

Aus dem Institut für Neuropathologie der Charité  
Direktor: Prof. Dr. Andreas von Deimling

## HABILITATIONSSCHRIFT

# **Molekulargenetische Veränderungen in Gliomen und Meningeomen**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Experimentelle Neuropathologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Herrn Dr. med. Christian Hartmann  
aus Hamburg

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. M. Paul
<b>Eingereicht:</b>	30.11.2005
<b>Datum der Habilitation:</b>	18.12.2006
<b>Gutachter:</b>	1. Prof. Dr. T. Pietsch, Bonn 2. Prof. Dr. J. Hainfellner, Wien

# Inhaltsangabe

Einleitung .....	4
Gliome .....	4
Geschichte .....	4
Epidemiologie .....	4
Histopathologie .....	5
Therapie und Prognose .....	5
Meningeome .....	6
Lokalisation und Ursprung .....	6
Epidemiologie .....	7
Histopathologie .....	7
Therapie und Prognose .....	8
Die Notwendigkeit molekularer Pathologie .....	9
Molekulargenetische Befunde astrozytärer Tumore .....	10
Progressions-assoziierte genetische Veränderungen .....	10
Astrozytome WHO Grad II .....	10
Anaplastische Astrozytome WHO Grad III .....	11
Glioblastoma multiforme WHO Grad IV .....	11
Veränderungen auf Chromosom 22q .....	13
Kandidatengen Eingrenzung auf 22q .....	13
Untersuchung potentieller Tumorsuppressorgene auf 22q .....	15
Originalarbeiten .....	17
Molekulargenetische Defekte im Rb Signalweg .....	18
Übersicht: Rb Signalweg .....	18
Mutationen in <i>CDKN2A</i> , <i>CDK2NB</i> und <i>Rb</i> .....	18
<i>CDKN2A</i> Veränderungen als Modell genetischer Stabilität von Zelllinien .....	19
Originalarbeiten .....	19
Molekulargenetische Defekte im PI3K/AKT Signalweg .....	20
Übersicht: PI3K/AKT Signalweg .....	20
LOH auf Chromosom 10 und <i>PTEN</i> Mutationen .....	20
<i>PIK3CA</i> Mutationen .....	21
Originalarbeiten .....	22
Klonalität von Glioblastomen .....	23
Originalarbeiten .....	24
Genetik, Progression und Therapie glialer Tumore .....	25
Expressionanalyse astrozytärer Tumore .....	25
Molekulare Prognoseparameter und Astrozytome .....	25
LOH 9p und 10q als Prognoseparameter für Temozolomid Therapie .....	26
Originalarbeiten .....	27
Molekulargenetische Veränderungen oligodendroglialer Tumore .....	28
Bekannte genetische Veränderungen oligodendroglialer Tumore .....	28
Alterationen in Oligodendrogliomen WHO Grad II .....	28
Alterationen in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III .....	28
Originalarbeiten .....	30
Molekulargenetische Veränderungen und Tumorlokalisierung .....	30
Originalarbeiten .....	32
Identifikation von Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 19q .....	32
Übersicht: Kandidatenregionen auf Chromosom 19q .....	32
Transkriptionskartierung von 19q13.3 .....	33

Polymorphismen im <i>PLA2G4C</i> Gen .....	36
Tumorsuppressorgen-Inaktivierung durch Hypermethylierung .....	37
Parentales Imprinting von 19q .....	37
Originalarbeiten .....	38
PDGFRA in Oligodendrogliomen .....	40
Originalarbeiten .....	40
PIK3CA Mutationen in oligodendroglialen Tumoren .....	41
Originalarbeiten .....	42
Chromosomale und molekulagenetische Veränderungen in Meningeomen .....	43
Bekannte molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen .....	43
Die Häufigkeit von NF2 Mutationen in Meningeomen .....	44
Multiple Meningeome .....	47
Originalarbeiten .....	47
Zusammenfassung .....	48
Abkürzungen .....	50
Danksagung .....	51
Literatur .....	52
Verzeichnis eigener Publikationen .....	66
a.1) Erstautorenschaften in Zeitschriften mit peer-review System .....	66
a.2) Koautorenschaften in Zeitschriften mit peer-review System .....	67
c) Übersichtsarbeiten .....	69
Erklärung .....	70

# **Einleitung**

## **Gliome**

### **Geschichte**

Gliome sind Tumore des ZNS, welche von Gliazellen oder deren Vorläufern ausgehen. Der Begriff „Astrozytom“ wurde erstmalig von dem Pathologen Rudolf Virchow 1863 in die Literatur eingeführt (183). Frank Burr Mallory beschrieb 1914 erstmalig ein „Spongioblastoma multiforme“ (112). Harvey Cushing und Percival Bailey verwendeten die Begriffe „Gliom“, „Astrozytom“ und „Oligodendrogliom“ 1926 zum ersten Mal in ihrer histopathologischen Klassifikation von Hirntumoren und benannten das „Spongioblastoma multiforme“ in den noch heute verwendeten Namen „Glioblastoma multiforme“ um (6). Eine präzisere Definition des „Oligodendroglioms“ wurde 1929 von Percival Bailey und Paul Clancy Bucy eingeführt (5). Der deutsche Neurologe und Neuropathologe Klaus-Joachim Zülch ordnete 1957 die Klassifikation neu (212) und schuf damit wesentliche Grundlagen für die erste unter seiner Federführung vorgelegte WHO Klassifikation von Hirntumoren (214). Diese wurde von Paul Kleihues und Webster Cavenee 1993 überarbeitet (93) und 2000 aktualisiert (94). Entsprechend der WHO Klassifikation werden Gliome heute eingeteilt in Astrozytome, Glioblastome, Oligodendrogliome und Ependymome (93, 94).

### **Epidemiologie**

Primäre Tumore des ZNS ohne die Meningeome machen etwa 2% aller primären Tumore des Menschen aus. Allerdings sind sie verantwortlich für den Verlust von etwa 7% Lebensjahre durch Tumore in Menschen unter dem Alter von 70 Lebensjahren (144). Die weltweite Inzidenz von Hirntumoren beträgt etwa 7 auf 100.000 pro Jahr. Es findet sich eine Verteilung von Männern zu Frauen im Verhältnis 1,3 zu 1 (83). Es gibt zwei Lebensphasen, in welchen gehäuft Hirntumore beobachtet werden: zum einen im Kindesalter, zum anderen im Erwachsenenalter zwischen 45 und 70 Jahren (47). Epidemiologisch ist eine Zunahme von Hirntumoren vor allem bei älteren Menschen zu beobachten (48). Als mögliche Ursachen werden zum einen eine verbesserte Bildgebung und zum anderen eine verfeinerte Tumorklassifizierung genannt (34, 90, 105). Etwa 60 % aller primären Hirntumore sind diffuse infiltrierende Astrozytome. Diese Gruppe setzt sich zusammen aus etwa 10 bis 15 % Astrozytomen WHO Grad

II, aus 20 bis 30 % anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III und aus 50 bis 60 % Glioblastomen WHO Grad IV (94). Der Anteil an Oligodendrogliomen an allen Hirntumoren schwankt mit einem deutlichen Trend nach oben in den verschiedenen epidemiologischen Studien zwischen 5 bis 25% (28, 70, 118, 213). Als einer der wesentlichen Gründe für diesen Trend sind die unterdessen bekannten besseren therapeutischen Optionen anzunehmen, welche mutmaßlich die Bereitschaft, die Diagnose „Oligodendrogliom“ zu stellen, fördert (60, 83).

## **Histopathologie**

Histopathologisch zeichnen sich Astrozytome durch einen mehr oder weniger zarten glialen Faserfilz aus. Astrozytome werden eingeteilt in Astrozytome WHO Grad II, anaplastische Astrozytome WHO Grad III und in Glioblastome WHO Grad IV. Das pilozytische Astrozytom WHO Grad I ist wahrscheinlich ein völlig anderer Tumor aufgrund der fehlenden Neigung zur Progression, anderer betroffener Patienten, anderer Tumorlokalisation und eines anderen Infiltrationsmusters. Während ein Astrozytom WHO Grad II ein isomorphes Erscheinungsbild bietet, so finden sich beim anaplastischen Astrozytom WHO Grad III u.a. eine Zunahme der Zelldichte, der Mitosen und der Pleomorphie der Zellen und ihrer Kerne. Das Glioblastoma multiforme WHO Grad IV ist, zusätzlich zu den oben genannten Kriterien, definiert durch Nekrosen und mikrovaskuläre Proliferate (94).

Oligodendrogliome zeigen in der Paraffinhistologie einen typischen Artefakt, welcher ihre Diagnostik ungemein erleichtert: ein „Honigwaben-artiger“ Aspekt entsteht durch ein helles ausgewaschenes Zytoplasma. Es finden sich viele zarte, zumeist geradlinige Kapillaren. Das Oligodendrogliom WHO Grad II ist ein monomorpher Tumor mit gleichförmigen Zellkernen. Das anaplastische Oligodendrogliom WHO Grad III weist eine erhöhte Zellularität und Mitoserate auf und es finden sich pleomorphe Zellen. Gefäßproliferate und Nekrosen sind mit der Diagnose anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III vereinbar (94).

Bei Ependymomen WHO Grad II handelt es sich um isomorphe gliale Tumore, welche u.a. perivaskuläre Pseudorosetten und manchmal ependymale Rosetten ausbilden. Anaplastische Ependymome WHO Grad III weisen eine erhöhte Zellularität und Mitoserate auf, es kommen pleomorphe Zellen neben Gefäßproliferaten und Nekrosen vor (94).

## **Therapie und Prognose**

Seit Anbeginn der Therapie von Gliomen ist die totale operative Resektion das primäre Ziel. Da Gliomzellen ein ausgesprochen großes Potential zur Migration aufweisen, ist zumeist

eine Resektion über die makroskopisch ersichtliche Grenze des Tumors erforderlich. Dem gegenüber steht eine hohe Dichte an funktionell wichtigen Strukturen. Deshalb ist eine ausgedehnte Resektion aufgrund der dadurch entstehenden Ausfälle meistens nicht vertretbar. Im Anschluss an eine operative Tumorentfernung wird bei höhergradigen Gliomen eine Bestrahlung empfohlen. Auch hier ist die Vulnerabilität des Gehirns der limitierende Faktor, eine strahleninduzierte Enzephalopathie wird ab 60 Gy Strahlendosis beobachtet. Wenn diese Dosis ausgereizt ist, verbietet sich eine weitere Radiatio. Während Astrozytome kein sonderlich gutes Ansprechen zeigen, so findet sich eine Gruppe der Oligodendrogliompatienten, welche davon sehr profitieren. Die dritte therapeutische Option liegt in der Chemotherapie, welche vor allem bei den Oligodendrogliomen aufgrund verbesserter molekulargenetischer Diagnostik deutliche Erfolge aufweisen konnte. Hier besteht der limitierende Faktor in der Gefahr der Induktion von Zweitmalignomen (60, 144, 145).

Im Kontext dieser limitierten therapeutischen Optionen ist die Prognose von Gliomen denkbar schlecht. Patienten mit einem Astrozytom WHO Grad II weisen ein medianes Überleben von 5 Jahren, mit einem anaplastischen Astrozytom WHO Grad III ein Überleben von 2 bis 3 Jahren und Patienten mit einem Glioblastom WHO Grad IV ein medianes Überleben von weniger als 12 Monaten bei maximaler Therapie auf. Niedriggradige Astrozytome zeigen eine fast obligate Tendenz zur Progression, was zumeist den die Lebenszeit limitierenden Faktor darstellt (144). Das mediane Überleben von Patienten mit einem Oligodendrogliom WHO Grad II schwank deutlicher zwischen den Studien und liegt zwischen 4 und 17 Jahren. Hinsichtlich Patienten mit einem anaplastischen Oligodendrogliom WHO Grad III werden ebenfalls deutlich gestreute mediane Überlebenszeiten zwischen 0,9 Jahren und 7,3 Jahren berichtet. Die deutlich größere Schwankungsbreite in den Überlebenszeiten erklärt sich wahrscheinlich durch die in den letzten Jahren hinzu gekommenen therapeutischen Optionen, welche eine deutliche Lebensverlängerung zur Folge haben. Oligodendrogliome WHO Grad II zeigen eine geringgradigere Neigung zur Progression als Astrozytome WHO Grad II (58, 60, 62).

## ***Meningeome***

### **Lokalisation und Ursprung**

Meningeome sind Tumore, welche wahrscheinlich von den Meningen ihren Ausgang nehmen. Sie werden sowohl im gesamten Bereich der Neuraxis, d.h. intrakranial, spinal, intraventriculär, als auch extrakranial beobachtet (46). Von den intrakraniellen Meningeomen kommen 40% im Bereich der Konvexität der Hemisphären vor. Oft sind sie mit der Falx ver-

bunden und es kann zu bilateraler Verdrängung der Hemisphären kommen. Parasagittal finden sich Meningeome zumeist im mittleren und vorderen Drittel der Schädelhöhle. Weitere Lokalisationen sind Keilbeinflügel, paraselläre Region, Nervus opticus, Tentorium cerebelli und die Fossa posterior. Intraspinale Meningeome finden sich gehäuft im thorakalen Bereich und machen etwa 12% aller Meningeome aus. Meningeome infiltrieren überwiegend anliegende Abschnitte der Dura mater und nur selten das angrenzende Gehirn. Fernmetastasen werden nur bei höher malignen Meningeomen beobachtet (46, 83, 94).

Aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten mit arachnoidalen Deckzellen wird der Ursprung von Meningeomen in der Arachnoidea vermutet. Allerdings steht ein befriedigender Beweis aus. Da die Meningen vom Mesoderm ausgehen, sind Meningeome wahrscheinlich mesodermalen Ursprungs (133).

## **Epidemiologie**

Etwa 13 bis 19% aller primären Hirntumore gehören der Gruppe der Meningeome an (46). Die Inzidenz von Meningeomen liegt etwa bei 6 auf 100.000 Einwohner pro Jahr. Am häufigsten kommen Meningeome in der sechsten und siebten Lebensdekade vor, allerdings sieht man gelegentlich auch kindliche Meningeome (94). Mutmaßlich liegt die Inzidenz jedoch über diesem Wert, da wiederholt bis dato nicht bekannte Meningeome in Autopsien nachgewiesen wurden. Bei steigendem Durchschnittsalter der Bevölkerung werden in der Zukunft Meningeome ein zunehmendes Problem darstellen. Meningeome gehören zu den wenigen Tumorentitäten, welche häufiger bei Frauen als bei Männern auftreten. Insgesamt beträgt das Verhältnis von Frauen zu Männern etwa 1,8 : 1,0 (46). Bei sekretorischen Meningeomen beträgt das Verhältnis von Männern zu Frauen sogar 9 : 1 (139).

## **Histopathologie**

Histologisch zeigen Meningeome variable Erscheinungsbilder, die innerhalb eines Tumors ineinander übergehen können. Nach der zweiten revidierten WHO Klassifikation werden fibroblastische, meningotheomatöse, transitionale, psammomatöse, angiomatöse, sekretorische, mikrozystische, lymphoplasmazellreiche, metaplastische, klarzellige, chordoide, papilläre, rhabdoide, atypische und anaplastische Varianten von Meningeome unterschieden. Als häufige Meningeomvarianten werden die fibroblastischen, meningotheomatösen, transitionalen, psammomatösen und angiomatösen, als seltene Varianten die sekretorischen, mikrozysti-

schen, lymphoplasmazellreichen, metaplastischen, klarzelligen, chordoiden, papillären und rhabdoiden Meningeome bezeichnet (94).

Meningothelimatöse Meningeome sind isomorphe Tumore, welche von gefäßführenden Bindegewebesepten begrenzte Läppchen ausbilden. Zellgrenzen sind lichtmikroskopisch nicht zu differenzieren. Die rundlich-ovalen isomorphen Kerne haben einen moderaten Chromatingehalt und weisen oft Zytoplasmavaginationen im Sinne von Lochkernen auf. Fibroblastische Meningeome bestehen aus spindelförmigen, isomorphen Tumorzellen, welche in Strängen und Zügen wachsen und fokal Wirbel ausbilden. Diese können zentral zu sogenannten Psammomkörpern verkalken. Zum Teil werden diese fibroblastischen Meningeome von dicken Kollagenbündeln durchzogen. Transitionale Meningeome stellen eine Mischform aus meningotheimatösen und fibroblastischen Meningeomen dar. Psammomatöse Meningeome zeichnen sich durch sehr viele Psammomkörpern aus. Das Tumorgewebe an sich bietet einen transitionalen Aspekt. Angiomatöse Meningeome weisen eine große Zahl an Gefäßen auf, welche zumeist auffallend Wände haben (94). Die histologische Subklassifikation von Meningeomen hat zumeist keine Konsequenzen für Therapie und Prognose.

Hingegen ist die Graduierung von klinischer Relevanz. Es gibt Meningeome WHO Grad I, atypische Meningeome WHO Grad II und anaplastische Meningeome WHO Grad III. Etwa 80 bis 90% aller Meningeome entsprechen dem WHO Grad I, 5 bis 15% dem atypischen Grad II und 1 bis 3% dem anaplastischen Grad III (102). Fibroblastische, meningotheimatöse, transitionale, psammomatöse, angiomatöse, sekretorische, mikrozystische, lymphoplasmazellreiche und metaplastische Meningeome werden als WHO Grad I eingeteilt. Klarzellige, chordoide und papilläre Meningeome werden als atypische WHO Grad II Tumore, rhabdoide als anaplastische Meningeome WHO Grad III graduiert (94).

## **Therapie und Prognose**

Primäres therapeutisches Ziel ist die kurative Resektion von Meningeome (85). Im Falle von Meningeomen der Konvexität ist dieses zumeist problemfrei möglich, wenn es sich um WHO Grad I Tumore handelt. Die Resektion von Meningeomen der Schädelbasis ist problematischer aufgrund des flächigen Wachstums mit Ummauerung präexistenter anatomischer Strukturen wie Hirnnerven und Blutgefäße. Hier sind Rezidive häufig (135). Bei subtotalen Tumorresektion oder bei Vorliegen eines Meningeoms vom WHO Grad II bis III wird eine Radiotherapie angeschlossen. Eine Chemotherapie von Meningeomen der WHO Grade II und III wird aufgrund des mäßigen Erfolges nur selten durchgeführt (83).

Patienten mit einem Meningeom WHO Grad I haben im Falle einer vollständigen totalen Resektion zumeist keine reduzierte Lebenserwartung. In 7 bis 20% aller Meningeome WHO Grad I kommt es zu Rezidiven. Eine Progression wird selten gesehen. Hingegen kommt es bei atypischen Meningeomen WHO Grad II in 30 bis 40% und bei anaplastischen Meningeomen WHO Grad III in 50 bis 78% der Fälle zu Rezidiven (94). Die mediane Überlebensrate von Meningeomen WHO Grad III liegt unter 2 Jahren (134).

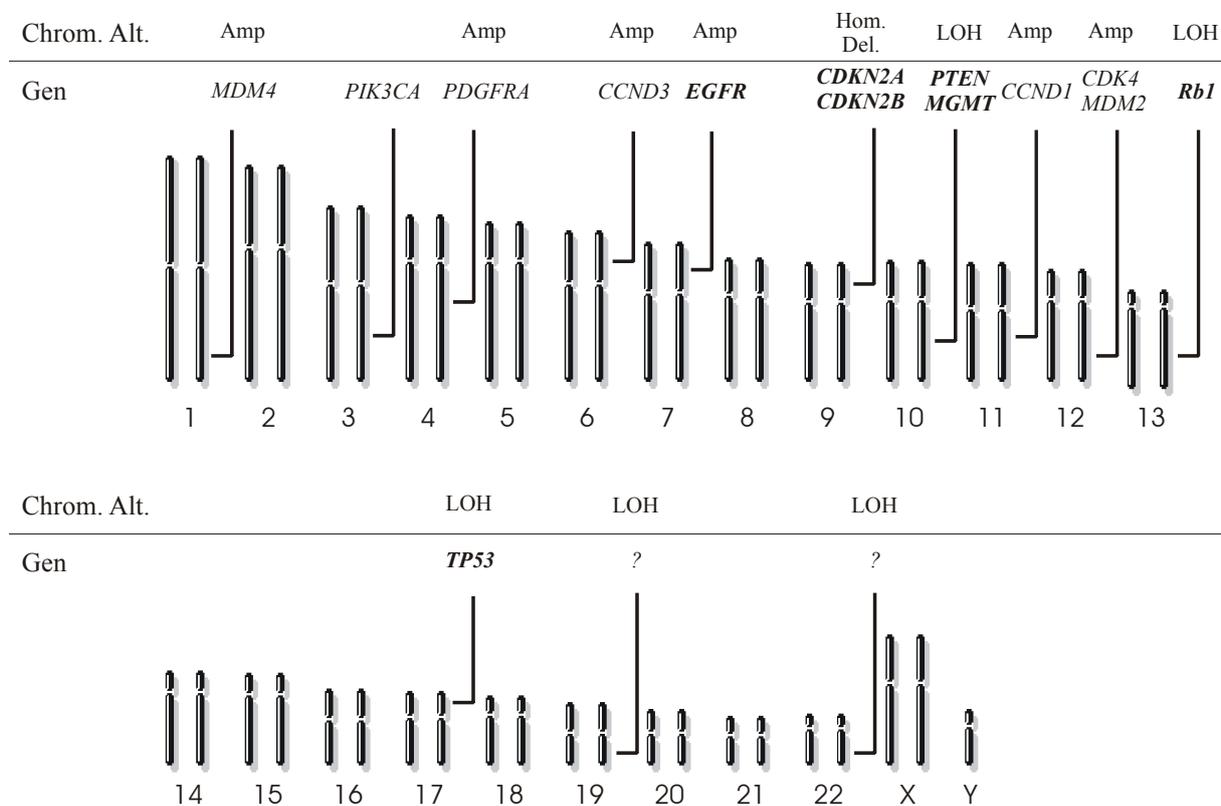
### ***Die Notwendigkeit molekularer Pathologie***

Sowohl in der klassischen morphologischen Diagnostik als auch in der Therapie sind die auf mikroskopischen Beobachtungen und auf empirischen Behandlungen beruhenden Fortschritte gering. Das differenzierte Verständnis molekularer Ursachen von Hirntumoren erlaubt Verbesserungen in der Klassifikation, in der prognostischen Einschätzung und in der Entwicklung von neuen Therapien für diese zum Teil noch immer sehr schlecht zu behandelnden Tumore.

Die im Folgenden vorgestellten Studien unterlagen diesem Anspruch. Sie konnten kleinere Fragen beantworten. Sie warfen noch viel größere, neuere auf.

# Molekulargenetische Befunde astrozytärer Tumore

## Progressions-assoziierte genetische Veränderungen



**Abbildung 1:** Chromosomale und molekulargenetische Veränderungen in astrozytären Tumoren. Details siehe Text. Chrom: chromosomal, Alt: Alteration, Amp: Amplifikation, Hom: homozygot, Del.: Deletion, LOH: loss of heterozygosity.

