

Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği

Genetics in Primary and Secondary Glioblastoma

ÖZ

Günümüzde glioblastom tedavisinde cerrahi ve diğer tedavi yaklaşımları memnun edici olmaktan uzaktır. Glioblastomlar moleküler temelde sekonder ve primer olarak iki subgruba ayrılmaktadır. P53 mutasyonu ve "Platelet-derived growth factor receptors" (PDGFR)'nin aşırı ekspresyonunun astrositom gelişiminde ilk genetik değişiklikler olduğu bilinmektedir. Bu değişikliklere retinoblastom geninin mutasyonunun veya delesyonunun, bax genini içeren 19q'da olan kayıplarının ve özellikle 10. kromozomun q kolunda olan delesyonların eklenmesi ile anaplastik astrositom ve sekonder glioblastom gelişmektedir. Yedinci kromozomda yerleşmiş "Epidermal growth factor receptors" (EGFR)'lerinin aktivasyonu, 9. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olan p16'nun homozigot delesyonları, hücre döngüsünde "Murine Double Minutes" (MDM2) proteinlerinin, p53 bağımlı frenleyici etkiyi azaltması, kromozom 10'un hem p hem de q kolunda olan kayıpları yanında PTEN mutasyonu gibi genetik değişiklikler astrositik öncü hücreden de novo olarak direkt primer glioblastom gelişmesine neden olmaktadır. Her iki tip glioblastom gelişiminde rol alan hücre siklusunun kontrol noktalarında geçişi frenleyici veya geçişten sorumlu proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimleri tartışılmıştır. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerin metilasyonlarının ve telomeraz aktivitesinin glioblastom gelişmesindeki katkılarına değinilmiştir. Glioblastomların gelişiminden sorumlu moleküler olayların detaylı bir şekilde anlaşılması, glioblastomların prognozu ve uygulanacak tedavinin seçimi konusunda yeni yaklaşımlar getireceği açıktır. Biz bu amaçla, glioblastomlarda şimdiye kadar saptanmış genetik değişikliklerin kısa bir derlemesini yapmayı uygun bulduk.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Genetik, Glioblastoma multiforme, Primer, Sekonder

ABSTRACT

The prognosis of glioblastoma is poor despite many treatment modalities including cytoreductive surgery. Glioblastoma is separated into two subgroups in the molecular basis as primary and secondary glioblastomas. The mutation of P53 tumor suppressor gene and the overexpression of "Platelet-derived growth factor receptors" (PDGFR) are known as the initial genetic changes in the formation of astrocytoma. The transformation of astrocytoma to anaplastic astrocytoma and secondary glioblastoma involves inactivation of a putative tumor suppressor gene on chromosome 19q, mutations or deletions of the retinoblastoma gene and the deletion of long arm of chromosome 10. The activation of epidermal growth factor receptor gene (EGFR), located on chromosome 7, the homozygous deletion of the p16, located on the short arm of chromosome 9, deforming of the equilibrium between MDM2-p53 proteins, the losses on 10p and 10q arms, and the genetic imbalances like PTEN mutation in the astrocytic stem cells may lead to the formation of primary glioblastoma de novo. The interactions between the regulator proteins on the cell cycle checkpoints, the role of the methylation of tumor suppressor genes and the activity of telomerase on the formation of glioblastoma, were discussed.

KEY WORDS: Genetics, Glioblastoma multiforme, Primer, Secondary

Ramazan DURMAZ

Murat VURAL

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı,
Eskişehir

Geliş Tarihi : 08.06.2007

Kabul Tarihi : 21.06.2007

Yazışma adresi:

Ramazan DURMAZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı,
Eskişehir

E-posta: rdurmaz@ogu.edu.tr

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü 2000 yılında astrositik tümörleri anaplazi derecesine göre sınıflandırmıştır. Bu sınıflamaya göre astrositik tümörler; pilositik astrositom (G I), diffüz astrositom (G II), anaplastik astrositom (G III) ve glioblastoma multiforme (G IV) olarak derecelendirilmiştir. Diffüz (fibriller) astrositomlar, düşük dereceli gliomlar içinde en sık karşılaşılan tümörlerdir (43).

Glioblastomlar günümüzde moleküler temelde primer ve sekonder olarak iki subgruba ayrılmaktadır. Ancak Alman nöropatolog Hans-Joachim Scherer 1940'lı yıllarda "Biyolojik ve klinik açıdan astrositomlardan gelişen sekonder glioblastomları primer glioblastomdan ayırt etmek gerekir. Bunlar muhtemelen uzun klinik süre ile uyumlu glioblastomlardır" diyerek glioblastomları klinik ve histopatolojik bulgulara göre iki subgruba ayıran ilk kişidir (66). Sekonder glioblastom, astrositom ve anaplastik astrositomun daha malign anaplazi derecesine dönüşümü sonucunda oluşmaktadır (44, 58). Bu nedenle öncü lezyona ve histopatolojik kanıt gereksinim vardır. Sekonder glioblastom, primer glioblastoma göre daha genç olgularda gözlenir. Düşük dereceli astrositomların glioblastoma dönüşmesi için geçmesi gereken süre ortamla 50-55 aydır. Primer glioblastom de novo olarak glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede glioblastom tanısı konulan tümörlerdir. Hızlı geliştikleri için ilk 3 ay içinde klinik belirti verirler ve daha çok yaşlı hastalarda gözlenirler (44, 85).

Fizyolojik koşullarda doku büyümesi proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin kontrolü altında gerçekleşir. Canlının gelişimi, doku rejenerasyonu ve tamiri sırasında fizyolojik proliferasyondan sorumlu büyüme faktörlerini kodlayan genlere proto-onkogen denir. Onkogenler; proto-onkogenlerin delesyonu, amplifikasyonu, mutasyonu ve yeniden düzenlenmesi (rearrangement) sonucu oluşur. Şimdiye kadar 100'ün üzerinde onkogen saptanmıştır. Belli başlı onkogenler şunlardır. 1) Büyüme faktörlerini, 2) hücre zarı reseptörlerini 3) bağları "ligands" 4) transkripsiyonel faktörleri 5) hücre içi iletim yolunda yer alan molekülleri kodlayan onkogenlerdir. Onkogenlerin kodladığı proteinler ise hücreye yeni fonksiyonlar kazandırır (4, 77). Tümör baskılayıcı genler fizyolojik şartlarda proliferasyonu frenleyen veya durduran proteinlerin transkripsiyonundan

sorumludurlar. Ancak tümör baskılayıcı genlerin delesyonu, amplifikasyonu, mutasyonu ve yeniden düzenlenmesi (rearrangement) sonunda fonksiyonlarını kaybetmesi büyümeyi baskılayıcı etkisinin ortadan kalkması ile sonuçlanır.

Glioblastomlarda, gerek cerrahi, gerekse diğer tedavi yaklaşımlarıyla tatminkâr sonuçların alınamaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur. Bu nedenle bu yazıda glioblastom gelişiminden sorumlu genetik değişiklikler üzerinde durulmuştur.

