTTGTTAG
1355	4 reverse	CAACATAGTACAGTACATTC
1356	5a forward	TCTGAGGTTATCTTTTTACC
1357	5a reverse	TATGCACATATCATTACACC
1425	5b forward	AATTCACTGTAAAGCTGGAA
1426	5b reverse	AAGAGGAAAGGAAAAACATC
1360	6 forward	CTTCTCTTTTTTTTCTGTCC
1361	6 reverse	AAGGATGAGAATTTCAAGCA
1362	7a forward	TTCCTGTGAAATAATACTGG
1363	7a reverse	GAACTCTACTTTGATATCAC
1364	7b forward	AGTTCATGTACTTTGAGTTC
1365	7b reverse	TCCAATGAAAGTAAAGTAC
1366	8a forward	CAGATTGCCTTATAATAGTC
1367	8a reverse	TCCTGGTATGAAGAATGTAT
1368	8b forward	AGGACAAAATGTTTCACTTTTGG
1369	8b reverse	GTAAGTACTAGATATTCCTTGTC
1370	8c forward	GAAATCGATAGCATTTCGAG
1371	8c reverse	ATACATACAAGTCACCAACC
1372	9a forward	AGATGAGTCATATTTGTGGG
1373	9a reverse	ATGATCAGGTTTCATTGTCAC
1374	9b forward	CAGTTCAACTTCTGTAACAC
1375	9b reverse	ATGGTGTTTTATCCCTCTTG

Tab. 3: Primersequenzen für die Durchführung der *PTEN* PCR wie oben beschrieben

Das für *PTEN* verwendete Programm für den Thermocycler von Biometra war wie folgt:

I. Initiale Denaturierung für 3 Minuten bei 94 °C

II. 25 - 30 Zyklen:

II.1. Denaturierung für 30 Sekunden bei 94 °C

II.2. Anlagerung der Primer für 40 Sekunden bei 50 bis 55 °C

II.3. Synthese für 40 Sekunden bei 72 °C

III. Abschließender Verlängerungsschritt für 10 Minuten bei 72 °C

Die *PTEN* Bedingungen für die PCR waren:

*PTEN* PCR Bedingungen

Primer	<i>PTEN</i> Gen Exon	mmol MgCl <sub>2</sub>	Annealing Temperatur °C
1346 / 1347	UT	1,5	50
1423 / 1424	1	1,8	50
1350 / 1351	2	1,5	54
1318 / 1319	3	1,5	55
1354 / 1355	4	2,0	50
1356 / 1357	5a	1,5	55
1425 / 1426	5b	1,8	50
1360 / 1361	6	1,5	54
1362 / 1363	7.1	1,5	50
1364 / 1365	7.2	1,5	50
1366 / 1367	8.1	2,0	50
1368 / 1369	8.2	1,5	54
1370 / 1371	8.3	1,5	54
1372 / 1373	9.1	1,5	54
1374 / 1375	9.2	1,5	54

Tab. 4: Bedingungen für die Durchführung der *PTEN* PCR wie oben beschrieben

## 2.5 SSCP Analyse

Die SSCP (single strand conformational polymorphism) Analyse ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe man Unterschiede in DNA Strängen bis hin zu einer Base finden kann (Orita et al., 1989). Die Sensitivität ist hierbei im Allgemeinen hoch – etwa 80% Entdeckungswahrscheinlichkeit bei einem Durchlauf und einer Fragmentlänge von unter 300 bp (Hayashi and Yandell, 1993). Steigt die Fragmentlänge über 300 bp an, sinkt die Sensitivität ab. In solchen Fällen müssen Modifikationen angewendet oder das Verfahren gewechselt werden. Vorab werden die DNA Fragmente bei 95° C für 10 min denaturiert. Anschließend werden die so entstandenen Einzelstränge auf Eiswasser wieder zügig abgekühlt. Hierbei kommt es nicht zur langsamen Renaturierung, sondern zu Rückfaltungen und Bildung von Sekundärstrukturen.

Zur weiteren Analyse werden die DNA Fragmente auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen (PAGE). Hierbei bilden sich in charakteristischer Weise zwei Banden aus, welche die beiden Einzelstränge repräsentieren. Kommt es durch Mutation zur Veränderung der Basenfolge und somit zu einer unterschiedlichen Sekundärstruktur folgt hieraus aus sterischen Gründen ein anderes Laufverhalten. Statt einer Doppelbande entstehen Mehrfachbanden („Shift“). Die zwei Banden, welche auf der Höhe aller übrigen Banden des Gels liegen entsprechen der Wildtyp DNA. Die aberrant laufenden Banden enthalten die potentiell mutierte DNA.

Die Ausbildung der Sekundärstruktur ist jedoch nicht nur abhängig von der Basenfolge der DNA, sondern auch von der Länge des Produktes, der Position der Mutation, den Elektrophoresebedingungen, der Acrylamidkonzentration des Gels, dem Bisacrylamid/Acrylamid Verhältnis, dem Hinzufügen oder Weglassen von Glycerol, der angelegten Spannung, der Laufzeit, der Konzentration des Ladepuffers und der Umgebungstemperatur. Dies bedeutet, daß je nach verwendeter Bedingung, zwischen 70 und >90% aller Mutationen entdeckt werden können (Michaud et al., 1992; Savov et al., 1992; Sheffield et al., 1993).

Die für das entsprechende Primerpaar optimalen Bedingungen müssen vorher empirisch ermittelt werden. Ergeben sich für bestimmte Primerpaare sehr ähnliche Bedingungen, und ist das Laufverhalten der Banden sehr unterschiedlich, kann man das Gel auch doppelt laden. Sollten sogar die PCR Bedingungen ähnlich genug sein, besteht die Möglichkeit, die PCR auch mit beiden Primerpaaren in einem Ansatz als sogenannte Multiplex-PCR durchzuführen.

Die für das *TP53* Gen ermittelten Bedingungen lauten:

*TP53* Gelbedingungen

Primer	Arcrylamid/Bisacrylamid Konzentration	Vernetzung	Leistung	Laufzeit ca.
1107 / 1108	10%	1:59	8 W	16 h
1109 / 1110	12%	1:29	10 W	16 h
1111 / 1112	10%	1:59	8 W	16 h
1113 / 1114	10%	1:59	8 W	16 h
1115 / 1116	12%	1:29	10 W	16 h

Tab. 5: Gelbedingungen für die SSCP Analyse von *TP53* Mutationen

Die für das *PTEN* Gen ermittelten Bedingungen lauten:

*PTEN* Gelbedingungen

Primer	Arcrylamid/Bisacrylamid Konzentration	Vernetzung	Leistung	Laufzeit ca.
1346 / 1347	10%	1:59	7 W	20 h
1423 / 1424	12%	1:79	10 W	18 h
1350 / 1351	12%	1:79	10 W	18 h
1318 / 1319	12%	1:29	10 W	16 h
1354 / 1355	12%	1:79	10 W	18 h
1356 / 1357	12%	1:29	10 W	16 h
1425 / 1426	12%	1:79	10 W	18 h
1360 / 1361	12%	1:79	10 W	18 h
1362 / 1363	14%	1:99	10 W	16 h
1364 / 1365	10%	1:59	7 W	20 h
1366 / 1367	12%	1:79	10 W	18 h
1368 / 1369	12%	1:79	10 W	18 h
1370 / 1371	12%	1:79	10 W	18 h
1372 / 1373	12%	1:79	10 W	18 h
1374 / 1375	12%	1:79	10 W	18 h

Tab. 6: Gelbedingungen für die SSCP Analyse von *PTEN* Mutationen

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Gelkammern (Pokerface II) der Firma Hoefer (San Francisco, USA) verwendet. Der Ansatz des Geles betrug jeweils 70 ml und wurde nach obigem Mischungsverhältnis angesetzt. Als Polymerisationsstarter wurden 20 µl TEMED hinzugefügt. Diese Mischung wurde luftblasenfrei zwischen zwei silanisierte, mit Klebeband versiegelte Glasplatten gegossen. Die Abstandhalter hatten eine Dicke von ca 0,35 mm. Um die Taschen für die Proben zu bilden wurde ein Kamm mit 35 Zacken verwendet. Nach etwa zwei Stunden ist das Gel ausreichend polymerisiert um aufgebaut und verwendet werden zu können.

Die Pufferkammern wurden mit 1x TBE gefüllt. 10 µl des PCR Ansatzes wurden mit je 5 µl Ladebuffer versetzt. Anschließend erfolgte die oben beschriebene Denaturierung und Abkühlung der Proben. Dann wurden die Proben in die Taschen pipettiert und zusammen mit einem Längenstandart (*pUC19* DNA/Mspl(HpaII), MBI Fermentas ), einer Leerprobe und einer bekannten mutierten DNA als Kontrollprobe geladen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt.

## 2.6 Silberfärbung

Um die DNA in den Polyacrylamidgelen wieder sichtbar zu machen, müssen die Gele nach dem vorsichtigen Abbauen mit einer Silberfärbung behandelt werden (Budowle et al., 1991).

Hierzu wird nach dem Trennen der beiden Glasplatten ein spezieller Färberahmen (Bender et al., 1994) auf die Glasplatte geschraubt, an der das Gel haften geblieben ist. Dadurch wird das Gel fixiert und es ist möglich die verschiedenen Lösungen für das Färben direkt auf das Gel zu bringen.

Lösung	Inkubationsdauer
10% Ethanol	5 min
1% Salpetersäure	3 min
H <sub>2</sub> O dd	1x waschen
Silbernitrat	Mindestens 20 min
H <sub>2</sub> O dd	1x waschen
Natriumbicarbonat	Mehrere Waschschritte – bis die Banden sichtbar werden
10% Essigsäure	5 min
H <sub>2</sub> O dd	1x waschen

Tab. 7: Abfolge der Arbeitsschritte bei der Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Das Prinzip der Färbung beruht auf einer unspezifischen Anlagerung von positiv geladenen Silberionen an die negativ geladene DNA. Durch die Applikation eines Entwicklers, in dem Fall Natriumbicarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) werden die Silberionen reduziert zu elementarem Silber und es erscheinen schwarze Banden wo sich die DNA im Gel befindet.

Anschließend werden die Gele auf Filterpapier aufgenommen und mit Hilfe eines Vakuumtrockners (Slab Gel Dryer, Hoefer, San Francisco, USA) haltbar gemacht.