## Astrozytome WHO Grad II

In etwa 50% der Astrozytome WHO Grad II findet sich eine Polysomie von Chromosom 7q (165, 199). In etwa 20% der Fälle wird LOH (Loss of heterozygosity) von polymorphen Markern auf 22q bei niedriggradigen Astrozytomen beschrieben (80). Deutlich seltener kommen Verluste auf den Chromosomen 13q, 10p und 6 vor (94). Etwa 60% aller Astrozytome WHO Grad II weisen Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* auf. (94). In gemistozytären Astrozytomen werden in bis zu 80% der Fälle *TP53* Mutationen beschrieben (190). *TP53* Mutationen gehen zumeist einher mit einem LOH 17p (144). Das p53 System wird alternativ durch eine Methylierung des Promotors des  $\beta$ -Transkriptes des Genes *CDKN2A* gestört, welches p14<sup>ARF</sup> kodiert, (122). Eine Überexpression des PDGFR $\alpha$  Proteins, welches dimerisiert

eine Tyrosinkinase Rezeptor ist, und dessen Liganden PDGF-A, wird häufig beschrieben und deutet auf eine autokrine Stimulation hin (49, 71). PDGFR $\alpha$  Überexpression wird vor allem in Astrozytomen WHO Grad II gefunden, welche LOH 17p aufweisen (72). Für eine Übersicht siehe Abbildung 1 und 2.

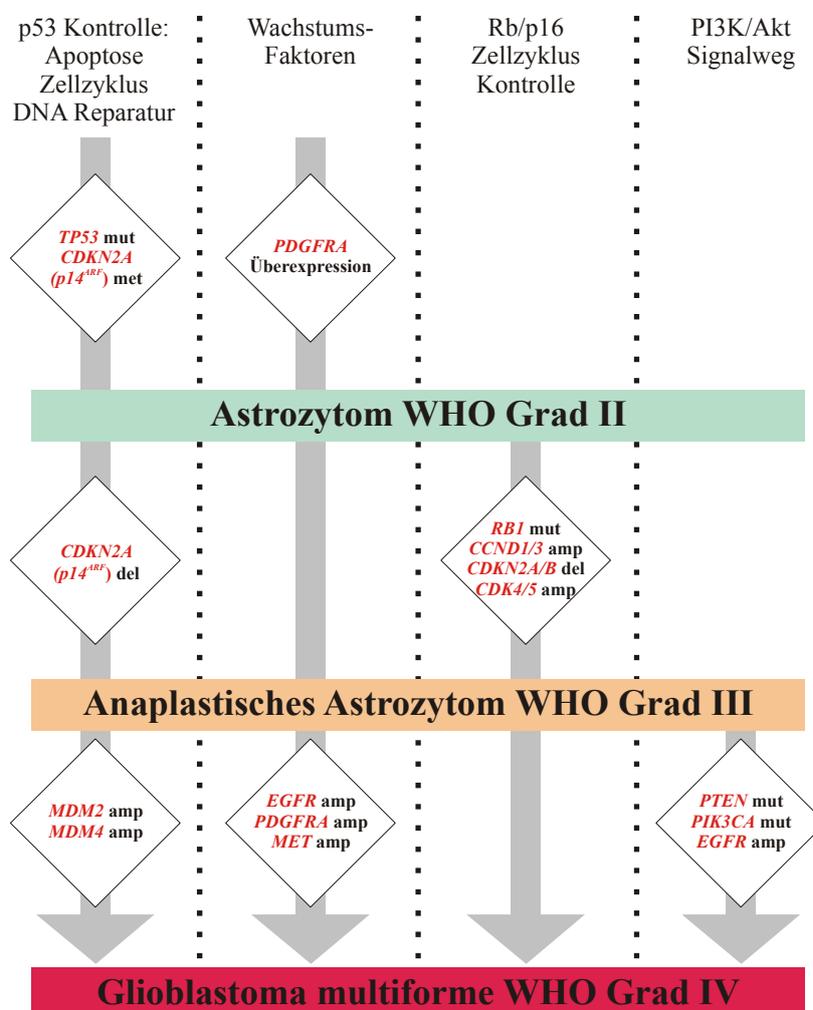
### **Anaplastische Astrozytome WHO Grad III**

Progressions-assoziierte chromosomale Alterationen in anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III umfassen in vielen Fällen den Verlust einer Kopie von den chromosomalen Armen 9p und 13q und die Amplifikation von Abschnitten auf Chromosom 12q (94). Diese chromosomalen Regionen tragen die den Zellzyklus regulierende Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* (9p21), *RB* (13q) und *CDK4* (12q). Somit ist wahrscheinlich der wichtigste Schritt in der Progression zur Anaplasie eine Störung der Zellzyklusregulation (144). Alterationen der Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* sind dabei die häufigste Ursachen der Störung des Zellzyklus. Es finden sich entweder homozygote Deletionen der Gene (57, 87, 123, 163) oder eine Hypermethylierung der CpG Inseln der Promotorregion (29), welche zum Verlust der Genexpression führt. Seltener sind Mutationen im Tumorsuppressorgen *RB*, welches in der Regel nur mutiert aufgefunden wird, wenn die Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* nicht alteriert sind (57, 77). Etwa 80% aller malignen Gliome weisen Läsionen entweder in *CDKN2A* und *CDKN2B* oder in *RB* auf (57). Die Proteine p16 (*CDKN2A*) und p15 (*CDKN2B*) inhibieren die Proteine CDK4 (*CDK4* auf 12q) und CDK6 (*CDK6* auf 7q). Als alternativer Mechanismus zur Ausschaltung der inhibierenden Proteine p16 und p15 kommen Amplifikationen von *CDK4* (häufig) und *CDK6* (selten) vor (30, 123, 146). Zumeist finden sich in anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III neben Defekten in der Zellzyklus Kontrolle noch Veränderungen im p53 System: *TP53* Mutationen, homozygote Deletionen von *CDKN2A*, über dessen  $\beta$ -Transkript die RNA für p14<sup>ARF</sup> abgelesen wird, oder Amplifikation von *MDM2* werden beschrieben (76). Übersicht siehe Abbildung 1 und 2.

### **Glioblastoma multiforme WHO Grad IV**

In Glioblastomen findet sich oft ein polyploider Satz an Chromosomen, es gibt selbst deutliche Variationen zwischen verschiedenen Tumorzellen (144). An singulären, häufig anzutreffenden chromosomalen Veränderungen ist an erster Stelle der zumeist komplette Verlust von einer oder beiden Kopien von Chromosom 10 zu nennen (83). Seltener kommen Deletionen auf 19q vor (94). An molekulargenetischen Veränderungen stehen Amplifikationen des On-

kogens *EGFR* auf Chromosom 7q und Mutationen im Tumorsuppressorgen *PTEN* auf Chromosom 10q im Vordergrund (144). Beide Gene werden auch in wenigen anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III mutiert aufgefunden. Diese Tumore weisen eine schlechtere Prognose auf (94, 144). *EGFR* Amplifikationen werden häufiger in primären Glioblastomen gefunden als in sekundären Glioblastomen (191). Das *PTEN* Gen kodiert einen Inhibitor des PI3K/AKT Signalweges. *PTEN* Mutationen kommen in etwa 30 bis 44% aller Glioblastome vor (189). Hierbei handelt es sich vor allem um primäre Glioblastome (176). Der PI3K/AKT Pathway kann ebenfalls eine Aktivierung erfahren durch Mutationen im Onkogen *PIK3CA* (15, 54, 95, 159). Neben diesen molekulargenetischen Veränderungen finden sich zudem Amplifikationen des Onkogens *PDGFRA*, welches vor allem in primären Glioblastomen verändert vorkommt (41, 200). Übersicht siehe Abbildung 1 und 2.



**Abbildung 2:** Progressionsassoziierte molekulargenetische und epigenetische Veränderungen astrozytärer Tumore. Mut: Mutation, met: Hypermethylierung, del: homozygote Deletion, amp: Amplifikation. Für nähere Details siehe Text. Abbildung modifiziert nach (144).

## **Veränderungen auf Chromosom 22q**

### **Kandidatengen Eingrenzung auf 22q**

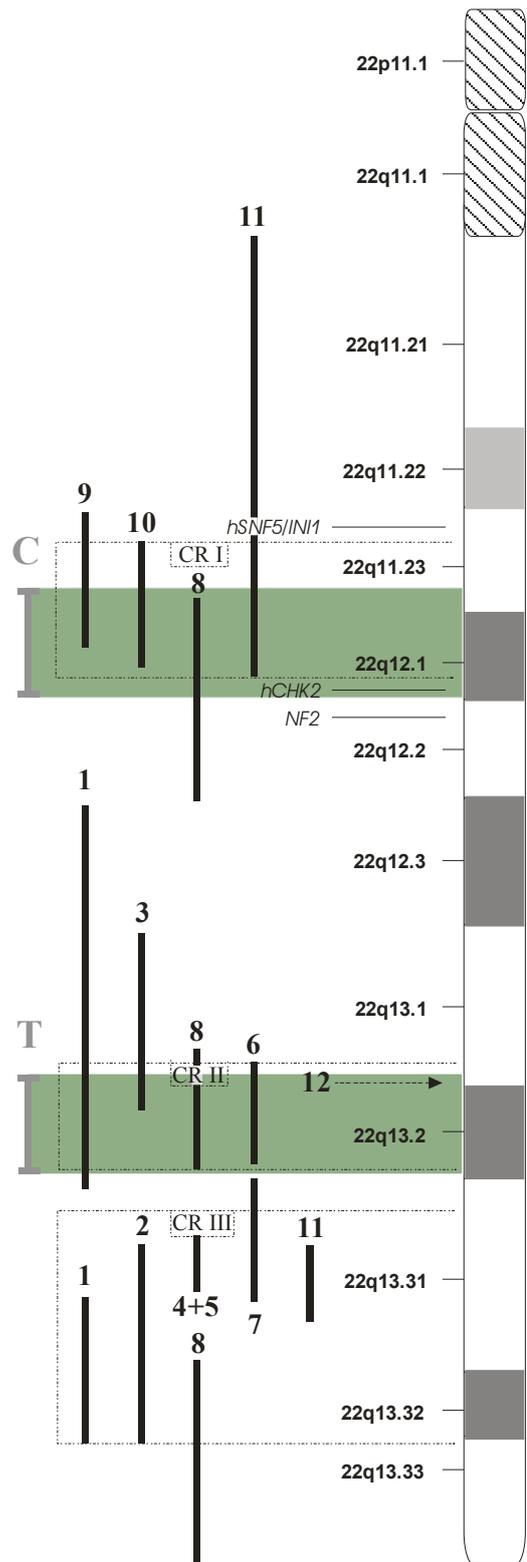
Chromosom 22q ist in etwa 30% aller astrozytären Tumore deletiert und damit eine häufige genetische Veränderung in diesen Tumoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Region in der Mitte des chromosomalen Arms bereits in niedriggradigen und eine telomere Region zumeist erst in hochgradigen Astrozytomen verloren gehen (80, 128). Beide Studien verwendeten Mikrosatelliten Marker, um Tumore mit interstitiellen LOH zu detektieren. Wenn multiple Tumore identifiziert werden, welche solche kleineren Deletionen aufweisen, können eine oder mehrere „common regions of overlap“ definiert werden. Entsprechend der „two hit“ Hypothese von Knudson kann ein Tumorsuppressorgen in dieser Region liegen: die eine Kopie dieses postulierten Gens ist inaktiviert durch den Verlust des ganzen chromosomalen Abschnittes, das zweite Allel durch umschriebene Mutationen (97). Das Ziel der Eingrenzungen solcher gemeinsamen Überlappungsregion („common region of overlap“) ist es, diese auf eine sehr kleine chromosomale Region einzuschränken, um dann gezielt die wenigen dort sich befindenden Gene auf Mutationen hin zu untersuchen.

Die erste Beschreibung des Verlustes chromosomaler Abschnitte auf 22q in Gliomen reicht in das Jahr 1988 zurück (86). Zum Teil widersprüchliche Daten erbrachten die folgenden Studien, welche erstmalig partielle Deletionen im Bereich 22q12 bis 22q13 in der Nähe des Tumorsuppressorgens *NF2* beschrieben. Allerdings stimmen diese Regionen nur teilweise überein (73, 121, 149, 194). Die beiden oben genannten Studien deuteten, unter Verwendung einer höheren Auflösung, auf zwei Regionen im Bereich 22q12.3 bis 22q13.31 und 22q13.31 bis 22q13.32 hin (80, 128). Neben Astrozytomen weisen auch andere Tumorentitäten Deletionen auf 22q auf. Unter anderem Meningeome (102), Ependymome (75, 98), Brust- (1, 25, 78), Kolon- (25, 26), Ovarial- (16), Rachen- (116) und Pankreasinseldzellkarzinome (201) zeigen Verluste chromosomalen Materials auf 22q. Während bei Meningeomen und Ependymomen zum Teil Mutationen im Tumorsuppressorgen *NF2* gefunden werden (94), so konnte bei den anderen genannten Tumoren kein mutiertes Tumorsuppressorgen identifizieren werden.

Um die astrozytären Kandidatenregionen näher einzugrenzen, wurde ein zweiteiliger Ansatz gewählt: zum einen wurden bioinformatisch die Daten der etablierten 22q Studien auf die im Jahr 2000 erstmalig vorliegende physikalische DNA Sequenz des Chromosoms gelegt, zum anderen 153 Astrozytome aller drei WHO Grade mittels 11 polymorpher Mikrosatellitenmarker analysiert.

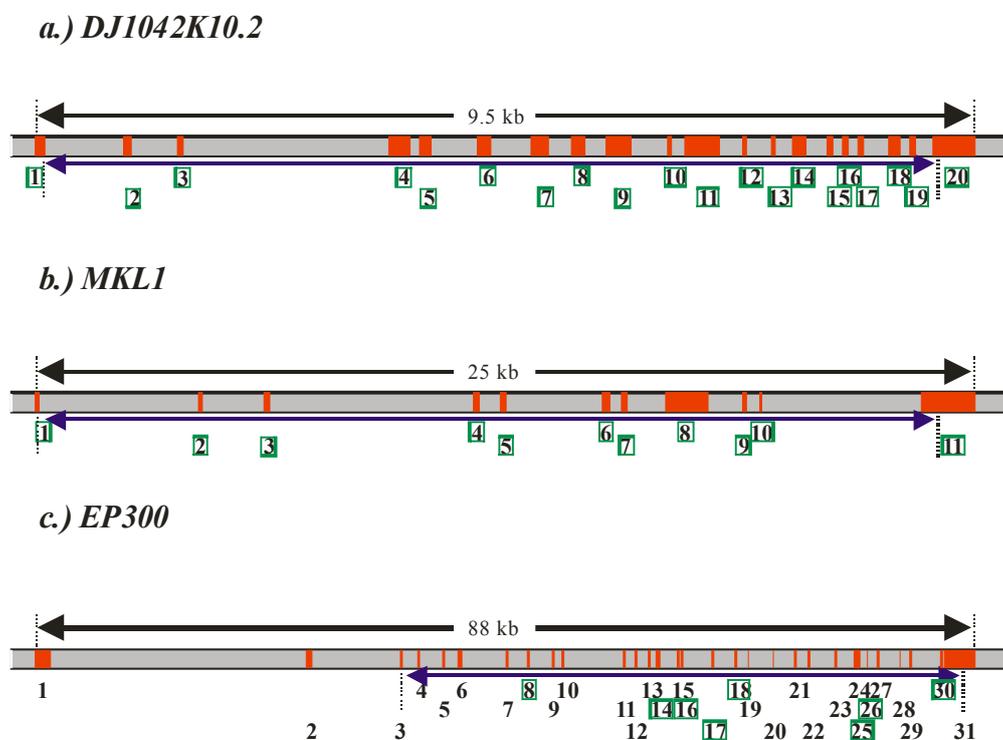
Der bioinformatische Ansatz zeigte in der Tat eine Vielzahl von Überlappungen der Kandidatenregionen der verschiedenen Tumorentitäten (Abbildung 3). Drei Kandidatenregionen, bezeichnet CRI, CRII und CRIII stellten sich dar (CR: candidate region). Der Labor-basierte Ansatz bestätigte zum einen die bereits beschriebene, dann T-Region (telomer) genannte, Kandidatenregion und grenzte sie von 10 Mb auf 2,7 Mb ein (80). Zum anderen fand sich eine deutlich weiter centromer gelegene Kandidatenregion von 3 Mb, welche dann als „C-Region“ bezeichnet wurde und angedeutet sich in den frühen 22q Studien bereits abzeichnete (73, 121, 149, 194) (Abbildung 3). Ein Verlust des telomeren Bereichs von 22q wurde nur in einzelnen, vor allem hochmalignen Gliomen gefunden und ermöglichte nicht die Definition einer gemeinsamen Überlappungsregion (61).

**Abbildung 3:** Kandidatenregionen auf Chromosom 22q; 1: Astrozytome (80), 2: Astrozytome (128), 3: Brustkarzinome (78), 4: Kolonkarzinome (26), 5: Brust- und Kolonkarzinom (25), 6: Ovarialkarzinome (16), 7: Rachenkarzinome (116), 8: Brustkarzinome (1), 9: Ependymome (98), 10: Pankreasinseldzellkarzinome (201), 11: Ependymome (75), 12: Megakaryoblastische Leukämie (110); CRI, CRII, CRIII: überlappende Kandidatenregionen ermittelt durch bioinformatische Analyse; C: centromere Kandidatenregion, T: telomere Kandidatenregion (jeweils ermittelt durch eigene Experimente). Physikalische Sequenzdaten basieren auf dem November 2002 Freeze der UCSC GoldenPath Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>) (61).



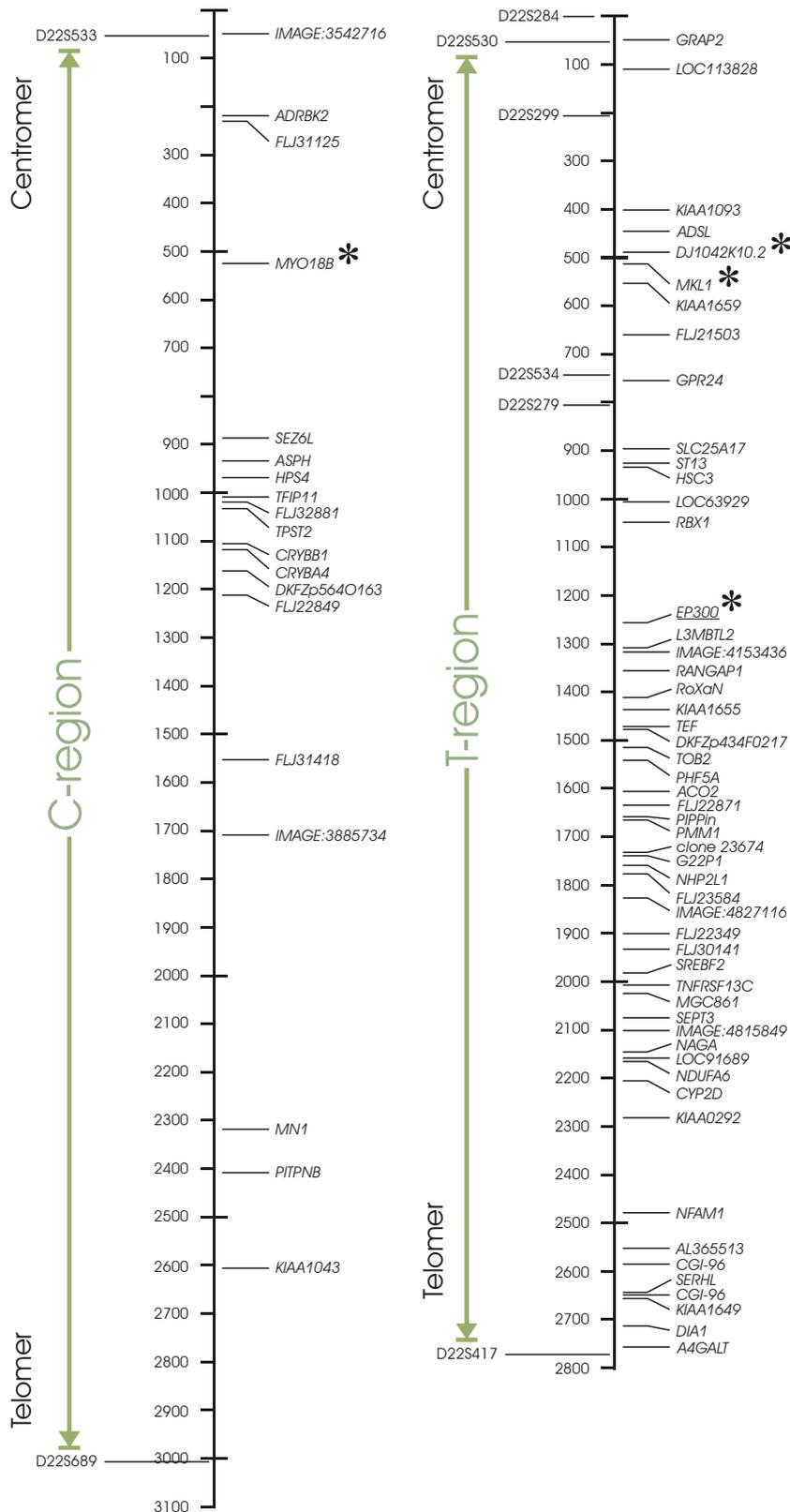
Im Anschluss wurde ein zweites „Mapping“ Projekt in Kooperation mit Prof. Dumanski in Uppsala in Schweden durchgeführt. Mittels des dort etablierten hoch auflösenden Tiling Path Matrix CGH Chips (17) wurden 50 Glioblastome auf Deletionen untersucht. In 14 der 50 Tumore (28%) fanden sich 22q Deletionen, 10 der Tumore zeigten 22q Monosomie. Vier Glioblastome wiesen partielle Deletionen auf. Aus diesen konnten zwei gemeinsamen Überlappungsregion abgeleitet werden: eine mehr centromere Region von 11,1 Mb Ausdehnung und eine am telomeren Ende des Chromosoms sich befindende 3,08 Mb große Region. Tatsächlich überlagerte sich die 11,1 Mb Region mit den CRI und CRII Regionen, die 3,09 Mb Region mit der CRIII Region des bioinformatischen Ansatzes (32).

### Untersuchung potentieller Tumorsuppressorgene auf 22q



**Abbildung 4:** Drei der in (61) untersuchten Kandidatengene; horizontale Pfeile über Grafiken: physikalische Ausdehnung, horizontale Pfeile unter Grafiken: Angabe der für den ORF kodierenden Exone, Zahlen unter Grafiken: Exon Nummern, grüne Kästchen um Zahlen: in (61) untersuchte Exone.

Eine Vielzahl potentieller Tumorsuppressorgene wurde auf Chromosom 22q unterdessen hinsichtlich Mutationen in Astrozytomen untersucht. Das Tumorsuppressorgen *NF2* auf 22q12.2 ist häufig in Meningeomen, Neurinomen und Ependymomen mutiert (157, 198), aber Alterationen in Astrozytomen wurden nicht gefunden (154). In rhabdoiden Tumoren und in



Plexuskarzinomen finden sich Mutationen im *hSNF5/INI1* Gen auf 22q12.1 (11, 166), nicht aber in Astrozytomen (195). Das Gen *hCHK2* auf 22q12.1 ist bei den LiFraumeni Patienten mutiert, welche keine *TP53* Mutation aufweisen. Obwohl es somit ein attraktives Kandidatengen für Astrozytome war, wurden keine Mutationen beobachtet (81).