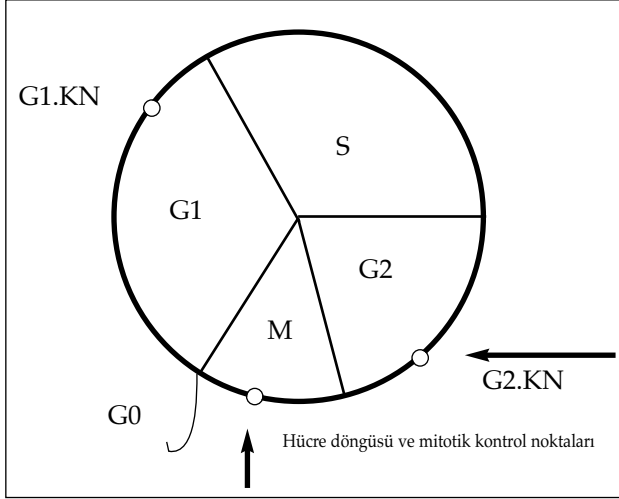
HÜCRE DÖNGÜSÜ:

KONTROL NOKTALARI ve HÜCRENİN ÇOĞALMASI veya FRENLENMESİNDE ROL ALAN MEKANİZMALAR

Hücre döngüsü 4 fazda tamamlanmaktadır. "Gap 1" (G1) fazı DNA replikasyonu için bütün hazırlıkların yapıldığı dönemdir. DNA replikasyonunu S fazında gerçekleştirilir. G2 mitotik faza hazırlıkların yapıldığı ara dönemdir ve genomik materyalin yavru hücrelere dağıtımı için içiciklerin düzenlendiği fazdır. Hücre döngüsünü boyunca G1, G2 ve mitotik fazda kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğine karar verilir. G1 fazı, erken G1 ve geç G1 olarak ayrılmaktadır. Erken G1 sonunda, G1 kontrol noktası bulunmaktadır. G2 kontrol noktasında ise DNA'nın uygun şekilde kopyalanıp kopyalanmadığı kontrol edilir. Uygun kopyalanma olmamışsa DNA'nın tamiri yapılmaya çalışılır. Bu da mümkün değilse hücre kendini ölüme götürür. Bu nedenle G2 kontrol noktası internal kontrol noktası olarak ta bilinir. Mitotik kontrol noktası genomik materyalin her iki yavru hücreye eşit şekilde dağıtımından sorumludur (19). Öploid veya anöploidinin; G2 ve mitotik kontrol noktası hatası sonucu geliştiği düşünülmektedir (49) (Şekil. 1).

Siklin bağımlı kinazlar ve siklinler

G1 kontrol noktasında hücrenin G1 fazından S fazına geçmesi retinoblastom proteinin fosforlanma durumuna göre olmaktadır. Retinoblastom proteinin fosforlanması siklin bağımlı kinazlar (SDK) ve siklinlerin oluşturduğu komplekslerle olmaktadır. Hücre döngüsünün dönemlerine göre farklı SDK'lar üretilmektedir. G1 fazında salgılanan SDKlar; siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4), siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) ve siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2) dir. Siklinler hücre siklusu boyunca ossilasyon halinde salınan proteinlerdir ve farklı SDK'lar ile birleşirler.

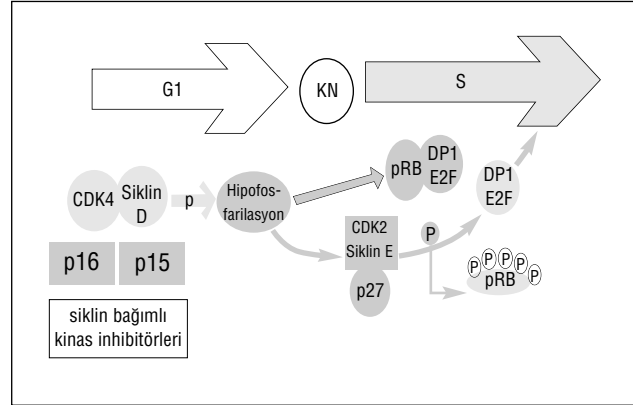


Şekil 1: Hücre siklusü ve kontrol noktaları.

G1 fazı siklinleri D ve E tipi siklinlerdir (Siklin D1, D2, D3 ve siklin E). S fazı siklinleri siklin A ve E iken mitotik fazı siklinleri A ve B dir. Siklinlerle siklin bağımlı kinazlar birbirine bağlanarak siklin-SDK kompleksini oluşturur. Bu kompleks Rb proteinini kısmi olarak fosforilasyona uğratar (hipofosfarilasyon) (19, 39). E2F transkripsiyonal faktör proteinleri retinoblastom proteinleri ile etkileşerek, DNA replikasyonu için gerekli genlerin aktivasyonundan ve siklusun G1/S geçişinden sorumludur. Hipofosfarilasyon halindeki retinoblastom proteini E2F-DP1 protein kompleksini bağlayabildiğinden, hücre döngüsü G1 kontrol noktasında durdurulur (13, 80). G1 fazının geç döneminde salınan CDK2 ile siklin E kompleksinin Rb proteini daha fazla fosforlaması (hiperfosfarilasyon) G1 kontrol noktasında S faza geçişe neden olur (19, 39). Hiperfosforile olmuş retinoblastom proteini E2F-DP1 kompleksini bağlayamaz ve G1/S geçişinden sorumlu E2F proteinleri serbest kalır. E2F proteinleri DNA'ya bağlanarak transkripsiyonel aktivitesini gösterir (Şekil. 2).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI); siklin ve CDK'ların aktivitesini ayarlar. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, özellikle siklin-CDK komplekslerinin aktivitelerini inhibe ederler ve hücre döngüsünü frenlediklerinden tümör baskılayıcı genlere adaydırlar. Etkilediği CDK ve inhibisyon mekanizmasına göre iki tip CKI vardır. 1- p16 aile benzeri CKI'leri (INK4 grubu); p15, p18, p19 dur. Bunlar genellikle G1 fazındaki CDK4 ve



Şekil 2: Retinoblastom proteinine (pRb) bağlı G1/S geçişi. CDK4-siklin D kompleksi, Rb proteinini fosforlar. Bu durumda Rb proteini hipofosforilasyon halinde bulunur. Hipofosforilasyon halindeki pRb hücrenin G1/S geçişinden sorumlu E2F protein ailesini bağlama kapasitesine sahip olduğundan, döngü G1 kontrol noktasında durdurulur (Kırmızı ok). Ancak CDK2-siklin E kompleksinin pRb'ü daha fazla fosforlaması ile pRb hiperfosforilasyon haline gelir. E2F proteinlerini bağlayamadığında S fazına geçiş gerçekleşir (Yeşil oklar).

