

Astrocitom Progresyonunun Moleküler Genetik Temelleri

Molecular Genetic Basis of Astrocytoma Progression

FİGEN SÖYLEMEZOĞLU

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji, Anabilim Dalı Doçenti, Ankara

Özet: Son on yıl içinde astrositomların progresyonuna ilişkin moleküler genetik mekanizmaların anlaşılması sürecinde hayli yol alınmıştır. Bu sürece katılan onkogenler ve tümör süppressör genler tanımlanmış, ek olarak olası tümör süppressör lokusları haritalanmıştır. Aşağıda astrositom progresyonunda yer alan moleküler yolların bir özeti sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Astrocitom, glioblastom, moleküler genetik, progresyon

Abstrac: The past ten years have witnessed extraordinary progress in our understanding of the molecular genetic basis of astrocytoma progression. Affected oncogenes and tumour suppressor genes have been identified and putative tumour suppressor loci have been mapped. Herein, you will find a summary of the data on molecular pathways in the astrocytoma progression.

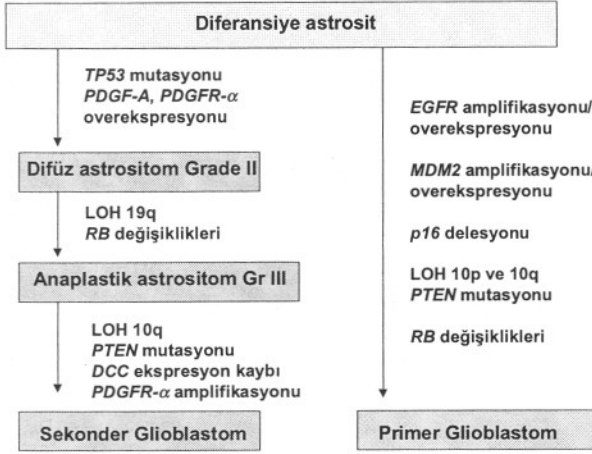
Key words: Astrocytoma, glioblastoma, molecular genetics, progression

GİRİŞ

Oldukça karmaşık bir süreç olan insan tümörlerinin gelişiminde, organ gelişimi için gerekli olan hücre proliferasyonu, diferansiasyonu veya hücre ölümü yollarını düzenleyen genleri ilgilendiren, genetik lezyonların birikimi söz konusudur. Tıpkı diğer organ tümörlerinde olduğu gibi, nöroepitelyal hücrenin malign transformasyonu da çok basamaklı ve birbirini izleyen genetik değişiklikler ile karakterizedir. Söz konusu değişiklikler, onkogenler ve tümör süppressör genlerde meydana gelir. Onkogen ürünü olan proteinler, hücre büyümesinden sorumludur, ve aktive edici mutasyonlar veya gen dosajını artıran amplifikasyonlar yoluyla genetik değişiklik meydana gelir. Tümör süppressör gen ürünü proteinler ise genellikle hücre büyümesini frenleyen bir etkiye sahiptirler, ve tümörlerde ya inaktive edici

mutasyonlar ya da genin ortadan kalkması söz konusudur.

Patologlar, düşük dereceli astrositomların yıllar içinde izlenen rekürrenslerinde, artmış selülarite, atipi, mitotik aktivite gösteren anaplastik astrositom veya vasküler proliferasyon ve/veya nekroz ile karakterize glioblastom morfolojisine tanıklık etmişlerdir. Astrositik progresyonun histopatolojik bulguları, günümüzde artan sayıda moleküler çalışma ile desteklenmektedir (2,9,28,46,49,62). Bugüne kadar elde edilen bilgilerle, düşük dereceli bir astrositomdan, glioblastoma dek ilerleyen ardışık genetik olaylar Şekil 1'de gösterilmiştir (31). Şekilden de anlaşılabilceği gibi, düşük dereceli astrositomlarda, *TP53* mutasyonları (75,76) ve *PDGFR* overekspresyonu (8,20) önde gelen değişikliklerdir. Anaplastik astrositomlarda, ilave olarak kromozom 19q heterozigosite kaybı (LOH),



Şekil 1: Primer ve sekonder glioblastom gelişiminde rol oynayan genetik olaylar (31 numaralı referanstan modifiye edilmiştir)

ve glioblastoma progresyonda, kromozom 10 LOH (*MMAC1/PTEN*), daha az sıklıkla *PDGFR* amplifikasyonu (23) ve *DCC* ekspresyonunda kayıp (57) izlenmektedir.