Durch die chromosomale Annotation der C- und der T-Region wurden 22 bzw. 49 Gene identifiziert (siehe Abbildung 5). Die Gene und deren Proteine wurden mit bekannten Genen bzw. Proteinen verglichen und die Literatur wurde hinsichtlich dessen gesichtet. Am Ende wurden Prioritätslisten erstellt (Abbildung 5).

**Abbildung 5:** In (61) identifizierte Gene der C- und T-Region. Gene mit Sternen wurden auf Mutationen hin untersucht.

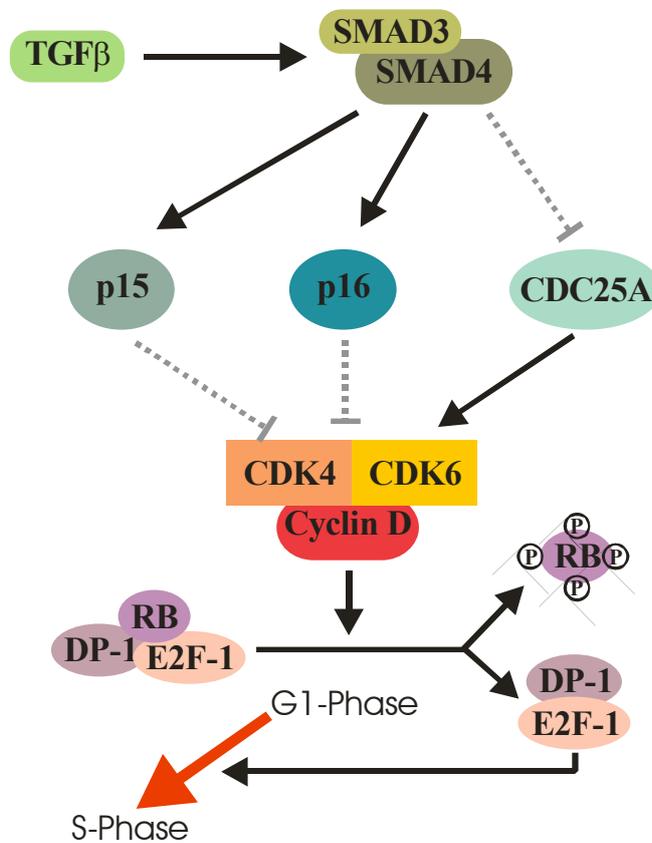
Die Gene *DJI042K10.2*, *MKL1* und *EP300* der T-Region und das *MYO18B* Gen der C-Region fanden sich auf den ersten Plätzen der Liste und wurden in 36 Astrozytomen auf Mutationen analysiert (Abbildung 4). *DJI042K10.2* zeigte Domänen in der Proteinsequenz, welche eine Funktion in der Zellzyklusregulation erwarten ließen. *MKL1* ist ein Gen, welches bei der megakaryoblastischen Leukämie als Bruchstelle einer chromosomalen Fusion beschrieben wurde (110). *EP300* ist ein Gen, das als klassisches Tumorsuppressorgen in epithelialen Tumoren beschrieben wurde (42). In keinem der astrozytären Tumore wurde eine Mutation identifiziert.

## Originalarbeiten

- **Hartmann C**, Numann A, Mueller W, Holtkamp N, Simon M, von Deimling A.; Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. *Int J Cancer*. 2004 Mar 1;108(6):839-44.
- de Stahl TD, **Hartmann C**, de Bustos C, Piotrowski A, Benetkiewicz M, Mantripragada KK, Tykewinski T, von Deimling A, Dumanski JP; Chromosome 22 tiling-path array-CGH analysis identifies germ-line- and tumor-specific aberrations in patients with glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Jun 8

## Molekulargenetische Defekte im Rb Signalweg

### Übersicht: Rb Signalweg



**Abbildung 6:** Die wesentlichen p16/p15-gesteuerten Regulationsmechanismen während des Zellzyklus im Übergang zwischen der G1- und der S-Phase. TGF- $\beta$  bewirkt über SMAD3 und SMAD4 eine Aktivierung der Proteine p16 und p15 und eine Inhibition von CDC25A. p16 und p15 binden an Cyclin D und verhindern somit eine Komplexierung des Cyclins mit CDK4 und CDK6. Kommt es zur Komplexbildung aus Cyclin D mit CDK4 und CDK6, bewirkt selbiger eine Phosphorylierung von RB, welches dann vom E2F-1/DB-1 Komplex dissoziiert. E2F-1/DB-1 vermittelt den Übertritt von der G1 in die S-Phase (94, 144, 145).

### Mutationen in *CDKN2A*, *CDK2NB* und *Rb*

So wie viele andere Tumore weisen Gliome häufig LOH auf 9p21 auf, wo die Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B* liegen (91, 124). In Abweichung zu klassischen Tumorsuppressorgenen wie *TP53* oder *NF2* finden sich jedoch Punktmutationen nur sehr selten in *CDKN2A* und *CDKN2B*. Stattdessen ist die homozygote Deletion dieser Gene, die für die drei Proteine p16, p14<sup>ARF</sup> und p15 kodieren, der häufigste Inaktivierungsmechanismus (57, 83, 94). So konnten in 47 Gliomen eine Rate homozygoter Deletionen von 49% aufgezeigt werden (57). Es fanden sich unter diesen Gliomen auch einige niedriggradige Tumore, welche eine Deletion aufwiesen. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit anderen Studien, welche Alterationen im Rb Signaltransduktionsweg nur in Gliomen WHO Grad III und IV gefunden haben (144). Als mögliche Erklärung kann angeführt werden, dass die verwendeten Untersuchungsmethode zum damaligen Zeitpunkt noch nicht ausgereift war, dass die zugrunde liegenden histopathologischen Diagnosen in der prä-WHO Ära erstellt wurden und damit von der gegenwärtigen Klassifikation abwichen, oder dass Läsionen in Zellzyklusgenen auch

schon in niedriggradigen Gliomen vorkommen können. Eine wichtige Beobachtung war die Exklusivität von *CDNK2A* und *CDKN2B* auf der einen und *Rb* Mutationen auf der anderen Seite: offenbar ist die Schädigung eines der beiden Gene bereits ausreichend zur Störung der Zellzykluskontrolle und weitere Störungen im *Rb* Signaltransduktionsweg führen zu keinem zusätzlichem Selektionsvorteil für Tumorzellen (57) (Abbildung 6).

## **CDKN2A Veränderungen als Modell genetischer Stabilität von Zelllinien**

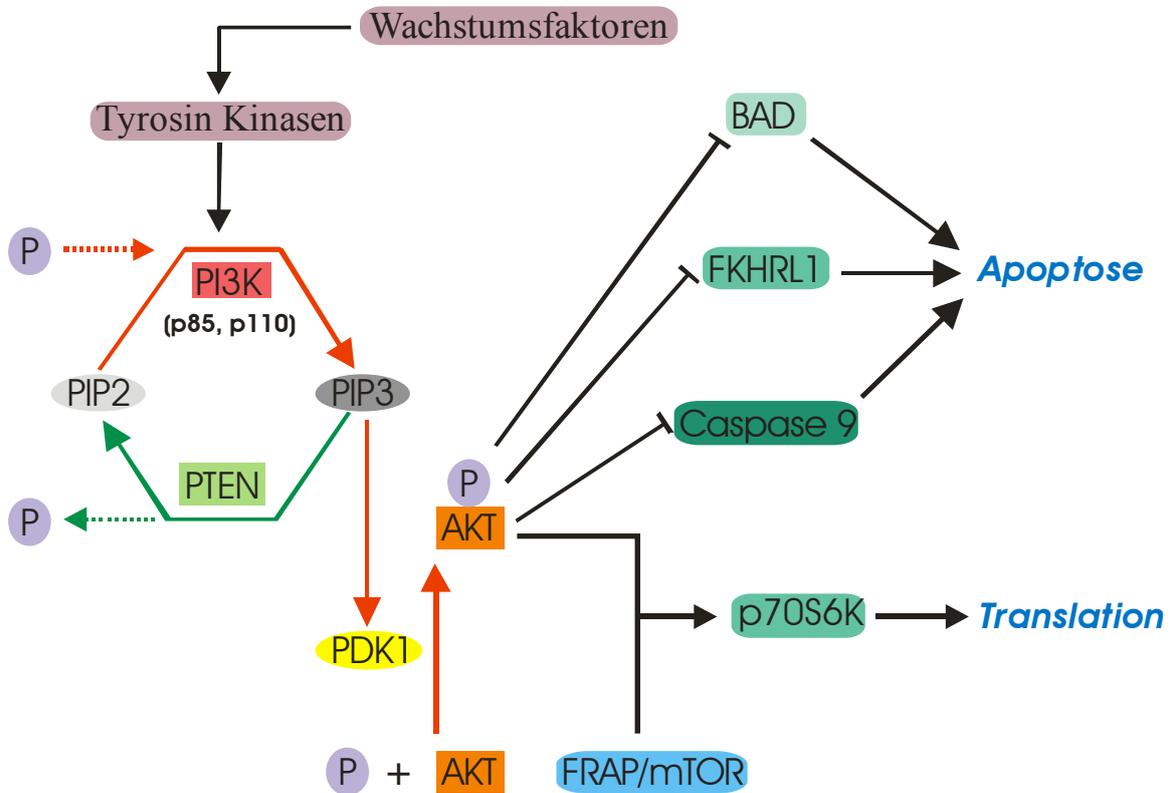
Nach der Erstbeschreibung homozygoter Deletionen von *CDNK2A* und *CDKN2B* (91, 124) bestanden größere Zweifel, ob diese initial an Zelllinien generierten Daten auch für primäre Tumore gelten, oder ob es sich hierbei um Zellkulturartefakte handelte. Allerdings fanden sich dann in 126 aus der Literatur zusammengefassten Fällen von Gliomen in etwa 50% der Fälle Mutationen (44, 119, 163, 179, 187). In zusammengefasst 137 untersuchten Gliom Zelllinien hingegen lag die Deletionsrate bei 75% (4, 45, 52, 65, 66, 84, 91, 124, 171). Zur Untersuchung dieser Diskrepanz wurden 31 Gliom Zelllinien mit ihrem korrespondierenden Primärtumor hinsichtlich des *CDNK2A/CDKN2B* Status verglichen. In einem Fall konnte eine *CDNK2A/CDKN2B* Deletion nur in der Zelllinie, nicht aber im korrespondierenden Primärtumor nachgewiesen werden. Hingegen blieb der *CDNK2A/CDKN2B* Status der Zelllinien selber auch über Beobachtungszeiträume von mehr als 8 Jahren stabil. In 47 anderen primären Gliomen fand sich eine homozygote Deletionsrate von 49%, in den oben genannten 31 Zelllinien eine Rate von 61%. Mutmaßlich haben die Gliome, welche eine *CDNK2A/CDKN2B* Mutation aufweisen, einen Selektionvorteil bei der Überführung in eine Zelllinie (57). Es kann in diesem Zusammenhang spekuliert werden, dass in den initialen Studien an primären Gliomen nicht zwischen der WHO Graduierung differenziert wurde (4, 45, 52, 65, 66, 84, 91, 124, 171), jedoch nur höhergradige Gliome eine Zellkultivierung ermöglichen. Diese höhergradigen Gliome zeichnen sich durch eine deutlich höhere *CDNK2A/CDKN2B* Deletionsrate aus.

## **Originalarbeiten**

- **Hartmann C**, Kluwe L, Lucke M, Westphal M.; The rate of homozygous *CDKN2A/p16* deletions in glioma cell lines and in primary tumors. *Int J Oncol.* 1999 Nov;15(5):975-82.

## Molekulargenetische Defekte im PI3K/AKT Signalweg

### Übersicht: PI3K/AKT Signalweg



**Abbildung 7:** Wachstumsfaktoren vermitteln über Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. PDGFRA eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges: Phosphoinositol 3'-Kinasen (PI3K) phosphorylieren PIP2 zu PIP3, PTEN dephosphoryliert PIP3 zu PIP2. PIP3 bewirkt über PDK1 eine Phosphorylierung von Akt, welches dann Apoptosesignalwege inhibiert. Zusätzlich wirkt phosphoryliertes Akt zusammen mit FRAP/mTOR aktivierend auf die Translation einer Vielzahl von Proteinen, welche an der Zellteilung beteiligt sind.

### LOH auf Chromosom 10 und *PTEN* Mutationen

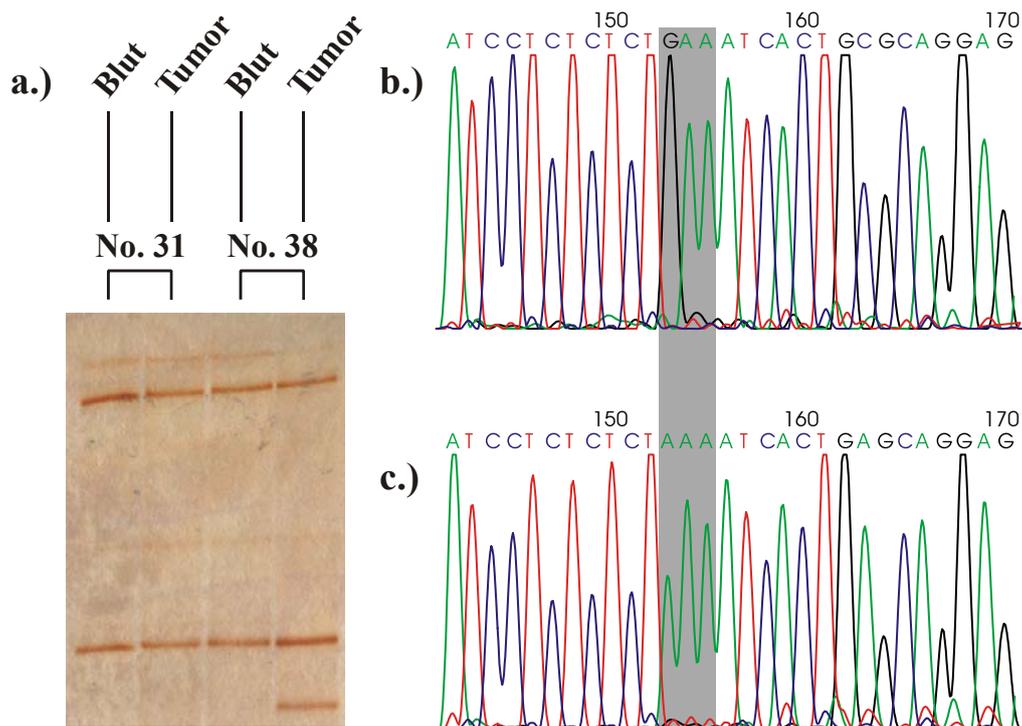
Der Verlust einer Kopie von Chromosom 10 ist mit einer Rate von 75 bis 95% die häufigste chromosomale Veränderung in Glioblastomen. LOH auf Chromosom 10 wird hingegen nicht in niedriggradigen Astrozytomen beobachtet. Somit ist LOH auf Chromosom 10 ein progressions-assoziiertes Ereignis (54, 94). Verschiedene Gene wie *PTEN* oder *MGMT* liegen auf dem langen Arm von Chromosom 10 und kommen damit als Ziele in Frage (83, 94). Allerdings findet sich häufiger LOH auf Chromosom 10 als eine genetische oder epigenetische

Veränderung in diesen Genen. Vermutlich gibt es mehrere Tumorsuppressorgene auf Chromosom 10.

*PTEN* Mutationen werden in etwa 30 bis 40% aller Glioblastome beschrieben (54, 144, 189). Dabei werden *PTEN* Mutationen häufiger in primären als in sekundären Glioblastomen gefunden (176). Protein PTEN dephosphoryliert den „second messenger“ Phosphoinositoltriphosphat (PIP3) zu Phosphoinositolbiphosphat (PIP2) und ist damit einer der wichtigsten Antagonisten der Phosphoinositol-3'-Kinasen (PI3K). PIP3 aktiviert den PI3K/Akt Signalweg, welcher zum einen die Zellproliferation stimuliert, zum anderen Apoptosemechanismen inhibiert. Protein PTEN wirkt somit als Inhibitor auf den PI3K/Akt Signalübertragungsweg (Abbildung 7) (94).

### ***PIK3CA* Mutationen**

*PTEN* wird den Tumorsuppressorgenen und die PI3Ks den Onkogenen zugerechnet. Ein typischer Aktivierungsmechanismus von Onkogenen ist die Amplifikation. Allerdings fanden sich in Gliomen im Gegensatz zu anderen Tumoren keine Amplifikationen verschiedener *PI3K* Gene (95). In einer 2004 veröffentlichten Studie gelang jedoch der Nachweis häufiger Mutationen im *PIK3CA* Gen, nicht jedoch in allen anderen Mitgliedern der Genfamilie (159). *PIK3CA* Mutationen wurden vor allem in den Exonen 1, 9 und 20 gefunden, welche somit einen „hot spot“ darstellen. In 4 der 15 untersuchten Glioblastome (27%) wurden *PIK3CA* Mutationen identifiziert, so dass der Eindruck entstand, dass Mutationen in diesem Gen etwa mit gleicher Häufigkeit auftreten wie *PTEN* Mutationen (159).



**Abbildung 8:** Mutationen in *PIK3CA* Exon 9: a.) SSCP Gel, Tumor Nr. 31 als Blut/Tumor Paar ohne aberrante Bande, Tumor No. 38 mit einer zusätzlichen Bande, b.) Wildtyp Sequenz von *PIK3CA* Exon 9, c.) Sequenz von Tumor No. 38 mit einer GAA → AAA Mutation (Codon 542, Glu → Lys).

Dieser erste Eindruck häufiger *PIK3CA* Mutationen konnte in nachfolgenden Studien nicht aufrecht erhalten werden (15, 54, 96). Unter Analyse größerer Zahlen von Glioblastomen konnte in diesen Studien nachgewiesen werden, dass die Rate an *PIK3CA* Mutationen bei etwa 5% liegt (Abbildung 8). Interessanterweise wurden Mutationen nur in den „hot spot“ Exonen 1, 9 und 20 gefunden (54), obwohl gerade bei Glioblastomen zunächst auch in anderen Exons Punktmutationen gefunden wurden (159). Unter der Annahme, dass ähnlich wie bei *CDKN2A* und *RB* (57) Mutationen in einem Gen den ganzen Signalweg fehlregulieren, war es interessant zu prüfen, ob Veränderungen entweder nur in *PIK3CA* oder *PTEN* vorlagen (15). Allerdings gelang in einem Glioblastom der Nachweis von jeweils einer Mutation in *PIK3CA* und in *PTEN* (54).

## Originalarbeiten

- **Hartmann C**, Bartels G, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A; *PIK3CA* mutations in Glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2005 Jun;109(6):639-42. Epub 2005 May 28.

## **Klonalität von Glioblastomen**

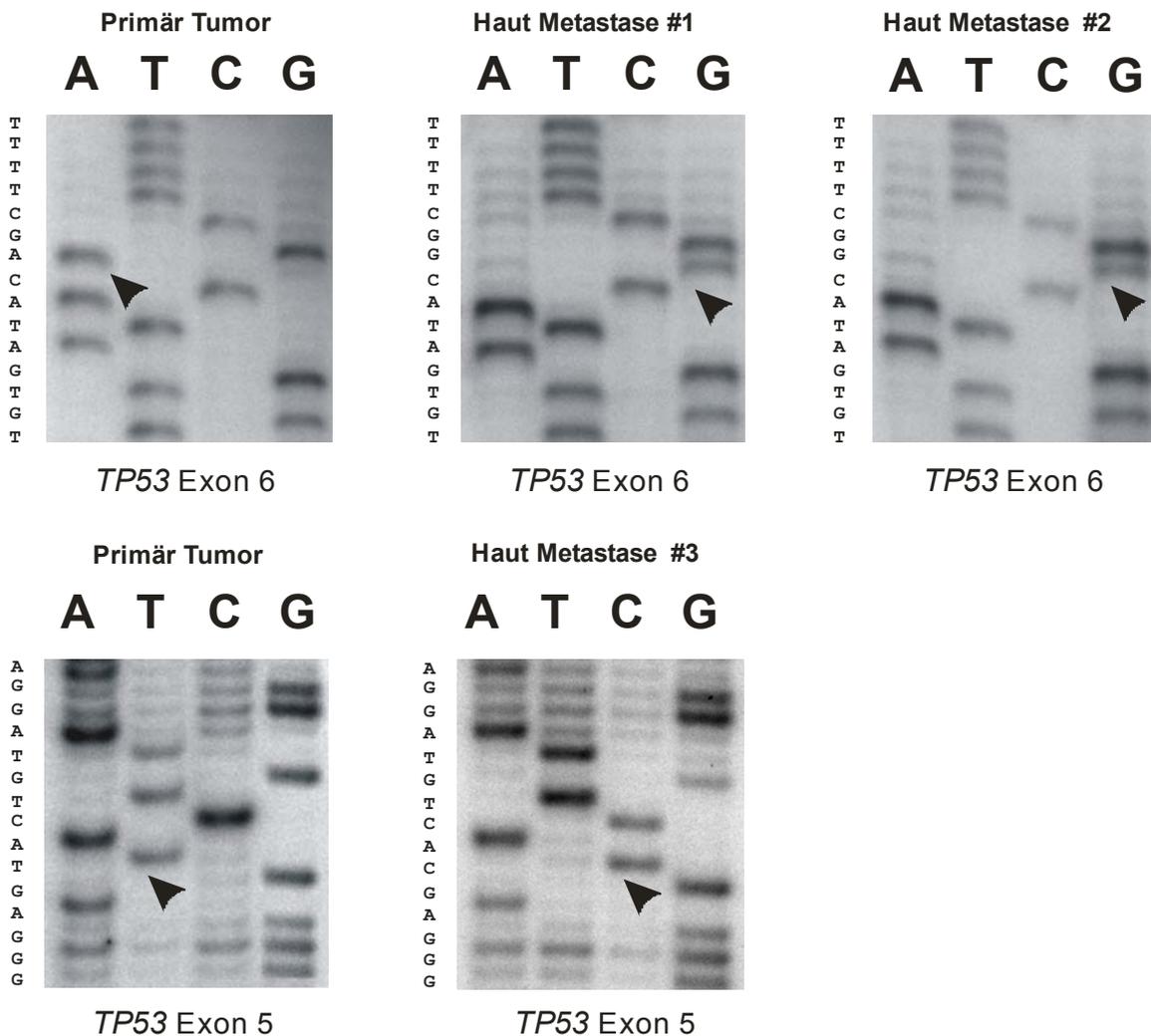
Glioblastome sind Tumore mit einer geringer Neigung zur hämatogenen Metastasierung (47). Allerdings kommen in der Literatur immer wieder Einzelfallbeschreibungen von Glioblastomen mit Fernmetastasen vor (130).