CDK6 bağlayarak siklin D-CDK kompleks oluşumunu inhibe ederler. 2- p21 aile benzeri CKI'leri; p27 ve p57 dir. Bunlar multipl siklin-CDK komplekslerini inhibe ederler. Hipoksi, ultraviyole, radyasyon ve ilaç gibi hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda DNA hasarı olursa, hücre bu uyarıya p53 düzeyinde artışla yanıt verir. p21 in aktivasyonu sağlanarak G1 kontrol noktasında retinoblastom proteini daha fazla fosforlanması önlenir. Sonuçta döngü durdurulur. P21 siklin-CDK kompleksini inhibe etmesi yanında "proliferating cell nuclear antijen (PCNA)i de inhibe eder. PCNA; DNA replikasyonunu sağlayan DNA polimeraz'nın önemli bir kısmını oluşturur.

Gliom onkogeneğinde hücre çoğalması temelde iki yol ile kontrol edilmektedir. Bunlar retinoblastom proteini ki G1/S geçişini durdurur ve p53 proteinleridir. Hücresel strese bir cevap olarak G1 ve G2 kontrol noktalarında hücre döngüsünü durdurur veya apoptoza neden olur (38, 69).

GLİOBLASTOMLARDA SİTOGENETİK

Glioblastomlarda yapısal ve sayısal kromozom bozuklukları görülmektedir. Translokasyonlar, kırılmalar ve delesyonlar en sık karşılaşılan yapısal kromozom bozukluklarıdır. Translokasyonlar; 15 ile 18'ci kromozom arasında (t15;18), 10 ile 19'cu

kromozom arasında (10q24;19q13) olabildiği gibi en sık kompleks translokasyonlar; der 18)t(2;4;12;18), der(X)t(X;10)(q27.1;p12.1), der(10)t(10;15)(p11.23;q11.2), der(1):(1p31->1q44::7q11. 3-->7qter) görülmüştür (8, 15, 51). Delesyonlar; kısmi olabildiği gibi bir kromozomun bir allelinin kaybı (monozomi) şeklinde de olabilmektedir. Glioblastomlarda en sık karşılaşılan kromozomal kayıplar 9p, 10p veya q, 13q, 17p ve 19q da olmaktadır (14, 37, 52, 71, 84, 90). Bu kayıp bölgelerde tümör baskılayıcı genler oturabilmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin bir allelinin kaybına "Loss of heterozygosity" (LOH) denilmektedir. Knudson'un çift vuruş hipotezine göre LOH'lar tümör gelişimine neden olmazlar. Retinoblastom olgularında görüldüğü gibi herediter yolla gelmiş mutant bir retinoblastom geninin bir alleli yanında, diğer allelinin kaybı (LOH) varsa tümör gelişebilmektedir (45). Bu nedenle bir genin fonksiyon görmemesi için, LOH ile kaybolan allelinin yanında diğer allelinin ya mutant ya da metilasyon gibi değişikliklere uğraması gerekmektedir. Her iki allelin kaybı varsa buna genin homozigot delesyonu denilmektedir.

Glioblastomlarda sayısal kromozom anomalileri öploidi (euploidy) veya anöploidi (aneuploidy) sık görülmektedir. İnsan cinsiyet hücreleri vücut hücrelerinde bulunan kromozom sayısının yarısına sahiptir (23 kromozom) ve haploid (n) hücre olarak tanımlanır. Somatik hücrelerde ise diploid (2n) kromozom sayısı vardır. Kromozom sayısındaki artış veya azalma haploid (n) sayının tam katları kadar ise buna öploidi denilmektedir. Oysa haploid (n) sayının tam katları şeklinde olmayan artış ve azalışlar anöploidi olarak bilinir (3). Astrositik tümörlerde 7. kromozomda olan polizomiler (öploidi) yanında biz kendi çalışmamızda glioblastomlarda en sık kromozom 7 de (%50) poliploidi (öploidi) saptadık (1). Ancak glioblastomlarda kromozomal kayıpların, kromozomal kazanımlardan daha çok olduğu rapor edilmiştir (60).

GÜCRE DÖNGÜSÜNÜ DÜZENLEYEN Rb-CDK4-P16 GENLERİNDE OLAN DEĞİŞİKLİKLER

G1/S geçiş kontrol noktasını kontrol eden genlerin inaktivasyonu primer ve sekonder glioblastomlarda yaygındır. Rb, CDK4 ve p16 genlerin inaktivasyonu primer glioblastomlarda %50 sekonder glioblastomlarda %39 düzeyinde bulunmuştur (7). Ancak tüm glioblastomlar

düşünüldüğünde sadece Rb ve p16 genindeki değişiklikler %86 gibi bir değere çıkar ki bu Rb, CDK4 ve p16'da olan genetik değişikliklerin glioblastom gelişimindeki önemini gösterir (82). p16'da homozigot delesyona sahip olmayan glioma hücreleri, CDK4 aşırı ekspresyonu göstermişlerdir. p16, pRb ve CDK4 üyelerinden birinin değişikliği glial onkogeneze rol oynamaktadır. p16 ekspresyon yokluğunda siklin D1-CDK4 kompleksi pRb'yi fosforlayarak E2F nin serbest kalmasına ve hücrenin S fazına geçmesine neden olmaktadır. p16 ekspresyonu durumunda ise pRb sıklıkla eksprese edilmez veya CDK4 aşırı ekspresyonu vardır (57).

a) RB proteini (pRb)

Astrositomda onkogenezi başlatan ve daha malign formlara dönüşümden sorumlu genlerden biri retinoblastom (Rb) tümör baskılayıcı genidir. Retinoblastom geni 13q14 bölgesinde yerleşmiştir. Normalde, yabancı Rb geninin kodladığı Rb proteinleri fosforlanarak (hipofosforilasyon) hücre içi E2F proteinini (pE2F) bağlar ve G1 kontrol noktasında siklusu durdurulur. Retinoblastom geninin yokluğu ve mutant olması durumunda, ya Rb proteini fonksiyon görmeyecek veya Rb proteinin uygunsuz fosforlanması olacaktır. Bu durumda, Rb ile E2F proteinleri birbirine bağlanamayacağından, hücrenin S fazına geçmesi gerekli E2F proteinleri gibi transkripsiyonel faktörlerin artmasına neden olur (14, 19, 39, 90). Bu bölgedeki LOH, düşük dereceli astrositomda ~%20, anaplastik astrositomda ~%25 ve glioblastomda ~%35 bulunmuştur. Ancak Rb geninin mutasyonu çok düşük oranlarda bulunmuştur (90). Kromozom 13q bölgesindeki LOH'ler primer glioblastomlarda düşük düzeylerde gözlenirken (%12), sekonder glioblastomlarda daha yüksek düzeyde gözlenmesi (%38), Rb geninin de gliomaların malign formlara dönüşümünde olaya katıldığını göstermektedir (57).