İlk kez Scherer tarafından tanımlanan primer ve sekonder glioblastom kavramları, bugün için histopatolojik birer gözlem olmanın ötesinde, moleküler yolları tanımlanmaya başlanmış iki farklı antite olarak karşımıza çıkmaktadır (59).

Primer glioblastomlar, genellikle yaşlılarda (ortalama, 55 yaş), genellikle 3 ay gibi kısa bir klinik öyküyü takiben, klinik veya histopatolojik olarak ön bir lezyonun varlığının gösterilemediği, *de novo* ortaya çıkan neoplazilerdir. Sekonder glioblastomlar ise, daha genç yaş grubunda (<45 yaş), düşük dereceli astrositom veya anaplastik astrositom gibi öncül bir lezyonun malign progresyonu sonucunda gelişirler.

Aşağıda astrositom gelişiminde ve progresyonunda rol aldığı saptanan *TP53/MDM2/p21* ve *p16/p15/CDK4/CDK6/RB* yolları (pathway) yanısıra epidermal büyüme faktörü reseptörü, platelet-derived büyüme faktörü ve reseptörleri ile diğer moleküler genetik değişiklikler özetlenmiştir.

TP53/MDM2/p21 yolu

TP53. *TP53* geni, kromozom 17p13.1'de lokalizedir ve hücre siklusu, DNA hasarına yanıt, hücre ölümü, hücre farklılaşması ve

neovaskülarizasyon gibi pek çok süreçte aktif rol oynayan, genomun gardiyanı olarak bilinen 53 kDa'luk bir proteini kodlar (6, 35). *TP53* molekülü, DNA bağlayabilme özelliği sayesinde, pek çok diğer genin transkripsiyonunda pozitif veya negatif düzenleyici olarak görev yapar.

TP53 tümör süpresör geninin kaybı veya mutasyonu, pek çok gliomda ve özellikle bir grup astrositomda erken gelişen bir genetik olay olarak karşımıza çıkmaktadır (15, 62,68,69). Kromozom 17p'nin allelik kaybı veya *TP53* mutasyonu, her üç grade erişkin astrositomunun yaklaşık üçte birinde izlenir. Bu da *TP53* inaktivasyonunun grade II tümörlerin gelişiminde çok önemli olduğunu düşündürmektedir. Glioblastomları genel olarak irdeleyen serilerde çok değişik sonuçlar bildirilmektedir (38,49). Ancak primer (de novo) ve sekonder glioblastomlar ayrı ayrı incelendiğinde, ortaya çıkan tablo oldukça farklıdır. *TP53* mutasyonları, primer glioblastomlarda son derece nadir (<%10), sekonder glioblastomlarda bu oran %65'lerin üstüne çıkmaktadır (50,75,76). *TP53* protein akümüasyonu, *TP53* mutasyonundan daha sık olarak izlenmekle birlikte (36,40,46,75) sekonder glioblastomlarda primer glioblastomlara oranla daha yüksektir (76).

MDM2. *MDM2* geni, kromozom 12q14.3-q15 bölgesinde lokalizedir. 54kDa ağırlığında, transkripsiyon faktörü olan bir proteini kodlar (43).

MDM2 proteini hem mutant hem de wild-tip *p53* proteinini bağlayabilir, ve wild-tip *p53*'ün, transkripsiyon aktivasyonu özelliğini inhibe eder (43,51). Öte yandan, *MDM2* geninin transkripsiyonu da wild-tip *TP53* ile indüklenir (1,81). Normal hücrelerde, söz konusu oteregülatuar döngü, *TP53* protein aktivitesi ve *MDM2* ekspresyonunu düzenler (52). Ayrıca *MDM2* *p53* degradasyonunu sağlar (19,34). Sonuç olarak, *MDM2* amplifikasyonu veya overekspresyonu ile *TP53* tarafından düzenlenen hücre büyümesi kontrolünden kurtulmak mümkündür. *MDM2* amplifikasyonu, *TP53* mutasyonu içermeyen primer glioblastomların yaklaşık %10'unda izlenmektedir (3,55). *MDM2* proteininin overekspresyonu immünohistokimyasal olarak primer glioblastomların yaklaşık yarısında saptanmaktadır (3,33,45).