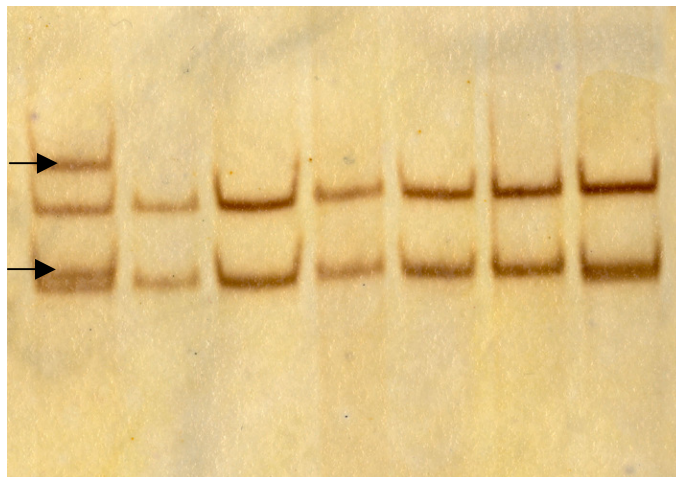


Abb. 1: Ausschnitt aus einem 14% Acrylamidgel (1:99); Dargestellt ist ein „Shift“ in Exon 6 des *TP53* Genes (Pfeilmarkierung).

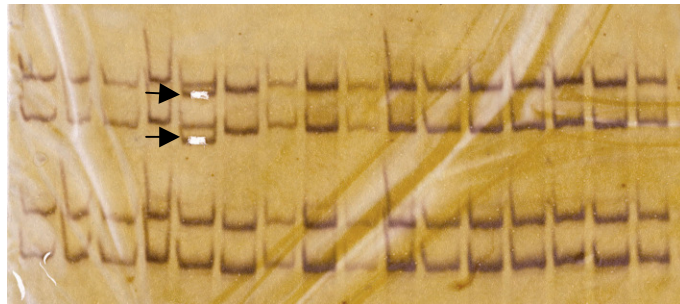


Abb. 1: Ausschnitt aus einem 12% Acrylamidgel (1:79); Die obere Reihe von Doppelbanden entspricht dem Exon 6 von *PTEN* und die untere Reihe dem Exon 9 (1374/1375) von *PTEN*. Diese PCR ist ein Beispiel für eine Multiplex-PCR, bei der zwei unterschiedliche Primerpaare in einem Ansatz verwendet werden. Ebenfalls zu sehen ist wie ein „Shift“ (Pfeilmarkierung) zur DNA Isolierung sauber ausgeschnitten wurde, ohne mit Material der Wildtyp DNA vermischt zu werden.



## 2.7 DNA – Isolierung

Die DNA aus dem Blut des Patienten und aus dem Tumorgewebe wurden neben einander aufgetragen. Zeigen sich aberrant laufende Banden in beiden Proben kann das für eine Keimbahnmutation, meistens einen Polymorphismus, sprechen. Unterscheidet sich nur die Tumor DNA in ihrem Laufverhalten gegenüber den anderen DNAs, kann dies für eine Neumutation sprechen. Zur eindeutigen Klärung muß die Sequenz der potentiellen Mutation und der Wildtyp DNA ermittelt werden.

Zur Weiterverarbeitung der DNA wird diese aus dem noch feuchten Gel direkt nach dem Aufziehen auf das Filterpapier ausgeschnitten. Hierbei ist darauf zu achten, daß nur die aberrant laufende Bande, der „Shift“, ausgeschnitten wird, um für die Sequenzierung benötigte hemizygot DNA zu erhalten und eine Signalüberlagerung mit der Wildtyp DNA zu vermeiden. Das ausgeschnittene Gelstück wird in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 10 min auf einem Heizschüttler bei 50° C aufgelöst.

Um eine genügende Menge an DNA für die Sequenzierung zu erhalten, wird eine Reamplifikations-PCR durchgeführt. Hierbei werden 5 µl der gelösten shift-DNA als Matrize verwendet. Die Bedingungen der PCR werden bis auf das Reaktionsvolumen, das jetzt 50 µl beträgt, entsprechend beibehalten. Der Erfolg der Reamplifikation wird, wie oben beschrieben, mit einem Agarosegel, auf das 2 µl der Probe mit 5µl Ladepuffer aufgetragen werden, kontrolliert.

Zur Reinigung des PCR-Produktes von Primermolekülen und allen übrigen Reaktionskomponenten wurde das High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim) und die dazu gehörenden High Pure Filtrationsgefäße (Boehringer Mannheim) verwendet. Als erstes wird dem Reaktionsgemisch 250 µl des Bindungspuffers zugesetzt. Danach wird der Reaktionsansatz in ein High Pure Filtrationsgefäß pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation für 30s bei maximaler Geschwindigkeit in einer Standardtischzentrifuge. Durch den Puffer bindet die DNA an die Membran der Säule und der Rest läuft in das Auffanggefäß und kann verworfen werden. Um die Reinheit noch zu erhöhen werden zwei Waschschrte mit jeweils 500 und 200 µl des mitgelieferten Waschpuffers durchgeführt, bei dem ebenfalls mit maximaler Geschwindigkeit für jeweils eine Minute zentrifugiert wird. Anschließend muß das Auffanggefäß durch ein neues, sauberes 1,5 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß ersetzt werden. Um die DNA wieder zu lösen, werden 30 µl H<sub>2</sub>O auf die Mitte der Membran pipettiert und für 30s mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Für eine optimale Sequenzierung schlägt der Hersteller des Sequenzierkits eine Menge von ca. 20 ng DNA vor. Daher ist es nach der Reamplifikation und Aufreinigung der Proben noch

notwendig deren ungefähren DNA Gehalt abzuschätzen und entsprechend zu verdünnen. Hierzu werden 3 µl der Proben auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel, wie bereits mehrfach verwendet, aufgetragen. Da die Leuchtintensität der Banden dem Gehalt an DNA proportional ist, kann durch den Vergleich mit den einzelnen Banden des Längenstandards die DNA Menge der Probe errechnet werden.

## 2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde auf einem semiautomatischen Sequenzierer (Applied Biosystems, Modell 373A, Foster City, USA) unter Verwendung eines Taq Sequenzierkit (ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit, Perkin Elmer, Alameda, USA) durchgeführt. Hierbei wurden der Vor- und Rückstrang einzeln amplifiziert und sequenziert.

Die Sequenzierung folgte im Prinzip der ursprünglichen Methode nach Sanger. Dabei werden einem Standard PCR Ansatz noch zusätzlich 2',3'-Dideoxynukleotide (ddNTPs) hinzugefügt. Baut die Taqpolymerase ein solches ddNTP statt einem dNTP ein, kommt es zum Abbruch der DNA Synthese und es resultiert ein Fragment verkürzter Länge. Durch die verschiedenen Zyklen der PCR und dem randomisierten Einbau der ddNTPs kommt es zur Ansammlung verschieden langer Fragmente, die sich mit Hilfe einer Gelelektrophorese der Länge nach auftrennen lassen. Da die jeweiligen Terminatoren entsprechend ihrer Basen außerdem mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, ist es anschließend möglich die Reihenfolge durch einen Laserscanner lesen zu lassen. Der PCR Ansatz konnte aufgrund der vier verschiedenen Farben in einem Eppendorf Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Allerdings waren für jede Probe zwei Ansätze notwendig, da Vorwärts- und Rückwärtsstrang getrennt von einander amplifiziert werden müssen.

Für die PCR wurde das oben genannte Kit (TRR Mix) benutzt. Es besteht im wesentlichen aus Taqpolymerase, Puffer, dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Ein Reaktionsansatz besteht aus 2 µl TRR Mix, 1,6 µl des entsprechenden Primers (ca. 10 pMol), 3,4 µl H<sub>2</sub>O und 3 µl der Probe. Die PCR wurde auf einem Thermocycler (GeneAmp 9600, Perkin Elmer) durchgeführt.

Das Programm folgte folgendem Protokoll:

I. Initiale Denaturierung für 5 Minuten bei 96 °C

II. 25 Zyklen:

II.1. Denaturierung für 10 Sekunden bei 96 °C

II.2. Anlagerung der Primer für 5 Sekunden bei 50 °C

II.3. Synthese fürs 3,5 Minuten bei 60 °C

Um das Reaktionsgemisch von störenden Primerresten und anderen Verunreinigungen zu befreien, mußte die DNA noch gefällt und gewaschen werden. Hierzu wird dem Gemisch 1 µl einer 3M Natriumacetat Lösung und 25 µl 95% Ethanol hinzugefügt. Anschließend wird 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand kann verworfen werden. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit 250 µl 70% Ethanol, bei dem nur noch 10 Minuten zentrifugiert werden muß. Abschließend wird der Alkohol vorsichtig abpipettiert und das Pellet für 20 Minuten in der SpeedVac getrocknet.

Zur Elektrophorese wird ein denaturierendes 6%iges Polyacrylamidgel benötigt. Dieses besteht aus 9 ml Acrylamid-Stammlösung, 30 g Harnstoff, 6 ml 1x TBE und 23,5 ml H<sub>2</sub>O. Die Glasplatten müssen zuvor mit Alconox<sup>®</sup> vollständig von Rückständen befreit werden, um dem Laser ein fehlerfreies Ablesen der Banden zu ermöglichen. Die Pufferkammer des Sequenzierers wird mit 1x TBE gefüllt.

Die Pellets werden in einem Puffer aus 4µl (desionisiertes Formamid und 25 mmol EDTA pH 8.0, im Verhältnis 5:1) und 50 mg/ml Dextranblau aufgelöst. Nach einem erneuten Denaturierungsschritt von 10 Minuten bei 95 °C werden die Proben auf Eis gekühlt und sofort geladen. Das Gel läuft 10h bei 2500 V und 40 mA (30 W) bei Raumtemperatur.

Der Scanner befindet sich am unteren Ende der Platte und liest die vorbeilaufenden Basen mit Hilfe des rechnergestützten Signalverarbeitungssystem (Centris 650, Apple Macintosh) ein. Anschließend wird das so entstandene Farbprofil mit dem Data Collection und Data Analysis Programmen (Version 1.2.0 bzw. D1-7.1, Applied Biosystems) weiterbearbeitet und in Daten übersetzt. Zum Abschluß wird die Sequenz semi-automatisch durch den Sequence Editor (Version 1.0.3., Applied Biosystems) ermittelt. Hierbei werden Vor- und Rückstrang der Sequenzierung mit der Wildtypsequenz verglichen. Bei nicht eindeutigen Signalen verlangt das Programm nach einer manuellen Überprüfung. Wenn z. B. einige Peaks zu intensiv waren, kann dies zu Überlagerungen mit den benachbarten Basen führen, die der Computer dann nicht mehr unterscheiden kann. Anhand des Maximums läßt sich jedoch in der Regel entscheiden, wo die gelesene Base hingehört.