b) CDK4

CDK4 geni 12q13'de yerleşmiştir. Glioblastomlarda CDK4 amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu %10-20 düzeyinde bulunmuştur (14, 78). CDK4 genini içeren bölgenin amplifikasyonu sadece anaplastik astrositom ve glioblastomlarda gözlenmiştir. CDK4 amplifikasyonu primer glioblastomlarda %4, sekonder glioblastomlarda %13 olarak rapor edilmiştir (7). Bu nedenle CDK4 gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonunun astrositom progresyonunda geç dönemde olaya katılan genetik değişiklik olarak kabul edilmektedir.

c) P16

P16, INK4 grubuna bağlı siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür. G1 fazında CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak pRb'nin fosforlanmasını önler ve G1/S geçişini durdurur. Bu nedenle P16 geni tümör baskılayıcı gen olarak bilinir (5). Kromozom 9p; p16 ve p15 proteinlerini kodlayan "cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN 2A; p16) ve "cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (CDKN 2B; P15) genini içermektedir (44). P16'nın metilasyonu veya mutasyonu %1 dolaylarında bildirilmiştir (17, 82). P15 ve p16'nın promoter bölgelerindeki hipermetilasyonlar protein ekspresyonunda kayıp ile sonlanmaktadır (32, 82). CDKN 2A'nın homozigot delesyonu düşük dereceli astrositomlarda gözlenmemiştir. Ancak anaplastik astrositomlarda %25 dolayında olmasına karşılık (64), glioblastomlarda %46-68 dolayında rapor edilmiştir (27, 55, 64). p16 inaktivasyonu daha çok p53 mutasyonu bulunmayan hastalarda saptanmıştır ve homozigot delesyonu yüksek Ki-67 proliferatif indeks ile uyumlu bulunmuştur (64). p16 inaktivasyonu ile epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) geni amplifikasyonu beraberliği dikkati çekmiştir (31). Bu birliktelik daha yaşlı hastalarda ve daha kötü prognozla uyumlu bulunmuştur. Kromozom 9p'de LOH ve p16 mutasyonun beraberce gerçekleşmesi, astrositom evalusyonunda anaplazi derecesine göre artarak, glioblastomlarda % 57 düzeyine ulaşmaktadır (82).

Ayrıca 9. kromozomun p kolu, CDKN 2A ile CDKN 2B arasındaki bölgede P14ARF geni içermektedir. p14ARF hem G1/S ve S/G2 geçişinde siklusu durdurur. Bu etki daha çok p53 ile p21 üzerinden olmaktadır. p14ARF düzeyi, p53 ekspresyonun aktivasyonuna bir cevap olarak artar. P14ARF, p16'nın aksine CDK'ları bağlamaz. Buna karşın p14ARF sitoplazmada p53'ü yıkan MDM2 proteinlerini hücre çekirdeğinde bağlayarak etkisiz kılar ve pMDM2 nin nükleustan sitoplazmaya geçmesine engel olur. Böylece MDM2'nin aktivitesi P14ARF tarafından inhibe edilmiş olur. Böylece p53'ün transkripsiyonel fonksiyonu zenginleştirilir. CDKN 2A, CDKN 2B ve P14ARF gen lokuslarını içine alan 9p'nin homozigot delesyonu glioblastomların %40'ında görülmüştür (36). p16 inaktivasyonu daha çok primer glioblastom gelişiminden sorumludur (7).

P53 GENİNDE OLAN DEĞİŞİKLİKLER

p53, 17p'de yerleşmiş tümör baskılayıcı gendir ve genom koruyucu olarak bilinir. Kodladığı protein p53, hipoksi, ultraviyole, radyasyon ve ilaç gibi nedenlerle hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda p21, p14 ARF, MDM2 ve bax aktivasyonu yaparak G1, G2 kontrol noktalarında siklusun durdurulması ve apoptoza neden olmaktadır. Astrositom onkogeneğinde p53'ün inaktivasyonu; hücrenin G1 fazındaki kontrolün (R noktası) değişmesi ve hücrenin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanmaktadır (69). p53 proteinin fonksiyon görmemesi için p53 geninde mutasyon veya P53 gen lokusunu içine alan allel kaybı olması gerekmektedir. Astrositomların (G II) yaklaşık 2/3 ünde p53 lokusunu içine allel kaybı ve diğer allelinde de mutasyon saptanmıştır (35). Sonuçta yabanıl (wild) p53 yokluğu, hücre çoğalmasının kontrol edilememesi ve hücrenin kendi kendini ölüme götürememesi yani bir anlamda apoptoz olayının gerçekleşmemesi ile sonuçlanmaktadır. Kromozom 17p13 lokusunda oturan TP53 geninin mutasyonunun astrositik tümörler içinde en sık diffüz astrositomlarda saptanmış olması, p53'ün astrositom onkogeneğinde ilk adımlardan biri olduğunu göstermektedir (65).

p53 mutasyonu tüm astrositik tümörlerde gözlenmesine rağmen anaplastik astrositomda (%64) glioblastoma multiformeden (%26) daha fazla bulunmuştur (42). Bu, p53'ün p16 ve p21 gibi tümör inhibitör proteinlerle harmonize çalışmasını engelleyerek, daha malign formlara dönüşümünü açıklamaktadır. p53 genindeki mutasyon sekonder glioblastomda %65 iken, primer glioblastomda sadece 10 olarak bulunmuştur (85). p53 proteinin aşırı ekspresyonu P53 geninin mutasyonunu yansıtmaktadır. P53 proteininin aşırı ekspresyonu sekonder glioblastomlarda >%90 iken, primer glioblastomlarda <%35 bulunmuştur (85).

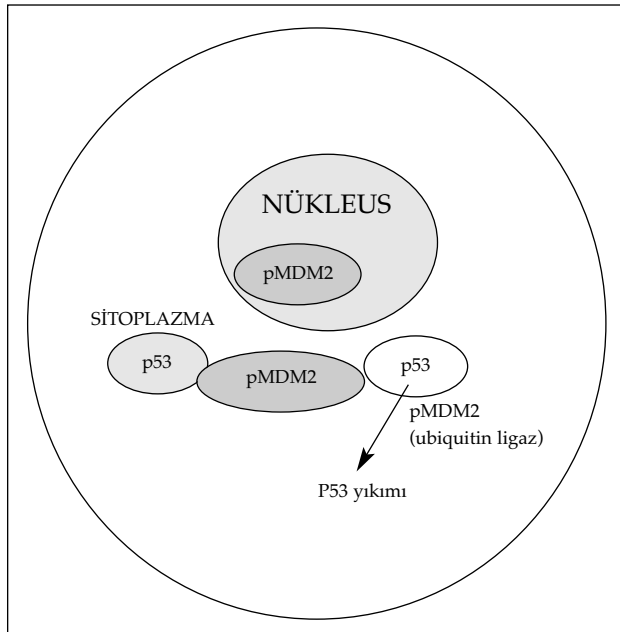
19q LOH

Kromozom 19q'da LOH'lar; daha sıklıkla oligodendrogliomda (%70) bulunmasına rağmen (29), düşük dereceli astrositomların, anaplastik astrositom veya glioblastomlara dönüşümünden sorumludur. Kromozom 19q'da LOH; difüz astrositomda ~ %15, anaplastik astrositomda ~ %45 ve sekonder glioblastomda %54 gözlenirken, primer glioblastomda ancak %6 düzeyinde saptanmıştır (57, 76, 84). Bu da 19q'da olan LOH'nin düşük dereceli

astrozitomaların malign formlara dönüşümünde rol aldığını göstermektedir. Kromozom 19q kolunda BAX tümör baskılayıcı geni oturmaktadır. Ancak bu gende herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (63).