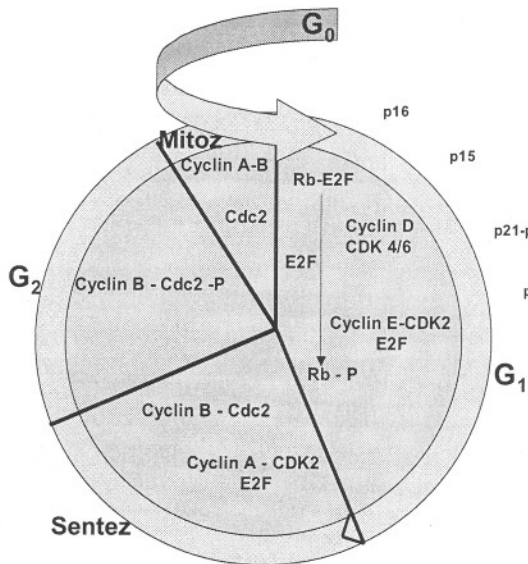
Sekonder glioblastomların küçük bir kısmında *MDM2* overekspresyonu izlenmekle birlikte, *MDM2* overekspresyonu, tipik olarak, *TP53* mutasyonu göstermeyen primer glioblastomların genetik

karakteristiğidir.

p21. *CDKN1A* (cyclin dependent kinase-siklin bağımlı kinaz) geni kromozom 6p'de lokalize olup, 21 kDa'luk bir proteini kodlar. *CDKN1A* geninin promotör bölgesi, p53 proteinini tanıyan sekanslar içermektedir. Ayrıca, *CDKN1A* transkripsiyonu, wild-tip p53 düzeyi ile regüle edilir (12). p21 proteini bir grup CDK/siklin kompleksini bağlar (18). p21 overekspresyonu büyüme arresti oluşturmak için yeterlidir (18). Bu bakış açısıyla, p21 aktivitesinin kaybı, *TP53* mutasyonuna eş değer sayılabilir. Ancak bugüne kadar, *CDKN1A* geninde somatik mutasyon saptanmamıştır (30,32). İmmünohistokimyasal p21 ekspresyonu, grade ile ilişkisiz olarak pekçok gliomda saptanmaktadır (30).

p16/p15/CDK4/CDK6/RB yolağı (Şekil 2)

Düşük grade'li astrositomdan anaplastik astrositoma geçişe sıklıkla kromozom 9p ve 13q alelik kaybı ve 12q amplifikasyonu gibi genetik olaylar eşlik etmektedir. Bugün, söz konusu genetik değişikliklerin hücre siklusu sisteminin parçaları olan genleri işaret ettiği bilinmektedir (Şekil 2) (17,25,72). Anaplastik astrositomların büyük bir kısmı ve glioblastomların hemen tamamında p16/p15/CDK4/CDK6/RB yolağındaki öğelerden herhangi birinde değişiklik izlenmektedir (4,27,67).



Şekil 2. Astrositom progresyonunda meydana gelen genetik değişikliklerin bir kısmı hücre siklusu sisteminin özellikle G₁ fazında yer alır (25 numaralı referanstan modifiye edilmiştir)

CDK4 ve CDK6. 33 kDa'luk CDK4 proteinini kodlayan gen, kromozom 12q13-14, ve 38 kDa'luk CDK6 proteinini kodlayan gen ise, kromozom 7q21-22'de lokalizedir. Her iki protein de katalitik kinaz aktivitesine sahiptirler. Cyclin D ailesi üyeleri ile kompleks oluştururlar. Aşağıda da belirtildiği üzere, p16 ve p15 tarafından inhibe edilirler ve CDK overekspresyonu, p16/p15 mutasyonunun etkisini taklit eder. Yüksek dereceli gliomaların %15'inde *CDK4* gen amplifikasyonu saptanmaktadır (47,56).