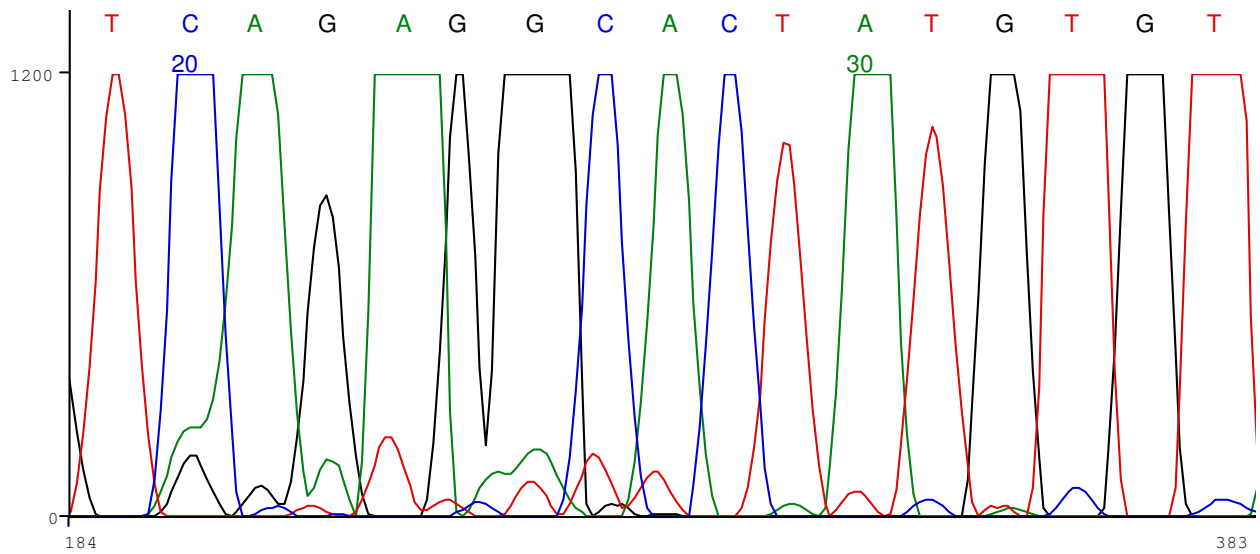


Abb. 3: Abgebildet ist eine *PTEN* Teilsequenz der Probe 4416. Ein Basenaustausch von CGC nach CAC in Codon 173 (hier in Leserichtung bei 27) führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin.

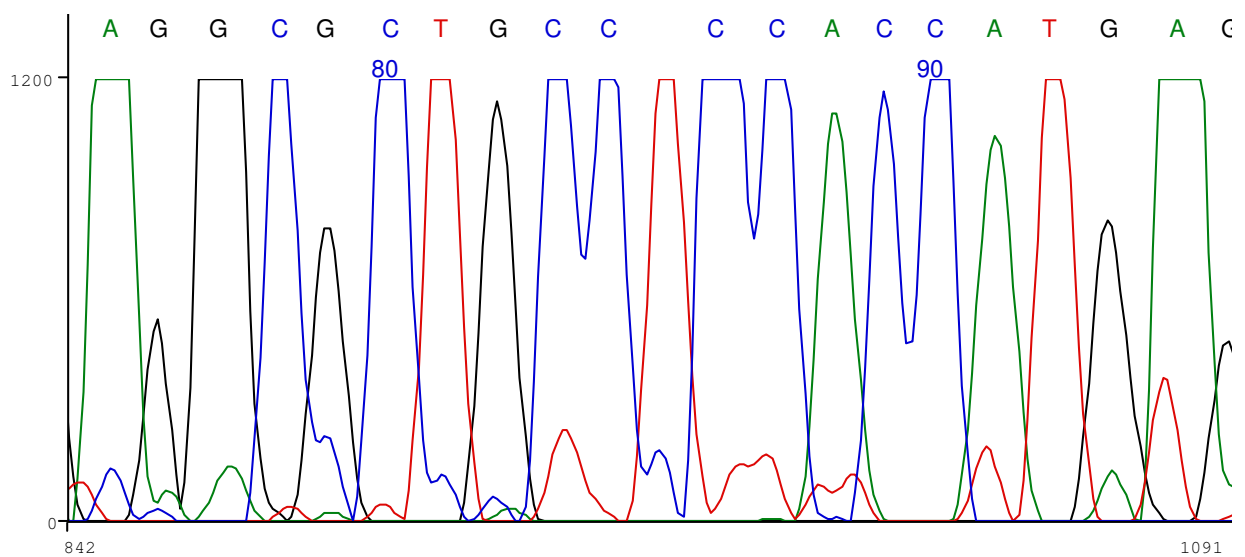


Abb. 4: Abgebildet ist eine *TP53* Teilsequenz der Probe 5162. Ein Basenaustausch von CCC nach CTC in Codon 177 (hier in Leserichtung bei 85) führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin.

## 2.9 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Firma	Filterpapier	Schleicher und Schüll
Acrylamid	Serva	Formaldehyd	Merck
Acrylamid (Sequenzierung)	BioRad	Formamid	Merck
Agarase	Boehringer	Glycerol	Sigma
Agarose	Sea Kem, FMC	Harnstoff	Sigma
Agarose (low melting)	Sea Plaque, FMC	Harnstoff (Sequenzierung)	Life Technologies
Alconox®	Aldrich	Kaliumchlorid	Merck
Amberlite®	Sigma	Magnesiumacetat	Merck
Ammoniumacetat	Merck	Magnesiumchlorid	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma	Natriumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat (Sequenzierung)	Kodak	Natriumcarbonat	Merck
Bisacrylamid	Serva	Natriumchlorid	Merck
Bisacrylamid (Sequenzierung)	BioRad	Natriumhydroxid	Merck
Borsäure	Sigma	Nonidet P40	Sigma
Borsäure (Sequenzierung)	Merck	Nylon-Membranfilter	Corning
Bromophenolblau	Merck	Paraffin	Merck
Chloroform	Merck	Phenol	Merck
CTAB	Fluka	2-Propanol	Riedel de Haen
Dichlordimethylsilan	Sigma	Proteinase K	Boehringer
DNA-Längenstandard	N <sup>o</sup> V, Boehringer	QIAQuick-Säulchen	QIAgen
DNTPs	Sigma	Salzsäure	Merck
EDTA	Boehringer	Salpetersäure	Merck
EDTA (Sequenzierung)	Sigma	SDS	Merck
Essigsäure	Merck	Sequenzierkit	Applied Biosystems
Ethanol	Merck	Silbernitrat	Merck
Ethidiumbromid	Sigma	Sucrose	Merck
Ficoll	Pharmacia	Taq Polymerase	Gibco
		TEMED	Sigma
		TEMED (Sequenzierung)	Molecular Biology Certified

TRIS	Trizma	Base,	Triton X 100	Sigma
	Sigma		Xylencyanol	Merck
TRIS (Sequenzierung)	BioRad			

Acrylamid-Stammlösungen für die SSCP-Analyse :

Gel	Acrylamid	Bisacrylamid	10x TBE	Glycerol	H <sub>2</sub> O
8% AA 1:79 5% Gly	79 g	1 g	100 ml	50 ml	ad 1000 ml
8% AA 1:79	79 g	1 g	100 ml	-	ad 1000 ml
12% AA 1:29 5% Gly	116 g	4 g	100 ml	50 ml	ad 1000 ml
12% AA 1:29	116 g	4 g	100 ml	-	ad 1000 ml
10% AA 1:29 5% Gly	96,6 g	3,3 g	100 ml	50 ml	ad 1000 ml

Gel	Acrylamid 40% Stammlösung	Bisacrylamid 2% Stammlösung	10x TBE	H <sub>2</sub> O
10% AA 1:59	17,21 ml	5,83 ml	7,00 ml	39,96 ml
12% AA 1:29	20,30 ml	14,00 ml	7,00 ml	28,70 ml
12% AA 1:79	20,74 ml	5,25 ml	7,00 ml	37,01 ml
14% AA 1:99	24,26 ml	4,90 ml	7,00 ml	33,85 ml

Lösungen für die Silberfärbung:

Ethanol	10% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH in H <sub>2</sub> O dd
Salpetersäure	1% HNO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O dd
Silbernitrat	2g AgNO <sub>3</sub> in 2l H <sub>2</sub> O dd
Entwickler	30g NaHCO <sub>3</sub> und 0,5 ml 37% H <sub>2</sub> CO in 1l H <sub>2</sub> O dd
Essigsäure	10% in H <sub>2</sub> O dd

## Lösungen für die Gelelektrophorese:

## 40% Acrylamid-Stammlsg.

Für Sequenziergele :

Acrylamid 76 g

Bisacrylamid 4 g

H<sub>2</sub>O dd ad 200 mlNach dem Lösen mit Amberlite<sup>®</sup> mischen und

durch 0,2 µm Filter filtrieren

DNA-Elutionspuffer

Ammoniumacetat 0,5 M

Magnesiumacetat 10 mM

EDTA 1 mM

SDS 0,1%

in H<sub>2</sub>O dd

## PAGE-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25%

Xylencyanol 0,25%

Glycerol 30%

in H<sub>2</sub>O dd

## Agarosegel-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25%

Xylencyanol 0,25%

Ficoll 15%

in H<sub>2</sub>O dd , vor Gebrauch 2:5 verdünnen

## SSCP-Ladepuffer

Formamid 90%

10x TBE 10%

EDTA 1 mM

SDS 0,01 %

Bromphenolblau 0,25%

Xylencyanol 0,25%

## 2x Sucrose-Lösung

Sucrose 218 g

TRIS 2,4 g

MgCl<sub>2</sub> 2,03 g

Triton-X-100 20 ml

H<sub>2</sub>O dd ad 1 l

pH 7,6 mit HCl einstellen

## 10x TBE-Puffer

TRIS 108 g

Borsäure 55 g

EDTA 0,5 M 40 ml

H<sub>2</sub>O dd ad 1l

## Tumor-TNE

TRIS 1M,pH 8 5 ml

NaCl 5M 10 ml

EDTA 2,1 g

H<sub>2</sub>O dd ad 500 ml

## 10x Warner's solution

NaCl 81,1 g

KCl 3,7 g

## Saline-EDTA-Lösung

NaCl 2,19 g

EDTA 4,46 g

MgCl <sub>2</sub>	0,3 g	H <sub>2</sub> O dd	ad 500 ml
H <sub>2</sub> O dd	ad 1l	pH 8 mit NaOH einstellen	
Agarosegel-Standard		PCR-Puffer	
Standard V	1,5 µl	KCl	500 mM
PCR-Puffer	1,0 µl	TRIS/HCl pH 8,5	100 mM
Dye	2 µl	MgCl <sub>2</sub>	5-25 mM
H <sub>2</sub> O dd	7,5 µl	Gelatine	0,1%
		in H <sub>2</sub> O dd	
CTAB-Lösung		TE-Puffer	
NaCl	0,5 M	TRIS/HCl pH 8,0	10 mM
CTAB	5%	EDTA	1mM
in H <sub>2</sub> O dd		in H <sub>2</sub> O dd	
Ethidiumbromid-Lösung		Primer	
10 mg/ml	in H <sub>2</sub> O dd	20 pMol	in H <sub>2</sub> O dd
DNTPs		Natriumacetat-Lösung	
dATP	2 mM	3 M, pH 5,5,	in H <sub>2</sub> O dd
dCTP	2 mM		
dTTP	2 mM	Proteinase-K-Lösung	
DGTP	2 mM	500 mg in 50 ml	H <sub>2</sub> O dd
in H <sub>2</sub> O dd			