MDM2 (Murine Double Minutes)

MDM2 geni 12q13-14 kromozom bölgesinde yerleşmiştir (62). Buradan kodlanan MDM2 proteinin (pMDM2), p53'ü kontrol altında tutar ve p53'ün G1/S geçişinde siklusu durdurma ve apoptoz etkisini engeller (68). MDM2 proteini sitoplazmada p53'ü bağlanarak ve "E3 ubiquitin ligase" aktivitesi ile p53'ü yıkarak p53'e karşı çalışan bir proteindir (Şekil 3). Hipoksi, ultraviyole, radyasyon gibi hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda pMDM2'nin p53'e bağlanma yerinde asetilasyon ve fosforilasyon nedeniyle yapısal değişiklik oluşur. Bu yüzden MDM2 proteini p53'ü bağlayamaz ve serbest kalan p53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında siklusu durdurulması ve bax geni aktivasyonu ile apoptoza neden olur. Ancak özellikle onkojenik stimulus varlığında pMDM2 etkisini, p53'e bağımlı olmayan yolla gösterir. G1/S geçişinden sorumlu olan E2F/DP1 aktivasyonunu p14ARF'in inaktivasyonunu yapar. İnaktive olan p14ARF hücre çekirdeğinde pMDM2'yi bağlayamaz ve sitoplazmaya çıkmasına engel olamaz. Bu nedenle P53'ün etkisi azalır. Ayrıca E2F aktivasyonu



Şekil 3: Fizyolojik şartlarda P53 proteininin MDM2 proteini tarafından etkisizleştirilmesi.

yaptığından hücre G1 fazından S fazına geçer (18, 68). MDM2 genindeki amplifikasyon glioblastomlarda < %10'un altında bulunmuştur (74, 75).

İmmünohistokimyasal çalışmalarda pMDM2'in aşırı ekspresyonu primer glioblastomda %52, sekonder glioblastomda %11 bulunmuştur (6). MDM2'in aşırı ekspresyonu, MDM2 geninin amplifikasyonu ve p53 mutasyonu bulunmayan primer glioblastomlarda saptanmıştır (74). Ayrıca kromozom 12q22-23 bölgesindeki LOH glioblastomlarda %42 düzeyine kadar ulaşmaktadır. Bu bölge "apoptotic protease activating factor-1" (Apaf-1)'i içermektedir. Bu bölgede olan kayıplar nedeniyle Apaf-1'in fonksiyon görmemesi sonucunda p53'ün neden olduğu apoptoz yolunun sonlanması ile glioma onkogenezi başlamaktadır. Kromozom 12q 22-23 bölgesindeki LOH'nin, p53 gen mutasyonu ve EGFR gen amplifikasyonu ile beraber olmaması, astrositik öncü hücrelerinin de novo olarak direkt malign transformasyonla primer glioblastom gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (86).

KROMOZOM 10 ve PTEN

Kromozom 10'da olan LOH'lar glioblastomlarda en sık karşılaşılan sitogenetik değişikliklerden biridir ve olguların %80'inde vardır. Bunlar en sık 10p, 10q23 ve 10q25-26 bölgesinde olur (37, 41, 70). Kromozom 10'da gözlenen bu kayıplar primer ve sekonder glioblastomlarda eşit sıklıkta gözlenmiştir (25). Ancak 10. kromozomun bir allelinin kaybı (monozomi) daha çok primer glioblastomlarda rapor edilmiştir (25). Kayıplar düşük dereceli astrositomlarda nadiren saptanırken anaplastik astrositomlarda % 40 düzeyinde bulunmuştur (37, 70).

PTEN geni kromozom 10q23.3 bölgesinde yerleşmiş tümör baskılayıcı gendir ve iki araştırmacı tarafından 1997 yılında saptanmıştır (47, 79). Bu nedenle PTEN/ MMAC1 olarak bilinir ve hücrelerin farklılaşma ve survisinde etkilidir. PTEN lokusunun kaybı glioblastomlarda %80 dolayında bildirilmesine rağmen PTEN mutasyonu %20-30 dolayında ve daha yaşlı hastalarda rapor edilmiştir (12, 72). Ancak PTEN geni mutasyonu primer glioblastomda 32, sekonder glioblastomda %4 dolayında bulunmuştur (81). Öte yandan primer glioblastomda 10. kromozom'un q ve p kolunu içeren tüm bir allelinin kaybına karşın, sekonder glioblastomda LOH'lar, kısmi delesyonlarla sadece q kolunda

bulunmuştur (24, 25). Tümör evalusyonunda 10q'da olan LOH ve PTEN mutasyonunun, p53'deki değişiklikleri takiben tabloya eklendiği kabul edilmektedir. P53 mutasyonu gösteren glioblastomlarda PTEN lokusu dışında özellikle 10q25-qter bölgelerinde kayıplar saptanmıştır ki bu sekonder glioblastom gelişiminde başka tümör baskılayıcı genlerin varlığını düşündürmektedir (24).

"PLATELET-DERİVED GROWTH FACTOR RECEPTORS" (PDGFR)

Astrofitomda (G II) "in situ hybridization" çalışmaları ile kromozom 7'deki trizomi/polizominin, % 66 düzeyinde olduğu rapor edilmiştir (87). Bilindiği gibi kromozom 7, "platelet drived growth factor-A" (PDGF-A) genini içermektedir. Öte yandan PDGF-B ise kromozom 22 cis-gen'i tarafından kodlanmaktadır (59). "Thyrosine kinase" ailesine bağlı olan "Platelet-derived growth factor receptors" (PDGFR), ve olmak üzeri iki yapıda bulunmaktadır (16). PDGF'lerin bu reseptörlere bağlanması, otokrin stimülasyon halkasını başlatmaktadır. PDGF yol açtığı otokrin stimülasyon, astrositler ve nöral progenitor hücrelerden düşük dereceli astrofitom ve oligodentrogliom gelişimine neden olmaktadır. Düşük dereceli gliomların malign transformasyonundan önce gözlenen bu deneyim, düşük dereceli gliom gelişiminde ilk adımlardan biri olarak kabul edilmektedir. PDGF ve PDGFR ekspresyonunun; düşük dereceli astrofitom, anaplastik astrofitom ve glioblastomlarda görülmesine rağmen, PDGFR'nın aşırı ekspresyonu ile p53 fonksiyon kaybının birlikteliğinin (17p kaybı) astrofitomda (G II) daha fazla olarak görülmesi, PDGF/PDGFR ile p53 arasında yakın bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (33). Düşük dereceli gliomların daha malign formlara geçişinde PDGFR'ların aşırı ekspresyonu, en erken olaylardan biri kabul edilir. Bu nedenle PDGF/PDGFR'lerde olan değişimler sekonder GBM gelişiminden sorumludur.

"EPİDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS" (EGFR)

"Epidermal growth factor" (EGF) ve "Epidermal growth factor receptors" (EGFR) sinyal yolu; de novo glioblastom gelişimine katılan temel genetik değişikliklerden biridir. "Epidermal growth factor" geni 4. kromozomda bulunurken, EGFR geni

7q12'de yerleşmiştir. EGFR'leri aynı PDGFR'de olduğu gibi "Thyrosine kinase" reseptör ailesine bağlıdır (50, 59). Kromozom 7q12'de oturan EGFR geninin amplifikasyonu ve proteininin aşırı ekspresyonu glioblastomların yaklaşık %35'inde bulunmuştur (48). Bu genin aktivasyonunun hücre zarının dış yüzeyindeki bağlarında yapısal değişiklik yapması bile hücrede otokrin stimülasyonu başlatması için yeterli olmaktadır. "Epidermal growth factor receptors" genindeki yeniden düzenlenmeler ("rearrangement") fazla protein ekspresyonu ile uyumludur (83). "Epidermal growth factor receptors" amplifikasyonu gösteren olguların tipik olarak kromozom 10'da kayıpları olduğu saptanmıştır (61). Seçilmemiş glioblastomlarda EGFR amplifikasyonu %30-40 düzeyinde bulunmuştur (50, 61). "Epidermal growth factor receptors" amplifikasyonu primer glioblastomda %39-73 iken, sekonder glioblastomda %0-9.5 düzeyinde bulunmuştur (81, 88). "Epidermal growth factor receptors"lerinin aktivasyonu "mitogen activated proten kinase" (MARK) gibi hücrelerin çoğalması ve survisinden sorumlu sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (53). "Mitogen activated proten kinase" proteinlerinin aşırı ekspresyonu gösteren hastalar, radyoterapiye karşı dirençli ve kötü prognozla uyumlu bulunmuştur (53, 67). Öte yandan "Mitogen activated proten kinase" ve AKT aktivasyonu, anaplastik astrofitomların glioblastoma dönüşümünden sorumlu tutulmaktadır (54).

"THE DELETED IN COLORECTAL CANCER (DCC) GENİ"

The deleted in colorectal cancer (DCC) geni 18q21 bölgesinde yerleşmiş tümör baskılayıcı genlere aday bir genidir (21). Ekspresyon kaybının astrofitomda %7, glioblastomda %47 düzeyine olması nedeniyle bu genin ekspresyon kaybının astrofitom progresyonuna katkı sağladığı düşünülmüştür (73).

METİLASYON

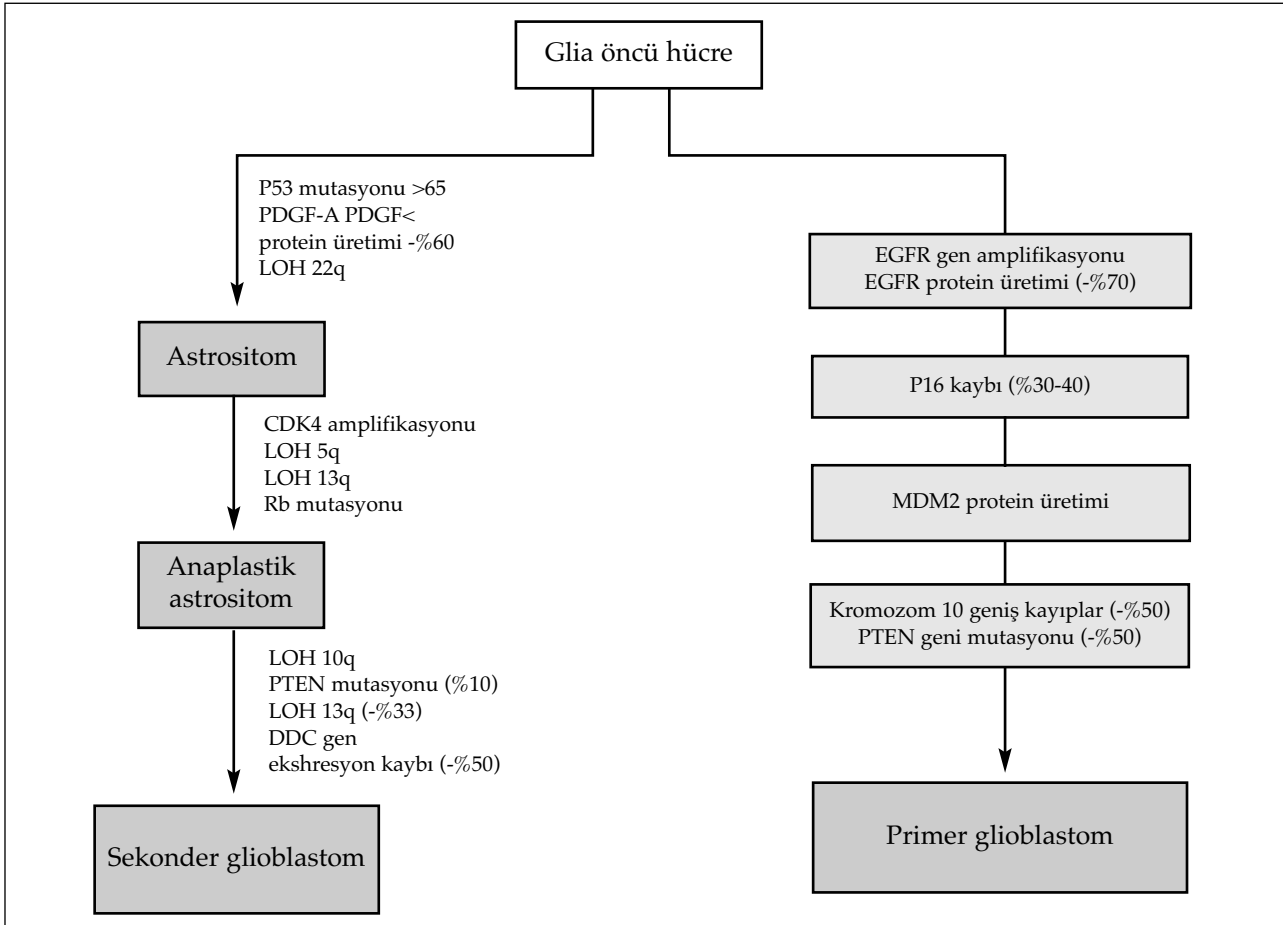
Biyokimyasal olarak tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu, delesyonlara karşı alternatif bir mekanizma oluşturmaktadır. Günümüzde tümör baskılayıcı genlerin LOH'larında diğer allelin en azından metilasyona uğradığı düşünülmektedir. Metilasyon; CpG dinükleotitinde, sitozin resüdülerinin, metil grubu ile birleşmesi ile olur ve tümör baskılayıcı genlerin ve hatta bir kromozomun fonksiyon kaybı ile sonuçlanır (X inaktivasyonu gibi)