RB. CDK4/CDK6-cyclin D kompleksinin oluşmasının esas amacı 107 kDa'luk retinoblastoma (RB) proteininin fosforilasyonudur. RB fosforilasyonu, E2F transkripsiyon faktörünün serbestleşmesine neden olur. E2F, hücre proliferasyonu için gerekli diğer genleri aktive eder (61). *RB1* geni kromozom 13q14'de yer alır ve yüksek dereceli gliomaların üçte birinde bu bölgede değişiklik saptanır (21,28). *RB1* mutasyonu, *CDK4/CDK6* amplifikasyonu veya *CDKN2A/CDKN2B* mutasyonu gibi fonksiyonel sonuçlar doğurur.

p16/p15. p16'yi kodlayan *CDKN2A* ve p15'i kodlayan *CDKN2B* genleri, kromozom 9p21'de lokalizedir. p16 ve p15 proteinleri, siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak rol oynamaktadırlar. Özellikle G₁ siklinlerini bağlayan CDK4 ve CDK6'nin inhibitörü olarak çalışırlar, ve CDK4/6'nın cyclin D ile birlikte, hücrenin G₁'den S-fazına geçişi için gerekli kilit bir olay olan, RB proteininin fosforilasyonunu gerçekleştirmesine engel olurlar (61). Özetle, p15 ve p16 aktivitesinin ortadan kalkması, kontrolsüz hücre büyümesine neden olabilir.

Mutasyon/delesyon yanısıra pekçok diğer mekanizmanın p15/p16 inaktivasyonuna neden olabileceği bildirilmektedir (22,29,47,60).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal growth factor receptor- EGFR)

EGFR 170 kDa'luk, transmembran bir tirozin kinaz reseptörüdür. EGFR'i kodlayan gen, kromozom 7 üzerinde yer almaktadır. Ligantı olan EGF ve TGF-α (transforming growth factor alpha) ile ekstraselüler kısmıyla ilişki kurar, bunu reseptor-ligand internalizasyonu, lizozomal yıkım, ve sinyal azalması izler (80). *EGFR* geni hücre proliferasyonunun kontrolünde rol almaktadır ve astrositik tümörlerde en sık amplifiye olan onkogendir (14). Glioblastomların üçte birinde amplifiye veya overekspresye olduğu saptanmaktadır

(11,26,36,49,70,78). Gliomlardaki *EGFR* amplifikasyonu wild-tipte olabileceği gibi, yapısal olarak aktif olan *truncated* (budanmış) *EGFR* amplifikasyonu şeklinde de olabilir. Mutant *EGFR*, gen rearanjmanı sonucunda gelişir (24,65,79). Hücre yüzeyinde eksprese olan mutant reseptörler (48,77), yapısal otofosforilasyon gösterdiğinden, sürekli sinyal iletiler ve mitojenik etki ile tümör gelişimini artırır (11,48). Ek olarak, gliomalar *EGFR*'ın ligandı *EGF* eksprese ederek, otokrin büyüme döngüleri oluşturabilirler (11).

EGFR amplifikasyonu gösteren glioblastomlar eş zamanlı olarak kromozom 10 kaybı da gösterirler (36,70). Primer glioblastomların %40'ında izlenen *EGFR* amplifikasyonu, sekonder glioblastomlarda bildirilmemektedir (39,49,66). İmmünohistokimyasal *EGFR* overekspresyonu primer glioblastomların %60'ından fazlasında, sekonderlerin %10'undan azında saptanmaktadır (76). Bütün bu bulgular *EGFR* amplifikasyonu ve overekspresyonunun primer glioblastomun moleküler belirleyicisi olduğunu göstermektedir (76). Bu tablo, progresyon sonucu gelişen glioblastomlarda izlenen *TP53* mutasyonu ile *EGFR* amplifikasyonunun farklı süreçler olduğunu sergilemektedir.

Platelet-derived growth factor ve reseptörleri (PDGF- PDGFR)

PDGF, bağ dokusu hücreleri ve glial hücreler için mitojen olan bir dimerdir. PDGF ligantları, tirozin kinaz ailesinden iki hücre yüzey reseptörü (*PDGFR-α* ve *PDGFR-β*) tarafından tanınır (8,20). *PDGFR-α* overekspresyonu, hem düşük hem de yüksek dereceli gliomalarda saptanmaktadır. Oysa *PDGFR-α* gen amplifikasyonu sadece glioblastomların %16'sında izlenmektedir (23). Artmış *PDGFR-α* ekspresyon düzeyi ile kromozom 17p LOH birlikteliği korelasyon göstermektedir (23). Bu da *PDGFR-α* amplifikasyonu ve overekspresyonunun, tipik olarak sekonder glioblastom gelişiminde rol aldığını düşündürmektedir.