Um Aussagen über genetische Veränderungen in Primärtumoren und derer Metastasen machen zu können, wurden 6 metastasierende Glioblastome untersucht. Es wurden sowohl die chromosomalen Arme 1p, 10q und 19q als auch die Gene *TP53*, *EGFR* und *CDKN2A* analysiert. Von den 6 Patienten waren 4 unter 32 Jahre alt. Alle bis auf einen Patienten verstarben 2 Jahre nach Erstdiagnose. Vier der 6 Fälle wiesen *TP53* Mutationen auf, aber nur ein Glioblastom hatte eine *EGFR* Amplifikation. In 2 der 6 Fälle fanden sich keine molekulargenetischen Veränderungen. Zwei weitere Glioblastome wiesen keine Unterschiede auf den untersuchten Chromosomen und Genen zwischen Primärtumor und Metastasen auf. Allerdings zeigten 2 Glioblastome unterschiedliche *TP53* Mutationen im Primärtumor und den korrespondierenden Metastasen (Abbildung 9).

Die Rate der *TP53* und *EGFR* Mutationen stimmte mit dem jungen Alter der Patienten überein: *TP53* Mutationen sind eher bei jungen Patienten, *EGFR* Amplifikationen eher bei älteren Patienten zu finden (83, 94). Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Alter von Glioblastom Patienten und der Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Fernmetastasen. Es kann spekuliert werden, dass ältere Patienten aufgrund des zumeist früher eintretenden Todes nicht mehr ausreichend Zeit zur Aussaat von Metastasen haben, welche dann groß genug zur Detektion wären. Andererseits sind es vielleicht gerade junge Patienten mit einer längeren Lebenserwartung, deren Glioblastome zusätzlich eine höhere Aggressivität aufweisen und damit erst eine Metastasierung ermöglichen.

Die beiden Fälle mit verschiedenen *TP53* Mutationen in Primärtumor und Metastase lassen Rückschlüsse auf die Klonalität von Glioblastomen zu. Zumeist werden Hirntumore nur als Primarius untersucht. Die Befunde deuten fast immer auf identische molekulargenetische Veränderungen in allen Teilen des Tumors hin. Wenn jetzt aber verschiedene Mutationen zwischen Primärtumor und Metastasen beobachtet werden, dann liegt der Verdacht nahe, dass initial verschiedene Tumorklone existierten. Der eine metastasierte, ein anderer aber besaß im Bereich der primären Lokalisation Wachstumsvorteile und überwuchs die anderen Klone. Somit bedeutet mutmaßlich bei Glioblastomen im Gegensatz zu epithelialen Tumoren die Metastasierung nicht das Ende der Entdifferenzierung, sondern ist eventuell schon ein früheres Ereignis (130).

## Fall 4



**Abbildung 9:** Mutationen in *TP53* Exon 5 und 6 bei Fall No. 4; *TP53* Exon 6 zeigte im Primärtumor eine wildtyp Sequenz. Die beiden Hautmetastasen hingegen hatten eine A → G Mutation (Pfeile); in Exon 5 liegt wieder im Primärtumor eine wildtyp Sequenz vor, in der Hautmetastase findet sich eine T → C Mutation (Pfeile).

### Originalarbeiten

- Park CC\*, **Hartmann C\***, Folkerth R, Loeffler JS, Wen PY, Fine HA, Black PM, Shafman T, Louis DN.; Systemic metastasis in glioblastoma may represent the emergence of neoplastic subclones. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000 Dec;59(12):1044-50.

\*: gemeinsame Erstautorenschaft

## **Genetik, Progression und Therapie glialer Tumore**

### **Expressionanalyse astrozytärer Tumore**

Histopathologisch ist das Glioblastoma multiforme WHO Grad IV entsprechend den WHO Kriterien ein astrozytärer Tumor mit Endothelproliferaten und Nekrosen. Anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III sind oligodendrogliale Tumore, bei denen ebenfalls Endothelproliferate und Nekrosen erlaubt sind (94). Aufgrund der in beiden Tumorentitäten nachweisbaren Anaplasie der Tumorzellen ist die histologische und immunhistochemische Differenzierung zwischen beiden oft nur eingeschränkt möglich. Da aber anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III im Gegensatz zu Glioblastomen deutlich besser auf eine Chemotherapie ansprechen, ist eine exakte Zuordnung dringend erforderlich (20-22).

Mit Expressionsarrays wurde zunächst anhand von je 14 Glioblastomen WHO Grad IV und 7 anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III mit typischem histopathologischem Erscheinungsbild ein Expressionprofil erstellt. Anhand der differierenden Expressionsmuster wurden mathematische Modelle trainiert, welche dann an einer zweiten Gruppe von Glioblastomen WHO Grad IV und anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III mit einem nicht-klassischen Phänotyp erprobt wurden.

Bei Klassifikation der zweiten Gruppe nach histopathologischem Erscheinungsbild fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten zwischen den nicht-klassischen Glioblastomen WHO Grad IV und anaplastische Oligodendrogliomen WHO Grad III. Hingegen fand sich eine signifikante Assoziation zwischen den beiden Prädiktionklassen der mathematischen Expressionsmodelle und den Überlebensraten. Somit konnte an dieser Serie gezeigt werden, dass die Expressionsanalytik-basierte Tumorklassifikation besser mit dem Überleben korreliert als die der Histopathologie (125).

### **Molekulare Prognoseparameter und Astrozytome**

Zu den üblichen Prognoseparametern gehören Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung, Tumorausdehnung und histopathologische Befunde. In den letzten Jahren ist es gelungen, zudem molekulargenetische Marker mit prognostischem Wert zu identifizieren. So konnte gezeigt werden, dass anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III mit LOH 1p/19q einen besseren Verlauf nehmen als morphologisch gleiche Tumore ohne diese Veränderung (23). Weiterhin ist die Langzeitprognose für Patienten mit Astrozytomen WHO Grad II mit *TP53* Mutation schlechter als die von Patienten mit gleichen Tumoren ohne *TP53* Mutationen (172). Me-

thylierung der Promotorregion des *MGMT* Gens auf 10q gehen bei Glioblastomen WHO Grad IV mit einem besseren Ansprechen auf eine Temozolomid Chemotherapie einher (67).

Um komplexere chromosomale Veränderungen auf ihren prognostischen Wert zu analysieren, wurden „oncogenic tree mixture models“ genutzt, um anhand von LOH Daten von 9p, 10p, 10q, 13q, 17p, 19q und 22q genetische Progressionswerte für Glioblastome zu generieren. Als klinischer Parameter wurde die Überlebenszeit herangezogen.

LOH 9p, 10q und 17p erwiesen sich in dem Baummodell aufgrund der größten Häufigkeit als die frühesten Ereignisse. Der Baum setzte sich von LOH 10q aus fort, als nächste Stufe dann finden sich LOH 10p und LOH 13q wieder. Als letztes Ereignis der pathogenetischen Kette nach der Kalkulation der genetischen Progressionswerte finden sich LOH 19q und LOH 22q im Baum wieder. Dann wurden die Daten der Cox Regressionsanalyse von den Überlebenszeiten auf die einzelnen LOH Muster hin berechnet. Es gelang zu zeigen, dass Prognoseparameter sich auf den einzelnen LOH Mustern abbildeten (141).

## **LOH 9p und 10q als Prognoseparameter für Temozolomid Therapie**

Die Einführung des Chemotherapeutikums Temozolomid stellte in der Behandlung von Glioblastomen einen wichtigen Fortschritt dar. Allerdings profitieren nicht alle Glioblastom Patienten in gleichem Maße von Temozolomid. Um molekulargenetische Prognosefaktoren zu ermitteln, wurde eine Serie von 50 Patienten mit Bestrahlung und Temozolomid Therapie mit einer Serie von 30 Patienten verglichen, die nur bestrahlt wurden. Im Anschluss wurden die Tumore mittels CGH auf Verluste und Zugewinne chromosomaler Abschnitte und mittels Mikrosatellitenmarker auf LOH 9p, 10p, 10q und 13q hin analysiert.

In Übereinstimmung mit publizierten Daten zeigte sich, dass die Patienten ohne Temozolomid Behandlung und mit LOH 10q (174) und mit LOH 9p (143) eine schlechtere Prognose aufweisen. Dieses kehrte sich in das Gegenteil, wenn Patienten mit Temozolomid behandelt wurden: in der univariaten Analyse zeigte sich, dass LOH 10q in Kombination mit Temozolomid ein prognostisch guter Marker war. In der multivariaten Analyse fand sich ein solcher Effekt zudem für LOH 9p und LOH 10q in älteren Patienten.

Diese Resultate untermauern die Beobachtung, dass die Methylierung der Promotorregion des *MGMT* Gens auf Chromosom 10q mit einem guten Ansprechen auf eine Temozolomid Chemotherapie einhergeht (67). Interessanterweise fand sich in der Gruppe der nicht mit Temozolomid behandelten Patienten eine schlechtere Prognose nur bei LOH in der Region von Chromosom 10q, welche das *MGMT* Gen umfasst. In Übereinstimmung mit anderen Studien

zeigte sich keine Prognoseverschlechterung, wenn nur *PTEN* und nicht *MGMT* in der Region des LOH lag (99, 143).

## Originalarbeiten

- Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, **Hartmann C**, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN. ; Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res.* 2003 Apr 1;63(7):1602-7.
- Rahnenführer J, Beerenwinkel N, Schulz WA, **Hartmann C**, von Deimling A, Wullich B, Lengauer T; Estimating cancer survival and clinical outcome based on genetic tumor progression scores. *Bioinformatics.* 2005 Feb 18.
- Wemmert S, Ketter R, Rahnenführer J, Beerenwinkel N, Strowitzki M, Feiden W, **Hartmann C**, Lengauer T, Stockhammer F, Zang KD, Meese E, Steudel W-I, von Deimling A, Urbchat S; Patients with high grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment, *Neoplasia.* 2005 Oct;7(10):883-93.

# Molekulargenetische Veränderungen oligodendroglialer Tumore

## ***Bekannte genetische Veränderungen oligodendroglialer Tumore***

### **Alterationen in Oligodendrogliomen WHO Grad II**

Die häufigste molekulargenetische Veränderung in Oligodendrogliomen WHO Grad II ist der kombinierte Verlust chromosomalen Materials auf 1p und 19q, der in bis zu 90% dieser Tumore gefunden wird (8, 9, 100, 148, 185). In diesem Kontext wurde bereits diskutiert, diese Tumorentität nicht mehr morphologisch, sondern molekulargenetisch zu definieren (60). Anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III zeigen LOH 1p und 19q in bis zu 60% der Fälle. Bei diesen Tumoren kann spekuliert werden, dass es andere Mechanismen gibt, über welche anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III entstehen können (145). Bis jetzt sind noch keine Tumorsuppressorgene auf 1p und 19q in Oligodendrogliomen als mutiert beschrieben worden (62). Die LOH 1p/19q Diagnostik hat sich inzwischen als klinisches Werkzeug etabliert (58), da Tumore mit dieser Läsion ein deutlich besseres Ansprechen auf eine PCV oder Temozolomid Chemotherapie oder Bestrahlung zeigen (7, 18, 23, 27, 64, 82, 168, 175, 181).

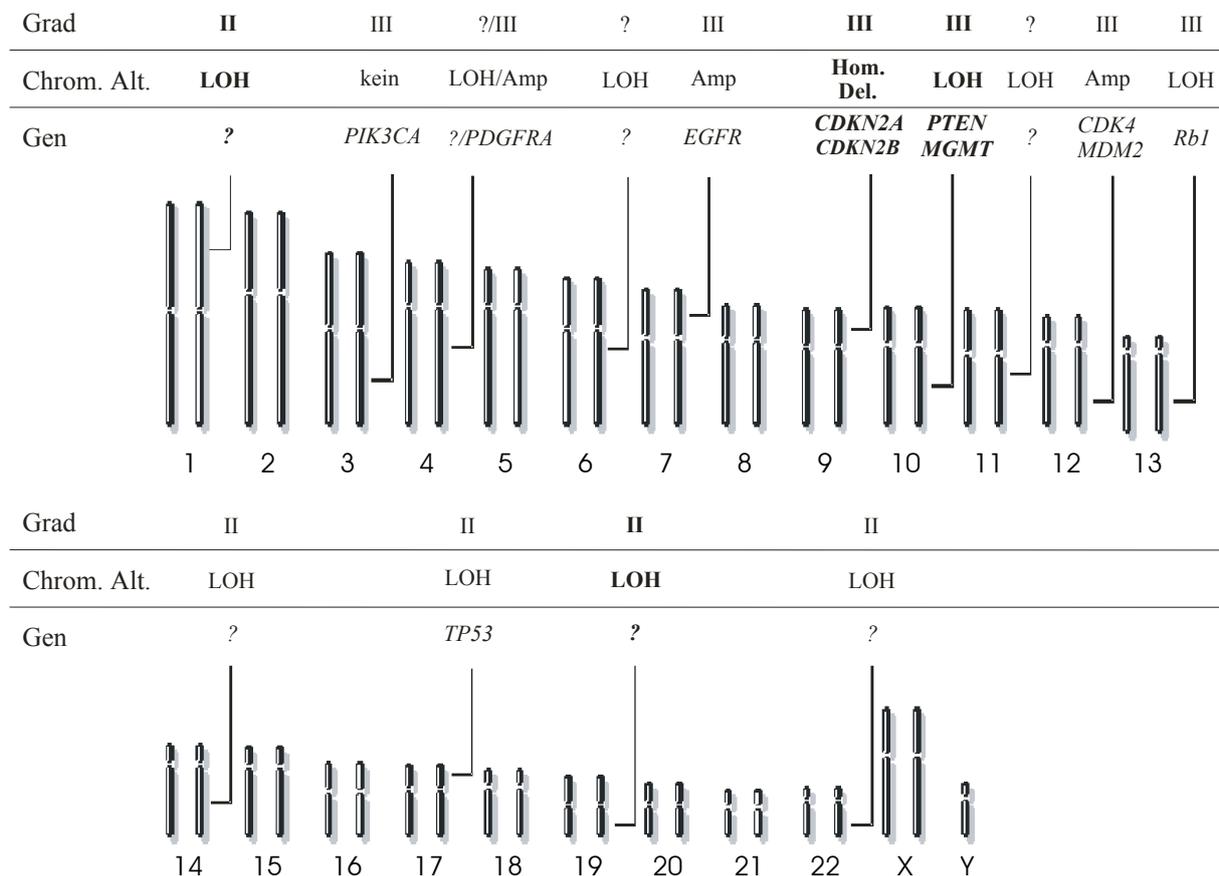
Andere Regionen, welche in Oligodendrogliomen WHO Grad II oft verändert vorliegen, sind die Chromosomen 4, 6, 11p, 14, and 22q (12, 101, 148, 197, 209). Auch für diese Lokalisationen sind in Oligodendrogliomen keine mutierten Tumorsuppressorgene bekannt.

Mutierte Gene sind bei Oligodendrogliomen WHO Grad II kaum bekannt. Es wurden in 10 bis 15% Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* in Kombination mit LOH 17p beschrieben, welche zumeist in Tumoren auftreten, die keinen LOH 1p/19q zeigen (19, 120, 127, 178, 192, 203). In bis zu 20 % der Oligodendrogliome WHO Grad II ist die Transkription von p14<sup>ARF</sup> durch Hypermethylierung des Promotors des  $\beta$ -Transkriptes von *CDKN2A* supprimiert. p14<sup>ARF</sup> stabilisiert den p53/MDM2 Komplex. Eine Inhibition der Expression bewirkt einen beschleunigten Abbau von p53 (192, 203). Zur Übersicht siehe Abbildung 10.

### **Alterationen in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III**

In anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III finden sich in 22 bis 50% der Fälle homozygote Deletion von Chromosom 9p und in 14 bis 58% der Fälle eine Deletion von

Chromosom 10 (12, 89, 101, 148, 184, 209). Offenbar ist ähnlich den anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III eine Störung in der Zellzykluskontrolle ein wesentlicher Schritt der Progression. Betroffen von den 9p21 Deletionen sind die Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B* (12, 13, 23, 79, 193). Daneben kommen Hypermethylierungen der Promotorregionen dieser Gene als alternativer Inaktivierungsmechanismus vor (193, 203).



**Abbildung 10:** Chromosomale und genetische Veränderungen in oligodendroglialen Tumoren. Details siehe Text. Chrom: chromosomal, Alt: Alteration, Amp: Amplifikation, Hom: homozygot, Del.: Deletion, LOH: loss of heterozygosity.

Neben Deletionen von *CDKN2A* und *CDKN2B* kommen Mutationen in *RB* und Amplifikation von *CDK4* vor (193, 203). *TP53* Mutationen und *MDM2* Amplifikationen sind seltene Ereignisse in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III (111, 126, 148, 193, 203). Allerdings wird der p53 Signalweg dennoch in bis zu 50% der Tumore durch Deletionen oder durch Hypermethylierung der Promotorregion des  $\beta$ -Transkriptes von *CDKN2A* beeinflusst (193, 203). Während LOH 10q ein häufiges Ereignis in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III ist, sind Mutationen des Tumorsuppressorgens *PTEN* nur in 3 bis 10% der Tumore zu finden (38, 88, 160, 162). Allerdings korrelieren *PTEN* Mutationen mit einem

schlechteren klinischen Verlauf von anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III (162). Die Kombination von Hypermethylierung einer Genkopie von *MGMT* und der Verlust der zweiten *MGMT* Kopie durch LOH 10q weist auf einen kompletten Ausfall dieses für die Entgiftung von Zytostatika relevanten Mechanismus hin (2, 37).

Obgleich nur eine relativ geringe Zahl an mutierten Tumorsuppressorgenen in Oligodendrogliomen gefunden wurde, scheint die Promotorhypermethylierung ein häufiger Deaktivationsmechanismus zu sein. So wurden für die Gene *CDKN2A* (jeweils sowohl  $\alpha$ -Transkript (p16) als auch  $\beta$ -Transkript (p14<sup>ARF</sup>), *CDKN2B*, *RBI*, *TP73*, *DAPK1*, *ESR1*, *GSTP1*, *THBS1*, *TIMP3*, *HIC* und *MGMT* hypermethylierte Promotoreregionen beschrieben (58, 60, 145).

Mutierte Onkogene sind nur selten in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III identifiziert worden. Amplifikationen von *PDGFRA* fanden sich nur in einigen anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III, welche Eigenschaften von Glioblastomen aufwiesen (170). *EGFR* Amplifikationen sind selten in anaplastischen Oligodendrogliomen gefunden worden, obgleich das Protein oft überexprimiert wird (12, 36, 147, 204). Punktmutationen konnten nicht nachgewiesen werden (63). Amplifikationen von *CDK4* und *MDM2* (siehe oben) wurden nur sporadisch beobachtet (150, 193). Zur Übersicht siehe Abbildung 10.

## Originalarbeiten

- **Hartmann C**, Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S, von Deimling A; Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Jan;64(1):10-4.
- **Hartmann C**, Mueller W, von Deimling A; Pathology and Molecular Genetics of Oligodendroglial Tumors. *J Mol Med*. 2004 Oct;82(10):638-55. Review
- **Hartmann C**, von Deimling A; Oligodendrogliomas - impact of molecular genetics on treatment. *Neurol India*. 2005 Apr-Jun;53(2):140-8. Review

## ***Molekulargenetische Veränderungen und Tumorlokalisation***

Anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III lassen sich in zwei Gruppen mit und ohne kombinierte Allelverluste auf 1p und 19q einteilen (s.o.). Es konnte gezeigt werden, dass anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III ohne LOH 1p/19q vorwiegend eine tempo-

rale Lokalisation, mit LOH 1p/19q hingegen vorwiegend eine extratemporale Lokalisation aufweisen (210).

Oligoastrozytome sind eine Tumorentität, die histologisch sowohl oligodendrogliale als auch astrozytäre Komponenten aufweisen (94). Etwa 30 bis 70% aller Oligoastrozytome weisen einen LOH 1p/19q auf und zeigen damit genetische Eigenschaften von Oligodendrogliomen (9, 100, 148, 167, 184, 185). Hingegen weisen 30% der Oligoastrozytome Mutationen in *TP53* auf oder zeichnen sich durch LOH 17p und damit durch molekulargenetische Ähnlichkeiten mit Astrozytomen aus (111, 148). LOH 1p/19q und *TP53* Mutationen in Oligoastrozytomen schließen einander nahezu aus (111). Es konnte durch Mikrodissektionsstudien gezeigt werden, dass Oligoastrozytome in beiden histologischen Komponenten die gleiche genetische Läsion aufweisen (100). Um die Frage zu beantworten, ob es auch innerhalb der beiden genetischen Oligoastrozytom Gruppen Verteilungsmuster hinsichtlich der Lokalisation gibt, wurden Oligoastrozytome, Oligodendrogliome und Astrozytome auf LOH 1p/19q und *TP53* Mutationen untersucht und mit der Lokalisation der Tumore verglichen.

Innerhalb der Gruppe der Oligodendrogliome WHO Grad II und III konnte die bereits beschriebene Assoziation zwischen LOH 1p/19q und extratemporaler Lage bestätigt werden. Oligoastrozytome WHO Grad II und III wiesen ebenfalls signifikant einen LOH 1p/19q bei extratemporaler Lage auf. Hingegen zeigten die temporalen Oligoastrozytome häufiger *TP53* Mutationen, welche deutlich seltener bei Tumoren extratemporaler Lage gefunden wurden. In der Gruppe der Astrozytome fand sich keine Assoziation zwischen Genotyp und Lokalisation.

Diese Daten unterstützen somit das Konzept, dass es sich bei Oligoastrozytomen um Tumore eines intermediären Phänotyp handelt, die pathogenetisch entweder den oligodendroglialen oder astrozytären Weg gehen, aber die Potenz besitzen, auch histologisch Komponenten des jeweils anderen glialen Tumortypes auszubilden. Dabei gibt es eine Assoziation mit der Lokalisation des Tumors. Man kann spekulieren, dass temporale Oligodendrogliome früher als extra-temporale auffällig werden und dass diese Tumore zum Zeitpunkt der Resektion noch keinen LOH 1p/19q aufweisen. Attraktiver erscheint jedoch das Konzept von mindestens zwei verschiedenen Precursor Populationen, welche eine differierende Vulnerabilität gegenüber verschiedenen molekulargenetischen Läsionen haben. Hinsichtlich der Konsequenzen für Oligoastrozytome stellt sich die Frage, ob es sich bei diesen Tumoren um eine eigenständige Entität handelt, oder ob sie nur die morphologische Pluripotenz von Astrozytomen und Oligodendrogliomen reflektieren (120).