**2.10 Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
Computer	Centris 650	Apple Macintosh
Reinwasseranlage	Milli Q UF plus	Millipore
DNA-Sequenzierer	Modell 373A	Applied Biosystems
Färberahmen		Eigenbau
Gelelektrophorese für Agarosegele	E 92	Biometra
Gelelektrophorese für Acrylamidgele	Pokerface II	Hoefer Scientific
Geltrockner	Slab Gel Dryer	Hoefer Scientific
Heizblock	Dri-Block DB 3A	Techne
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Biofuge 28 RS	Heraeus
Magnetrührer, heizbar		lkamag
Membranpumpe	MZ 2C	Vacuubrand GmbH
Netzgerät	Desatronic 500/500	Desaga
Netzgerät	Power-All	Serva
pH-Meter	CG 840	Schott
Pipetten	P10, P20, P200, P1000	Gilson
Rotator	3025	Ges. f. Labortechnik
Software	Data Collection Version 1.2.0	Applied Biosystems
	Data Analysis Version D1-7.1	Applied Biosystems
Thermocycler	Omnigene TR3 CM 220	Hybaid
Thermocycler	Gene Amp 9600	Perkin Elmer
UV Bank		Hoefer Scientific
Vakuumbzentrifuge	SpeedVac SC 110	Savant
Vortex	Genie 2	Bender und Hobein
Waage	BA 200	Sartorius
Wasserbad	1003	Ges. f. Labortechnik
Zentrifuge	5414 C	Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus

### 2.11 Statistische Analyse

Die mittleren Überlebenszeiten wurden auf der Grundlage der Grenzwertabschätzung aus der Verteilungsfunktion der Überlebensdauer errechnet. Da nur drei Zeiten zum Auswertungszeitpunkt nicht vorlagen, kam es nur zur geringfügigen Abweichung von den tatsächlichen mittleren Überlebenszeiten.

Der Vergleich der Überlebenszeiten zwischen den einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe des Log-Rank Testes durchgeführt. Die Beziehung von molekularen und histopathologischen Befunden wurde mit Hilfe des Chi<sup>2</sup> und Fischer Exact Testes bestimmt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische, histopathologische und immunhistochemische Bewertung

Alle Tumoren wurden unter Anwendung der WHO (2000) als Glioblastome diagnostiziert (Kleihues und Cavenee, 2000). Ausgeschlossen wurden die Tumoren, welche die Kriterien für anaplastische Oligodendrogliome erfüllten. Von den 97 untersuchten Tumoren waren 87 primäre Glioblastome (einschließlich eines Gliosarkomes), 6 waren, nach der Definition von Scherer (1940), sekundäre Glioblastome (d.h. aus einem niedriger gradigen astrozytischen Tumor hervorgegangen) und 4 waren Riesenzellglioblastome. Zwischen den primären und sekundären Glioblastomen ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der histopathologischen und immunhistochemischen Eigenschaften.

55 Patienten waren männlich und 42 weiblich, was der leichten Mehrverteilung von Männern unter den Patienten mit Glioblastomen entspricht. Das Alter der Patienten lag bei 24 bis 78 Jahren mit einem Mittelwert von 58,1 Jahren.

Die mittlere Überlebenszeit aller 97 Patienten lag bei 10,8 Monaten, wobei die mittlere Überlebenszeit der Männer 10,3 und die der Frauen 11,4 Monate betrug. 87 Patienten mit primären Glioblastomen hatten eine mittlere Überlebenszeit von 10,2 Monaten. Die mittlere Überlebenszeit der 6 Patienten mit sekundären Glioblastomen lag bei 18,3 Monaten und die der 4 Riesenzellglioblastompatienten bei 11,3 Monaten. Daraus ergab sich eine tendenziell bessere Prognose für die Patienten mit sekundären Glioblastomen ( $p = 0,0656$ ). Von allen 97 Patienten waren bei Abschluß der Datensammlung 94 gestorben und 3 noch am Leben. Ein Überblick über die histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse ist in Tabelle 8 zu finden.

#### 3.2 Analyse von *TP53*, *PTEN* und LOH 10

*TP53* Mutationen wurden in 23 von 97 (24%) und *PTEN* Mutationen in 21 von 97 (22%) der Fälle gefunden. Ein LOH auf dem langen Arm von Chromosom 10 trat bei 68 von 89 (76%) und auf dem kurzen Arm bei 53 von 79 (67%) der ausgewerteten Patienten auf. Die genauen Angaben über die *TP53* und *PTEN* Mutationen sind in Tabelle 9 aufgelistet. Eine Zusammenfassung von molekularen Daten und deren Verteilung auf primäre, sekundäre und Riesenzell Glioblastome befindet sich in Tabelle 10.

### 3.3 Zusammenhang von molekularen Parametern und Überlebenszeiten

Es ergab sich ein Zusammenhang von *TP53* Mutationen und mittlerer Überlebenszeit. 23 Patienten mit *TP53* Mutationen hatten eine mittlere Überlebenszeit von 16,0 Monaten und 74 Patienten mit Wildtyp *TP53* eine mittlere Überlebenszeit von 9,1 Monaten ( $p = 0,0085$ ). Ein Zusammenhang von *TP53* Mutationen und Überlebenszeit konnte ebenfalls in der Gruppe von Patienten mit primären Tumoren beobachtet werden ( $p = 0,0241$ ). Bei den 6 Patienten mit sekundären Glioblastomen lag die mittlere Überlebenszeit bei 27,7 Monaten bei Patienten mit, und 9,0 Monaten bei den Patienten ohne *TP53* Mutation ( $p = 0,261$ ). Dies stellte sich allerdings aufgrund der geringen Fallzahl nicht als signifikant heraus.

Die Patienten mit *TP53* Mutation hatten ein mittleres Alter von 56,6 Jahren. Im Gegensatz dazu waren die Patienten ohne *TP53* Mutationen im Mittel 59,2 Jahren alt.

Nach Durchführung einer Cox Regression, mit *TP53* Status und Patientenalter als Faktoren stellten sich sowohl das Vorhandensein von *TP53* Mutationen (mit einem Regressionskoeffizienten von 0,543 {0,329, 0,897} 95% CI,  $p = 0,0171$ ) als auch junges Alter mit einem Regressionskoeffizienten von 1,026 {1,008, 1,045}, mit einer Risikoerhöhung von ( $p = 0,0052$ ) als signifikant günstige prognostische Faktoren heraus.

Es ergab sich ein Zusammenhang zwischen LOH 10q und der Überlebensrate. So stellte sich heraus, daß von den untersuchten Patienten diejenigen, die weiterhin heterozygote Allele auf dem langen Arm von Chromosom 10 hatten, eine mittlere Überlebensrate von 18,0 Monaten gegenüber denen mit LOH 10q mit 8,8 Monaten hatten ( $p = 0,0028$ ). Etwas weniger eindeutig fielen die Ergebnisse mit  $p=0.0287$  für den kurzen Arm von Chromosom 10 aus.

Die entsprechenden Kaplan-Meyer Kurven sind in Abbildung 5 bis 8 zu sehen. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und *PTEN* Mutationen herstellen.

### 3.4 Zusammenhang von molekularen und histopathologischen Daten

Kleine p-Werte, die einen Zusammenhang zwischen molekular- und histopathologischen Parametern vermuten lassen, wurden bei folgenden Kombinationen beobachtet:

*PTEN* Mutationen waren häufiger in Tumoren mit Anteilen von lymphozytären Infiltraten aufzufinden ( $p = 0,0149$ ).

*TP53* Mutationen waren häufiger bei Riesenzellglioblastomen zu finden ( $p = 0,0015$ ).

LOH 10q war seltener in Tumoren mit einem niedrigeren MIB-1 Index zu beobachten ( $p = 0,0495$ ).

LOH 10p war etwas seltener bei Patienten, deren Tumoren Kalzifizierungen aufwiesen ( $p = 0,0101$ ).

Histopathologische und immunhistochemische Daten in 97 unselektierten Glioblastomen

<b>Histopathologische und Immunhistochemische Differenzierung</b>	<b>Anzahl (N)</b>
vorherrschender Zelltyp	Anzahl (N)
Kleinzellig, undifferenziert	43
fibrillär	25
gemistozytisch	19
Riesenzelltyp	4
Spindelzellen	1
oligodendroglial	5
Andere bedeutende Zelltypen *	Anzahl (N)
Kleinzellig, undifferenziert	20
fibrillär	19
gemistozytisch	13
Riesenzelltyp	3
Spindelzellen	5
oligodendroglial	3
unspezifiziert	36
weitere vorhandene Zelltypen *	Anzahl (N)
Kleinzellig, undifferenziert	6
fibrillär	7
gemistozytisch	14
Riesenzelltyp	8
Spindelzellen	5
oligodendroglial	5
unspezifiziert	55
stellenweise höhere	Anzahl (N)

Differenzierung*	
nicht vorhanden	43
fibrillär	34
gemistozytisch	22
oligodendroglial	3
Zellproliferation (Mitosen)	Anzahl (N)
0-5/10 HPF	36
6-10/10 HPF	26
>10/10 HPF	35
Zellproliferation (MIB1 index)	Anzahl (N)
<2%	0
2%-5%	20
6% to 10%	42
>10%	35
Nekrosen	Anzahl (N)
nicht vorhanden	1
vereinzelte Zellen	2
bandförmig mit Bildung von Pseudopalisaden	23
ausgedehnte Bereiche	71
microvaskuläre Proliferation	Anzahl (N)
nicht vorhanden	0
mäßig	25
glomeruloid/ausgedehnt	72
sarkomatöses Wachstum	Anzahl (N)
nicht vorhanden	85
gering/fokal	11
verbreitet	1
Thrombosen	Anzahl (N)

nicht vorhanden	8
vorhanden	89
Verkalkungen	Anzahl (N)
nicht vorhanden	91
vorhanden	6
Expression von GFAP	Anzahl (N)

nicht vorhanden	1
vereinzelte Zellen	16
Gruppen von Zellen	20
mehr als 30% der Tumorzellen	60

\* Mehrfachzählung erlaubt

Tab. 8: Auswertung der untersuchten Tumoren nach histopathologischen und immunhistochemischen Kriterien in absoluten Zahlen

Individuelle TP53 und PTEN Mutationen in 97 unselektierten GBM

Gen	ID	Gewebe	shift	Mutation	Konsequenz
<u>TP53</u>	764 a	GBMprm	ex5	c542 G->A	R181H
	3268	GBMprm	ex5	c472 A->C	R158S
	3320 a	GBMprm	ex5	c466 C->G	R156G
	3572	GBMprm	ex7	c683 del CT	D228fs->238X
	4244	GBMprm	ex6	c638 A->G	R213R
	4380	GBMprm	ex7	c716 A->G	N239S
	4384	GBMprm	ex7	c718 insACA	ins240T
	4548	GBMprm	ex6	c638 A->G	R213R
	4804	GBMprm	ex5	c488 A->G	Y163C
	4884	GBMprm	ex5	c455 C->G	P152L
	4936	GBMprm	ex8	c844 C->G	R282G
	4976	GBMprm	ex6	c638 A->G	R213R
	5162	GBMprm	ex5	c530 C->T	P177L
	6250	GBMprm	ex7	c746 G->C	R249T
	6836	GBMprm	ex6	c625 delGA	R209fs->214X
	6840	GBMprm	ex5 ; ex8	c480 G->T; c481 G->T	M160I; A161S
	2254 a	GBMsec	ex5	c487 T->C	T163H
	3038	GBMsec	ex8	c817C->T	R273C
	4340	GBMsec	ex6	c653T->G	V218G
	2268 a,b	gcGBM	ex5	c454 C->A	P152T
	3864 b	gcGBM	ex7	c742C->T	R248W
	5056	gcGBM	ex6	c576 G->C; c577 C->A	Q192H; H193N
	5396 b	gcGBM	ex7	c754 delCTC	del252L
<u>PTEN</u>	760 c	GBMprm	ex8	c941/c942 delA	Q314fs->316X
	908	GBMprm		homo del	
	946 a,c	GBMprm		homo del	
	2110 c	GBMprm	ex7	IVS6-12 T->G; IVS6-17 T->G	unbekannt
	3268	GBMprm		homo del	
	3330	GBMprm	ex3	c170 T->G	L57S
	3424	GBMprm	ex6	c566-571 delACCAG	R189fs->199X
	3902 a,c	GBMprm		homo del	

	3946	GBMprm	ex5	c313 T->G	C105G
	4006 a,c	GBMprm	ex6	c557 delT	L186fs -> 198X
	4164	GBMprm	ex2	c138 C->G	Y46X
	4270 c	GBMprm		homo del	
	4400	GBMprm	ex5	c406 T->C	C136R
	4416	GBMprm	ex6	c518 G->A	R173H
	4534	GBMprm	ex2	c103 A->G	M35V
	5162	GBMprm	ex5	c286 C->T	P96S
	6250	GBMprm		homo del	
	6622	GBMprm	ex8	c888 delT	C296fs->306X
	6638	GBMprm	ex5	c331 T->C	W111R
	6836	GBMprm	ex5 ; ex 8	c278 A->G; c950 delTACT	L93R; V317fs->319X
	2268 a,c	gcGBM	ex3	c197 ins14	K66fs -> 103X

Tab. 9: Die Nomenklatur folgt den Vorschlägen der HUGO Mutation Database Meeting, San Francisco, 1994. GBMprm = primäre Glioblastome; GBMsec = sekundäre Glioblastome, gcGBM = Riesenzell Glioblastome; a = bereits publiziert in von Deimling et al. (2000), b = bereits publiziert in Meyer-Puttitz et al. (1997), c = bereits publiziert in Duerr (1998).



## Molekulare Veränderungen, Geschlecht, Alter und Überlebenszeit in 97 unselektierten GBM

Gen Chromosom	od. Subtyp	Status	n	Alter (Jahre)	Geschlecht w/m	Überlebenszeit (Monate)
<u>TP53</u>	GBMprm	wt	71	59.5	32/39	9.1
		mut	16	56.4	7/9	15.1
	GBMsec	wt	3	53.3	1/2	13.8
		mut	3	53.0	1/2	41
	GcGBM	wt	0	-	-	-
		mut	4	48.8	1/3	11.3
<u>PTEN</u>	GBMprm	wt	67	58.6	30/37	10.9
		mut	20	59.0	9/11	8.1
	GBMsec	wt	6	53.2	2/4	18.3
		mut	0	-	-	-
	GcGBM	wt	3	47.3	1/2	14.7
		mut	1	51.0	0/1	1.0
10p	GBMprm	wt	21	60.0	9/12	15.1
		LOH	48	58.1	23/25	8.5
	GBMsec	wt	4	49.8	1/3	15.8
		LOH	2	60.0	1/1	23.5
	gcGBM	wt	1	41.0	0/1	25.0
		LOH	3	50.7	1/2	6.7
10q	GBMprm	wt	17	54.1	7/10	15.9
		LOH	62	59.5	28/34	8.9
	GBMsec	wt	3	53.0	1/2	27.7
		LOH	3	53.3	1/2	9.0

Tab. 10: GBMprm = primäre Glioblastome; GBMsec = sekundäre Glioblastome, gcGBM = Riesenzell Glioblastome; wt = Wildtyp; mut = mutiert. Es wurden nur informative Patienten aufgenommen

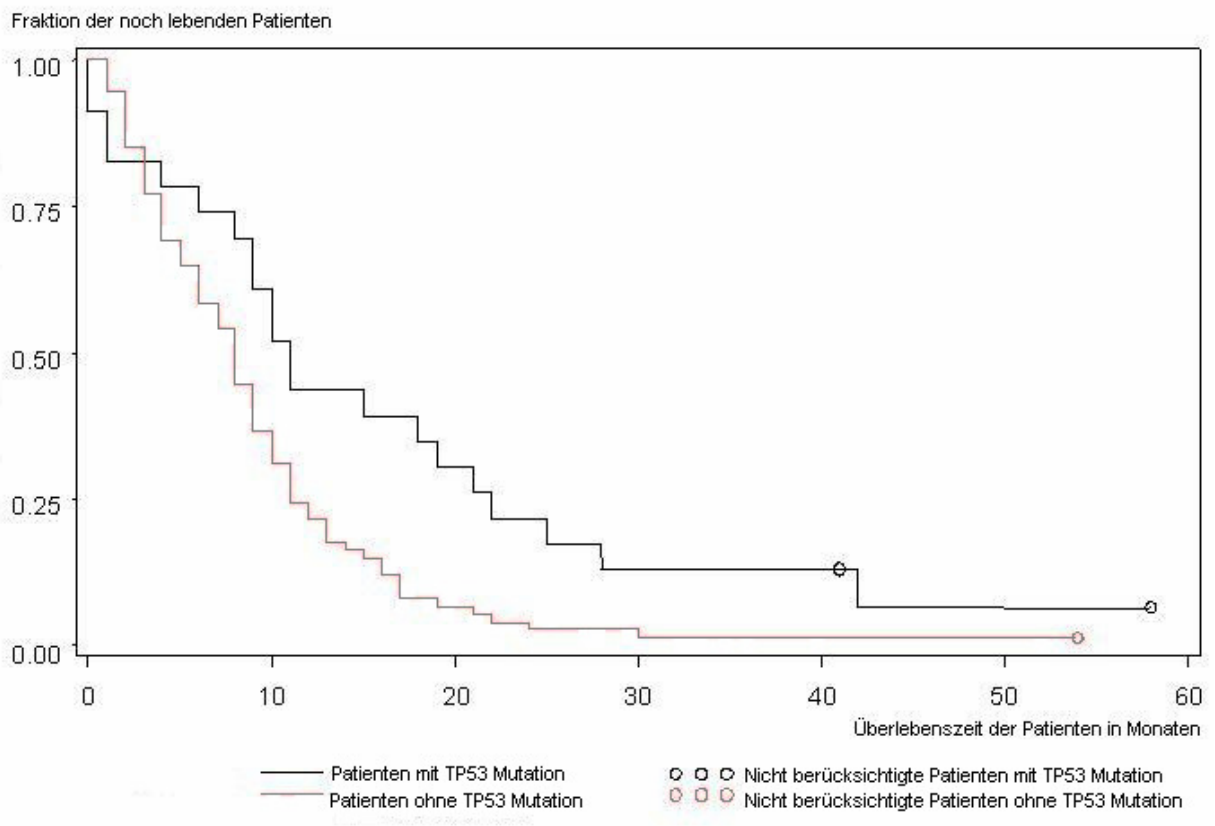


Abb. 5: Verteilung von Überlebenszeiten von Patienten mit und ohne *TP53* Mutation