Deleted in colorectal cancer (DCC)

DCC geni kromozom 18q21'de yer alan, 1447 amino asitlik, nöral hücre adezyon ailesinden transmembran bir proteini kodlayan bir gendir (13). İmmünohistokimyasal olarak, *DCC* ekspresyonu düşük dereceli astrositomlardan, glioblastomlara doğru artış göstermektedir. Bu bulgu da *DCC*'nin astrositom progresyonunda yer aldığını ve inaktivasyonunun daha çok sekonder glioblastomda

izlendiğini düşündürmektedir (57).

PTEN (MMAC1) ve Deleted in Malignant Brain Tumours 1 (DMBT1)

PTEN (MMAC1). *PTEN* (phosphatase and tensin homology) veya *MMAC1* (mutated in multiple advanced cancers) olarak da bilinen gen, kromozom 10q23.3'de lokalizedir (37,64). *PTEN* mutasyonu glioblastomların %30'unda saptanırken (7,10,54,74), düşük dereceli ve anaplastik astrositomlarda izlenmez. Önceleri astrositom progresyonunda geç bir olay olarak yorumlanmışken, son çalışmalardan birinde primer glioblastomların %32'sinde, sekonder glioblastomların ise %4'ünde *PTEN* mutasyonu gösterilmiştir (66). *TP53* ve *PTEN* mutasyonlarının birlikteliği son derece nadirdir (54,66). *TP53* mutasyonu gösteren glioblastomlarda tipik olarak izlenen kromozom 10 heterozigosite kaybının, *PTEN*'den başka bir tümör süppressör gen ile ilişkili olması olasılığı çok güçlüdür.

DMBT1. *DMBT1* (*Deleted in Malignant Brain Tumours 1*) geni, kromozom 10q25-26'de yer almaktadır ve bir tümör süppressör gen adayıdır (42). Glioblastomların yarısından fazlasında delesyona uğramıştır (42,63). *DMBT1* geninin kromozomal instabilitenin gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (41).

Geni henüz saptanmamış kromozomal değişiklikler

Kromozom 10. Kromozom 10'un bir kopyasının kaybı düşük dereceli astrositomlarda nadir olmakla birlikte, glioblastomlarda sıklıkla izlenen bir olaydır (5,28). Hedef genin klonlanması çalışmaları sürmektedir.

Kromozom 19q. Kromozom 19q heterozigosite kaybı yüksek grade'li astrositomlarda bildirilmektedir (71,72,73). Bu yolun tipik olarak sekonder glioblastomlarda izlendiğine dair kanıtlar mevcuttur (44).

Kromozom 22. Kromozom 22q LOH, tüm gliomların %20-30'unda izlenebilmektedir (16,28). Söz konusu tümör süppressör genin gliom gelişiminin erken evrelerinde rol aldığı düşünülmektedir. Kromozom 22q'da yer alan nörofibromatozis 2 (*NF2*) geni haritalanmış, ancak astrositomlarda *NF2* mutasyonu saptanmamıştır (58). Çalışmalar *NF2*'ye yakın bir bölgeyi işaret etmektedir (53).

Yazışma Adresi: Doç. Dr. Figen Söylemezoğlu
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
06100, Ankara
E-mail: soylemez@ato.org.tr