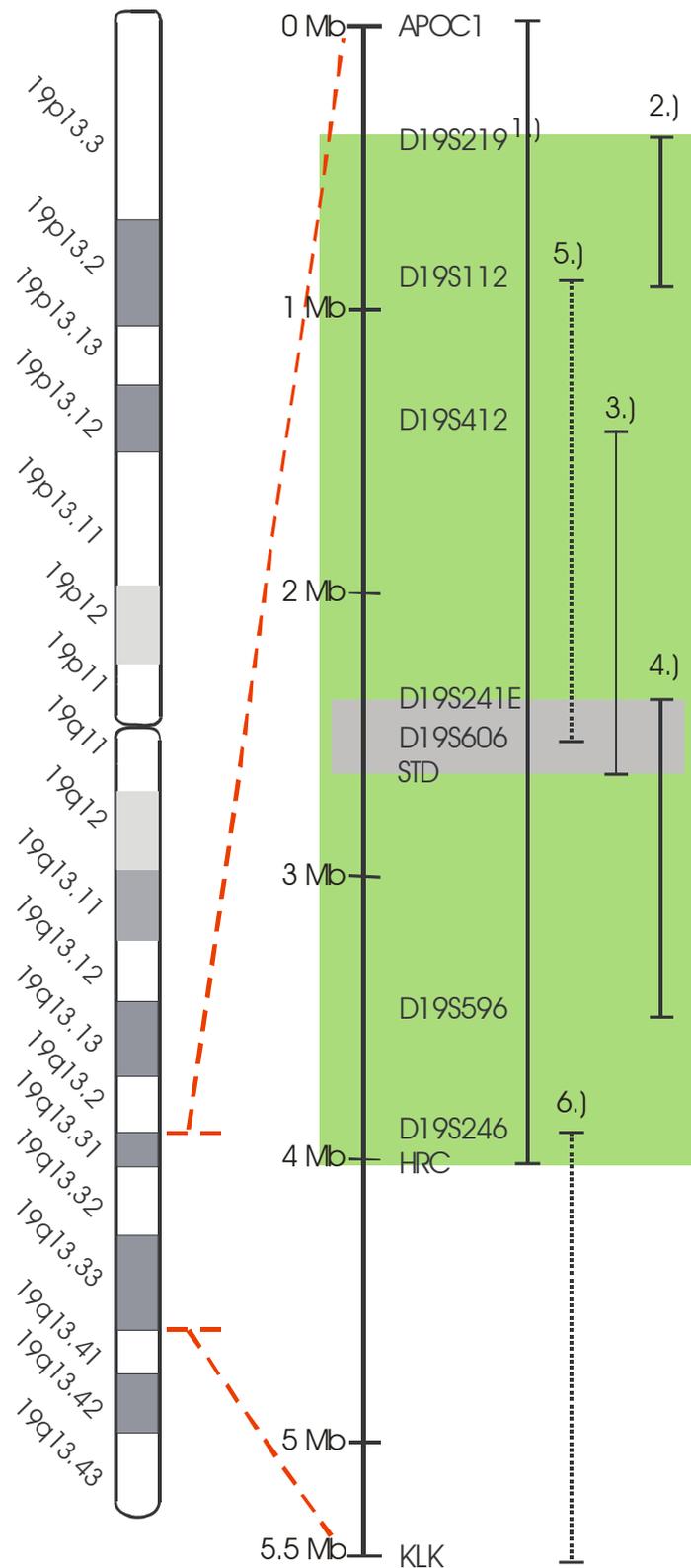
## Originalarbeiten

- Mueller W, **Hartmann C**, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A.; Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. Am J Pathol. 2002 Jul;161(1):313-9.

## ***Identifikation von Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 19q***

### **Übersicht: Kandidatenregionen auf Chromosom 19q**

Der kurze Arm von Chromosom 19 ist in Oligodendrogliomen und diffusen Astrozytomen oft durch Verluste betroffen (94). Neben Gliomen weisen auch Ovarialkarzinome und Neuroblastome LOH 19q auf (3, 10, 117). Entsprechend dem Konzept von Knudson besteht der Verdacht auf das Vorliegen eines für diese Tumorentitäten relevanten Tumorsuppressorgens auf 19q (97). Verschiedene Eingrenzungsstudien konnten die Kandidatenregion deutlich reduzieren. So wurde initial eine Region zwischen 19q13.11 und 19q13.4 beschrieben (142, 185). Diese konnte im Folgenden eingegrenzt werden auf eine 9,5 Mb große Region zwischen den Markern D19S178 auf 19q.13.2 und D19S180 auf 19q13.4 (186), dann auf eine 4 Mb Zone auf 19q13.3 zwischen *APOC1* und *HRC* (155). Im nächsten Schritt gelang eine Einengung der Kandidatenregion auf 1,4 Mb zwischen D19S412 und *STD* (153). Eine weitere Kandidatenregion wurde dann zwischen D19S241E und D19S596 identifiziert. In der gleichen Studie wurden zwei Tumore präsentiert, welche eine nur 150 kb große Deletion innerhalb dieser Region aufwiesen (169). Im Widerspruch zu dieser kleinen Region wurde ein glialer Tumor beschrieben, welcher weiter centromer eine 425 Kb Deletion aufwies (206). Zusammengefasst muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt von einer 3,7 Mb großen Kandidatenregion ausgegangen werden (55) (Abbildung 11).

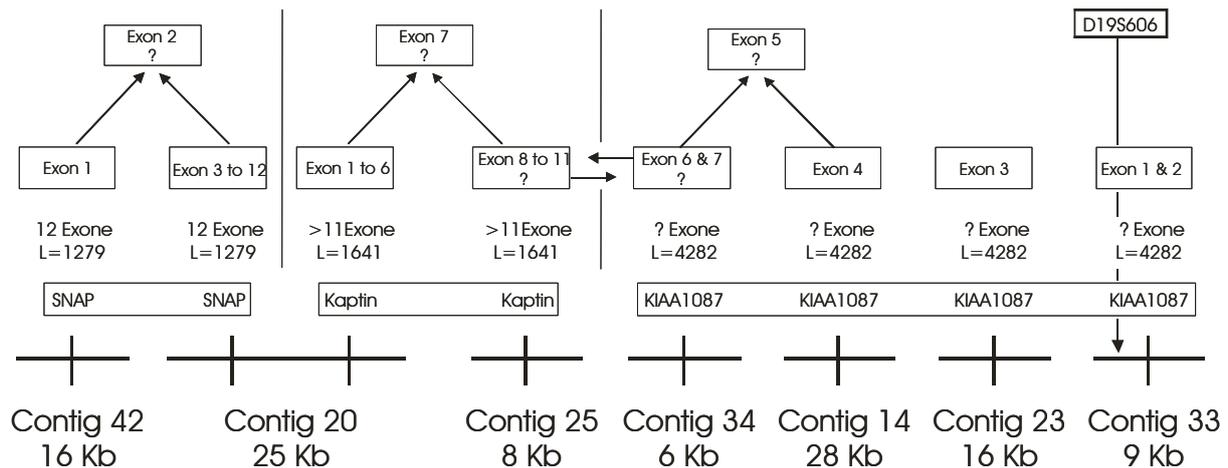


**Abbildung 11:** Physikalische Zuordnung der verschiedenen 19q Eingrenzungsstudien; 1: (155), 2: (206), 3: (153), 4: (169), 5: (Neuroblastom) (117), 6: (Ovarialkarzinom) (10), grüne Fläche: erweiterte Kandidatenregion, nach (55), graue Fläche: kleinste Kandidatenregion, nach (169).

### Transkriptionskartierung von 19q13.3

Die Verfügbarkeit großer Abschnitte der physikalischen Sequenz von Chromosom 19 lieferte die grundlegenden Daten zur Annotation der erweiterten Kandidatenregion mit dem Ziel, alle Gene auf 19q13.3 zu identifizieren (103, 182). Insbesondere die 150 Kb Region und ihre vor allem telomere Nachbarschaft war von großem Interesse. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine durchgehenden, größeren Contigs seitens der LLNL (Lawrence Livermore National Laboratories) Sequenzierungslaboratorien freigegeben waren, mussten zunächst inkomplette „Shotgun“ Sequenzfragmente assembliert werden. Um

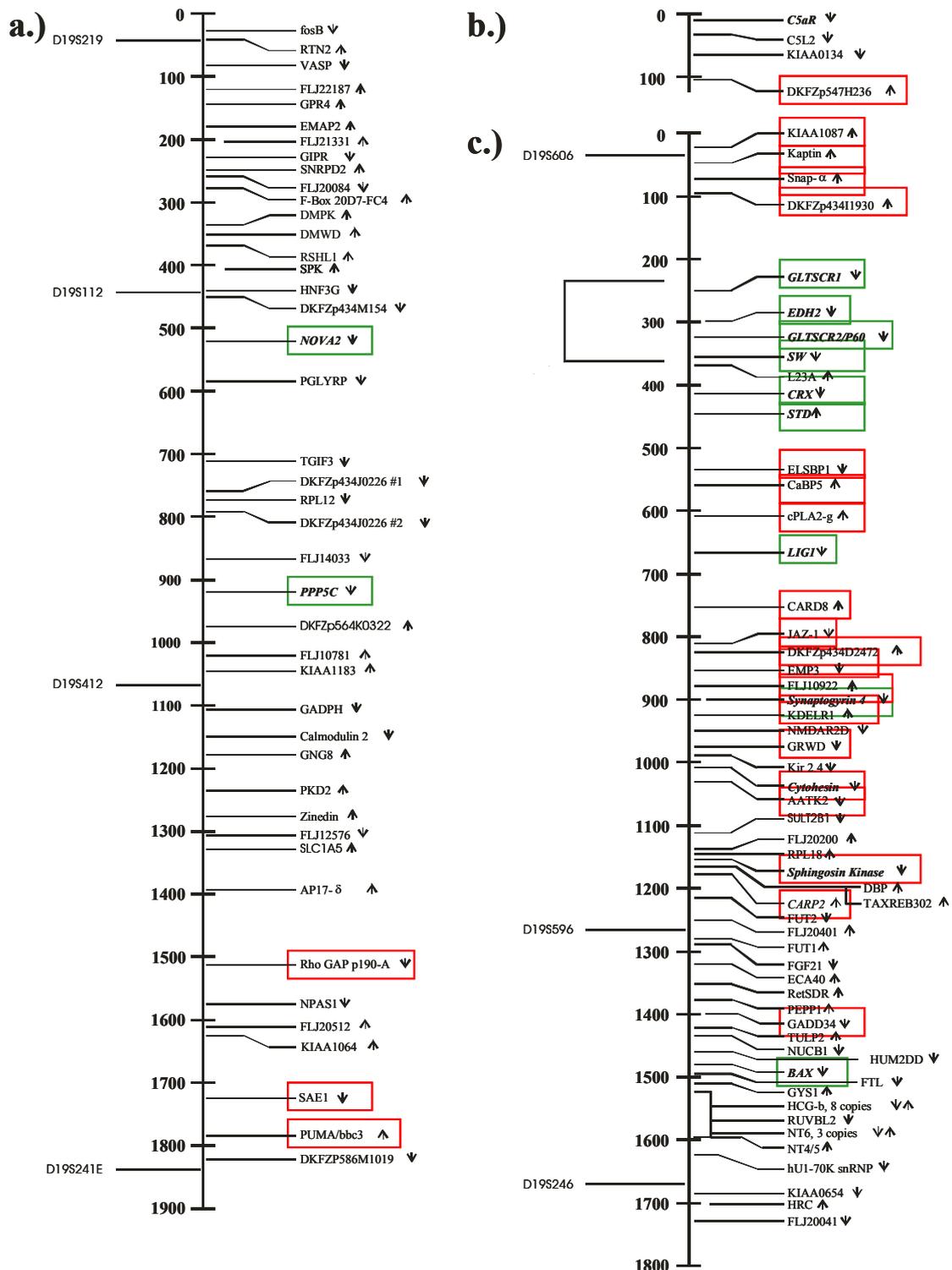
die Orientierung der resultierenden Contigs zueinander bestimmen zu können, wurden zudem in den Assemblierungsprozess bekannte STS Marker und Gene eingebaut, deren Position zueinander auf 19q13.3 bekannt waren (Abbildung 12). Nach Abschluss der Assemblierung lagen drei Contigs vor, welche die erweiterte Kandidatenregion abbildeten. Die beiden verbliebenen Lücken zwischen den drei Contigs waren mutmaßlich nur von kleiner Größe.



**Abbildung 12:** Assemblierung und Orientierung von 19q Sequenzabschnitten der Qualitätsstufe „draft quality“ vom LLNL; zunächst wurden kleinere Contigs generiert; im folgenden Schritt diese in Bezug zu Referenzgenen und STS Markern annotiert und mittels überbrückender Gene (sogenannte „bridging genes“) zueinander in eine Reihenfolge gesetzt. Es verblieben weitere Lücken (sogenannte „gaps“) zwischen den Contigs. Man konnte jedoch eine Größenabschätzung über die Zahl der zwischen den Contigs liegenden Genen erreichen.

Im nächsten Schritt wurden diese 3 Contigs auf das Vorliegen von Genen hin annotiert. Zwei Strategien wurden parallel zueinander verfolgt und am Ende wurden die Ergebnisse zusammengeführt: „Komparation“ und „Prediktion“. Mittels des Blast Algorithmus wurden die Contigs mit bekannten cDNA Sequenzen von Genen oder mit hESTs verglichen. Daneben wurden Computerprogramme wie Genscan oder GrailEXP heran gezogen, um Genkandidaten zu präzisieren.

Nach Identifikation der Genkandidaten wurde versucht, diese funktionell zu klassifizieren. Aus diesem Grund wurden die cDNA Sequenzen der Gene direkt mit anderen cDNA Sequenzen bekannter Gene verglichen. Weiterhin wurden die Genkandidaten in Computersimulationen translatiert, auf bekannte funktionelle Domänen mittels der CDDB Datenbank abgeglichen und mit den Aminosäuresequenzen bekannter Proteine verglichen.



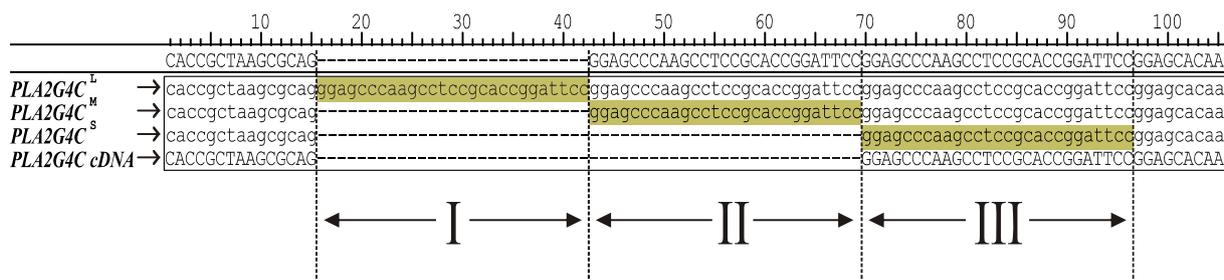
**Abbildung 13:** Resultate der Assemblierung und Annotation der erweiterten 19q13.3 Kandidatenregion; es gelang 3 Contigs zu generieren (a: centromerer Contig, b: mittlerer Contig, c: telomerer Contig), welche zusammen 107 Gene und Genkandidaten aufwiesen. Offenes Kästchen im telomeren Contig: 150 Kb Region von (169), grüne Kästchen um Gennamen: Gene, welche vor Abschluss dieser Studie auf Mutationen hin untersucht wurden, rote Kästchen um Gennamen: Gene, welche aufgrund dieser Studie auf Mutationen untersucht wurden.

In den drei Contigs fanden sich insgesamt 107 Genkandidaten. Dreiundvierzig Genkandidaten wurden in dem centromeren Contig identifiziert, 4 Genkandidaten in dem kleinen mittleren Contig und 61 Genkandidaten in dem telomeren Contig (Abbildung 13). Mindestens 27 Genkandidaten zeigten Ähnlichkeiten mit Genen, für deren Produkte eine inhibierende oder aktivierende Wirkung für Tumore funktionell nachgewiesen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass innerhalb der 150 Kb Region keine weiteren potentiellen Tumorsuppressorgene liegen (55).

Die Grundlagen dieser Arbeit lieferten die Voraussetzungen für eine Vielzahl von bisher zum Teil nicht veröffentlichten Folgestudien. Unter anderem wurden 24 Genkandidaten aufgrund ihrer Lokalisation oder Funktion mittels SSCP oder direkter Sequenzierung auf Mutationen untersucht (unveröffentlichte Ergebnisse).

### Polymorphismen im *PLA2G4C* Gen

Im Zuge der Mutationsanalysen fand sich in dem *PLA2G4C* Gen ein häufiger 27 bp Polymorphismus in Exon 1 außerhalb des ORF. Dieser Polymorphismus zeichnet sich durch eine einfache, zwei- oder dreifache Wiederholung dieses 27 bp Sequenzmotivs aus (Abbildung 14). Aufgrund der Größe des polymorphen Motivs entspricht dieser STS Marker somit der Definition eines Minisatellitenmarkers. Da dieses Gen sehr nahe an der minimalen 150 kb Kandidatenregion von 19q liegt, ist dieser Marker sehr gut für die 19q LOH Diagnostik verwendbar (56).



**Abbildung 14:** Sequenzpolymorphismus im *PLA2G4C* Gen auf 19q13.3; das Sequenzmotiv „ggagcccaagcctccgcaccggattcc“ findet sich in einer (*PLA2G4C<sup>S</sup>*), zwei (*PLA2G4C<sup>M</sup>*) oder drei (*PLA2G4C<sup>L</sup>*) Wiederholungen im Exon 1 des Gens.

## **Tumorsuppressorgen-Inaktivierung durch Hypermethylierung**

Die intensiven, aber erfolglosen Bemühungen um Identifikation des postulierten Tumorsuppressorgens auf 19q erzwangen die Erwägung anderer deaktivierender Mechanismen. Als alternativer Mechanismus des „second hits“ ist die Methylierung von CpG Inseln in der Promotorregion denkbar, welche die Transkription inhibiert. Um Aussagen über die Anzahl der Gene innerhalb der Kandidatenregion machen zu können, welche über CpG Inseln verfügen, wurden die 107 Gene mittels der Prädiktionsprogramme GrailEXP, CpG-islands und WebGene untersucht. Es wurden nur die CpG Inseln als potentielle Promotor-assoziierte Motive gewertet, welche maximal 7 kb von Exon 1 entfernt lagen. Es fanden sich in der Tat CpG Inseln in 85 der 107 Gene (79%). Zumeist weisen humane Chromosomen eine Dichte von 5 – 15 Inseln pro Mb auf, die Chromosomen 16, 17 und 22 kommen auf 19 – 22 Inseln pro Mb. Chromosom 19 ist das Chromosom mit der höchsten Dichte an CpG Inseln und erreicht eine Dichte von 43 Inseln pro Mb (103). Diese sehr hohe Dichte an CpG Inseln kann nur teilweise durch die hohe Dichte an Genen auf dem Chromosom 19 erklärt werden. Denn während durchschnittlich ein humanes Gen 1,05 CpGs zeigt, so finden sich auf Chromosom 19 dann 2,25 CpGs pro Gen (103). Somit erscheint die Möglichkeit, dass eine Promotorhypermethylierung statt einer Mutation auf dem verbliebenen Allel vorliegt, sehr plausibel. Es ist auch möglich, dass aufgrund der hohen Dichte an Genen und deren häufig anzunehmender Expressionsregulation über CpG Inseln Methylierung eventuell nicht nur ein einziges, sondern ganze Gruppen an Tumor-relevanten Genen durch Verlust des zweiten chromosomalen Arms inaktiviert werden (55).

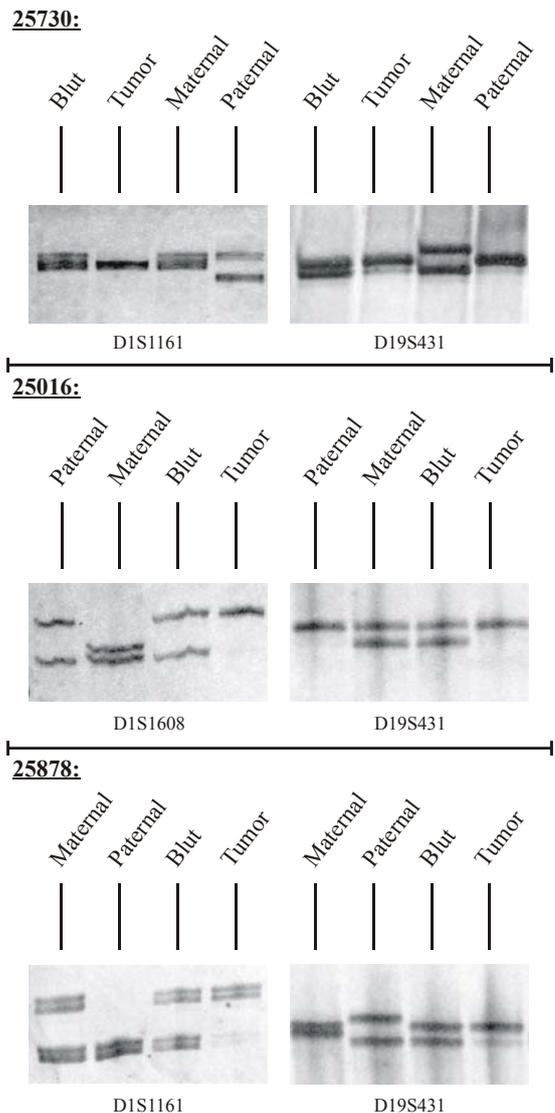
## **Parentales Imprinting von 19q**

Als Fortsetzung der Hypermethylierungshypothese bietet es sich an zu fragen, ob nicht eine Kopie des gesuchten Tumorsuppressorgens bereits in der Keimbahn hypermethyliert und somit epigenetisch ausgeschaltet ist. Der Verlust der zweiten Genkopie würde dann zum kompletten Ausfall der Funktion führen. Bei einer Reihe von Genen ist ein solcher Mechanismus bekannt. Ein ganzes X Chromosom ist bei Frauen durch solches CpG Imprinting deaktiviert. Somit wäre der Verlust des aktiven Allels durch einen LOH bereits der inaktivierende „second hit“ und jede Mutationsanalyse von Genen bliebe erfolglos. Ein solcher Mechanismus wurde für Chromosom 1p bei Neuroblastomen beschrieben (24), wiewohl dieses Konzept widerlegt wurde (74).

Um diese Hypothese zu prüfen, bietet es sich an zu testen, ob immer die maternale oder paternale Kopie verloren geht. Da Oligodendrogliome jedoch Tumore des mittleren Erwachse-

nenalters sind, konnte elterliche DNA nur in wenigen Fällen untersucht werden. Während der Zusammenstellung einer ausreichenden Zahl an Fällen publizierte eine französische Arbeitsgruppe den Nachweis eines selektiven Verlustes der paternalen 19q Kopie in 6 untersuchten Oligodendrogliomen (161). Die eigenen Daten widerlegten dann aber diese Beobachtung. Es fand sich in 13 oligodendroglialen Tumoren in 6 Fällen der Verlust der paternalen und in 7 Fällen der Verlust der maternalen 19q Arms (59) (Abbildung 15).

**Abbildung 15:** Repräsentative Resultate bezüglich der parenteralen Herkunft der verlorenen Allele: ID 25730, D1S1161 - Verlust des paternalen Allels, D19S431 - Verlust des maternalen Allels; ID 25016, D1S1608 - Verlust des maternalen Allels, D19S431 - Verlust des maternalen Allels; ID 25878, D1S1161 - Verlust des paternalen Allels, D19S431 - Verlust des maternalen Allels; Paternal = paternale DNA, Maternal = maternale DNA, Tumor = Tumor DNA des Patienten, Blood = Konstitutive DNA des Patienten.