(77). Astrositom onkogenezinde on altı genin promoter-CpG alanlarının metilasyonu bulunmuştur (89). Glioblastomlarda PTEN promoter bölgelerinin metilasyonu %35 olarak rapor edilmiştir (2). Promoter p16 geninin hipermetilasyonu, bu genin inaktivasyonuna neden olmaktadır ve tüm gliomlarda % 24 düzeyinde bulunmuştur (17, 23). "Nitrosourea and temozolomide", antikanser etkisini DNA'daki O6-guanini alkilleyerek yapmaktadır. "O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)" ise O6-guanini tekrar tamir etmektedir. Bu nedenle "O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)" alkilleyici ilaçlara ve temozolomide karşı direnç gelişiminden sorumludur (22, 40). MGMT geninin promoter bölgesinin metilasyonu, tüm glioblastomlarda %45 düzeyinde bulunmuş ve bu bölgede metilasyon gösteren hastalar temozolomide tedavisine iyi yanıt vermiştir (11, 30). Öte yandan MGMT geninin promoter bölgesinin metilasyon yolu ile susması, primer glioblastomlarda %36

düzeyinde bulunmuştur (56). Son zamanlarda, kromozom 3p21.3 bölgesindeki RASSF1A geninin hipermetilasyonu beyin tümörleri dahil kanser vakalarında rapor edilmiş ve bu genin tümör baskılayıcı bir gene aday olduğu düşünülmüştür (34). Düşük evreli glial tümörlerde RASSF1A hipermetilasyonu % 31.7 bildirilmiştir (26). Biz kendi çalışmamızda glioblastomlarda bu genin hipermetilasyonunu 6/10 hastada saptadık (20).

TELOMERAZ AKTİVİTESİ

Telomer; ökaryot kromozomlarının her iki terminal ucunda bulunan ve tekrarlayan (TTAGGG)n dizisini içeren yapılardır. İnsan yaşlandıkça veya hücre bölündükçe kısalmaktadır. Kısalan DNA kısımları telomeraz (ribonükleo-protein DNA polimeraz) adı verilen bir enzim ile yerine konulmaya çalışılır. Somatik hücrelerde telomeraz inaktif olduğundan, insan yaşlandıkça kromozomun kritik seviyelere kadar kısılması DNA instabilitesi ile sonuçlanır. Telomeraz ancak eşeyli ve



Şekil 4: Primer ve sekonder glioblastom yolundaki genetik değişiklikler.

tümör hücrelerinde aktif halde bulunur. Normalde p53, telomeraz bağımlı protein I' bağlanarak telomeraz aktivitesini inhibe etmektedir (9, 10). Telomeraz aktivitesi astrositik tümörlerde anaplazi derecesine bağlı olarak artar ve glioblastomlarda % 89 düzeyine rapor edilmiştir (46). Sekonder glioblastomlar primer glioblastomlara göre daha yüksek oranlarda telomeraz aktivitesi göstermiştir. Telomeraz aktivitesi; P53 mutasyonu gösteren olgularda, P53 mutasyonu göstermeyen olgulardan daha yüksek bulunmuştur. Bu P53 mutasyonu ve telomeraz aktivitesinin astrositom progresyonunda rol aldığını önermektedir (28).

Primer ve sekonder glioblastom gelişiminde katkısı olan ve bilinen genetik değişiklikler (Şekil 4)de özetlenmiştir.

Sonuç olarak; glioblastomlar gerek sitogenetik gerekse genetik olarak heterojen bir yapıdadır. Tüm glioblastomların yaklaşık %80'nini oluşturan primer glioblastomlar, direkt astrositik öncü hücrelerden de novo olarak gelişir ve daha kötü prognoz gösterir. Düşük evreli ve anaplastik astrositomların daha malign formlara dönüşümüyle gelişen sekonder glioblastomlar daha çok genç ve orta yaş grubunda görülür. Glioblastomların gelişiminde rol alan genetik değişikliklerin bilinmesinin tedavi yaklaşımlarında yeni ufuklar açacağı açıktır.

KAYNAKLAR

1. Arslantas A, Artan S, Öner U, Müslümanoğlu H, Durmaz R, Coşan E, Atasoy MA, Başaran N, Tel E: The importance of genomic copy number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Rev* 27:58-64,2004
2. Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 106:479-485,2003
3. Başaran N. *Tıbbi genetik, ders kitabı, altıncı baskı. Eskişehir: Bilim Teknik Yayınevi, 1996, 9. Böl-139-159*
4. Batra SK, Rasheed BK, Bigner SH, Bigner DD: Oncogenes and anti-oncogenes in human central nervous system tumors. *Lab Invest* 71:621-37,1994
5. Besson A, Yong VW: Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol* 51:245-264,2001
6. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H: Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:180-185,1997
7. 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 (Berl)* 94:303-309,1997
8. Bigner SH, Mark J, Burger PC, Mahaley MS Jr, Bullard DE, Muhlbauer LH, Bigner DD: Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* 48:405-411,1988
9. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 350:569-573,1991
10. Blackburn EH: Telomeres, *Trends Biochem Sci*. 16:378-381,1991
11. Blough MD, Zlatescu MC, Cairncross JG: O6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Res*. 67:580-584,2007
12. Bostrom J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G: 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
13. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K: E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* 29:409-417,2004
14. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN. Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:122-130,1998
15. Chernova O, Cowell JK: Molecular definition of chromosome translocations involving 10q24 and 19q13 in human malignant glioma cells. *Cancer Genet Cytogenet* 105:60-68,1998
16. Claesson-Welsh L: Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 269:32023-32026,1994
17. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK: Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 56:2405-2410,1996
18. Daujat S, Neel H, Piette J: MDM2: life without p53. *Trends Genet* 17:459-464,2001
19. Dirks PB, Rutka JT: Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. *Neurosurgery* 40:1000-1013; discussion 1013-1015,1997
20. Durmaz R, Uludağ A, Artan S, Tepeli E, Arslantaş A, Karakaş Z, Çilingir O: Methylation profiles of P16, RASSF1A and hMLH1 promoter-CpG islands in brain tumors. 7th Congress of the European Association for Neurooncology (EANO), September 14-17, 2006 Vienna Austria.
21. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49-56,1990
22. Friedman HS, Kerby T, Calvert H: Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 6:2585-2597,2000
23. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Bruner JM, Saito Y, Zhang B, Zhang W, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP. Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. *Oncogene* 13:1615-1619,1996
24. Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 155:387-394,1999
25. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80:65-72,2000
26. Gao Y, Guan M, Su B, Liu W, Xu M, Lu Y: Hypermethylation of the RASSF1A gene in gliomas. *Clin Chim Acta* 349:173-179,2004
27. Giani C, Finocchiaro G. Mutation rate of the CDKN2 gene in malignant gliomas. *Cancer Res* 54:6338-6339,1994

28. Harada K, Kurisu K, Tahara H, Tahara E, Ide T, Tahara E: Telomerase activity in primary and secondary glioblastomas multiforme as a novel molecular tumor marker. *J Neurosurg* 93:618-625,2000
29. Hartmann C, Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S, von Deimling A: Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:10-14,2005
30. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352:997-1003, 2005
31. Hegi ME, zur Hausen A, Ruedi D, Malin G, Kleihues P: Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas. *Int J Cancer.* 73:57-63,1997
32. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55:4525-4530, 1995
33. Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermarck B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nister M: Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res* 56:164-171,1996
34. Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, Kurihara H, Mori M, Saito N: Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 22:7862-7865,2003
35. Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP: Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 60:417-424,2000
36. Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP: Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13(5):1065-1072,1996
37. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP: Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22:9-15,1998
38. Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT: The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neurooncol* 51:219-229,2001
39. Ivanchuk SM, Rutka JT: The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. *Neurosurgery* 54:692-700,2004
40. Kaina B, Christmann M: DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40:354-367, 2002
41. Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjold M, Larsson C: Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet* 92:169-174,1993
42. Kato H, Kato S, Kumabe T, Sonoda Y, Yoshimoto T, Kato S, Han SY, Suzuki T, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C: Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. *Clin Cancer Res* 6(10):3937-3943,2000
43. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK: The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:215-225; discussion 226-229,2002
44. Kleihues P, Ohgaki H: Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol* 1(1):44-51,1999
45. Knutson AGJR: Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823,1971
46. Le S, Zhu JJ, Anthony DC, Greider CW, Black PM: Telomerase activity in human gliomas. *Neurosurgery* 42:1120-1124; discussion 1124-1125,1998
47. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis 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* 275:1943-1947,1997
48. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J: Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 313:144-147,1985
49. Loeper S, Romeike BF, Heckmann N, Jung V, Henn W, Feiden W, Zang KD, Urbschat S: Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet* 94:1-8,2001
50. Louis DN, Gusella JF: A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet* 11:412-415,1995
51. Mao X, Hamoudi RA: Molecular and cytogenetic analysis of glioblastoma multiforme. *Cancer Genet Cytogenet* 122:87-92,2000
52. Maruno M, Yoshimine T, Muhammad AK, Tokiyoshi K, Hayakawa T: Loss of heterozygosity of microsatellite loci on chromosome 9p in astrocytic tumors and its prognostic implications. *J Neurooncol* 30:19-24,1996
53. Mawrin C, Diete S, Treuheit T, Kropf S, Vorwerk CK, Boltze C, Kirches E, Firsching R, Dietzmann K: Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol.* 23(3):641-648, 2003
54. Mizoguchi M, Betensky RA, Batchelor TT, Bernay DC, Louis DN, Nutt CL: Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65(12):1181-1188, 2006
55. Moulton T, Samara G, Chung WY, Yuan L, Desai R, Sisti M, Bruce J, Tycko B: MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 146:613-619,1995
56. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis.* 22(10):1715-1719,2001
57. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:539-543,2000
58. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC: Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* 8:655-667,1998

59. Newton HB: Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 1: Growth factor and Ras signaling pathways. *Expert Rev Anticancer Ther* 3:595-614,2003
60. Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, Sasaki K: Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21:340-346,1998
61. Ohgaki H, Schauble B, zur Hausen A, von Ammon K, Kleihues P: Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch* 427:113-118,1995
62. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358:80-83,1992
63. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619,1993
64. Ono Y, Yamiya T, Ichikawa T, Kunishio K, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Ueki K, Louis DN: Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(10):1026-1031,1996
65. Pardo FS, Hsu DW, Zeheb R, Efird JT, Okunieff PG, Malkin DM: Mutant, wild type, or overall p53 expression: freedom from clinical progression in tumours of astrocytic lineage. *Br J Cancer* 9:1678-1686,2004
66. Peiffer J, Kleihues P: Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol* 9:241-245,1999
67. Pelloski CE, Lin E, Zhang L, Yung WK, Colman H, Liu JL, Woo SY, Heimberger AB, Suki D, Prados M, Chang S, Barker FG 3rd, Fuller GN, Aldape KD: Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 12(13):3935-3941, 2006
68. Piette J, Neel H, Marechal V: Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 15:1001-1010,1997
69. Prives C, Hall PA: The p53 pathway. *J Pathol* 187:112-126,1999
70. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH: Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10:2243-2246,1995
71. Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH: Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res* 54:1324-1330, 1994
72. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 57:4187-4190,1997
73. Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, Ohgaki H, Ekstrand BC, Helie M, Kleinman G, Yahanda A, Fearon ER, Kleihues P, Reale MA: Loss of DCC expression and glioma progression. *Cancer Res* 57:382-386,1997
74. 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* 53:2736-2739,1993
75. 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* 54:4299-4303,1994
76. Ritland SR, Ganju V, Jenkins RB: Region-specific loss of heterozygosity on chromosome 19 is related to the morphologic type of human glioma. *Genes Chromosomes Cancer* 12(4):277-282,1995
77. Santarius T, Kirsch M, Rossi ML, Black PM: Molecular aspects of neuro-oncology. *Clin Neurol Neurosurg* 99:184-195,1997
78. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP: CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54:6321-6324,1994
79. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15(4):356-362,1997
80. Stevens C, La Thangue NB: E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys* 412:157-169,2003
81. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:684-689,1998
82. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN: CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56:150-153,1996
83. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yaşargil MG, Wiestler OD, et al: Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 77:295-301,1992
84. von Deimling A, Nagel J, Bender B, Lenartz D, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD: Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int J Cancer* 1;57(5):676-80,1994
85. Watanabe K, Tachibana O, Sata 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* 6:217-224,1996
86. Watanabe T, Hirota Y, Arakawa Y, Fujisawa H, Tachibana O, Hasegawa M, Yamashita J, Hayashi Y: Frequent LOH at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma. *Brain Pathol* 13:431-439,2003
87. Wessels PH, Twijnstra A, Kessels AG, Krijne-Kubat B, Theunissen PH, Ummelen MI, Ramaekers FC, Hopman AH: Gain of chromosome 7, as detected by in situ hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2. *Genes Chromosomes Cancer* 33:279-284,2002
88. Yoon KS, Lee MC, Kang SS, Kim JH, Jung S, Kim YJ, Lee JH, Ahn KY, Lee JS, Cheon JY: p53 mutation and epidermal growth factor receptor overexpression in glioblastoma. *J Korean Med Sci* 16:481-488,2001
89. Yu J, Zhang H, Gu J, Lin S, Li J, Lu W, Wang Y, Zhu J: Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. *BMC Cancer* 4:65,2004
90. Zainuddin N, Jaafart H, Isa MN, Abdullah JM: Loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 9p, 17p and 13q in malays with malignant glioma. *Neurol Res* 26:88-92,2004