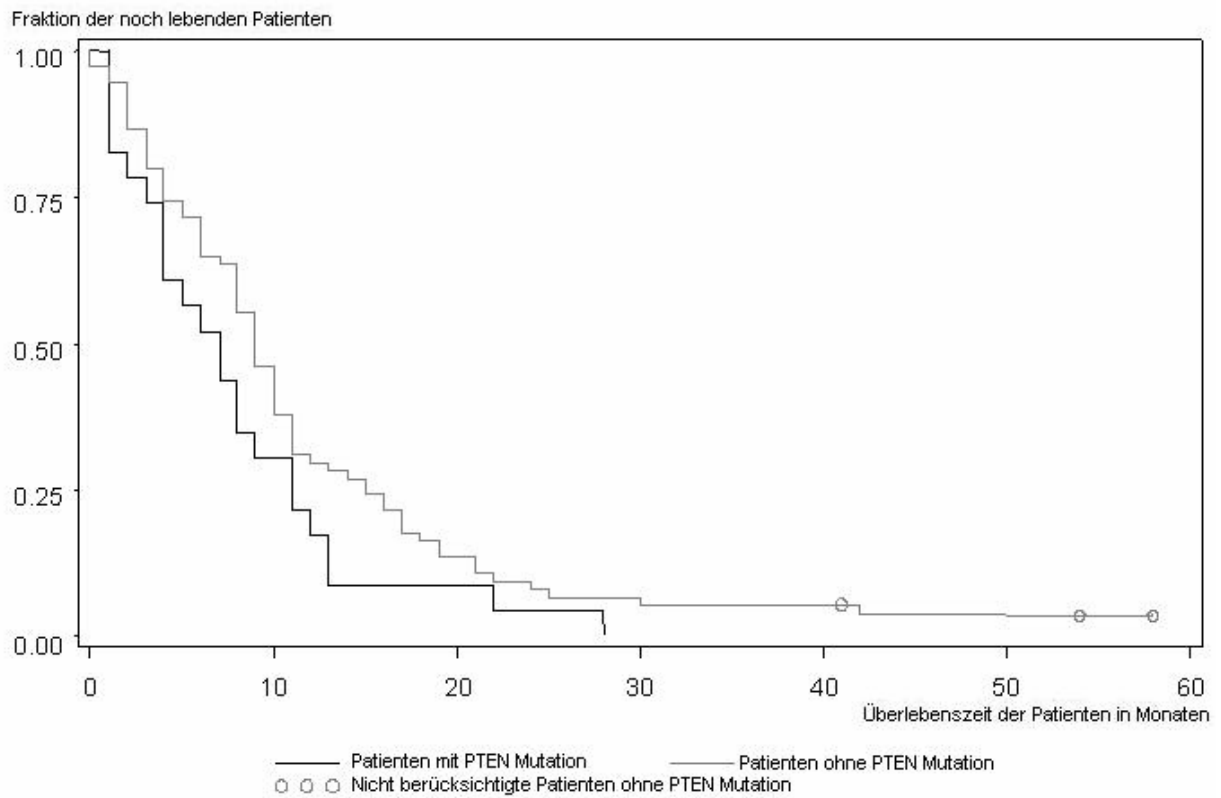


Abb. 6: Verteilung von Überlebenszeiten von Patienten mit und ohne *PTEN* Mutation

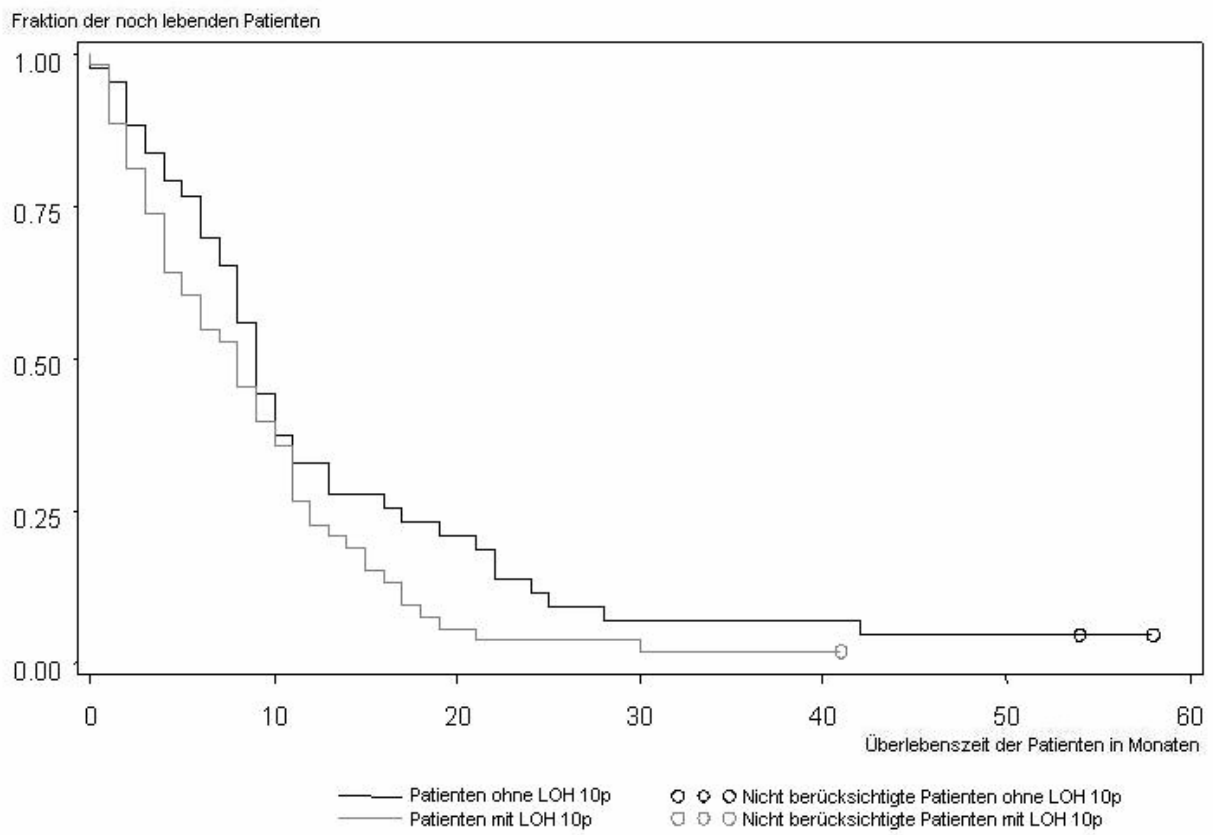


Abb. 7: Verteilung von Überlebenszeiten von Patienten mit und ohne LOH 10p

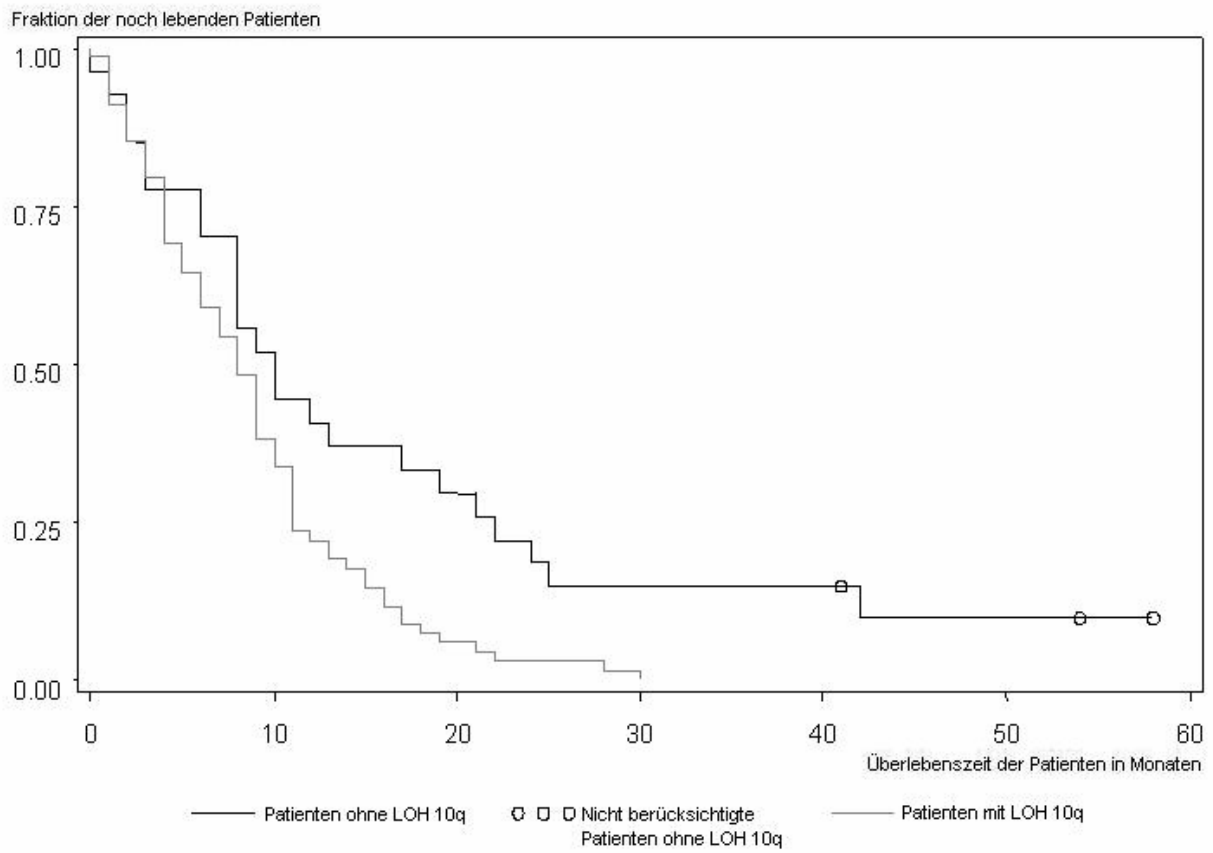


Abb. 8: Verteilung von Überlebenszeiten von Patienten mit und ohne *LOH 10q*

## 4. Diskussion

Als Goldstandard der differentiellen Diagnostik gilt heutzutage nach wie vor die feinhistologische Aufarbeitung von Gewebeproben durch den Pathologen. Diese können entweder intraoperativ durch den Neurochirurgen oder präoperativ, minimal invasiv, durch stereotaktische Feinnadelbiopsie gewonnen werden. Die histologische Differenzierung erfolgt nach standardisierten konventionellen und immunhistologischen Techniken. Danach werden die Proben von einem oder mehreren Pathologen nach ihren histologischen Kriterien untersucht und schließlich eingeteilt. Von diesem Vorgehen hängen dann sowohl Prognose als auch Therapie des Patienten ab. Leider ist dieses Verfahren natürlicher Weise anfällig für Fehler. So ist es zu Beispiel vorstellbar, daß durch die Feinnadelbiopsie zwar Material aus dem Tumor entnommen aber vielleicht ein Areal mit höherem Differenzierungsgrad getroffen wurde, sodaß es zu einer falsch positiven Bewertung kommt. Natürlich können auch die Qualität der Färbung des Präparates oder die individuelle Erfahrung des Diagnostikers einen Einfluß auf die Zuverlässigkeit der Diagnose haben. Daher ist es wichtig nach neuen Verfahren zu suchen, um die Spezifität und Sensitivität der Untersuchungen weiter zu erhöhen. Die ergänzende Suche nach spezifischen Mutationen oder genetischen Markern ist daher von außerordentlicher Wichtigkeit.

Die Entdeckung von genetischen Subklassifizierungen ist jedoch nicht nur ausschließlich von diagnostischer Bedeutung. Unter Umständen ist es möglich eine Untergruppe zu identifizieren, die trotz einheitlicher histologischer Klassifizierung einen unterschiedlichen klinischen Verlauf nimmt oder gar therapeutisch anders zu behandeln ist. Dazu ist es wichtig, bekannte Tumor- oder Kandidatengene mit histologischen und klinischen Daten in einer Studie zu vergleichen. Diese Arbeit ist Teil einer solchen Studie und soll die Gene *PTEN* und *TP53*, in zuvor histologisch und klinisch eingeteilten Gruppen, auf ihre Mutationen hin überprüfen.

Verschiedene histologische und morphologische Parameter können dazu herangezogen werden eine Aussage zur Prognose einer Tumorerkrankung zu treffen. So hat sich in verschiedenen Studien gezeigt, daß das Vorhandensein von Riesenzellen im Resektat offensichtlich mit einer besseren Prognose und längeren Überlebenszeit einhergeht. Allerdings sind Riesenzellglioblastome eher selten. Areale höherer Differenzierung, wie z.B. das Auftreten von fibrillären, astrozytären Strukturen und Mikrozysten sprechen ebenfalls für einen langsameren Verlauf der Erkrankung. Als ungünstig hat sich hingegen ein homogenes und kleinzelliges Bild herausgestellt. Kalzifizierungen und eine laterale Lokalisation des Tumors werden je nach Autor unterschiedlich bewertet. Einige bescheinigen auch hier eine bessere prognostische Bedeutung, wohingegen andere dies nicht bestätigen konnten. Allgemein

anerkannt als einer der wichtigsten positiven Faktoren ist ein junges Alter bei Beginn der Erkrankung. Hierbei konnte allerdings nicht gezeigt werden, daß eine Korrelation mit einem oder mehreren der anderen positiven histologischen Prädikatoren besteht. (Burger und Green, 1987; Burger und Vollmer, 1980).

In der vorliegenden Studie stellte sich heraus, daß auch hier ein jüngeres Alter bei Diagnosestellung einen signifikant günstigen Einfluß hat. Im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen konnte allerdings kein Unterschied in der Überlebenszeit zwischen Patienten mit und ohne Gebieten höherer Differenzierung gefunden werden. Die Zahl der Riesenzell Glioblastome (gcGBM) in dieser Studie war zu gering um daraus statistisch signifikante Ergebnisse für die Überlebenszeit ableiten zu können.

Scherer (1940) hatte beobachtet, daß Patienten mit sekundären Glioblastomen, die sich aus niedriger-gradigen Astrozytomen entwickelt haben, eine leicht günstigere Prognose haben. Mehrere Studien haben deshalb den Versuch unternommen, zu klären, ob es sich bei diesen klinisch unterschiedlichen Gruppen auch um genetisch heterogene Tumoren handelt und ob sich gegebenenfalls ein bestimmter Mutationsweg erkennen läßt. Dabei hat sich gezeigt, daß bei Glioblastomen, die primär als solche diagnostiziert werden, sogenannten „de novo Glioblastomen“, häufig ein LOH auf Chromosom 10 gefolgt von einer Amplifikation des *EGF* Rezeptor Genes, vorliegt. Diese Tumoren werden vor allem bei älteren Patienten gefunden und gehen, wie bereits oben schon erwähnt, mit einer schlechteren Prognose einher. Für die sekundären Glioblastome konnte gezeigt werden, daß sie zunächst sehr häufig mit einem LOH des 17p Chromosoms einhergehen. Dies ist konsequenterweise auch bei niedriger gradigen Astrozytomen der Fall. Durch weitere Untersuchungen konnte die genetische Läsion auf dem 17p Chromosom auf das *TP53* Gen eingegrenzt werden. Treten bei einem Astrozytom mit *TP53* Mutation weitere genetische Schäden, zum Beispiel durch *EGFR* Amplifikation oder LOH10, auf, so kann es zur weiteren Malignisierung und zum Entstehen eines sekundären Glioblastomes kommen. (von Deimling et al., 2000; Lang et al., 1994; Peraud et al., 1997; Reifenberger et al., 1996; Watanabe et al., 1996).

Diese Ergebnisse haben sich in der vorliegenden Studie bestätigt. So konnte gezeigt werden, daß *TP53* Mutationen in 50% aller sekundären und nur in 18% aller primären Glioblastome auftraten. Allerdings muß erwähnt werden, daß durch die ursprüngliche Definition, wie sie von Scherer vorgeschlagen wurde, sekundäre Glioblastome selten sind und daß daher durch die Überzahl von primären Glioblastomen die absolute Zahl der *TP53* Mutationen bei primären Glioblastomen fünfmal höher liegt als in sekundären. Daher ist es naheliegend, die Anwesenheit von *TP53* Mutationen nicht als Unterscheidungskriterium zwischen diesen beiden Formen von Glioblastomen heranzuziehen. Der Vergleich von Überlebensrate und *TP53*

Mutation deutete auf eine günstigere Prognose für Patienten mit einer solchen Mutation hin ( $p = 0,0085$ , Univarianzanalyse). Dieser Unterschied war ebenfalls vorhanden, wenn man die primären Glioblastome alleine betrachtet ( $p = 0,0241$ ). Deshalb ist zu schlußfolgern, daß das Vorhandensein von *TP53* Mutationen ein prognostisch günstiger Faktor ist, unabhängig davon ob ein primäres oder sekundäres Glioblastom vorliegt.

Durch die Tendenz von *TP53* Mutationen, häufiger bei jungen als bei älteren Patienten aufzutreten und durch den Einfluß des Alters auf die Prognose wurde das Verhältnis von *TP53* Mutation, Alter und Überlebenszeit mit Hilfe einer Cox Regression untersucht. Diese Analyse ergab, daß *TP53* Mutationen auch nach Alterskorrektur einen signifikanten prognostisch günstigen Faktor darstellen ( $p = 0,0171$ ). Diese Beobachtung mag als Erklärung dafür dienen, daß Patienten mit sekundären Glioblastomen gewöhnlich eine höhere Überlebenszeit haben. Denn hier treffen oft zwei günstige Faktoren zusammen - junges Alter und *TP53* Mutationen.

Auf der anderen Seite konnten in letzter Zeit zwei weitere Studien, die 80 beziehungsweise 88 Glioblastompatienten untersucht haben, keine signifikante Beziehung zwischen *TP53* Mutation und höherer Überlebenszeit herstellen (Newcomb et al., 1998; Simmons et al., 2001). Dieser Unterschied mag sich aus der Verwendung unterschiedlicher Techniken ergeben haben und unterstreicht die Bedeutung von Multi-Center Ansätzen, welche die Analyse größerer Kollektive an Patienten zulassen.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß ein LOH auf Chromosom 10 bei bis zu 90 % aller Glioblastomen auftritt (Fults et al., 1993; Louis 1997). Auch hier hat man nach einem Kandidatengenen gesucht um Aussagen über die Pathogenese treffen zu könne. Eine Möglichkeit stellte das *PTEN* Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 dar. *PTEN* ist ein Mediator in der Phosphatidylinositol-3-Kinase Kaskade. Es konnte gezeigt werden, daß erneute *PTEN* Expression in Karzinomzellen mit defektem Gen das weitere Zellwachstum hemmt und die tumorösen Eigenschaften der Zellen herabzusetzen vermag (Furnari, 1997). Damit erfüllt *PTEN* offensichtlich die Funktion eines Tumorsuppressorgenes. Für verschiedene andere Arten von Neoplasmen, wie zum Beispiel Malignen Melanomen, Mamma oder Prostata Carcinomen, konnten ebenfalls Mutationen in diesem Gen gezeigt werden. Eine Studie konnte anhand von Expressionsnachweisen mittels rtPCR und Immunfärbung tatsächlich eine erniedrigte *PTEN* Aktivität in Glioblastomen nachweisen und mit einer schlechteren Prognose korrelieren (Sano, 1999). Allerdings deutet die verhältnismäßig niedrigere Mutationsrate des Genes von 10-35% verglichen mit der hohen Rate an LOH auf dem Chromosom 10 von 75-95% darauf hin, daß es noch mindestens ein weiteres Gen von Bedeutung dort geben muß oder daß weitere Mechanismen wie zum Beispiel Methylierungen der Regulator Region eine Rolle spielen müssen.



In der vorliegenden Studie konnte keine Beziehung zwischen *PTEN* Mutationen und Überlebenszeit der Patienten hergestellt werden. Zu diesem Ergebnis kam auch eine weitere Arbeitsgruppe, welche ebenfalls die Bedeutung von *PTEN* Mutationen in Glioblastomen untersucht hat (Zhou et al., 1999).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß das Vorhandensein von *TP53* Mutationen in Glioblastomen unabhängig von Alter, Geschlecht oder primärem/sekundären Entstehen des Tumors einen prognostisch günstigen Einfluß zu haben scheint. Einen ungünstigeren Verlauf der Erkrankung darf man bei dem Vorliegen eines LOH auf Chromosom 10q erwarten. Dies läßt sich jedoch nicht auf eine alleinige Mutation im *PTEN* Gen zurückführen, obschon das Gen eine wichtige Bedeutung für das biologische Verhalten des Tumors zeigt. Eine histologische Korrelation mit den gängigen Untersuchungsmerkmalen und den damit verbundenen Untergruppen von Glioblastomen lies sich nicht herstellen.

Auch wenn das Vorliegen einer Mutation im *PTEN* Gen nicht den vermuteten prognostischen Wert zu haben scheint, so zeigt jedoch, daß der Nachweis von z.B. *TP53* Mutationen durchaus von klinischer Bedeutsamkeit sein kann. Daraus folgt, daß die ergänzende molekulargenetische Typisierung in Zukunft mehr an Bedeutung für die klinische Diagnostik und Therapie gewinnen kann, wenn noch weitere aussagekräftige Mutationen gefunden werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Erkennung von molekularen Subtypen von Glioblastomen hat die Frage aufgeworfen, ob aufgrund bestimmter Mutationen in glioblastombezogenen Genen prognostische Aussagen gemacht werden können. Die vorliegende Studie umfaßt 97 Proben von Glioblastomen erwachsener Patienten, die mit klinischen, histopathologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Methoden untersucht wurden. Die dabei erhobenen Parameter umfaßten: Alter bei Diagnosestellung, Überlebenszeit, Zelltyp, Wachstumsverhalten, Nekrosen, mikrovaskuläre Proliferation, sarkomatöses Wachstum, Lymphozyteninfiltrate, Thrombosen, Kalzifizierung und strukturelle Veränderungen in den *TP53* und *PTEN* Genen.

Wie in vorhergehenden Studien schon gezeigt wurde, stellte sich junges Alter als prognostisch günstiger Faktor heraus. Unter den molekularen Parametern zeigte sich eine *TP53* Mutation ebenfalls als mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert. Dies war signifikant, unabhängig davon, ob es sich bei den entsprechenden Glioblastomen um primäre oder sekundäre handelte. Diese Ergebnisse legen nahe, daß Genotypisierung von Glioblastomen klinisch relevante Aussagen über Prognosen erlauben können.

Das Vorliegen eines LOH auf Chromosom 10q stellte sich als prognostisch ungünstig heraus. Allerdings lies sich diese Beobachtung nicht auf eine alleinige Mutation im *PTEN* Gen übertragen.

Keine der genetisch unterschiedlichen Gruppen mit prognostischem Aussagewert ging mit einer spezifischen morphologischen Veränderung einher. Dies hebt die zukünftige Bedeutung von molekulargenetisch ergänzenden Untersuchung von Tumoren für die Diagnostik und Therapie noch einmal verstärkt hervor.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Arch EM, Goodman BK, Van Wesep RA, Liaw D, Clarke K, Parsons R, McKusick VA, Geraghty MT, Deletion of PTEN in a patient with Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggests allelism with Cowden disease. *Am J Med Genet* 1997; 71:489-493
2. Black PMcL, Medical Progress: Brain tumors (first of two parts). *New Engl J Med* 1991; 21:1471-1476
3. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC, Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Gen* 1991; 48:1137-144
4. Burger PC, Green SB, Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987; 59:1617-1625
5. Burger PC, Vollmer RT, Histologic factors of prognostic significance in the glioblastoma multiforme. *Cancer* 1980; 46:1179-1186
6. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, et al., Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. *Cancer* 1983; 52:997-1107
7. Dahia PLM, Aguiar RCT, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H, Marsh DJ, Ritz J, Freedman A, Stiles C, Eng, C, PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Molec Genet*; 8:185-193
8. von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of Glioblastoma Multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 1993; 3:19-26
9. von Deimling A, Bender B, Louis DN, Wiestler OD. A rapid and non-radioactive assay for the detection of allelic loss in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993; 19:524-529
10. von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR. p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III Astrocytoma. *Cancer Research* 1992; 52:2987-2990
11. von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC, et al. Comprehensive allelotype and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59:544-558
12. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, et al., PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 1998; 16:2259-2264
13. El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B, Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet* 1992; 1:45-49

14. Fine HA, The basis for current treatment recommendations for malignant gliomas. *J Neuro-Oncol* 1994; 20:111-120
15. Fuets D, Edone CA, Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 7: 173-177
16. Furnari FB, Lin H, Huang HJ, Cavenee WK, Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:12479-12484
17. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R, p53 mutations in lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphopietic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:5413-541
18. Gutin PH, Leibel SA, Wara WM, et al., Recurrent malignant gliomas: survival following interstitial brachytherapy with high-activity iodine-125 sources. *J Neurosurg* 1987; 67:864-873
19. Harris CC, Hollstein M, Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Eng J Med* 1993; 329:1318-1327
20. Hayashi K, Yandell DW, How sensitive is PCR-SSCP. *Hum Mutat* 1993; 2(5):338-46
21. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. *Histological typing of tumors of the central nervous system, 2.* New York: Springer-Verlag, 1993
22. Kleihues P, Cavenee WK, *Pathology and genetics of tumours of the nervous system, 1* edition, Lyon, IARC Press, 2000.
23. Lane DP, p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16
24. Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW, Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 1994; 81:427-436
25. Lee JM, Bernstein A, p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Nat Acad Sci* 1993; 90:5742-5746
26. Leibel SA, Sheline GE, Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg* 1987; 66:1-22
27. Levin VA, Silver P, Hannigan J, et al., Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *J Rad Oncol Biol Phys* 1990; 18:321-324
28. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PLM, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R, Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genet* 1997; 16:64-67

29. Li DM, Sun H, PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Nat Acad Sci* 1998; 95:15406-15411
30. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275:1943-1946
31. Li L, Ernsting BR, Wishart MJ, Lohse DL, Dixon JE, A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem* 1997; 272:29403-29406
32. Loeffler JS, Alexander E, Wen PY, et al., Results of stereotactic brachytherapy used in the initial management of patients with glioblastoma. *J Nat Cancer Inst* 1990; 82:1918-1921
33. Loeffler JS, Alexander E, Hochberg FH, et al., Clinical patterns of failure following stereotactic interstitial irradiation for malignant gliomas. *J Rad Oncol Biol Phys* 1990,19:1455-1462
34. Longy M, Coulon V, Duboue B, David A, Larregue M, Eng C, Amati P, Kraimps J-L, Bottani A, Lacombe D, Bonneau D, Mutations of PTEN in patients with Bannayan-Riley-Ruvalcaba phenotype. *J Med Genet* 1998; 35:886-889
35. Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl R, Ohgaki H, Wiestler OD, Thor AD, Seizinger B. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993 ; 52:31-38
36. Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53:11-21
37. Louis DN. A molecular genetic model of astrocytomas histopathology. *Brain Pathol* 1997; 7:755-764
38. Mahaley MS, Analysis of Patterns of Care of Brain Tumor Patients in the United States. A Study of the Brain Tumor Section of the AANS. In: *Syllabus of the Joint Section on Brain Tumors of the CNS and AANS* 1992; 136–163
39. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH, Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250:1233-1238
40. Malkin MG, Interstitial brachytherapy of malignant gliomas: The Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience. *Rec Result Cancer Res* 1994; 135:117-125
41. Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, Rocca-Serra P, Dahia PLM, Zheng Z, Liaw D, Caron S, Duboue B, Lin AY, Richardson AL, Bonnetblanc JM, and 25 others, Mutation spectrum and

- genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Molec Genet* 1998; 7:507-515
42. Marsh DJ, Dahia PLM, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IPM, Hughes KS, Eeles RA, Hodgson SV, Murday VA, Houlston R, Eng C, Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet* 1998; 35:881-885
43. Marsh DJ, Dahia PLM, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, Eng C, Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. (Letter) *Nature Genet* 1997; 16:333-334
44. Meyer-Puttlitz B, Hayashi Y, Waha A, et al., Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas. *Am J Pathol* 1997; 151:853-857
45. Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G, Strand separating conformational polymorphism analysis efficacy of detection of point mutations in the human Ornithine  $\delta$ -Aminotransferase gene. *Genomics* 1992; 13:389-394
46. Nazzarro JM, Neuwelt EA, The role of surgery in the management of supratentorial intermediate and high grade astrocytomas in adults. *J Neurosurg* 1990; 73:331-344
47. Nelen MR, van Staveren WCG, Peeters EAJ, Ben Hassel M, Gorlin RJ, Hamm H, Lindboe CF, Fryns JP, Sijmons RH, Woods DG, Mariman ECM, Padberg GW, Kremer H, Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Molec Genet* 1997; 6:1383-1387
48. Nelson DF, Nelson JS, Davis DR, et al., Survival and prognosis of patients with astrocytoma with atypical or anaplastic features. *J Neuro-Oncol* 1985; 3:99-103
49. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, et al., Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* 1998; 8:655-667
50. Newcomb EW, Madonia WJ, Pisharody S, Lang FF, Koslow M, Miller DC. A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in Glioblastoma Multiforme. *Brain Pathol* 1993; 3: 229-235
51. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B, Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358:80-83
52. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformational polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:2766-2770
53. Ostertag CB, Interstitial implant radiosurgery of brain tumors: radiobiology, indications and results. *Rec Result Cancer Res* 1994; 135:105-116

54. Peraud A, Watanabe K, Plate KH, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H, p53 mutations versus EGF receptor expression in giant cell glioblastomas. *J Neuropath Exp Neurol* 1997; 56:1236-1241
55. Polyak K, Xia Y, Zweler JL, Kinzler KW, Vogelstein B, A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389:300-305
56. Reifenberger J, Ring GU, Gies U, et al., Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropath Exp Neurol* 1996; 55:822-831
57. Reisman D, Greenberg M, Rotter V, Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Nat Acad Sci* 1988; 85:5146-5150
58. Russel DS, Rubenstein LJ: *Pathology of Tumors of the Nervous System*, ed 5, Williams & Wilkins. Baltimore (1989) 805-854
59. Sano T, Lin H, Chen X, et al., Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res* 1999; 59:1820-1824
60. Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva, High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:6741-6742
61. Sawaya R, Neurosurgery issues in oncology. *Curr Op in Oncol* 1991; 3:459-466
62. Scherer HJ, Cerebral astrocytomas and their derivatives. *American Journal of Cancer* 1940; 40:159-198
63. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A, Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61(4):321-8
64. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Sone EW, The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993;16:325-332
65. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C, DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91:325-334
66. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, et al., Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* 2001; 61:1122-1128
67. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHF, Tavtigian SV, Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genet* 1997; 15:356-362

68. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM, Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280:1614-1617
69. Vogelstein B, Kinzler KW, p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526
70. Walker MD, Alexander E, Hunt WE, et al., Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *J Neurosurg* 1978; 49:333-343
71. Walker MD, Green SB, Byar DP, et al., Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980; 303:1323-1329
72. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H, Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996; 6:217-223
73. Wen S, Stolarov J, Myers MP, Su JD, Wigler MH, Tonks NK, Durden DL, PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Nat Acad Sci* 2001; 98:4622-4627
74. Winger MJ, MacDonald DR, Schold SC, et al., Selection bias in clinical trials of anaplastic glioma. *Ann Neurol* 1989; 26:531-534
75. Zhou XP, Li YJ, Hoang-Xuan K, et al., Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *Int J Cancer* 1999; 84:150-154
76. Zülch KJ: *Brain Tumors. Their biology and pathology.* Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1986)
77. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ, Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000;14:391-396



## 7. Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei Prof. Dr. med. O.D. Wiestler, dem ehemaligen Direktor des Institutes für Neuropathologie des Universitätsklinikum Bonn, für die freundliche Überlassung des Themas.

Prof. Dr. med. A. von Deimling, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Charité, Berlin möchte ich für die optimale Betreuung meiner Arbeit danken, die er geduldig auch nach seiner Berufung nach Berlin weiter aufrecht erhielt.

Danken möchte ich auch unseren (B&M) Technischen Assistentinnen Ortrud Schmidt und Birgit Meyer-Puttlitz, ohne deren ständige Bereitschaft zur tatkräftigen Unterstützung oder ermutigenden Worte in schwierigen Zeiten diese Arbeit vielleicht nicht zustande gekommen wäre.