## Originalarbeiten

- **Hartmann C**, Johnk L, Kitange G, Wu Y, Ashworth LK, Jenkins RB, Louis DN.; Transcript map of the 3.7-Mb D19S112-D19S246 candidate tumor suppressor region on the long arm of chromosome 19. *Cancer Res.* 2002 Jul 15;62(14):4100-8.
- **Hartmann C\***, Johnk L\*, Sasaki H, Jenkins RB, Louis DN.; Novel PLA2G4C polymorphism as a molecular diagnostic assay for 19q loss in human gliomas. *Brain Pathol.* 2002 Apr;12(2):178-82.

- **Hartmann C**, Mueller W, Lass U, Stockhammer F, von Eckardstein K, Veelken J, Jeuken J, Wick W, von Deimling A.; No preferential loss of paternal 19q alleles in oligodendroglial tumors. *Ann Neurol.* 2003 Aug;54(2):256-8
- Tews B, Felsberg J, **Hartmann C**, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P; Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer*, in press.

\*: gemeinsame Erstautorenschaft

## ***PDGFRA in Oligodendrogliomen***

PDGF-A stimuliert O2A Progenitor Zellen zur Proliferation und verhindert eine Differenzierung (46). Zwei Mausmodelle oligodendroglialer Tumore werden durch PDGF-B Überexpression zur vermehrten Proliferation stimuliert (31, 180). In einem der Modelle fand sich in einer modifizierten Variante ein Zusammenhang zwischen der Expression von PDGF-B und *p190ARhoGAP*, welches innerhalb der erweiterten Kandidatenregion von 19q13.3 liegt und als 19q Tumorsuppressorgen diskutiert wurde (202). Bis zu 94% aller Oligodendrogliome exprimieren den PDGFR- $\alpha$  Rezeptor und seinen Liganden PDGF-A, so dass von einer auto- und parakrinen Stimulation auszugehen ist (35, 152). Eine Amplifikation des *PDGFRA* Gens, das PDGFR- $\alpha$  kodiert, fand sich jedoch nur in wenigen anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III, welche zudem auch histologische Eigenschaften von Grad IV Gliomen zeigten (170). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass gastrointestinale Stromatumore (GIST), welche keine c-Kit Mutation aufwiesen, dafür aber stark PDGFR- $\alpha$  exprimierten, Punktmutationen in *PDGFRA* zeigten (69). Interessanterweise wird PDGFR- $\alpha$  ebenfalls durch Imatinibmesylat (Gleevec<sup>®</sup>) inhibiert (43). Somit ergeben sich mehrere Argumente, *PDGFRA* auf Punktmutationen und PDGFR- $\alpha$  Expression bezüglich eines Zusammenhanges mit dem 1p/19q Genotyp von Oligodendrogliomen zu untersuchen.

Aus diesem Grund wurden 108 Gliome (20 Oligodendrogliome WHO Grad II, 32 anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III, 18 Astrocytome WHO Grad II, 17 anaplastische Astrocytome WHO Grad III, 21 Glioblastome WHO Grad IV) auf Mutationen in den Exons 2 bis 21 von *PDGFRA* untersucht. Weiterhin wurde mittels Western-blot die Expression von PDGFR- $\alpha$  mit dem 1p/19q LOH Status von 28 Oligodendrogliomen verglichen.

Es fanden sich keine Mutationen in *PDGFRA*. In etwa 50% der untersuchten Oligodendrogliome wurde PDGFR- $\alpha$  exprimiert. Es konnte aber kein Zusammenhang zwischen der Expression von PDGFR- $\alpha$  mit dem 1p/19q LOH Status aufgezeigt werden (63).

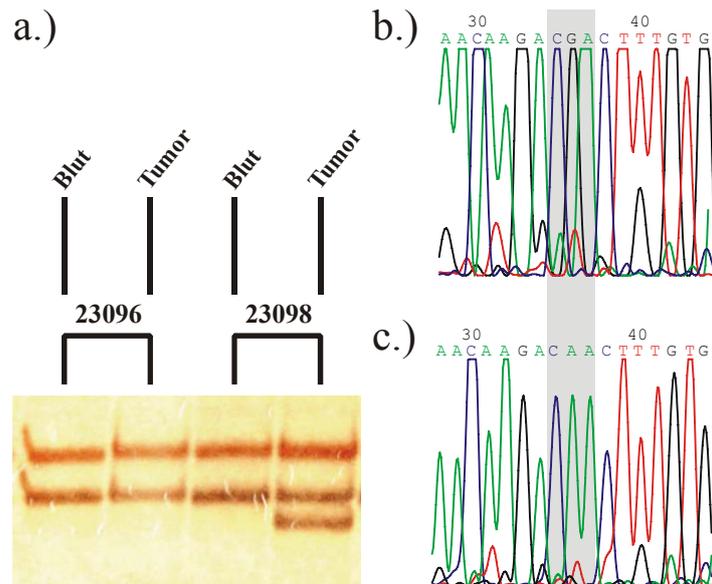
## **Originalarbeiten**

- **Hartmann C**, Xu X, Bartels G, Holtkamp N, Atallah-Gonzales I, Tallen G, von Deimling A; PDGFR-a in 1p/19q LOH Oligodendrogliomas. *Int J Cancer*. 2004 Dec 20;112(6):1081-2.

## ***PIK3CA Mutationen in oligodendroglialen Tumoren***

Der Übergang von Oligodendrogliomen WHO Grad II zu anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III ist oft durch Mutationen im RB Signalweg und durch LOH auf Chromosom 10 charakterisiert (60, 62). In Glioblastomen finden sich in etwa 20% der Fälle Mutationen im Tumorsuppressorgen *PTEN* auf 10q (94). In anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III kommen *PTEN* Mutationen jedoch nur in 3 bis 10% der Fälle vor (38, 88, 160, 162). In einer Untersuchung wurden allerdings eine Mutationsrate von 14% im *PIK3CA* Gen in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO Grad III identifiziert (15). Die Genprodukte von *PTEN* und *PIK3CA* haben im gleichen Signalweg eine entgegengesetzte Wirkung. Bisher fanden sich Mutationen in Onkogenen in Oligodendrogliomen nur in sehr geringer Häufigkeit. Überwiegend wurden mutierte Tumorsuppressorgene oder chromosomale Veränderungen, welche auf solche Gene hindeuten, gefunden (60, 62). Somit erscheint *PIK3CA* als das häufigste mutierte Onkogen in Oligodendrogliomen. Um diese Beobachtung an einer größeren Zahl oligodendroglialer Tumore zu prüfen, wurden 66 anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III und 23 anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III auf *PIK3CA* Mutationen in den Exonen 1, 9 und 20 untersucht. Um zudem Aussagen über die Frequenz von *PIK3CA* Mutationen in Oligodendrogliomen WHO Grad II zu erhalten, wurden zusätzlich 41 dieser Tumore untersucht.

In den insgesamt 130 oligodendroglialen Tumoren wurden 3 *PIK3CA* Mutationen gefunden (2%). Alle Mutationen wurden in der Gruppe der 66 anaplastischen Oligodendrogliome WHO Grad III beobachtet, so dass die Frequenz an *PIK3CA* Mutationen in diesen Tumoren etwa 5% beträgt. Entgegen der initialen Beobachtung scheint die Rolle von Mutationen in *PIK3CA* weniger bedeutend zu sein (15). Alle *PIK3CA* Mutationen wurden in Oligodendrogliomen gefunden, welche LOH 1p/19q aufwiesen (Abbildung 16). Da *PIK3CA* Mutationen in anderen Tumoren wie Brustkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und Magenkarzinomen bereits in frühen Läsionen identifiziert wurden (104, 158), erschien es angezeigt auch Oligodendrogliome WHO Grad II zu untersuchen. Da keine Mutationen in dieser Tumorentität gefunden wurden, ist es möglich, dass *PIK3CA* Mutationen, ebenso wie *PTEN* Mutationen, bei der Progression zu Anaplasie eine Rolle spielen.



**Abbildung 16:** Repräsentative SSCP- und Sequenzierungsergebnisse; a.) SSCP Gel mit *PIK3CA* Exon 1 PCR Produkten des Blutes und der Tumor DNA der Fälle 23096 und 23098; eine abweichende Bande in der rechten Spur (Tumor 23098) deutet auf eine Sequenzalteration im PCR Produkt hin; b.) Sequenzierungsergebnisse für Blut DNA und c.) Tumor DNA von Fall 23098. Das Wildtyp-Triplett CGA ist verändert zu CAA.

## Originalarbeiten

- **Hartmann C**, Devermann L, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A; *PIK3CA* mutations in oligodendroglial tumors. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, in press.

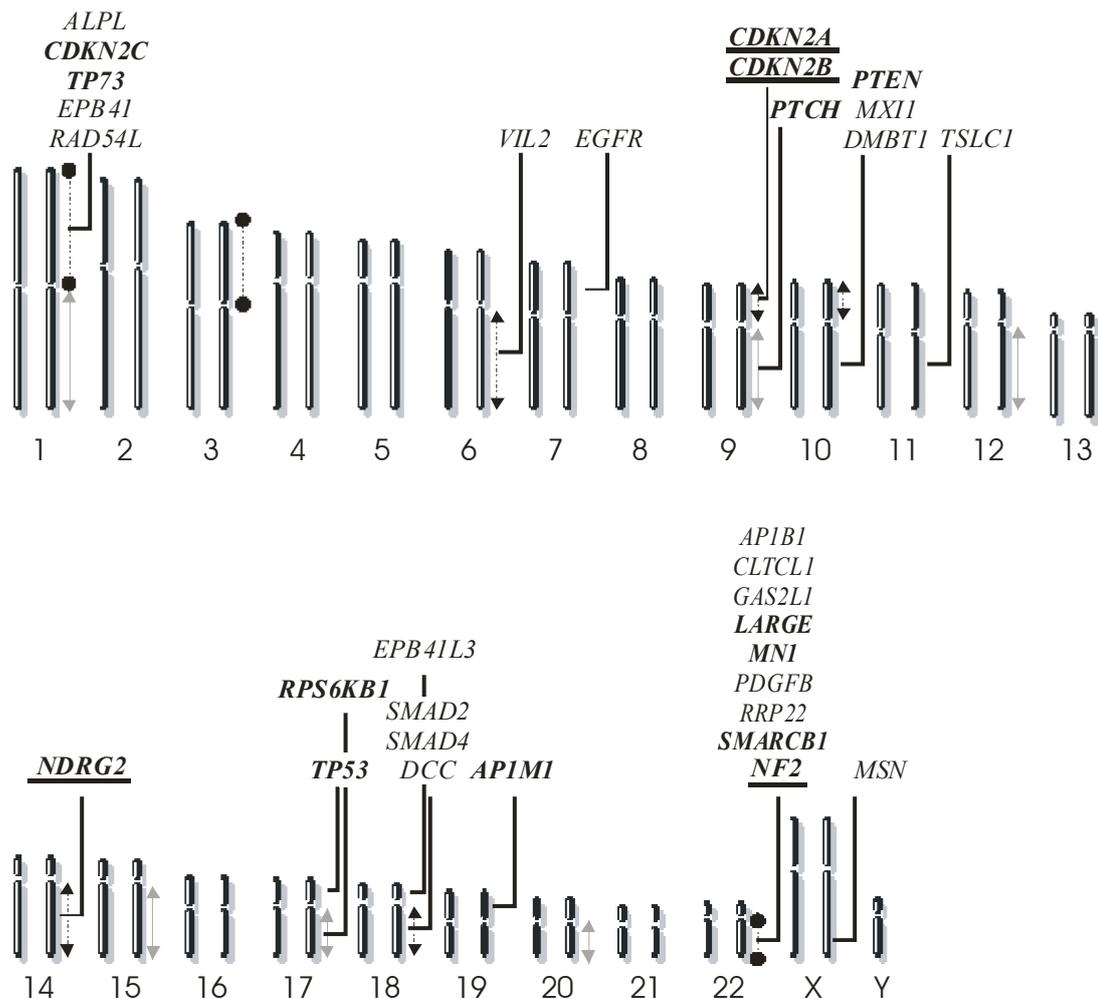
# Chromosomale und molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen

## ***Bekannte molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen***

Eine Vielzahl chromosomaler Veränderungen wurden in Meningeomen dokumentiert. Diese sind zum Teil in WHO Grad I Meningeomen nachweisbar, teils sind diese chromosomalen Veränderungen progressions-assoziiert. Andererseits konnten bisher nur wenige Gene mit Mutationen in Meningeomen identifiziert werden.

Die häufigste beobachtete chromosomale Alteration in Meningeomen ist eine Monosomie 22. Monosomie 22 wurde als erste chromosomale Veränderung in soliden Tumoren beschrieben (207, 208). LOH Eingrenzungsstudien konnten die Kandidatenregion auf 22q12 reduzieren (39, 40, 108, 114, 157). Als nächster Schritt erfolgte der Nachweis von Mutationen in dem Tumorsuppressorgen *NF2*, welches in 30 - 60% aller Meningeome betroffen ist (33, 53, 106, 115, 129, 156). Da die Häufigkeit der *NF2* Mutationen zwischen den verschiedenen WHO Graden nicht wesentlich schwankt, ist anzunehmen, dass *NF2* Mutationen ein initiiendes Ereignis für diese Tumore darstellen (198). *NF2* kodiert das Protein Merlin. Strukturell homologe Proteine wie DAL-1 und Protein 4.1R suggerieren alternative, attraktive Tumorsuppressorgene zu sein. Doch außer Expressionsdifferenzen konnten keine genetischen oder epigenetischen Veränderungen gefunden werden (50, 131, 151). Da häufiger LOH 22q als *NF2* Mutationen identifiziert werden, wird mindestens ein weiteres Tumorsuppressorgen auf 22q vermutet. Aus diesem Grund wurden die Gene *INII*, *BAM22/AP1B1*, *GAR22*, *RRP22*, *MNI*, *CTLCL1/CLH-22* und *LARGE* untersucht. Es fanden sich in der Regel keine oder nur wenige Mutationen (92, 107, 137, 138, 164, 211). In niedriggradigen Meningeomen wurden zudem selten Mutationen im *PTCH* Gen beschrieben (205).

In atypischen und anaplastischen Meningeomen wurden mehr oder weniger häufig Deletionen der chromosomalen Arme 1p, 6q, 9q, 10q, 14q, 17p und 18q beschrieben (83). Einige Tumorsuppressorgene, lokalisiert auf diesen chromosomalen Armen, wurden bei malignen Meningeomen untersucht: in *CDKN2A* auf 9p (14, 196), *TP53* auf 17p (188) und *PTEN* auf 10q wurden nur selten Mutationen nachgewiesen (136). In einer jüngst veröffentlichten Studie konnte eine häufige Promotorhypermethylierung des *NDRG2* Genes auf 14q beobachtet werden (109). Mit CGH wurden Amplifikationen auf 1q, 9q, 12q, 15q, 17q und 20q beschrieben (196). Allerdings gelang kein Nachweis von Mutationen in Onkogenen auf diesen chromosomalen Armen (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Chromosomale und molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen. Durchgehende graue Linien auf der rechten Seite von Chromosomen zeigen chromosomale Zugewinne, gestrichelte Linien zeigen chromosomale Verluste an; Kreise an den Enden der Linien bedeuten strukturelle Veränderungen in WHO Grad I, Pfeilköpfe zeigen Veränderungen in WHO Grad II und III Meningeomen an; einfach gedruckte Gennamen weisen auf Gene hin, welche keine genetischen oder epigenetischen Veränderungen aufweisen, fett gedruckte Gennamen weisen auf selten mutierte Gene hin und unterstrichene fette Gennamen weisen auf häufig alterierte Gene in Meningeomen hin.

### **Die Häufigkeit von *NF2* Mutationen in Meningeomen**

In der aktuellen WHO Klassifikation wird eine Vielzahl histologischer Varianten von Meningeomen unterschieden. Allerdings zeigen die meisten dieser histologischen Varianten keine Unterschiede im klinischen Verhalten und werden deshalb dem WHO Grad I zugeteilt. Man differenziert in klassische und seltene Varianten von Meningeomen. Zu den klassischen

Meningeomen gehören die meningotheiomatösen, fibroblastischen, transitionalen, psammomatösen und angiomatösen Meningeome. Zu den seltenen Varianten zählt man die sekretorischen, mikrozystischen, lymphoplasmazellreichen und das metaplastischen Meningeome. Klarzellige und chordoide Meningeome werden aufgrund ihres biologischen Verhaltens als atypische WHO-Grad II, papilläre und rhabdoide Meningeome als anaplastische WHO Grad III Tumore eingeteilt. Auch diese WHO Grad II und III Varianten gehören in die Gruppe der seltenen Meningeome (46, 94).

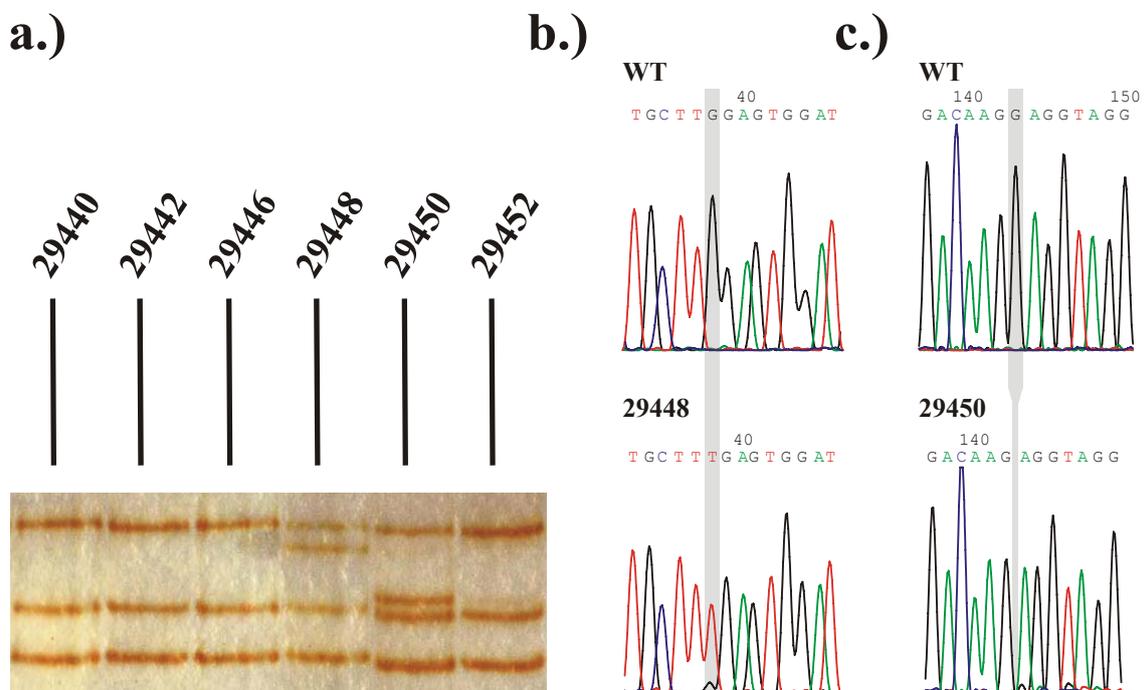
Es konnte gezeigt werden, dass trotz gleichen klinischen Verhaltens die meningotheiomatösen, fibroblastischen und transitionalen Meningeome eine unterschiedliche Frequenz an *NF2* Mutationen aufweisen: Während transitionale Meningeome in bis zu 83% der Fälle und fibroblastische Meningeome noch in bis zu 70% der Fälle *NF2* Mutationen aufwiesen, konnten in meningotheiomatösen Meningeomen *NF2* Mutationen nur in etwa 25% der Fälle nachgewiesen werden. Offenbar gibt es genetisch differente Varianten von Meningeomen, die eine gewisse Überschneidung mit histologischen Varianten zeigen (198).

Um dieses Konzept auch hinsichtlich seltener histologischer Varianten zu prüfen, wurden 80 sekretorische, psammomatöse, angiomatöse, klarzellige, mikrozystische, chordoide, lymphoplasmazyten-reiche, metaplastische, rhabdoide und papilläre Meningeome auf *NF2* Mutationen untersucht. Zur Kontrolle wurden 25 fibroblastische Meningeome mit untersucht.

Zweiundzwanzig *NF2* Mutationen wurden in 21 von 105 Tumoren (20%) gefunden. Mutationen wurden in 5/14 (36%) psammomatösen, in 1/9 angiomatösen, in 2/9 klarzelligen, in 1/3 chordoiden und in 1/1 papillären Meningeomen detektiert (Abbildung 18). In dem einzigen papillären Meningeom fanden sich 2 verschiedene *NF2* Mutationen in den Exonen 11 und 14. Keine *NF2* Mutationen wurden in 33 sekretorischen, 7 mikrozystischen, 2 lymphoplasmazyten-reichen, 1 rhabdoiden und 1 metaplastischen Meningeomen gefunden. In der Kontrollgruppe von 25 fibroblastischen Meningeome wurden 11 *NF2* Mutationen (44%) beobachtet. *NF2* Mutationen waren signifikant seltener in sekretorischen Meningeomen als in fibroblastischen Meningeomen ( $p < 0.0001$ , Fisher exact test). Das Fehlen von *NF2* Mutationen in den 7 mikrozystischen Meningeomen erreichte kein signifikantes Niveau im Vergleich zur Häufigkeit dieser Mutationen in fibroblastischen Meningeomen ( $p < 0.07$ , Fisher exact test).

Die verschiedenen *NF2* Mutationsfrequenzen unterstützen das Konzept genetischer Varianten von Meningeomen, welche eine gewisse Überschneidung mit histologischen Varianten zeigen. So weisen sekretorische Meningeome eine in etwa ebenso niedrige *NF2* Mutationshäufigkeit wie meningotheiomatöse Meningeome auf. Hingegen verhalten sich psammomatöse Meningeome bezüglich der *NF2* Mutationsfrequenz in etwa wie fibroblastische und tran-

sitionale Meningeome. Wenn man nach histologischen Mustern dieser zwei Gruppen schaut, dann zeigen psammomatöse, fibroblastische und transitionale Meningeome eine eher mesenchymal-artige, spindelzellige Morphologie, während meningotheliomatöse und sekretorische Meningeome eher einen epitheloiden Phänotyp bieten. Verschiedene Erklärungen können heran gezogen werden. Zum einen liegt die Hypothese nahe, dass es unterschiedliche Vorläuferzellen beider Gruppen gibt, welche eine unterschiedliche Vulnerabilität hinsichtlich *NF2* Mutationen haben. Zum anderen können diese differenten Gruppen abweichende Funktionen reflektieren: während Ursprungszellen epitheloider Meningeome eher anatomische Barrieren und sekretorische Funktionen haben mögen, so könnte die Funktion der Vorläuferzellen mesenchymal-artiger Meningeome eher reparativer Art sein.