KAYNAKLAR

- Barak Y, Gottlieb E, Juven G, Oren M. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.*,8:1739-49. 1994
- Batra SK, Rasheed BK, Bigner SH, Bigner DD. Biology of disease. Oncogenes and anti-oncogenes in human central nervous system tumors. *Lab.Invest.*,71:621-37. 1994
- Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*,56:180-5. 1997
- Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.*,94:303-9. 1997
- Bigner SH, Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathol.*,1:12-8. 1990
- Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia*,15:308-27. 1995
- Bostrom J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P et al. Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res.*,58:29-33. 1998
- Claesson W. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J.Biol.Chem.*,269:32023-6. 1994
- Collins VP, James CD. Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. *FASEB J.*,7:926-30. 1993
- Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttitz B, Louis DN et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene*,16:2259-64. 1998
- Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.*,51:2164-72. 1991
- El Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*,75:817-25. 1993
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*,247:49-56. 1990
- Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat.Res.*,276:299-306. 1992
- Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res.*,52:674-9. 1992
- Fults D, Pedone CA, Thomas GA, White R. Allelotype of human malignant astrocytoma. *Cancer Res.*,50:5784-9. 1990
- Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. Molecular biology of malignant degeneration of astrocytoma. *Pediatr.Neurosurg.*,24:41-9. 1996
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*,75:805-16. 1993
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*,387:296-9. 1997
- Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul.*,1:555-66. 1990
- Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ et al. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann.Neurol.*,36:714-21. 1994
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res.*,56:722-7. 1996
- Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermark B et al. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res.*,56:164-71. 1996
- Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,87:4207-11. 1990
- Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*,79: 573-82. 1994.
- Hurt MR, Moosy J, Donovan-Peluso M, Locker J. Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*,51:84-90. 1992
- Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP. Human glioblastomas with no alterations of the CDK2A (p16^{INK4A}, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene*,13:1065-72. 1996
- James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hausen M, Nordenskjöld MD, Collins VP et al. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res.*,48:5546-51. 1988
- Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S et al. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res.*,54:6353-8. 1994
- Jung JM, Bruner JM, Ruan S, Langford LA, Kyritsis AP, Kobayashi T et al. Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors. *Oncogene*,11:2021-8. 1995
- Kleihues P, Cavenee WK (eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of the Nervous System. IARC

- Press, Lyon, 2000. [ISBN 92 832 2409 4]
32. Koopmann J, Maintz D, Schild S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD et al. Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumours. *Br.J.Cancer*,72:1230-3. 1995
 33. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kouzelis K, Hadjiyannakis M, Priftis A, Stamoulis G et al. MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor. *Br.J.Cancer*,75:1269-78. 1997
 34. Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*,387:289-303. 1997
 35. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*,358:15-6. 1992
 36. 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.*,81:427-36. 1994
 37. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*,275:1943-7. 1997
 38. Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*,53:11-21. 1994
 39. Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet*,11:412-5. 1995
 40. Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*,52:31-8. 1993
 41. Mollenhauer J, Holmskov U, Wiemann S, Krebs I, Herbertz S, Madsen J et al. The genomic structure of the *DMBT1* gene: evidence for a region with susceptibility to genomic instability. *Oncogene*,18:6233-40. 1999
 42. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK et al. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet*,17:32-9. 1997
 43. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*,69:1237-45. 1992
 44. Nakamura, M., Yang, F., Fujisawa, H., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 59:539-43. 2000
 45. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL 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*,8:655-67. 1998
 46. 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.*,3:229-35. 1993
 47. Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavenee WK et al. Loss of P16INK4 expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res.*,55:1941-5. 1995
 48. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,91:7727-31. 1994
 49. Ohgaki H, Schauble B, zur H, von Ammon K, Kleihues P. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch.*,427:113-8. 1995
 50. Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, Biernat W, von Deimling A, Yasargil MG et al. A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol.(Berl)*,97:525-32. 1999
 51. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*,358:80-3. 1992
 52. Picksley SM, Lane DP. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays*,15:689-90. 1993
 53. Ransom DT, Ritland SR, Kimmel DW, Moertel CA, Dahl RJ, Scheithauer BW et al. Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer*,5:348-56. 1992
 54. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS et al. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res*,57:4187-90. 1997
 55. Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.*,53:2736-9. 1993
 56. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res.*,54:4299-303. 1994
 57. Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, Ohgaki H, Ekstrand BC, Helie M, Kleinman G et al. Loss of *DCC* expression and glioma progression. *Cancer Res.*,57:382-86. 1997
 58. Rubio MP, Correa KM, Ramesh V, MacCollin MM, Jacoby LB, von Deimling A et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res.*,54:45-7. 1994
 59. Scherer HJ. Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am.J.Cancer*,40:159-98. 1940
 60. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.*,54:6321-4. 1994
 61. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*,336:704-7. 1993
 62. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavenee WK, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature*,355:846-7. 1992