**Abbildung 18:** Repräsentative SSCP- und Sequenzierungsergebnisse; a.) SSCP Gel mit PCR Produkten von *NF2* Exon 8 verschiedener Tumore; abweichende Banden der Tumore 29448 und 29450 deuten auf Sequenzalterationen hin; b.) Sequenzen vom Wildtyp (WT) und Tumor 29448 von Exon 8. Das Wildtyp-Triplet GGA (Gly) wurde zu TGA (stop codon) (cDNA Position 1128, Codon 235); c.) Sequenzen vom Wildtyp (WT) und Tumor 29450 von Exon 8, es findet sich eine Einzelbasendeletion eines Guanosin bei cDNA Position 1232, die zu einem Frameshift der Aminosäuresequenz ab Codon 270 führt.

## **Multiple Meningeome**

Etwa 1 bis 8% aller Patienten mit Meningeomen entwickeln multiple Tumore (68, 177). In seltenen Fällen treten multiple Meningeome familiär gehäuft auf und zeigen einen autosomal dominanten Erbgang (113). In Fällen sporadischer multipler Meningeome fanden sich gehäuft *NF2* Mutationen (173). Hingegen gibt es Hinweise, dass *NF2* in familiären multiplen Meningeomen nicht mutiert ist (113, 140). Eine Alteration im *DAL-1* Gen auf 18p11.3, das ebenso wie Merlin zur Protein 4.1 Familie gehört, könnte einen alternativen Mechanismus für die *NF2*-unabhängige Entstehung von Meningeome darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Meningeome *DAL-1* nicht exprimiert (50), dass die chromosomale Region auf 18p11.3 häufig deletiert ist (132) und dass das Protein *DAL-1* in Meningeomen die Proliferation inhibiert (51). Somit erscheinen Mutationen in *DAL-1* als plausible Ursache familiärer multipler Meningeome. Deshalb wurde Chromosom 18p und 22q mittels LOH Analyse und die Gene *DAL-1* und *NF2* mittels SSCP in 7 Patienten mit multiplen Meningeomen untersucht. Drei der 7 Patienten zeigten familiäre multiple Meningeome.

Es fanden sich 3 Patienten mit *NF2* Mutationen, 2 davon wiesen LOH 22q auf. Die Patienten mit familiären multiplen Meningeomen zeigten weder *NF2* Mutationen noch LOH 22q. Hingegen konnte in keinem Fall ein LOH 18p oder Mutationen in *DAL-1* nachgewiesen werden. Die Daten unterstützen die Beobachtung, dass in Patienten mit familiären multiplen Meningeomen das Tumorsuppressorgen *NF2* keine wesentliche Bedeutung spielt und deuten auf das Vorliegen anderer initiiender Ereignisse. Zudem konnte gezeigt werden, dass weder *DAL-1* noch der *DAL-1* Locus in den untersuchten Tumoren alteriert ist (68).

## **Originalarbeiten**

- **Hartmann C**, Sieberns J, Gehlhaar C, Simon M, Paulus W, von Deimling A; *NF2* mutations in secretory and other rare variants of meningiomas. *Brain Pathol.*, <http://brainpathology.com/brainpath/abstracts/vol16/1601/1601ab0002.html>.
- Heinrich B, **Hartmann C**, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, MacCollin M.; Multiple meningiomas: Investigating the molecular basis of sporadic and familial forms. *Int J Cancer*. 2003 Feb 10;103(4):483-8.

## Zusammenfassung

Gliome und Meningeome sind die häufigsten primären intrakraniellen Tumore. Während letztere oft heilbar sind, so gibt es keine befriedigende Therapie für Gliome. Dennoch kommen nur zu oft Meningeome vor, welche ebenfalls nicht heilbar sind. Erst ein weitergehendes Verständnis genetischer Ursachen beider Tumore bietet die Möglichkeit einer differenzierteren Diagnostik und verbesserter Therapiekonzepte.

In den vorliegenden Studien konnte gezeigt werden, dass Hirntumore genetische Veränderungen aufweisen, die zum Teil mit bestimmten klinischen Verläufen oder charakteristischer Morphologie assoziiert sind. Ausgehend von diesen chromosomalen Veränderungen wurde versucht, spezifische molekulargenetische Veränderungen zu identifizieren. Dieses erforderte neuartige Methoden der chromosomalen und genetischen Annotation. So konnten in Astrozytomen potentielle Tumorsuppressorgen-Kandidatenregionen näher eingegrenzt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass in Astrozytomen häufig die Gene *CDKN2A* und *CDKN2B*, die wesentliche Zellzyklusinhibitoren kodieren, deletiert sind und dass Zelllinien astrozytärer Tumore eine weitgehend gleiche Häufigkeit dieser Mutationen im Vergleich zum Primärtumor aufweisen. Weiterhin wurde eine deutlich niedrigere Mutationshäufigkeit im Onkogen *PIK3CA* nachgewiesen, als initiale Studien implizierten. Zudem wurde erstmalig ein Tumor dokumentiert, welcher sowohl eine *PIK3CA* als auch eine *PTEN* Mutation aufwies. Die Analyse Microarray-basierter Expressionsdifferenzen zwischen Glioblastomen und anaplastischen Oligodendrogliomen erlaubte eine bessere klinische Prädiktion, als es die konventionelle Histologie ermöglichte. In Glioblastomen wurden LOH auf den chromosomalen Armen 9p und 10q als Prädiktionsmarker für eine Temozolomid Therapie identifiziert. Chromosom 19q spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese oligodendroglialer und astrozytärer Tumore. Die Identifikation des postulierten Tumorsuppressorgens auf 19q13.3 wurde zum einen durch die erste detaillierte Annotation der Kandidatenregion, zum anderen durch den Ausschluss eines parentalen Imprintings einige Schritte weiter geführt. Ein diagnostisch verwendbarer Polymorphismus im *PLA2G4C* Gen wurde nachgewiesen. Aktivierte Onkogene sind in Oligodendrogliomen mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen. *PDGFRA* ist solch ein Kandidat, doch gelang kein Nachweis von Mutationen. Mutationen wurden jedoch im Onkogen *PIK3CA* in anaplastischen Oligodendrogliomen in geringer Zahl gefunden. In der histopathologischen Diagnostik wird eine Vielzahl an Varianten von Meningeomen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die seltenen Varianten unterschiedliche Frequenzen an *NF2* Mutationen

aufweisen. Weiterhin wurde eine Bedeutung des Kandidatengens *DAL-1* für multiple Meningeome ausgeschlossen.

In vielen Feldern dieser Studien liegen noch keine endgültigen Ergebnisse vor. Weitere Studien sind erforderlich, um den Zielen gerecht zu werden. Dennoch konnten zum Teil wesentliche Antworten gefunden werden.

## Abkürzungen

BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basepairs
CDDB	Conserved domain database
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A/B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B
CGH	Comparative Genomic Hybridization
Contig	Contiguous sequence of DNA
DAL-1	differentially expressed in adenocarcinoma of the lung
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EP300	E1A-binding protein 300 KDa
hEST	Human Expressed Sequence Tag
LOH	Loss of heterozygosity
Kb	Kilobasen
Mb	Megabasen
MGMT	O(6)-methylguanine DNA methyltransferase
MKL1	Megakaryoblastic leukemia 1
NF2	Neurofibromatose Typ 2
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PIK3K	Phosphoinositol 3'-Kinase
PIP2	Phosphoinositolbiphosphat
PIP3	Phosphoinositoltriphosphat
cPLA2G4C	cytosolic phospholipase A2 group IV c
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB	Retinoblastom
SSCP	Single-Strand Conformational Polymorphism
WHO	World Health Organization
WT	Wild Typ
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Danksagung

Danken möchte ich meinen akademischen Lehrern. Von Professor Dr. Andreas von Deimling erlernte ich wesentliche Konzepte tumorgenetischen Denkens. Er ermöglichte mir einen Großteil meiner wissenschaftlichen Arbeiten unter seiner Anleitung auszuführen. Professor Dr. David Louis verdanke ich die Freude an der Erstellung wissenschaftlicher Texte. Er zeigte mir, dass diplomatische Fähigkeiten auch in der Wissenschaft unabdingbar sind. Meinem Doktorvater Professor Dr. Manfred Westphal danke ich für die Heranführung und Begeisterung an neuroonkologischen Themen. Ohne seine Förderung wäre diese Schrift nie entstanden.

Weiterhin schulde ich Claire Gehlhaar, Gesine Bartels, Xuidan Xu und Christine Spiengies sehr viel Dank für ihre Arbeiten in meiner Arbeitsgruppe. Eine große Zahl der hier präsentierten Projekte wären ohne ihre Hilfe nie verwirklicht worden.

Es war mir eine Freude und ständige Herausforderung mit den Doktorandinnen Astrid Nümann, Annegret Kunitz und Jennifer Siebers zu arbeiten. Ich danke ihnen für ihre Geduld mit mir.

Ebenso dürfen die Namen Nikola Holtkamp, Ute Pohl, Loki Johnk, Andrea Cutone, Bianca Heinrich, Yasu Ino, Yoshifumi Okada, Hikaru Sasaki, Jennifer Roy, Cathy Nutt und Anat Stemmer-Rachamimov an dieser Stelle nicht fehlen. Von Ihnen erlernte ich viele der Techniken, welche die Grundlagen der hier vorgestellten Studien sind.

Auch meiner Mutter und meinem Vater bin ich zu einer großen Danksagung verpflichtet. Sie ermöglichten mir meine Ausbildung nicht allein durch ihre finanzielle Unterstützung, welche sie selber nicht in geringem Maße belastete.

In Dank und Liebe Ulrike Lengler. Ihrer Geduld, Ihrer Kritik, Ihrer Sanftmut. *Cara sposa, amante cara.*

## Literatur

1. Allione F, Eisinger F, Parc P, Noguchi T, Sobol H, Birnbaum D (1998) Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22Q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer* 75:181-186
2. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, Lomas J, de Campos JM, Isla A, Sarasa JL, Rey JA (2003) Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 144:134-142
3. Amfo K, Neyns B, Teugels E, Lissens W, Bourgain C, De Sutter P, Vandamme B, Vamos E, De Greve J (1995) Frequent deletion of chromosome 19 and a rare rearrangement of 19p13.3 involving the insulin receptor gene in human ovarian cancer. *Oncogene* 11:351-358.
4. Arap W, Nishikawa R, Furnari FB, Cavenee WK, Huang HJ (1995) Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res* 55:1351-1354
5. Bailey P, Bucy P (1929) Oligodendrogliomas of the brain. *J Pathol Bacteriol* 32:735-754
6. Bailey P, Cushing H (1926) *A Classification of Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic basis with a Correlation Study of Prognosis*. Lippincott: Philadelphia.
7. Bauman GS, Ino Y, Ueki K, Zlatescu MC, Fisher BJ, Macdonald DR, Stitt L, Louis DN, Cairncross JG (2000) Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48:825-830
8. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA (1995) Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 64:207-210
9. Bello MJ, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Saez-Castresana J, Pestana A, Rey JA (1994) Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 57:172-175
10. Bicher A, Ault K, Kimmelman A, Gershenson D, Reed E, Liang B (1997) Loss of heterozygosity in human ovarian cancer on chromosome 19q. *Gynecol Oncol* 66:36-40.
11. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B (1999) Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res* 59:74-79
12. Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH, Stenzel TT, Dawes DM, McLendon RE, Bigner DD (1999) Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 155:375-386
13. Bortolotto S, Chiado-Piat L, Cavalla P, Bosone I, Chio A, Mauro A, Schiffer D (2000) CDKN2A/p16 inactivation in the prognosis of oligodendrogliomas. *Int J Cancer* 88:554-557
14. Bostrom J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G (2001) Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 159:661-669
15. Broderick DK, Di C, Parrett TJ, Samuels YR, Cummins JM, McLendon RE, Fults DW, Velculescu VE, Bigner DD, Yan H (2004) Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res* 64:5048-5050

16. Bryan EJ, Thomas NA, Palmer K, Dawson E, Englefield P, Campbell IG (2000) Refinement of an ovarian cancer tumour suppressor gene locus on chromosome arm 22q and mutation analysis of CYP2D6, SREBP2 and NAGA. *Int J Cancer* 87:798-802.
17. Buckley PG, Mantripragada KK, Benetkiewicz M, Tapia-Paez I, Diaz De Stahl T, Rosenquist M, Ali H, Jarbo C, De Bustos C, Hirvela C, et al (2002) A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet* 11:3221-3229
18. Buckner JC, Gesme D, Jr., O'Fallon JR, Hammack JE, Stafford S, Brown PD, Hawkins R, Scheithauer BW, Erickson BJ, Levitt R, et al (2003) Phase II trial of procarbazine, lomustine, and vincristine as initial therapy for patients with low-grade oligodendroglioma or oligoastrocytoma: efficacy and associations with chromosomal abnormalities. *J Clin Oncol* 21:251-255
19. Burger PC, Minn AY, Smith JS, Borell TJ, Jedlicka AE, Huntley BK, Goldthwaite PT, Jenkins RB, Feuerstein BG (2001) Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections. *Mod Pathol* 14:842-853
20. Cairncross G, Macdonald D, Ludwin S, Lee D, Cascino T, Buckner J, Fulton D, Dropcho E, Stewart D, Schold C, Jr., et al (1994) Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 12:2013-2021
21. Cairncross JG, Macdonald DR (1988) Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol* 23:360-364
22. Cairncross JG, Macdonald DR, Ludwin S (1994) Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. *J Clin Oncol* 12:2013-2021
23. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, et al (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90:1473-1479
24. Caron H, van Sluis P, van Hoesve M, de Kraker J, Bras J, Slater R, Mannens M, Voute PA, Westerveld A, Versteeg R (1993) Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nat Genet* 4:187-190
25. Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK (2000) A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res* 60:2836-2839.
26. Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Rustgi AK (1999) Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 117:831-837.
27. Chahlavi A, Kanner A, Peereboom D, Staugaitis SM, Elson P, Barnett G (2003) Impact of chromosome 1p status in response of oligodendroglioma to temozolomide: preliminary results. *J Neurooncol* 61:267-273
28. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK (1997) Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 79:1381-1393
29. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK (1996) Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 56:2405-2410
30. Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, Su Huang HJ, Cavenee WK (1997) Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res* 57:1250-1254

31. Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN, Holland EC (2001) PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev* 15:1913-1925
32. de Stahl TD, Hartmann C, de Bustos C, Piotrowski A, Benetkiewicz M, Mantripragada KK, Tykewinski T, von Deimling A, Dumanski JP (2005) Chromosome 22 tiling-path array-CGH analysis identifies germ-line- and tumor-specific aberrations in patients with glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* 44:161-169
33. De Vitis LR, Tedde A, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Bigozzi U, Montali E, Papi L (1996) Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 97:632-637
34. Desmeules M, Mikkelsen T, Mao Y (1992) Increasing incidence of primary malignant brain tumors: influence of diagnostic methods. *J Natl Cancer Inst* 84:442-445
35. Di Rocco F, Carroll RS, Zhang J, Black PM (1998) Platelet-derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 42:341-346
36. Diedrich U, Soja S, Behnke J, Zoll B (1991) Amplification of the c-erbB oncogene is associated with malignancy in primary tumours of neuroepithelial tissue. *J Neurol* 238:221-224
37. Dong SM, Pang JC, Poon WS, Hu J, To KF, Chang AR, Ng HK (2001) Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:808-816
38. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, et al (1998) PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 16:2259-2264
39. Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP, Nordenskjold M (1987) Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9275-9279
40. Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M, Collins VP (1990) Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 50:5863-5867
41. Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU (1992) Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 52:4550-4553
42. Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Souter HM, et al (2000) Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nature* 24:300-303.
43. George D (2001) Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol* 28:27-33
44. Giani C, Finocchiaro G (1994) Mutation rate of the CDKN2 gene in malignant gliomas. *Cancer Res* 54:6338-6339
45. Gomi A, Sakai R, Ogawa S, Shinoda S, Hirai H, Masuzawa T (1995) Frequent loss of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in human gliomas. *Jpn J Cancer Res* 86:342-346
46. Graham DI, Lantos PL (1997) *Greenfield's Neuropathology*. Arnold: London.
47. Greenfield JG, Graham DI, Lantos PL (1997) *Greenfield's Neuropathology*. Arnold ; Oxford University Press: London, New York.

48. Greig NH, Ries LG, Yancik R, Rapoport SI (1990) Increasing annual incidence of primary malignant brain tumors in the elderly. *J Natl Cancer Inst* 82:1621-1624
49. Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD (1995) Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *Int J Cancer* 60:168-173
50. Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Newsham IF (2000) Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 9:1495-1500
51. Gutmann DH, Hirbe AC, Huang ZY, Haipek CA (2001) The protein 4.1 tumor suppressor, DAL-1, impairs cell motility, but regulates proliferation in a cell-type-specific fashion. *Neurobiol Dis* 8:266-278
52. Hama S, Sadatomo T, Yoshioka H, Kurisu K, Tahara E, Naruse I, Heike Y, Saijo N (1997) Transformation of human glioma cell lines with the p16 gene inhibits cell proliferation. *Anticancer Res* 17:1933-1938
53. Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, Maher ER (1996) Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg* 84:847-851
54. Hartmann C, Bartels G, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A (2005) PIK3CA mutations in Glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 109:639-642
55. Hartmann C, Johnk L, Kitange G, Wu Y, Ashworth LK, Jenkins RB, Louis DN (2002) Transcript map of the 3.7-Mb D19S112-D19S246 candidate tumor suppressor region on the long arm of chromosome 19. *Cancer Res* 62:4100-4108
56. Hartmann C, Johnk L, Sasaki H, Jenkins RB, Louis DN (2002) Novel PLA2G4C polymorphism as a molecular diagnostic assay for 19q loss in human gliomas. *Brain Pathol* 12:178-182
57. Hartmann C, Kluwe L, Lucke M, Westphal M (1999) The rate of homozygous CDKN2A/p16 deletions in glioma cell lines and in primary tumors. *Int J Oncol* 15:975-982
58. Hartmann C, Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S, von Deimling A (2005) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:10-14
59. Hartmann C, Mueller W, Lass U, Stockhammer F, von Eckardstein K, Veelken J, Jeuken J, Wick W, von Deimling A (2003) No preferential loss of paternal 19q alleles in oligodendroglial tumors. *Ann Neurol* 54:256-258
60. Hartmann C, Mueller W, von Deimling A (2004) Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors. *J Mol Med* 82:638-655
61. Hartmann C, Numann A, Mueller W, Holtkamp N, Simon M, von Deimling A (2004) Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. *Int J Cancer* 108:839-844
62. Hartmann C, von Deimling A (2005) Oligodendrogliomas: Impact of molecular genetics on treatment. *Neurol India* 53:140-148
63. Hartmann C, Xu X, Bartels G, Holtkamp N, Gonzales IA, Tallen G, Von Deimling A (2004) Pdgfr-alpha in 1p/19q LOH oligodendrogliomas. *Int J Cancer*
64. Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K (2003) Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. *Cancer* 97:2254-2261

65. He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS, 3rd, James CD (1994) CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 54:5804-5807
66. He J, Olson JJ, James CD (1995) Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer Res* 55:4833-4836
67. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, et al (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997-1003
68. Heinrich B, Hartmann C, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, MacCollin M (2003) Multiple meningiomas: Investigating the molecular basis of sporadic and familial forms. *Int J Cancer* 103:483-488
69. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, et al (2003) PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299:708-710
70. Helseth A, Mork SJ (1989) Neoplasms of the central nervous system in Norway. III. Epidemiological characteristics of intracranial gliomas according to histology. *Apmis* 97:547-555
71. Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M (1992) Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52:3213-3219
72. Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermark B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, et al (1996) 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
73. Hoang-Xuan K, Merel P, Vega F, Hugot JP, Cornu P, Delattre JY, Poisson M, Thomas G, Delattre O (1995) Analysis of the NF2 tumor-suppressor gene and of chromosome 22 deletions in gliomas. *Int J Cancer* 60:478-481
74. Hogarty MD, Winter CL, Liu X, Guo C, White PS, Look AT, Brodeur GM, Maris JM (2002) No Evidence for the Presence of an Imprinted Neuroblastoma Suppressor Gene within Chromosome Sub-Band 1p36.3. *Cancer Res* 62:6481-6484
75. Huang B, Starostik P, Kuhl J, Tonn JC, Roggendorf W (2002) Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 103:415-420
76. Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP (2000) 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
77. Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP (1996) Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13:1065-1072
78. Iida A, Kurose K, Isobe R, Akiyama F, Sakamoto G, Yoshimoto M, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M (1998) Mapping of a new target region of allelic loss to a 2-cM interval at 22q13.1 in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 21:108-112.
79. Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Ramsay DA, Cairncross JG, Louis DN (2001) Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res* 7:839-845

80. Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, Nishikawa R, Matsutani M, von Deimling A, Louis DN (1999) Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:881-885.
81. Ino Y, Wahrer DC, Bell DW, Haber DA, Louis DN (2000) Mutation analysis of the hCHK2 gene in primary human malignant gliomas. *Neurogenetics* 3:45-46
82. Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Jhung S, Ramsay DA, von Deimling A, Louis DN, Cairncross JG (2000) Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. *J Neurosurg* 92:983-990
83. Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Well RO (2002) *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours*. Churchill Livingstone: London.
84. Izumoto S, Arita N, Ohnishi T, Hiraga S, Taki T, Hayakawa T (1995) Homozygous deletions of p16INK4A/MTS1 and p15INK4B/MTS2 genes in glioma cells and primary glioma tissues. *Cancer Lett* 97:241-247
85. Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A (1986) Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol* 25:233-242
86. James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK (1988) Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48:5546-5551
87. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54:6353-6358
88. Jeuken JW, Nelen MR, Vermeer H, van Staveren WC, Kremer H, van Overbeeke JJ, Boerman RH (2000) PTEN mutation analysis in two genetic subtypes of high-grade oligodendroglial tumors. PTEN is only occasionally mutated in one of the two genetic subtypes. *Cancer Genet Cytogenet* 119:42-47
89. Jeuken JW, Sprenger SH, Wesseling P, Macville MV, von Deimling A, Teepen HL, van Overbeeke JJ, Boerman RH (1999) Identification of subgroups of high-grade oligodendroglial tumors by comparative genomic hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:606-612
90. Jukich PJ, McCarthy BJ, Surawicz TS, Freels S, Davis FG (2001) Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994. *Neuro-oncol* 3:141-151
91. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS, 3rd, Johnson BE, Skolnick MH (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436-440.
92. Kedra D, Peyrard M, Fransson I, Collins JE, Dunham I, Roe BA, Dumanski JP (1996) Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (CLH-22) from chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 5:625-631
93. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
94. Kleihues P, Cavenee WK (2000) *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. IARC Press: Lyon.
95. Knobbe CB, Reifenberger G (2003) Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* 13:507-518

96. Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G (2005) Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:486-490
97. Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-823
98. Kraus JA, de Millas W, Sorensen N, Herbold C, Schichor C, Tonn JC, Wiestler OD, von Deimling A, Pietsch T (2001) Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from hSNF5/INI1. *Acta Neuropathol (Berl)* 102:69-74
99. Kraus JA, Glesmann N, Beck M, Krex D, Klockgether T, Schackert G, Schlegel U (2000) Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 48:89-94
100. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:91-95
101. Kros JM, van Run PR, Alers JC, Beverloo HB, van den Bent MJ, Avezaat CJ, van Dekken H (1999) Genetic aberrations in oligodendroglial tumours: an analysis using comparative genomic hybridization (CGH). *J Pathol* 188:282-288
102. Lamszus K (2004) Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:275-286
103. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
104. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005) PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 24:1477-1480
105. Legler JM, Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS (1999) Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 91:1382-1390
106. Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeyer A, van Drunen E, Bootsma D, Koper JW, Avezaat CJ, Kley N, et al (1994) Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 54:1022-1029
107. Lekanne Deprez RH, Riegman PH, Groen NA, Warringa UL, van Biezen NA, Molijn AC, Bootsma D, de Jong PJ, Menon AG, Kley NA, et al (1995) Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene* 10:1521-1528
108. Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP (1994) Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 56:354-357
109. Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann DH, Perry A (2005) Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res* 65:7121-7126
110. Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, Bouman D, Li Y, Mehta PK, Nizetic D, et al (2001) Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet* 28:220-221

111. Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D, Stangl AP, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, et al (1997) Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:1098-1104.
112. Mallory FB (1914) *Principles of Pathologic Histology*. Saunders: Philadelphia.
113. Maxwell M, Shih SD, Galanopoulos T, Hedley-Whyte ET, Cosgrove GR (1998) Familial meningioma: analysis of expression of neurofibromatosis 2 protein Merlin. Report of two cases. *J Neurosurg* 88:562-569
114. Meese E, Blin N, Zang KD (1987) Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 77:349-351
115. Merel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Moreau-Aubry A, Bijlsma EK, Lazaro C, Moisan JP, Resche F, Nishisho I, Estivill X, et al (1995) Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 13:211-216
116. Miyakawa A, Wang XL, Nakanishi H, Imai FL, Shiiba M, Miya T, Imai Y, Tanzawa H (1998) Allelic loss on chromosome 22 in oral cancer: possibility of the existence of a tumor suppressor gene on 22q13. *Int J Oncol* 13:705-709.
117. Mora J, Cheung NK, Chen L, Qin J, Gerald W (2001) Loss of heterozygosity at 19q13.3 is associated with locally aggressive neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 7:1358-1361.
118. Mork SJ, Lindegaard KF, Halvorsen TB, Lehmann EH, Solgaard T, Hatlevoll R, Harvei S, Ganz J (1985) Oligodendroglioma: incidence and biological behavior in a defined population. *J Neurosurg* 63:881-889
119. Moulton T, Samara G, Chung WY, Yuan L, Desai R, Sisti M, Bruce J, Tycko B (1995) MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 146:613-619
120. Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, et al (2002) Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *Am J Pathol* 161:313-319
121. Muhammad AK, Yoshimine T, Maruno M, Tokiyoshi K, Takemoto O, Hayakawa T (1997) Chromosome 22q allelic losses at microsatellite loci in human astrocytic tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 37:606-610; discussion 611
122. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001) p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 11:159-168
123. Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavenee WK, Su Huang HJ (1995) Loss of P16INK4 expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res* 55:1941-1945
124. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-756.
125. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, et al (2003) Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 63:1602-1607
126. Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Holl T, Wiestler OD, Kleihues P (1993) Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog* 8:74-80
127. Ohgaki H, Eibl RH, Wiestler OD, Yasargil MG, Newcomb EW, Kleihues P (1991) p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res* 51:6202-6205

128. Oskam NT, Bijleveld EH, Hulsebos TJ (2000) A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression. *Int J Cancer* 85:336-339
129. Papi L, De Vitis LR, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, Bigozzi U (1995) Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 95:347-351
130. Park CC, Hartmann C, Folkerth R, Loeffler JS, Wen PY, Fine HA, Black PM, Shafman T, Louis DN (2000) Systemic metastasis in glioblastoma may represent the emergence of neoplastic subclones. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:1044-1050
131. Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, Swanson PE, Lohse CM, Newsham IF, Weaver A, Gutmann DH (2000) Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:872-879
132. Perry A, Giannini C, Raghavan R, Scheithauer BW, Banerjee R, Margraf L, Bowers DC, Lytle RA, Newsham IF, Gutmann DH (2001) Aggressive phenotypic and genotypic features in pediatric and NF2-associated meningiomas: a clinicopathologic study of 53 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:994-1003
133. Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G (2004) Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 70:183-202
134. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC (1999) "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 85:2046-2056
135. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM (1997) Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol* 21:1455-1465
136. Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B, Hayashi Y, Meyer-Puttlitz B, Duerr EM, Lenartz D, Marsh DJ, Schramm J, Wiestler OD, et al (1998) Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24:3-8
137. Peyrard M, Pan HQ, Kedra D, Fransson I, Swahn S, Hartman K, Clifton SW, Roe BA, Dumanski JP (1996) Structure of the promoter and genomic organization of the human beta'-adaptin gene (BAM22) from chromosome 22q12. *Genomics* 36:112-117
138. Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordqvist AC, Xie YG, Han FY, Fransson I, Collins J, Dunham I, Kost-Alimova M, Imreh S, et al (1999) The human LARGE gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:598-603
139. Probst-Cousin S, Villagran-Lillo R, Lahl R, Bergmann M, Schmid KW, Gullotta F (1997) Secretory meningioma: clinical, histologic, and immunohistochemical findings in 31 cases. *Cancer* 79:2003-2015
140. Pulst SM, Rouleau GA, Marineau C, Fain P, Sieb JP (1993) Familial meningioma is not allelic to neurofibromatosis 2. *Neurology* 43:2096-2098
141. Rahnenfuhrer J, Beerenwinkel N, Schulz WA, Hartmann C, von Deimling A, Wullich B, Lengauer T (2005) Estimating cancer survival and clinical outcome based on genetic tumor progression scores. *Bioinformatics* 21:2438-2446
142. Ransom DT, Ritland SR, Kimmel DW, Moertel CA, Dahl RJ, Scheithauer BW, Kelly PJ, Jenkins RB (1992) Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 5:348-356.
143. Rasheed A, Herndon JE, Stenzel TT, Raetz JG, Kendelhardt J, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE (2002) Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. *Cancer* 94:2688-2697

144. Reifenberger G, Collins VP (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82:656-670
145. Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:111-126
146. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP (1994) 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
147. Reifenberger J, Reifenberger G, Ichimura K, Schmidt EE, Wechsler W, Collins VP (1996) Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol* 149:29-35
148. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 145:1175-1190
149. Rey JA, Bello MJ, Jimenez-Lara AM, Vaquero J, Kusak ME, de Campos JM, Sarasa JL, Pestana A (1992) Loss of heterozygosity for distal markers on 22q in human gliomas. *Int J Cancer* 51:703-706
150. Riemenschneider MJ, Buschges R, Wolter M, Reifenberger J, Bostrom J, Kraus JA, Schlegel U, Reifenberger G (1999) Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res* 59:6091-6096
151. Robb VA, Li W, Gascard P, Perry A, Mohandas N, Gutmann DH (2003) Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis. *Neurobiol Dis* 13:191-202
152. Robinson S, Cohen M, Prayson R, Ransohoff RM, Tabrizi N, Miller RH (2001) Constitutive expression of growth-related oncogene and its receptor in oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 48:864-873; discussion 873-864
153. Rosenberg JE, Lisle DK, Burwick JA, Ueki K, von Deimling A, Mohrenweiser HW, Louis DN (1996) Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval. *Oncogene* 13:2483-2485.
154. Rubio MP, Correa KM, Ramesh V, MacCollin MM, Jacoby LB, von Deimling A, Gusella JF, Louis DN (1994) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res* 54:45-47.
155. Rubio MP, Correa KM, Ueki K, Mohrenweiser HW, Gusella JF, von Deimling A, Louis DN (1994) The putative glioma tumor suppressor gene on chromosome 19q maps between APOC2 and HRC. *Cancer Res* 54:4760-4763.
156. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, et al (1994) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6:180-184
157. Rutledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP (1994) Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 10:122-130
158. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstrom PO, Mansukhani M, Enoksson J, et al (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 65:2554-2559
159. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, et al (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304:554

160. Sanson M, Leuraud P, Aguirre-Cruz L, He J, Marie Y, Cartalat-Carel S, Mokhtari K, Duffau H, Delattre JY, Hoang-Xuan K (2002) Analysis of loss of chromosome 10q, DMBT1 homozygous deletions, and PTEN mutations in oligodendrogliomas. *J Neurosurg* 97:1397-1401
161. Sanson M, Leuraud P, Marie Y, Delattre JY, Hoang-Xuan K (2002) Preferential loss of paternal 19q, but not 1p, alleles in oligodendrogliomas. *Ann Neurol* 52:105-107
162. Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Ino Y, Cairncross JG, Louis DN (2001) PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol* 159:359-367
163. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP (1994) CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54:6321-6324
164. Schmitz U, Mueller W, Weber M, Sevenet N, Delattre O, von Deimling A (2001) INI1 mutations in meningiomas at a potential hotspot in exon 9. *Br J Cancer* 84:199-201.
165. Schrock E, Blume C, Meffert MC, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M, Lozanowa T, Thiel G, Witkowski R, Ried T, et al (1996) Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 15:199-205
166. Sevenet N, Lellouch-Tubiana A, Schofield D, Hoang-Xuan K, Gessler M, Birnbaum D, Jeanpierre C, Jouvet A, Delattre O (1999) Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 8:2359-2368
167. Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G, Hosek SM, Kimmel D, O'Fallon J, Yates A, et al (1999) Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 18:4144-4152.
168. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, et al (2000) Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 18:636-645
169. Smith JS, Tachibana I, Lee HK, Qian J, Pohl U, Mohrenweiser HW, Borell TJ, Hosek SM, Soderberg CL, von Deimling A, et al (2000) Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer* 29:16-25.
170. Smith JS, Wang XY, Qian J, Hosek SM, Scheithauer BW, Jenkins RB, James CD (2000) Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:495-503
171. Srivenugopal KS, Ali-Osman F (1996) Deletions and rearrangements inactivate the p16INK4 gene in human glioma cells. *Oncogene* 12:2029-2034
172. Stander M, Peraud A, Leroy B, Kreth FW (2004) Prognostic impact of TP53 mutation status for adult patients with supratentorial World Health Organization Grade II astrocytoma or oligoastrocytoma: a long-term analysis. *Cancer* 101:1028-1035
173. Stangl AP, Wellenreuther R, Lenartz D, Kraus JA, Menon AG, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A (1997) Clonality of multiple meningiomas. *J Neurosurg* 86:853-858
174. Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Nakamura H, Hirano H, Kuratsu J, Kochi M, Saya H, Ushio Y (2001) Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. *J Neurosurg* 95:651-659

175. Thiessen B, Maguire JA, McNeil K, Huntsman D, Martin MA, Horsman D (2003) Loss of heterozygosity for loci on chromosome arms 1p and 10q in oligodendroglial tumors: relationship to outcome and chemosensitivity. *J Neurooncol* 64:271-278
176. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1998) PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:684-689
177. Turgut M, Palaoglu S, Ozcan OE, Gurcay O, Eryilmaz M (1997) Multiple meningiomas of the central nervous system without the stigmata of neurofibromatosis. Clinical and therapeutic study. *Neurosurg Rev* 20:117-123
178. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, Fujimaki T, Hojo S, Kubo O, Ide T, et al (2002) Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 8:196-201
179. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efrid JT, von Deimling A, Louis DN (1996) CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56:150-153
180. Uhrbom L, Hesselager G, Nister M, Westermark B (1998) Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* 58:5275-5279
181. Van Den Bent MJ, Looijenga LH, Langenberg K, Dinjens W, Graveland W, Uytendewilligen L, Sillevius Smitt PA, Jenkins RB, Kros JM (2003) Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer* 97:1276-1284
182. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
183. Virchow R (1863) *Die Krankhaften Geschwulste*. Hirschwald: Berlin.
184. von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC, Bender B, Fassbender F, Nagel J, Jahnke R, Kaskel P, Duerr EM, Koopmann J, et al (2000) Comprehensive allelotyping and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:544-558
185. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR (1992) Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res* 52:4277-4279.
186. von Deimling A, Nagel J, Bender B, Lenartz D, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD (1994) Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int J Cancer* 57:676-680
187. Walker DG, Duan W, Popovic EA, Kaye AH, Tomlinson FH, Lavin M (1995) Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas. *Cancer Res* 55:20-23
188. Wang JL, Zhang ZJ, Hartman M, Smits A, Westermark B, Muhr C, Nister M (1995) Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer* 64:223-228
189. Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R (1997) Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 57:4183-4186
190. Watanabe K, Peraud A, Gratas C, Wakai S, Kleihues P, Ohgaki H (1998) p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 95:559-564

191. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6:217-223; discussion 223-214
192. Watanabe T, Nakamura M, Kros JM, Burkhard C, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2002) Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 103:267-275
193. Watanabe T, Yokoo H, Yokoo M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001) Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1181-1189
194. Watkins D, Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Poisson M, Delattre JY, Rouleau GA (1996) Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human gliomas does not inactivate the neurofibromatosis type 2 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 92:73-78
195. Weber M, Stockhammer F, Schmitz U, von Deimling A (2001) Mutational analysis of INI1 in sporadic human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 101:479-482
196. Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14719-14724
197. Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiessling M, Cremer T (1996) Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 13:983-994
198. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Westler OD, von Deimling A (1995) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146:827-832
199. Wessels PH, Twijnstra A, Kessels AG, Krijne-Kubat B, Theunissen PH, Ummelen MI, Ramaekers FC, Hopman AH (2002) 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
200. Westermark B, Heldin CH, Nister M (1995) Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* 15:257-263
201. Wild A, Langer P, Ramaswamy A, Chaloupka B, Bartsch DK (2001) A novel insulinoma tumor suppressor gene locus on chromosome 22q with potential prognostic implications. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5782-5787
202. Wolf RM, Draghi N, Liang X, Dai C, Uhrbom L, Eklof C, Westermark B, Holland EC, Resh MD (2003) p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3. *Genes Dev* 17:476-487
203. Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP, Reifenberger G (2001) Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1170-1180
204. Wong AJ, Zoltick PW, Moscatello DK (1994) The molecular biology and molecular genetics of astrocytic neoplasms. *Semin Oncol* 21:139-148
205. Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP, et al (1997) Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 57:2369-2372

206. Yong WH, Chou D, Ueki K, Harsh GRt, von Deimling A, Gusella JF, Mohrenweiser HW, Louis DN (1995) Chromosome 19q deletions in human gliomas overlap telomeric to D19S219 and may target a 425 kb region centromeric to D19S112. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:622-626
207. Zang KD (1982) Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 6:249-274
208. Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14:167-169
209. Zhu JJ, Santarius T, Wu X, Tsong J, Guha A, Wu JK, Hudson TJ, Black PM (1998) Screening for loss of heterozygosity and microsatellite instability in oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 21:207-216
210. Zlatescu MC, TehraniYazdi A, Sasaki H, Megyesi JF, Betensky RA, Louis DN, Cairncross JG (2001) Tumor location and growth pattern correlate with genetic signature in oligodendroglial neoplasms. *Cancer Res* 61:6713-6715
211. Zucman-Rossi J, Legoix P, Thomas G (1996) Identification of new members of the Gas2 and Ras families in the 22q12 chromosome region. *Genomics* 38:247-254
212. Zülch KJ (1957) *Brain tumors; their biology and pathology*. Springer: New York,.
213. Zülch KJ (1986) *Brain tumors : their biology and pathology*. Springer-Verlag: Berlin ; New York.
214. Zülch KJ, World Health Organization. (1979) *Histological typing of tumours of the central nervous system*. World Health Organization: Geneva.

## Verzeichnis eigener Publikationen

### a.1) Erstautorenschaften in Zeitschriften mit peer-review System

	Publikation	IF
1	<b>Hartmann C</b> , Kluwe L, Lucke M, Westphal M.; The rate of homozygous CDKN2A/p16 deletions in glioma cell lines and in primary tumors. <i>Int J Oncol.</i> 1999 Nov;15(5):975-82	1.381
2	Park CC*, <b>Hartmann C*</b> , Folkherth R, Loeffler JS, Wen PY, Fine HA, Black PM, Shafman T, Louis DN.; Systemic metastasis in glioblastoma may represent the emergence of neoplastic subclones. <i>J Neuropathol Exp Neurol.</i> 2000 Dec;59(12):1044-50.	5.565
3	<b>Hartmann C*</b> , Johnk L*, Sasaki H, Jenkins RB, Louis DN.; Novel PLA2G4C polymorphism as a molecular diagnostic assay for 19q loss in human gliomas. <i>Brain Pathol.</i> 2002 Apr;12(2):178-82.	5.652
4	<b>Hartmann C</b> , Johnk L, Kitange G, Wu Y, Ashworth LK, Jenkins RB, Louis DN.; Transcript map of the 3.7-Mb D19S112-D19S246 candidate tumor suppressor region on the long arm of chromosome 19. <i>Cancer Res.</i> 2002 Jul 15;62(14):4100-8.	8.318
5	<b>Hartmann C</b> , Mueller W, Lass U, Stockhammer F, von Eckardstein K, Veelken J, Jeuken J, Wick W, von Deimling A.; No preferential loss of paternal 19q alleles in oligodendroglial tumors. <i>Ann Neurol.</i> 2003 Aug;54(2):256-8.	7.717
6	<b>Hartmann C</b> , Numann A, Mueller W, Holtkamp N, Simon M, von Deimling A.; Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. <i>Int J Cancer.</i> 2004 Mar 1;108(6):839-44.	4.416
7	<b>Hartmann C</b> , Xu X, Bartels G, Holtkamp N, Atallah-Gonzales I, Tallen G, von Deimling A; PDGFR-a in 1p/19q LOH Oligodendrogliomas. <i>Int J Cancer.</i> 2004 Dec 20;112(6):1081-2.	4.416
8	<b>Hartmann C</b> , Bartels G, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A; PIK3CA mutations in Glioblastoma multiforme. <i>Acta Neuropathol.</i> 2005 Jun;109(6):639-42. Epub 2005 May 28.	2.503 <sup>+</sup>
9	<b>Hartmann C</b> , Sieberns J, Gehlhaar C, Simon M, Paulus W, von Deimling A; NF2 mutations in secretory and other rare variants of meningiomas. <i>Brain</i>	3.958 <sup>+</sup>

---

Pathol., <http://brainpathology.com/brainpath/abstracts/vol16/1601/1601ab0002.html>

---

- Hartmann C**, Devermann L, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A;  
**10** PIK3CA mutations in oligodendroglial tumors. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, in 3.402<sup>+</sup> press.

### **a.2) Koautorenschaften in Zeitschriften mit peer-review System**

<b>Publikation</b>	<b>IF</b>
<b>11</b> Beckmann A, <b>Hartmann C</b> , Schroder J.M.; DDD-PCR for the gene dosage determination of PMP22 in DNA from long-term stored, paraffin embedded tissue. <i>J Peripher Nerv Syst.</i> 2000 4: 285-6.	1.038
<b>12</b> Mueller W, <b>Hartmann C</b> , Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A.; Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. <i>Am J Pathol.</i> 2002 Jul;161(1):313-9.	6.750
<b>13</b> Heinrich B, <b>Hartmann C</b> , Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, MacCollin M.; Multiple meningiomas: Investigating the molecular basis of sporadic and familial forms. <i>Int J Cancer.</i> 2003 Feb 10;103(4):483-8.	4.375
<b>14</b> Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, <b>Hartmann C</b> , McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN. ; Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. <i>Cancer Res.</i> 2003 Apr 1;63(7):1602-7.	8.649
<b>15</b> Holtkamp N, Mautner VF, Friedrich RE, Harder A, <b>Hartmann C</b> , Theallier-Janko A, Hoffmann KT, von Deimling A.; Differentially expressed genes in neurofibromatosis 1-associated neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors. <i>Acta Neuropathol (Berl).</i> 2004 Feb;107(2):159-68. Epub 2003 Dec 13.	2.556
<b>16</b> Tallen G, Kaiser I, Krabbe S, Lass U, <b>Hartmann C</b> , Henze G, Riabowol K, von Deimling A.; No ING1 mutations in human brain tumours but reduced expression in high malignancy grades of astrocytoma. <i>Int J Cancer.</i> 2004 Apr 10;109(3):476-9.	4.416

17	Holtkamp N, Reuss DE, Atallah-Gonzales I, Kuban RJ, <b>Hartmann C</b> , Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, Algermissen B, Pham V, Prietz S, Rosenbaum T, Estevez-Schwarz L, , von Deimling A; Subclassification of nerve sheath tumors by gene expression profiling. <i>Brain Pathol.</i> 2004 Jul;14(3):258-64.	3.958
18	Rahmenfuhrer J, Beerenwinkel N, Schulz WA, <b>Hartmann C</b> , von Deimling A, Wullich B, Lengauer T; Estimating cancer survival and clinical outcome based on genetic tumor progression scores. <i>Bioinformatics.</i> 2005 Feb 18.	5.742 <sup>+</sup>
19	de Stahl TD, <b>Hartmann C</b> , de Bustos C, Piotrowski A, Benetkiewicz M, Mantripragada KK, Tykwiniski T, von Deimling A, Dumanski JP; Chromosome 22 tiling-path array-CGH analysis identifies germ-line- and tumor-specific aberrations in patients with glioblastoma multiforme. <i>Genes Chromosomes Cancer.</i> 2005 Jun 8.	4.276 <sup>+</sup>
20	Wemmert S, Ketter R, Rahmenfuhrer J, Beerenwinkel N, Strowitzki M, Feiden W, <b>Hartmann C</b> , Lengauer T, Stockhammer F, Zang KD, Meese E, Steudel W-I, von Deimling A, Urbschat S; Patients with high grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment, <i>Neoplasia.</i> 2005 Oct;7(10):883-93	4.377 <sup>+</sup>
21	Holtkamp N, Ocuducu AF, Mucha J, Afanasieva A, <b>Hartmann C</b> , Atallah I, Estevez-Schwarz L, Mawrin C, Friedrich RE, Mautner VF, von Deimling A; Mutation and expression of PDGFRA and KIT in malignant peripheral nerve sheath tumours, and its implications for imatinib sensitivity. <i>Carcinogenesis.</i> <a href="http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/reprint/bgi273v1">http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/reprint/bgi273v1</a>	5.375
22	Tews B, Felsberg J, <b>Hartmann C</b> , Kunitz A, Hahn M, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P; Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. <i>Int J Cancer</i> , in press.	4.416 <sup>+</sup>

### c) **Übersichtsarbeiten**

	<b>Publikation</b>	<b>IF</b>
<b>23</b>	<b>Hartmann C</b> , Mueller W, von Deimling A; Pathology and Molecular Genetics of Oligodendroglial Tumors. J Mol Med. 2004 Oct;82(10):638-55. Review	4.256 <sup>+</sup>
<b>24</b>	<b>Hartmann C</b> , Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S, von Deimling A; Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors. J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Jan;64(1):10-4.	5.037 <sup>+</sup>
<b>25</b>	<b>Hartmann C</b> , von Deimling A; Oligodendrogliomas - impact of molecular genetics on treatment. Neurol India. 2005 Apr-Jun;53(2):140-8. Review	0.339 <sup>+</sup>

IF: Impact Faktor  
\*: gemeinsame Erstauthorenschaft  
+: Impact Faktor des Jahres 2004

# Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift